

최 중  
연구보고서

GOVP 12010392

bmg.1  
L 293 2

**초미세구 Bifidobacteria를 함유한  
유제품의 개발**

Development of Dairy Products Containing  
Bifidobacteria Microparticles

연구기관  
강원대학교

농림부



[별지 제7호 서식]

## 최종보고서

1996 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 초미세구  
Bifidobacteria를 함유한 유제품의 개발에 관한 연구에 관한 연구의  
최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 2매

1999 . 10 . 27 .

주관연구기관 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 고준수 (인)

주관연구기관장 : 강원대학교 총장 직인

농림부장관 귀하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "초미세구 Bifidobacteria를 함유한 유제품의 개발에 관한 연구" 과제 ( 제1세부과제 : Bifidobacteria의 배양법과 유제품의 개발, 제2세부과제 : Bifidobacteria 초미세구의 제조 및 평가, 제3세부과제 : 장내의 면역기능에 대한 Bifidobacteria의 효과, 협동연구과제 : Bifidobacteria의 생체내 활성연구에 관한 연구 )의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10 . 27 .

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 고 준 수

연 구 원 : 이 범 진

연 구 원 : 김 명 현

연 구 원 : 박 승 용

연 구 원 : 최 경 호

연 구 원 : 김 완 섭

연 구 원 : 고 은 주

연 구 원 : 장 규 대

협동연구기관명 : 상지대학교

협동연구책임자 : 최 석 호

연 구 원 : 권 우 혁

# 요 약 문

- I. 제 목 : 총괄제목 : 초미세구 Bifidobacteria를 함유한 유제품의 개발  
제1세부과제 : Bifidobacteria의 배양법과 유제품의 개발  
제2세부과제 : Bifidobacteria 초미세구의 제조 및 평가  
제3세부과제 : 장내의 면역기능에 대한 Bifidobacteria의 효과  
협동연구과제 : Bifidobacteria의 생체 내 활성 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

Bifidobacteria는 유해 미생물의 증식억제, 면역기능의 강화, 항암 및 cholesterol 저하 효과 등 많은 건강 증진 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며 이러한 기능적 특성을 최대한 발휘하기 위하여 내산성과 안전성을 향상시킬 수 있는 미세 캡슐로 제조하여 그 생물학적 기능을 검증하고 bifidobacteria의 이용성을 향상시키며 부가 가치가 높은 유제품을 개발하는 것이 매우 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 아래와 같이 세 부과제별로 연구를 수행하였다.

1. 제1세부과제 : Bifidobacteria를 초미세구로 제조하여 다양한 유제품을 개발하고 이를 산업적으로 이용하기 위하여서는 먼저 우수한 bifidobacteria를 선정하고 저렴한 가격으로 대량 생산할 수 있어야 한다. 본 시험에 사용하기 위한 우수한 bifidobacteria로 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7을 선정하였으며, MRS broth와 whey를 기초로 한 배지에서 최대의 활성을 갖도록 배양하여 초미세구로 제조하였으며 다양한 유제품 개발에 효과적으로 이용할 수 있는 방법을 모색하였다.

2. 제2세부과제 : Bifidobacteria는 혐기성 발효 균주로 보존 중 또는 복용시 강한 위산을 통과할 때 대부분 사멸하게 되어 장에 도달할 때 까지

생존율이 극히 불량하다. 따라서 보존 중 bifidobacteria의 안정성을 높이고 특히 유제품 중에 함유된 유산균을 복용시 위를 통과하여 장에서 이용될 수 있도록 특수하게 제조된 유산균 함유 제품을 제조하는 것이 매우 필요하다.

본 연구의 목적은 공기분사방법을 활용하여 bifidobacteria를 함유하는 초미세구를 제조한 후 제조공정의 확립, 최적 성장 조건의 처방화, 인공위액 중 안정성과 내산성 등을 평가하고 사람에게 복용한 후 분변 중 장내 균총의 변화에 미치는 bifidobacteria 함유 초미세구의 효능을 평가하는 연구이다.

3. 제3세부과제 : *B. bifidum*을 비롯한 유산균이 면역기능을 향상시킨다고 추정되고 있지만 아직까지 장내 점막면역에 미치는 구체적인 기능에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 *B. bifidum*과 초미세구화된 *B. bifidum*의 면역활성 기능을 구체적으로 조사하였다.

4. 협동연구과제 : Bifidobacteria의 분자유전학적 동정과 생리적 성질에 관한 연구는 유용한 생균제 균주의 기초적 분류와 효율적 개발을 위하여 중요하다. 생균제 균주를 쥐에게 급여하여 분 내 균총과 혈청 cholesterol에 대한 영향을 조사하여 bifidobacteria의 생체 내 건강증진효과와 초미세구화에 의한 생균제 효과의 증대를 조사하였다.

이 연구의 목적은 bifidobacteria의 동정과 분류를 위한 분자유전학 방법을 개발함으로써 균주의 기본적인 명명과 분별을 체계화하는 것과 생균제로서의 중요한 생리적 성질을 가진 균주의 분포를 조사하고 유용한 생균제 균주를 개발하여서 초미세구 bifidobacteria의 제조에 사용하는 것이다. 또한 기존 생균제 균주와 개발된 균주를 초미세구화하여 쥐에게 투여하여 분변 균총의 변화와 혈청 cholesterol에 대한 초미세구화의 효과를 조사하는 것이 목적이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제 : 미세 캡슐을 제조하기 위하여 상업용으로 제조 판매되고 있는 *B. bifidum* Bb-11과 협동연구과제에서 우수한 bifidobacteria로 선발한 *B. bifidum* K-7을 초미세구 bifidobacteria를 함유한 유제품 개발 시험에 사용하는 bifidobacteria로 선정하였다. Bifidobacteria를 초미세구로 제조하여 다양한 유제품 개발에 이용하기 위하여서는 먼저 저렴한 가격의 배지로 bifidobacteria를 다량으로 배양 할 수 있는 방법이 모색 되어야 하며, 이 연구를 산업적으로 이용하는 데 필요한 bifidobacteria를 대량으로 생산하기 위하여 유청을 기초배지로 하여 케이신 단백질분해물과 분자량에 따라 분획된 펩타이드 및 yeast 첨가에 의한 bifidobacteria 생장 시험을 실시 하였으며 MRS broth와 비교 하였다.

*B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7을 미세 캡슐로 제조하기 위하여 최적 조건으로 배양, 활성화 시킨 다음, air atomization 방법으로 제조한 sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles를 시유·발효유 및 아이스크림에 첨가하여 부가 가치를 향상시킨 새로운 기능성 유제품을 개발하고자 하였다.

2. 제2세부과제 : 본 연구에서 수행한 연구 내용은 먼저 bifidobacteria 함유 초미세구를 air-atomization 기술을 사용하여 제조하였다. 즉 sodium alginate용액을 CaCl<sub>2</sub> 용액에 분사하여 형성되는 초미세구 제조 기술을 활용하여 bifidobacteria를 봉입하고 균주의 생존율을 최적화 할 수 있는 제조공정인자, 최적처방 조성 (배지 및 첨가제 등)을 고찰한 후 초미세구에 봉입된 균주의 내산성 및 안정성 실험을 평가하였으며 최종적으로 제품을 건강한 성인남성에게 투여한 후 분변 중에서의 장내 세균총의 변화에 미치는 영향을 고찰하여 bifidobacteria 함유 초미세구의 우수성과 유제품 첨가에 응용할 수 있는 체제를 구축하였다.

3. 제3세부과제 : 세균수의 결정 방법 정착, in vitro에서 bifidobacteria

에 의한 B cell의 활성화, 장내점막 B cell의 항체합성에 미치는 *B. bifidum*의 효과, *B. bifidum*의 경구투여 효과, *B. bifidum*의 항체합성 유도 성분의 분석, 초미세구 *B. bifidum*의 구강투여가 항체합성에 미치는 효과 및 *B. bifidum*의 cytokine 합성유도 효과 등에 대하여 연구하였다.

4. 협동연구과제 : 16S rDNA의 염기서열 및 단백질 형태를 이용한 분자유전학 기술을 이용하여 bifidobacteria의 동정과 분류방법을 개발하였다. Bifidobacteria 표준 균주를 비롯한 상업균주와 야생균주의 내산성, 내담즙성 및 장상피세포에 대한 흡착능력과 기작을 조사하였으며, 기존의 상업균주와 개발된 야생균주를 초미세구화하여 쥐에게 급여, 분균총과 혈청 콜레스테롤의 변화에 대하여 연구조사하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발결과

가. 제1세부과제 : 초미세구 bifidobacteria를 함유한 유제품을 제조개발하기 위하여 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7을 최적조건으로 배양 활성화시켜 sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles를 air atomization 방법으로 제조, 새로운 유제품 개발을 위하여 시유·발효유 및 아이스크림에 첨가하였다.

협동연구과제에서 우수한 bifidobacteria로 선발한 *B. bifidum* K-7에 대하여 L-cysteine·HCl 0.05%를 첨가한 MRS broth와 whey를 기본 배지로 하여 성장시험을 실시하였으며 *B. bifidum* Bb-11과 비교하였다. *B. bifidum* K-7을 MRS broth로 37℃에서 24시간 배양 하였을 때 적정산도는 *B. bifidum* K-7이 1.33%로 *B. bifidum* Bb-11의 1.84% 보다 약간 낮은 경향이 있었으나 생균수는 *B. bifidum* K-7이  $1.4 \times 10^9$  그리고 *B. bifidum* Bb-11이  $9.0 \times 10^9$ 으로 큰 차이가 없었으며, 배양 기간중 pH 저하에 있어서도 2종의 균주사이에 거의 차이가 없었다.

Whey를 기초로 한 배지에 whey protein isolate(WPI) 또는 yeast extract를 0.75% 첨가하였을 때에는 MRS broth에서와는 달리 *B. bifidum* K-7이 37°C에서 24시간 배양할 때 pH 5.20, 적정산도 0.33% 및 생균수  $1.7 \times 10^8$ 으로, *B. bifidum* Bb-11의 pH 4.03, 적정산도 0.64% 및 생균수  $1.9 \times 10^9$ 으로 현저하게 생존율이 떨어졌다.

시유는 12.7% 멸균탈지시유를 제조하여 사용하였고, 발효유는 상업용 yoghurt starter culture B-3로 yoghurt를 제조 사용하였으며, 아이스크림은 시판 아이스크림 믹스를 구입하여 아이스크림을 제조, 시험에 사용하였다. 멸균탈지시유, yoghurt 및 아이스크림 믹스 200ml에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 각각 5g씩 첨가하여 시유와 발효유는 4°C 그리고 아이스크림은 -20°C에서 저장, 16일 동안 생균수, pH 및 적정산도를 측정하였다. 멸균 탈지시유에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 첨가한 최초의 생균수는  $1.6 \times 10^7$ 과  $2.0 \times 10^5$ 이었으나 저장 16일에 각각  $5.8 \times 10^5$  및  $4.6 \times 10^3$ 으로 시험기간을 통하여 우수한 생존력을 유지할 수 있었으며 pH가 약간 저하되고 적정산도가 조금 증가하는 경향이 있었으나 큰 변화가 나타나지 않았으며 이와 같은 결과는 bifidobacteria를 함유한 bifidobacteria milk를 제조 개발할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

발효유에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7의 초미세구 첨가 효과를 보면 최초 pH와 적정산도는 각각 4.75와 0.8%이었으나 저장 16일에는 각각 pH가 4.62와 4.60 그리고 T.A가 1.07%와 1.02%로 크게 변화하지 않았으나 생균수는 *B. bifidum* Bb-11이 저장 4일에 그리고 *B. bifidum* K-7이 저장 8일에 거의 사멸한 것으로 나타났다.

아이스크림 믹스에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 첨가하여 아이스크림을 제조 -20°C에서 저장 시험한 결과 최초의 생균수는  $4.1 \times 10^6$ 과  $4.0 \times 10^5$ 이었으며 저장 16일에는 각각  $4.1 \times 10^5$  과  $3.1 \times 10^4$ 으로 큰 변화가 없었다. pH 및 적정산도의 변화에도 모두 큰 영향을 미치지 않았으며 이와 같은 결과는 bifidobacteria 초미세구를 함유한 아이스크림을 제조 개발할 수 있는 가능성이 충분히 있다고 판단된다.

나. 제2세부과제 : 공기분사법에 의한 bifidobacteria를 함유하는 초미세구의 제조시 최적 공정인자는 초미세구의 크기 및 형상에 대한 결과로부터 sodium alginate 1.5%, 유속은 8 ml/min, 압력은 0.75 bar이었으며 분사 시간은 7분이고 curing은 약 15분이었다. 형성된 초미세구는 구형에 가까운 구조이나 상당히 불규칙한 형성이었으며 표면은 매우 울퉁불퉁한 구조를 가지고 있었다. 입자의 크기는 약 80-90 $\mu$ m를 나타내었다. 한편 냉동 건조중 균주의 생존율을 최적화 하기 위한 다양한 첨가제를 연구하였으며 Starter culture 0.5g, Yeast extract 0.5g, Glycerol 5.0g, NaHSO<sub>3</sub> 0.5g, Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1.0g을 초미세구 제조시 가했을 때 최적의 생존율을 나타내었다. 또 초미세구의 slurry를 -37 $^{\circ}$ C에서 2시간 얼린 후 -55 $^{\circ}$ C에서 14시간 냉동 건조하는 최적 조건을 확립하였다.

봉입 처리하지 않은 bifidobacteria culture는 인공위액에서 120분 처리한 후 생균수는 10<sup>3</sup> cfu/g 이하로 급속히 감소하였으나 초미세구중의 bifidobacteria는 10<sup>7</sup> cfu/g의 높은 활력을 유지하였다. 봉입처리된 bifidobacteria는 낮은 pH에서도 생존율이 크게 저하되지 않고 내산성을 나타내었다. 한편 인공위액 처리시간에 따른 bifidobacteria의 생존율을 보면 30분에서 60분까지는 인공위액 처리전 보다 균주 활력은 현저한 차이가 없었으며 90분에서 120분 사이에는 일정하게 감소하는 경향을 보여주었으나 적어도 10<sup>7</sup> cfu/g의 높은 활력을 유지하였다. 초미세구중에 함유된 bifidobacteria를 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관시 2주까지는 10<sup>9</sup>- 10<sup>10</sup> cfu/g 수준의 높은 활력을 유지하였으며 16주까지 적어도 10<sup>7</sup>cfu/g의 생존율을 나타내었다.

상업용 bifidobacteria 및 bifidobacteria 함유 초미세구를 경구 복용하여 비교 시험한 결과 상업용 bifidobacteria culture를 복용한 군에서는 복용전후 현저한 변화가 없었으나 bifidobacteria함유 초미세구를 복용한 군에서는 분변 중 장내 유산균수가 현저히 증가하는 양상을 보여주었다. 그러나 분변 중에서의 다른 균종인 lactic acid bacteria, enterobacteriaceae 및 staphylococci는 모두 비슷한 경향을 나타내었으며 특이할만한 균주의 증가 혹은 감소 경향은 고찰하지 못하였다. 한편 bifidobacteria 복용후 두 가지 실험군에서 모두 배변 frequency가 증가하

고 대변의 점도가 감소하는 양상을 나타내었으며 배변양은 현저한 변화가 없었다.

이상의 결과로부터 공기분사법에 의하여 제조되는 bifidobacteria 함유 초미세구는 유기용매를 전혀 사용하지 않으면서 또한 입자의 크기가 작고 우수한 내산성과 안정성을 나타내었으며 사람에게 투여시 장내 유산균 균총이 증가되는 것으로 보아 다양한 유산균 함유 유제품에 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

다. 제3세부과제 : *B. bifidum*는 spleen B cell의 항체 합성수를 증가시켜 전체 항체합성을 비특이적으로 증가시켰다. 또한 B cell을 활성화시켜 cytokine (TGF- $\beta$ 1과 IL-5)에 의한 IgA 합성을 항진시켰다. 이러한 기능은 B cell의 polyclonal activator인 LPS의 작용과 유사하였다. *B. bifidum*는 장내 면역 조직에 존재하는 mesenteric lymph node (MLN) B cell의 IgA 합성도 증가시켰다. *B. bifidum*을 경구 투여하였을 때 spleen B cell이나 Peyer's patch (PP) B cell의 경우는 변화가 없었으나 MLN에서는 IgA 합성 세포수가 의미있게 증가하였다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 경구 투여 되었을 때 PP보다는 MLN B cell의 IgA 항체 합성을 자극하여 점막조직의 방어에 기여함을 시사하며, 장내 감염에 대한 IgA 항체의 중요성을 생각할 때 매우 중요하다고 평가된다. 본 연구에서는 이러한 *B. bifidum*의 자극효과는 *B. bifidum*의 세포막이나 세포벽 성분임을 밝혔다. 한편 이러한 *B. bifidum*의 경구투여 효과는 초미세구 *B. bifidum*를 사용하였을 때 좀더 증가됨을 관찰하였다. 마지막으로 초미세구 *B. bifidum*는 MLN cell의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 수준을 증가시켰다. TGF- $\beta$ 1이 IgA 유도인자로 잘 알려진 바, 본 결과는 bifidobacteria의 장내 점막 면역 활성화, 특히 IgA 항체 합성을 증가시키는 한가지 기작으로 이해된다.

라. 협동연구과제 : 16S rDNA ribotyping, PCR로 합성된 16S rDNA의 제한 효소절단형 및 SDS-PAGE를 이용하여 bifidobacteria의 동정이 가능하였으며 PCR로 합성된 16S rDNA의 제한효소절단형을 이용하여 상업균주와 야생 균주를 동정할 수 있었다. Bifidobacteria 균주간의 분별을 위하여 RAPD

또는 SDS-PAGE를 사용할 수 있었다.

*B. infantis* 균주들이 내산성이 강하고 *B. bifidum*이 내담즙성이 높았으며 상업용 bifidobacteria 균주들은 내산성과 내담즙성이 높았다. 야생 균주 중에서 *B. bifidum* K-7은 내산성과 내담즙성이 우수하였다. *B. bifidum* 균주들은 모두 흡착성이 높았다. *B. bifidum* Bb-11의 분자량이 40,000인 단백질이 Caco2 cell에 흡착하였으며 이 단백질이 *B. bifidum* K-7의 대장상피에 대한 정착을 매개하는 것으로 추정되었다.

분에서 분리한 야생균주인 *B. bifidum* K-7로 제조된 우유와 발효유를 급여하므로써 쥐 분내 bifidobacteria 군수가 증가하였으나 clostridia 군수는 감소하였으며 혈청내 콜레스테롤에는 차이가 없었다. 이러한 군총 변화에 대한 초미세구화의 효과를 볼 수 없었다. *B. bifidum* Bb-11로 제조된 발효유와 초미세구 *B. bifidum* Bb-11이 첨가된 우유로 투여된 처리구는 대조구에 비해 혈청 cholesterol이 낮았으며 초미세구가 안된 *B. bifidum* Bb-11에서는 혈청 cholesterol 저하효과가 없었다.

## 2. 연구결과 활용 및 건의

가. Whey를 기초로 한 bifidobacteria 성장 시험 결과는 bifidobacteria를 미세캡슐로 제조하는데 활용할 수 있을 뿐만 아니라 bifidobacteria를 산업적으로 이용하거나 bifidobacteria를 함유한 유제품을 개발하는데 활용될 수 있을 것으로 판단되며, sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles를 이용하여 제조한 시유·발효유 및 아이스크림은 관심있는 유업회사에서 생산하고자할 경우 이에 필요한 기술을 이전할 수 있다.

나. Bifidobacteria와 같이 생존이 불안정하고 복용시 체내 전달효율이 낮은 미생물을 백신 및 균주들의 제품화연구에 활용할 수 있으며, 연구과정 중 획득한 초미세캡슐의 제조 기술 및 수성고분자를 이용한 수성코팅 기술은 의약품 및 식품 분야등 다양하게 활용될 수 있다.

다. 각종 유산균들이 면역기능에 미치는 영향을 평가하는 기법을 정착시킬 수 있었으며, bifidobacteria에 대한 분사형 미세구 코팅의 우수성을 평가

할 수 방법의 정착으로 다른 우량 유산균에 대해서도 활용이 될 수 있다.

라. 새로운 생균제의 효율적인 개발과 기존 균주의 정체성을 구명하기 위하여 본 연구결과를 이용할 수 있도록 한다. 또 bifidobacteria가 생균제로서의 가치가 있음을 알 수 있어 이에 대한 지속적인 개발이 필요하다. Bifidobacteria의 초미세구화가 생균제로서의 활력을 증대시키고 있음이 밝혀져 상업적인 응용 방법을 강구할 필요가 있다.

## SUMMARY

### Subject 1: Development of Culturing Method of Bifidobacteria and value-added dairy products

1. Purpose of Study: In order to develop the value-added dairy products containing either *B. bifidum* Bb-11 or *B. bifidum* K-7 bifidobacteria-loaded microparticles,

2. Results and Conclusion: Both bifidobacteria were massively grown and stimulated at optimal condition then microparticulated by air atomization with sodium alginate poly-*l*-lysine. To evaluate the employed bifidobacteria, the *B. bifidum* K-7, selected by this collaborative research project was compared to the commercial *B. bifidum* Bb-11. The growth of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in MRS broth containing L-cysteine · HCl 0.05% were respectively  $1.3 \times 10^9$  and  $6.3 \times 10^9$  at 24 hours, indicates no difference. However, in the culture based on whey, the growth of *B. bifidum* K-7 was  $1.7 \times 10^8$  at 24 hours which was inferior to  $1.9 \times 10^9$  of *B. bifidum* Bb-11. Therefore, both bifidobacteria were employed in the experiment to develop value-added dairy products.

The experimental 12.7% sterilized market skim milk was simulated with commercial skim milk powder. The experimented fermented milk was cultured with commercial yoghurt starter culture B-3. Finally the experimental ice cream was made from commercial ice cream mix.

After individual addition 5g of either *B. bifidum* Bb-11 and *B. bifidum* K-7 microparticles into each 200ml of the experimental 12.7% skim milk, fermented milk and ice cream mix, the skim milk and fermented milk were stored at 4°C while the ice cream was stored at -20°C. The number of live bacteria, pH and titratable acidity in each product were measured every 4 days during 16 days of storage. During

the storage of bifidobacteria added experimental skim milk, the initial number of live *B. bifidum* Bb-11 and *B. bifidum* K-7 were respectively  $1.6 \times 10^7$  and  $2.0 \times 10^5$  then changed to  $5.8 \times 10^5$  and  $4.0 \times 10^3$  after 16 days, indicates relatively good survivability. And the pH and titratable acidity were also nearly unchanged for 16 days. This result proved that the commercial production of so called bifidobacteria containing milk is technically feasible.

In the fermented milk containing *B. bifidum* Bb-11 and *B. bifidum* K-7 microparticles, the initial pH was 4.95 and the initial titratable acidity was 0.8 %. At 16 days, the pH and the titratable acidity in the fermented milk containing *B. bifidum* Bb-11 were 4.62 and 1.07% while those in the fermented milk containing *B. bifidum* K-7 were 4.60 and 1.02%, respectively. However, the number of live *B. bifidum* Bb-11 and *B. bifidum* K-7 were zero at 4 days and 8 days of storage.

In the ice cream containing *B. bifidum* Bb-11 and *B. bifidum* K-7 microparticles, the initial number of live bacteria were  $4.1 \times 10^6$  and  $4.0 \times 10^5$ , but at 16 days, those were  $4.1 \times 10^5$  and  $3.1 \times 10^4$  respectively. This showed no difference in number of live bacteria through the storage period. In addition, the pH and the titratable acidity were almost similar. Based on the results, it is likely that ice cream containing bifidobacteria microparticles also can be made.

## **Subject 2: Preparation and Evaluation of Bifidobacteria-loaded microparticles**

1. Purpose of Study: To develop bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles using air atomization method.
2. Results and Conclusion: The optimal survival of bifidobacteria

loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles during freeze-drying process was established. Thereafter, the survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles was widely investigated as a function of pH, dissolution time, media and storage condition. Finally, the changes of microorganisms such as bifidobacteria, lactic acid bacteria, enterobacteriaceae and staphylococci in feces after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles to human volunteers were investigated in addition to physical status of feces.

The mean size of bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles was ranged between 80.1-92.8  $\mu\text{m}$ . The bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles were prepared by changing concentration of alginate solution (1.5%), spraying air pressure (0.75 bar) and delivery rate of alginate solution (8 ml/min). The bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles were irregularly and roughly spherical in shape but had wrinkled surface. The bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles were small sized and free flowable.

The survival of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles was optimized when the formulation containing 0.5% yeast extracts, 5% glycerol, 0.5%  $\text{NaHSO}_3$  and 1%  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  was used. The moisture content was also important to influence survival of Bifidobacteria during the freeze-drying process. The optimal freeze-drying time was estimated around 14 h.

The survival of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles was highly dependent on dissolution media, pH and incubation time. When the bifidobacteria was immobilized with alginate or even poly-*l*-lysine treatment, the survival of bifidobacteria was highly enhanced in the gastric fluid for 120 min, showing over  $10^7$  cfu/g. The bifidobacteria-loaded alginate

poly-*l*-lysine microparticles maintain their survival over  $10^7$  cfu/g after storage for 16 weeks.

Bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles significantly increased survival of bifidobacteria in fecal microflora in human beings when compared to bifidobacteria cultures as a control. It was evident that the microencapsulation improved resistance of bifidobacteria to gastric acid. However the survival of fecal lactic acid bacteria, enterobacteriaceae and staphylococci did not change significantly after ingestion of bifidobacteria products during the study period. Bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles had a tendency to increase the frequency of stools. But the amount of stools was not changed. The viscosity of stools was also significantly decreased during the study periods.

From these findings, bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles could be use to deliver bifidobacteria to the colon without losing their viability in low pH conditions. The current microencapsulation method using air atomization technique provides an alternative to entrap bifidobacteria without using harmful organic solvents. The bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles could be also used in the dairy products to deliver bifidobacteria to the colon without losing viability significantly in the low pH condition.

### **Subject 3: Effect of Bifidobactria on Intesitinal Immune Function**

1. Purpose of Study: Bifidobacterium is regarded to be stimulatory for overall host immune responses. However, its exact role in the systemic and mucosal immunity is largely unkown. This study was performed to determine the role of bifidobacterium in the systemic

and mucosal antibody response

2. Results and Conclusion: We first examined the direct modulatory effect of bifidobacterium on the synthesis of antibodies by murine spleen B cells. Whole spleen B cells were cultured with *Bifidobacterium bifidum* or *Clostridium perfringens* (Welch's bacilli, negative control) and antibody synthesis was measured by ELISA and ELISPOT assay. *B. bifidum*, but not *C. perfringens*, substantially increased the total secretion of major Ig isotypes as well as the number of IgA-secreting cells. In addition, *B. bifidum* increased the proliferation of spleen cells by 3-fold while *C. perfringens* had little to diminishing effect on it. These results indicate that *B. bifidum* increased Ig synthesis through its mitogenic influence on B cells. Further, *B. bifidum* induced spleen B cells to be reactive to TGF- $\beta$ 1 and IL-5, resulting in the increase of surface IgA expression ( $\approx$ 3-fold) and total IgA production ( $>20$  fold) but not IgM and IgG2a isotypes.

As much as seen in spleen B cells, *B. bifidum* increased IgA production by mesenteric lymph node (MLN) B cells. In addition, peroral immunization with *B. bifidum* enhanced number of IgA secreting cells in MLN. Subsequently, we found that this modulating effect of *B. bifidum* is owing to its cell wall components. Further, it was found that perorally administered alginate-encapsulated *B. bifidum* is more potent in the increase of IgA expression by MLN B cells than unencapsulated *B. bifidum*.

Finally, we examined the effect of *B. bifidum* on cytokine expression. Peroral immunization of alginate-encapsulated *B. bifidum* increased mRNA level of TGF- $\beta$ 1 in MLN cells.

Taken together, these studies indicate that *B. bifidum* can act as a LPS-like polyclonal activator for B cells. Furthermore, the fact

that bifidobacterium enables B cells to respond to TGF- $\beta$ 1 and IL-5 for the IgA production has important implications in the primary defense against pathogens in the gastrointestinal tract.

#### **Subject 4: In Vivo biological activity of Bifidobacteria**

1. Purpose of Study: The purpose of the present study is two fold. 1) To develop the molecular biological methods to identify and differentiate species and strains of bifidobacteria. 2) To examine physiological characteristics of bifidobacteria which are important as probiotics and the *in vivo* effects of bifidobacteria and microencapsulation on fecal bacteria and serum cholesterol

2. Results and Conclusion: 16S rDNA ribotyping, restriction pattern of PCR-amplified 16S rDNA, and SDS-PAGE of whole cell protein could be used to identify species of bifidobacteria. *B. infantis* strains and *B. bifidum* strains were tolerant to acid and bile acid, respectively. Commercial cultures of bifidobacteria were tolerant to both acid and bile acid. *B. bifidum* K-7 were tolerant to both acid and bile acid. All *B. bifidum* strains adhered to Caco2 cell better than other bifidobacteria. The protein with molecular weight of 40,000 which bound to Caco2 cell seemed to mediate adherence of *B. bifidum* Bb-11. Feeding of rat with milk and fermented milk containing *B. bifidum* K-7 decreased counts of clostridia and increased counts of bifidobacteria in feces. Microencapsulation of *B. bifidum* K-7 did not affect the bacterial counts of the feces. There was no change in serum cholesterol due to feeding of *B. bifidum* K-7. Feeding of rat with milk containing microencapsulated *B. bifidum* Bb-11 and fermented milk decreased serum cholesterol but feeding with *B. bifidum* Bb-11 without microencapsulation did not.

# CONTENTS

## Chapter I. Introduction

Section 1. Purpose of study -----	21
Section 2. Scope of study -----	21

## Chapter II. Development of Culturing Method of Bifidobacteria and Value-added Dairy Products

Section 1. Effects of casein hydrolyzates fractionated by molecular weight on the growth of <i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i> Bb-11 -----	23
Section 2. Growth of <i>Bifidobacterium bifidum</i> K-7 and stability of bifidobacteria microparticles in dairy products-	39
Section 3. References -----	59

## Chapter III. Preparation and Evaluation of Bifidobacteria-loaded Microparticles

Section 1. Introduction -----	63
Section 2. Materials and methods -----	66
Section 3. Results and discussion -----	73
Section 4. Summary -----	93
Section 5. References -----	95

## Chapter IV. Effects of Bifidobacteria on Intesitinal Immune Function

Section 1. Introduction -----	97
Section 2. Materials and methods -----	101

Section 3. Results and discussion -----	108
Section 4. Summary -----	136
Section 5. References -----	137

## Chapter V. *In Vivo* Biological Activity of Bifidobacteria

Section 1. Molecular biological identification of differentiation of bifidobacteria -----	142
Section 2. Physiological characteristics and mechanisms of bifidobacteria adhesion ability to Caco2 cells ---	164
Section 3. <i>In vivo</i> biological activity of microencapsulated bifidobacteria -----	174
Section 4. References -----	193

# 목 차

## 제 1 장 서 론

제 1 절	연구 개발의 목적 -----	21
제 2 절	연구 개발의 범위 -----	21

## 제 2 장 Bifidobacteria의 배양법과 유제품의 개발

제 1 절	분자량에 따라 분획된 케이신 분해물이 <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb-11의 성장에 미치는 영향 -----	23
제 2 절	<i>B. bifidum</i> Bb-11과 <i>B. bifidum</i> K-7의 성장 비교 시험 및 초미세구 Bifidobacteria를 첨가한 유제품 제조 -----	39
제 3 절	참고 문헌 -----	59

## 제 3 장 Bifidobacteria 함유 초미세구의 제조 및 평가

제 1 절	서 론 -----	63
제 2 절	재료 및 방법 -----	66
제 3 절	결과 및 고찰 -----	73
제 4 절	적 요 -----	93
제 5 절	참고 문헌 -----	95

## 제 4 장 장내의 면역 기능에 대한 Bifidobacteria 초미세구의 효과

제 1 절	서 론 -----	97
제 2 절	재료 및 방법 -----	101
제 3 절	결과 및 고찰 -----	108
제 4 절	적 요 -----	136
제 5 절	참고 문헌 -----	137

## 제 5 장 Bifidobacteria의 생체내 활성 연구

제 1 절	Bifidobacteria의 동정과 균주 확인을 위한 분자유전학적 방법의 연구 개발 -----	142
제 2 절	Bifidobacteria의 생리적 성질과 장상피세포 흡착 능력과 기작에 관한 연구 -----	164
제 3 절	코팅처리된 초미세구 Bifidobacteria의 생체 활성 연구-	174
제 4 절	참고 문헌 -----	193

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적

유제품의 수입개방화에 대항하여 유가공 산업의 경쟁력을 향상시키고 낙농을 지속적으로 발전시키기 위하여서는 새로운 유제품의 개발이 절대 필요하다.

Bifidobacteria는 장내 유해 미생물의 증식억제, 면역기능의 강화, 항암 및 cholesterol 저하 효과 등 많은 건강 증진 효과가 있는 것으로 밝혀져 현재 전세계적으로 발효유제조에 이의 이용이 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 bifidobacteria는 극도로 혐기성이고 이질적 특성 때문에 우유와 유제품에서 다른 유산균에 비하여 생존과 활성을 유지하기 어려울 뿐만 아니라 생존하고 있는 bifidobacteria를 섭취한다고 하여도 위액과 담즙의 강한 산성환경하에서 대부분 사멸되기 때문에 bifidobacteria가 위를 통과하여 소장과 대장에 도달하여 장내에서 건강증진 효과를 유지하기는 매우 어렵다.

따라서 bifidobacteria의 생리적 활성기능을 충분히 발휘하기 위하여서는 bifidobacteria를 초미세구로 제조하여 강한 산성환경의 위액을 통과하고 안정성을 높힐 수 있는 방법이 필요하다.

본 연구는 air atomization 방법으로 bifidobacteria를 sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles를 제조, 새로운 유제품을 개발하고 bifidobacteria와 초미세구로 제조한 bifidobacteria에 대하여 면역학적 및 생리적 특성을 구명하기 위하여 실시하였다.

## 제 2 절 연구개발의 범위

이 연구를 효과적으로 수행하기 위하여 제 1 세부과제에서 본 시험에 가장 적합한 bifidobacteria 균주를 선정하여 초미세구를 제조하고 산업적으로 이용하기 위하여 가격이 저렴한 배지로 최적배양 조건을 확립하여 배양한 bifidobacteria를 제 2 세부과제의 bifidobacteria 초미세구 제조를 위하여 공급하였으며 초미세구로 제조된 bifidobacteria microparticles을 첨가, 시유·발효유 및 아이스크림을 제조하여 새로운 유제품의 개발을 시

도 하였다.

제 2 세부과제에서는 제 1 세부과제에서 최적조건으로 배양 공급한 bifidobacteria를 공기 분사 방법을 활용하여 bifidobacteria 초미세구 제조공정을 확립하고, 인공위역에서 내산성과 안정성을 평가하며 bifidobacteria microparticles을 사람에게 복용시켜 장내 균총변화에 미치는 효과를 시험하였다.

제 3 세부과제에서는 bifidobacteria와 초미세구 bifidobacteria의 면역활성기능을 조사하였다. 이를 위하여 in vitro에서 bifidobacteria에 의한 B cell의 활성화, 장내점막 B cell의 항체합성에 미치는 *B. bifidum*의 효과, *B. bifidum*의 경구투여 효과, *B. bifidum*의 항체합성 유도 성분의 분석, 초미세구 *B. bifidum*의 구강투여가 항체합성에 미치는 효과 및 *B. bifidum*의 cytokine 합성유도 효과등에 대하여 연구 조사 하였다.

협동과제에서는 bifidobacteria의 동정과 분류를 위한 분자유전학적 방법의 개발, 생균제로서의 중요한 균주의 분포와 생균제 균주 개발 및 bifidobacteria 초미세구에 대한 분균총변화와 혈청 cholesterol에 대한 효과를 연구 하였다.

## 제 2 장 Bifidobacteria의 배양법과 유제품의 개발

### 제 1 절 분자량에 따라 분획된 케이신 분해물이 *Bifidobacterium bifidum* Bb-11의 성장에 미치는 영향

#### 1. 서론

우유에는 이미 잘 알려진 영양소 외에 여러 가지 생체조절기능이 있는 인자들이 함유되어 있는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 인자들은 주로 유단백질, 유지방, 유당 등에서 다양하게 나타나고 있으나, 주로 단백질로부터 기인하는 것이 많다. 우유단백질은 다른 식품단백질과는 달리 소화과정 중 다양한 생리활성을 가지는 peptide를 생성하며, 효소에 의하여 생성된 단백질분해물은 일정한 위치에서 아미노산잔기가 절단되므로 영양적 가치와 생리적 기능성이 높게 나타날 수 있다. Kehagias 등(1977)이 우유 casein 가수분해물로부터 얻은 peptide분획물이 *B. bifidum*의 성장을 촉진한다고 보고한 이래, 우유 단백질의 효과에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 우유와 모유내 단백질 질소와 비단백태 질소가 인체에서 분리한 bifidobacteria의 성장을 촉진한다는 연구보고가 있으며(Poch와 Bezkorovainy, 1988, 1991; Petschow와 Talbott, 1991), Poch와 Bezkorovainy(1988)는 모유의 유청보다 우유 casein 소화물과 효모추출물이 bifidobacteria의 성장촉진효과가 더 좋다고 하였고, trypsin 처리한  $\kappa$ -casein 분해물이 우유 casein 효소분획중에서 bifidobacteria 성장촉진효과가 가장 우수하다고 하였다(Poch와 Bezkorovainy, 1991). Proulx 등(1992)은 casein 분해물로부터 얻어진 peptide가 유리아미노산보다 bifidobacteria의 성장촉진효과가 높다고 하였으며, Cheng과

Nagasawa(1984)는 분자량 1,100 ~ 2,300Da 범위의 peptide들을 최소생장 배지인 Norris배지에 첨가하였을 때, *B. breve*와 *B. infantis*가 산생성을 촉진하였다고 하였다. Azuma 등(1984)은 모유의  $\kappa$ -casein을 chymosin과 pepsin으로 처리하여 가수분해하기 전과 후의 bifidobacteria 성장촉진효과를 비교하였는데  $\kappa$ -casein 가수분해물이 가수분해하지 않은 것보다 성장촉진효과가 더 우수하였다고 하였다. 이와 같이 유단백질은 인체내 여러 가지 중요성, 즉 경구섭취할 때 면역계, 내분비계 및 신경계 등의 생체조절에 대한 생리조절인자로서의 기능을 갖고 있을 뿐만 아니라, 유단백질 분해물은 인체장관의 건강유지에 중요한 bifidobacteria를 비롯하여 유익한 균총들의 성장촉진효과를 가지고 있다.

유청은 치즈제조시 부산물로 생산되며  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, immuno globulin, serum albumin, proteose-peptone, 유당 그리고 여러 종류의 비타민과 무기물 등이 함유되어 있다. 유청은 가격이 저렴하고 cheese를 제조할 때 원료유로부터 86~90%가 생산되고 우수한 유화작용과 용해성 등 기능적 특성과 가치를 지니고 있어 여러 방면에서 그 이용성이 연구되고 있다(Yamauchi, 1992). 이 연구는 산업적으로 이용하는 데 필요한 bifidobacteria를 대량생산하기 위하여 유청을 기초배지로 하여 케이션 단백질분해물과 그 분자량에 따라 분획한 펩타이드들이 *B. bifidum* Bb-11의 성장에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Bifidobacteria

본 연구에 사용된 bifidobacteria는 동결건조된 *Bifidobacterium bifidum* Bb-11(Chr. Hansen's Lab., Denmark)을 구입하여 시험에 이용하였다. *B. bifidum* Bb-11의 전배양은 L-cysteine·HCl을 함유하는 MRS배지에서 2시간 성장활력을 높여 시험에 사용하였다.

### 나. *B. bifidum* Bb-11의 배양

Whey powder는 (주)삼익유가공으로부터, 상업용 milk protein

hydrolysate(MPH)와 casein hydrolysate(CH)는 (주)남양유업으로부터 제공 받았으며,  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein, 및 trypsin은 Sigma사(St. Louis, U.S.A)로부터 구입하였다. 기초배지 제조를 위해 국내산 whey powder를 증류수에 6.5%로 용해시키고(pH 7.0, 1N NaOH로 조정), 원심분리기(Beckman J2-21, England)로 9,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 회수하여 냉동보관하면서 시험에 사용하였다. 기초배지인 whey용액에 L-cysteine·HCl 0.05%와 yeast extract 0.75%를 첨가한 것을 성장기초배지로 정하였고, 여기에 단백분해물에 의한 성장촉진효과를 비교하고자 milk protein hydrolysate(MPH)와 casein hydrolysate(CH), 그리고 trypsin 처리후 분자량에 따라 10,000Da 이상, 10,000~3,000Da, 3,000Da 이하로 분리한  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -casein의 분획들을 각각 1%(w/v)양으로 조정하여 각각 0.25, 0.5, 0.75 및 1%의 농도별로 첨가하였다. 성장 배지는 액체 파라핀으로 피복한 후 121℃에서 15분간 멸균하고 *B. bifidum* Bb-11을 1% 량씩 각각 접종한 후, 진공펌프로 잔존공기를 제거하고 질소개스를 주입하여 37℃에서 24시간동안 혐기배양하였다.

#### 다. Trypsin 처리 및 casein 분해물의 분자량별 분획

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -Casein 250mg을 각각 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 30ml에 용해하여 40℃에서 5분간 예열시킨 후, trypsin을 1% 용액으로 만들어 각 케이신 용액에 125 $\mu$ l(1437U) 첨가하여(효소:단백질= 1:200, wt/wt), 40℃ 항온수조에서 6시간 반응시킨 후, 85℃에서 10분간 효소를 불활성화시켰다.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -Casein의 trypsin분해물들은 각각 2단계를 걸쳐 분자량 10,000Da 이상, 10,000 ~ 3,000Da, 3,000Da 이하의 크기로 분리하였다. 각 단백질의 trypsin분해물의 분획처리는 Centriprep-10(Amicon, Inc., USA)에 분해물을 넣고 3,000 $\times$ g에서 40분 원심분리(Union 32R, Hanil Sci. Korea)하여 10,000Da 이상의 분획과 10,000Da 이하의 분획으로 분리한 다음, 10,000Da 이하의 분획을 다시 Centricon-3(Amicon, Inc., USA)에 넣고 7,500 $\times$ g에서 2시간 원심분리하여 3,000Da 이상의 fraction과 3,000Da 이하의 분획으로 분리하였다(Fig.1). 각 분획의 단백질 함량은 Waddell 법(A215/A225 법)에 준하여 증류수를 바탕값으로하여 215nm와 225

nm의 두 파장에서 각각 시용액의 흡광도를 측정(자외선 분광광도계 Uvikon 942, Kontron Co. Italy)하여 다음 식에 의해서 단백질 농도를 계산하였다.

$$\text{단백질 } (\mu\text{g/ml}) = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

#### 라. 생균수, pH 및 적정산도 측정

pH는 Delta 350 pH측정기(Mettler, England)로 측정하였으며, 적정산도(titratable acidity, TA)는 Marth의 방법(1978)에 따라 측정하였다. 즉, 시료 9ml에 동량의 증류수 9ml를 가하여 1% phenolphthalein을 가하고 pH가 8.4에 도달할 때까지의 0.1N NaOH 소요량(ml)으로 측정하여 환산하였다. 생균수의 측정은 Lactobacillus MRS agar(Difco Lab., USA)에 L-cysteine·HCl(Sigma Chem. Co. U.S.A.) 0.05%를 첨가시켜 121℃에서 15분간 멸균한 배지를 사용하였고, 희석액은 MRS broth함량의 1/2농도로 하였으며, L-cysteine·HCl 0.05%를 첨가한 다음, 산소의 접촉을 차단하기 위하여 유동파라핀으로 피복하여 사용하였다. 희석된 시료 1ml를 petridish에 분주하여 MRS agar를 부어 굳힌 다음, 혐기배양자(BBI Gas Pak 100 Anaerobic Jar Becton Dickinson Microbio. systems, Cockeysville, MD. U.S.A)에 넣어 진공펌프로 산소를 제거한 후 질소가스를 충전하고 Gas Pak 100™ Anaerobic Envelops (Becton Dickinson Microbio. systems, Cockeysville, MD. U.S.A)으로 혐기상태를 유지토록 하면서 37℃에서 48시간 혐기배양하였다.

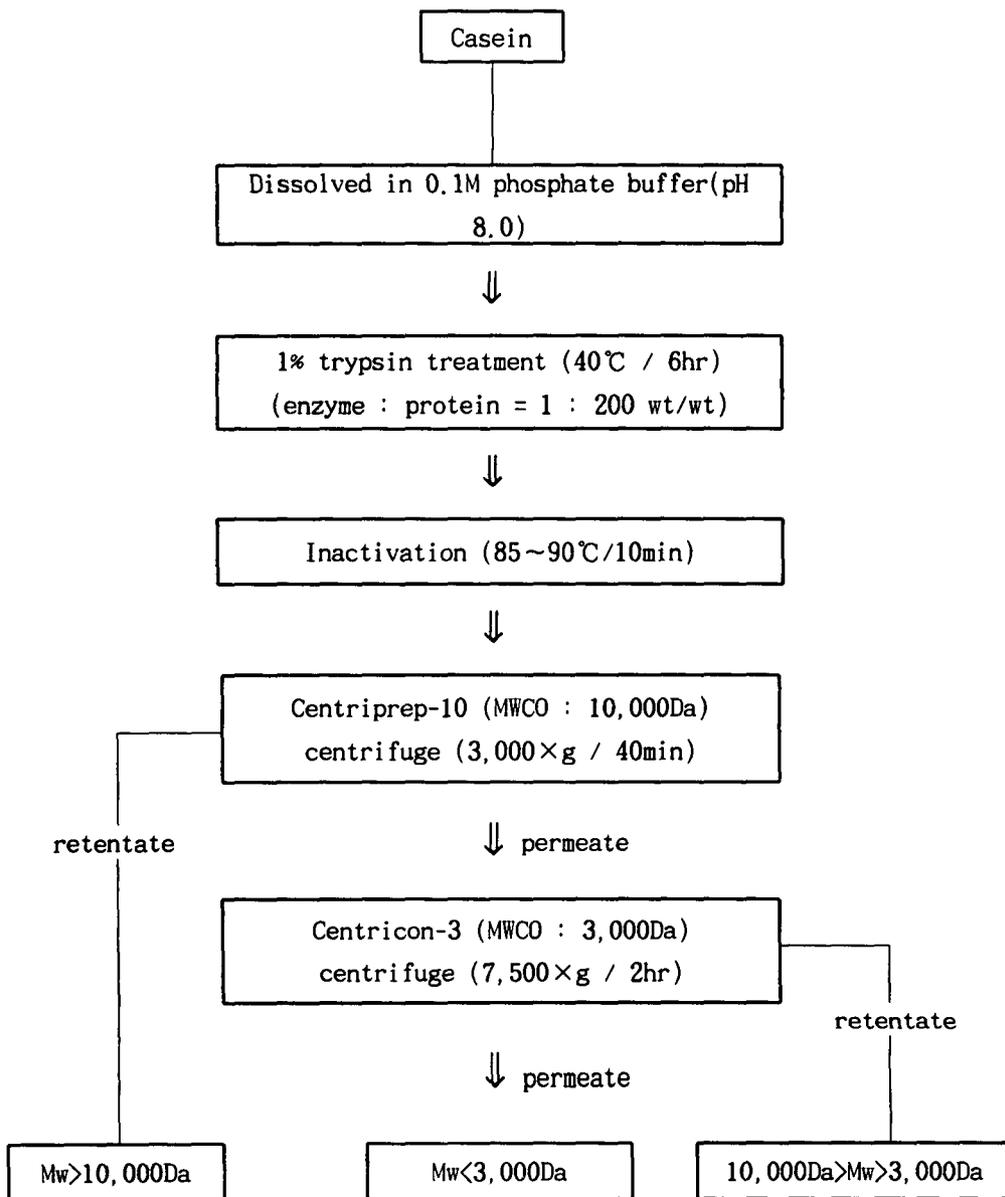


Fig.1. Procedure for the fractionation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ - casein hydrolyzates by ultrafiltration after trypsin digestion.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 단백질분해물에 의한 *B. bifidum* Bb-11의 성장촉진

기초 성장배지인 whey배지에 MPH(Milk protein hydrolysate)와 CH(Casein hydrolysate)를 각각 0.25, 0.5, 0.75 및 1%씩 첨가하여 *B. bifidum*의 성장촉진효과를 pH, 적정산도 그리고 생균수로 비교하였다.

MPH를 첨가한 각 배지들의 pH변화(Table 1)는 배양 12시간에 모든 시험구가 대조구에 비해 pH값이 낮았으며, MPH의 첨가량이 적을 수록 낮은 pH 값을 나타냈고, 배양 24시간에서도 모든 시험구가 대조구에 비해 pH가 낮았다.

Table 1. Changes of pH and titratable acidity of whey medium supplemented with milk protein hydrolyzate during the growth of *B. bifidum* Bb-11.

Incubation time (hr)	Control		Milk protein hydrolyzates							
			0.25%		0.5%		0.75%		1.0%	
	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)
0	7.00	0.04	7.00	0.04	7.00	0.04	7.00	0.04	7.00	0.04
6	5.87	0.13	5.68	0.16	6.02	0.12	6.23	0.12	5.98	0.18
12	4.80	0.35	4.49	0.40	4.57	0.41	4.70	0.38	4.63	0.46
18	4.28	0.52	4.25	0.55	4.27	0.56	4.23	0.68	4.26	0.65
24	4.11	0.66	4.00	0.82	3.96	0.94	4.10	0.78	4.11	0.83

각 배지들에서 적정산도는 모든 시험구가 대조구에 비해 적정산도가 낮았으며, 특히 1% 시험구에서 산도가 가장 낮았다(Table 1). 배양 24시간에서는 모든 시험구가 대조구에 비해 산도의 변화가 큰 것으로 나타났고, 배양 12시간과는 달리 0.5% 시험구에서 적정산도가 가장 낮았다. 각 배지에서 생균수의 변화를 보면, 배양 12시간에 모든 시험구가 대조구에 비해 높았

으며, 1% 시험구에서 가장 높은 생균수를 나타냈다. 배양 24시간에서는 대조구와 0.25% 시험구의 생균수가 가장 낮았고, 그 외의 시험구는 대조구에 비해 생균수가 많았으며, 특히 0.5% 시험구가 가장 높은 생균수를 나타냈다. MPH를 0.75% 첨가한 시험구와 1% 첨가한 시험구는 차이가 크지 않았으나(Fig. 2), MPH 첨가 농도에 따라서 *B. bifidum*의 성장을 보면 전시험구가 대조구에 비해 성장촉진 효과가 높아지는 경향을 보였다.

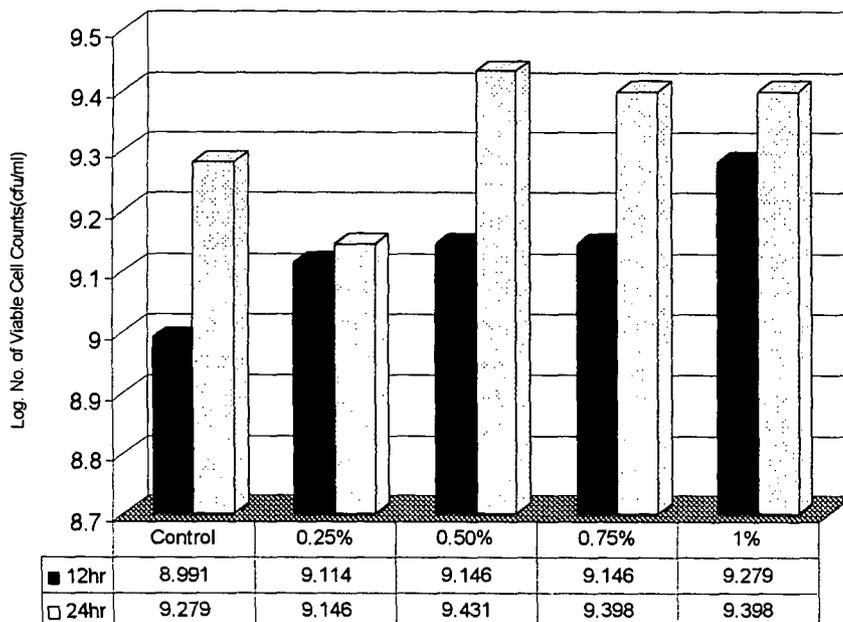


Fig. 2. Changes of viable cell counts during the growth of *B. bifidum* Bb-11 in whey medium supplemented with milk protein hydrolyzate.

CH를 첨가한 각 배지들의 pH변화(Table 2)는 배양 12시간에 0.25%시험구와 0.75% 시험구가 대조구에 비해 낮았으며, 배양 24시간에서는 모든 시험구가 대조구에 비해 pH값이 낮았고, 첨가량이 적을수록 낮은 pH값을 나타냈다. 산생성량(Table 2)은 배양 12시간에 0.5% 시험구가 대조구에 비해 산생성량이 적었으며, 나머지 시험구는 대조구보다 높은 산생성량을 나타

냈지만, 1% 시험구보다 0.75% 시험구에서 산생성량이 높았다. 배양 24시간에서는 모든 시험구가 대조구에 비해 높은 산생성량을 나타내었다. 생균수는 배양 12시간에 0.5% 시험구만이 대조구에 비해 낮았고, 0.75% 시험구에서 가장 높았다. 배양 24시간에서는 모든 시험구에 있어서 대조구에 비해 높은 생균수를 나타내었고, 첨가량이 많을 수록 생균수가 많았다(Fig. 3). CH 첨가농도에 따른 *B. bifidum*의 성장촉진효과는 배양 12시간보다 배양 24시간에 대조구에 비해 높은 것으로 나타났으나, *B. bifidum*의 생장이 다소 지연되었다.

Table 2. Changes of pH and titratable acidity of whey medium supplemented with casein hydrolyzate during the growth of *B. bifidum* Bb-11.

Incubation time (hr)	Control		Casein hydrolyzates							
			0.25%		0.5%		0.75%		1.0%	
	pH	T. A (%)	pH	T. A (%)	pH	T. A (%)	pH	T. A (%)	pH	T. A (%)
0	7.00	0.03	7.00	0.03	7.00	0.03	7.00	0.03	7.00	0.03
6	6.35	0.10	6.23	0.13	6.46	0.15	6.35	0.18	6.27	0.18
12	4.91	0.28	4.76	0.33	5.34	0.26	4.87	0.35	5.23	0.31
18	4.53	0.47	4.29	0.54	4.15	0.76	4.16	0.86	4.22	0.83
24	4.21	0.61	3.98	0.83	4.03	0.84	4.10	0.86	4.11	0.91

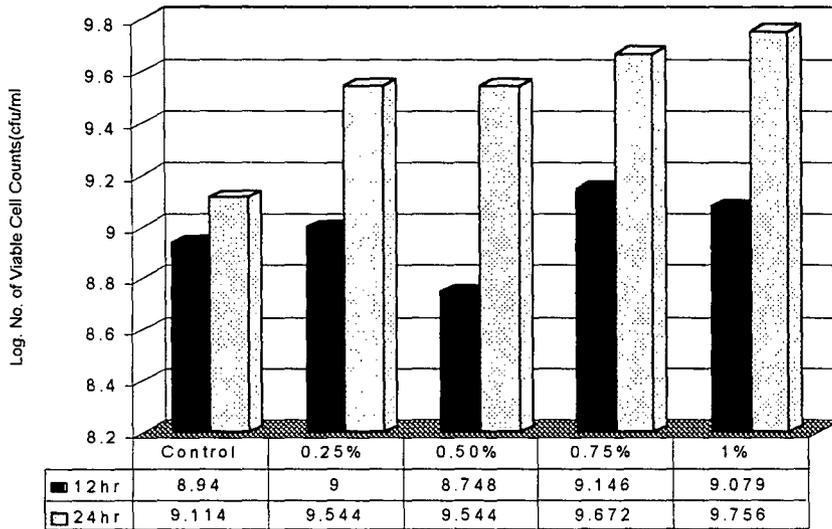


Fig.3. Changes of viable cell counts during the growth of *B. bifidum* Bb-11 in whey medium supplemented with casein hydrolyzate.

나. Casein 분해물들의 분자량별 분획에 따른 첨가효과

$\alpha$ -Casein,  $\beta$ -casein, 및  $\kappa$ -casein을 40°C에서 6시간 동안 trypsin으로 처리하여 얻은 분해물을 원심분리형 한외여과장치를 사용하여 각 케이스인 분해물들을 분자량에 따라서 10,000Da 이상 펩타이드 함유 분획, 10,000 ~ 3,000Da 분획, 및 3,000Da 이하의 분획으로 분리하여 얻은 분획들의 단백질 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 각 분획들의 단백질 함량은 큰 차이를 보여 주었으며, 이는 각 케이스인들의 아미노산 조성의 차이에 의해서 가수분해되는 결합의 수가 다르며, 생성된 펩타이드들의 아미노산 잔기의 수가 다르기 때문이라고 볼 수 있다.  $\alpha$ -,  $\beta$ - 및  $\kappa$ -Casein을 각각 trypsin처리하여 얻어진 분해물을 분자량에 따라 10,000Da 이상, 3,000 ~ 10,000Da 및 3,000Da 이하로 분리하고, 각 분획들을 1%(w/v)양으로 조정하여 첨가하여 *B. bifidum*의 성장촉진효과를 pH, 적정산도 그리고 생균수로 비교하였다.

성장배지들의 pH변화를 보면  $\alpha$ -casein을 첨가한 배지는 배양 24시간후

대조구에 비해 분자량10,000~3,000Da과 3,000Da 이하의 두 분획을 첨가한 유청배지는 첨가하지 않은 배지보다 낮은 pH값을 나타냈으며(Table 4),  $\beta$ -casein을 첨가한 유청배지에서도 유사한 성향을 나타내었다(Table 5).  $\kappa$ -Casein은 12시간때부터 pH가 낮은 수준으로 떨어진 후 변화가 없었으며, 분자량 10,000Da 이상의 분획의 pH가 다소 높은 편이었다(Table 6).

Table 3. Protein concentration of three fractions with different molecular weight of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein hydrolyzates by trypsin.

(  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )

	Molecular weight		
	> 10,000 Da	10,000 ~ 3,000 Da	3,000 Da >
$\alpha$ -casein	6.49	7.03	6.01
$\beta$ -casein	6.45	3.67	2.51
$\kappa$ -casein	258.0	0.02	6.49

Table 4. Changes of pH and titratable acidity of whey medium supplemented with different molecular weights of  $\alpha$ -casein hydrolyzates during the growth of *B. bifidum* Bb-11.

Incubation time (hr)	Control		>10,000Da		3,000~10,000Da		<3,000Da	
	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)
0	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04
6	5.8	0.10	5.85	0.11	5.70	0.12	5.49	0.14
12	4.86	0.23	4.82	0.23	4.71	0.27	4.61	0.28
18	4.33	0.43	4.34	0.43	4.25	0.47	4.21	0.48
24	4.05	0.65	4.06	0.65	4.02	0.67	4.01	0.68

Table 5. Changes of pH and titratable acidity of whey medium supplemented with different molecular weights of  $\beta$ -casein hydrolyzates during the growth of *B. bifidum* Bb-11.

Incubation time (hr)	Control		>10,000Da		3,000~10,000Da		<3,000Da	
	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)
0	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04
6	5.88	0.10	5.97	0.10	5.78	0.11	5.66	0.13
12	4.86	0.23	4.93	0.22	4.75	0.26	4.70	0.29
18	4.33	0.43	4.37	0.42	4.25	0.48	4.24	0.50
24	4.05	0.65	4.10	0.60	4.04	0.65	4.03	0.66

Table 6. Changes of pH and titratable acidity of whey medium supplemented with different molecular weights of  $\kappa$ -casein hydrolyzates during the growth of *B. bifidum* Bb-11.

Incubation time (hr)	Control		>10,000Da		3,000~10,000Da		<3,000Da	
	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)	pH	T. A. (%)
0	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04	6.80	0.04
6	5.88	0.10	6.13	0.09	5.81	0.11	5.60	0.13
12	4.86	0.23	5.19	0.18	4.79	0.25	4.70	0.27
18	4.33	0.43	4.49	0.36	4.27	0.46	4.25	0.48
24	4.05	0.65	4.20	0.53	4.04	0.64	4.04	0.65

각 성장배지에서 *B. bifidum* Bb-11의 성장과 생성된 산의 양은 적정산도의 변화로 나타내었다.  $\alpha$ -Casein을 첨가한 배지에서 배양 24시간 경과 후를 보면 분자량 10,000Da 이상의 분획을 첨가하였을 때 대조구와 비슷한

산생성량을 나타내었으며, 분자량 10,000~3,000Da과 3,000Da 이하의 분획들을 첨가하였을 때에는 대조구보다 산생성량이 높은 편이었으며, 분자량 3,000Da 이하의 분획이 보다 많은 산을 생성하였다(Table 4).  $\beta$ -Casein을 첨가하였을 때에는 단지 분자량 3,000Da 이하의 분획에서만 대조구보다 산생성량이 많았다(Fig.5).  $\kappa$ -Casein 분획들은 분자량 10,000Da 이상의 분획은 대조구보다 산생성량이 적었으며, 분자량 3,000Da 이하의 분획이 비교적 많은 양의 산을 생성하였다.

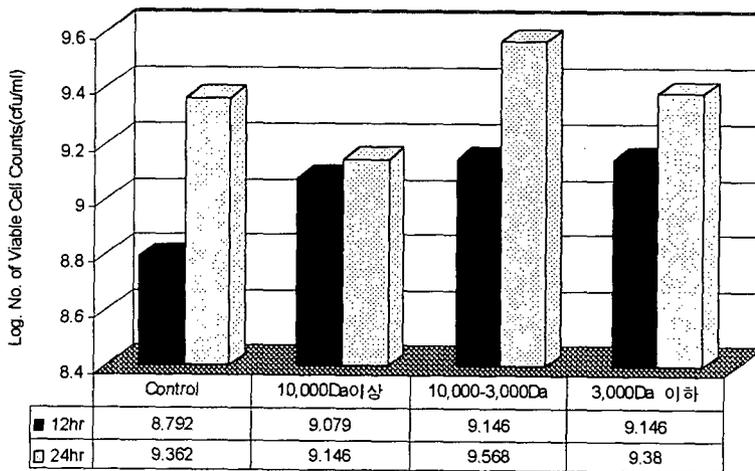


Fig.4. Changes of viable cell counts during the growth of *B. bifidum* Bb-11 in whey medium supplemented with different molecular weights of  $\alpha$ -casein hydrolyzates.

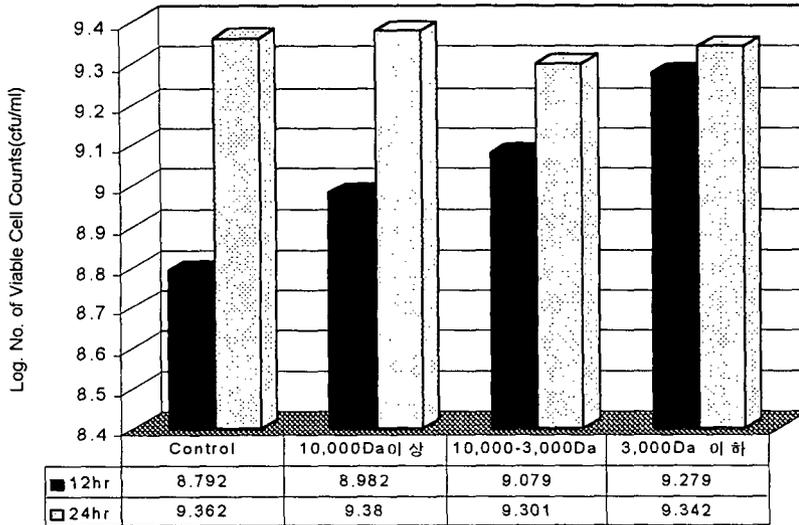


Fig.5. Changes of viable cell counts during the growth of *B. bifidum* Bb-11 in whey medium supplemented with different molecular weights of  $\beta$ -casein hydrolyzates.

생균수는  $\alpha$ -casein 분해물을 분자량 별로 나누어 첨가한 성장배지에서 *B. bifidum* Bb-11은 배양 12시간에 모든 시험구가 대조구에 비해 높았으며, 배양 24시간에 측정된 생균수는 분자량 10,000Da 이상의 분획만 대조구보다 낮은 생균수를 나타내었고, 나머지 시험구는 모두 높았으며, 분자량 3,000Da 이하보다는 분자량 10,000~3,000Da 분획 생균수가 더 많았다 (Fig. 4).  $\beta$ -Casein 분해물들도 배양 12시간에는 모든 첨가구가 대조구에 비해 높은 생균수를 나타냈으나, 배양 24시간때에는 대조구에 비해 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 5).  $\kappa$ -Casein 분해물들은 배양 12시간까지는 모든 처리구의 생균수가 대조구보다 높은 경향을 보였으며, 특히 분자량 3,000Da 이하의 분획과 분자량 10,000Da 이상의 분획에서 가장 많은 생균수를 나타내었으며, 두 시험구 간의 차이는 근소하였다. 그러나 배양 24시간이 되었을 때에는 모든 시험구에서 *B. bifidum*의 생장이 최대에 달하여 분자량 10,000Da 이상의 분획만이 높은 생균수를 나타내었다 (Fig. 6).

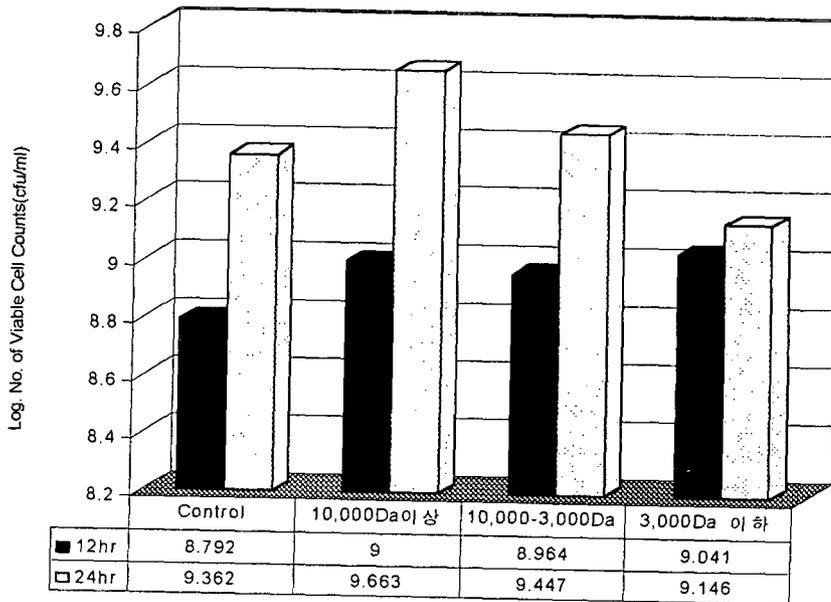


Fig.6. Changes of viable cell counts during the growth of *B. bifidum* Bb-11 in whey medium supplemented with different molecular weights of  $\kappa$ -casein hydrolyzates.

Whey를 기초로 한 성장배지에서 *B. bifidum* Bb-11은 단백질분해물들 (MPH, CH)에 의해서 생장이 촉진되는 효과를 보여 주었다. 유청용액에 효모추출물을 0.5% 첨가하여 bifidobacteria의 성장시킨 결과, 증식이 잘 되었으며, 유청용액을 기초로 한 배지가 bifidobacteria의 배양배지로서 적합하다는 Park과 Heo(1995)의 연구결과가 있다. 그러나, bifidobacteria의 성장을 높여주기 위해서는 별도의 성장촉진물질을 필요로 하기 때문에 각종 성장급원물질들의 성장촉진효과를 밝히려는 노력이 계속되고 있다. 그 중에서도 우유로부터 bifidobacteria의 성장촉진인자를 발견하려는 연구들을 살펴보면, Rose 등(1963)이 우유단백질을 pepsin, trypsin, papain 등의 단백질 분해효소처리하여 얻어진 분해물들이 bifidobacteria의 성장촉진효과가 있었다는 연구결과를 발표한 이후, Kehagias 등(1977), Jao 등(1978) 등은 우유 casein으로부터 casein bifidus factor를 분리하였으며, 이 물질은 모유의 N-acetyl-glucosamine과 같은 정도의 성장촉진효과가 있

었다고 하였다. 상업적 casein분해물들이 bifidobacteria의 성장을 촉진한다는 보고(Proulx와 Gaurhier, 1992)와 함께 Klaver 등(1993)은 bifidobacteria 자체는 우유 단백질을 분해하는 효소가 부족하므로 casein 분해물이나 아미노산을 성장촉진물질로 첨가해 주어야 하며, 우유 단백질을 가수분해하지 않으면 bifidobacteria의 배양속도가 느려진다고 하였다. 이 결과들은 성장촉진물질을 함유하고 있는 MPH와 CH 등에는 분자량이 600Da 이하인 저분자 물질이 많으므로 쉽게 미생물의 세포벽을 투과하여 이용되는 때문이라고 설명되어진다(Mcdonald 등, 1990).

Trypsin 처리한 3종류의 casein 분해물들을 분자량에 따라 *B. bifidum* Bb-11의 성장촉진효과를 연구한 본 실험의 결과를 보면,  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein은 분자량 3,000Da이하의 분획에서 가장 높은 성장촉진효과를 나타낸 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 분자량 1,100~2,300Da 범위의 peptide들이 bifidobacteria의 산생성량을 증가시켰다는 Cheng과 Nagasawa(1984)는 casein분해물로부터 얻어진 peptide들이 유리아미노산에서 얻은 질소원보다 peptide의 질소원이 bifidobacteria의 성장촉진효과가 있다고 한 Proulx 등 (1992)의 연구와 분자량 5,000Da보다 큰 peptide들은 bifidobacteria의 성장에 대한 촉진효과는 없다고 한 Poch와 Betskorobainy(1991)의 결과와 같은 경향을 보였다. Bouhallab 등(1993)은 우유 casein의 tryptic hydrolysates로부터 얻어진 펩타이드 혼합물(MP)에 함유된 peptide 형태들은 bifidobacteria의 성장을 촉진시켰으며, MP 분해물의 성장촉진효과는 분자량 2,000Da 이하의 작은 peptide에 의한 것이라는 연구 결과들과도 일치하고 있다.

한편, Poch와 Betskorovainy(1991)는 trypsin처리에 의한  $\kappa$ -casein 분해물이 우유 casein 분해물 구성물질중에 가장 좋은 성장촉진물질이 있다고 하였는데, 본 연구에 있어서는  $\kappa$ -casein 이외에  $\alpha$ -,  $\beta$ -casein 분해물들의 분자량 3,000Da 이하인 peptide들도 *B. bifidum*의 성장을 촉진하는 주요물질인 것으로 밝혀졌다. 본 연구 결과를 Bezkorovainy와 Topouzian (1981)의 보고에 비추어 보면 *B. bifidum* var. *pennsylvanicus*에 대한 우유 단백질의 성장촉진효과는 오직 분자량 10,000Da 이하의 비단백태 질소에서만이 성장촉진효과를 나타낸 반면, *B. bifidum*, *B. infantis* 및 *B.*

*breve*는 분자량 10,000Da 이하의 비단백태 질소와 분자량 10,000Da 이상의 단백질 질소 모두에서 성장효과를 나타내었다는 연구결과와 같이 *bifidobacteria*는 균종에 따라 필요로 하는 성장촉진물질이 상이하다는 결과를 뒷받침 해주고 있다.

#### 4. 적 요

Whey를 *Bifidobacterium bifidum* Bb-11의 성장기초배지로 하여 protein hydrolysate (MPH)와 casein hydrolysate (CH)을 첨가하였을 때 성장촉진효과를 알아보고, 케이신을 구성하고 있는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -casein을 각각 trypsin으로 처리하여 얻어진 분해물을 분자량( > 10,000Da, 10,000~3,000Da, < 3,000Da)에 따라 분획한 후 배지에 첨가하였을 때 성장에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 그 결과, 단백분해물인 MPH와 CH의 첨가에 따른 성장효과가 전 시험구에서 나타났으며, 단백분해물의 첨가량에 따른 차이는 1% 시험구가 가장 높은 성장효과를 보임으로써, 영양물질, 즉 단백분해물의 첨가농도가 높을수록 성장촉진효과가 현저하게 증가하는 현상을 보여주었다. 세 종류의 casein분해물들을 분자량에 따라 3,000Da 이하, 3,000~10,000Da, 10,000Da 이상으로 분획하여 유청배지에 첨가한 결과 *B. bifidus* Bb-11의 생장이 촉진되는 효과를 보였으며,  $\alpha$ -casein 및  $\beta$ -casein 분해물들 중에서는 분자량이 작은 분획(3,000Da 이하)이 성장촉진효과가 가장 높은 것으로 나타났으나,  $\kappa$ -casein 분해물은 10,000Da 이상의 분자량을 갖는 분획에서 다소 높은 pH와 낮은 적정산도를 보였으며, 생균수도 높았다

## 제 2 절 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7의 생장 비교 시험 및 초미세구 Bifidobacteria를 첨가한 유제품 제조

### 1. 서론

Bifidobacteria는 유해 미생물의 증식 억제 효과(Gibson 등, 1994 ; Misra 등, 1995; Moore 등 1995), 면역기능의 강화(Link등, 1994 ; Schiffrin 등 1995), 항암효과(Gri 11등, 1995 ; Kampmann등, 1994 ; Singh등, 1997 ; Van't등, 1989) 및 cholesterol 저하 효과(Seki등, 1978) 등을 비롯하여 많은 건강 증진 효과가 있는 것으로 알려졌다(Bouhnik Y등, 1996). 그러나 이와 같이 우수한 bifidobacteria의 건강증진 효과도 장내에서 생존이 왕성하여야 그 기능을 제대로 발휘 할 수 있을 것이다. 사람의 위액은 pH가 2.0 정도로 매우 낮아서 bifidobacteria를 섭취하여 위를 통과할 때 이와 같이 낮은 산성 조건 때문에 균주에 따라 차이가 있기는 하지만 대부분 사멸 하는 것으로 알려져 있다. (conWay등, 1987 ; Floch 등, 1971 ; Midtvedt, 1974). Mayer(1948)가 bifidobacteria를 유아용 식품제조에 이용한 이래 발효유제품을 비롯하여 건강증진 효과를 위하여 bifidobacteria를 다양하게 이용하고 있으나 그 기능적 특성을 충분히 발휘하기 위해서는 내산성을 지닌 균주를 개발하거나 bifidobacteria미세캡슐을 제조하여 이용성을 높이기 위한 방법등이 제시 되고 있다.

이 시험은 bifidobacteria의 낮은 산성환경에서도 사멸하지 않고 장내에서 활성을 유지하며 그 이용성을 높이기 위하여 상업균주인 *B. bifidum* Bb-11 과 협동연구과제에서 우수한 균주로 선발한 *B. bifidum* K-7을 미세캡슐로 제조하기 위하여 최적 조건으로 배양, 활성화 시킨 다음, sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles을 air atomization 방법을 사용 제조 하였으며, 이를 시유, 발효유 및 아이스크림에 첨가하여 새로운 유제품을 개발하고자 시도 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Bifidobacteria

이 시험에 사용된 bifidobacteria는 상업균주로 동결건조된 *B. bifidum* Bb-11(Chr. Hansen's, Denmark)과 협동연구과제에서 우수한 균주로 선발한 *B. bifidum* K-7을 L-cysteine·HCl(Sigma)을 함유하는 MRS broth에서 계대 배양하여 활력을 최대로 한 다음 원심분리기(Beckman J2-21, England)로 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거한후 미세 캡슐 제조에 사용하였다.

### 나. Bifidobacteria 배양

MRS broth는 L-cysteine 0.05%를 첨가 pH를 6.8로 조정 사용하였다. Whey를 기초로 한 배지는 국내산 whey powder를 증류수에 6.5%로 용해시키고 pH는 1N NaOH용액을 사용 6.8로 조정하였으며 원심분리기(Beckman J2-21, England)로 9,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 회수, 냉동 보관하면서 시험에 사용하였다. 상정액의 whey 성분조성은 단백질 0.59%, 지방0.38%, 유당3.74%, 무기물 0.35%, 그리고 수분 94.90%이었으며, *B. bifidum* K-7은 기본적으로 Ammonium citrate 0.2%, Sodium Acetate 0.5% Magnesium sulfate 0.01% 및 Manganese sulfate 0.005%를 첨가하였다.

### 다. 유제품의 제조

시유는 시판 탈지분유(서울우유)를 구입하여 고형분 함량이 12.7%로 제조하여 시험에 사용하였고, 발효유는 상업용으로 동결건조된 yoghurt starter culture B-3 (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 혼합균주, Chr. Hansen's, Denmark)로 yoghurt를 제조하여 시험에 사용하였으며, 아이스 크림은 아이스크림믹스(하이믹스, 매일유업)를 구입하여 아이스크림제조기(Sani-Serv A4071-E, U.S.A)로 아이스 크림을 제조하여 시험에 사용하였다.

라. 초미세구 bifidobacteria 첨가

*B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 sodium alginate poly-*l*-lysine 미세 캡슐을 air atomization으로 제조하여, 시유, 발효유 및 아이스크림 믹스에 각각 200ml당 bifidobacteria 미세 캡슐을 5g씩 첨가하였으며, 시유와 발효유는 4℃, 그리고 아이스크림은 -20℃에 보관, 경시적으로(0, 4, 8, 12 및 16일) pH, 적정산도 및 생균수를 측정하였다.

마. pH, 적정산도 및 생균수 측정

pH는 Mettler Delta 350으로 측정하였으며, 적정산도(titratable acidity, TA)는 Marth의 방법(1978)에 따라 시료 9ml에 동량의 증류수를 가하고 1% phenolphthalein을 첨가, pH가 8.4에 도달할 때까지의 0.1N NaOH 소요량(ml)으로 측정 환산하였다.

Bifidobacteria의 생균수는 NPML MRS agar를 사용하여 측정하였다. NPML은 Neomycin sulfate 2g, Paromomycin sulfate 4g, Nalidixic acid 0.3g, Lithium chloride 60g을 증류수 1ℓ에 가하여 항생제용액을 만들었다. 항생제 용액은 0.22 μm membrane filter 통과하여 여과 멸균한 다음 4℃에서 보관 사용하였다. 생균수 측정은 MRS agar에 L-cysteine·HCl 0.05%를 첨가, 121℃에서 15분간 멸균한 배지에 항생제용액 5% 첨가하여 NPML MRS agar를 제조 사용 측정하였으며, 희석액은 MRS broth함량의 1/2농도로 하여 L-cysteine·HCl 0.05%를 첨가 사용하였다. 각 시료는 0, 4, 8, 12 및 16일 간격으로 1ml를 취하여 100ml 인공장액에 약 4시간동안 넣어 미세 캡슐에 봉입된 균주를 용출하였다. 인공장액으로 용출된 시료 1ml를 취하여 MRS agar로 37℃에 48시간 BBL Gas Pak 100™ Anaerobic Systems (Cockeysville, MD, U.S.A)에 의하여 혐기적으로 배양하였으며 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 성장 비교 시험

협동연구과제에서 우수한 bifidobacteria로 선발하여 공급한 *B. bifidum* K-7에 대하여 미세캡슐제조를 위한 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 MRS broth와 whey를 기초로 한 배지에서 성장시험을 실시하였으며 *B. bifidum* Bb-11과 비교하였다.

*B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7을 MRS broth에 L-cysteine · HCl 0.0 5%를 첨가하여 성장시험을 하였으며 37℃에서 24시간 배양하면서 생균수, pH 및 적정산도의 변화를 측정한 결과를 보면 Fig.1, Fig.2 및 Fig. 3과 같다.

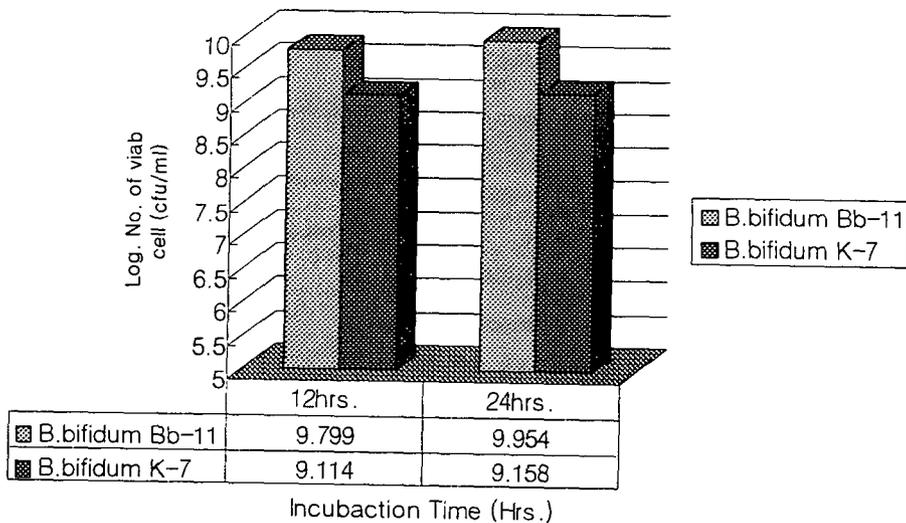


Fig.1. Growth effects of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in MRS broth.

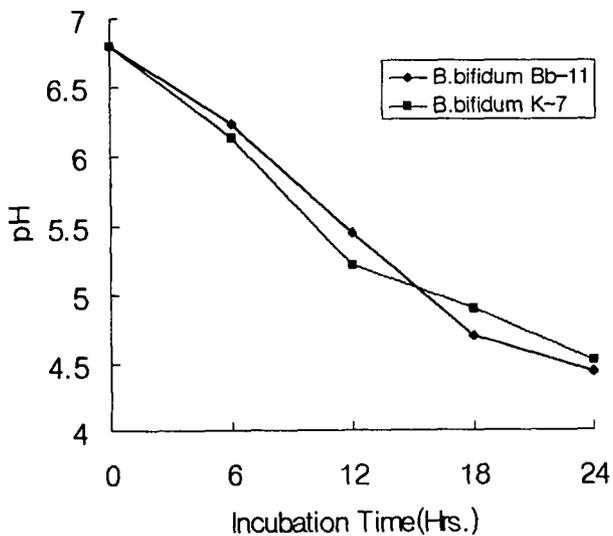


Fig.2. Changes of pH during the growth of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in MRS broth.

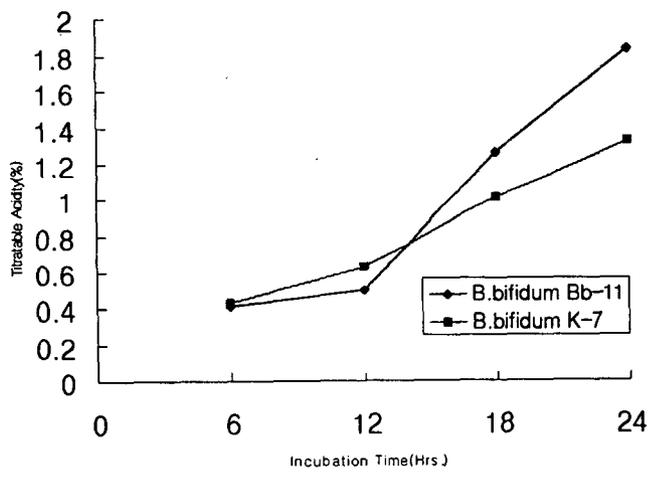


Fig.3. Changes of titratable acidity during the growth of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in MRS broth.

*B. bifidum* K-7을 MRS broth로 37℃에서 24시간 배양 할 때 적정산도는 *B. bifidum* K-7이 1.33%이었으나 *B. bifidum* Bb-11은 1.84%로 높은 경향을 보여 주고 있으나, 생균수는 Fig.1에서 보는 바와 같이 배양 12시간에 *B. bifidum* K-7이  $1.3 \times 10^9$  그리고 *B. bifidum* Bb-11이  $6.3 \times 10^9$ 이었으며 배양 24시간에서 각각 *B. bifidum* K-7이  $1.4 \times 10^9$ 과 *B. bifidum* Bb-11이  $9.0 \times 10^9$ 으로 큰 차이가 없었으며 배양 기간중 pH 저하에 있어서는 2종의 균주 차이는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 MRS broth에 L-cysteine · HCl 0.05% 첨가하여 배양 할 때 *B. bifidum* K-7은 *B. bifidum* Bb-11과 거의 동일한 생장을 보여 주었으며 차이가 크게 나타나지 않음을 알 수 있다.

Whey를 기초로 하고 L-cysteine · HCl 0.05%를 첨가한 배지에서 *B. bifidum* K-7은 37℃에서 24시간 배양 할 때 pH가 5.20으로 *B. bifidum* Bb-11의 pH 4.03보다 높았으며, 적정산도는 *B. bifidum* K-7이 0.33% 그리고 *B. bifidum* Bb-11이 0.64%로 현저하게 낮았고, 생균수에 있어서도 *B. bifidum* K-7이  $1.7 \times 10^8$ , *B. bifidum* Bb-11이  $1.9 \times 10^9$ 으로 현저하게 낮게 나타나고 있다. 이상의 결과로 미루어 보아 MRS broth에서와는 달리 whey를 기초로 한 배지에서는 *B. bifidum* Bb-11이 *B. bifidum* K-7에 비하여 pH, 적정산도 및 생균수에 있어서 모두 생장이 우수함을 알 수 있다. (Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6)

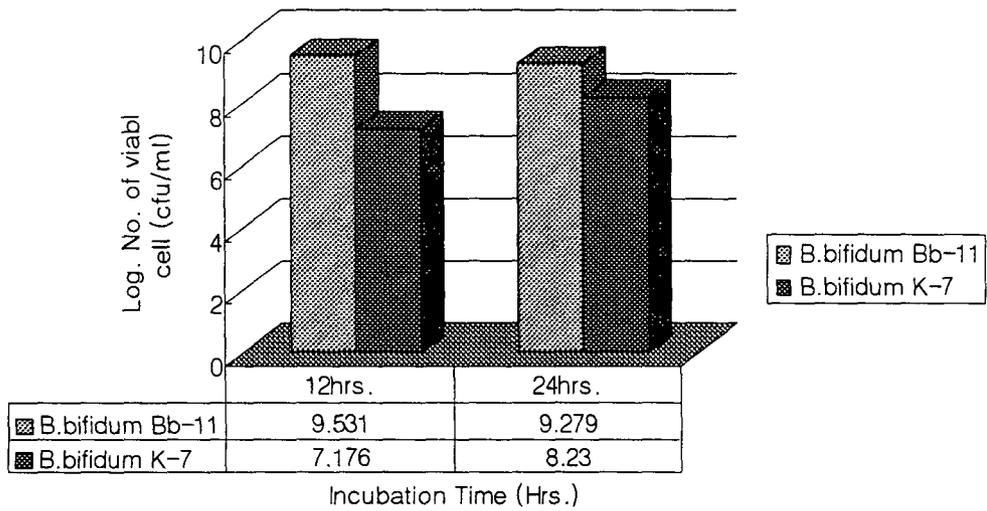


Fig.4. Growth effects of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in Whey-based medium.

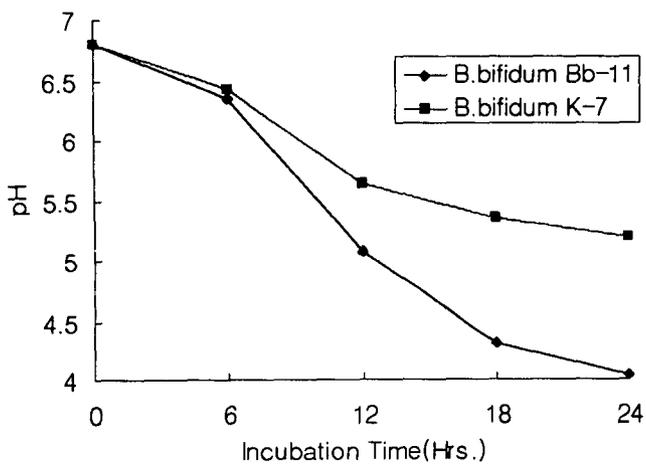


Fig.5. Changes of pH during the growth of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in Whey-based medium.

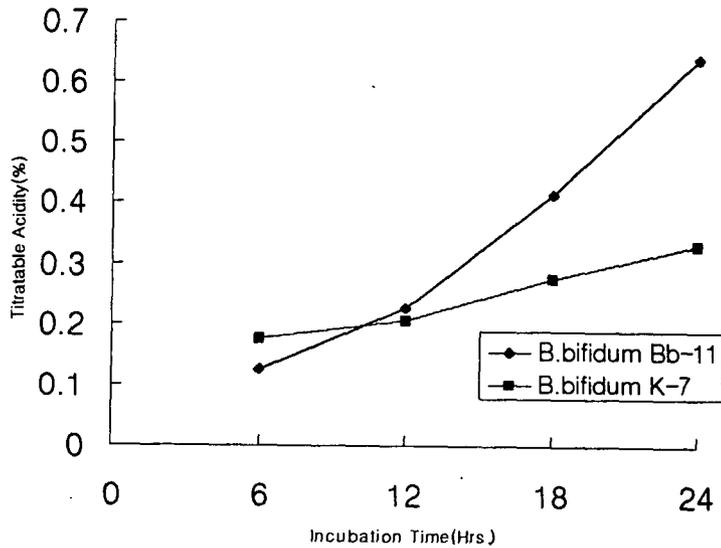


Fig. 6. Changes of titratable acidity during the growth of *B. bifidum* K-7 and *B. bifidum* Bb-11 in Whey-based medium.

*B. bifidum* K-7에 대한 whey의 성장율을 높이기 위하여 whey를 기초로 한 배지에 whey protein isolate(WPI)를 0.75% 첨가하거나, yeast extract를 0.75% 첨가하여 배양하여도 *B. bifidum* K-7의 성장을 약간 증가시키는 효과를 보여 주기는 하였으나 *B. bifidum* Bb-11에 비하여서는 생장이 여전히 떨어졌다.

#### 나. 초미세구 bifidobacteria의 시유 첨가 시험

Acidophilus milk와 같이 우유를 발효하지 않고 bifidobacteria를 함유한 bifidobacteria milk를 제조 개발하기 위하여 bifidobacteria 미세캡슐을 pH가 시유와 유사한 우유에 첨가하여 bifidobacteria의 생존력을 시험하였다.

본 시험에 원료유로 사용한 시유는 bifidobacteria 미세 캡슐에 대한 저장중 변화를 가능한 한 정확하게 측정하기 위하여 12.7% 탈지시유를 제

조하여 121℃에서 1분간 멸균, 4℃로 냉각하여 탈지시유 200ml에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7 미세캡슐을 각각 5g씩 첨가하여 4℃ 냉장고에 보관하면서 16일 까지 경시적(0, 4, 8 및 16일)으로 bifidobacteria 생균수, pH 및 적정산도를 측정하였다.

*B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 미세캡슐을 12.7% 탈지시유에 첨가하여 4℃에서 저장하면서 생균수의 변화를 보면 Fig.7에서 보는 바와 같다.

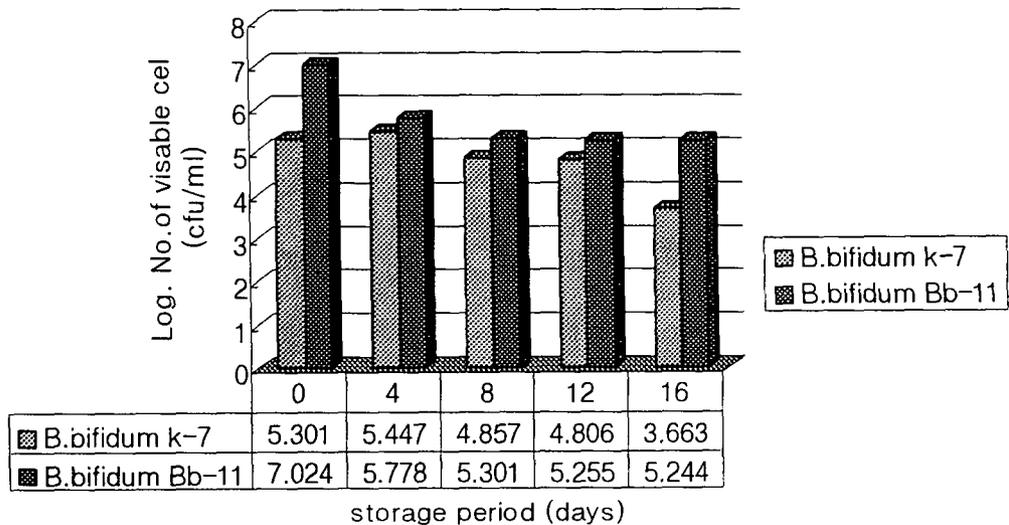


Fig.7. Changes of viable cell counts during the storage of milk added bifidobacteria microparticles

탈지시유에 *B. bifidum* Bb-11 첨가구와 *B. bifidum* K-7 초미세구첨가구의 최초 생균수는 각각 *B. bifidum* Bb-11이  $1.6 \times 10^7$  과 *B. bifidum* K-7이  $2 \times 10^5$ 이 있으며 저장기간이 경과 할수록 점차 감소하여 저장 16일에는 각각 *B. bifidum* Bb-11이  $5.8 \times 10^5$  및 *B. bifidum* K-7이  $4.6 \times 10^3$ 으로 *B. bifidum* Bb-11이 *B. bifidum* K-7보다 생존력이 높게 나타났다. 시험기간중 *B. bifidum* Bb-11 보다 *B. bifidum* K-7의 생존력이 낮은 것은 최초

bifidobacteria 미세캡슐을 탈지시유에 첨가 하였을 때 *B. bifidum* K-7이 *B. bifidum* Bb-11보다 생균수가 낮았기 때문이라고 생각된다.

식품위생법에 의하면 시유에 유산균이나 효소등을 첨가하게 되면 가공 유 범주에 속하게 되며 bifidobacteria 미세캡슐을 첨가한 우유도 마찬가지로 해석할 수 있다. 본 시험에서 시유제조시 bifidobacteria 미세캡슐의 첨가 단계 결정은 예비시험결과 살균 냉각하여 첨가하는 것이 좋은 것으로 판단 되었으며, 4℃에서 저장할 때 *B. bifidum* Bb-11 및 *B. bifidum* K-7 모두 16일 까지 우수한 생존력을 유지하고 있었기 때문에 bifidobacteria 함유 시유 제조 가능성이 충분히 있다고 판단된다.

*B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 미세캡슐을 12.7% 탈지시유에 첨가하여 4℃에서 저장, pH 변화를 보면 Fig.8에서 보는 바와 같다.

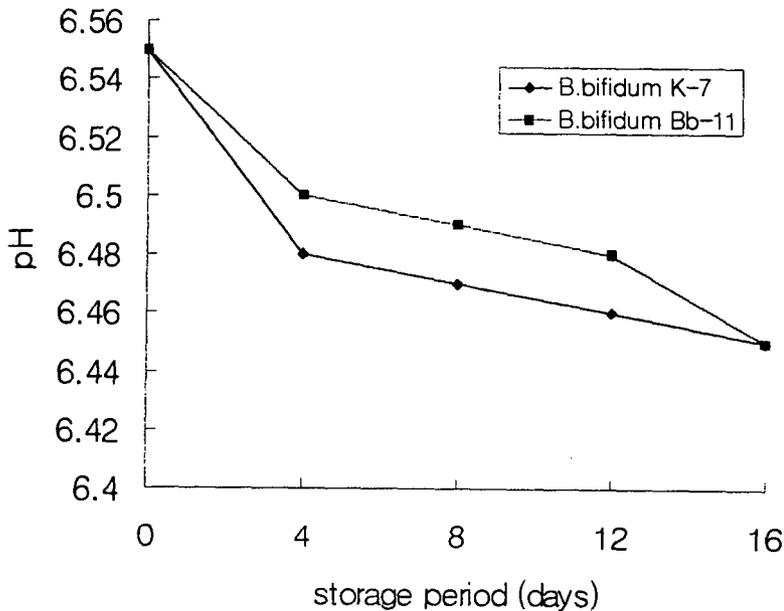


Fig.8. Changes of pH during the storage of milk added bifidobacteria microparticles

Fig.8에서 보면 *B. bifidum* Bb-11 첨가구와 *B. bifidum* K-7 첨가구의

최초 pH는 모두 6.55이었고 저장 4일에 각각 *B. bifidum* Bb-11이 pH 6.5와 *B. bifidum* K-7이 6.48로 저하되었으며 그 후 서서히 저하되어 저장 16일에 2개구 모두 pH 6.45로 떨어졌다. 시험 기간중 *B. bifidum* K-7 첨가구가 *B. bifidum* Bb-11 첨가구 보다 pH가 약간 더 저하되는 경향이 있었으나 크게 차이가 나타나지 않았으며 저장 16일에 pH가 동일하게 나타난 것으로 보아 bifidobacteria milk를 제조 개발할 경우 이 정도의 pH저하는 크게 문제가 되지 않는다고 판단된다. 4℃에서 16일 까지 장기간 탈지시유가 이화학적 변화없이 저장 가능했던 것은 12.7% 탈지시유를 제조하여 121℃에서 1분간 멸균했기 때문이다.

멸균 탈지시유에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7을 첨가하여 4℃에서 저장, 이 기간중 적정산도(T.A)의 변화를 보면 Fig.9 와 같다.

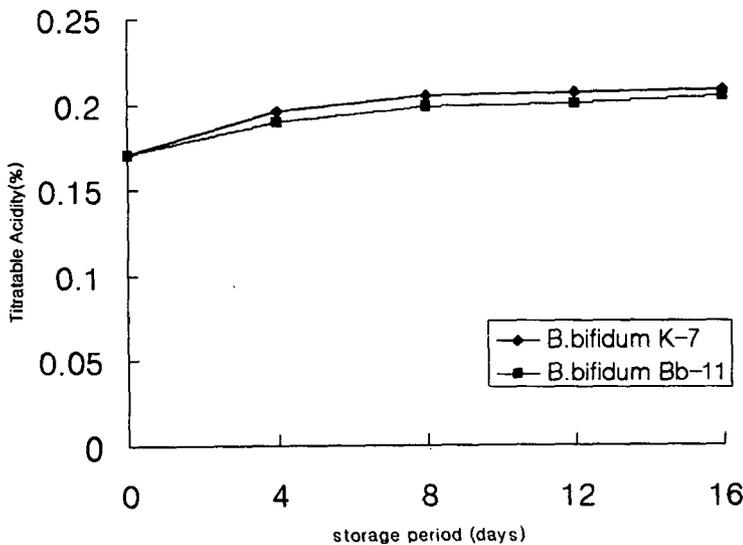


Fig.9. Changes of titratable acidity during the storage of milk added bifidobacteria microparticles

*B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7을 첨가한 최초의 적정산도는 2개구 모두 0.17% 이었고, 저장 8일에는 각각 *B. bifidum* Bb-11이 0.19%와 *B.*

*bifidum* K-7이 0.20%로 약간 증가되었으며 저장 16일에는 각각 *B. bifidum* Bb-11이 0.20%와 *B. bifidum* K-7이 0.21%로 전 시험기간을 통하여 약간 증가하는 경향을 보여 주고 있다. pH와 더불어 이와 같이 적정산도가 증가하는 것은 미세캡슐에 들어 있는 bifidobacteria가 약간은 용출되어 성장함으로써 산을 생성하기 때문이라고 판단되며, 이 정도의 산도증가는 bifidobacteria milk를 제조하여 음용하여도 좋다고 생각된다. 더욱이 4℃에서 4일간 저장했을 때 적정산도가 각각 *B. bifidum* Bb-11이 0.18%와 *B. bifidum* K-7이 0.19%로 이 정도 수준의 적정산도는 전혀 문제가 되지 않을 것으로 생각된다.

시험기간중 신선 시유와 비교할 때 적정산도가 전체적으로 약간 높은 경향을 보여주고 있는데 이것은 12.7% 탈지시유를 제조 121℃에서 1분간 가열하였기 때문이다.

#### 다. 초미세구 bifidobacteria의 발효유 첨가 시험

발효유제품을 통하여 섭취한 미생물이 장내에 정착하기 위해서는 인체의 여러 가지 방어체계에 대한 저항성(Gilliland, 1979), 숙주 및 장내균총사이의 상호작용등의 요인이 관계가 있으며(Petterson등, 1983), 최근 bifidobacteria를 비롯하여 내산성이 약한 유산균을 캡슐로 처리하여 인체의 위액에 안전하며 담즙산에 노출되지 않고 장에 도달하여 장내 중성 pH에서 bifidobacteria 또는 유산균이 용출되게 함으로서 이들의 이용성을 높이는 연구가 이루어져 왔다(류등, 1998). 현재 국내에서도 2개 회사가 bifidobacteria 및 유산균을 코팅처리한 미세캡슐을 첨가하여 제조한 발효유제품을 시판하고 있으며 비교적 성공을 거두고 있다.

본 시험은 발효유제품을 제조할 때 코팅처리한 bifidobacteria 미세캡슐의 첨가 효과를 알기 위해 상업용으로 동결 건조된 yoghurt starter culture B-3 (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 혼합균주, Chr. Hansen's, Denmark)로 yoghurt를 제조하여 시험에 사용하였으며, yoghurt 200ml에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7 미세캡슐을 각각 5g씩 첨가하여 4℃ 냉장고에 보관, 16일 까지 경시적으로(0, 4, 8, 12 및 16일) bifidobacteria 생균수, pH 및 적정산도를 측

정하였다.

*S. salivarius subsp. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 2종의 유산균으로 전통적인 yoghurt를 제조하여 bifidobacteria 미세캡슐을 첨가하였으며 4℃에 저장, 생균수의 변화를 보면 Fig.10와 같다

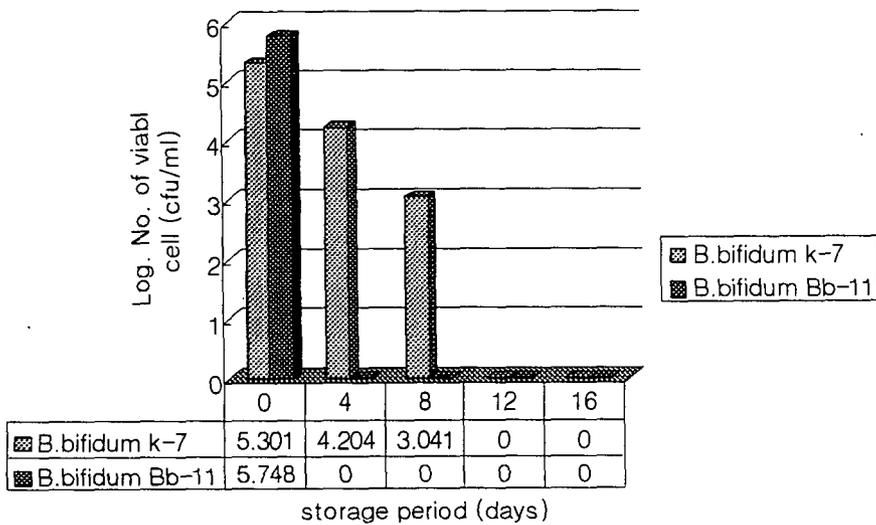


Fig.10. Changes of viable cell counts during the storage of fermented milk added bifidobacteria microparticles

Fig.10에서 보는 바와 같이 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 최초 생균수는 각각  $5.6 \times 10^5$ 과  $2.0 \times 10^5$ 이었으나 *B. bifidum* Bb-11은 저장 4일에  $10^3$ 으로 희석하여 측정된 결과 거의 나타나지 않았으며 *B. bifidum* K-7은 저장 8일에는  $1.1 \times 10^3$ 을 나타냈으며, 저장12일에  $10^3$  희석 비율에서 측정되지 않았다. 이것은 yoghurt와 같은 발효유의 산성환경에서 미세캡슐 bifidobacteria가 사멸한 것으로 추측되며 *B. bifidum* K-7이 *B. bifidum* Bb-11보다 최초 생균수는 낮았지만 더 오랜 저장기간에도 생존

한 것은 *B. bifidum* K-7이 *B. bifidum* Bb-11 보다 내산성이 더 우수한 것으로 판단된다.

발효유에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7 의 미세캡슐을 첨가하여 4°C에서 저장, pH 변화를 보면 Fig.11와 같다.

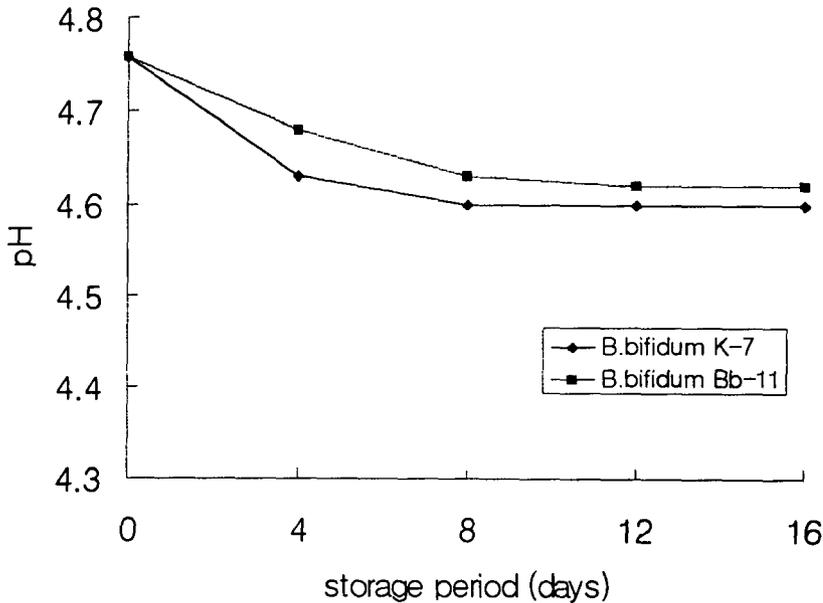


Fig.11. Changes of pH during the storage of fermented milk added bifidobacteria microparticles

Yoghurt에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 미세캡슐을 첨가한 제품의 최초 pH는 모두 4.75이 었고, 저장 8일에는 각각 *B. bifidum* Bb-11 이 4.63과 *B. bifidum* K-7이 4.60을 나타 냈으며, 저장 16일은 *B. bifidum* Bb-11이 4.62와 *B. bifidum* K-7이 4.60으로 약간 저하되었다. Bifidobacteria 미세캡슐을 첨가한 발효유는 4°C 저장기간중 pH가 크게 변화하지 않았으며 약간 저하된 것으로 나타난 것은 bifidobacteria 미세캡슐을 첨가한 영향이라기 보다 발효유에 함유된 유산균의 영향이 더 큰 것으로 생각된다.

발효유에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7의 미세캡슐을 첨가하여 저장 기간중 적정산도의 변화를 보면 Fig.12과 같다.

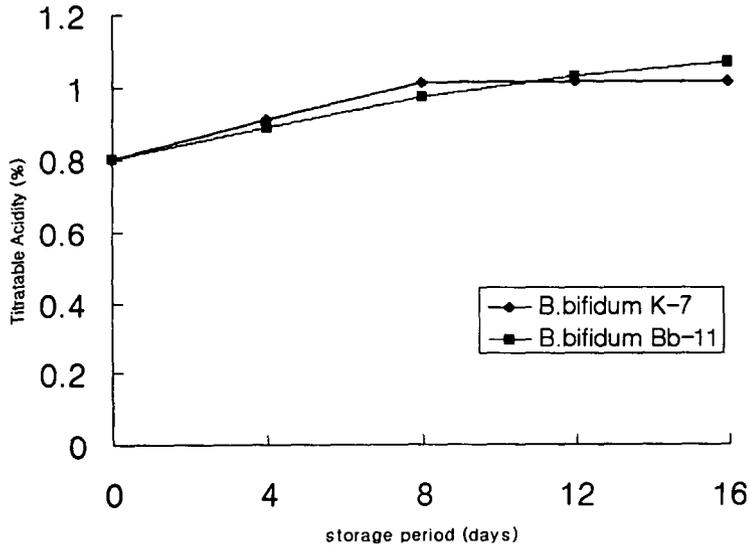


Fig.12. Changes of titratable acidity during the storage of fermented milk added bifidobacteria microparticles

*B. bifidum* Bb-11 및 *B. bifidum* K-7을 첨가한 발효유의 최초 적정산도는 모두 0.8%를 나타냈으나, 저장 8일에는 *B. bifidum* Bb-11이 0.97% 그리고 *B. bifidum* K-7이 1.01%로 상승하였으며, 저장 16일에는 *B. bifidum* Bb-11이 1.07%와 *B. bifidum* K-7이 1.02%로 약간 증가하는 경향을 보여 주고 있다. 이와 같은 적정산도의 변화는 발효유에 첨가한 bifidobacteria 미세캡슐에 의한 것이 라기 보다 pH변화와 마찬가지로 발효유에 함유된 유산균의 영향으로 판단된다.

라. 초미세구 bifidobacteria의 ice cream 첨가 시험

외국에서는 유산균을 발효하여 제조한 아이스 크림 즉 frozen yoghurt 가 많이 생산 판매되고 있다. 이것은 아이스크림에 유산균이 함유되도록

제조하여 유산균에 의한 아이스크림의 건강증진효과를 높이기 위하여 시도된 제품이다.

본 시험에서서도 이와 같은 목적을 달성하기 위하여 아이스크림믹스(하이믹스, 매일유업)를 구입하여 아이스크림제조기(Sani-Serv A4071-E, U.S.A.)로 아이스 크림을 제조하여 bifidobacteria 미세 캡슐을 첨가 하였으며 이의 효과에 대한 시험을 수행하였다. 아이스크림을 제조하기 전 먼저 아이스크림 믹스 200ml에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7 미세캡슐을 각각 5g씩 첨가하여 아이스크림을 제조하고 -20℃의 냉동상태에서 16일간 보관하면서 0, 4, 8, 12 및 16일 까지 bifidobacteria 생균수, pH 및 적정산도를 측정하였다.

저장중 bifidobacteria 생균수의 변화는 Fig.13에서 보는 바와 같이 아이스크림을 제조한 다음 즉시 측정한 결과 *B. bifidum* Bb-11이  $4.1 \times 10^6$  그리고 *B. bifidum* K-7이  $4 \times 10^5$ 이었으며, 저장 4일에는 *B. bifidum* Bb-11이  $4.9 \times 10^5$  그리고 *B. bifidum* K-7은  $5.0 \times 10^5$ 을 으로 *B. bifidum* K-7보다 *B. bifidum* Bb-11이 더 저하되었고, 그 후 저장 12일까지는 2개구 모두 큰 변화가 없었으나 저장 16일에는 *B. bifidum* Bb-11이  $4.1 \times 10^5$  그리고 *B. bifidum* K-7이  $3.1 \times 10^4$  으로 *B. bifidum* K-7의 생균수 감소율이 *B. bifidum* Bb-11보다 더 높았다. 이상의 결과는 bifidobacteria 미세캡슐을 아이스크림믹스에 첨가하여 아이스크림을 제조하고 -20℃에 저장할 경우 저장 16일까지는 bifidobacteria 생균수가 크게 저하되지 않는다. 따라서 bifidobacteria 함유 아이스크림을 제조 개발할 수 있는 가능성이 충분히 있다고 생각된다.

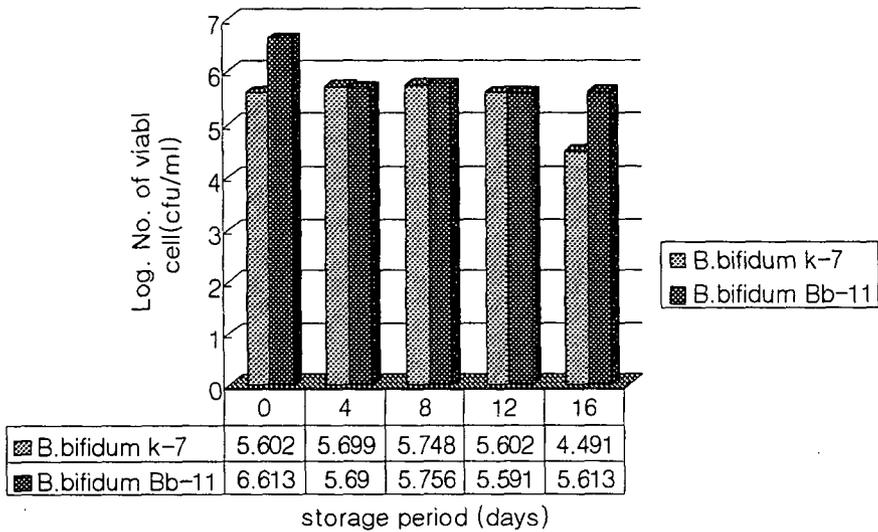


Fig.13. Changes of viable cell counts during the storage of ice cream added bifidobacteria microparticles

아이스 크림 믹스에 *B. bifidum* Bb-11 과 *B. bifidum* K-7 미세캡슐을 첨가하여 제조한 아이스크림을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장. 16일 까지 pH와 적정산도의 변화를 보면 , Fig.14 및 Fig.15에서 보는 바와 같다. *B. bifidum* Bb-11 미세캡슐 첨가구와 *B. bifidum* K-7 미세캡슐 첨가구의 최초 pH는 2개구 모두 6.75이 었고, 저장 16일은 *B. bifidum* Bb-11이 6.72 그리고 *B. bifidum* K-7이 6.78로 거의 변화 되지 않았다. 따라서 bifidobacteria 미세캡슐 첨가에 의한 아이스크림의 pH에 미치는 영향은 거의 없다.

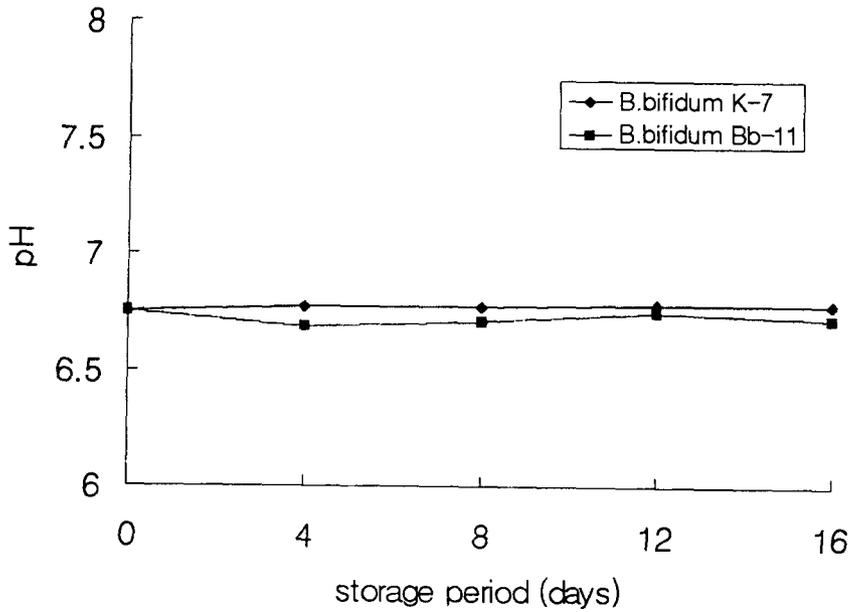


Fig.14. Changes of pH during the storage of ice cream added bifidobacteria microparticles

Bifidobacteria 미세캡슐을 첨가한 아이스크림의 저장중 적정산도의 변화도 *B. bifidum* Bb-11 첨가구와 *B. bifidum* K-7 첨가구 모두 초기에는 0.11%이었고 저장 16일에는 각각 *B. bifidum* Bb-11 0.11% 그리고 *B. bifidum* K-7 0.12%로 거의 차이가 없었으며 따라서 bifidobacteria 미세캡슐첨가에 의한 아이스크림의 저장중 적정산도 변화에도 영향이 없었다.

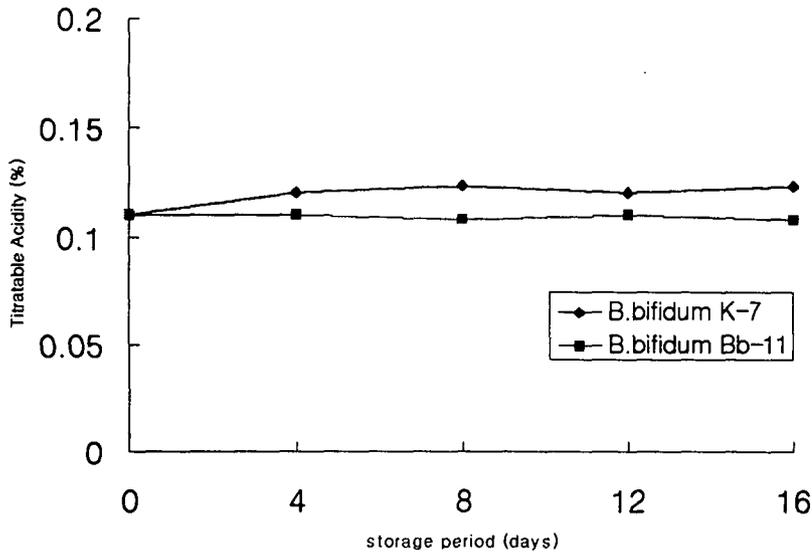


Fig.15. Changes of titratable acidity during the storage of ice cream added bifidobacteria microparticles

#### 4. 적 요

초미세구 bifidobacteria를 함유한 유제품을 제조개발하기 위하여 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7을 최적조건으로 배양 활성화시켜 sodium alginate poly-*l*-lysine microparticles을 air atomization 방법으로 제조하여 시유·발효유 및 아이스크림에 첨가하였다.

협동연구과제에서 우수한 bifidobacteria로 선발한 *B. bifidum* K-7에 대하여 L-cysteine·HCl 0.05%를 첨가한 MRS broth와 whey를 기초로한 배지에서 성장시험을 실시하였으며 *B. bifidum* Bb-11과 비교하였다. *B. bifidum* K-7을 MRS broth로 37℃에서 24시간 배양 할 때 적정산도는 *B. bifidum* K-7이 1.33%로 *B. bifidum* Bb-11의 1.84% 보다 약간 낮은 경향이 있었으나 생균수는 *B. bifidum* K-7이  $1.4 \times 10^9$  그리고 *B. bifidum* Bb-11이  $9.0 \times 10^9$ 으로 큰 차이가 없었으며, 배양 기간중 pH 저하에 있어서는 2종의 균주 사이에 차이가 거의 없었다.

Whey를 기초로 한 배지에 whey protein isolate(WPI) 또는 yeast extract를 0.75% 첨가하여도 MRS broth에서와는 달리 *B. bifidum* K-7을 37°C에서 24시간 배양할 때 pH 5.20, 적정산도 0.33% 및 생균수  $1.7 \times 10^8$ 으로, *B. bifidum* Bb-11의 pH 4.03, 적정산도 0.64% 및 생균수  $1.9 \times 10^9$ 으로 현저하게 생존율이 떨어졌다.

시유는 12.7% 멸균탈지시유를 제조하여 사용하였고, 발효유는 상업용 yoghurt starter culture B-3로 yoghurt를 제조 사용하였으며, 아이스크림은 시판 아이스크림 믹스를 구입하여 아이스크림을 제조, 시험에 사용하였다. 멸균탈지시유, yoghurt 및 아이스크림 믹스 200ml에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 각각 5g씩 첨가하여 시유와 발효유는 4°C 그리고 아이스크림은 -20°C에서 저장, 16일동안 생균수, pH 및 적정산도를 측정하였다. 멸균탈지시유에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 첨가한 최초의 생균수는  $1.6 \times 10^7$ 과  $2.0 \times 10^5$ 이었으나 저장 16일에 각각  $5.8 \times 10^5$  및  $4.6 \times 10^3$ 으로 시험기간을 통하여 우수한 생존력을 유지할 수 있었으며 pH가 약간 저하되고 적정산도가 조금 증가하는 경향이 있었으나 큰 변화가 나타나지 않았으며 이와 같은 결과는 bifidobacteria를 함유한 bifidobacteria milk를 제조 개발 할 수 있을 것으로 판단된다.

발효유에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7의 초미세구 첨가 효과를 보면 최초 pH와 적정산도는 각각 4.75와 0.8%이었으나 저장 16일에는 각각 pH가 4.62와 4.60 그리고 T.A가 1.07%와 1.02%로 크게 변화하지 않았으나 생균수는 *B. bifidum* Bb-11이 저장 4일에 그리고 *B. bifidum* K-7이 저장 8일에 거의 사멸한 것으로 나타났다.

아이스크림 믹스에 *B. bifidum* Bb-11과 *B. bifidum* K-7 초미세구를 첨가하여 아이스크림을 제조 -20°C에서 저장 시험한 결과 최초의 생균수는  $4.1 \times 10^6$ 과  $4.0 \times 10^5$ 이었으며 저장 16일에는 각각  $4.1 \times 10^5$  과  $3.1 \times 10^4$ 으로 큰 변화가 없었다. pH 및 적정산도의 변화에도 모두 큰 영향을 미치지 않았으며 이와 같은 결과는 bifidobacteria 초미세구를 함유한 아이스크림을 제조 개발할 수 있는 가능성이 충분히 있다고 판단된다.

### 제 3 절 참고문헌

1. Azuma, N., K., Yamauchi and T. Mitsuoka. 1984. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human  $\kappa$ -casein. *Agric. Biol. Chem.* 48(8):2159-2162.
2. Bezkorovainy, A. and N. Topouzian. 1981. *Bifidobacterium bifidus* var. *pennsylvanicus* growth promoting activity of human milk casein and its derivatives. *Int. J. Biochem.* 13:585.
3. Bouhallab, S., C. Favrot and J. L. Maubois. 1993. Growth-promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Lait* 73:73-77.
4. Bouhnik Y, B. Flourie, c. Andrieux, N. Bisetti, F. Brie and J.C. Rambaud. 1996. Effects of *bifidobacterium* sp. fermented milk ingested with or without inulinon colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50 : 269-273
5. Cheng, C. C. and Nagasawa, T. 1984. Effect of peptides and amino acids produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of bifidobacteria. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 55:339-349.
6. Desjardins, M. L., D. Roy, and J. Goulet. 1990a. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* 73:299-307.
7. Desjardins, M. L., D. Roy, C. Toupin, and J. Goulet. 1990b. Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium spp.* *J. Dairy Sci.* 73:1478-1484.
8. El-Soda, M., A. Macedo, and N. F. Olson. 1992. The peptide hydrolase system of *Bifidobacterium species*. *Milchwissenschaft.* 47. 87-90.
9. Gibson, G.R. and X. Wang. 1994. Regulatory effect of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria.

- J. Appl. Bacteriol. 77 : 412-420.
10. Grill, J.P., J. Crociani and J. Ballongue. 1995. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. Appl. Microbiol. 20: 328-330.
  11. Hukins, R. W., and N. L. Nannen. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 76: 2354.
  12. Jao, V. C., E. M. Milkolajcik, and P. M. T. Hansen, 1978. Growth of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* in laboratory media supplemented with amino sugars and spent broth from *E. coli*. J. Food Sci. 43:1257-1260.
  13. Kampmann, E. A. Goldbohm, V.D. Brandt and P. Veer. 1994. Fermented dairy products, calcium and colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. Cancer Res. 54 : 3186-3190.
  14. Kehagias, C., Y. C., Jao, E. M., Mikolajick and P. M. T. Hansen. 1977. Growth response of *Bifidobacterium bifidum* to a hydrolytic product isolated from bovine casein. J. Food Sci. 42:146-150.
  15. Klaver, A. M., F. Kingma and H. Weewkamp. 1993. Growth and survival over Bifidobacteria in milk. Neth. Milk Dairy J. 47:151
  16. Link, A.H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot and J. M. Aeschlimann. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and change in intestinal flora mediated through fermented milk intake. Immunol. Med. Microbiol. 10 : 55-64.
  17. Marth, E. H. 1978. Standard methods for the examination of dairy products. Americ. Public Health Assoc. Washington, DC 20036.
  18. Marteau, P., P. Pochart, B. Flourie, P. Pellier, L. Sanots, J. F. Desjeux, and J. C. Rambaud. 1990. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. Am. J. Clin. Nutr. 52, 685-688.

19. McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassen. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56:2120.
20. Misra, A.K. and P.k. Kuila. 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. Indian J. Dairy Sci. 48: 612-614.
21. Modler, H. W., R. C. McKellar, H. D. Goff, and D. A. Mackie. 1990. Using ice cream as a mechanism to incorporate Bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. Cult. Dairy Prod. J. 25: 4-9.
- Moore, W.E and L.H. Moore. 1995. Intestinal floras of populations that have a high of colon cancer. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3202-3207.
22. Park, H. K., and T. R. Heo. 1995. Studies on the characteristics of *Bifidobacterium spp.* for the Industrial use. Korean, J. Food Sci. Ani. Resour. Vol.15(2):139-149.
23. Petschow, B. W., and R. D. Talbott. 1991. Response of *Bifidobacterium species* to growth promoters in human and cow milk. Pediatr Res. 29:208-213.
24. Poch, M., and A. Bezkorovainy. 1988. Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. J. Dairy Sci. 71: 3214-3221.
25. Poch, M., and A. Bezkorovainy. 1991. Bovine milk  $\kappa$ -casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. J. Agric Food Chem. 39: 73-77.
26. Proulx, M., S. F. Gauthier and D. Roy. 1992. Utilisation d'hydrolysats enzymatiques de caseine pour la croissance des bifidobacteries. Lait 72:393-404.
27. Reuter, G. 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. Bifidobacteria Microflora 9: 107-118.
28. Rose, C. S. and P. György. 1963. Bifidus factor II for growth of *Lactobacillus bifidus*. Proc. Soc. Exp. Bio. N.Y. 112(4):923-926.
29. Van't, V.P., J. Dekker, J.W.J. Lamers, F.J.Kok, E.G.Schouten, H. Brants, F. Sturmans and R.J.J Hermus. 1989. Consumption of

- fermented milk products and breast cancer : A case-control study in the Netherlands. *Cancer Res.* 49 : 4020-4023
30. Schiffrin, E.J., F. Rochat, H.A. Link, J.M. Aeschlimann and A.H. Donnet. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria *J. Dairy Sci.* 78: 491-497.
  31. Seki, M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Simamura, T. Kawashima and K. Ogasa. 1978. The effect of bifidobacterium cultured milk on the "regularity" among aged group. *Nutr. Food.* 4 : 379-387
  32. Singh, j., A. Rivenson, M. Tomita, S. Shimamura, N. Ishibashi and B.S Reddy. 1997. *Bifidobacteria longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 18 : 833-841
  33. Yamauchi, K. 1992. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. *Bulletin of the IDF.* 272: 51.
  34. Yoshigawa, M., H. Suganuma, A. Shiata, H. Usui, K. Kurahashi, T. Mizumoto, Y. Suitani, and K. Kashimoto. 1994. In *peptides chemistry 1993*. Y. Okata(Editor), Protein Research Foundation, Osaka, 157-160.
  35. Yoshihama, M., E. Mochizuki, S. Mitsunashi, and K. Ahiko, 1982. Studies on application of galactosyl lactose for infant formula. III. Effects of galactosyl lactose on intestinal bacterial flora of newborn infants, Reports of research lab. Technical research institute, snow brand milk products Co.,Ltd, 78:33-37.

## 제 3 장 Bifidobacteria 함유 초미세구의 제조 및 평가

### 제 1 절 서론

장내의 Bifidobacteria는 유해 미생물 활동 억제, 면역강화, 항암작용, 혈중 cholesterol저하 및 장내 부패균을 억제하는 유익한 균이다. 따라서 식생활이나 스트레스 등 기타 여러 원인에 의해 유익균보다 유해균이 증식하기 쉬운 장내 환경에 유익한 Bifidobacteria 및 유산균과 같은 섭취가 요구된다.

Bifidobacteria는 혐기성 발효 균주로 우유와 유제품에서 생장이 잘 안되어 생산 및 산업화에 어려움이 있으며 특히 산소에 노출되면 안정성이 저하된다. Bifidobacteria를 비롯한 유산균을 단순히 복용하거나 요구르트, 치즈 등에 분산시킨 많은 제제중의 세균은 살아있는 생균이지만 보존중 사멸되거나 복용시 강한 위산을 통과할 때 대부분 죽게 되어 내장에 이르지 못해 생존율이 극히 불량하다. 따라서 보존중 Bifidobacteria의 안정성을 높이고 특히 유제품 중에 함유된 유산균을 복용시 위를 통과해 장에서 이용될 수 있도록 특수하게 제조된 유산균 제품을 복용해야 효과가 있다.

본 연구에서 제조하고자 하는 초미세구는 인체에 무해하고 다양한 생물체 및 백신등의 봉입에 응용되는 sodium alginate를 사용하여 제조하고자 하였다. Sodium Alginate가 다가 양이온과 치환시 겔화되는 성질을 이용하여 살아있는 세포나 백신 및 균주의 봉입 등에 널리 활용되고 있다. 그러나 기존의 제제는 미세구가 수mm에 이르는 크기가 커서 다양한 유제품의 중간 공정용으로 활용하는 데 문제가 있다. 즉 대개의 alginate를 활용한 제제는 크기가 수백  $\mu\text{m}$ 에서 mm에 이르는 상당히 큰 bead를 사용함으로써 분유 혹은 우유 등에 Bifidobacteria를 함유한 유제품의 활용에 문제가 있다.

본 연구에서는 Nozzle 및 분사방법으로 특수하게 제조된 Bifidobacteria

함유 초미세구의 제조방법을 연구하여 유산균의 내산성 및 안정성 향상을 위한 제품의 연구에 있다. 특히 살아있는 Bifidobacteria를 장내로 적절하게 전달하는 수단으로 안정한 조건에서 Bifidobacteria 균을 함유하는 초미세구를 제조하고 특히 수성 고분자를 사용한 특수 코팅기술로 유제품을 개발하려는 노력은 아직까지 낙농분야에 시도되지 못한 극히 초보적 단계이다.

본 연구 기술을 통하여 다음과 같은 측면에서 우위성을 확립할 수 있으리라 생각한다. 먼저 기술적 측면으로는 새로운 초미세구의 제조 기술을 확립함으로써 생균이나 백신 및 기타 생체 물질의 전달 수단으로 사용할 수 있다. 또한 인체에 무해하고 유기용매를 사용하지 않는 수성 코팅 기술을 개발함으로써 기타 다른 제제의 제조 기술에 활용될 수 있다. 특히 보존증 불안하고 생산 및 제조 과정이 복잡하며 특히 복용시 불안정한 균주들의 안정화 기술을 확립할 수 있으며 살아있는 Bifidobacteria 최적생균수를 체내에 전달할 수 있는 기술을 제공할 수 있다. 최근 Bifidobacteria 활용 기술 중 cholesterol 감소 기능, anti-mutagenicity 기능, 면역 강화기능 등을 이용하면 농수산물 가공 분야에서 새로운 고부가 가치를 창출할 수 있는 기술적 가능성이 열릴 수 있다.

경제·산업적 측면에서는 외국제품보다 우수한 품질유지 및 경쟁력이 강한 유제품을 개발함으로써 국가 경쟁력을 강화할 수 있으며 생산이 어렵고 비싼 Bifidobacteria균의 안정성을 강화하고 생균수를 극대화할 수 있는 방법을 확립함으로써 원가를 절감할 수 있다. 또한 새로운 Bifidobacteria 함유 유제품을 개발함으로써 우유 및 기타 유제품의 활성화에 기여할 수 있으며 Bifidobacteria 제품의 활성화로 낙농제품의 수요를 증대하고 제품의 효율을 활성화함으로써 농촌낙농업가의 수익을 증대할 수 있다.

사회·문화적 측면에서는 단순한 Bifidobacteria에 비하여 본 유제품이 체내에 최적 효율로 전달됨으로서 Bifidobacteria 관련 의학적 효능을 증대하여 건강에 이바지할 수 있고 특히 현대인의 최대관심사인 건강을 증진할 수 있는 본제품의 활성화로 국민복지에 이바지할 수 있다.

이상의 연구 배경을 바탕으로 본 연구에서는 air-atomization (공기분

사 장치) 기술을 사용하여 sodium alginate용액을  $\text{CaCl}_2$ 용액에 분사하여 형성되는 초미세구 제조 기술을 활용하여 Bifidobacteria를 봉입하고 균주의 생존율을 최적화 할 수 있는 제조공정인자, 최적 처방조성 (배지 및 첨가제등)을 고찰한 후 초미세구에 봉입된 균주의 내산성 및 안정성 실험을 평가하였으며 최종적으로 제품을 건강한 성인남성에게 투여한 후 분변 중에서의 장내 세균총의 변화 (Bifidobacteria의 변화 및 lactic acid bacteria, enterobacteriaceae 및 staphylococci)에 미치는 영향을 고찰하여 Bifidobacteria를 함유 초미세구의 우수성과 유제품 첨가에 응용할 수 있는 체제를 구축하였다. 즉 제제의 최적화 제조기술(공정 및 처방화 조건)은 확립, Bifidobacteria함유 초미세구의 제조 공정인자의 확립 및 평가, 초미세구제조 공정인자의 변화와 균의 생존율 측정, 초미세구로부터 균의 *in vitro* 방출 및 코팅된 초미세구의 내산성 및 안정성 연구와 끝으로 사람에서 코팅된 초미세구의 투약 후 분변중 균총 변화 및 *in vivo* 평가 연구이며 구체적으로 본 연구에서 수행한 연구 내용은 아래와 같다.

1차년도에서는 공기분사법에 의한 초미세구의 제조 공정 확립에 있다. 즉 공기분사법에 의한 초미세구 제조시 공기압력, 분사속도, 노즐 크기, 분사거리외에도 피막물질의 농도 및 처방 조성등을 확립하고 Bifidobacteria가 봉입된 초미세구의 입자 크기 분석 및 표면 구조를 폭 넓게 고찰하였다. 특히 고품의 초미세구 제조시 냉동 건조 조건과 유산균주의 생존율을 최적화할 수 있는 첨가제류와 제조 조건을 확립하는 데 있다.

2차년도에서는 Bifidobacteria함유 초미세구의 제조 공정인자의 확립 및 평가한 후 균의 생존율 측정이 있다 특히 코팅된 초미세구로부터 균의 인공위액 및 장액중 *in vitro* 방출실험 및 방출액의 조성/조건, 인공위액에서의 내산성을 다양하게 연구하고 또한 분말 상태로 보존하여 안정성을 확립하는 데 있다.

3차년도에서는 Bifidobacteria함유 초미세구의 평가 연구로 사람에서 코팅된 초미세구의 투약 후 분변중 장내 균총 변화 및 분변의 물리적 상태 변화등 *in vivo* 평가 연구에 주력하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 재료

Bifidobacteria 초미세구는 상업용으로 판매하고 있는 Chr. Hansen Lab. (Denmark) 의 *B. bifidum* Bb-11과 협동연구과제에서 우수한 균주로 선발한 *B. bifidum* K-7을 MRS broth와 whey를 기초로 한 배지에서 최대로 활성화 시킨 다음 원심분리기(Beckman J-21, England)로 3,000rpm에서 10분 간 농축하여 초미세구를 제조하였다.

### 2. 초미세구 제조방법

2% Sodium alginate 용액과 부형제를 첨가한 혼합액을 실온에서 충분히 stirring 하여 균일하게 혼합한 다음 autoclave 에서 30분 동안 멸균 처리 하였다. Bifidobacteria를 함유하는 냉동 건조한 Start culture 일정량을 sodium alginate 멸균 용액에 첨가하였다. 약30분 동안 stirring 하여 homogeneous 액상을 만들었다. Peristaltic pump로 연결된 air atomization device 에 8ml/min의 수송속도로 멸균 처리한 0.2M 농도의 CaCl<sub>2</sub>용액에 분산하여 일정한 크기의 초미세구를 만든 후 15분 동안 CaCl<sub>2</sub> 용액에서 curing하여 경화 후 두 층의 여과지로 여과하여 회수하고 정제수로 씻은 다음 0.02% poly-*l*-lysine 용액에서 5분동안 cross-linking하여 외부막을 형성하였다. 형성된 초미세구는 다시 여과하고 정제수로 충분히 washing한 다음 -38℃ 에서 2시간 동안 pre-freezing 후 온도는 56℃, 압력은 8mmtorr에서 14시간동안 냉동 건조하였다. 초미세구 제조시 제조 공정인자들로는 공기압, 수송속도, 분사거리, alginate 및 polylysine농도등을 변화시키면서 최적 제조 조건을 확립하였다.

### 3. Bifidobacteria를 함유하는 초미세구의 모양 및 크기 분포

다양한 제조공정 조건에서 얻은 microcapsules 분말은 SEM(scanning electron micrograph) 통하여 형상을 관찰하였으며, 입자의 크기는 Laser particle size 측정기를 사용하여 크기 분포를 관찰하였다. 특히 여러 가지 제조 공정인자들이 초미세구의 물성에 미치는 양상을 고찰하여 추후 균주 함유 초미세구 제조시 최적화 처방조건을 확립하였다.

#### 4. 동결건조시 초미세구중 Bifidobacteria의 생존율에 미치는 첨가제의 영향

초미세구 제조시 균주의 생존율을 최적화하기 위하여 다양한 첨가제류를 가하였으며 고려 인자들로는 균주의 부가량, yeast extract 양, cryoprotectant류 (glycerol, lactose), 항산화제류 (ascorbic acid, NaHSO<sub>3</sub>), 중화제 (Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)를 초미세구 제조시 첨가하여 균주의 생존율을 측정하였다.

#### 5. Bifidobacteria 함유 초미세구의 내산성 및 안정성

냉동 건조된 초미세구 1g을 영양소(0.5% yeast extract)를 함유한 인공 장액 200ml (pH=6.8±0.1) 및 인공위액(pH=1.4±0.1)에서 혐기성 조건하에 용출실험을 진행한다. 일정시간후 용출액 1ml 를 취하여 MRS 희석액에 가하여 gradient 법으로 희석한 다음 MRS-Agar 배지에서 혐기성조건하에 48-72시간동안 배양하여 colon formed unit 법으로 균주활력을 측정하였다.

##### 가. 희석액 및 MRS-agar 배지 제조

###### 1) 희석액 제조

Bifidobacteria 활력측정에 사용되는 희석액은 5.5% MRS 및 0.05% Yeast extract 을 증류수에 첨가하여 용해한 다음 Paraffin 코팅하여 혐기성조건을 만들었으며 autoclave 에서 15분 동안 멸균하였다.

###### 2) MRS-agar 배지 제조

5.5% MRS, 1.5% agar 및 0.05% Cystein.HCl 을 증류수에 첨가한 다음 autoclave 에서 15분 동안 멸균하여서 사용하였다.

나. 용출실험에 사용하는 인공위액 및 인공장액의 제조

6.0g NaCl 및 15g Yeast extract 를 2900ml 증류수에 가하여 충분히 용해하였다. 7.4% HCl 를 서서히 가하여 pH 를  $1.4 \pm 0.1$ 로 맞추었다. 증류수를 3000ml 까지 가하여 멸균후 용출용 인공위액으로 사용하였다.

20.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MW. 136.09) 및 15g Yeast extract 를 2900ml 증류수에 가하여 충분히 용해한다. 1N NaOH 서서히 가하여 pH 를  $6.8 \pm 0.1$ 로 맞추었다. 증류수를 3000ml 까지 가하여 멸균후 용출용 인공장액으로 사용하였다.

다. Poly-lysine 처리효과에 따른 Bifidobacteria의 인공위액중 내산성 변화

상업용 Bifidobacterium cultures, Bifidobacteria를 함유한 alginate 초미세구 및 poly-lysine 처리한 초미세구 각각 1 g을 영양소 (0.5% yeast extract) 및 항산화제 (0.05% cysteine.HCl)를 함유한 인공위액 200 ml (pH=1.5)에서 37°C조건에서 120분 동안 처리한다. 처리 후 용출액 1ml를 취하여 2.5 % MRS 용액에 가하여 gradient 법으로  $10^{-8}$  까지 희석한 다음 MRS agar 배지에서 혐기성 조건하에 37°C, 48-72시간동안 배양하여 colon formed unit 법으로 생균수를 측정하였다.

라. 서로 다른 pH 조건이 Bifidobacteria 생존율에 대한 영향

Phosphate buffer (pH=7.4) 용액에 0.1M HCl를 사용하여 pH를 각각 6.8, 4.0, 2.0 및 1.5로 맞추어 서로 다른 pH 용액을 제조하였다. Bifidobacteria함유 초미세구 1g을 취하여 200ml 시험용액에 (0.5% yeast extract 및 0.05% cysteine.HCl 첨가) 넣어 37°C에서 120 분 동안 처리하였다. 시료는 0.1N NaOH로 pH를 6.8로 조정후 위와 같은 방법으로 Bifidobacteria 생균수를 측정하여 pH 영향을 고찰하였다.

마. 인공위액(pH=1.5) 처리시간에 따른 Bifidobacteria의 생존율 변화

Bifidobacteria를 함유한 초미세구를 1 g을 영양소 (0.5% yeast extract) 및 항산화제 (0.05% cysteine.HCl)를 함유한 인공위액 200 ml (pH=1.5)에서 37℃조건에 방치하였다. 일정한 시간간격으로 용출액 1ml를 취하여 2.5 % MRS 용액에 가하여 gradient 법으로  $10^{-8}$  까지 희석한 다음 시료는 0.1N NaOH로 pH를 6.8로 조정한 후 MRS agar 배지에서 혐기성 조건 하에 37℃, 48-72시간동안 배양하여 colon formed unit 법으로 생균수를 측정하여 처리시간에 따른 Bifidobacteria의 생존율을 평가하였다.

바. Bifidobacteria 함유 초미세구의 보존중 안정성 연구

Bifidobacteria 함유 초미세구를 petri dish 넣어 4℃ 조건에서 방치하였다. 일정한 시간간격으로 sampling 하고 시료를 인공장액에 12시간 노출 시킨 후 위와 같은 방법으로 Bifidobacteria 생존율을 측정하여 보존기간 중에서의 균주의 생존율 변화를 평가하였다.

6. Bifidobacteria 함유 초미세구의 사람 분변중 세균총의 변화에 미치는 in vivo 평가

가. 실험계획

건강한 성인남자 8명을 선발하여 실험 group 과 control group으로 2조를 나누었다. 상업용 Bifidobacterium bifidum cultures 및 Bifidobacteria 함유 초미세구종의 생균수를 위와 같은 방법으로 측정한 다음 gelatin capsule에 넣어 매회 투여용량을 결정하였으며 매회 복용제품 중에서의 생균수 농도를 동일하게 하였다. 투여용량은  $5.0 \times 10^9$  cfu/g 이었으며, 1일 2회 조식 및 석식 30분전에 물 한컵과 같이 복용하도록 하였다. 그리고 fecal sample 채취는 가능한 동일한 장소에서 행하였으며, 채취후에는 냉장보관을 하였고 4시간 이내에 생균수측정을 진행하였다. 실험시작 전 3 일 과 7일 그리고 투여 후 3일, 7일, 14일 및 투여중단 5일과 10일에 실험대상자들의 대변을 채취하였으며 채취 후 즉시 냉장고에 보관

한 후 특정배지에서 배양하여 균주의 생존율을 측정하였다.

나. 분변중 균주의 측정

실험대상자 대변 중에서의 Bifidobacteria, Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae 및 Staphylococci 생균수를 아래와 같은 4종의 배지를 사용하여 측정하였으며 균주 배양을 위한 특정배지의 제조는 아래와 같다.

-Bifidobacteria 측정 배지

배지조성	사용량 (g)
BL agar	58
Sodium propionate	15
Paromomycin	0.05
Neomycin	0.1
Lithium chloride	3
Water added	1000 ml

위와 같이 제조한 다음 가열하여 충분히 용해를 시킨 후 121℃ 20 분 동안 멸균처리를 하였다. 사용전까지는 55℃ 수욕에서 보관하였다.

Bifidobacteria의 선택배지 BS medium에서 37℃, 48-72시간 혐기성조건에서 배양한 후 배지위에 성장한 colony는 육안을 통하여 Bifidobacteria colony 만을 측정하였다.

-Lactic acid bacteria 측정 배지

배지조성	사용량 (g)
Lactobacilli MRS broth	55
Agar	15
NaN <sub>3</sub>	0.2
Water added	1000 ml

위와 같이 제조한 다음 가열하여 충분히 용해를 시킨 후 121℃, 20 분 동안 멸균처리를 하였다. 사용전까지는 55℃ 수욕에서 보관하였다.

Lactic acid bacteria 선택배지 MRS agar medium에서 37℃, 48-72시간 호기성조건에서 배양한 후 배지위에 성장한 colony를 육안을 통하여 계측

하였다.

-Enterobacteriaceae 측정 배지

배지조성	사용량 (g)
EMB agar	27 g
Water added	1000 ml

위와 같이 제조한 다음 가열용해 후 121℃ 20 분 동안 멸균처리를 하였다. 사용전까지는 55℃ 수욕에서 보관하였다. Enterobacteriaceae 선택배지 EMB agar medium에서 37℃, 48시간 호기성조건에서 배양한 후 배지위에 성장한 특정한 colony를 육안을 통하여 계측하였다.

-Staphylococci 측정 배지

배지조성	사용량 (g)
Baird-parker agar base	63
Bacto EY Tellurite	50 (ml)
Water	950 (ml)

위와 같이 Baird-parker agar base를 950 ml 증류수에 분산한다음 가열하여 완전히 용해시킨다. 121℃에서 15분동안 멸균처리를 하였다. 무균조건에서 미리 가열한 Bacto EY Tellurite용액을 50ml를 가한다. 사용전까지는 55℃ 수욕에서 보관하였다.

Staphylococci 선택배지 Baird-parked agar medium에서 37℃ 48시간 호기성조건에서 배양한 후 배지위에 성장한 특정 colony를 육안을 통하여 계측하였다.

다. Bifidobacteria 함유 초미세구가 인체 분변의 물리적 특성에 대한 영향

Bifidobacteria 함유 초미세구 및 상업용 균주를 투여전 후 배변빈도 (frequency), 대변의 점도 및 배설물양의 변화를 실험 참여 자원자에 대하여 표1의 아래 기준에 따라 평가하였다.

Table 1. Score and criterion for evaluation of characteristics of stool before, during and after taking Bifidobacteria-loaded microparticles

Scores	Frequency of stools/day	Amount of stools	Viscosity of stools
1	irregular	highly reduced	very soft
2	half	reduced	soft
3	one	normal	normal
4	two	increase	hard
5	three	highly increased	very hard

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. Bifidobacteria를 함유하는 초미세구의 모양 및 크기 분포

본 연구에 사용한 Air atomization 장치의 모식도를 Fig.1에 나타내었다. Air atomization 장치를 사용하여 형성된 초미세구의 전자현미경 사진의 실예를 Fig.2에 나타내었다. Bifidobacteria 함유 초미세구의 전체적 양상은 구모양 혹은 근사한 particle 모양을 나타내었다. 구의 모양은 sodium alginate 농도가 1.2%일 때 좋았고 그다음으로는 1.5%, 2% 순서로 되어있었다. 한편 Bifidobacteria 균주 loading 양에 따라 sodium alginate 용액과의 혼합액의 점도가 변화므로 초미세구 형성에 영향을 가져온다. 균주 30ml를 200ml sodium alginate에 분산하였을 때 초미세구의 형상이 제일 좋았고 다음으로는 균주 50ml/200ml 이고 10ml/200ml 일 때에는 형상이 불규칙하였다. Sodium alginate 및 균주 용액의 유속도 8ml/min 일 때 초미세구의 형상이 비교적 좋았고 유속이 12ml/min 일 때 초미세구의 형상이 불규칙하였다. Air pressure는 압축된 공기를 atomization device 에 공급함으로써 sodium alginate 용액이 빠른속도로 atomization device 에서부터 CaCl<sub>2</sub> 용액에 분산하는 작용을 한다. Air pressure가 커질 수록 초미세구의 크기는 작아지는 경향을 나타내었다.

# Air atomization device

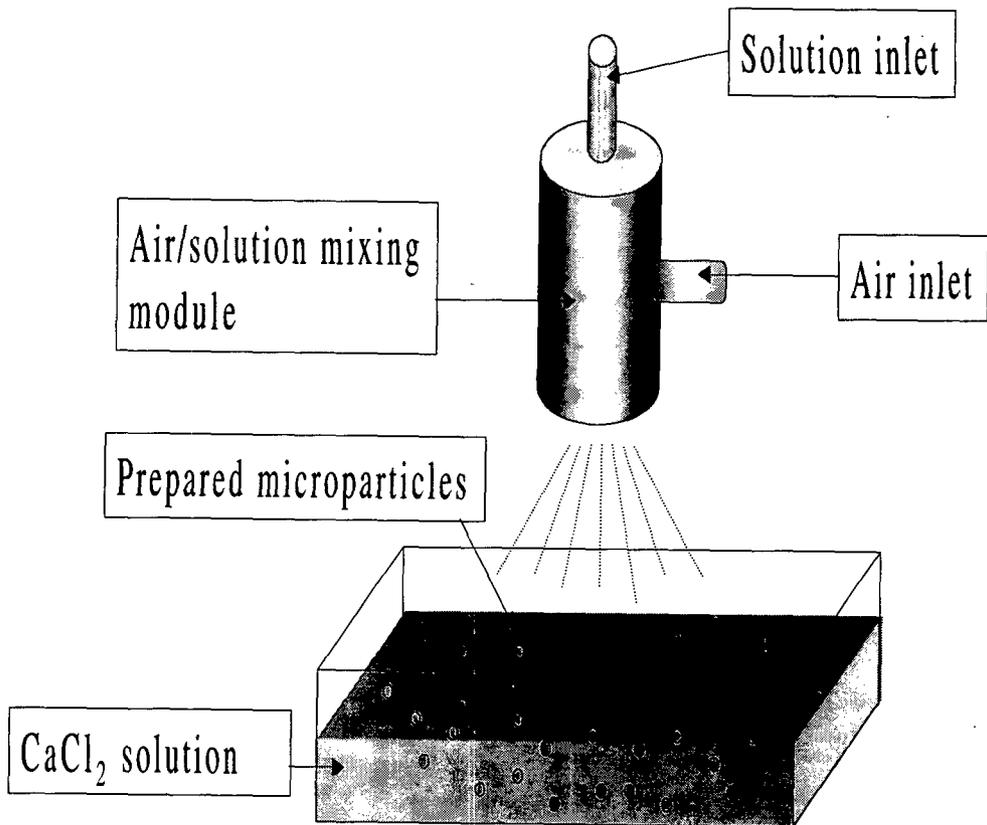


Fig. 1. Diagram of air atomization device

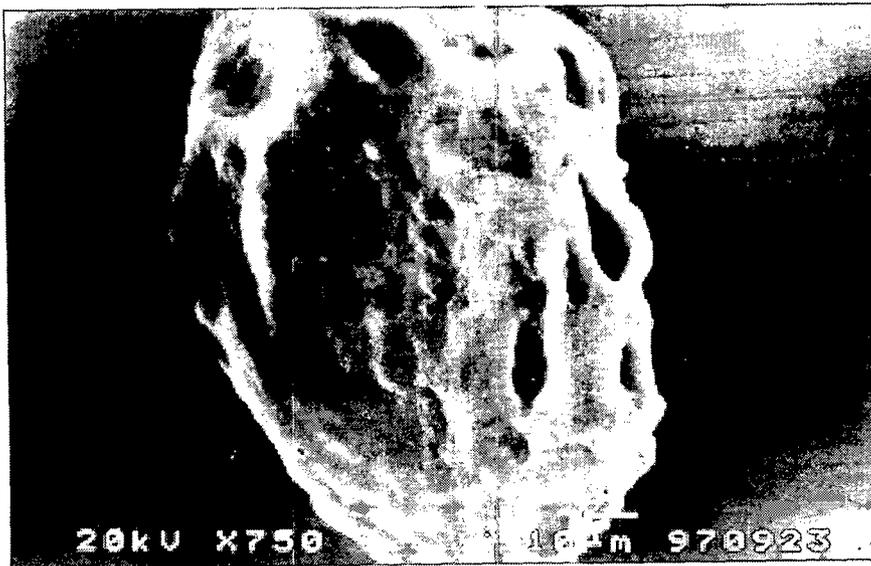


Fig. 2. Surface morphology of Bifidobacteria-loaded microparticles using scanning electron microscope

한편 Bifidobacteria 함유 초미세구의 평균크기 sodium alginate 농도가 2.0% 일 때 분포가 균일하였으며 다음으로는 1.5%, 1.2% 순서였다. 한편 Peristaltic pump로 sodium alginate 용액과 Bifidobacteria 균주 혼합액을 atomization device 수송하는 속도가 8ml/min, 12ml/min 일 때 초미세구 크기가(50%) 근사하게 나타났으며 4ml/min 일 때는 초미세구의 크기는 더 크게 나타나는 양상을 보여주었다. 초미세구 크기 분포에서는 유속에 현저한 차이를 나타내지 않았다. Bifidobacteria함유 초미세구의 크기(50%)는 air pressure 가 커질수록 초미세구의 크기는 작아지는 경향을 나타내었다. 균주 loading 양은 Bifidobacteria함유 초미세구의 크기에 큰 영향을 미치지 않았으나 양이 증가했을 때 좀더 큰 경향을 나타내었다.

이상의 초미세구의 크기 및 형상에 대한 결과로부터 Bifidobacteria를 함유하는 초미세구의 제조시 최적 공정인자는 sodium alginate 1.5%, 유속은 8 ml/min, 압력은 0.75 bar이었으며 분사 시간은 7분이고 curing은 약 15분이었다. 경화를 위해 사용한 poly-*l*-lysine의 농도는 0.02% 이었다. 또한 초미세구의 slurry를 -37℃에서 2시간 얼린 후 -55℃에서 14시간 냉동 건조하는 조건을 확립하였다.

한편 다양한 초미세구 제조공정인자에 따른 입자의 크기를 요약하면 Table 2와 같다.

Table 2. Processing parameters for the preparation of Bifidobacteria-loaded alginate-polylysine microparticles and their size distribution

No.	Alginate conc. (%)	Air pressure (bar)	Delivery rate (ml/min)	Culture loading (%)	Size ( $\mu\text{m}$ )
1	1.2%	1.5	8	1.5	90.2 $\pm$ 30.3
2	1.5%	1.5	8	1.5	86.7 $\pm$ 28.7
3	2.0%	1.5	8	1.5	80.1 $\pm$ 21.6
4	1.5%	1.0	8	1.5	88.1 $\pm$ 30.8
5	1.5%	2.0	8	1.5	83.0 $\pm$ 30.5
6	1.5%	1.5	4	1.5	81.4 $\pm$ 28.2
7	1.5%	1.5	12	1.5	92.8 $\pm$ 26.9
8	1.5%	1.5	8	0.5	81.4 $\pm$ 30.3
9	1.5%	1.5	8	2.5	91.4 $\pm$ 27.1

The 0.02 % poly-*l*-lysine was invariably used to cross-link Bifidobacteria-loaded alginate microparticles.

## 2. 동결건조시 초미세구중 Bifidobacteria의 생존율에 미치는 첨가제의 영향

냉동 건조한 Bifidobacteria 초미세구 제조시 다양한 첨가제에 따른 균주활력을 비교하였다. 균주의 양 자체는 1.5g을 사용했을 때 활력이 약간 높았으나 첨가량에 따라 현저한 차이는 없는 것으로 나타내었다. 한편 Bifidobacteria 함유 초미세구 냉동건조시 여러 가지 cryoprotectant 및 첨가량에 따른 균주활력을 고찰하였다. 5% glycerol 첨가시 좋은 균주활력을 나타내었으며 2.5% lactose 첨가 시에도 비록 좋은 활력을 보여주었으나 초미세구 형성과정에 응집현상을 나타내기 때문에 제조과정에 어려움이 있어 추후 배제하였다. 또한 yeast extract 을 Bifidobacteria의 영양소로 제공하여 첨가량에 따른 냉동건조된 초미세구중에서의 균주활력을 측정하였으며 0.5% 첨가시 좋은 효과를 나타내었다. 여러 가지 antioxidants 및 첨가량에 따라 균주활력에 대한 영향을 고찰하였다. NaHSO<sub>3</sub> 및 ascorbic

acid 는 초미세구 제조 및 냉동건조 과정에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 0.5% NaHSO<sub>3</sub> 첨가시 다른 대조 군보다 좋은 초미세구 형성 효과를 나타내었다. 일정량 Ascorbic acid 첨가시에는 alginate 용액 spraying 과정에서 CaCl<sub>2</sub>용액 표면에 aggregation 현상을 발견하였다. 한편 본 실험에서는 Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>을 neutralizer 에 사용하였으며 1% 첨가시 높은 균주활력을 보여 주었다.

Table 3. Formulation for the optimization of survival of Bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles during freeze-drying process

Culture	Yeast extract	Cryoprotectant		Antioxidant		Neutralizer	Survival rate Log cfu/g
		Glycerol	Lactose	NaHSO <sub>3</sub>	Ascorbic acid	Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	
F1	0.5 g	-	-	-	-	-	7.56 ± 0.11
F2	1.5 g	-	-	-	-	-	7.91 ± 0.12
F3	2.5 g	-	-	-	-	-	7.67 ± 0.13
F4	1.5 g	0.5 %	-	-	-	-	9.25 ± 0.08
F5	1.5 g	2.5 %	-	-	-	-	8.89 ± 0.17
F6	1.5 g	-	5 %	-	-	-	8.35 ± 0.08
F6	1.5 g	-	10 %	-	-	-	7.99 ± 0.12
F8	1.5 g	-	--	2.5 %	-	-	8.90 ± 0.09
F9	1.5 g	-	--	5 %	-	-	8.25 ± 0.11
F10	1.5 g	-	-	-	0.5 %	-	8.73 ± 0.20
F11	1.5 g	-	-	-	1%	-	8.19 ± 0.15
F12	1.5 g	-	-	-	0.25%	-	8.51 ± 0.15
F13	1.5 g	-	-	-	0.5%	-	8.61 ± 0.22
F14	1.5 g	-	-	-	-	1%	8.15 ± 0.19
F15	1.5 g	-	-	-	-	2%	8.04 ± 0.09

Alginate solution (1.5%) was used invariably used.

이상의 조건으로부터 동결건조시 Bifidobacteria의 생존율에 미치는 첨가제류의 최적 조성은 아래 Table 4와 같다.

Table 4. Optimal condition for the survival of Bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles during freeze-drying process

Alginate	Start culture	Yeast extract	Glycerol	NaHSO <sub>3</sub>	Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
1.5g	0.5 g	0.5g	5.0g	0.5g	1.0g	100 ml

한편 동결 건조중 최적 조성으로 제조한 초미세구의 동결 건조 시간에 따른 생존율을 Fig. 3에 나타내었다. 동결건조하지 않은 균주 분말에 비하여 동결 건조를 수행함에 따라 생존율은 감소하였으나 적어도 14시간동안 안정한 경향을 나타내었다. 그러나 그 이후 장시간의 수분 건조 및 혐기성 균주의 동결 건조중 조건에서 급격히 사멸되어 생존율이 저하하는 경향을 나타내었다.

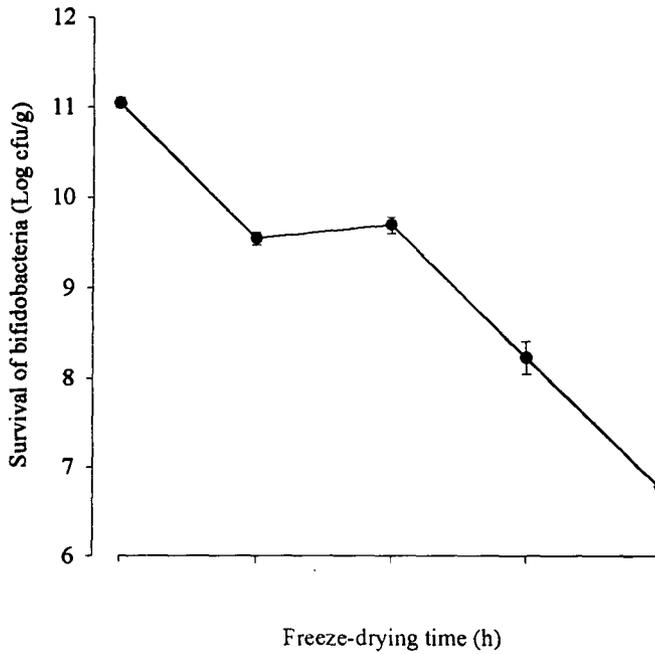


Fig.3. Effect of freeze-drying time on the survival of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles. Bar represents the standard deviation.

### 3. Bifidobacteria 함유 초미세구의 내산성 및 안정성

#### 가. 내산성 연구

##### 1) Polylysine 처리효과에 따른 Bifidobacteria의 내산성 변화

Bifidobacteria는 편성 혐기성 균으로서 약간의 내산성을 가지고 있을 뿐만 아니라 위액에서 낮은 pH 때문에 급속히 사멸한다. 본 연구에서는

air-atomization 방법을 이용하여 Bifidobacteria를 alginate-polylysine 초미세구에 봉입하여 산소와의 접촉을 차단하며 alginate의 용해특성에 따라 위액에서 보호작용을 하여 생존율을 높이었다. 냉동건조된 Bifidobacteria 함유 초미세구 분말을 유제품에 첨가가 가능하리라 사료된다.

Bifidobacteria 함유 alginate를 polylysine 처리한 다음의 내산성 연구결과는 Fig. 4에 나타내었다. 봉입 처리하지 않은 Bifidobacteria culture는 인공위액에서 120분 처리 후 생균수는  $2.85 \times 10^9$  cfu/g 에서  $10^3$  cfu/g 이하로 급속히 감소하였으나 alginate 초미세구 및 polylysine 처리한 초미세구중의 Bifidobacteria는 각각  $2.62 \times 10^7$  cfu/g 및  $3.46 \times 10^7$  cfu/g 의 높은 활력을 유지하였다. 이는 봉입물질로 사용한 alginate 의 pH의존성 용해성질과 polylysine 처리에 따른 피막물질의 견고성 향상으로 사료된다. 한편 초미세구에 봉입이 안된 배지중의 Bifidobacteria는 인공위액에 노출 시 바로 사멸되어 120분 후 생존율을 측정할 수 없었다.

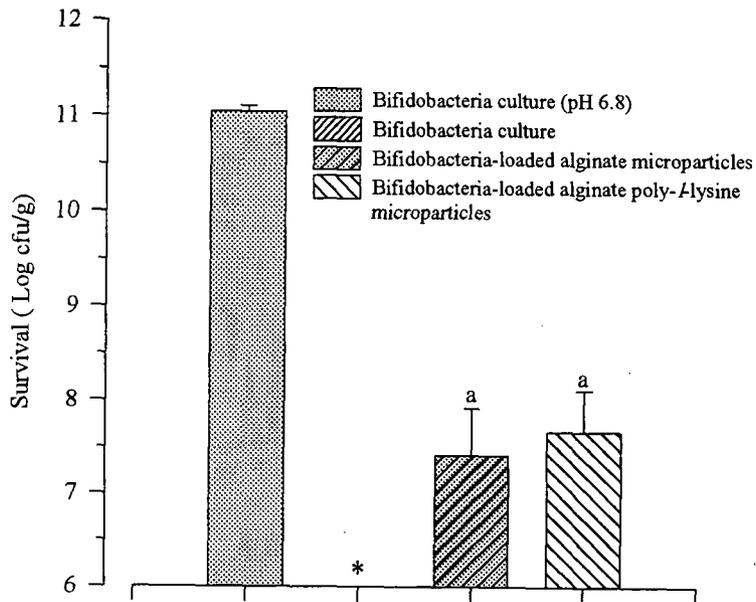


Fig.4. Comparison of survival of bifidobacteria loaded in alginate and alginate poly-*L*-lysine microparticles after 120 min treatment in simulated gastric fluid (without pepsin, pH 1.5). <sup>a</sup> $p < 0.01$ , compared to bifidobacteria culture in simulated gastric fluid; \*, the survival was less than  $10^3$  cfu/g.

2) 서로 다른 pH 조건이 Bifidobacteria 생존율에 대한 영향

pH 변화에 따른 bifidobacteria 함유 초미세구의 내산성 실험결과는 Fig.5에 나타내었다. Bifidobacteria는 pH가 높은 조건에서는 어느정도의 높은 활성을 나타내었으나 pH가 저하됨에 따라 활력이 저하되었다. 즉 다

른 조건에 비하여 pH 6.8에서 제일 좋은 활력을 보여주었고 pH 1.5에서 가장 낮았다. 그러나 alginate polylysine 봉입처리된 bifidobacteria는 높은 pH 조건에서 유지한 생존율이 낮은 pH에서도 크게 저하되지 않고 내산성을 나타내었다. 따라서 위산에 저항할 수 있는 유산균 함유 제제로써의 가능성이 시사된다.

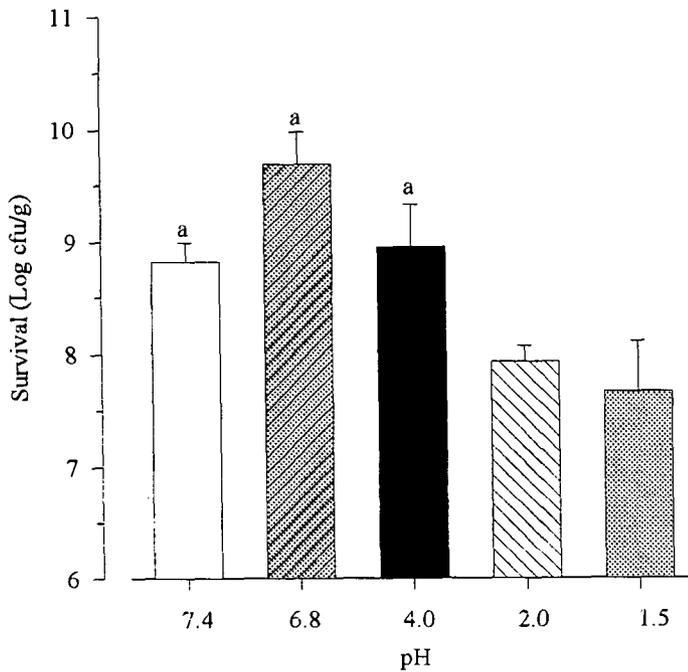


Fig.5. Effect of pH on the survival of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles. Bar represents standard deviation. <sup>a</sup>p<0.05, compared to pH 1.5 and pH 2.0.

3) 인공위액(pH=1.5) 처리시간에 따른 Bifidobacteria의 생존을 변화  
 비록 Bifidobacteria를 함유하는 초미세구가 위산에 안정하지만 노출정

도에 따라서 어느정도 사멸될 수 있다. 인공위액 처리시간에 따른 Bifidobacteria 함유 초미세구중 균주의 활력변화는 Fig.6에 나타내었다. 30분에서 60분까지는 인공위액 처리전 보다 균주 활력은 현저한 차이가 없었으나( $10^8$  cfu/g) 90분에서 120분 사이에는 일정하게 감소하는 경향은 보여주었으나 각각  $(6.92 \pm 2.45) \times 10^7$  cfu/g 및  $(4.47 \pm 2.75) \times 10^7$  cfu/g 의 높은 활력을 유지하였다. 이는 gastric emptying 시간이 90분 정도인 것을 감안하면 경구투여 후 충분히 많은 양의 Bifidobacteria가 장관 속으로 이동할 수 있음을 알 수 있다. 더욱이 식후에 복용하거나 위의 pH를 높일 수 있는 조건이면 생존율은 더욱 높으리라 사료된다.

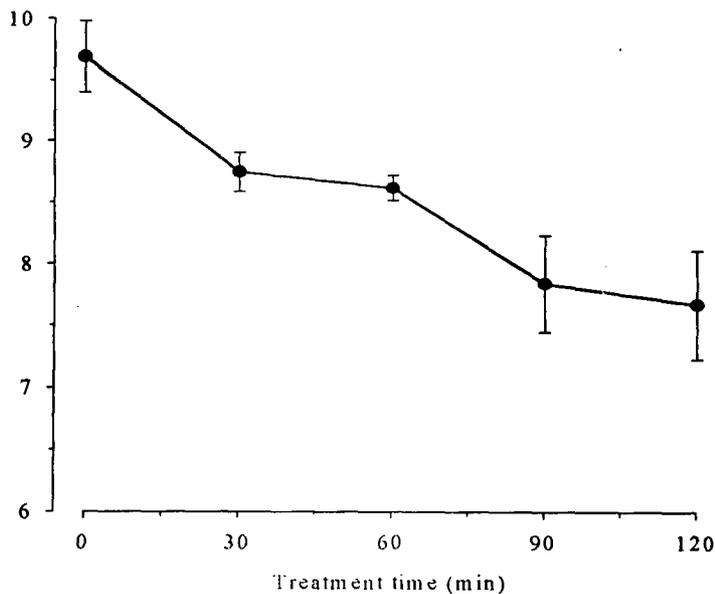


Fig.6. Survival of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles in simulated gastric fluid (without pepsin, pH 1.5) as a function of time. Bar represents the standard deviation.

나. Bifidobacteria 함유 초미세구의 안정성 연구

Bifidobacteria 함유 분말형의 초미세구의 냉장조건에서의(4℃) 안정성 실험결과는 Fig. 7에 표시하였다. 초미세구중에 함유된 Bifidobacteria는 2주까지는 현저한 변화를 나타내지 않았으며  $10^9$ -  $10^{10}$  cfu/g 수준의 높은 활력을 유지하였다. 4주 후부터 16주까지는 전에 비하여 일정하게 감소하였으나  $9.12 \times 10^7$  cfu/g에서  $1.66 \times 10^7$  cfu/g 사이에서 안정함을 알 수 있었다. 그러나 20주 후에는 비교적 낮은 활력을( $6.0 \times 10^5$  cfu/g) 보여주었다. 시판 유산균 제제의 유효 기간이 약 20일 정도 임을 감안할 때 본 Bifidobacteria 함유 초미세구는 추후 유산균의 다양한 제품화 공정에 응용될 수 있으리라 사료된다.

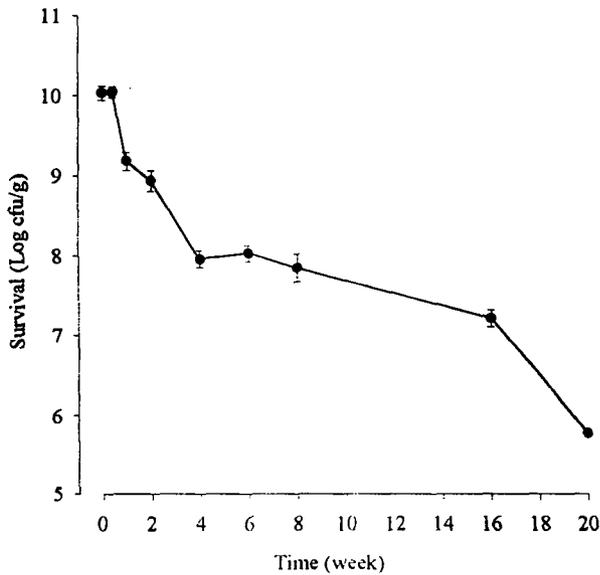


Fig. 7. Stability of bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles during storage in a refrigerator at 4°C. Bar represents the standard deviation.

#### 4. Bifidobacteria 함유 초미세구의 사람 분변중 세균총의 변화에 미치는 in vivo 평가

##### 가. 장내 균총의 변화

Bifidobacteria 함유 초미세구 경구투여 후 대변 중에서의 Bifidobacteria 생균수의 측정결과는 Fig. 8에 나타내었다. 상업용 Bifidobacteria culture를 복용한 군에서는 복용전후 현저한 변화가 없었으나 Bifidobacteria 함유 초미세구를 복용한 군에서는 분변중 장내 유산균의 총수가 현저히 증가하는 양상을 보여주었다. 즉 복용전 대변중의 Bifidobacteria는 생균수는  $(2.51 \pm 1.62) \times 10^8$  cfu/g 이었으나 Bifidobacteria 함유 초미세구를 복용한 후 3일, 7일 및 14일에는 각각  $6.0 \pm 2.2$ ,  $7.2 \pm 2.19$  및  $5.5 \pm 3.2 (\times 10^8$  cfu/g)이었다.

Bifidobacteria 함유 초미세구 경구투여 후 분변 중에서의 Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae 및 Staphylococci의 변화를 Fig. 9, 10 및 11에 각각 나타내었다. 상업용 Bifidobacteria 및 Bifidobacteria 함유 초미세구를 복용 한후 대변중에서의 이상 3가지 균주는 모두 대체로 비슷한 경향을 나타내었으며 특이할만한 균주의 증가 혹은 감소 경향은 고찰하지 못하였다.

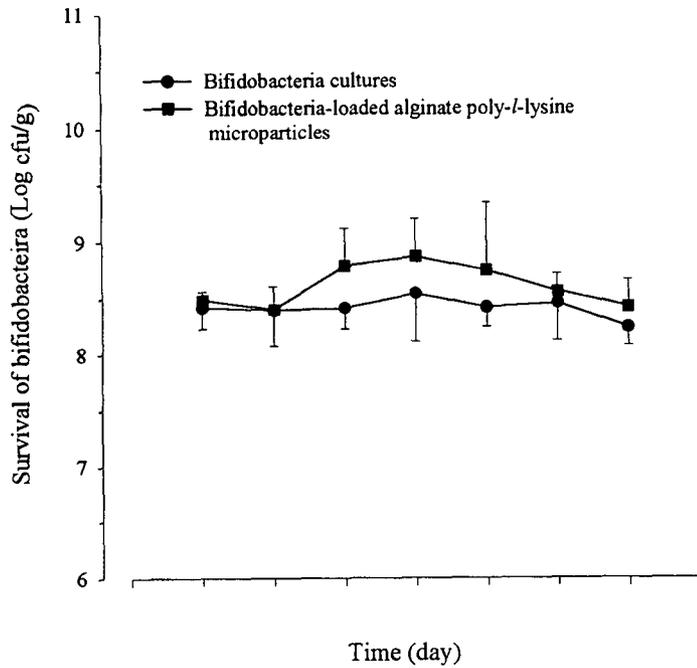


Fig.8. Changes of bifidobacteria in feces after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-*l*-lysine microparticles to human subjects. Bar represents the standard deviation. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , compared to before study period.

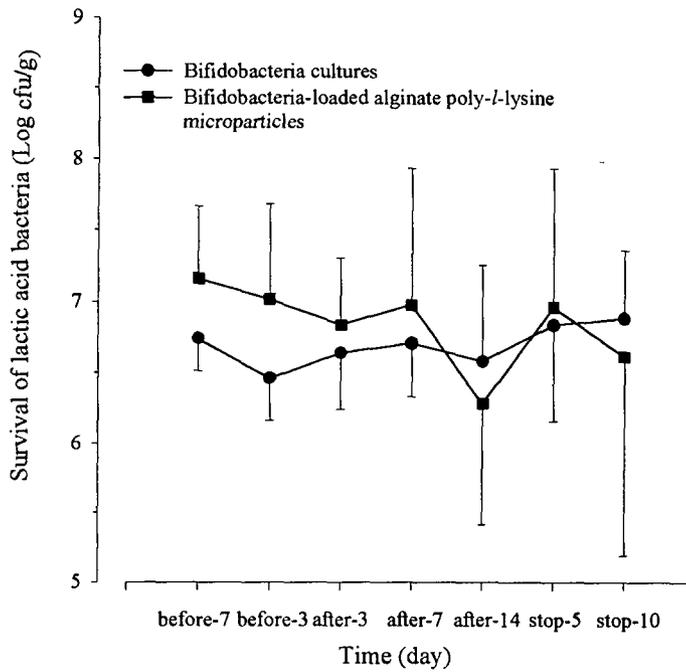


Fig.9. Changes of lactic acid bacteria in feces after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-L-lysine microparticles to human beings. Bar represents the standard deviation.

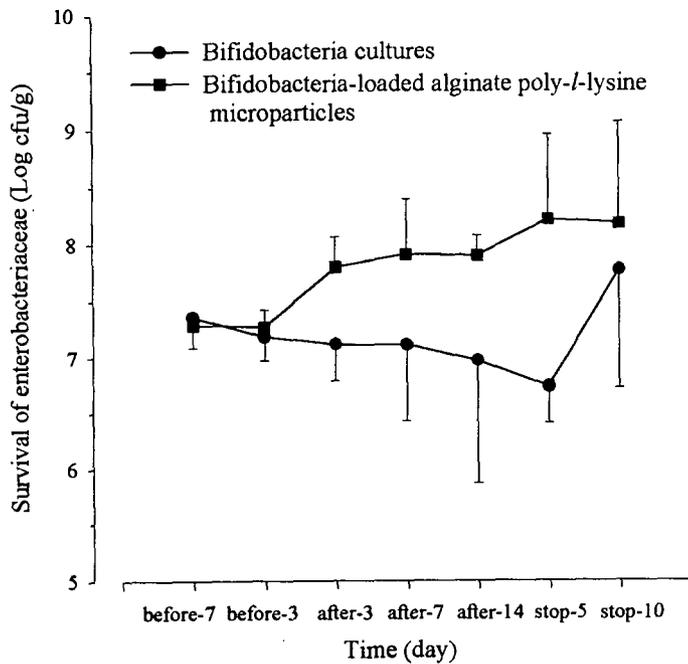


Fig.10. Changes of enterobacteriaceae in feces after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-L-lysine microparticles to human beings. Bar represents the standard deviation.

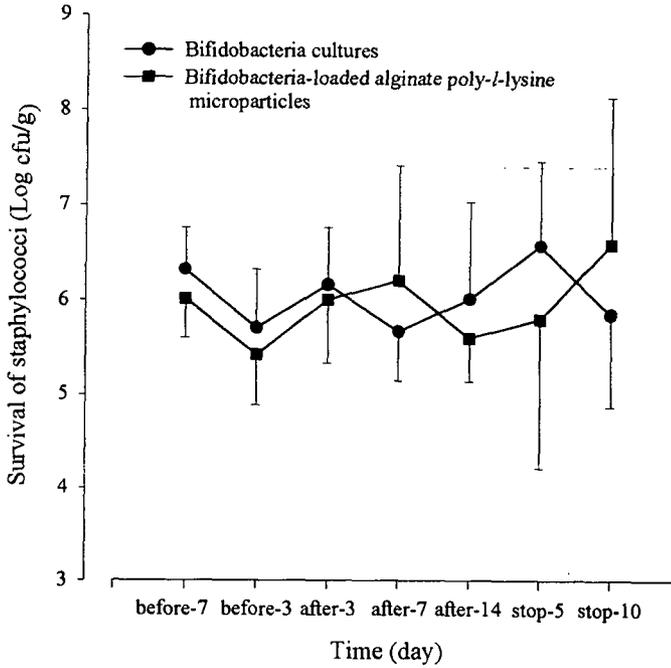


Fig.11. Changes of staphylococci in feces after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-L-lysine microparticles to human beings. Bar represents the standard deviation.

나. 대변의 물리적 특성의 변화

Bifidobacteria 경구투여 후 배변 frequency, 대변 점도 및 배변양의 변화를 Fig.12에 표시하였다. Bifidobacteria 복용후 두 가지 실험군에서 모두 배변 frequency가 증가하고 대변의 점도가 감소하는 양상을 나타내었으며 배변양은 현저한 변화가 없었다. 이는 Bifidobacteria가 장관운동을 촉진하고 변비치료에 유용하게 작용할 것으로 사료된다.

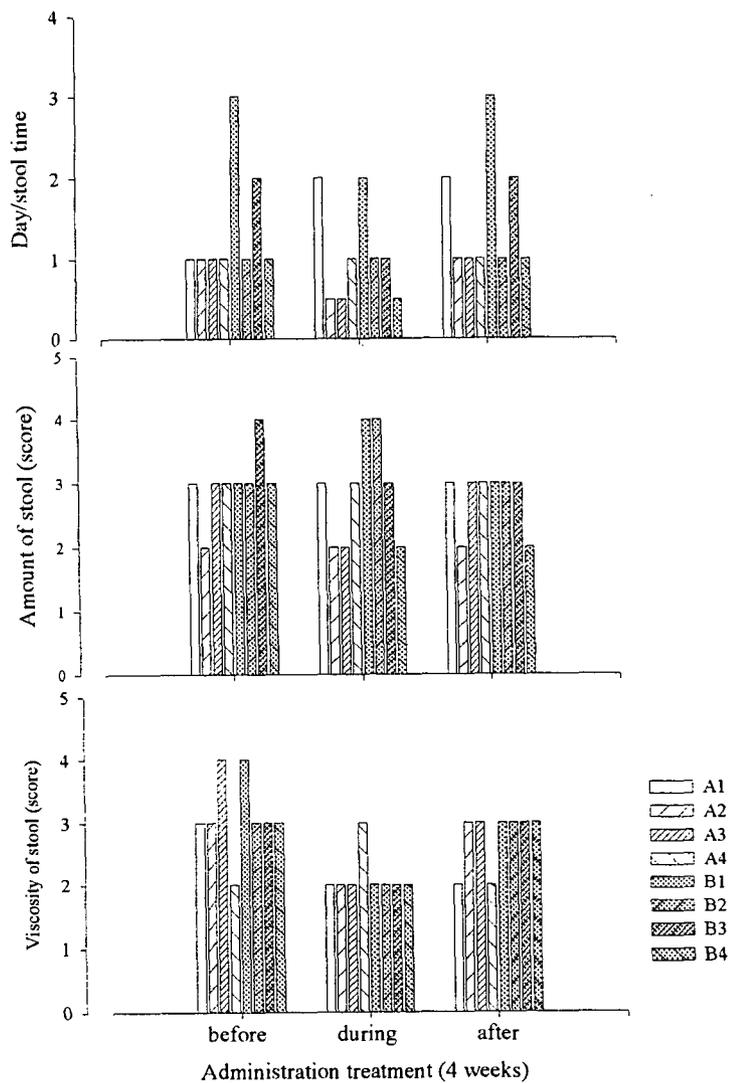


Fig.12. Effect of bifidobacteria-loaded microparticles on the characteristics of stools.

Bifidobacteria를 함유하는 초미세구를 경구 투여후 분변의 물리적 특성에 미치는 결과를 요약하면 Table 5와 같다.

Table 5. Physical characteristics of stools after oral administration of bifidobacteria-loaded alginate poly-/-lysine microparticles.

		before	after	stop
Frequency	A group	1.00±0.00	1.34±0.75	0.88±0.75
	B group	0.71±0.34	1.13±0.63	0.71±0.34
Amount	A group	2.75±0.50	2.50±0.58	2.75±0.50
	B group	3.25±0.50	3.25±0.96	2.75±0.50
Viscosity	A group	3.00±0.82	2.25±0.50	2.50±0.58
	B group	3.25±0.50	2.00±0.00	3.00±0.00

A group; Bifidobacteria cultures were orally given. B group, Bifidobacteria-loaded alginate poly-/-lysine microparticles were orally given.

## 제 4 절 적 요

공기분사법에 의한 Bifidobacteria를 함유하는 초미세구의 제조시 최적 공정인자는 초미세구의 크기 및 형상에 대한 결과로부터 sodium alginate 1.5%, 유속은 8 ml/min, 압력은 0.75 bar이었으며 분사 시간은 7분이고 curing은 약 15분이었다. 형성된 초미세구는 구형에 가까운 구조이나 상당히 불규칙한 형성이었으며 표면은 매우 울퉁불퉁한 구조를 가지고 있었다. 입자의 크기는 약 80-90  $\mu\text{m}$ 를 나타내었다. 한편 냉동 건조중 균주의 생존율을 최적화 하기 위한 다양한 첨가제를 연구하였으며 0.5 g Start culture, 0.5g Yeast extract, 5.0g Glycerol, 0.5g NaHSO<sub>3</sub>, 1.0g Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>을 초미세구 제조시 기했을 때 최적의 생존율을 나타내었다. 또한 초미세구의 slurry를 -37°C에서 2시간 얼린 후 -55°C에서 14시간 냉동 건조하는 최적 조건을 확립하였다.

봉입 처리하지 않은 Bifidobacteria culture는 인공위액에서 120분 처리 후 생존수는 10<sup>3</sup> cfu/g 이하로 급속히 감소하였으나 초미세구중의 Bifidobacteria는 10<sup>7</sup> cfu/g의 높은 활력을 유지하였다. 봉입처리된 Bifidobacteria는 낮은 pH에서도 생존율이 크게 저하되지 않고 내산성을 나타내었다. 한편 인공위액 처리시간에 따른 Bifidobacteria의 생존율은 30분에서 60분까지는 인공위액 처리전 보다 균주 활력은 현저한 차이가 없었으나 90분에서 120분 사이에는 일정하게 감소하는 경향은 보여주었으나 적어도 10<sup>7</sup> cfu/g의 높은 활력을 유지하였다. 초미세구중에 함유된 Bifidobacteria를 4도의 냉장고에 보관시 2주까지는 10<sup>9</sup>- 10<sup>10</sup> cfu/g 수준의 높은 활력을 유지하였으며 16주까지 적어도 10<sup>7</sup>cfu/g의 생존율을 나타내었다.

상업용 Bifidobacteria 및 Bifidobacteria 함유 초미세구를 경구 복용 한 후 상업용 Bifidobacteria culture를 복용한 군에서는 복용전후 현저한 변화가 없었으나 Bifidobacteria함유 초미세구를 복용한 군에서는 분변중 장내 유산균의 총수가 현저히 증가하는 양상을 보여주었다. 그러나 분변 중에서의 다른 균총인 Lactic acid bacteria, Enterobacteriaceae 및 Staphylococci는 모두 대체로 비슷한 경향을 나타내었으며 특이할만한 균

주의 증가 혹은 감소 경향은 고찰하지 못하였다. 한편 Bifidobacteria 복용후 두 가지 실험군에서 모두 배변 frequency가 증가하고 대변의 점도가 감소하는 양상을 나타내었으며 배변양은 현저한 변화가 없었다.

이상의 결과로부터 공기분사법에 의해 제조되는 Bifidobacteria 함유 초미세구는 유기용매를 전혀 사용하지 않으면서 또한 입자의 크기가 작고 우수한 내산성과 안정성을 나타내었으며 사람에게 투여시 장내 유산균의 균총이 증가되는 것으로 볼 때 추후-타양한 유산균 함유-유제품에 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 5 절 참고문헌

1. Bodmeier, R., Chen, H. and Paeratakul, O., A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles, *Pharm. Res.*, 6(5), 413-417 (1989)
2. Goh, J. S., Kwon, I. K. and Kim, Y. O., Studies on the growth of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 in milk, *Kor. J. Dairy Sci.*, 8(1), 48-56 (1986)
3. Goh, J. S., Kwon, I. K., Ahn, J. K. and Yoon, Y. H., Fermentation of milk by *Bifidobacteria*, and improvement of usability of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 by lactic acid bacteria for the fermentation of milk, *Kor. J. Dairy Sci.*, 9(4), 211-219 (1987)
4. Goh, J. S., Kwon, I. K., Ahn, J. K. and Yoon, Y. H., Fermentation of milk by *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 ; Conversion of milk constituents by fermentation, *Kor. J. Anim. Sci.*, 30(10), 618-630 (1988)
5. Kim, D. H. and Han, M. J., Inhibition of intestinal bacterial enzymes by lactic acid bacteria, *Yakhak Hoeji*, 39(2), 169-174 (1995)
6. Kim, H. S., Kamara, B. C., Good, I. C. and Enders, G. L., Method for the preparation of stabile microencapsulated lactic acid bacteria, *J. Ind. Microbiol.*, 3, 253-257 (1988)
7. Krueter, J. and Liehl, E., Long-term studies microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 70(4), 367-371 (1981)
8. Kwok, K. K., Groves, M. J. and Burgess, D. J., Production of 5-15  $\mu\text{m}$  diameter alginate-polylysine microcapsules by an air-atomization technique, *Pharm. Res.*, 8(3), 341-344 (1991)
9. Lee, B.-J. and Min, M.-G., Preparation and release characteristics of polymer-reinforced and coated alginate beads. *Arch. Pharm.*

Res., 18(3), 183-188, 1995b.

10. Lim, F. and Moss, R. D., Microencapsulation of living cells and tissues, J. Pharm. Sci., 70(4), 351-354 (1981)
11. Lin, S. Y., Ayres, J. W., Winkler, W. and Sandine, W. E., Lactobacillus effects on cholesterol : In vitro and In vivo results, J. Dairy Sci., 72, 2885-2899 (1989)
12. Lin, S. Y. and Kao, Y. H. Tablet formulation study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules, Pharm. Res., 8(7), 919-924 (1991)

## 제 4 장 장내의 면역 기능에 대한 Bifidobacteria 초미세구의 효과

### 제 1 절 서 론

Bifidobacteria는 혐기성 세균으로, 젖산을 생산하며 모유를 먹인 유아의 장내에서 발견된다고 보고된바 있다 (Tisser, 1899). Elie Metchnikoff는 Bifidobacteria가 건강에 유익한 효과를 줄 수 있다고 처음으로 제안하였으며 (Mechnikoff, 1908), 발효된 유제품내에 있는 bifidobacteria는 건강과 영양학적인 면에서 유익하다고 잘 알려져 있다(Chandan, 1989). 이들의 특성은 유아나 성인의 장내 microflora의 균형을 유지할 수 있으며 (Bullen et al., 1977), mitogenic 반응의 강화 (Simone et al., 1992), 병원균에 의한 감염의 저항성을 개선할 수 있다 (Duffy et al., 1993 ; Yasui et al., 1996). 또한 혈청내 콜레스테롤 수치를 줄이는 효과도 있다 (Gilliland et al., 1989; Klaver et al., 1990). 이와 같은 기능은 bifidobacteria를 섭취한 숙주의 면역계를 조절할 수 있다고 예측된다 (Fernandes et al., 1990).

Bifidobacteria는 macrophage와 lymphocyte의 활성화 (Hatcher et al., 1993), 항체 합성, spleen과 Peyer's patch (PP)에서 mitogenic response (Kado-oka et al., 1991) 와 natural killer cell (Igarashi et al., 1990) 의 기능을 증진시켜 전체적인 숙주의 면역기능을 향상시킨다. 이러한 면역반응의 촉진효과는 병원체의 감염에 대한 저항성이 증가되고 잠정적으로는 암을 예방할 수 있다고 추측된다. Perdigon 등 (1991)은 젖산 생성 bacteria를 구강으로 면역시켰을 때 host의 mucosal immunity가 증가되었다고 알려져 있다. 또한 유아에게 Lactobacillus GG, human Lactobacillus strain을 포함하고 있는 발효 유제품을 먹였을 때, rotavirus에 대한 특정 IgA response가 대조군에 비해 증가하였다 (Kaila et al., 1992). 장내 병원성 세균과 virus는 숙주의 mucosal surface에서 기생하기 때문에 dietary lactic acid bacteria가 병원체에 대한 숙주의

방어 능력에 기여한다고 추측된다.

위장관계, 호흡기계, 비뇨기계등 점막면은 유해한 미생물을 포함하는 외인성 인자들에게 폭넓게 개방되어 있는 생체의 일부이며 지속적으로 외부 항원의 침입이 시도되는 장소이기 때문에 (Hanson & Brandtzaeg, 1989), 점막계는 외부 항원의 침입에 대비하기 위하여 해부학적, 기능학적으로 systemic immunity 와는 명확하게 구별되는 점막 면역 조직을 갖고 있다. 이 점막 조직에서 외부 감염성 인자들에 대한 방어기능은 S-IgA의 생산에 크게 의존하고 있다 (Holmgren et al., 1992). 이러한 점막 면역계 중에서도 특히 위장관 점막계는 가장 큰 영역이며 장내에 많은 lymphoid organ에 존재하는 B cell들은 항체를 분비함으로써 외부 항원의 침입을 저지한다. 이러한 기관들로는 PP, mesenteric lymph node (MLN), Lamina propria (LP) 등이 존재한다 (McGhee et al., 1992 ; Russell et al., 1991).

항원이 경구를 통해 장내로 들어오면 PP의 상피세포에 존재하는 M cell 을 통해 PP로 전달되고 (Owen et al., 1990) 여기에서 항원특이적 면역반응이 일어나며 B cell의 경우 대부분 항원 특이적 IgA B cell로 운명이 결정된다. 이러한 과정을 통해 항원 특이적 IgA<sup>+</sup> B cell로 분화된 B cell은 MLN, thoracic duct등을 통해 전신순환을 거친 후 최종적으로 다시 장내의 LP로 homing하게 되는데 (Stollman et al., 1989) 여기에서 IgA B cell은 plasma cell로 성숙하여 IgA를 분비하게 된다 (McGhee et al., 1992 a : Briere et al., 1994 a). 이후 IgA는 상피세포에 의해서 생산된 secretory component와의 상호작용에 뒤이어 장점막 분비물속과 섞여 상피조직을 통해 장내로 분비된다. IgA는 점막에서 병원체에 대해 처음으로 방어를 담당하는 항체로 잘 알려져 있다. IgA는 전체 항체 class 중 체내에 존재하는 절대량으로 보아 80% 정도를 차지하고 장내에서 가장 많이 분비되는 항체이다. 그리고 대부분 점액 분비 조직에서 존재해 항원의 부착과 침투를 막고 독소를 중화시키며 가수 분해효소의 작용을 돕는다 (Kagnoff, 1987). 분비된 IgA는 점막상피와 몸으로 침입한 병원성 미생물과 알레르기성 단백질 식품과 같은 외부물질에 대한 면역 방어벽이 되어 흡착을 통한 방법으로 몸을 보호한다 (Lambert et al., 1974). 최근에 LPS로 자극된 비

장의 B cell로 하여금 TGF- $\beta$ 1은 마우스나 사람의 B cell에서도 IgA 합성을 선택적으로 증가시킴을 보고한 바 있다. 또한 TGF- $\beta$ 1은 IL-2 또는 IL-5와 함께 IgA 분비를 더욱 항진시킨다고 알려져 있다 (Kim & Kagnoff et al., 1990).

지금까지 살펴본 바와 같이 점막면역은 인체의 면역체계에서 중요한 역할을 담당하며, bifidobacterium은 전반적인 면역기능을 항진시키는 효과가 있다고 추정되고 있지만 아직까지 장내 점막면역에 미치는 구체적인 기능에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 아래에 기술한 바와 같이 그 역할에 대해 3차년도에 걸쳐 조사하였다.

본 연구의 1차년도에서는 먼저 bifidobacteria가 B cell의 분화에 미치는 영향을 평가하였다. 본 연구에서는 기본적으로 spleen B cell의 항체 합성에 미치는 bifidobacteria의 영향을 ELISA와 flow cytometry로 평가하였고 세포 증식에 미치는 bifidobacteria의 영향을 thymidine uptake 방법으로 수행하였다. 계속하여 장내의 림프조직인 Peyer's patch와 mesenteric lymph node B cell의 항체 합성능에 미치는 bifidobacteria의 활성능력을 in vitro에서 조사하였다. 마지막으로 bifidobacteria의 항체합성 활성에 대한 TGF- $\beta$ 1과 IL-5의 영향을 평가하였다.

2차년도에서는 bifidobacteria의 배양액의 B cell 활성 효과를 조사하였고 또한 경구 투여효과를 마우스를 대상으로 평가하였다. 배양액의 효과는 1차년도의 연구에서 확립된 실험 디자인을 적용하였다. Bifidobacteria의 경구 투여 효과를 평가하기 위하여 4주간 2일에 1회 씩 투여하였다. 먼저 마우스 spleen B cell의 항체 합성에 대한 효과를 조사하였다. in vitro에서 bifidobacteria로 spleen cell을 자극시킨 후 7일간 배양한 후 ELISA 방법으로 총 합성량을 측정하였고 항체 합성 세포 수의 변화는 ELISPOT assay로 결정하였다. 장내에 존재하는 면역세포의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 spleen cell과 동일하게 Peyer's patch와 mesenteric lymph node cell에 대해 항체 합성능을 ELISPOT assay로 조사하였다. 그리고 bifidobacteria 세포자체로 활성화된 B cell의 선택적인 IgA 항체 합성 유도를 위해 cytokine인 IL-5와

TGF-beta1을 사용하였고 항체 합성능은 ELISA로 측정하였다. 마지막으로 미세구 bifidobacteria를 위에 기술한 방법으로 투여한 후 동일한 방법으로 항체 합성에 미치는 영향을 장액과 혈액에서 조사하였다.

3차년도에서는 초미세구 Bifidobacteria의 경구 투여 효과를 계속적으로 조사하였다. 즉, 내장까지 살아있는 bifidobacterium의 수를 증가시키기 위해 alginate로 bifidobacterium을 초미세구화시켜 4주간 BALB/C 마우스에 투여하여 spleen, MLN, PP에서의 항체합성 정도를 알아보았다. 그 결과 초미세구화된 bifidobacterium이 대조군, bifidobacterium cell을 구강면역시킨 것 보다 spleen, MLN에서 더 많은 IgA 항체합성을 보였다. 이것으로 보아 세포를 단독으로 면역시키는 것보다는 초미세구화시키는 것이 장까지 도달하는 세포수를 증가시켜 숙주의 면역체계를 항진시켰다고 추정된다. 다음 단계에서는 T cell 및 macrophage에 미치는 영향을 알아보기 위해 bifidobacteria로 spleen cell을 활성화시킨 후 RT-PCR 법으로 cytokine 발현 패턴을 조사하였다. 구체적으로 B cell의 polyclonal activator인 LPS와 T cell의 polyclonal activator인 ConA 로 활성화시킨 spleen cell에서의 cytokine 발현을 관찰하였다. bifidobacteria가 macrophage나 T cell의 몇가지 cytokine분비를 촉진시킴을 확인할 수 있었다. 이와같은 결과는 bifidobacteria가 T cell과 macrophage의 반응을 잠정적으로 조절할 수 있음을 시사한다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 실험동물

BALB/C 마우스를 강원대학교 미생물학과 동물환경조정실에서 사육하여 생후 8-12주된 마우스를 사용하였다.

### 2. *Bifidobacterium bifidum*의 배양준비

*Bifidobacterium bifidum*은 MRS 배지에서 배양시켰다. MRS 배지는 0.5% L-cystein, HCl과 0.1% sodium azide를 유리 시험관에 넣어 멸균한 후 Liquid paraffin을 배지 위에 약 1.5 ml 정도 부은 후 5일간 37°C에서 배양하였다. 1-5일 배양한 *B. bifidum*을 매일 차례로 washing하였다. MRS 배지 위층에 paraffin oil을 걷어낸 후 배양 상등액을 400g에서 10분간 원심 분리하였다. bacteria는 HBSS로 2회 씻어주었다. 이 과정에서 박테리아 수를  $1 \times 10^5$  cell/well 로 맞추었다. 그리고 나서 RPMI-1640 배지에 세포와 배양상등액을 따로 넣어 -20°C에 보관하였다.

### 3. Encapsulated bacterial cell counting

캡슐화된 *Bifidobacteria* 슬러리 5 ml에 증류수 30 ml을 넣은 후 suspension 하였다. 다음으로 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상등액은 버렸다. 2 ml 부피의 슬러리를 취한 뒤 100 ml tube에 넣었다. 이 tube 에 0.01 M PBS with 0.1% yeast extract를 넣었다. tube의 내용물이 나오지 않게 입구를 봉한 뒤 37°C shaker에서 4시간 두었다. capsule이 깨진 것을 현미경으로 확인한 다음 50 ml tube에 옮겨 담은 후 1000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등액만 분리한 다음 세포수를 계수하였다.

### 4. *Bifidobacterium bifidum* cell과 Encapsulated *Bifidobacterium bifidum*의 구강면역

#### 가. 마우스의 면역

마우스의 면역는 4주간 2일 간격으로 구강으로 면역시켰다. 마우스에

대한 경구면역은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 초미세구 bifidobacterium powder를 멸균한 0.01 M PBS에  $1 \times 10^8$  cells/ml 이 되도록 powder 0.1 g과 0.01 M PBS 5 ml을 잘 섞은 뒤 tip blunted feeding needle을 사용하여 구강으로 투여하였다. *Bifidobacterium bifidum* cell도 같은 방법으로 마우스에 구강으로 투여하였다. 마우스 한 마리의 1회 투여 분은 500  $\mu$ l로 하였다. 대조군의 마우스는 아무 것도 투여하지 않은 마우스로 실험하였다.

#### 나. 마우스의 채혈

마우스의 채혈은 4주 면역시킨 후 7일 뒤에 가볍게 ethyl ether로 마취시킨 후 retroorbital bleeding 방법으로 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4°C에서 2시간 동안 움직이지 않도록 보관한 후 원심분리하여 혈청만을 취하였고 분석하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

#### 다. 장액의 채취

장액의 채취는 마우스를 치사시킨 다음 복강을 절개하고 십이지장 개시부와 회맹결장부 바로 앞부분을 지혈점자로 단단히 잡은 후 그 외측을 절단하여 소장을 분리하였다. 분리된 소장은 PBS를 이용하여 그 외부를 깨끗이 세척하였다. 그후 소장은 25G needle 주사기를 이용하여 십이지장 개시부위에 2 ml의 soybean trypsin inhibitor (0.1 mg/ml) 가 첨가된 lavage solution (NaCl 25 mM, NaSO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20 mM, Polyethylene glycol : average M.W. 3350 48.5 mM) 을 주사하였다. 상온에서 10분간 정치시킨 후 2 ml의 EDTA solution (50 mM) 이 들어있는 centrifuge tube에 장내 내용물을 조심스럽게 담았다. 모여진 sample에 PBS를 가하여 총 부피를 6 ml로 만든 후 강하게 vortexing시킨 다음 650 g에서 10분간 원심분리하였다. 이 sample의 상등액 3 ml를 취하여 95%의 ethanol에 녹인 30  $\mu$ l의 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 100 mM) 을 가하여 잘 섞어 준 후 4°C에서 14,000 g으로 30분간 원심 분리하였다. 원심 분리가 끝난 후 상등액 2 ml를 취하여 20  $\mu$ l의 PMSF와 증류수에 녹인 20  $\mu$ l의 1% sodium azide를 가하여 15분간 상온에 둔 후 분석 전까지 -2

0℃에서 보관하였다.

라. 마우스 세포 분리

1) Spleen cell

spleen cell은 Murray et al. (1987)에 의한 방법으로 준비하였다. 마우스에서 spleen을 분리하여 차가운 PBS에 넣은 뒤 needle과 forcep을 사용하여 세포가 빠져 나오도록 갈았다. 실온에서 5분간 그대로 두어 조직세포를 가라앉혔다. 상등액만을 취한 다음 500 g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액은 버리고 세포에 적혈구를 파괴하기 위하여 0.83% ammonium chloride solution을 첨가한 뒤 상온에서 5분간 두었다. 이후 ammonium chloride solution의 5배의 HBSS를 넣은 뒤 suspension하였다. 세포 suspension은 HBSS로 두 번 더 washing하였다. 세포수를 센 다음 RPMI-1640+10% FBS에 세포를 넣은 다음 얼음 위에서 보관하였다.

2) MLN cells

마우스에서 MLN을 분리한 다음 멸균된 PBS에 넣은 뒤 needle과 forcep을 사용하여 세포가 빠져 나오도록 갈았다. 세포는 suspension한 뒤 500g에서 5분간 원심분리하였다. 그후 HBSS로 두 번 washing 한 다음 세포수를 센 다음 세포는 RPMI-1640+10% FBS에 넣은 다음 얼음 위에서 보관하였다.

3) PP cells

PP cell은 Frangakis et al. (1982)에 의한 방법으로 준비하였다. 마우스의 복강을 절개하고 소장으로부터 PP를 분리해 낸 후 차가운 PBS에 옮겼다. 다음으로 PP는 RPMI-1640+Dispase 50 ml에 넣고 37℃에서 30분간 stirring 하였다. 그런 다음 분리되어 나온 세포를 포함하고 있는 supernatant 30 ml만을 거뒀던 뒤 500 g에서 원심분리한 다음 HBSS로 washing 후 10% FBS-RPMI-1640 2ml에 resuspension한 후 얼음 위에 보관하고, 남아있는 조직에 다시 새로운 Dispase+RPMI 1640을 첨가하여 3회 더 반복하였다.

## 5. Isotype-specific ELISA

Goat anti-mouse isotype specific antibody를 1.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 sodium bicarbonate buffer (pH 9.2) 를 사용하여 96 well plate에 coating하였다. 4°C에서 overnight 시킨 후 0.5% gelatin을 이용하여 37°C에서 1시간 blocking시켰다. PBST로 3회 세척 후 well당 50  $\mu\text{l}$ 의 세포 배양액과 standard protein을 0.5% gelatin에 희석하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 plate를 3번 씻고 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody를 1.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 50  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PBST로 3회, 3차 증류수로 2회 씻은 후 substrate인 [2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin) -6-sulfuric acid] 를 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고 약 10-15분간 반응시킨 후 405 nm 파장에서 ELISA reader 를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 6. ELISPOT assay

isotype-specific antibody-secreting cell 수를 측정하기 위하여 ELISPOT assay를 실시하였다. Anti-mouse isotype-specific antibody를 0.05 M sodium bicarbonate buffer에 1.2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 nitrocellulose bottomed polystyrene 96-well microplates에 coating하였다 (Costar, Cambridge, MA). 4°C에서 overnight incubation시킨 다음 0.05% Tween-20 을 포함하고 있는 PBS (PBST) 로 씻어준 다음 1% gelatin solution 200  $\mu\text{l}$ 로 1시간동안 37°C에서 blocking하였다. PBST로 씻어준 뒤 RPMI-1640에 있는 세포를 각 well당  $1.5 \times 10^5$ 이 되도록 넣어준 다음 37°C에서 4시간 동안 배양시켰다. PBST로 3회 씻어준 뒤 Biotin-conjugated goat anti-mouse Ig isotype을 0.5% gelatin에 1:1000으로 희석한 다음 각 well당 150  $\mu\text{l}$ 씩을 넣어준 뒤 37°C에서 1시간 동안 incubation 시켰다. PBST로 3회 씻어준 뒤 Avidin-peroxidase를 1:1000으로 희석해 각 well당 150  $\mu\text{l}$ 씩 넣어준 뒤 어두운 곳에서 실온으로 1시간 30분간 incubation 시켰다. plate를 PBST로 씻은 후 AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) 를 넣어주고 15분간 반응시킨 다음 spot은 현미경하에서 counting하였다.

## 7. RNA 분리

배양된 B cell,  $0.5 \sim 1 \times 10^7$  cells에 TRIzol (Gibco) 1ml을 처리해서 lysis시킨 후 상온에서 5분간 방치한 다음  $200 \mu\text{l}$ 의 chloroform을 혼합하여 세게 흔들어 주고  $4^\circ\text{C}$ , 12,000 g에서 15분간 원심분리하였다. aqueous phase를 새 tube에 옮긴 후  $500 \mu\text{l}$ 의 isopropyl alcohol을 첨가하고 상온에서 10분간 방치한 후  $4^\circ\text{C}$ , 12,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 침전물 (침전된 RNA)을 75% cold ethanol로 씻어주고 7,500 g에서 5분간 원심분리하고 적당히 말린 다음 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$   $50 \mu\text{l}$ 에 녹였다. 전체 RNA를 사용하여 reverse transcription에 들어가기 앞서 UV Spectrophotometer A260/A280 nm 흡광도에서 측정하여 RNA의 purity 결정과 정량 후 농도가  $500 \text{ng}/\mu\text{l}$  가 되도록 DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ 로 희석하였다.

## 8. RT-PCR

### 가. Reverse Transcription

준비된 각 RNA를 10 mM의 Tris, 50 mM의 KCl, 5 mM의  $\text{MgCl}_2$ , 각각 1 mM의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, 20 U의 RNasin (ribonuclease inhibitor ; Promega),  $0.1 \mu\text{l}$ 의 oligo (dT)<sub>15</sub> (Boehringer Mannheim)과 50 U M-MLV reverse transcriptase (BRL)의 조건하에서 PCR tube에 넣고 RNA를  $2 \mu\text{l}$ 을 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 60 분 동안 reverse transcription 시킨 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 10 분 동안 heat-inactivation하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 안정화시켰다.

### 나. Primer의 준비

#### 1) $\beta$ -actin primer

3' - TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA

5' - CTAGAAGCACTGCGGTGGACGATGGAGGG

#### 2) TGF- $\beta$ 1 primer

3' - CTGCTCCACCTTGGGCTTGGCAGCCAC

5' - CGGGGCGACCTGGGCACCATCCATGAC

- 3) TNF- $\alpha$  primer
  - 3' - TACAGGCTTGTCCTCGAATT
  - 5' - ATGAGCACAGAAAGCATGATC
- 4) IL-2 primer
  - 3' - CTTATGTGTTGTAAGCAGGAGGTAC
  - 5' - CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG
- 5) IL-4 primer
  - 3' - GCATGGTGGCTCAGTACTACG
  - 5' - CTTCTTTCTCGAATGTACCAGG
- 6) IL-5 primer
  - 3' - AGGTAATCCAGGAACTGCCTCGTC
  - 5' - ATGAGCACAGTGGTAAAAGAGACC
- 7) IL-6 primer
  - 3' - CTGTTAGGAGAGCATTGGAAATTG
  - 5' - GAACGATAGTCAATTCCAGAAACC
- 8) IL-10 primer
  - 3' - TCATTCATGGCCTTGTAGACAC
  - 5' - AGCTGGACAACATACTGCTAACC
- 9) IL-12 primer
  - 3' - TGGAGCACTCCCCATTCCATT
  - 5' - AGAGGTGGACTGGACTCCCGA
- 10) IFN- $\gamma$  primer
  - 3' - GGCTGGATTCCGGCAACA
  - 5' - CGCTACACACTGCATCTTGG

#### 다. Polymerase Chain Reaction

RT가 끝난 cDNA products를 PCR buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 각각 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP와 dTTP)에 넣고 specific 5' 과 3' primer를 각각 25 pmol의 농도로 넣은 후 PCR을 수행하였다. PCR의 temperature profile은 95°C에서 1 분간 denaturation, 55°C에서 1 분간

annealing, 72°C에서 1 분간 extension하여 35 cycle을 수행하였다. PCR products는 2% agarose gel 상에서 확인하였다.

#### 9. Flow cytometry 분석

세포배양을 끝낸 세포를 500 g에서 원심분리하여 수거한 후 dimethyl sulfoxide in sucrose-citrate buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 1 ml로 씻어냈다. 0.5% BSA와 0.1% sodium azide를 포함한 PBS로 2번 씻어낸 뒤, 200  $\mu$ l의 PBS에  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  의 세포를 넣고 FITC가 결합된 goat anti-IgA 항체를 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 최종 농도가 25  $\mu$ g/ml이 되도록 넣은 뒤 빛을 차단한 상태로 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응하지 않은 항체를 제거하기 위해 0.5% BSA와 0.1% sodium azide를 포함한 PBS로 2번 씻어낸 뒤 4°C에서 보관한 후, FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 세포 표면에 발현되는 IgA 항체를 관찰하였다.

#### 10. 혈청의 분리

안와총 채혈법 (retroorbital bleeding)을 사용하여 혈청을 얻었다. 마우스를 ether로 마취시킨 후 조심스럽게 두부를 손으로 보정하였다. heparin으로 내부처리된 모세관을 마우스의 안와총에 찔러넣어 조심스럽게 회전시키면서 모세관을 통하여 나오는 혈액을 모았다. 이 혈액은 4°C에서 overnight시킨 후 100 g에서 3 분간 원심분리하여 상층의 혈청만을 microtube에 모아서 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

#### 11. 세포증식의 결정

*B. bifidum* 과 *C. perfringens*을 96 well 배양 plate에 준비된 spleen cell ( $5 \times 10^5$  cells/well)넣고 4일간 배양하였다. 세포를 걷기 18시간 전에 5  $\mu$ Ci/ml의  $^3$ [H] thymidine을 넣었다. 세포는 cell harvester (Inotech IH-110, Switzerland)를 사용하여 수집하였고, 방사선량은 liquid scintillation counter (Wallac 1410, Pharmacia, Finland)로 측정하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 세균수의 결정방법 정착

본 연구에서 사용하는 *B. bifidum*과 *C. perfringens*는 혐기성 세균이다. 본 연구를 본격적으로 시작하기 전에 먼저 세포 수의 측정을 정확하고 간편하게 개선할 필요성이 있었다. 전통적인 colony counting과 현미경을 이용한 direct counting을 비교하였다. Table 1에서 보듯 direct counting은 colony counting의 결과에 버금가는 결과를 보여준다. 본 연구에서는 이 결과를 기초로 대부분의 경우 direct counting을 사용하여 세포수를 결정하였다.

### 2. in vitro에서 Bifidobacteria에 의한 B cell의 활성화 조사

#### 가. *B. bifidum*에 의한 spleen B cell의 활성화

먼저 *B. bifidum*이 spleen B cell의 항체 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 이와같은 조사는 기본적인 *B. bifidum*의 특징을 이해하는데 필수적이기 때문이다. BALB/C mouse로부터 spleen whole cell을 분리하여  $2.5 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 96-well culture plate에 seeding한 뒤,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  cells/ml의 bifidobacteria를 넣고 LPS ( $12.5 \mu\text{g/ml}$ )가 있는 조건과 없는 조건으로 구분하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 7일 후 상등액을 얻어 ELISA로 항체합성 정도를 측정하였다. 그 결과,  $5 \times 10^6$ 와  $5 \times 10^7$  cells/ml의 bifidobacteria가 있는 조건에서 IgA, IgM, IgG1 isotype의 합성이 현격히 증가하였음을 관찰하였다 (Fig.1). 특히 LPS가 없는 조건에서  $5 \times 10^6$ 와  $5 \times 10^7$  cells/ml의 bifidobacteria를 넣었을 때 LPS로 활성화시킨 경우보다 항체합성이 증가하였다 (Fig.2). 본 결과는 일정한 수 이상의 bifidobacteria는 B cell의 비특이적인 항체합성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 보여준다. 한편 negative control로 사용된 식중독 원인 세균 중 하나인 *Clostridium perfringens* (일명 웰치균)의 경우에는 같은 조건에서 bifidobacteria에서

보이던 항체 합성 증진 효과를

**Table 1. Comparison of bacterial viability between colony and direct counting method.**

Method	Dilution factor	<i>B. bifidum</i>	<i>C. perfringens</i>
		No. of cells	
Colony countin. (CFU/ml)	$1 \times 10^6$	$1.29 \times 10^8$	$2.09 \times 10^8$
	$1 \times 10^7$	$1.25 \times 10^8$	$3.18 \times 10^8$
	$1 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$7.05 \times 10^8$
Direct counting (cells/ml)	1	$2 \times 10^8$	$7.96 \times 10^8$
	10	$1.48 \times 10^8$	$6.37 \times 10^8$
	100	$1.25 \times 10^8$	$7.87 \times 10^8$

Colony counting method: *B. bifidum* and *C. perfringens* were serially diluted in culture media. Cell suspension was poured into MRS agar plates and covered with melted agar media. After mixing of bacterial cell suspension, it was transferred to anaerobic jar. The anaerobic jar was vacuumed and incubated at 37°C. Colonies were counted after 3 days of incubation. The data are the means of average number of duplicate samples.

Direct counting method: Bacterium was washed with 0.01 M PBS and serially diluted in culture media. 5  $\mu$ l of bacterial cell suspension was transferred on Petroff-Hausser bacteria counter and covered with cover glass. Then, cells were counted using inverted microscope. The data are the means of average number of duplicate samples.

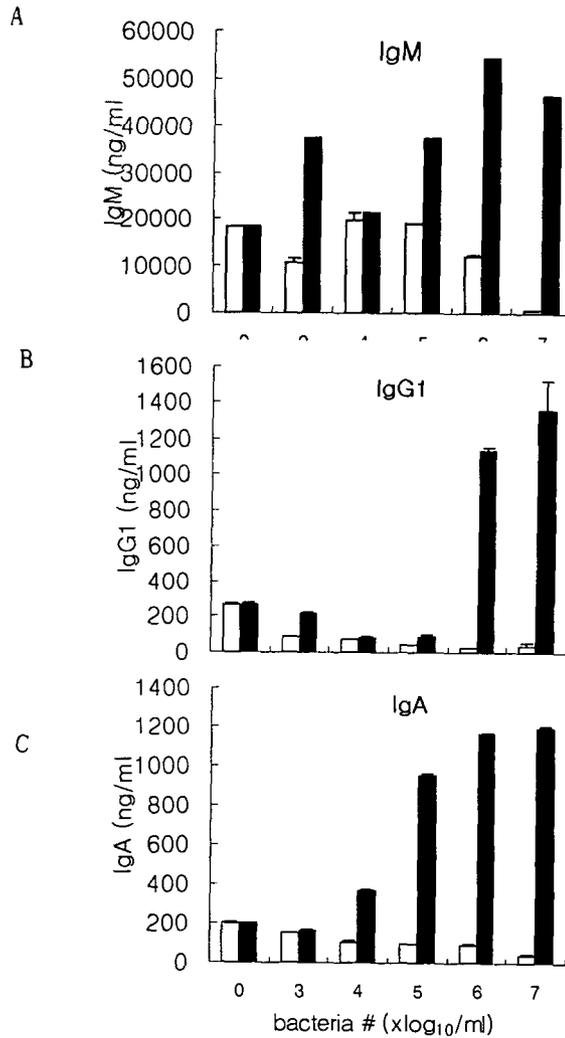


Fig. 1. Effect of *B. bifidum* on the secretion of Igs by murine whole spleen cells in the presence of LPS. Whole spleen cells were cultured with *B. bifidum* or *C. perfringens* (none,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ) in 96-well plates. LPS ( $12.5 \mu\text{g/ml}$ ) was added to culture on day 0. After 7 days of culture, supernatants were obtained and antibody response was measured by ELISA. Data are means of triplicate samples. Vertical bars represent SEM. *C. perfringens* ( $\square$ ); *B. bifidum* ( $\blacksquare$ ).

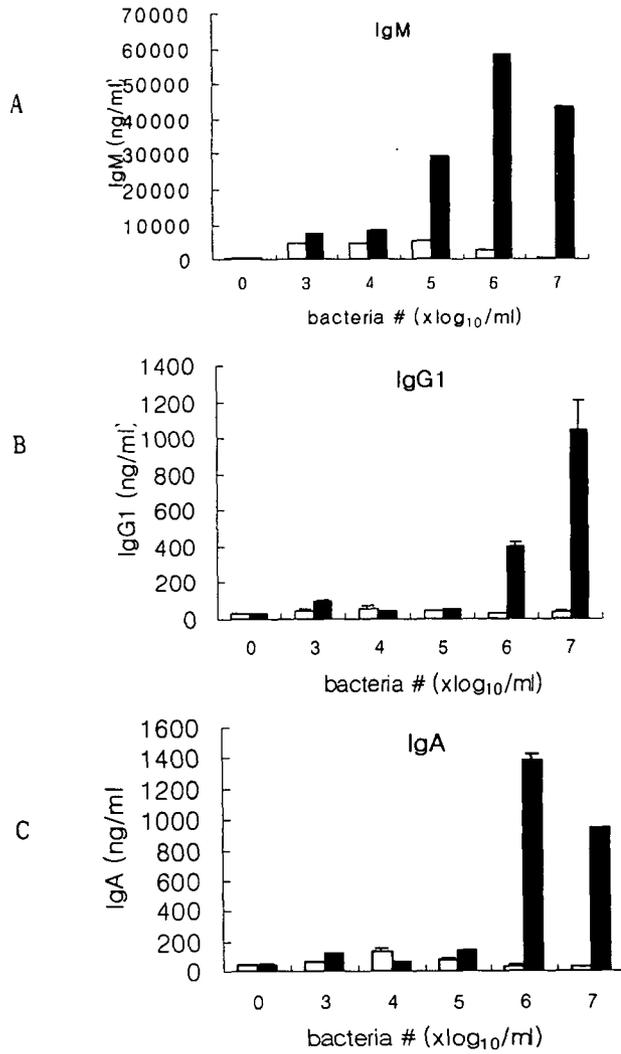


Fig.2. *B. bifidum* alone stimulates whole spleen cells to secrete Igs. whole spleen cells were cultured as described in Figure 1 without LPS. Data are the means of triplicate samples. Vertical bars represent SEM. *C. perfringens* (□); *B. bifidum* (■).

관찰할 수 없었다 (Fig. 1, 2).

이와 같은 *B. bifidum*의 영향은 마치 B cell의 polyclonal activator인 LPS와 같이 mitogen 역할을 할 수 있음을 보여준다. 따라서 다음 단계에서는 세포의 증식에 미치는 역할을 조사하였다. Fig.3에서 보듯, BB는 control이나 *C. perfringens*에 비해 현격히 B cell의 증식을 증가시켰다. 이러한 결과는 *B. bifidum*이 B cell의 증식에 영향을 주어 항체합성을 증가시켰음을 시사한다. 다음으로는 이러한 증식의 효과가 항체합성세포수의 증가로 나타나는지를 조사하였다. Bifidobacteria와 spleen whole cell을 5일 동안 함께 배양한 후, 세포수가  $1 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 seeding한 뒤 ELISPOT 방법을 이용하여 항체 합성 세포의 수를 측정하였다. 그 결과, bifidobacteria가 있는 조건에서 IgA isotype의 합성이 약 3배 정도 증가하였다. 결국 *B. bifidum*이 세포의 증식을 통해 항체합성 세포수의 증가를 일으킴을 밝힐 수 있었다.

나. *B. bifidum*은 B cell의 cytokine 반응성을 증가시킴

본인 등은 TGF- $\beta$ 1이 in vitro에서 IgA class switch를 유도하여 IgA 합성을 항진시킨다고 보고한 바 있다 (Kim and Kagnoff, 1990). 또 IL-5는 B cell 성장과 항체분비를 항진시키는 cytokine으로 잘 알려져 있다. 본 실험에서는 Bifidobacteria가 B cell이 TGF- $\beta$ 1이나 IL-5에 대한 반응성을 갖도록 B cell을 활성화시킬 수 있는지를 알아보았다. 마우스 spleen cell ( $5 \times 10^5$  cell/well)에 media, *B. bifidum*, TGF- $\beta$ 1+IL-5, B+T+5를 넣은 후 7일간 배양한 후, ELISA를 통해 Ig 합성 결과를 관찰하였다. IgA와 IgG2b의 경우 *B. bifidum*과 B+T+5 조건에서 의미있는 증가를 보였다 (Fig.5). 그러나 IgM, IgG2a, IgG1의 분비정도는 각 조건들 사이에서 현격한 차이를 나타내지는 않았다 (Fig.6). 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 다시 한번 마우스의 경우 LPS와 같이 polyclonal activator로 작용함을 보여준다. 마지막으로 B cell 표면에 발현되는 surface IgA의 정도를 조사한 바, IgA 합성량 패턴과 유사하게 BB는 B cell에 작용하여 TGF- $\beta$ 1과 IL-5의 반응성을 증가시켰다 (Fig.7).

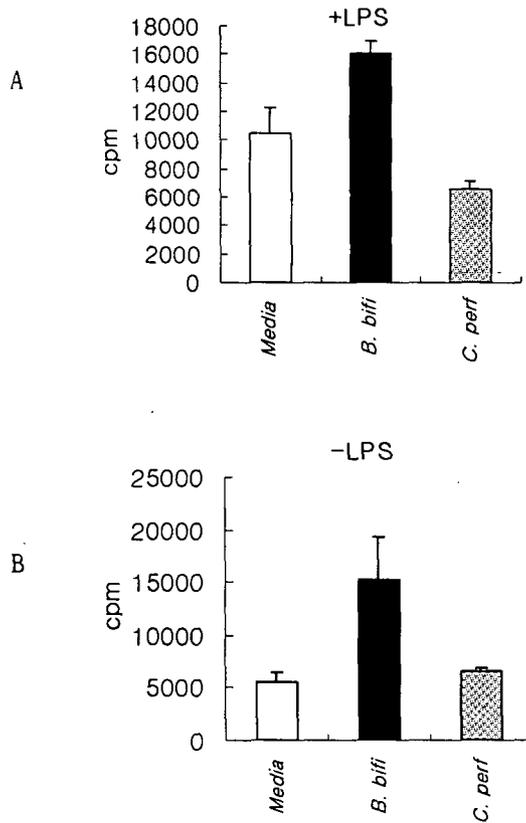


Fig.3. *B. bifidum* enhances the proliferation of whole spleen cells. whole spleen cells were cultured with *B. bifidum* at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well with or without LPS ( $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in 96-well culture plates and incubated for 4 days. Wells were pulsed for 18 h with  $5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  of  $^3\text{H}$  thymidine. Cells were harvested and filtered through glass fiber filters and counted in a liquid scintillation counter. **A**) In the presence of LPS. **B**) In the absence of LPS.

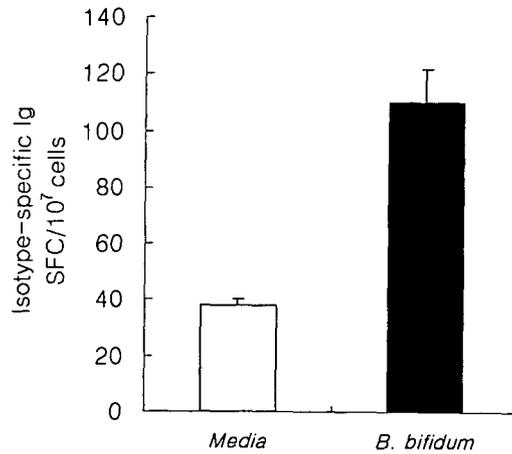


Fig.4. *B. bifidum* increases number of IgA secreting cells. Spleen B cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated with *B. bifidum* ( $1 \times 10^7$  cells/well) for 5 days. Number of IgA secreting cells were enumerated by ELISPOT assay as described in Materials and Methods. Data are means of duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells ( $n=3$ ). Vertical bars represent SEM.

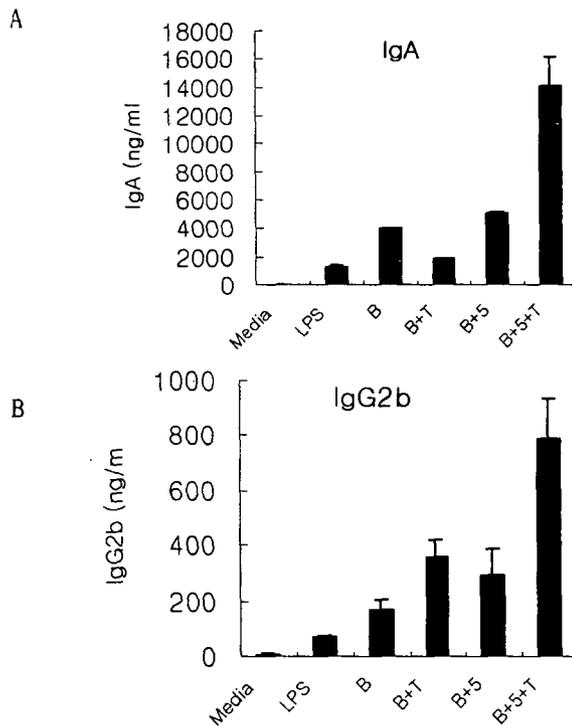


Fig.5. *B. bifidum* induces B cells to responsive to TGF- $\beta$ 1 and IL-5 resulting in increase of IgA and IgG2b synthesis. Spleen B cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with *B. bifidum* ( $1 \times 10^7$  bacteria/well). Cells were stimulated with TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml) or IL-5 (0.5 ng/ml) on day 0. After 7 days of culture, supernatants were obtained and antibody response was measured by ELISA. Data are means of duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells (n=3). Vertical bars represent SEM. B, *B. bifidum*; T, TGF- $\beta$ 1; 5, IL-5.

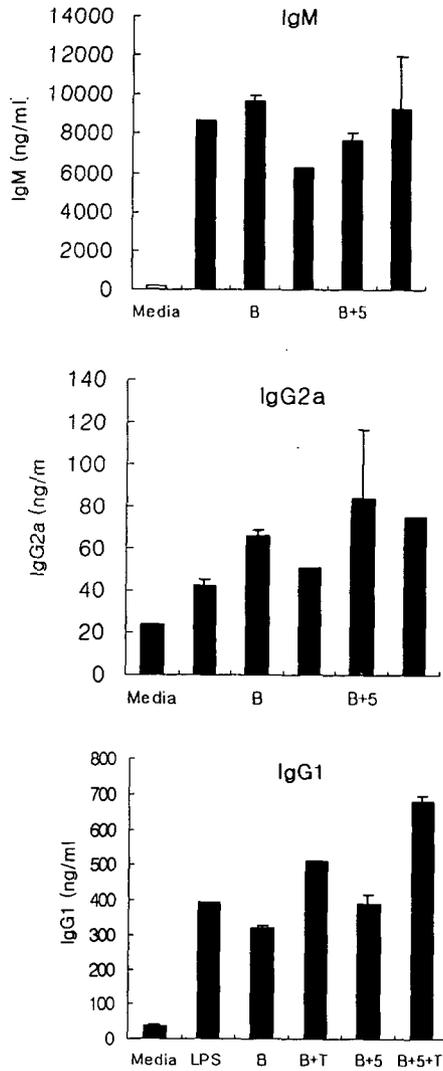


Fig.6. Effect of *B. bifidum* on the synthesis of IgM, IgG1 and IgG2a by spleen B cells in the presence of TGF- $\beta$ 1 and IL-5. Culture conditions were the same as described in Fig. 5. Data are means of duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells (n=3). Vertical bars represent SEM. B, *Bifidobacterium bifidum*; T, TGF- $\beta$ 1; 5, IL-5.

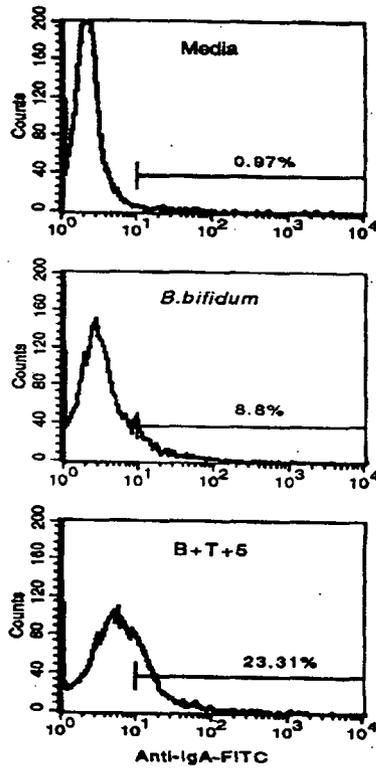


Fig. 7. Effect of *B. bifidum* on the expression of surface IgA by murine spleen B cells in the presence of TGF- $\beta$ 1 and IL-5. Culture conditions were the same as described in Fig. 5. Cells were harvested after 4 days of culture and analyzed by FACS following staining with FITC-conjugated anti-mouse IgA antibody. T, TGF- $\beta$ 1; 5, IL-5.

### 3. 장내점막 B cell의 항체합성에 미치는 *B. bifidum*의 효과 조사

#### 가. Mesenteric Lymph Node (MLN) B cell에 대한 영향

지금까지 결과는 *B. bifidum*이 비특이적으로 spleen B cell을 활성화시켜 Ig 합성을 증가시킴을 보여준다. *B. bifidum*은 장내에만 머무는 유익세균이므로 다음 단계에서는 장내 면역에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 MLN B cell의 항체 합성에 미치는 영향을 조사하였다. spleen B cell과 유사하게 IgA나 IgM 합성량을 현격히 증가시켰다. 그러나 IgG1의 합성에는 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig.8). 한편 *B. bifidum*는 surface IgA 발현에 대해서는 LPS 보다도 더욱 크게 증가시켰다 (Fig.9). TGF- $\beta$ 1과 IL-5의 반응성에 대해서는 spleen B cell과 유사하게 IgA 합성을 증가시켰고, IgM이나 IgG1의 합성은 변화가 없었다 (Fig.10). 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 장내에서도 B cell을 직접 영향을 주어 IgA 항체 합성에 기여할 수 있음을 시사한다.

#### 나. Peyer's Patch (PP) B cell에 대한 영향

*B. bifidum*은 PP B cell의 경우에도 IgA 합성을 증가시켰다. 그러나 *C. perfringens*는 어떤 영향도 주지 않았다. 이 때 BB는 IgM과 IgG1의 합성에는 별 다른 영향을 주지 않았다 (Fig.11). 이런 결과는 MLN B cell의 경우와 유사한 현상이며, spleen B cell의 경우와는 대조적인 결과이다. 아직까지 그 이유를 단정하기는 어렵지만 장내 점막 B cell의 특징으로 보인다. spleen B cell의 경우와 한가지 더 다른 점은 *B. bifidum*에 의해 활성화된 PP B cell의 경우 TGF- $\beta$ 1과 IL-5에 의해 첨가적인 IgA 합성 상승이 관찰되지 않은 현상이다 (Fig.12). 이와 같은 현상은 어느 정도 예상되었다. 일반적으로 PP에 존재하는 B cell은 대부분 IgA를 합성할 수 있는 세포로 운명이 결정되어 있기 때문에 TGF- $\beta$ 1에 의한 IgA isotype switching 유도과정이 불필요하기 때문이다.

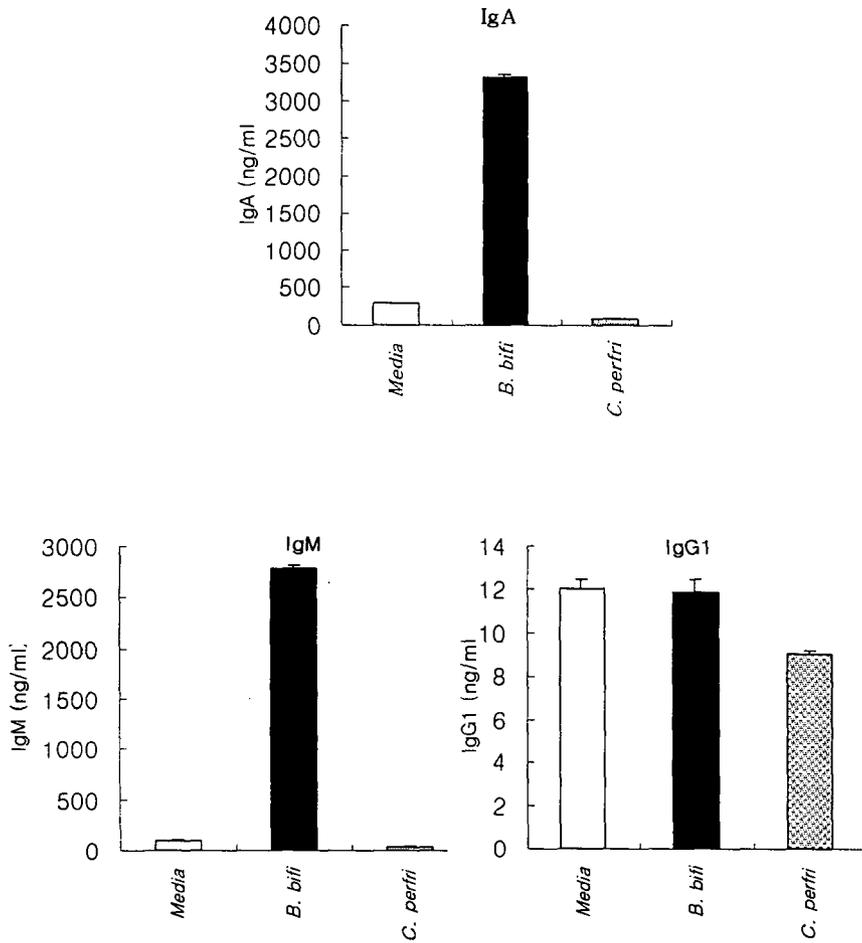


Fig. 8. *B. bifidum* stimulated murine MLN B cells to secrete IgA and IgM antibody. MLN cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with  $1 \times 10^7$  bacteria/well of *B. bifidum* or *C. perfringens* in a 96-well culture plate on day 0. Supernatants were harvested after 7 days of culture and Ig secretion was measured by ELISA. Data are the means duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells ( $n=3$ ). Vertical bars represent SEM.

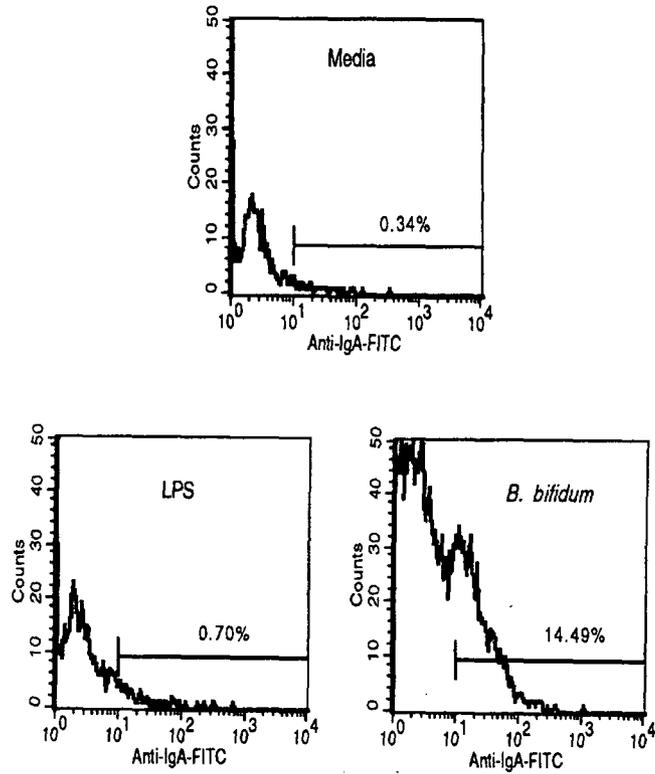


Fig. 9. Bifidobacterium increased sIgA expression by murine MLN B cells. MLN cells were cultured with LPS (12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or *B. bifidum* ( $1 \times 10^7$  bacteria/well) at  $5 \times 10^5$  cells/well in a 96-well culture plate on day 0. After 4 days of culture, cells were harvested and analyzed with FITC-conjugated anti-mouse IgA antibody using FACS.

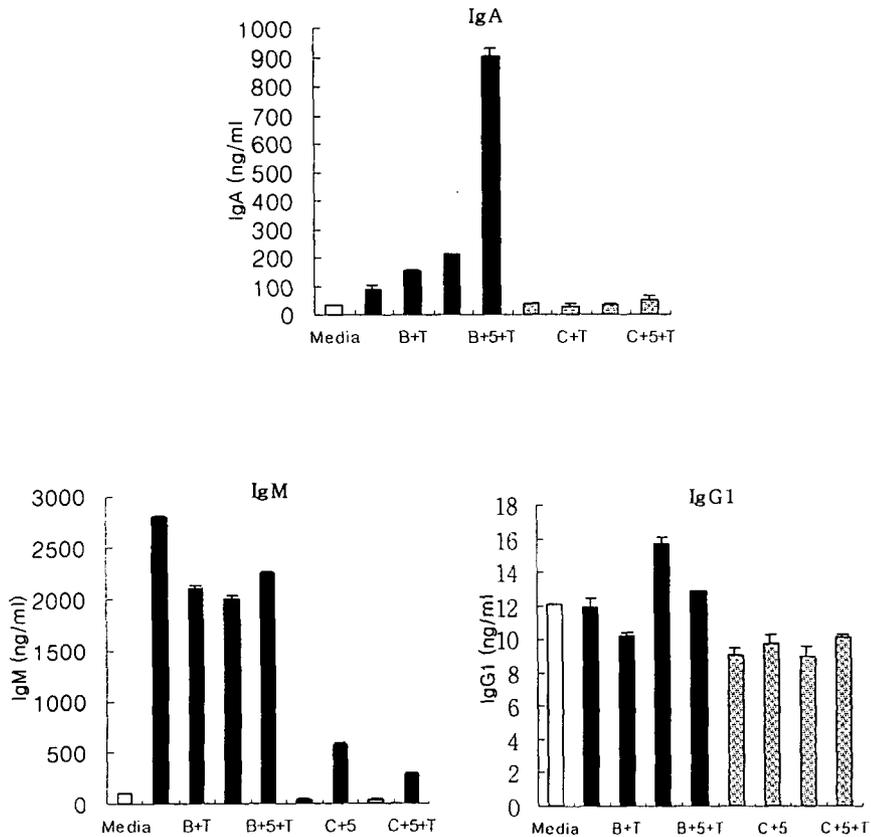


Fig.10. Effect of TGF- $\beta$ 1 and IL-5 on Ig synthesis of murine MLN B cells by bifidobacterium. MLN cells were cultured with *B. bifidum* or *C. perfringens* ( $1 \times 10^7$  bacteria/well) and/or TGF- $\beta$ 1 (0.2 ng/ml) and IL-5 (0.5 ng/ml) at  $5 \times 10^5$  per well in a 96-well culture plate on day 0. Supernatant were harvested after 7 days of culture and Ig secretion was measured by ELISA. Triplicate wells were pooled and the data are means of duplicate samples. B, *B. bifidum*; C, *C. perfringens*; T, TGF- $\beta$ 1; 5, IL-5. Vertical bars represent SEM.

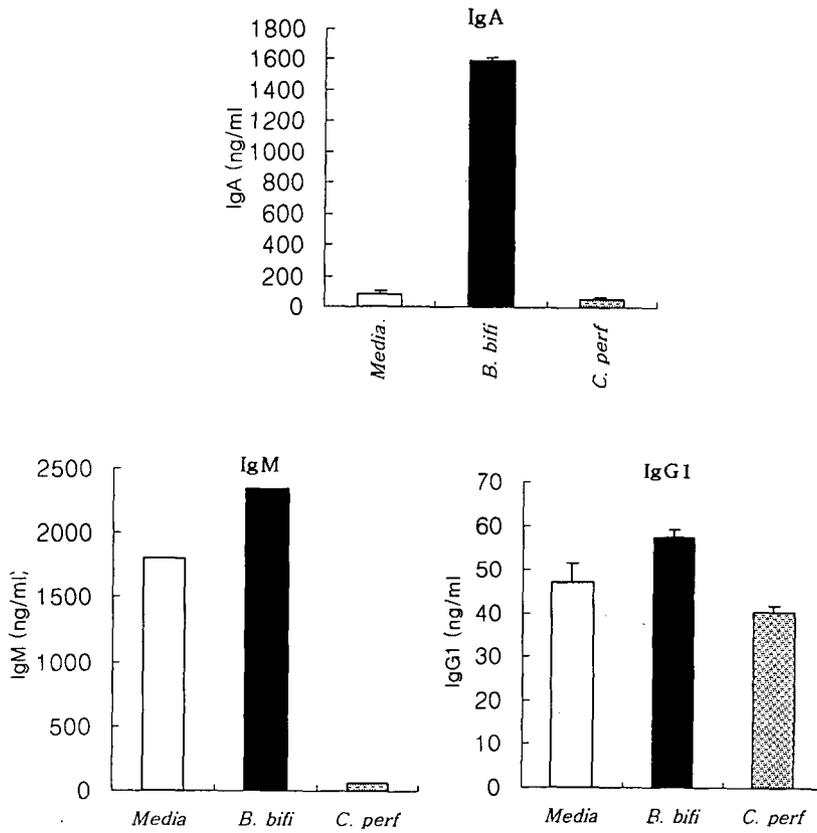


Fig.11. *B. bifidum* stimulated murine PP B cells to secrete IgA antibody. Culture conditions were the same as described in Fig.8. Supernatants were harvested after 7 days of culture. IgA, IgM, and IgG1 were assayed by ELISA. Data are the means of duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells (n=3). Vertical bars represent SEM.

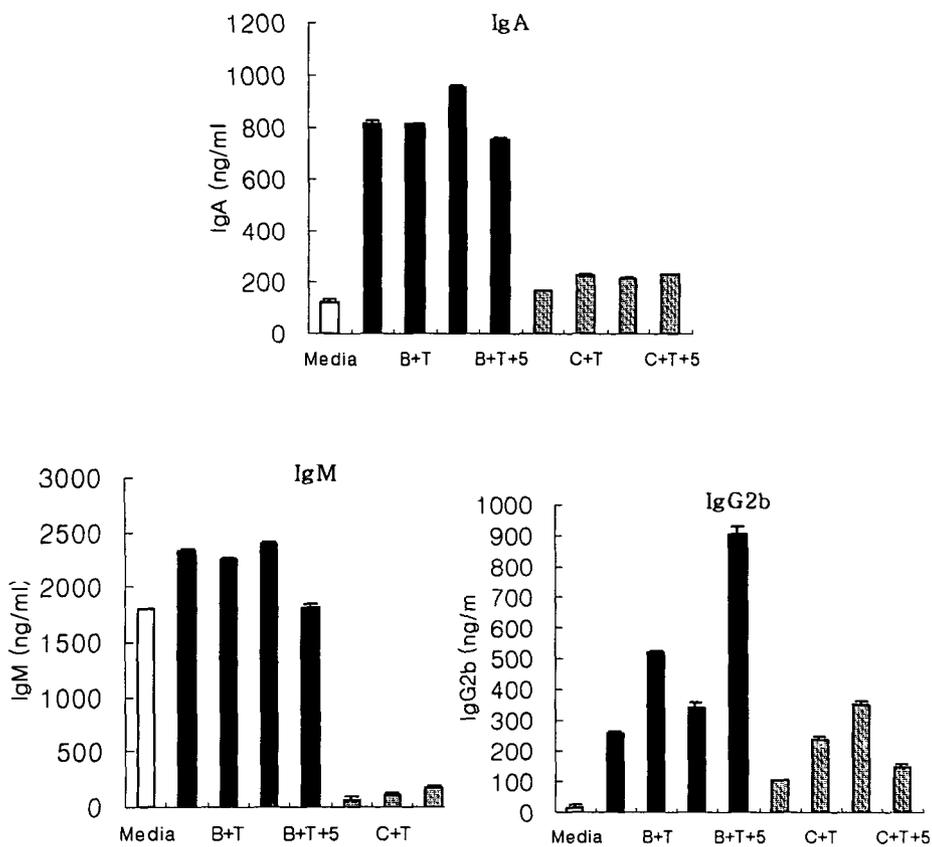


Fig.12. Effect of TGF- $\beta$ 1 and IL-5 on Ig synthesis of murine PP B cells by bifidobacterium. Culture conditions were the same as described in Fig.10. Supernatants were harvested after 7 days of culture. IgA, IgM, and IgG2b were assayed by ELISA. Data are the means duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells (n=3). Vertical bars represent SEM.

#### 4. *B. bifidum*의 경구투여 효과 조사

가. *B. bifidum*에 의한 장액과 혈액에서의 항체분비

먼저 *B. bifidum*의 경구투여가 *B. bifidum*에 대한 항체가 형성되었는지 조사하였다. 경구 투여된 *B. bifidum*의 항원성을 알아 보기 위해서다. *B. bifidum*과 *C. Perfringens*를 마우스에 4주간 2일 간격으로 투여하였다. 4주 후 장액과 혈청에서의 BB 특이적인 항체합성을 ELISA로 조사하였다. *B. bifidum*을 투여한 마우스의 BB 특이적인 항체합성 정도가 control과 *C. Perfringens*를 투여한 마우스의 장액 (Fig.13)과 혈청 (Fig.14)에서 의미있는 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum* 자체는 면역성이 약하며 단지 adjuvant로만 작용함을 시사한다.

나. *B. bifidum*의 구강투여가 spleen, MLN, PP에서의 항체합성 세포수에 미치는 효과

*Bifidobacteria*의 구강투여가 항원 비특이적인 항체합성에 미치는 영향을 조사하였다. 항체합성 세포수를 ELISPOT assay를 통해 결정하였다 (Fig.15). spleen에서는 *B. bifidum*의 역할을 뚜렷이 관찰할 수 없었고, MLN에서는 IgA 합성세포수가 의미있게 증가하였다. 그러나 PP에서 *B. bifidum*을 투여한 마우스는 IgG1, IgM의 분비량에서 control이나 *C. Perfringens*에 비해 증가되었다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 경구 투여되었을 때 PP보다는 MLN B cell의 IgA 항체 합성을 자극하여 점막조직의 방어에 기여함을 시사하며, 장내 감염에 대한 IgA 항체의 중요성을 생각할 때 매우 중요하다고 사료된다.

#### 5. *Bifidobacteria*에 의한 항체합성 항진효과는 세포막이나 세포벽 성분임

B cell을 자극하고 경구 투여시 IgA 합성을 자극할 수 있는 *B. bifidum*의 구체적인 특성을 알아보기 위한 일환으로 *B. bifidum*의 자극효과가 *B. bifidum* 세포자체에 의해서인지 또는 배양상등액에 의해서인지를 알아보았다. 먼저 BALB/c 마우스로부터 분리한 spleen cell을 크게 LPS가 있는 조건과 없는 조건으로 나누어 7일간 배양하였다. 그리고 배양후 ELISA방법

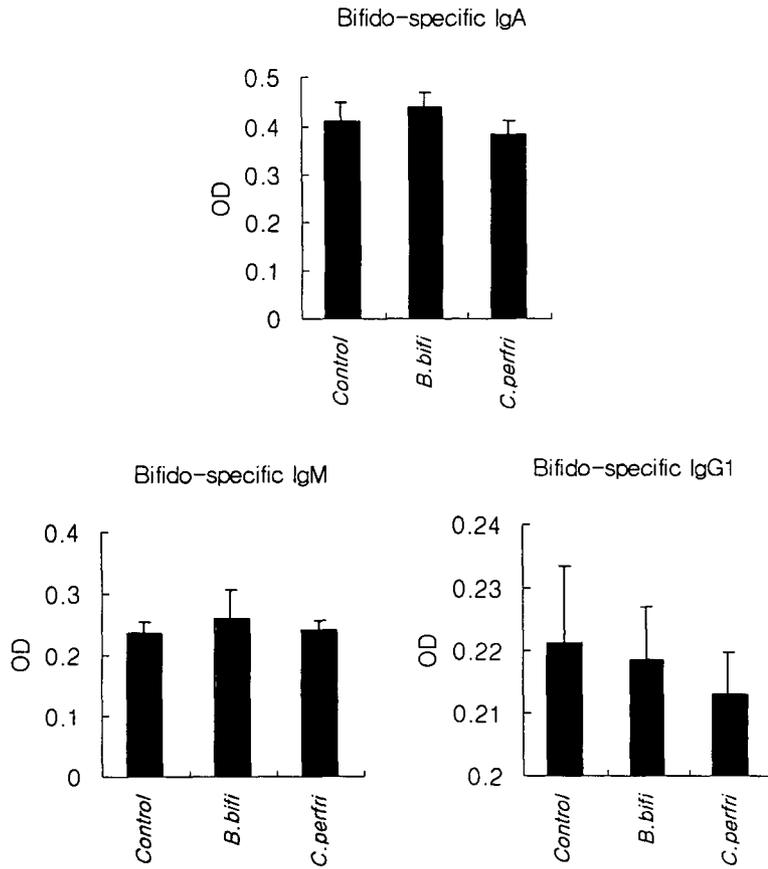


Fig.13. Effect of peroral administration of *B. bifidum* on antigen-specific antibody responses in intestinal lavages. *B. bifidum* or *C. perfringens* ( $10^{10}$  cells/mouse) was administered every other day for 4 weeks. Lavages was collected as described in materials and Methods. Antigen-specific antibody responses was measured by ELISA.

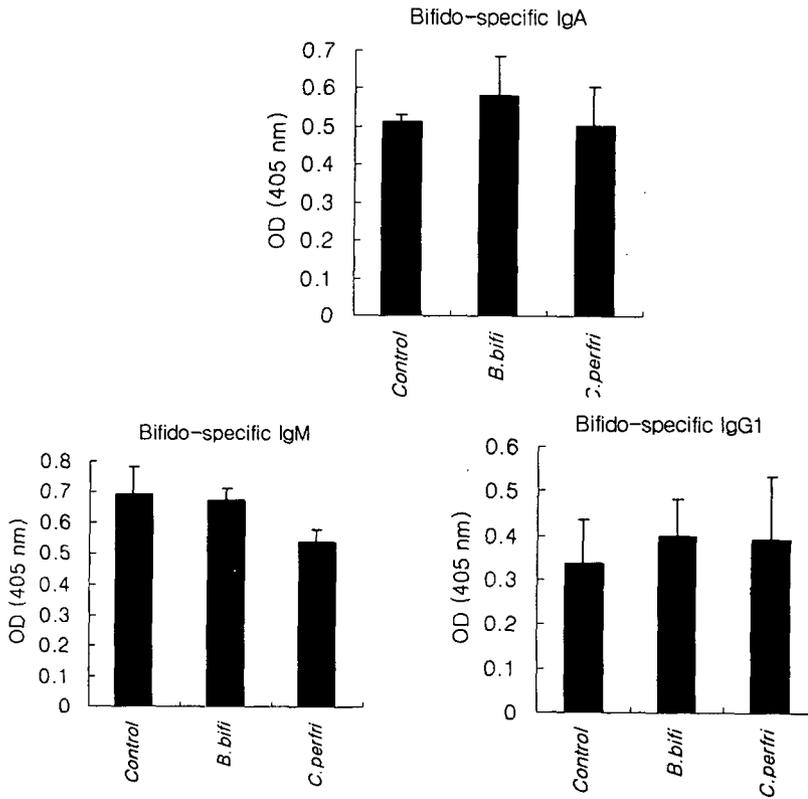


Fig.14. Effect of peroral administration of *B. bifidum* on antigen-specific antibody responses in the sera. *B. bifidum* or *C. perfringens* ( $10^{10}$  cells/mouse) was administered every other day for 4 weeks. Sera was collected as described in materials and Methods. Antigen-specific antibody responses was measured by ELISA.

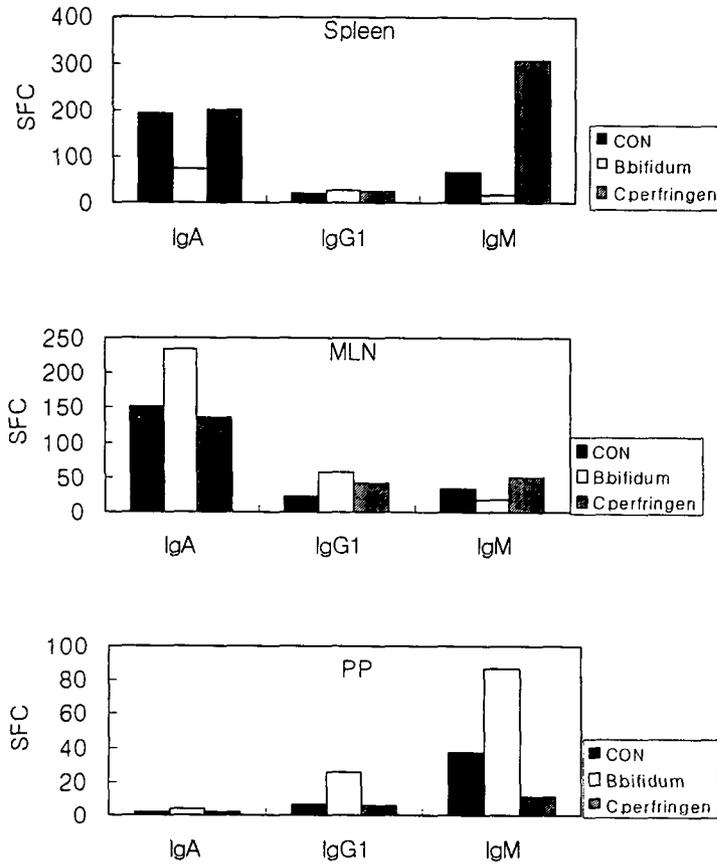


Fig.15. Effect of peroral administration of *B. bifidum* on number of antigen non-specific Ig secreting cells. *B. bifidum* or *C. perfringens* ( $10^{10}$  cells/mouse) was administered every other day for 4 weeks. Number of antigen-specific antibody secreting cells was enumerated by ELISPOT assay.

을 통해 결과를 확인했다 (Fig.16). LPS가 존재할 경우는 세포나 배양상등액의 영향이 뚜렷하지 않았다. 그러나 LPS가 없을 때는 2~5일 배양한 *B.*

*bifidum* cell이 배양상등액에 비해 IgA와 IgM 분비를 크게 증가시켰다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum*에 의한 항체합성의 자극효과는 배양상등액보다는 세포자체 즉 세포막이나 세포벽의 효과가 큼을 보여준다.

#### 6. 초미세구 Bifidobacteria의 구강투여가 항체 합성에 미치는 효과

내장까지 살아있는 bacteria의 수를 증가시키기 위해서 alginate로 미세구화된 *B. bifidum*과 *B. bifidum* 세포를 마우스에게 4주간 2일 간격으로 구강 투여하였다. 투여량은 1회 500  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  cells/day)로 하였다. 4주 후 장액과 혈액에서의 항체합성을 ELISA를 통해 관찰하였다 (Fig. 17). 결과에서 보듯 혈청에서 초미세구 *B. bifidum*의 효과는 *B. bifidum* cell, 대조군 (non-feeding) 에 비해 IgA의 분비량이 각각 2.5배, 5배의 증가를 보였다. 장액에서의 IgA 분비량은 *B. bifidum*의 IgA분비량과 거의 유사한 값을 나타낸 반면, control 비해 약 3배정도의 증가를 보였다. 이상의 결과는 초미세구 *B. bifidum*의 투여가 전신면역과 점막면역에서 IgA 항체 합성에 항진 효과가 있음을 보여 준다.

다음단계에서는 초미세구 *B. bifidum*의 구강투여가 항체합성에 미치는 영향을 조사하였다. 항체합성 세포수는 ELISPOT assay를 통해 결정하였다 (Fig. 18). MLN B cell의 경우, 먼저 IgA 합성 세포수를 보면 초미세구 *B. bifidum*과 *B. bifidum* cell은 뚜렷한 차이를 보이지 않았지만 대조군과 비교하였을 때는 초미세구 *B. bifidum*이 약 7배의 증가를 보였다. MLN B cell에서 IgG 합성 세포수는 초미세구 *B. bifidum*이 *B. bifidum* cell, 대조군에 비해 의미있는 증가를 보이지는 못했다. 다음으로 Spleen B cell의 경우에서, IgA 합성 세포수를 살펴보면 초미세구 *B. bifidum*은 *B. bifidum* cell, 대조군에 비해 각각 9배, 3배의 증가를 보였으며, IgG 합성 세포수는 각각 약 4.3배, 3.4배의 증가를 보였다. 이상의 결과는 초미세구 *B. bifidum*의 투여가 전신면역 활성 효과가 크며 장내에서는 주로 IgA 항체 합성에 항진 효과가 있음을 보여 준다.

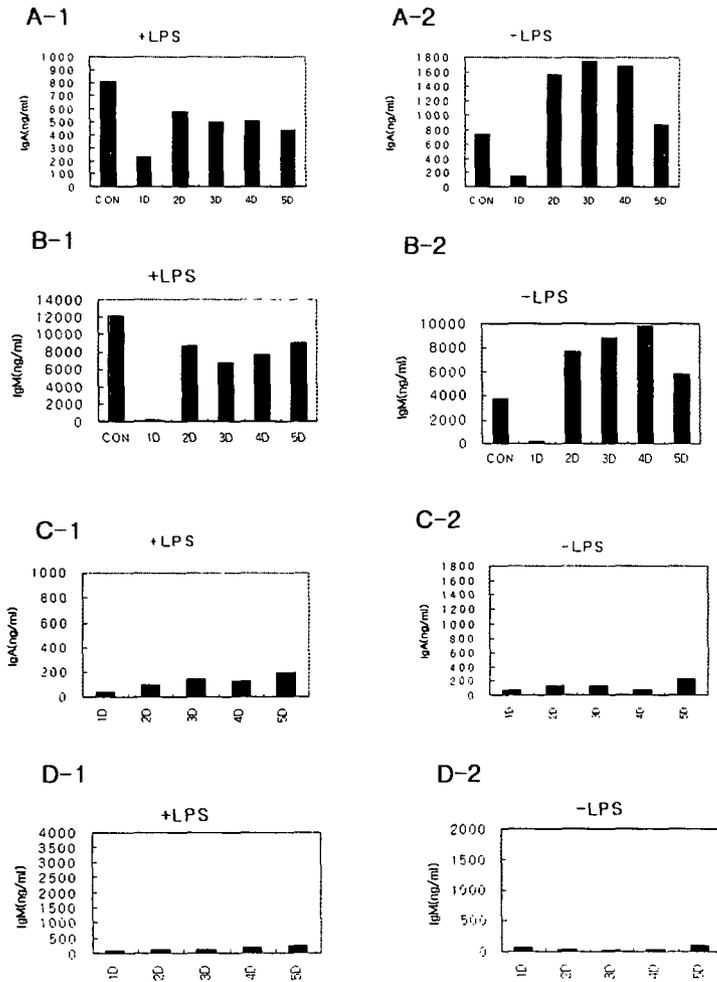


Fig.16. Effect of bifidobacterial cells or its culture supernatants on IgA and IgM synthesis by murine spleen B cells. B cells were cultured with bifidobacterial cells (A and B panel) or its culture supernatants (C and D panel) in the presence of LPS and absence of LPS. Antigen non-specific antibody responses was measured by ELISA. D represents the incubation date of bacterial culture.

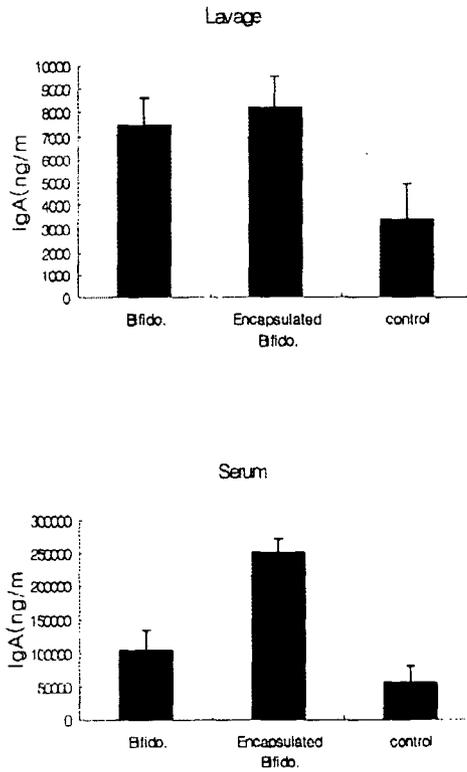


Fig.17. Effect of peroral administration of *B. bifidum* on antigen-nonspecific antibody response in intestinal lavage and the sera. Male and female BALB/C mice were administered perorally with bifidobacterium cell ( $1 \times 10^8$  cells/ml) for 4 weeks for every other day. After 4 weeks, intestinal fluid and serum were obtained from mouse and antibody response was measured by ELISA assay.

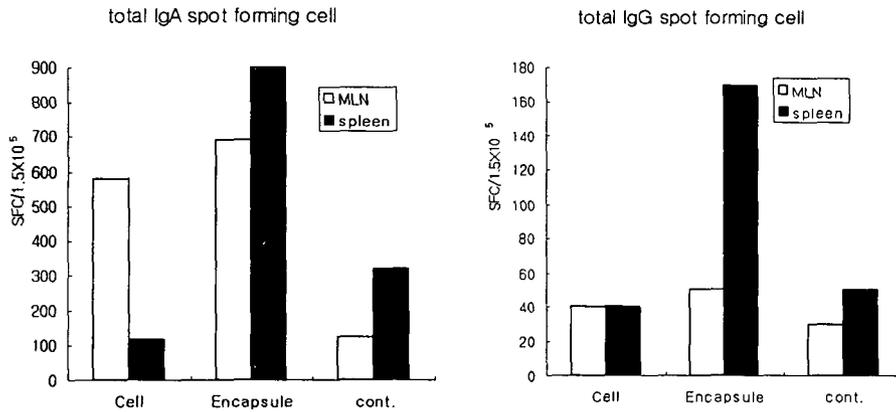


Fig.18. Effect of peroral administration of Encapsulated *B. bifidum* on the mouse number of antigen nonspecific Ig secreting cells. MLN and Spleen were isolated following peroral administration.  $1.5 \times 10^5$  cells per well were incubated in a nitrocellulose-bottomed 96 well plate for 4h and IgA secreting cell and IgG secreting cell number were determined by ELISPOT assay as described in Material and Methods. Data are the means duplicate samples. Each sample contains 2-fold diluted wells.

## 7. Bifidobacteria의 cytokine합성에 미치는 효과

가. 초미세구 Bifidobacteria 경구투여가 장내 점막면역조직의 cytokine합성에 미치는 효과

다음은 장내 면역조직에 존재하는 면역세포의 cytokine 합성에 미치는 초미세구 Bifidobacteria의 영향을 mRNA 수준에서 조사하였다. B cell의 항체합성에 T cell이나 macrophage가 분비하는 cytokine의 영향은 절대적이라고 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 초미세구 Bifidobacteria를 경구투여 후 Peyer's patch (PP)와 mesenteric lymph node (MLN)에서의 mRNA 발현을 RT-PCR 방법에 의해 측정하였다. 먼저 mRNA control로서  $\beta$ -actin의 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 19에서 보듯 모든 조건에서 비슷한 수준의 mRNA 양이 검출되었다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용한 제반 실험조건이 적절함을 보여준다. 다음 단계에서는 TGF- $\beta$ 1의 mRNA양을 조사하였다. PP에서는 초미세구 Bifidobacteria의 구강투여 효과가 오히려 TGF- $\beta$ 1의 mRNA양을 감소시켰다. 그러나 MLN에서는 그 초미세구의 효과가 뚜렷하게 관찰되었다. 이런 결과는 초미세구가 MLN에서의 IgA 항체 합성을 증가시킨다는 Fig. 18의 결과와 밀접한 관련이 있다. 왜냐하면 TGF- $\beta$ 1은 IgA 항체 합성을 항진시키는 대표적인 cytokine이기 때문이다. 이상의 결과는 Bifidobacteria의 장내 점막 면역 활성화, 특히 IgA 항체 합성을 증가시키는 한가지 기작으로 이해된다.

나. *B. bifidum*으로 자극시킨 spleen cell의 cytokine 발현 조사

본 연구에서는 *B. bifidum*이 다양한 cytokine 발현에 미치는 영향을 조사하였다. T helper cell은 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6 등을 발현하고, macrophage는 IL-1, IL-10, IL-12 등을 발현한다고 알려져 있다. 따라서 이와 같은 cytokine의 발현에 *B. bifidum*이 어떤 조절작용을 보이는지는 궁극적으로 면역체계에 대한 BB의 위치를 파악하는데 단서를 제공할 수 있다. 본 실험에는 *B. bifidum*과 함께 B cell polyclonal activator인 LPS, 그리고 T cell polyclonal activator인 Con A를 병행하였다. IL-2의 mRNA는 *B. bifidum*이 함께 배양한 경우 가장 많이 발현되었다 (Fig. 20).

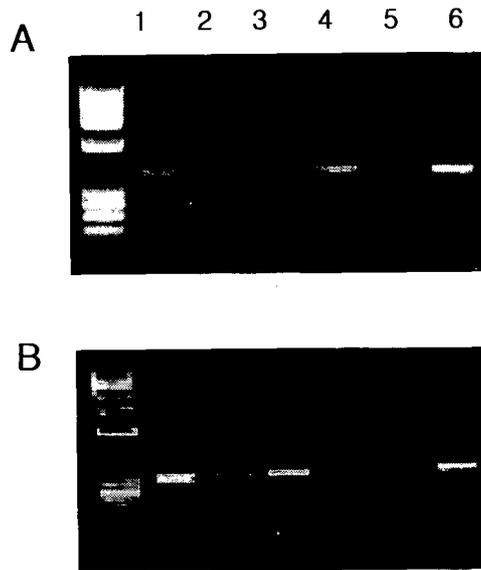


Fig.19. Detection of TGF- $\beta$ 1 mRNA by RT-PCR. Appropriate samples were prepared from mice administered with Bifidobacterium alone or encapsulated Bifidobacterium. A) mRNA level of TGF- $\beta$ 1. B) mRNA level of  $\beta$ -actin. Lane 1: control (PP), Lane 2: Bifidobacterium alone (PP), Lane 3: encapsulated Bifidobacterium (PP), Lane 4: control (MLN), Lane 5: Bifidobacterium alone (MLN), Lane 6: encapsulated Bifidobacterium (MLN)

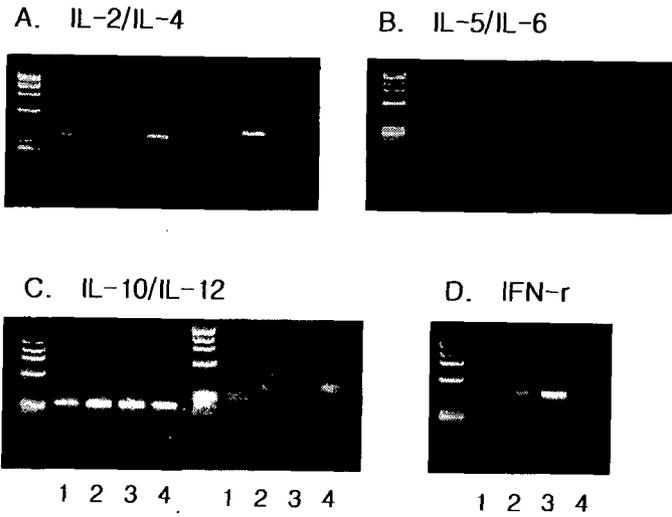


Fig.20. Detection of mRNA of various cytokines by RT-PCR. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with LPS, ConA or *B. bifidum* for 2 days. Lane 1, spleen cells only; Lane 2, spleen cells + LPS; Lane 3, spleen cells + ConA; Lane 4, spleen cells+ *B. bifidum*.

그리고 IL-10의 경우 LPS와 비슷한 수준으로 mRNA가 발현되었다. 또한 IFN- $\gamma$ 과 IL-12는 그 정도는 약하지만 *B. bifidum*에 의해 유도되었다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 T helper cell과 macrophage를 활성화시킬 수 있으며 cytokine 발현 조절에 참여할 수 있음을 보여준다. 앞으로 좀더 구체적으로 이러한 cytokine이 항체 합성에 미치는 영향을 조사할 필요성이 있을 것이다.

## 제 4 절 적 요

*B. bifidum*은 장내에서 유익한 세균으로 잘 알려져 있다. *B. bifidum*을 비롯한 유산균이 면역기능을 향상시킨다는 추정되고 있지만 아직까지 장내 점막면역에 미치는 구체적인 기능에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 *B. bifidum*의 면역활성 기능을 구체적으로 조사하였다. *B. bifidum*는 spleen B cell의 항체 합성수를 증가시켜 전체 항체합성을 비특이적으로 증가시켰다. 또한 B cell을 활성화시켜 cytokine (TGF- $\beta$ 1과 IL-5)에 의한 IgA 합성을 항진시켰다. 이러한 기능은 B cell의 polyclonal activator인 LPS의 작용과 유사하였다. *B. bifidum*은 장내 면역 조직에 존재하는 mesenteric lymph node (MLN) B cell의 IgA 합성도 증가시켰다. *B. bifidum*을 경구 투여하였을 때 spleen B cell이나 Peyer's patch (PP) B cell의 경우는 변화가 없었으나 MLN에서는 IgA 합성세포수가 의미있게 증가하였다. 이와 같은 결과는 *B. bifidum*이 경구 투여되었을 때 PP보다는 MLN B cell의 IgA 항체 합성을 자극하여 점막조직의 방어에 기여함을 시사하며, 장내 감염에 대한 IgA 항체의 중요성을 생각할 때 매우 중요하다고 평가된다. 본 연구에서는 이러한 *B. bifidum*의 자극효과는 *B. bifidum*의 세포막이나 세포벽 성분임을 밝혔다. 한편 이러한 *B. bifidum*의 경구투여 효과는 초미세구 *B. bifidum*를 사용하였을 때 좀더 증가됨을 관찰하였다. 마지막으로 초미세구 *B. bifidum*는 MLN cell의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 수준을 증가시켰다. TGF- $\beta$ 1이 IgA 유도인자로 잘 알려진 바, 본 결과는 Bifidobacteria의 장내 점막 면역 활성화, 특히 IgA 항체 합성을 증가시키는 한가지 기작으로 이해된다.

## 제 5 절 참고문헌

1. Andre, C., Lambert, R., Bazin, H., and Heremans, J.F. 1974. Interference of oral immunization with the intestinal absorption of heterologous albumin. *Eur. J. Immunol.* 4:701
2. Beagley, K.W., Eldridge, J.H., Kiyono, H., Everson, M.P., Koopman, W.J., Honjo, T., and McGhee, J.R. 1988. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.* 141:2035-2042
3. Brandtzaeg, P., Sollid, L.M., Thrane, P.S., Kvale, D., Bjerke, K., Scott, H., Kett, K., and Rognum, T.O. 1988. Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut.* 29:1116-1130
4. Bullen, C.L., P.C. Terle, M.G. Stewart. 1977. The effect of "humanized" milks and supplemented breast feeding on the fecal flora of infants. *Br. Med. J.* 16, 403
5. Chabbarri, F.J., M. De Paz, and M. Nunez. 1988. Cryptoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. *Biotechnol. Lett.* 10, 11
6. Chandan, R.C. 1989. "Yogurt : Nutritional and Health properties", ed. National Yogurt Association, McLean, Virginia.
7. Coffman, R.L., Lebman, D.A., and Shrader, B. 1989. Transforming growth factor- $\beta$  specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp Med.* 170:1039-1044
8. Craig, S.W., and Cebra, J.J. 1971. Peyer's patches: An enriched source of precursors of IgA-producing immunocytes in the rat. *J. Exp Med.* 134:188-200
9. Czerkinsky, C.C., Nilsson, L., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkousky, A. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunol Methods.* 65:109.

10. De Aizpurua, H.J., and Russel-Jones, G.J. 1988. Identification of Classes of Proteins that Provoke an Immune Response upon Oral Feeding. *J. Exp Med.* 167:440-451
11. De Simone, R., R. Vesely, B. Negri, B.S. Salvadori, A. Zanzoglu, Cilli, and L. Lucci. 1987. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 9, 87-100
12. Duffy, L.C., M.A. Zielesny, T.M. Riepenhoff, D. Dryja, A.S. Sayahtheri, E. Griffiths, D. Ruffin, H. Barrett, J. Rossman, and P.L. Ogra. 1993. Effectiveness of *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection: dietary implications in formulars for newborns. *Endocrine Regulations.* 27, 223-229
13. Fernandes, C.F., Shahani, K.M. 1990. *J. Food. Prot.* 53:704-710
14. Gilliland, S.E. 1989. Acidophilus Milk Products: A Review of Potential Benefits to Consumers. *J. Dairy Sci.* 72:2483-2494
15. Harriman, G.R., Kumimoto, D.Y., Elliott, J.F., Paetkau, V., and Strober, W. 1988. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.* 140:3033-3039
16. Kagnoff, M.F. 1987. In physiology of the Gastrointestinal Track, and 2nd Ed. pp 1699-1728. Raven, New York.
17. Kehrl, J., Roberts, H.A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. 1986. Transforming growth factor  $\beta$  is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* 137:3855
18. Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. 1986. Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163:1037
19. Kim, P.H., and Kagnoff, M.F. 1990. Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a costimulator for IgA production. *J. Immunol.* 144(9):3411-3416
20. Klaver, F.A.M., and van der Meer, R. 1993. *Appl. Environ Microbiol.* 59:1120-1129
21. Leberman, D.A., Lee, F.K., and Coffman, R.L. 1988. The effects of

- IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine Peyer's patch B cell subpopulations. *J. Immunol.* 141:2050-2056
22. Leberman, D.A., Nomura, D.Y., Coffman, R.L., and Lee, F.D. 1990. Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor  $\beta$ -induced isotype switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3962
  23. Matsuoka, M., Yoshida, K., Usuda, S., and Sakano, H. 1990. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell.* 62:135
  24. McIntyre, T.M., Klinman, D.R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J.R., Mond, J.J., and Snapper, C.M. 1993. *J. Exp Med.* 177:1031
  25. Murray, P.D., McKenzie, D.T., Swain, S.L., and Kagnoff, M.F. 1987. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.* 139:2669.
  26. Nagaoka, M., S. Hashimoto, T. Watanabe, T. Yokokura, and Y. Mori. 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1012-1017.
  27. Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R., and Bienenstock, J. 1994. *Handbook of Mucosal Immunology.* ed. pp 373-390, 415-424. Academic Press, Inc.
  28. Owen, R.L., and Ermak, T.H. 1990. Structural specialization for antigen uptake and processing in the digestive track. *Spring Semin. Immunopathol.* 12:139
  29. Pestka, J.J. 1993. Food, diet and gastrointestinal immune function. In (Kinsella, J. ed. *Advances in Food and Nutrition Research.* Academic Press (in press))
  30. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. 1986. Transforming growth factor type  $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 83:4167

31. Sasaki, T., S. Fukami, and S. Namioka. 1994. Enhancement of cytotoxic activity of lymphocytes in Mice by oral administration of peptidoglycan (PG) derived from *Bifidobacterium thermophilus*. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 1129-1133.
32. Sekine, K., Ohta, J., Onishi, M., Tatsuki, T., Shimokawa, Y., Toida, T., Kawashima, T., and Hashimoto, Y. 1995. Analysis of Antitumor Properties of Effector Cells Stimulated with a Cell Wall Preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1):148-153
33. Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N., and Takatsu, K. 1989. Transforming growth factor  $\beta$  induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp Med.* 170:1415
34. Stokes, C.R., Newby, T.J., Huntley, D.P., and Bourne, F.J. 1979. The Immune response of mice to bacterial antigens given by mouth. *Immunology.* 38:497-502
35. Stokes, C.R., Soothill, J.F., and Turner, M.W. 1975. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature (London)* 255:745
36. Tahri K., Grill J.P., and Schneder, F. 1996. *Bifidobacteria* strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr Microbiol.* 33(3):187-193
37. Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T., and Yamamoto, Y. 1993. Immune Response of Mice to Orally Administered Lactic Acid Bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(9):1557-1560
38. Tissier. 1899. 2a reaction chromophile d'*Echerich* et le *Bacterium Coli*. *C. R. Soc Biol.* 51, 943
39. Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., and Nathan, C. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . *Nature (Lond.)*. 334:260
40. Yasui, H., and Ohwaki, M. 1991. Enhancement of Immune Response in Peyer's patch Cells Cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci.* 74:1187-1195

41. Yasui, H., Nagadka, N., Hayakawa, K. 1996, Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's patch cells with Bifidobacterium breve YIT 4064. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1(2):244-246

## 제 5 장 Bifidobacteria의 생체내 활성 연구

### 제 1 절 Bifidobacteria의 동정과 균주 확인을 위한 분자유전학적 방법의 연구 개발

#### 1. 서 론

Bifidobacteria는 건강을 증진시키고 예방치료적인 효과가 있는 유산균의 하나로서 발효유제품의 종균으로서 또는 생균제제로서 사용되고 있다 (Robin and Tamine, 1990; Fuller, 1992). 유가공회사와 종균회사에서 개발되어 많은 종류의 bifidobacteria 균주가 발효유와 같은 유제품에 사용되고 있다. 발효유의 생산에 중요한 특성인 젖산 생성능력 및 산소에 대한 내성이 우수한 균주, 내산성 및 내담증성이 강하여 유제품의 저장 중 활력을 유지할 수 있고 장내에서 생존력이 있는 균주, 대장세포에 흡착하여 정착할 수 있는 균주, 및 항암 및 항돌연변이, 콜레스테롤 흡수, 유당분해 및 병원균 억제와 같은 건강생리적으로 우수한 균주를 사람의 분과 장에서 선발하고자 하는 연구와 선발된 균주를 사람 또는 실험동물에 투여하여 분과 장에서의 생존 여부와 건강증진효과에 대하여 조사하는 연구가 계속되고 있다. 이러한 연구에서 많은 종류의 균주를 자연계에서 분리하여 동정하고 fingerprinting할 필요가 있으며 섭취된 균주를 다양한 세균들이 존재하는 장과 분에서 특이적으로 분별할 수 있는 방법이 필요하다.

Bifidobacteria의 일반적 동정은 당발효 능력에 따라 분류가 되고 있으나 사람으로부터 분리된 bifidobacteria의 당발효 능력에 의한 분류가 불완전하다고 보고되었다(Biviati 등, 1982; Roy와 Ward, 1990). DNA/DNA hybridization(Scardovi 등, 1971)와 효소의 전기영동 형태 (Biviati 등, 1982; Roy 등, 1994)을 이용하여 당발효 시험을 보완하여 균주 동정할 수 있었다.

분자유전학적 방법을 이용한 방법으로서 종 특이적인 DNA probe와

primer를 사용한 dot blot 방법과 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 유산균을 동정할 수 있다(Chareris 등, 1997). Yamamoto 등(1992)은 16S rRNA의 염기순서를 바탕으로 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, 및 *B. longum*에 대해 종 특이성 DNA probe를 이용하여 동정하였다. 또한 *Bifidobacterium* genus 특이성 16S rRNA probe를 개발되었다(Frothingham 등, 1993; Langendijk 등, 1995).

같은 종의 유산균 균주간의 분별과 분류는 생화학적 대사능력, 항생제 내성, phage 감수성, 항원-항체 반응을 근거로 하여 이루어졌다. 유산균의 전체 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하여 형성된 polypeptide들의 갯수와 분자량에 따라 종을 동정하거나 균주를 분류할 수 있다(Pot 등, 1993; Tsakalidou 등, 1992). 최근에는 전체 genome DNA의 제한효소 분석방법으로 유산균의 균주를 분별할 수 있었으며(최 등, 1995), *Sma*I과 같은 DNA 절단빈도가 낮은 제한효소로 분해된 genome DNA의 절편을 pulsed field gel electrophoresis를 사용하여 분리하여 DNA band의 유산균주간의 다형 현상을 분석하였다(Roy 등, 1996; Tanskanen 등, 1990). Random primer를 이용한 polymerase chain reaction에 의해 합성된 DNA band의 형태를 분석하는 방법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 유산균 균주를 분별할 수 있었다(Cancilla 등, 1992; 남 등, 1994; 최 등, 1997). 16S rRNA 및 23S rRNA probe를 이용한 restriction fragment length polymorphism(RFLP)인 ribotyping 방법과 M13 probe를 이용한 RFLP에 의해 유산균 종 또는 균주를 분별할 수 있다(Mangin 등, 1994; 최 등, 1997),

본 연구개발은 bifidobacteria 표준균주와 상업균주를 분류하는 방법으로서 ribotyping 및 PCR 방법으로 합성된 16S rDNA의 제한효소 절단형 분석 방법과, SDS-PAGE 방법에 의한 속과 종의 동정 방법을 개발하였으며 RAPD에 의한 균주 분별방법을 개발하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Bifidobacteria 균주의 분리

생명공학연구소 유전자은행(KCTC)와 미국 American Type Culture Collection(ATCC)에서 표준균주를 각각 15 균주와 2균주를 분양받았다 (Table 1). 5종의 상업용 bifidobacteria Bb-11, Bb-12L, Bb-12S, ABT-4, ABT-B, 및 SJ-1을 발효유 제조용 종균과 발효유 제품에서 분리하였다. 사람의 분으로부터 15종의 Bifidobacteria를 분리하였다.

Table 1. Type strains of bifidobacteria used in the study

Species	Strain	Synonym	Source
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	ATCC 15703	Intestine of adult
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3352	ATCC 15706	Intestine of adult
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3416	ATCC 15740	Intestine of adult
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3202	ATCC 29521	Stool of breast-fed infant
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3357	ATCC 35914	Human feces
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3418	ATCC 15696	Intestine of infant
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3476	ATCC 11863	<i>Lactobacillus bifidus</i> subsp. <i>pensylvanicum</i>
<i>B. breve</i>	KCTC 3220	ATCC 15700	Intestine of infant
<i>B. breve</i>	KCTC 3419	ATCC 15701	Intestine of infant
<i>B. breve</i>	KCTC 3461	ATCC 15698	Intestine of infant
<i>B. infantis</i>	KCTC 3127	ATCC 25962	Intestine of infant
<i>B. infantis</i>	KCTC 3249	ATCC 15697	Intestine of infant
<i>B. infantis</i>	KCTC 3270	ATCC 15697	Intestine of infant
<i>B. infantis</i>	KCTC 3368	ATCC 27920	Intestine of infant
<i>B. infantis</i>	KCTC 3460	ATCC 15702	Intestine of infant
<i>B. longum</i>	KCTC 3466	DSM 20097	Calf feces
<i>B. longum</i>	ATCC 15707		Intestine of adult
<i>B. longum</i>	ATCC 15708		Intestine of infant

#### 나. Bifidobacteria 상업용 균주와 야생균주의 분리

발효유 제조용 상업용 종균과 발효유로부터 bifidobacteria를 분리하기 위하여 Lactobacilli MRS agar(Difco)에 NPNL(nalidixic acid, 15 $\mu$ g/ml; paromomycin sulphate, 125 $\mu$ g/ml; neomycin sulphate 10 $\mu$ g/ml; lithium

chloride 300 $\mu$ g/ml)을 첨가한 선택배지를 사용하였다. 사람의 분으로부터 bifidobacteria를 분리하기 위하여 BSI agar와 Beeren's agar를 사용하였다. 배양된 colony를 그람염색하여 현미경 관찰하여 그람양성의 Y, V자형의 간균인 colony를 TPY agar(Biviati 등, 1991)에 접종하여 순수한 colony을 얻어 실험에 사용하였다.

#### 다. Bifidobacteria의 배양 및 보관

Bifidobacteria 균주들을 배양하기 위하여 TPY broth를 배지로서 사용하였으며 anaerobic catalyst(Difco)를 장치한 anaerobic jar(Difco)를 진공펌프로 탈기한 후에 90% H<sub>2</sub>와 10% CO<sub>2</sub>를 함유하는 개스를 주입하였으며 anaerobic indicator strip(Difco)의 탈색을 확인하여 혐기성 상태에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. 균주들의 장기간 보관을 위하여 10% glycerol을 첨가한 탈지유에 분산하여 -70 $^{\circ}$ C에서 동결보존하였다.

#### 라. DNA의 분리

Bifidobacteria 균주로부터 Versalovic 등(1991)의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하였다. TPY broth에서 24시간 혐기성 배양한 후 7,000rpm에서 10분간 원심분리하여 bifidobacteria를 침전시켰다. 1ml의 1M NaCl용액으로 한차례 세척하고 50mM TE 용액(50mM Tris, 50mM EDTA, pH 7.8)으로 두차례 유산균을 세척한 후 0.45ml의 10mM TE용액(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.8)에 분산시키고 25 $\mu$ l의 mutanolysin(5,000 unit/ml 10mM TE 용액)와 25 $\mu$ l의 RNase A(6mg/ml 10mM Tris, 15mM NaCl, pH 7.8)을 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 30 $\mu$ l의 SDS(10%)와 30 $\mu$ l의 proteinase K (10mg/ml, 10mM TE 용액)을 가하고 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. Phenol(0.4ml)을 가하고 섞은 후 소형원심분리기에서 1분간 원심분리하였다. 상부의 수용액층을 다른 튜브에 옮기고 phenol으로 추출을 반복하였으며 chloroform(0.4ml)으로 2회 추출하였다. 수용액 층에 10mM TE 용액을 가하여 0.4ml으로 만든 후 40 $\mu$ l의 3M sodium acetate(pH 5.2)를 가하고 0.8ml의 냉각된 ethanol을 가하고 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 유지하였다. 용액을 2분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전된 DNA를 냉각된

70% ethanol으로 세척하고 적당한 양의 10mM TE 용액으로 용해하였다. DNA 용액을 앞에 방법에 따라 반복하여 RNase A 및 proteinase K와 SDS로 처리하고 phenol과 chloroform으로 추출하였고 다시 3M sodium acetate(pH 5.2)와 ethanol로 침전하여 DNA를 정제하였다.

#### 마. PCR에 의한 bifidobacteria 16S rDNA probe의 합성

PCR 증폭을 위한 20 $\mu$ l PCR 반응액은 PCR PreMix(50mM Tris-HCl: pH 8.3, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP, 1U Taq polymerase) (Bioneer)에 2 $\mu$ l의 primer(각각 25  $\mu$ M), 1 $\mu$ l의 bifidobacteria DNA(20ng), 17 $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O를 가하여 PCR 반응을 하였다. 반응은 Perkin-Elmer thermal cycler을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분, 30cycles 증폭하였다. 순상 primer는 bifidobacteria의 16S rRNA의 9bp에서 31bp까지의 염기서열에 해당하는 5'-GGTTCGATTCTGGCTCAGGATG-3' 염기서열의 oligonucleotide이고 역상 primer는 1351bp에서 1372bp까지의 역상 염기서열에 해당하는 5'-TACAAGGCCCGGAACGCATTC-3'의 염기서열의 oligonucleotide이었다(Leblond-Bourget 등, 1996). PCR에 의해 합성되는 DNA의 길이는 1364bp이었다. Digoxigenin으로 labeling된 16S rDNA probe를 제조하기 위하여 200 $\mu$ M의 dTTP 대신에 130 $\mu$ M의 dTTP와 70  $\mu$ M digoxigenin-11-dUTP(Boehringer Mannheim)을 첨가하였다.

#### 바. Southern blot

*EcoRI* 제한효소 분해를 위한 20 $\mu$ l의 반응액은 일정량의 증류수에 1 $\mu$ g의 bifidobacteria DNA, 10unit의 *EcoRI* 제한효소(Promega), 2 $\mu$ l의 10 $\times$  reaction buffer를 가하여 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시켰다. 반응액을 1% agarose gel과 1 $\times$ TAE 용액(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)을 사용하여 30V에서 24시간 동안 전기영동하였다. DNA marker로서  $\lambda$  *HindIII/EcoRI*(Promega)를 사용하였다. 전기영동된 agarose gel을 depurination, denaturation, 및 neutralization 처리하였다 (Sambrook 등, 1989). 처리된 gel을 positively-charged nylon membrane(Boehringer Mannheim)에 진공펌프(Hoeffler)를 이용하여 blotting 한 후 UV

crosslinker(UVP)에서 DNA를 nylon membrane에 고정시켰다. Nylon membrane상의 DNA와 digoxigenin-labeled 16S rDNA probe와의 hybridization을 위하여 prehybridization용액(50% formamide, 5×SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 2% blocking reagent(Boehringer Mannheim)에서 42℃에서 2시간 반응한 후 prehybridization 용액에 200 $\mu$ l의 digoxigenin-labeled 16S rDNA 용액을 넣은 42℃에서 24시간 hybridization 하였다. 0.1% SDS를 함유한 2×SSC용액에 넣어 상온에서 15분간 2회 세척하였다. 세척된 nylon membrane을 DIG luminescent detection kit(Boehringer Mannheim)을 사용하여 처리한 후 X-ray film(AGFA Curix RP-1)에 노출하였다.

#### 사. PCR에 의해 증폭된 16S rDNA의 제한효소 절단형

PCR 증폭을 위한 20 $\mu$ l PCR 반응액은 PCR PreMix(50mM Tris-HCl; pH8.3, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP, 1U Taq polymerase; Bioneer)에 2 $\mu$ l의 각각 forward primer(5'-10-GGTTTCGATTCTGGCTCAGGATG-31-3')(25 $\mu$ M)와 reverse primer (5'-1376-TACAAGGCCCGGAACGCATTC-1355-3')(25 $\mu$ M), 1 $\mu$ l의 Template DNA(20ng), 17 $\mu$ l의 H<sub>2</sub>O를 가하여 PCR 반응을 하였다. 반응은 Per kin-Elmer thermal cycler을 이용하여 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분, 30cycles 증폭하였다.

PCR로 합성된 16S rDNA를 제한효소 *Rsa*I, *Hha*I, *Alu*I, *Hae*III, *Mbo*I, *Dde*I로 분해하였다. 제한효소로 분해된 PCR 산물을 2.5% agarose gel (Nusieve : agarose = 3 : 1)와 1×TAE buffer를 사용하여 전기영동 하였다. DNA 염색은 0.5 $\mu$ g의 ethidium bromide로 하였다.

#### 아. RAPD

OPB-07(Operon)을 random primer로 사용하여 PCR로 DNA를 합성하였으며 agarose gel 전기영동 하였다. PCR 증폭을 위한 20 $\mu$ l PCR 반응액은 PCR PreMix(50mM Tris-HCl; pH 8.3, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ M dNTP, 1U Taq polymerase) (Bioneer)에 1.5 $\mu$ l의 20mM MgCl<sub>2</sub>(1.5mM), 1 $\mu$ l의 OPB-07 primer(1  $\mu$ M)(Operon), 1 $\mu$ l의 Template DNA(20ng) 및 16.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O를 가하

여 PCR 반응을 하였다. 반응은 Perkin-Elmer thermal cycler을 이용하여 94℃에서 1분 37℃에서 1분 72℃에서 1분으로 35cycles 증폭하였다. 전기영동은 1.5% agarose gel, 0.5×TBE buffer, 70V에서 4시간 전기영동 하였다. DNA 염색은 ethidium bromide으로 하였다.

#### 자. SDS-PAGE

Glucose 대신에 lactose를 함유한 TPY broth에서 37℃에서 24시간 배양한 bifidobacteria를 원심분리하여 2회 증류수로 세척한 후에 동결건조하였다. 25mg의 동결건조된 균체를 10ml의 증류수에 분산시킨 후에 Vibra Cell-VCX 600(Sonics and Materials Inc.)을 사용하여 37% amplitude에서 5초 작동과 5초 정지의 cycle로 30분간 sonication하였다. Sonication 하는 동안에 세균분산액을 얼음물로 냉각시켰다. 일정량의 분해된 세균분산액을 SDS-PAGE의 sample buffer에 분산시킨 후 100℃에서 5분간 가열하였다. 13% polyacrylamide gel을 separating gel로 사용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 단백질을 silver staining(Pharmacia)하였다. 표준 분자량 단백질을 bovine serum albumin(66,000), egg albumin(45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), carbonic anhydrase(29,000), trypsin inhibitor(20,100) 및 α-lactalbumin(14,200)을 사용하였다 (괄호 안은 분자량).

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. Ribotyping 방법에 의한 bifidobacteria 균주의 동정 방법 개발

*Bifidobacterium*의 16S rRNA의 1364bp의 길이의 염기서열을 가진 digoxigenin-labeled probe를 PCR을 이용하여 합성하여 ribotyping 분석을 하였다. *EcoRI* 제한효소에 의해 분해된 bifidobacteria의 genomic DNA를 agarose 전기영동한 후에 nylon membrane에 blot하여 고정된 DNA에 digoxigenin-labeled 16S rDNA probe로 hybridize하여 검출된 nucleotide band의 pattern을 균주간에 비교하였다 (Fig. 1; Table 2).

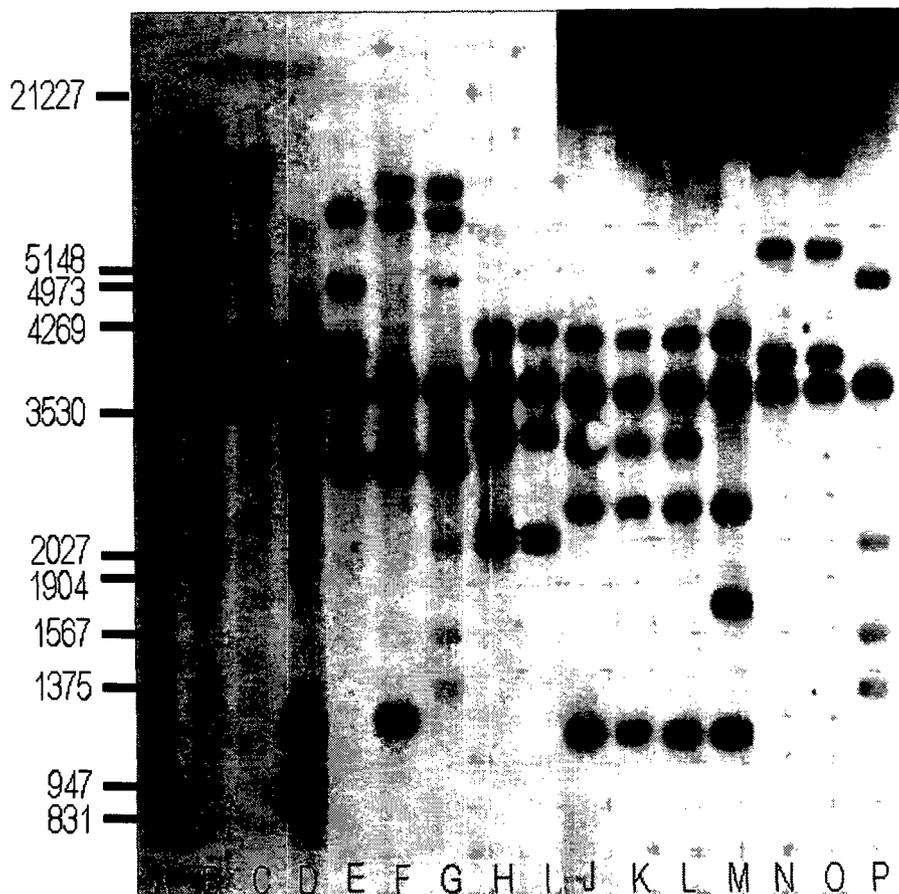


Fig. 1. Chemiluminescence detection of *Eco*RI-digested DNA from *Bifidobacterium* strains hybridized with digoxigenin-labeled 16S ribosomal DNA probe amplified in PCR. A, *B. bifidum* KCTC 3418; B, *B. bifidum* KCTC 3357; C, *B. bifidum* KCTC 3476; D, *B. longum* KCTC 3466; E, *B. adolescentis* KCTC 3416; F, *B. adolescentis* KCTC 3216; G, *B. adolescentis* KCTC 3352; H, *B. breve* KCTC 3461; I, *B. breve* KCTC 3220; J, *B. infantis* KCTC 3270; K, *B. infantis* KCTC 3460; L, *B. infantis*

KCTC 3368; M. *B. infantis* KCTC 3127; N, *Bifidobacterium* spp. Bb-11; O, *Bifidobacterium* spp. Bb-12L; P, *Bifidobacterium* spp. Bb-12S. The numbers at left indicate the base pair of the nucleotides in  $\lambda$ HindIII/EcoRI marker.

Table 2. The nucleotides detected by hybridization of *Eco*RI-digested DNA from *Bifidobacterium* strains probed with digoxigenin-labeled 16S ribosomal DNA amplified with PCR.

Species	Strain	Length of nucleotide (base pair)					
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	8,500	6,600	3,700	2,900	1,250	
	KCTC 3352	8,500	6,600	3,700	2,900		
	KCTC 3416	6,600	5,100	3,900	3,700	2,900	
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3202	9,700	5,600	3,900	3,700		
	KCTC 3357	9,700	4,000	3,700			
	KCTC 3418	9,700	5,600	3,900	3,700		
<i>B. breve</i>	KCTC 3220	4,200	3,700	3,200	2,200		
	KCTC 3461	4,200	3,700	3,200	2,200		
<i>B. infantis</i>	KCTC 3127	4,200	3,700	2,400	1,800	1,250	
	KCTC 3270	4,200	3,700	3,100	2,400	1,250	
	KCTC 3368	4,200	3,700	3,100	2,400	1,250	
	KCTC 3460	4,200	3,700	3,100	2,400	1,250	
<i>B. longum</i>	KCTC 3466	4,100	3,700	3,500	3,400	1,200	900
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bb-11	9,700	6,600	3,900	3,700		
	Bb-12L	9,700	6,600	3,900	3,700		
	Bb-12S	5,200	3,700	3,200	2,200	1,600	1,450

이 연구에서 연구한 모든 *Bifidobacterium*에서 공통적으로 있는 band는 3,700bp이었으며 이외에 *B. adolescentis*의 공통 band는 6,600bp와 2,900bp이었으며 *B. bifidum* 3 균주의 공통 band는 9,700bp 이었으며 *B. breve*의 공통 band는 4,200bp, 3,700bp와 2,200bp이었으며 *B. infantis*의 공통 band는 4,200bp, 2,400bp, 및 1,250bp이었다. *B. infantis*와 *B. longum*은 4,200bp의 band가 공통이었다. *B. longum*은 KCTC 3466 균주만을 실험하였기 때문에 공통 band를 결정할 수 없었으며 3,700bp의 band외에 다른 종과 공통 band가 없었다.

상업균주 Bb-11과 Bb-12L은 *B. bifidum* KCTC 3418과 *B. bifidum* KCTC 3357과 동일한 band 형태를 가지고 있어 *B. bifidum*으로 동정할 수 있었다. Bb-12S는 *Bifidobacterium*의 공통인 3,700bp의 band를 가지고 있었으나 다른 종과 공통의 band가 없었다.

본 연구에서는 *B. bifidum* KCTC 3357의 genomic DNA를 template DNA로 하여 16S rDNA를 PCR에 의해 증폭하여 합성된 digoxigenin-labeled probe를 ribotyping에 사용하였다. 이 연구에서 사용한 probe의 염기서열이 모든 *Bifidobacterium*의 16S rRNA의 염기서열과 거의 일치하는 장점이 있다. 또한 *Bifidobacterium* genus에 대해 특이적인 band를 찾을 수가 있었으며 종에 대해 특이적인 band도 발견할 수 있었다. Ribotyping은 적절한 probe와 제한효소를 사용하면 속과 종을 동정하기 위하여 사용하기에 적절한 방법이였다.

#### 나. PCR 합성된 16S rDNA의 제한효소 절단형을 이용한 bifidobacteria의 동정 방법 개발 및 응용

PCR에 사용된 primer의 16S rDNA내에서의 염기서열로 계산된 DNA의 크기는 1367bp이었으며 실제로 합성된 DNA의 전기영동에서의 크기는 약 1400bp이었다. 모든 bifidobacteria 균주들로부터 합성된 DNA의 길이는 유사하였다(Fig. 2).

PCR로 합성된 16S rDNA를 제한효소 *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MboI*과 *RsaI*으로 분해하여 형성된 DNA 절편들의 길이(bp)를 전기영동으로 조사하였다

(Fig. 2). *HaeIII*와 *MboI*은 각각 6종류의 제한효소 절단형이 bifidobacteria 균주들에 있었다. *HaeIII*의 경우 A, B, C, 및 D는 표준균주에서 발견되었으며 E와 F는 각각 상업용 균주와 야생균주에서 볼 수 있었다. *MboI*의 경우 모든 제한효소 절단형이 표준균주에서 발견되었다.

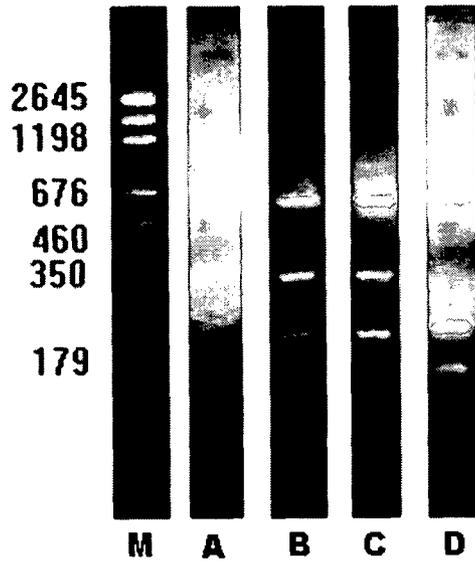
*MboI*의 제한효소 절단형 D에서 380bp, 190bp, 및 100 bp의 길이를 갖는 DNA 절편들은 강도가 약하였으며 절편 길이들의 총합이 1400bp을 초과하였다. 그러나 대부분의 제한효소 절단형에서 총합이 1400bp 미만이었으며 이는 100bp 보다 더 작은 DNA 절편이 형성되거나 DNA 절편의 크기가 유사하여 전기영동에서 분리할 수 없었기 때문이라고 생각된다.

각 제한효소 절단형의 알파벳 명명은 해당되는 bifidobacteria의 알파벳 순서와 균주번호 순에 따라 결정하였다(Table 3, 4). Bifidobacteria의 각 종들은 다른 종에는 없는 공통의 제한효소 절단형을 가지고 있었다. 각 종들의 고유의 절단형으로서 *B. adolescentis*는 *AluI*와 *MboI*에서 A 절단형이 있으며 *B. bifidum*은 *HaeIII*와 *HhaI*에서 C 절단형, *B. breve*는 *AluI*에서 D 절단형과 *MboI*에서 C와 D 절단형, *B. infantis*는 *MboI*에서 E와 F 절단형이 각 종들의 고유 제한효소 절단형이었다. *HaeIII*와 *MboI*의 각 A와 B 절단형을 모두 사용하여야 다른 종들로부터 분별할 수 있었다.

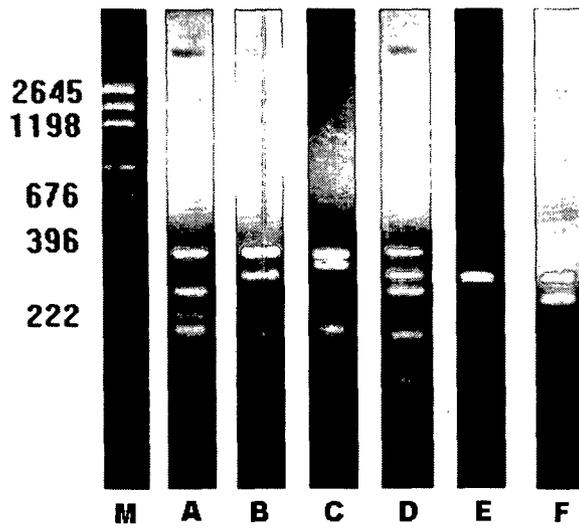
**Uncut**



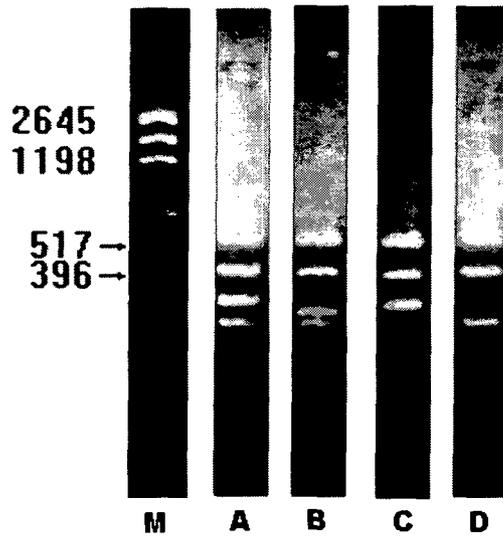
**AluI**



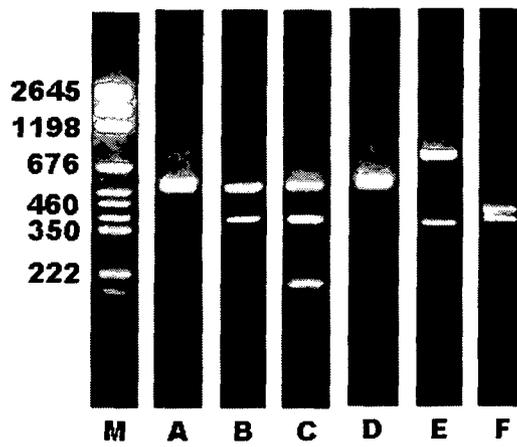
**HaeIII**



**HhaI**



**MboI**



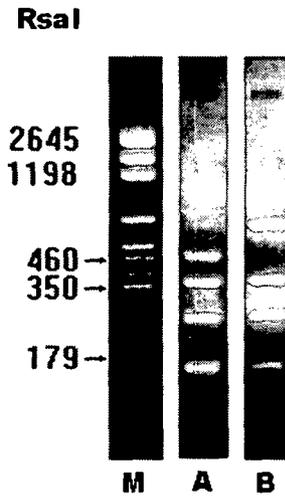


Fig.2. Restriction pattern of PCR-amplified 16S rDNA of bifidobacteria M : pGEM marker, A, B, C, D, E, and F : Restriction pattern (Table 3)

Table 3. DNA fragment size and restriction pattern of PCR-amplified 16s rDNA digested with restriction endonuclease

Restriction Endonuclease	DNA fragment size (bp)					Restriction pattern	
<i>AclI</i>	870	340				A	
	610	340	220	110		B	
	610	340	220	150	110	C	
	610	220	160	150	110	D	
<i>HaeIII</i>	330	230	190	160	80	A	
	330	260	160	90	80	B	
	330	300	165	160	80	C	
	330	260	230	160	90	80	D
	290	285	210	160		E	
	330	260	200	160	80	F	
<i>HhaI</i>	480	370	290	260		A	
	480	370	270	260		B	
	480	370	290			C	
	480	370	260	160	130	D	
<i>MboI</i>	590	540				A	
	570	400	100	80		B	
	540	380	190	100		C	
	590	540	380	190	100	D	
	900	370				E	
	420	380	190	120	90	F	
<i>RsaI</i>	470	370	250	155	150	A	
	640	370	250	150		B	

Table 4. Classification of restriction pattern of PCR-amplified 16S rDNA from the type culture of *Bifidobacterium*

Strains		<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	A	A	A	A	A
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3352	A	B	B	A	A
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3416	A	B	A	A	A
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3202	B	C	C	B	A
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3357	B	C	C	B	A
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3418	C	C	C	B	A
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3476	C	C	C	B	A
<i>B. breve</i>	KCTC 3220	D	A	A	C	A
<i>B. breve</i>	KCTC 3416	D	A	D	D	A
<i>B. breve</i>	KCTC 3419	D	A	A	C	A
<i>B. infantis</i>	KCTC 3127	C	D	A	E	A
<i>B. infantis</i>	KCTC 3249	C	A	A	F	B
<i>B. infantis</i>	KCTC 3270	C	A	A	F	B
<i>B. infantis</i>	KCTC 3368	C	A	A	F	B
<i>B. infantis</i>	KCTC 3460	C	A	A	F	B
<i>B. longum</i>	KCTC 3466	C	A	A	B	B
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	C	A	A	B	B
<i>B. longum</i>	ATCC 15708	C	A	A	B	B

제한효소 절단형을 이용하여 상업용 균주들과(Table 5) 사람의 분에서 분리한 야생균주들의(Table 6) 동정에 응용하였다. *Bifidobacterium* Bb-11과 Bb-12L은 *B. bifidum*과 같은 제한효소 절단형을 가져 *B. bifidum*으로 동정되었으며 *Bifidobacterium* Bb-12S, ABT4, ABTB, SJ-1은 5 제한효소에서 동일한 제한효소 절단형을 보였으며 이는 표준균주에서 볼 수 없었기 때문에 동정할 수 없었다. BSI agar에서 분리된 K-2, K-4, K-5, K-7 및 K-10과 Beeren's agar에서 분리된 K-C는 *B. bifidum*으로 동정되었으며 Beeren's agar에서 분리된 K-A, K-B, K-E, K-H, 및 K-J는 *B. adolescentis*로 동정되었다. K-3, K-C, 및 K-I는 동일한 제한효소 절단형을 가지고 있으나 표준균주에서 볼 수 없는 절단형이어서 동정할 수 없었다.

PCR를 증폭된 16S rDNA의 제한효소 절단형은 bifidobacteria의 동정에 효율적으로 사용할 수 있었으며 더 많은 종을 동정하기 위하여 표준균주들의 16S rDNA 제한효소 절단형을 확대하여 조사할 필요가 있다.

Table 5. Identification of commercial culture of *Bifidobacterium* based on restriction pattern of PCR-amplified 16S rDNA

Culture name	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	Identification
Bb-11	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
Bb-12L	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
Bb-12S	A	E	A	C	B	Not identified
ABT4	A	E	A	C	B	Not identified
ABTB	A	E	A	C	B	Not identified
SJ-1	A	E	A	C	B	Not identified

Table 6. Identification of wild strain of *Bifidobacterium* isolated from human stool based on restriction patterns of PCR-amplified 16S rDNA

Selective agar	Culture name	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaIII</i>	Identification
BSI agar	K-2	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
	K-3	C	F	A	D	B	Not identified
	K-4	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
	K-5	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
	K-7	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
	K-10	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
Beeren's agar	K-A	A	A	A	A	A	<i>B. adolescentis</i>
	K-B	A	A	A	A	A	<i>B. adolescentis</i>
	K-C	C	C	C	B	A	<i>B. bifidum</i>
	K-E	A	A	A	A	A	<i>B. adolescentis</i>
	K-G	C	F	A	D	B	Not identified
	K-H	A	A	A	A	A	<i>B. adolescentis</i>
	K-I	C	F	A	D	B	Not identified
	K-J	A	A	A	A	A	<i>B. adolescentis</i>

다. SDS-PAGE를 이용한 bifidobacteria의 균주 동정

*Bifidobacterium* 균주들을 TPY 배지에서 배양한 cell을 증류수에 분산한 후 sonicate하여 SDS-PAGE하여 조사하였다(Fig 3). *B. bifidum* KCTC 3418과 *B. bifidum* 3357은 78,000, 69,000, 63,000, 60,000, 56,000, 54,000, 50,000, 47,000, 45,000, 21,000, 및 20,000의 분자량의 대부분의

polypeptide를 공통으로 가지고 있으며 *B. adolescentis* KCTC 3416과 KCTC 3216은 786,000, 62,000, 61,000, 20,000, 및 14,000 분자량의 공통 polypeptide를 가지고 있었으며 *B. breve* KCTC 3461과 *B. breve* KCTC 3419는 polypeptide band의 형태가 유사하였으며 *B. breve* KCTC 3220은 다른 *B. breve* 두 균주와 분자량이 29,000인 polypeptide의 형태는 유사하였으나 저 분자량의 polypeptide에서 차이를 보였다. *B. infantis* KCTC 3249와 *B. infantis* KCTC 3460은 매우 유사한 polypeptide band 형태를 보였다.

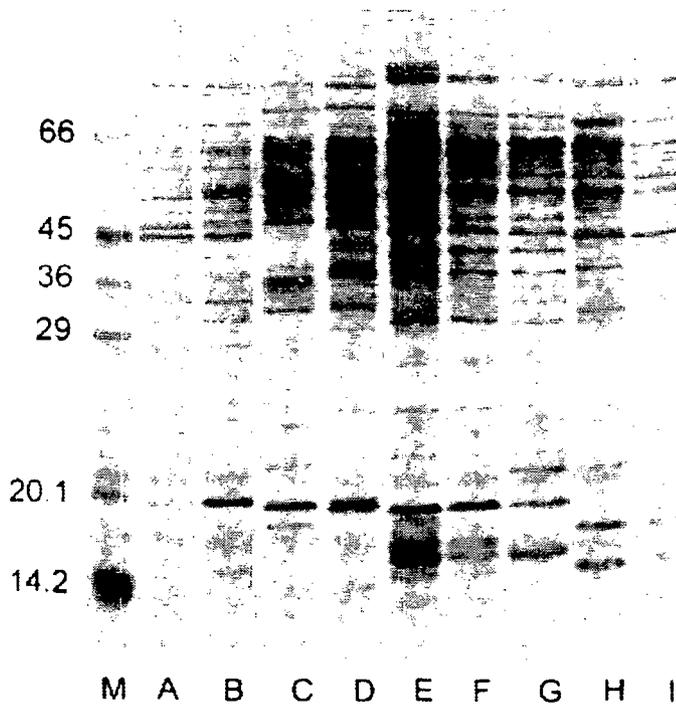


Fig.3. SDS-PAGE of cell proteins of bifidobacteria. S. Molecular marker; A. *B. bifidum* KCTC 3418; B. *B. bifidum* KCTC 3357; C. *B. adolescentis* KCTC 3416; D. *B. adolescentis* KCTC 3216; E. *B. breve* KCTC 3461; F. *B. breve* KCTC 3419; G. *B. breve* KCTC 3220; H. *B. infantis* KCTC 3249; I. *B. infantis* KCTC 3460.

Tsakalidou 등(1992)은 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 cell 단백질을 SDS-PAGE으로 분리하여 조사한 결과 두 유산균간에 뚜렷한 차이가 있었으며 종내 계통간에는 매우 유사한 polypeptide 형태를 보였다. *Leuconostoc mesenteroides*의 전체 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과 다른 종과 분별할 수 있었으나 *L. mesenteroides*의 3개 subspecies간에는 분별할 수 없었다. 본 연구에서 bifidobacteria의 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 연구결과에서도 종 내에서는 유사하거나 동일한 polypeptide band 형태를 보여 종내 모든 균주간에 분별할 수는 없으나 종내 균주간에 공통적인 polypeptide를 가지고 있어 종간에 분별할 수 있었다.

라. RAPD에 의한 균주의 분별 방법 개발

*Bifidobacterium*의 genomic DNA를 random amplified DNA polymorphism(RAPD) 방법을 이용하여 조사하였다(Fig. 4). RAPD에 의해 증폭된 DNA band의 균주에 따라 3-14 개이었다. *B. bifidum* 3 균주는 750bp, 590bp, 및 300bp의 공통 band를 가지고 있었다. *B. breve* 3균주는 340bp의 공통 band를 가지고 있었으며 *B. infantis*는 340bp와 300bp의 공통 band를 가지고 있었다. *B. adolescentis*에는 공통 band가 없었다. *B. infantis* KCTC 3249와 *B. infantis* KCTC 3270은 band pattern이 동일하였으며 두 균주의 원천이 *B. infantis* ATCC 15697이기 때문에 같은 band pattern을 보일 수 있다. 그 외의 균주간에는 동일한 균주가 없었다

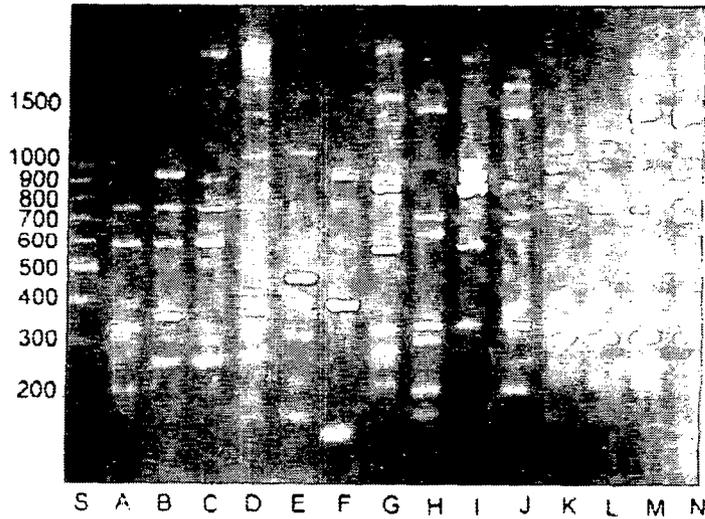


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of random-amplified DNA products of bifidobacteria. S. 100bp DNA ladder marker; A, *B. bifidum* KCTC 3418; B. *B. bifidum* KCTC 3357; C. *B. bifidum* KCTC 3476; D. *B. longum* KCTC 3466; E. *B. adolescentis* KCTC 3416; F. *B. adolescentis* KCTC 3216; G. *B. adolescentis* KCTC 3352; H. *B. breve* KCTC 3461; I. *B. breve* KCTC 3419; J. *B. breve* KCTC 3220; K. *B. infantis* KCTC 3249; L. *B. infantis* KCTC 3270; M. *B. infantis* KCTC 3460; N. *B. infantis* KCTC 3368.

RAPD는 7-10bp의 random primer를 사용하여 낮은 annealing 온도 또는 높은  $MgCl_2$  농도의 반응액을 사용하여서 stringency를 낮춘 조건에서 PCR을 하여 합성된 여러 개의 DNA band의 개수와 크기에 따라 개체간의 차이를 찾는 방법으로서 계통 및 개체를 민감하게 분별할 수 있는 fingerprinting 방법이다(Welsh와 McClelland, 1990). 남 등(1994)은 17-27 bp의 degenerated primer를 이용하여 28℃의 낮은 annealing 온도에서 PCR을 하여 합성된 DNA pattern으로 균주 간을 분별할 수 있었으며 돌연변이 균주도 분별이 가능하였으며 재현성이 우수하다고 보고하였다.

최 등(1997)은 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*와 *L. delbrueckii* subsp. *bulgraicus*의 균주간의 차이점을 발견할 수 있었으며 *L. acidophilus* 상업균주와 실험실 균주에서 동일한 band 형태를 한 균주를 찾을 수 있었다. Tyler 등(1997)은 RAPD가 실험실간 및 반응조건간에 재현성에 문제가 있고 종간의 연관도를 나타내지 못하는 단점이 있다고 설명하였다.

#### 4. 적 요

16S rDNA ribotyping, PCR로 합성된 16S rDNA의 제한효소절단형 및 세균 전체 단백질의 SDS-PAGE를 이용하여 bifidobacteria의 종간의 분류가 가능하였다. PCR로 합성된 16S rDNA를 *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MboI*, and *RsaIII*로 분해한 제한효소절단형을 이용하여 상업균주와 야생균주를 동정할 수 있었다. Bifidobacteria 균주간의 분별을 위하여 RAPD 또는 SDS-PAGE를 사용할 수 있다.

## 제 2 절 Bifidobacteria의 생리적 성질과 장상피세포 흡착 능력과 기작에 관한 연구

### 1. 서론

Bifidobacteria 생균제는 위와 소장에서의 생존하기 위하여 내산성, 내산소성 및 내담즙성이 좋아야하며 항균 작용과 콜레스테롤 흡수 능력, 장상피세포에 대한 흡착능력의 특성이 우수하여야 한다.

안 등(1997)은 발효유 제조에 적합한 한국인 유래 *Bifidobacterium* spp.의 선발을 위하여 내산성, 내산소성, 내담즙성 및 발효적 특성을 조사하였다. 박 등(1995)은 *Bifidobacterium* spp.의 성장에 대한 배지내 산소의 영향을 조사한 결과 균주 마다 산소에 대한 영향이 다르며 배지에 녹아있는 산소의 양으로는 bifidobacteria의 생존에 치명적인 손상을 주지 않는다고 하였다. 박 등(1996)은 생균제로서 이용하기 위해서 *Bifidobacterium breve*의 생존력에 대한 pH와 L-cystein HCl의 첨가효과에 대한 연구를 하였다.

Bernet 등(1993)은 bifidobacteria의 Caco2 cell에 대한 흡착함으로서 대장균, *Salmonella*, 및 *Yersinia*의 Caco2 cell에 대한 흡착과 침투를 억제하였다고 보고하였다. Perez 등(1998)은 bifidobacteria의 세포벽의 소수성 성질과 Caco2 cell에 대한 흡착 능력과 상관관계가 있고 *B. bifidum*이 세포벽 소수성과 Caco2 cell에 대한 흡착능력이 크다고 하였다. Crociani는 bifidobacteria의 Caco2 cell에 대한 흡착능력과 장내에서의 정착능력과 관계가 있음을 보고하였다.

본 연구는 bifidobacteria의 내산성, 내담즙성, 내산소성 및 Caco2 cell에 대한 흡착능력과 흡차기작을 조사하여 생균제를 개발하고자 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 균주

본 실험에서 사용한 균주는 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 분양 받은 14 표준균주(*B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*)와 ATCC에서 분양받은 *B. longum* 2 균주를 사용하였다. 상업균주 6 균주(ABTB, ABT4, Bb-11, Bb-12L, Bb-12S와 SJ-1)은 수입 종균과 국산 발효유에서 분리하였다. 그리고 한 명의 건강한 성인의 분변에서 분리한 15 균주를 야생균주로서 사용하였다. 표준 균주와 명단은 제1절의 Table 1 과 같다.

분변으로부터 bifidobacteria를 분리하기 위하여 BSI agar(Mitsuoka 등, 1965)와 Beerens' agar(Beerens, 1990; Beerens, 1991)를 이용하여 분리하였다(Silvi 등, 1996). 시판중인 발효유로부터 bifidobacteria를 분리하기 위하여 modified-NPNL 방법에 준하여 분리하였다(Teraguchi 등, 1978).

### 나. 내산성 실험

MacFarland nephelometer를 이용하여  $8 \times 10^3$  bacteria/ml가 되도록 희석하여 TPY broth에  $20 \mu\text{L}$ 씩(최종농도  $1.6 \times 10^7$ /ml) 접종하였다. 배양은 anaerobic jar안에서  $37^\circ\text{C}$ , 24시간 배양하였다. 대조구의 TPY broth의 pH는 6.5이고 실험구의 pH는 4.8이며 염산과 초산을 가하여 pH를 조절하였다. 대조구에서 성장한 배양액의 600nm에서의 흡광도에 대해 실험구에서 성장한 배양액의 흡광도의 백분율을 생장률로서 계산하였다.

### 다. 내담즙성 실험

내산성 실험과 같이 희석된 균주를 0.25% Oxgall를 첨가한 TPY broth에  $20 \mu\text{L}$ 씩(최종 세균수  $1.6 \times 10^7$ /ml) 접종하여 배양하였다. 대조구에서 성장한 배양액의 600nm에서의 흡광도에 대해 실험구에서 성장한 배양액의 흡광도의 백분율을 생장률로서 계산하였다.

#### 라. Bifidobacteria의 흡착능력

불활성화시킨 15% fetal bovine serum (HyClone), 100U/ml penicillin G, 100 $\mu$ g/ml streptomycin sulfate 및 0.25 $\mu$ g/ml의 amphotericin B로 제조된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 세포 접종일로부터 15일간 배양하여 분화말기의 세포를 흡착실험에 사용하였으며, 배지는 이틀에 한 번씩 교환해 주었다(Chauviere 등, 1992). 흡착된 세균은 그람염색을 하여 조사하였다.

#### 마. Bifidobacteria의 흡착 기작

##### 1) Cell extract와 culture supernatant의 제조

*B. bifidum* Bb-11를 TPY 배지에서 배양하여 원심분리하여 cell을 분리한 후 증류수로 세척하였다. 분산된 cell 분산액에 1M NaOH를 가하여 pH 11.5로 조절한 후 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 교반한 후 1M의 염산을 가하여 pH7로 조정된 후에 원심분리하여 상등액을 증류수에서 투석하였다. 투석된 상등액을 동결건조하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 culture supernatant는 Membrane filter로 저분자량의 물질을 제거하고 동결건조하였다.

##### 2) Antibody의 제조

0.5ml의 cell extract(1mg/ml) 또는 culture supernatant(5mg/ml)과 0.5ml complete adjuvant의 혼합균질액을 토끼에 주사하고 계속해서 2주마다 cell extract 또는 culture supernatant와 incomplete adjuvant 혼합액을 2회 주사하였다. 마지막으로 주사한 후 2주후에 채취하여 항혈청을 채취하였다. 항혈청에 sodium sulfate를 18%가 되게 가하여 IgG를 침전하여 분리한 후에 인산생리염수에 투석하였다.

##### 3) Caco2 cell 흡착 실험

*B. bifidum* K-7의 cell extract(1mg/ml)와 culture supernatant(5mg/ml)를 PBS에 용해한 후에 0.3ml의 용액에 2.7ml의 DMEM을 혼합한 후에 Caco2 cell에 가하였다. CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 반응시킨 후에 HBSS+0.1%

BSA로 3회 세척하였다. SDS-PAGE sample buffer 용액을 가하여 Caco2 cell 을 추출하였다.

#### 4) Immunoblot에 의한 흡착 단백질의 검출

흡착 실험에서 얻은 추출액을 SDS-PAGE 전기영동한 후에 nitrocellulose에 electroblot하였다. Nitrocellulose를 1% BSA 용액으로 1시간동안 처리한 후에 anti-cell extract 또는 anti-culture supernatant(1:1,000)(PBS-0.05% Tween 20)에서 1시간 반응하였다. PBS-0.05% Tween 20 용액으로 세척한 후에 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate(1:1,000)용액에서 1시간 반응한 후에 기질용액으로 발색하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. Bifidobacteria의 내산성 및 내담즙성 조사

TPY broth 배지에 염산과 초산을 가하여 pH를 4.8로 조정하여 배양한 후 배양액을 600nm에서의 흡광도를 측정하여 pH 6.5의 표준배지 배양액의 흡광도와 비교한 결과(Table 1) 14개의 표준균주 중에서 *B. infantis* 균주들이 내산성이 우수하게 나타났으며, *B. breve* KCTC 3419는 20% 수준을 나타내었다. 염산 처리에서만 내성을 갖는 표준균주로는 *B. bifidum* KCTC 3476, *B. bifidum* KCTC 3418, *B. adolescentis* KCTC 3352, *B. breve* KCTC 3461, *B. infantis* KCTC 3368이고 야생균주로는 *B. bifidum* 균주들인 K-3, K-4, K-5, K-10, K-C, 및 *Bifidobacterium* sp. K-I로 나타났다. 5개의 상업균주들은 염산과 초산 모두에서 20~40%의 성장률을 나타내었다. 야생균주들 중에서 K-7 균주는 염산과 초산 처리구에서 각각 75%와 83%로 나타나 산성에 대한 내성이 매우 우수하였다(Table 2).

Table 1. Acid tolerance and bile acid tolerance of type cultures and commercial cultures of bifidobacteria

Species	Strain	Acid tolerance (pH 4.8)		Bile tolerance (%)
		HCl (%)	Acetic acid (%)	
Type culture				
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3418	30.7 ± 4.5	8.2 ± 10.1	38.5 ± 9.2
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3357	5.4 ± 1.4	0.4 ± 0.6	37.5 ± 2.9
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3476	47.0 ± 6.2	9.7 ± 11.4	0.9 ± 1.3
<i>B. longum</i>	KCTC 3466	15.8 ± 0.2	40.8 ± 30.2	0.2 ± 0.2
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3416	0	0.8 ± 0.4	5.4 ± 0.9
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	18.3 ± 3.7	35.6 ± 11.6	23.6 ± 15.8
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3352	22.7 ± 2.9	17.6 ± 9.8	15.0 ± 11.6
<i>B. breve</i>	KCTC 3419	18.7 ± 3.1	29.0 ± 3.7	23.6 ± 4.8
<i>B. breve</i>	KCTC 3461	47.1 ± 4.1	29.1 ± 3.5	2.6 ± 0.3
<i>B. infantis</i>	KCTC 3249	4.1 ± 2.1	30.7 ± 9.8	15.6 ± 2.0
<i>B. infantis</i>	KCTC 3460	49.1 ± 2.6	32.6 ± 17.5	12.8 ± 1.1
<i>B. infantis</i>	KCTC 3270	34.5 ± 17.0	26.8 ± 12.1	22.0 ± 2.1
<i>B. infantis</i>	KCTC 3368	30.5 ± 6.7	32.9 ± 27.1	14.0 ± 13.4
Commercial culture				
<i>B. bifidum</i>	Bb-11	23.3 ± 1.4	43.6 ± 12.5	38.3 ± 6.5
<i>Bifidobacterium</i> sp.	ABT-B	21.4 ± 8.2	17.4 ± 18.5	19.6 ± 4.3
<i>Bifidobacterium</i> sp.	ABT-4	29.6 ± 0.3	31.1 ± 7.3	20.7 ± 6.4
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bb-12	23.5 ± 1.5	39.8 ± 10.4	33.6 ± 5.1
<i>Bifidobacterium</i> sp.	SJ-1	31.7 ± 4.5	32.9 ± 8.6	16.0 ± 0.8

Table 2. Acid tolerance and bile tolerance of wild cultures of bifidobacteria strains isolated from human stool

Species	Strain	Acid tolerance (pH4.8)		Bile tolerance (%)
		HCl (%)	Acetic acid (%)	
<i>B. bifidum</i>	K-2	17.7 ± 1.9	28.0 ± 3.3	49.2 ± 9.8
<i>B. bifidum</i>	K-4	17.5 ± 6.8	9.4 ± 2.1	27.0 ± 4.3
<i>B. bifidum</i>	K-5	15.8 ± 8.5	6.6 ± 3.2	33.7 ± 4.9
<i>B. bifidum</i>	K-7	74.7 ± 3.0	83.0 ± 2.4	58.1 ± 2.7
<i>B. bifidum</i>	K-10	22.2 ± 11.3	6.8 ± 0.3	33.8 ± 5.6
<i>B. bifidum</i>	K-C	18.6 ± 8.4	10.6 ± 1.4	76.1 ± 3.0
<i>B. adolescentis</i>	K-A	2.3 ± 3.2	15.0 ± 11.0	3.1 ± 1.2
<i>B. adolescentis</i>	K-B	5.8 ± 1.4	3.9 ± 0.5	13.5 ± 1.9
<i>B. adolescentis</i>	K-E	6.7 ± 6.1	21.2 ± 15.8	0.9 ± 0.2
<i>B. adolescentis</i>	K-F	0	12.6 ± 1.5	0.5 ± 0.7
<i>B. adolescentis</i>	K-H	5.4 ± 3.3	19.4 ± 1.7	1.8 ± 1.3
<i>B. adolescentis</i>	K-J	0.8 ± 1.1	10.6 ± 0.9	2.2 ± 0.2
<i>Bifidobacterium</i> sp.	K-3	9.5 ± 4.4	22.8 ± 8.1	10.9 ± 9.1
<i>Bifidobacterium</i> sp.	K-G	0	4.6 ± 0.6	20.9 ± 1.7
<i>Bifidobacterium</i> sp.	K-I	42.1 ± 0.9	19.6 ± 1.5	2.9 ± 1.1

0.25% Oxgall이 함유된 TPY broth배지에서 혐기배양 후 성장한 배양액을 600nm에서 흡광도를 측정된 결과 전반적으로 50% 이하의 성장률을 보여주고 있다(Table 1, Table 2). 그러나 그 중에서 야생균주인 *B. bifidum* K-C 균주는 내담즙성 능력이 54.14% 로 가장 우수했으며 *B. bifidum* 균주들인 K-2, K-7, K-10, K-5, K-8, 및 K-4 순으로 담즙산에 대한 내성을 나타내었다(Table 2). 표준균주 중 *B. bifidum* 균주는 3 균주 중에서 2 균주가 30%이상으로 다른 표준균주에 비해 내담즙성이 우수함을 보여주었다. 담즙에 대한 내성이 우수한 균주들은 표준균주 보다 상업균주들이 우수하며 상업균주 중 *B. bifidum* Bb-11은 평균 30%의 동일한 내성 효과를 나타

내고 있음을 볼 수 있다.

나. 대장상피세포(Caco2 cell)에 대한 흡착능력 검사

Caco2 cell에 대한 흡착능력이 우수한 균주로서 표준균주에서는 *B. bifidum*과 상업균주에서는 *B. bifidum* Bb-11과 *B. longum* SJ-1 균주이고 야생균주에서는 *B. bifidum* 균주들인 K-2, K-4, K-5, 및 K-C 균주로서 평균 100개의 세포당 262마리가 흡착되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 *B. bifidum* 균주들이 장상피세포에 잘 흡착되는 균주임을 확인할 수 있었다(Table 3).

Table 3. Adherence of bifidobacteria to Caco2 cell

	Species	Strain	Bacteria No./100cell
Type strains	<i>B. bifidum</i>	KCTC 3418	278
	<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	29
	<i>B. longum</i>	KCTC 3215	51
	<i>B. breve</i>	KCTC 3220	26
	<i>B. infantis</i>	KCTC 3249	68
Commercial strains	<i>B. bifidum</i>	Bb-11	213
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bb-12	73
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	ABT-B	4
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	ABT-4	18
Wild strains	<i>Bifidobacterium</i> sp.	SJ-1	102
	<i>B. bifidum</i>	K-2	324
	<i>B. bifidum</i>	K-4	334
	<i>B. bifidum</i>	K-5	151
	<i>B. bifidum</i>	K-C	238
	<i>B. adolescentis</i>	K-A	21
	<i>B. adolescentis</i>	K-B	37
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	K-3	40

다. 대장상피세포(Caco2 cell)에 대한 bifidobacteria의 흡착 기작

대장상피세포에 *B. bifidum*이 흡착할 때에 관여하는 *B. bifidum*의 세포 벽과 배양액 상등액(culture supernatant)에 존재하는 단백질을 조사하였다. 대장상피세포에 *B. bifidum* K-7의 세포추출물과 배양액상등액을 Caco2 cell에 반응시킨 후에 0.1% BSA 용액으로 Caco2 cell을 세척하여 흡착안된 cell extract와 culture supernatant의 단백질은 제거하였다. Cell extract와 culture supernatant로 처리된 Caco2 cell과 cell extract와 culture supernatant를 첨가하지 않고 처리한 대조구인 Caco2 cell을 SDS-PAGE의 sample buffer를 가하여 용출하였다. 용출된 Caco2 cell을 SDS-PAGE하여 단백질을 분리한 후 electroblot하여 nitrocellulose로 이전하였다. Nitrocellulose를 anti-cell extract IgG와 anti-culture supernatant IgG로 반응시킨 후 goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate와 기질용액을 이용하여 발색하였다(Fig. 1).

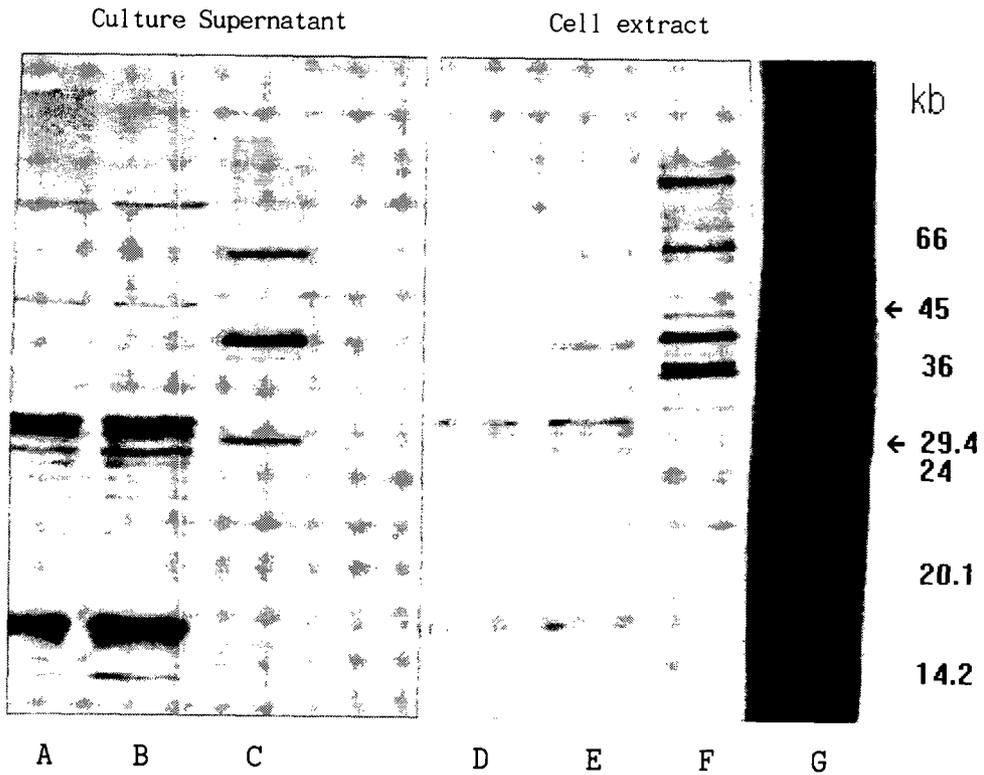


Fig. 1. Immunological blot of culture supernatant and cell extract from *B. bifidum* Bb-11 bound to Caco2 cell. A, B, and C: Detection with rabbit anti-culture supernatant rabbit IgG, D, E, and F: Detection with rabbit anti-cell extract IgG, A: Caco2 cell. without treatment, B: Caco2 cell treated with culture supernatant, C: Culture supernatant, D: Caco2, E: Caco2 cell treated with cell extract, F: Cell extract, G: Molecular weight marker

Cell extract 및 Culture supernatant로 처리한 Caco2 cell은 대조구 Caco2 cell에 비해 분자량이 40,000인 polypeptide band가 있었으며 이는 cell extract의 주요 polypeptide와 비슷한 분자량이었다. Cell extract가

culture supernatant 보다도 분자량이 40,000인 polypeptide가 강하게 나타났다. Antibody를 bifidobacteria의 cell extract와 culture supernatant을 면역주사하여 제조되었으나 Antibody가 Caco2 cell의 polypeptide에 반응하여 교차반응하는 antibody가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1. A, D).

이 연구 결과 *B. bifidum* Bb-11의 세포벽에 존재하는 분자량이 40,000인 *B. bifidum* Bb-11의 단백질이 Caco2 cell 흡착에 매개함을 보여주고 있다.

#### 4. 적 요

*B. infantis* 균주들이 내산성이 강하며 *B. bifidum*이 내담즙성이 높았으며 상업용 bifidobacteria 균주들은 내산성과 내담즙성이 높았다. *B. bifidum* 균주들이 모두 흡착성이 높았다. *B. bifidum* Bb-11의 분자량이 40,000인 세포벽 단백질이 세균의 Caco2 cell에 대한 흡착을 매개하는 것으로 추정되었다.

### 제 3 절 코팅처리된 초미세구 bifidobacteria의 생체 활성 연구

#### 1. 서론

Bifidobacteria를 비롯한 생균제는 장내의 세균총에 영향을 주어 병원균과 부패균의 성장을 억제하고 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추며, 항암효과와 면역증강효과가 있음이 알려지고 있다. Bifidobacteria의 이러한 효과는 균주에 따라 다르다(Benno와 Mitsuoka, 1992; Charteris 등, 1998).

Bifidobacteria는 사람의 위장과 소장을 통과하는 비율이 섭취된 세균수의 23.5%가 된다(Pochart 등, 1992). *B. longum*을 투여한 결과 장내 균총의 변화가 거의 없었으나 lecithinase 음성 clostridia와 *Bacteroids*의 대장내 세균수가 감소하고 분의 pH, 암모니아 및  $\beta$ -glucuronidase 활력이 감소하였다(Benno와 Mitsuoka, 1992). 반면에 *B. longum*으로 배양된 발효유를 사람에게 급여한 결과 분내 bifidobacteria 세균수는 증가하였으나 호기성균 및 혐기성균의 세균수 및 pH에는 차이가 없었다(Bartram 등, 1994). *B. breve* 6균주 중에서 한 균주로 발효된 유청배양여과액을 투여한 쥐와 사람의 분의 clostridia, bacilli 및 *B. fragilis*의 세균수와 분의 pH가 감소하였다(Romond 등, 1997; Romond 등, 1998).

발효유를 쥐 또는 곰에게 급여함으로써 혈청 cholesterol을 감소하였다는 연구 보고가 있다(Danielson 등, 1989; Grunewald, 1982; Rao 등, 1981; Thakur와 Jha, 1981). Grunewald(1982)는 *Lactobacillus acidophilus*로 발효된 발효유를 쥐에게 급여한 결과 혈청 콜레스테롤 함량이 감소하였다고 보고하였으며 분변의 lactobacilli의 세균수는 변화가 없었다고 보고하였다. 발효유를 급여함으로써 혈청 콜레스테롤이 감소하는 이유로서 유산균이 장내에서 cholesterol을 흡수하던가 또는 유산균이 발효 중에 생성하는 물질이 간에서 cholesterol의 합성을 억제하기 때문이라고 알려져 있다(Noh 등, 1997, Rasic 등, 1992; Thakur와 Jha, 1981).

Bifidobacteria는 biled salt와 cholesterol이 첨가된 배지에서 배양할

때에 bile salt를 deconjugate하므로 pH5.4에서 deconjugate된 bile salt는 cholesterol와 함께 침전하게 된다(Klavier와 Der Meer, 1993). 또한 bifidobacteria는 cholesterol 보다는 cholesterol oleate가 흡수되어 세포막을 합성한다(Tahri 등, 1996). 따라서 bile salts가 첨가된 배양액에서 bifidobacteria는 cholesterol과 cholesterol 유도체를 침전시키고 흡수함으로써 제거할 수 있다(Tahri 등, 1995).

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시동물 및 실험기간

제1차 연구에서는 *B. bifidum* K-7 투여에 따른 rat 분변 균총의 변화 및  $\beta$ -glucuronidase 활성도를 조사하였으며 SD 계통의 수컷 쥐 12수를 구입하여 1999년 1월 14일 ~ 2월 9일 총 22일간 예비 사양실험을 실시하였다.

제2차 연구에서는 *B. bifidum* Bb-11 투여에 따른 rat 분변 균총의 변화 및  $\beta$ -glucuronidase 활성도를 조사하였다. SD 계통의 웅성 32수를 구입하여 1999년 5월 24일~6월 14일 총 19일간 사양실험을 실시하였다.

### 나. 실험설계 및 경구투여용 균주의 제조

제1차 연구에서 쥐는 항온 항습이 조절되는 장소에서 cage별로 한 마리씩 분리시켜 사육하였으며 5일간의 적응 기간을 둔 후 본 실험에 착수하였다. 적응기간 5일간은 일반사료로 급식시켰고 *B. bifidum* K-7 균주의 경구투여 이를 전부터 고지방, 고콜레스테롤식 실험 다이어트로(Table 1) 전환하였다. 각각 3마리씩 대조구(CO)와 처리구 별로 일정 기간 *B. bifidum* K-7이 첨가된 우유를 경구투여 하고 일정시기에 분을 채취하여 분의 균총 변화와  $\beta$ -glucuronidase 활성도를 조사하였다.

제2차 연구에서는 일반사료로(Table 2) 급식시키면서 *B. bifidum* Bb-11 균주의 경구투여 하였다. 각각 8마리씩 대조구와 처리구 별로 일정 기간 *B. bifidum* Bb-11이 첨가된 우유를 경구투여 하고 일정시기에 분을 채취하여 분의 균총 변화와  $\beta$ -glucuronidase 활성도를 조사하였다.

대조구는 우유만을 매일 1ml 씩 경구투여 하였고 3개의 처리구는 각각

*bifidum*을 분산시킨 우유(우유+*B. bifidum*), 초미세구 *B. bifidum*을 분산시킨 우유(우유+초미세구 *B. bifidum*) 및 *B. bifidum*으로 발효시킨 발효유(*B. bifidum* 발효유)를 매일 1ml 씩 1차연구에서는 20일 2차 연구에서는 14일간 경구투여 하였다.

#### 다. Bifidobacteria의 제조

처리구(우유+*B. bifidum*)와 처리구(우유+초미세구 *B. bifidum*)의 시료 제조 방법은 TPY broth에 2대 계대배양된 *B. bifidum* 균주를 0.2% 접종하여 37℃에서 24시간 혐기배양 하였다. 처리구(우유+*B. bifidum*)는 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 20% 탈지유에 녹여 0.5ml씩 분주한 후 -20℃에서 냉동 보관하면서 투여할 때마다 사용하였다. 냉동된 0.5ml의 균주를 5ml의 우유에 분산시켜 쥐에게 경구투여 하였다. 처리구(우유+초미세구 *B. bifidum*)은 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 0.85% 생리식염수에 분산시킨 후 분산액 10ml을 4ml의 1% yeast extract와 1ml의 20% skim milk 과 혼합하였다. 이 혼합액을 강원대학교에서 초미세구화 시켰다. 초미세구화된 *B. bifidum* 균주를 우유 5ml에 0.1g 씩 분산시킨 후 1ml씩 쥐에게 경구투여 하였다.

처리구(*B. bifidum* 발효유)의 시료 제조 방법은 10ml의 TPY broth에 2대 계대배양된 *B. bifidum* 균주를 우유에 0.5% 접종하여 37℃에서 24시간 혐기적으로 배양하였다. 우유의 커드 형성 여부를 확인 한 후 이를 잘 흔들어 분산시킨 후 쥐에게 경구투여 하였다. 발효된 우유의 pH는  $4.3 \pm 0.2$  이었다. 발효유는 5일에 한번씩 제조하였다.

#### 라. 쥐에 투여된 Bifidobacteria 세균수 측정

실제 마리 당 투여된 균수를 계수하기 위하여 처리구(우유+*B. bifidum*) MB는 냉동보관 중에 있는 균주를 꺼내어 1% peptone 수에 십진 희석한 후 TPY agar 평판에 도말하여 실제 균수를 계수 하였고 처리구(우유+초미세구 *B. bifidum*)은 초미세구화된 *B. bifidum* 균주 0.5g을 100ml의 인공장액(0.05M phosphate buffer; pH 6.8)에 첨가하여 37℃에서 6시간 동안 용출시킨 후 용출액을 1% peptone수로 십진희석하여 TPY agar 평판에 도말하

여 g 당 균수를 계산 한 후 CFU/ml 로 전환하여 계산하였다. 처리구 FM은 발효된 우유를 인산염 용액(0.03M potassium phosphate, monobasic; pH 7.2)에 십진희석 한 후 TPY agar 평판에 도말하여 계수 하였다.

Table 1. 제1차 쥐 사양 실험의 사료 조성

성 분	함 량 (g)
Casein	20.0
Corn-starch	58.0
Cellulose	10.0
Corn-oil	5.0
Beef-tallow	13.0
Choesterol	1.0
DL-methionine	0.3
Mineral-mix	3.5
Vitamin-mix	1.0
Choline-bitatrate	0.2
총 중량	112.0

Table 2. 제2차 쥐 사양 실험의 사료 조성

성 분	함 량 (%)
Moisture	9.5
Crude protein	23.1
Crude fat	5.5
Crude fiber	4.1
Crude ash	7.0
Nitrogen free extract	51.0
Cholesterol	1.1mg/g

#### 마. 쥐 분변의 세균수 측정

쥐 분변의 bifidobacteria, lactobacilli, clostridia, enterobacteria, staphylococci 의 균수를 조사하기 위하여 선택배지로서 각각 BSI, modified-MRS with 0.02% sodium azide, NN(Neomycin Nagler), DHL 한천배지(DAIGO; Japan), Staphylococci 110 (Difco)를 사용하였다.

대사 cage에서 쥐의 분변을 개체별로 채취하여 혐기희석액(0.05% Cysteine, 0.85% NaCl)에 분산시킨 후 1% peptone 희석용액을 사용하여 십진희석 하였으며 bifidobacteria는 37°C에서 48시간 동안 혐기적( $H_2$  90%:  $CO_2$  10%)으로 배양하였고, clostridia은 37°C에서 48시간 동안 혐기적(질소 100%)으로 배양하였다. lactobacilli, enterobacteria, staphylococci 는 호기상태로 37°C에서 24시간 배양하였다.

#### 바. 쥐 분변내의 $\beta$ -glucuronidase 활성도 분석

쥐의 맹장부위로부터 분을 채취하여 이를 시료로 사용하였다. 시료의 처리는 0.1M potassium phosphate buffer에 분산시킨 후 stomacher를 이용하여 고르게 마쇄 시켰다. 마쇄된 시료는 거즈를 이용하여 걸렀다. 시료의 원액으로부터 0.01g/ml의 농도가 되게끔 0.1M potassium phosphate buffer 로 희석한 후 초음파분쇄 시켰다. 시료의 초음파분쇄(Vibra-cell)는 4°C에서 1분씩 3회 실시하였으며 분쇄된 용액을 500g에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 새 tube에 옮겨 이를 효소반응실험에 사용하였다.

효소반응 분석은 상등액으로부터 0.1ml을 취하여 0.9ml의 substrate 용액(0.02M potassium phosphate: pH7.0, 0.1mM EDTA, 1mM phenolphthalein- $\beta$ -D-glucuronide)과 혼합시킨 후 항온수조에서 37°C, 30분간 반응 시켰다. 5ml의 stop solution (0.2M glycine buffer: pH10.4, 0.2M NaCl)을 가하여 반응을 중단 시켰다. 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 사. 혈청 분석

Cholesterol은 Rudel과 Morris (1973)의 o-phthalaldehyde 방법에 준하여 실시하였으며 인지질, triglycreide, 및 HDL cholesterol각 Iatrochrom

P<sub>i</sub>-S kit, Cleantech TG-S kit 및 Am203-k kit(Iatron lab., Japan)을 사용하여 측정하였다. LDL cholesterol을 Friedwald(1972)의 식에 의해 산출하였다.

#### 아. Bifidobacteria의 콜레스테롤 흡수 측정

Lipid vesicle는 Razin 등, (1979)의 방법에 따라 제조하였다. 0.2ml의 phosphatidycholine( $\alpha$ -lecithin; Sigma)과 10mg의 cholesterol(Sigma)를 1ml의 CHCl<sub>3</sub>에 용해시킨 후 N<sub>2</sub>를 분사하면서 건조 시켰다. 건조된 혼합물에 10ml의 0.4M sucrose를 가한 후 얼음 꽃아 N<sub>2</sub> 분사하면서 초음파분쇄기로 분쇄하여 vesicle를 형성 시켰다. 분쇄시킨 용액은 0.45 $\mu$ m로 막 여과 멸균하여 냉장 보관하였다.

TPY 배지 3ml에 준비된 lipid vesicle 용액 1ml(Cholesterol: final concentration 0.2g/ℓ) 과 막 여과 멸균된 1ml의 0.3% oxgall (Difco)를 혼합하였다. 이 혼합물에 2대 계대배양된 bifidobacteria균을 5% 접종한 후 37°C에서 24시간 혐기 배양하였다.

배양액을 원심분리하여 상등액을 취하여 새 tube에 옮겨 cholesterol 측정에 사용하였다. 침전물은 동량의 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 1회 세척한 후 원심분리 하였다. 침전물에 동량의 0.1M phosphate buffer를 다시 가하여 이를 차가운 상태에서 초음파분쇄기로 세포를 분쇄하였다. 분쇄된 세포 추출물을 cholesterol 측정에 사용하였다. Cholesterol 측정 방법은 Rudel과 Morris (1973)의 o-phthalaldehyde 방법에 준하여 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

가. *B. bifidum* K-7 투여에 따른 rat 분변 균총 및  $\beta$ -glucuronidase의 변화

쥐의 분변내 bifidobacteria의 세균수는 투여기간 지나감에 따라 전반적이 감소하는 경향을 보였다. 전체적으로 대조구에 비하여 처리구들의 세균수의 감소가 지체되었다. 7일과 14일에 채취한 분에서 처리구(우유+초미세구 *B. bifidum*)의 bifidobacteria 세균수가 투여 기간동안 대조구와 다른 처리구에 비해 상대적으로 많은 양의 bifidobacteria를 유지하고 있음을 알 수 있었다(Table 4). 이러한 결과는 초미세구화가 bifidobacteria의 장내에서의 생존성에 효과를 미치고 있음을 알 수 있었다.

Clostridia 세균수의 변화는 투여 기간동안 대조구와 처리구들은 지속적인 감소율을 나타내고 있었다. 특히 *B. bifidum* 발효유를 투여한 처리구는 감소율이 가장 높았다(Table 5).

Enterobacteria는 전반적으로 투여 0일 날로부터 20일 동안 큰 변화를 나타내지는 않았으나 9일 쯤 약간 증가하다가 마지막날 맹장에서 채취한 분변에서 대조구에 비해 처리구가 낮게 나타났다(Table 6).

Lactobacilli는 투여 0일 날에 비해 전반적으로 투여기간동안 감소하는 경향을 나타냈으며 처리구에서 감소율이 높았다(Table 7).

Staphylococci는 전반적으로 0일 쯤 보다 투여 기간 동안 증가하는 경향을 나타냈었다. 대조구에 비해 처리구의 세균수가 매우 낮게 나타나는 경향이 9일에 있었다(Table 8).

이러한 실험 결과를 토대로 초미세구화된 bifidobacteria가 경구투여 후 쥐의 식도로부터 대장까지 안전하게 도달하는데 기여함에 따라 장내에서의 생존율을 높여주고 있음을 Table 3에서 보여 주고 있다. 반면에 clostridia는 bifidobacteria로 처리된 처리구들이 대조구의 세균수에 비해 낮게 나타나 bifidobacteria 투여에 따른 유해균들의 감소 효과를 볼 수 있었으며 특히 전반적으로 최초 경구투여 일로부터 9일째 되는 때가 가장 효과가 좋았다.

경구투여 마지막 20일 쯤은 맹장으로부터 직접 분을 채취하였으므로 기존의 배설된 분변과의 시료 채취간의 변수가 있을 수 있다. 따라서 차후 실험에서는 시료의 통일성을 위하여 배설된 분변만을 채취하여 균수를 검사하여야 할 것이다. 경구투여 기간 동안 고지방, 고콜레스테롤 식이시료를 급여함에 따라 쥐가 섭취하는 다이어트에 따른 균총의 변화에 영향을

미처 또 다른 변수로서 작용할 수 있으므로 일반 사료를 급식 시키므로서 이러한 변수를 없애야 할 것이다.

Table 3. 쥐에 투여한 *B. bifidum* K-7의 세균수

구 분	log CFU/마리당
우유 + <i>B. bifidum</i>	10.4
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	7.1
<i>B. bifidum</i> 발효유	12.2 ± 3.02

Table 4. 쥐의 분변내 bifidobacteria 세균수

처리구	투여일자	(log CFU/g)			
		0 일	9 일	15일	20 일
우유		8.9±0.4	7.2±0.5	7.8±0.3	6.0±2.0
우유 + <i>B. bifidum</i>		8.3±0.2	8.0±0.8	6.7±0.9	7.6±0.5
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>		8.5±0.0	8.5±0.9	8.4±0.1	7.6±0.5
<i>B. bifidum</i> 발효유		8.2±0.7	7.8±0.4	7.4±1.3	7.7±0.7

Table 5. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 분변내 clostridia 세균수  
(log CFU/g)

처리구	투여일자	0 일	15일	20 일
	우유	6.6±0.3	6.4±0.5	4.5±1.9
	우유 + <i>B. bifidum</i>	6.3±0.1	5.1±0.4	3.3±0.9
	우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	6.1±0.1	5.6±0.7	3.8±1.3
	<i>B. bifidum</i> 발효유	6.6±0.4	4.9±0.7	3.0±0.0

Table 6. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 분변내 enterobacteria 세균수  
(log CFU/g)

처리구	투여일자	0 일	9 일	20 일
	우유	6.3±0.3	7.1±0.5	6.8±0.9
	우유 + <i>B. bifidum</i>	6.5±0.5	6.9±0.6	6.6±0.6
	우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	6.2±0.9	7.1±0.7	6.4±0.6
	<i>B. bifidum</i> 발효유	6.9±0.0	7.2±0.2	6.0±0.2

Table 7. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 분변내 lactobacilli 세균수  
(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	0 일	9 일	20 일
우유	9.8±0.5	8.4±0.6	6.9±0.8
우유 + <i>B. bifidum</i>	8.9±0.1	7.1±0.4	6.7±0.9
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	9.9±0.1	7.5±0.8	7.4±0.4
<i>B. bifidum</i> 발효유	9.9±0.4	7.6±0.2	6.7±0.5

Table 8. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 분변내 staphylococci 세균수  
(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	0 일	9 일	20 일
우유	3.8±0.2	6.3±1.2	4.7±0.5
우유 + <i>B. bifidum</i>	4.3±0.1	5.1±1.0	4.7±0.2
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	3.9±0.0	5.7±0.5	4.7±0.5
<i>B. bifidum</i> 발효유	3.9±0.0	5.7±0.9	4.9±0.3

Table 9에서 보는 바와 같이 경구투여 기간 동안  $\beta$ -glucuronidase의 농도는 뚜렷한 변화를 나타내지는 않았으나 마지막 20일째 맹장에서 채취한 분변 내  $\beta$ -glucuronidase의 농도가 대조구에 비해 처리구 모두에서 높게

나타났다. 혈청 cholesterol의 함량은 처리구들이 대조구에 비해 낮은 경향을 보였다.

Table 9. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 분변내  $\beta$ -glucuronidase (mmol/ng)

처리구 \ 투여일자	0 일	9 일	15 일	20 일
우유	0.6±0.2	2.6±0.3	1.3±0.4	1.7±0.0
우유 + <i>B. bifidum</i>	0.7±0.1	2.3±0.7	1.2±0.1	3.3±0.1
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	1.5±0.5	1.7±0.2	1.2±0.1	3.0±0.5
<i>B. bifidum</i> 발효유	0.5±0.0	2.7±0.9	1.2±0.2	3.2±1.0

Table 10. *B. bifidum* K-7을 투여한 쥐의 혈청 콜레스테롤

처리구 \ 투여일자	Cholesterol (mg/dl)
우유	153 ± 22
우유 + <i>B. bifidum</i>	113 ± 41
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	140 ± 19
<i>B. bifidum</i> 발효유	146 ± 31

나. *B. bifidum* Bb-11 투여에 따른 rat 분변 균총 및  $\beta$ -glucuronidase의 변화

쥐 32마리를 8마리씩 4개의 구로 나누어 일반사료(삼양사료)(Table 2)로 자유급식하면서 대조구는 매일 1ml의 우유를 투여하고 나머지 3개 처리구는 *B. bifidum* Bb-11을 첨가한 우유, 초미세구 *B. bifidum* Bb-11을 첨가한 우유, *B. bifidum* Bb-11로 발효시킨 우유를 매일 1ml 씩 투여하였다.

각 한 마리에 투여된 *B. bifidum* Bb-11의 세균수는 Table 11에 있다. 쥐의 분의 투여전 1일, 7일 및 14일에 채취하여 세균수와 조사하였으며 15일에 쥐를 희생하여 경동맥으로 혈액을 채취하여 cholesterol, triglyceride, phospholipid, high density lipoprotein(HDL) 및 low density lipoprotein(LDL)을 측정하였다.

분 내 Bifidobacteria, clostridia, enterobacteria 및 staphylococci의 평균 세균수는 각각  $10^8$ CFU/ml,  $10^6$ CFU/ml,  $10^6$ CFU/ml 및  $10^5$ CFU/ml이었다(Table 12, 13, 14, 15). 투여전 1일과 투여 후 2일, 7일 및 14일에 있어 모든 세균수의 변화를 볼 수 없었다. Lactobacilli는 투여전 1일과 7일에는  $10^7$ 이었으나 14일에는  $10^8$ CFU/ml이었다. 모든 처리구간에 세균수에는 차이가 없었다.  $\beta$ -Glucuronidase 활성도는 투여기간 동안 증가하였으나 처리구간에는 유의적인 차이가 없었다(Table 17).

투여 후 15일에 쥐를 희생하여 혈청내 cholesterol, triglyceride, phospholipid, HDL 및 LDL을 측정하였다(Table 18과 19). 대조구의 cholesterol 평균값은 85 mg/dl이고 초미세구 *B. bifidum* Bb-11을 첨가한 우유를 투여한 처리구의 평균값은 66mg/dl으로서  $p < 0.01$  수준에서 유의성이 있었다. *B. bifidum* 발효유를 투여한 처리구는 45mg/dl로서 대조구와 *B. bifidum* 첨가된 우유를 투여한 처리구에 대해 50%이며  $P < 0.001$  수준에서 유의성이 있었다. 이상의 결과에서 초미세구 *B. bifidum* Bb-11의 투여와 *B. bifidum* Bb-11으로 발효된 발효유의 투여가 쥐 혈청 cholesterol을 감소시키는 효과 있으며 초미세구 처리가 안된 *B. bifidum*의 투여는 혈청 cholesterol의 감소 효과 없음을 알 수 있었다. *B. bifidum* Bb-11으로 제

조된 발효유를 투여함으로써 인지질의 함량이 유의적으로 증가하였다 (P<0.05).

Table 11. 일일 한 마리 쥐에게 투여한 *B. bifidum* Bb-11 세균수

처리구	log CFU/rat
우유 + <i>B. bifidum</i>	9
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i> <i>B. bifidum</i>	9
발효유	10

Table 12. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐 분내 bifidobacteria 세균수의 변화

		(log CFU/g)			
처리구	투여일자	-1일	2일	7일	14일
우유		7.9±0.3	8.1±0.4	7.8±0.3	7.7±0.4
우유 + <i>B. bifidum</i>		8.1±0.2	7.9±0.3	7.8±0.3	7.6±0.4
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i> <i>B. bifidum</i>		7.9±0.3	8.4±0.4	7.9±0.8	7.5±0.2
발효유		7.8±0.6	8.2±0.3	8.0±0.4	7.7±0.7

Table 13. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 clostridia 세균수

(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	투여 1일 전	2일	7일	14일
우유	5.4±0.3	5.5±0.6	5.8±0.3	5.9±0.4
우유 + <i>B. bifidum</i>	5.8±0.3	5.8±0.3	6.0±0.1	6.3±0.6
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	5.4±0.1	6.0±0.4	5.9±0.2	6.2±0.4
<i>B. bifidum</i> 발효유	6.0±0.0	5.4±0.6	5.5±0.4	5.8±0.4

Table 14. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 enterobacteria 세균수

(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	투여 1일 전	7일	14일
우유	6.0±0.1	6.3±0.8	5.2±0.5
우유 + <i>B. bifidum</i>	5.8±0.5	5.9±0.7	5.5±0.4
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	5.3±0.8	6.3±0.6	5.2±0.9
<i>B. bifidum</i> 발효유	6.5±0.2	5.9±0.4	5.0±0.6

Table 15. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 분내 lactobacilli 세균수  
(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	투여 1일 전	7일	14일
우유	8.8±0.1	9.2±0.3	6.9±0.8
우유 + <i>B. bifidum</i>	8.8±0.2	9.2±0.5	6.7±0.9
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	8.3±0.0	9.1±0.4	7.4±0.4
<i>B. bifidum</i> 발효유	8.3±0.2	8.6±0.2	6.7±0.5

Table 16. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 분내 staphylococci 세균수  
(log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	투여 1일 전	7일	14일
우유	4.7±0.4	5.5±0.3	4.3±0.5
우유 + <i>B. bifidum</i>	4.7±0.3	5.7±0.6	4.5±0.3
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	5.2±0.4	4.7±0.6	5.0±0.3
<i>B. bifidum</i> 발효유	4.9±0.4	5.0±0.4	4.5±0.6

Table 17. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 분내  $\beta$ -glucuronidase (log CFU/g)

처리구 \ 투여일자	투여 1일 전	7일	14일
우유	0.1±0.2	1.0±0.3	1.3±0.8
우유 + <i>B. bifidum</i>	0.5±0.2	0.9±1.1	1.1±1.1
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	0.5±0.3	0.8±0.2	1.1±0.7
<i>B. bifidum</i> 발효유	0.3±0.2	0.7±0.6	0.9±0.6

Table 18. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 혈청 지질 분포

처리구 \ 투여일자	Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
우유	85±8	36±10	6.4±0.3
우유 + <i>B. bifidum</i>	93±19	35±3	6.4±0.6
우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	66±12**	36±7	6.5±0.4
<i>B. bifidum</i> 발효유	45±16***	37±11	6.9±0.4*

\* P<0.05

\*\* P < 0.01

\*\*\* P < 0.001

Table 19. *B. bifidum* Bb-11을 투여한 쥐의 혈청 lipoprotein의 함량

처리구	투여일자	HDL (mg/dℓ)	LDL (mg/dℓ)
	우유	93±21	30±24
	우유 + <i>B. bifidum</i>	90±17	23±11
	우유 + 초미세구 <i>B. bifidum</i>	94±29	41±10
	<i>B. bifidum</i> 발효유	92±26	25±14

\*\* P < 0.01

다. 담즙산이 함유된 배지에서 bifidobacteria의 콜레스테롤 흡수 효과

표준균주 5균주 및 *B. bifidum* 상업균주 1 균주와 야생균주 6균주를 oxgall이 첨가된 TPY 배지에서 배양한 후 원심분리한 상등액, 세균의 인산염완충액(pH 7) 세척액, 및 세척된 세균의 초음파분해액내의 cholesterol 함량을 측정하였다(Table 20). 표준균주는 배지에 함유된 cholesterol의 80% 이상의 상등액에 남아있었으며 야생균주의 대부분은 인산염완충액 세척액에 발견되었다. 모든 세균의 초음파분해액에는 cholesterol이 매우 적어 bifidobacteria가 cholesterol이 거의 흡수하지 않았음을 알 수 있었다.

Table 20. Ovgall이 함유된 TPY배지에서의 bifidobacteria 배양액의 cholesterol 분포

Species	Strain	Cholesterol(%)		
		Supernatant fluids	Washing buffer	Cell extracts
<i>B. adolescentis</i>	KCTC 3216	78.3±6.0	15.4±0.1	6.9±0.2
<i>B. bifidum</i>	KCTC 3357	93.4±0.6	5.9±1.0	0.7±0.4
<i>B. breve</i>	KCTC 3419	90.4±0.8	0.5±1.0	9.1±1.0
<i>B. infantis</i>	KCTC 3249	95.5±0.4	0.3±0.2	4.2±1.0
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	79.0±1.0	17.9±1.0	3.1±0.4
<i>B. bifidum</i>	Bb-11	94.8±3.0	3.9±0.3	1.3±0.3
<i>B. bifidum</i>	K-2	39.6±0.5	55.1±1.0	5.3±1.0
<i>B. bifidum</i>	K-4	91.8±3.0	4.3±3.0	3.9±1.0
<i>B. bifidum</i>	K-5	33.9±3.0	60.1±0.4	6.0±1.0
<i>B. bifidum</i>	K-7	38.3±0.4	59.0±1.0	2.6±0.1
<i>B. bifidum</i>	K-10	66.3±0.1	30.1±1.0	3.6±1.0
<i>B. bifidum</i>	K-C	68.3±1.0	30.5±0.0	1.2±0.0

#### 4. 적 요

*B. bifidum* 및 초미세구 *B. bifidum*을 첨가한 우유와 *B. bifidum*으로 발효된 발효유를 급여한 쥐를 처리구로하고 우유를 급여한 쥐를 대조구로 하여 실험하였다. 제1차 경구투여실험에서는 고지방 고콜레스테롤 다이어트를 급여하였다. *B. bifidum* K-7 및 초미세구 *B. bifidum* K-7을 첨가한 우유와 *B. bifidum* K-7으로 제조한 발효유를 급여받은 처리구에서 분의 bifidobacteria 세균수가 대조구에 비해 높았으며 clostridia는 낮았다. 투여 실험기간 동안에 대조구와 처리구가 bifidobacteria, clostridia 및 lactobacilli의 수가 감소하였으며 enterobacteria와 staphylococci는 증가하였다. 제2차 경구투여실험에서는 일반사료를 급여하였다. *B. bifidum* Bb-11가 투여된 처리구는 투여기간 중에 분 내 bifidobacteria, clostridia, lactobacilli, enterobacteria 및 staphylococci의 세균수에

있어 대조구와 차이가 없었다. *B. bifidum* Bb-11로 제조된 발효유와 초미세구 *B. bifidum* Bb-11이 첨가된 우유로 투여된 처리구는 대조구에 비해 혈청 cholesterol이 낮았으며 *B. bifidum* Bb-11로 제조된 발효유를 투여된 처리구는 인지질이 유의성있게 높았다.

## 제 4 절 참고문헌

1. Bartram, H.-P., W. Scheppach, S. Gerlach, G. Ruckdeschel, E. Kelber, and H. Kasper. 1994. Does yogurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 59:428-432.
2. Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11:155-157.
3. Beerens, H. 1991. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2418-2419.
4. Benno, Y. and T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol Immunol.*, 36:683-694.
5. Bernet, M.-F., D. Brassart, J.-R. Neeser, and A. L. Servin. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. 59:4121-4128.
6. Biviati, B., V. scardovi, and W. E. C. Moore. 1982. Electrophoretic pattern of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 32:358-373.
7. Biviati, B., B. Sgorbati, and V. Scardovi. 1991. The genus *Bifidobacterium*. In *The prokaryotes* 2nd ed. vol 1. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. -H. Schleifer, edited. Springer-Verag. New York.
8. Cancilla, M. R., I. B. Powell, A. J. Hillier, and B. E. Davidson. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with <sup>32</sup>P and fluorescent labels. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1772-1775.
9. Chareris, W. P. , P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins.

1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Inter. J. Food Microbiol.* 35:1-27.
10. Chauviere, G., M. H. Coconnier, S. Kernis, J. Fourniat, and A. L. Servin. 1992. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.*, 138:740-747.
11. Crociani, J., J.-P. Grill, M. Huppert, and J. Ballongue. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21:146-148.
12. Danielson, A.D., E. R. Peo. Jr, K. M. Shahani, A. J. Lewis, P. J. Whalen, and M. A. Amer. 1989. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J. Animal Sci.*, 67:966-974.
13. Friedwald, W. R. I. Levy, and D. S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol with use of the preparation ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, 18:499-502.
14. Frothingham, R., A. J. Duncan, and K. H. Wilson. 1993. Ribosomal DNA sequences of bifidobacteria: implications for sequence-based identification of the human colonic flora. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 6:23-27.
15. Fuller R. 1992. Probiotics - The scientific basis. Chapman and Hall. London.
16. Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Sci.*, 47:2078-2079.
17. Klaver, F. A. M. and R. Van Der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl.*

- Environ. Microbiol., 59:1120-1124.
18. Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, H. F. Wilsinson, and G. W. Welling. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA targeted probes and its application in faecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.
  19. Leblond-Bourget, N, H. Philippe, I. mangin, and B. Decaris. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:102-111.
  20. Mangin, J., N. Bourget, Y. Bourget, Y. Bouhnik, N. Bisetti, J. M. Simonet, and B. Descaris.. 1994. Identification of *Bifidobacterium* strains by rRNA gene restriction patterns. Appl. Environ. Microbiol. 60:1451-1458.
  21. Mitsuoka, T., T. Sega, and S. Yamamoto. 1965. Ejne verbasserte methodik der qualitative und quantitative Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zentralbl. Bakteriol Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe. 195:455-469.
  22. Noh, D. O., S. H. Kim, and S. E. Gilliland. 1997. incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. J. Dairy Sci., 80:3107-3113.
  23. Perez, P. F., Y. Minnaard, E. A. Disalvo and G. L. De Antoni. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Appl. Environ. Microbiol., 64:21-26.
  24. Pochart, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlious, and J.-C. Rambaud. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. Am. J. Clin. Nutr., 55:78-80.
  30. Pot, B., C. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters, and

- K. -H. Schleifer. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 1439:513-517.
31. Rao, D. R., C. B. Chawan, and S. R. Pulusani. 1981. Influence of milk and *thermophilus* milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. *J. Food Sci.*, 46:1339-1341.
32. Rasic, J. L., I. F. Vujicic, M. Skringer, and M. Vulic. 1992. Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* 14: 39-44.
33. Razin, S., M. Wormser, and N. L. Gershfeld. 1974. Cholesterol in mytoplasm membranes. II Components of *Acholeplasma laidlawii* cell membranes responsible for cholesterol binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 352:385-396.
34. Robin, R. K. and A. Y. Tamine. 1990. Microbiology of fermented milks *In Dairy Microbiology* vol. 2. 2nd ed. R. K. Robinson, edited. Elsevier Applied Science, London.
35. Romond, M.-B., Z. Haddou, C. Miercareck, and C. Romond. 1997. Bifidobacteria and human health: regulatory effect of indigenous bifidobacteria on *Escherichia coli* intestinal colonization. 3:131-136.
36. Romond, M.-B., A. Ais, F. Guillemot, R. Bounouader, A. Cortot, and C. Romond. 1998. Cell-free whey from milk fermented with *bifidobacterium breve* C50 used to modify the colonic microflora of health subjects. *J. Dairy sci.*, 81\_1229-1235.
37. Roy, D., and P. Ward. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of *Bifidobacteriu* species. *J. Appl. Bacteriol.* 69:739-749.
37. Roy, D., J. -L. Berger, and G. Reuter. 1994. Characterization of dairy-related *Bifidobacterium* spp. based on their  $\beta$ -galactosidase

- electrophoretic pattern. *Inter. J. Food Microbiol.* 23: 55-70.
38. Roy D., P. Ward, and G. Champagne. 1996. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Inter. J. Food Microbiol.* 29:11-29.
  39. Rudel, L. L. and M. d. Morris. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J. Lipid. Res.*, 14:364-366.
  40. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual* 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  41. Scardovi, V., L. D. Trovatelli, G. Zani, F. Crociani, and D. Matteuzzi. 1971. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 21:276-294.
  42. Silvi S, C. J. Rummeyl, and I. R. Rowland. 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.*, 81:561-564.
  43. Tahri, K., J. P. Grill, and F. Schneider. 1996. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr. Microbiol.*, 33:187-193.
  44. Tahri, K., J. P. Grill, and F. Schneider. 1997. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Curr. Microbiol.* 34:79-84.
  45. Tanskanen, E. I., D. L. Tulloch, A. J. Hillier, and B. E. Davidson. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I digests of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3105-3111.
  46. Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa, and T. Misuoka. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jap. J. Bacteriol.*, 33:753-761.
  47. Thakur, C. P. and A. N., Jha. 1981. Influence of milk, yoghurt

- and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 39:211-215.
48. Tsakalidou, E., E. Ziodou, and G. Kalantzopoulos. 1992. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains isolated from yoghurt and cheese. *Milchwissenschaft* 47:296-298.
  49. Tyler, K. D., G. Wang, S. D. Tyler, and W. M. Johnson. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clinical Microbiol.* 35:339-346.
  50. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.*, 24:6823-6831.
  51. Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218.
  52. Yamamoto, T., M. Morotomi, and R. Tanaka. 1992. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:4076-4079.
  53. 남진식, 이정준, 신명수, 나석환, 백영진, 유민. 1994. Polymerase chain reaction에 의한 *Lactobacillus casei* 및 돌연변이 균주들의 비교 분석. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:577-583.
  54. 박희경, 허태련. 1995. 산업적 이용을 위한 *Bifidobacterium* spp.의 특성 연구. *한국축산식품학회지*. 15:139-149.
  55. 박희경, 허태련. 1996. *Bifidobacterium breve*의 성장특성과 생존력에 미치는 배양조건의 영향. *한국식품과학회지*. 28:451-457.
  56. 안준배, 지근억, 정후길, 이계호, 박종현. 1996. 발효유 제조시 적합한 한국인 유래 *Bifidobacterium* spp.의 선발 및 동정. *한국낙농학회*

지. 19:349-360.

57. 최석호, 임태진, 정의룡. 1995. 국산 발효유에서 분리한 유산균의 DNA 제한효소 분석에 관한 연구. Korean J. Dairy Sci. 37:405-410.
58. 최석호, 이승배, 김현욱. 1997. 요구르트 제조용 유산균 종균의 유전자 지문 분석과 생리적 성질에 관한 연구. Korean J. Dairy Sci. 19:141-150.