



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

*Bifidobacterium*과 일반 유산균용
선택배지의 검증과 개선

**Verification and Improvement of Selective Medium
for *Bifidobacterium* and Lactic Acid Bacteria**

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
식품영양학과
박현주

*Bifidobacterium*과 일반 유산균용

선택배지의 검증과 개선

Verification and Improvement of Selective Medium
for *Bifidobacterium* and Lactic Acid Bacteria

지도교수 지근억

이 논문을 생활과학 석사학위논문으로 제출함
2015년 10월

서울대학교 대학원
식품영양학과
박현주

박현주의 생활과학 석사학위논문을 인준함
2015년 12월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국 문 초 록

식품에 함유되어 있는 유산균의 수를 측정하기 위해 많은 선택배지들이 사용되고 있다. 하지만 선택배지에 사용되는 항생제에 의해 일부 *Bifidobacterium* 들의 생장이 저해된다는 연구가 보고되고 있다.

본 연구에서는 비선택배지와 선택배지에서 유산균의 생존율을 검증하였고 double layer (DL)를 이용한 배지 제조 방법을 고안하여 검출 정확도를 높였다. 또한 시중에 판매되고 있는 유산균 제품으로부터 일반 유산균과 *Bifidobacterium* 을 선택적으로 검출하여 배지의 유효성을 확인하였다.

일반 유산균의 검출을 위해 MRS-BCP (de Man Rogosa and Sharpe with bromocresol purple) 배지와 BCP (plate count agar with bromocresol purple) 배지를 이용하였으며, *Bifidobacterium* 검출을 위해 BS (*Bifidobacterium* selective) 배지 및 TOS-MUP (transgalacto-oligosaccharides with mupirocin, TM) 배지를 사용하였다. 또한 TM-DL (TM-double layer) 배지 및 BS-DL (BS double layer) 배지를 제조하여 *Bifidobacterium* 의 회복능을 높이고자 하였다.

BCP 배지를 이용한 일반 유산균 검출에 사용되는 주입평판법은 배지의 높은 온도에 균체가 손상을 받아 생균수가 낮게 측정되므로 도말평판법을 이용하여 호기적으로 배양하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

Bifidobacterium 선택배지인 BS 배지와 TM 배지에서 *Bifidobacterium* 을 배양했을 경우 BS 배지에서 모든 *Bifidobacterium* 의 생균수가 유의하게

낮게 나타났으며 *Enterococcus faecium* KCTC 13225 이 10^5 CFU/ml 수준으로 관찰되었기 때문에 BS 배지를 *Bifidobacterium* 선택배지로 사용할 경우 계수에 오류가 생길 것으로 판단된다. TM 배지 및 TM-DL 배지는 BS 배지에 비하여 높은 회복률을 나타내며 일반 유산균의 생장도 효과적으로 저해했다. 따라서 TM 배지 및 TM-DL 배지가 *Bifidobacterium* 선택배지로 적합할 것으로 사료된다.

주요어: *Bifidobacterium*, 선택배지, BS 배지, TOS-MUP 배지, Double layer 배지

학번: 2014-20354

목 차

목차

국 문 초 록	i
목 차	iii
표 목 록	v
약 어 목 록	vi
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	3
2.1 일반 유산균 계수 배지에서의 검출	3
2.1.1 일반 유산균 측정에 사용된 실험 균주	3
2.1.2 배지 제조	3
2.1.3 실험 방법 및 배양 조건	4
2.2 <i>Bifidobacterium</i> 검출	5
2.2.1 실험 균주	5
2.2.2 배지 제조	6
2.2.3 실험 방법 및 배양 조건	8
2.3 유산균 제품에서의 검출	9

2.3.1	사용된 유산균 제품	9
2.3.2	배지 제조 및 실험 방법	9
2.3.4	F-6-PPK 효소 활성 검사	10
2.4	통계 분석	11
3.	실험결과 및 고찰	12
3.1	일반 유산균의 생균수 측정	12
3.2	<i>Bifidobacterium</i> 선택배지에서의 유산균 수 측정	16
3.2.1	<i>Bifidobacterium</i> 선택배지에서 <i>Bifidobacterium</i> 검출	17
3.2.2	<i>Bifidobacterium</i> 선택배지에서 일반 유산균 검출	24
3.2.3	선택배지를 이용하여 유산균 제품에서의 유산균 수 측정	28
4.	요약 및 결론	30
	References	31
	Abstract	36
	APPENDIX	38

표 목 록

Table 1. Media for the enumeration of <i>Bifidobacterium</i>	7
Table 2. The viable counts of lactic acid bacteria grown on MRS-BCP and BCP agar media	14
Table 3. The viable counts of <i>Bifidobacterium</i> grown on various non-selective and <i>Bifidobacterium</i> -selective media	20
Table 4. The viable counts of lactic acid bacteria grown on various non-selective and <i>Bifidobacterium</i> -selective media	26
Table 5. The viable counts of lactic acid bacteria and <i>Bifidobacterium</i> grown on various non-selective and <i>Bifidobacterium</i> -selective media from several commercial products	29

약어 목록

MRS; de Man Rogosa and Sharpe

BCP; Plate count agar (PCA) with bromocresol purple

MRS-BCP; MRS agar with bromocresol purple

TOS; Transgalacto-oligosaccharides

TOS-MUP (TM); Transgalacto-oligosaccharides with mupirocin

BL; Briggs liver

BS; *Bifidobacterium* selective

1. 서론

프로바이오틱스 (probiotics)는 적정량 섭취 시 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물이다 [1]. 건강기능식품공전에는 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* 및 *Enterococcus*를 프로바이오틱 유산균으로 인정하고 있다 [2].

위의 프로바이오틱 유산균들이 제공해주는 효과에는 장내 균총 유지, 유당불내증 완화 [3], 면역 체계 강화 [4-6], 변비 및 설사의 증상 완화 등이 있다 [7, 8]. 또한 장내 유해균 성장을 억제하며 [9] 유해균이 생성하는 유해 물질을 감소시킨다 [10]. 이와 같은 효과를 보기 위해 프로바이오틱스를 식품으로 10^6 CFU (colony forming unit)/g 이상, 또는 하루 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/g 수준의 살아있는 균을 섭취해야 한다 [2, 11, 12].

그러므로 적정 섭취량을 유지하기 위해 제조자는 생산된 제품에 들어 있는 균 종류 및 수를 지속적으로 추적해야 할 필요가 있다.

식품에 함유되어 있는 유산균 측정 시 일반 유산균 및 *Bifidobacterium*의 선택적 검출을 위해 많은 배지들이 사용되고 있다 [13-15]. 일반 유산균 검출 시 BCP (Plate count agar with bromocresol purple) 배지를 사용하며 *Bifidobacterium* 검출 시 식품공전과 여러 시험법에서 널리 사용되는 배지로 BS (*Bifidobacterium* selective medium) 배지와 TOS-MUP (transgalactooligosaccharides with mupirocin) 배지가 있다 [16-18].

Bifidobacterium 검출 시 사용되는 BS 배지는 BL (Briggs liver) 배지에 일반 유산균 억제 물질인 프로피온산 나트륨, 염화리튬 및 항생제인 파로모마이신 (paromomycin)과 네오마이신 (neomycin)을 첨가한 배지이다.

*Bifidobacterium*은 파로모마이신과 네오마이신에 저항성을 갖지만 종에 따라 다양한 감수성을 보이기 때문에 선택배지에서 일부 *Bifidobacterium*이 저해된다는 연구가 보고되고 있다 [19-23]. 또한 *Bifidobacterium*이 무피로신 (mupirocin)에 저항성이 있다는 연구 [24]를 통해 개발된 TOS-MUP 배지가 있으나 이 역시 종에 따라 감수성에 차이가 크기 때문에 모든 *Bifidobacterium* 검출에 어려움이 있다 [16].

선택배지 사용은 많은 도움을 주지만 위와 같이 종에 따라 항생제 내성 차이와 다른 미생물의 생장은 저해하며 *Bifidobacterium*만 촉진시키는 선택 물질에 대한 이용능 차이가 크기 때문에 [25] *Bifidobacterium*에 대해 완전한 선택성을 갖기 힘들며 선택배지로서의 적합성에 문제가 있을 것으로 사료된다 [13, 20, 22, 23, 26].

더욱이 프로바이오틱 유산균 제품의 제조, 유통 및 보관 과정에서 균체들은 물리적·화학적 영향으로 손상을 입어 생육 요구성이 민감해져 위와 같은 항생제가 첨가된 배지에서 배양할 경우 생육이 저해될 가능성이 있다 [27].

Bifidobacterium 분리 및 계수를 위해 많은 선택배지들이 개발되어 왔지만 아직까지 완전한 선택성을 갖는 배지를 찾아보기 어렵다 [26, 28-37].

따라서 본 연구에서는 비선택배지와 선택배지에서 유산균의 생존율을 검증하였고 손상 받은 균체를 회복시키기 위해 double layer (DL) 배지 제조 방법을 고안하여 검출 정확도를 높였다. 또한 시중에 판매되고 있는 유산균 제품으로부터 일반 유산균과 *Bifidobacterium*을 선택적으로 검출하여 배지의 유효성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 일반 유산균 계수 배지에서의 검출

2.1.1 일반 유산균 측정에 사용된 실험 균주

일반 유산균의 계수에 사용되는 BCP 배지에서의 검출률을 알아보기 위하여 다음과 같은 균주를 사용하였다. *Lb. acidophilus* KCTC 3145, *Lc. lactis* subsp. *lactis* KCTC 2013 와 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* KCTC 3779 는 한국 과학 기술 연구원 유전자 은행으로부터 분양 받았으며, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 27258 는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하였다. *Lb. plantarum* KFRI 708 및 *Lb. casei* KFRI 699 은 한국 식품 연구원에서 구입하였다.

2.1.2 배지 제조

일반 유산균의 계수를 위해 BCP (PCA with bromocresol purple) 배지와 브로모크레졸 퍼플을 첨가하여 만든 MRS-BCP 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 Appendix 에 나타내었다.

10 진 희석 시 사용한 펩톤식염완충액 (Buffered peptone water)은 펩톤 10 g, 염화나트륨 5 g, 디소듐포스페이트 3.5 g, 모노소듐포스페이트 1.5 g 을 증류수 1 L 에 가하여 pH 를 7.2 ± 0.2 로 조정한 후 121°C에서 15 분간 멸균하여 제조하였다.

2.1.3 실험 방법 및 배양 조건

2.1.1 에 서술한 일반 유산균들은 8 ml 의 MRS 액체배지에 1%로 접종하여 24 시간 배양 후 실험에 사용하였다.

일반 유산균의 계수 시 식품공전 방법을 따랐으며, 약술하면 다음과 같다. 펩톤식염완충액 9 ml 에 균액 1 ml 을 더하여 10 진 희석 후 배지에 분주하였다. 도말평판법 (spread plate method)과 주입평판법 (pour plate method)을 실시하여 호기적, 혐기적 조건으로 각각 37°C에서 72 ± 3 시간 배양 후 발생한 황색 집락을 계수하였다. 주입평판법 실험 시 배지의 온도를 43~45°C로 낮춘 후 분주하였다. 검체와 배지를 잘 혼합하여 응고시킨 후 배양하였다. 실험의 모든 과정은 무균적인 환경에서 진행되었다.

혐기적 조건 형성 시 Anoxomat System (MART, Lichtenvoorde, Netherlands)을 이용하였다.

2.2 *Bifidobacterium* 검출

2.2.1 실험 균주

실험에 사용 된 균주는 다음과 같다. *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3267, *B. angulatum* KCTC 3236, *B. animalis* KCTC 3219, *B. breve* KCTC 3419, *B. infantis* KCTC 3249, *Lb. acidophilus* KCTC 3145, *Lb. acidophilus* KCTC (3164), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *Lb. rhamnosus* KCTC 3237, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* KCTC 3779, *Lc. lactis* subsp. *lactis* KCTC 2013 및 *Enterococcus faecium* KCTC 13225 는 한국 과학 기술 연구원 유전자 은행에서 분양 받았으며 *B. thermophilum* KCCM 12097 는 한국 미생물 보존 센터에서 분양 받았다. 또한 *Lb. casei* KFRI 699 및 *Lb. plantarum* KFRI 708 는 한국 식품 연구원에서, *Lc. cremoris* ATCC 19257 은 미국 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였다.

B. bifidum BGN4 와 *B. longum* RD65 는 서울대학교 식품영양학과 식품 미생물학 연구실에 보관 중인 균주를 사용하였다.

2.2.2 배지 제조

실험에 사용된 배지는 Table 1 에 나타내었다. 항생제 첨가 배지에서의 생육성을 비교하기 위해 대조군으로 MRS (Difco, Detroit, USA)와 BL (Difco, Detroit, USA) 배지를 사용하였다. BS 배지는 BL 배지에 프로피온산 나트륨 15 g/L, 황산 파로모마이신 0.05 g/L, 황산 네오마이신 0.1 g/L, 염화리튬 3 g/L 를 첨가하여 제조하였다.

BL 배지와 BS 배지는 121°C에서 15 분간 멸균한 뒤 50°C로 낮추어 말의 탈 섬유소 혈액을 5%가 되게 첨가하였다.

TOS 배지 (MBCell, Los Angeles, USA)는 115°C에서 15 분간 멸균하여 50°C로 식힌 다음 0.22 µm 실린지 필터 (PALL Acrodisc Syringe Filters, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하여 무피로신 (1 mg/ml)을 첨가하였다.

DL (double layer) 배지는 항생제를 두 배로 넣은 고체 배지 10 ml 을 페트리 접시에 분주하여 15 분 가량 굳힌 후 항생제를 넣지 않은 배지 5 ml 을 그 위에 중첩하여 두 층의 배지를 만들었다.

10 진 희석에는 2.1.2에서 서술한 펩톤식염완충액을 사용하였다.

Table 1. Media for the enumeration of *Bifidobacterium*

Non-selective media		References
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe	[38]
BL	Briggs liver	[39]
Selective media		References
BS	<i>Bifidobacterium</i> selective	[40]
BS-DL	Double layered BS medium	
TOS	Transgalacto-oligosaccharides	[41]
TOS-MUP (TM)	TOS with mupirocin supplement	[42]
TOS-MUP- DL (TM-DL)	Double layered TM medium	

2.2.3 실험 방법 및 배양 조건

MRS 액체 배지에 균을 접종하여 37°C에서 18 시간, 36 시간 또는 54 시간 동안 배양 후 실험에 사용하였다.

MRS 액체 배지에 배양한 균 액 1 ml 에 펩톤식염완충액 9 ml 을 가하여 10 진 희석 후 도말 하였다.

모든 고체 배지는 Anoxomat System (MART, Lichtenvoorde, Netherlands)을 이용하여 혐기 치환 후 37°C 배양기에서 3 일간 배양하였다.

2.3 유산균 제품에서의 검출

2.3.1 사용된 유산균 제품

시중에 판매되고 있는 유산균 제품 중 *Bifidobacterium* 과 일반 유산균 혼합 제품 6 가지를 구입하여 실험에 사용하였다.

2.3.2 배지 제조 및 실험 방법

일반 유산균의 검출을 위해 BCP 배지와 MRS-BCP 배지를 이용하여 도말평판법 시행 후 호기적으로 배양하였다.

Bifidobacterium 검출 실험은 2.2.3 에서 나타낸 방법과 동일하다.

2.3.4 F-6-PPK 효소 활성 검사

선택배지에서 형성된 콜로니가 *Bifidobacterium* 인지 확인하기 위해 fructose-6-phosphate phosphoketolase (F-6-PPK) 활성을 확인하였다.

Bifidobacterium 은 aldolase 와 glucose-6-phosphate 의 부재로 fructose-6-phosphate phosphoketolase 를 이용하여 hexose 를 분해한다. 일반 유산균에는 F-6-PPK 가 존재하지 않으며 *Bifidobacterium* 에만 특이적으로 나타나기 때문에 *Bifidobacterium* 확인 시 많이 이용된다 [35, 43].

F-6-PPK 활성 측정은 Orban 과 Patterson [44]의 방법을 따랐다.

우선 선택 배지 상의 콜로니를 MRS 액체 배지에 접종하여 배양시켰다. 배양액 1 ml 을 원심분리 (12,000 × g, 5 min)하여 상등액을 제거한 후 배지 성분을 세척하기 위해 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) 1 ml 에 부유시키고 원심 분리하여 상등액을 제거했다. PB 버퍼 50 µl 를 넣어 침전물을 부유 시키고 세트리모늄 브로마이드 (0.45 mg/ml CTAB) 23 µl 를 첨가한 후 불화 나트륨 (NaF, 60 mg/ml in DW)과 칼륨 또는 나트륨 요도아세테이트 (100 mg/ml in DW) 12 µl 를 첨가하였다. 그리고 fructose-6-phosphate (80 mg/ml in DW) 12 µl 를 첨가 한 후 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 75 µl 의 하이드록실아민 염산염 (13.9 g/100 ml in DW)을 첨가한 후 실온에서 10 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 트라이클로로아세트산 15% (w/v) 50 µl, 4 N 염화수소 50 µl 와 염화제이철 (FeCl₃·6H₂O, 5% w/v in 0.1 N HCl)을 순서대로 첨가한 후 색의 변화를 관찰하였다. 반응이 음성으로 나타날 경우 염화제이철 색깔인 밝은

노란색으로 변화가 없으며 양성으로 나타날 경우 마지막 시약을 첨가하는 즉시 적자색~적갈색으로 변한다.

2.4 통계 분석

모든 실험은 3 반복하였으며 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

실험 결과는 SAS 통계 프로그램 (version 9.4, SAS Institute, NC, USA)의 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 이용하여 분석하였으며 사후분석은 Duncan 방법을 이용하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 일반 유산균의 생균수 측정

일반 유산균 검출 시 사용되는 BCP 배지에서 검출률을 확인하기 위하여 브로모크레졸 퍼플을 첨가한 MRS를 대조군으로 사용하였고 6종의 유산균을 이용하여 생균수를 측정하였다. 각 균주는 MRS 액체배지에서 18 시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다. 결과는 Table 2 에 나타내었으며 실험은 3반복 하였다.

BCP 배지로 주입평판법 (pour plate method)을 실시하였을 때 혐기 또는 호기 조건에 상관없이 모든 균에서 다른 배지보다 생균수가 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 주입평판법은 최근 식품공전이 개정되기 이전에 사용했던 방법으로 고체 배지를 43~45°C로 유지하여 검체와 함께 혼합하여 균히는 방법이다. 여러 요인에 의해 손상되어 있던 균이 주입평판법 이용 시 배지의 높은 온도에 영향을 받아 회복되지 못하고 사멸되어 생균수가 낮게 측정된 것으로 사료된다.

Lc. lactis KCTC 2013의 경우 BCP 배지에 도달하여 혐기적으로 배양하였을 때 높은 균수를 보였다. *S. thermophilus* KCTC 3779는 MRS 배지와 BCP 배지에 도달하여 호기 배양한 것에는 유의한 차이가 없었으나 BCP 배지에 도달하여 혐기 배양 한 경우 유의적으로 낮게 측정되었다. *Leu. mesenteroides* ATCC 27258을 비롯하여 *L. acidophilus* KCTC 3145, *L. casei* KFRI 699, *L. plantarum* KFRI 708 및 *S. thermophilus* KCTC 3779는 BCP 배지에 균을

도말하여 호기적으로 배양한 경우 유의적으로 높게 나타났다.

BCP 배지를 이용한 일반 유산균 검출에 사용되는 주입평판법은 배지의 온도에 균체가 손상을 받아 생균수가 낮게 측정되므로 도말평판법을 이용하여 호기적으로 배양하는 것이 생균수 측정에 보다 적합할 것으로 사료된다.

Table 2. The viable counts of lactic acid bacteria grown on MRS-BCP and BCP agar media (\log_{10} CFU/ml)¹⁾

Experimental bacteria	Medium	Air condition	
		anaerobic	aerobic
<i>Lb. acidophilus</i> KCTC 3154	MRS	9.55±0.10 ^{a4)}	9.54±0.09 ^a
	BCP (spread plate) ²⁾	9.50±0.08 ^a	9.66±0.03 ^a
	BCP (pour plate) ³⁾	9.20±0.04 ^b	9.23±0.12 ^b
<i>Lb. casei</i> KFRI 699	MRS	9.48±0.07 ^b	9.52±0.06 ^{ab}
	BCP (spread plate)	9.53±0.01 ^{ab}	9.59±0.05 ^a
	BCP (pour plate)	9.20±0.04 ^c	9.20±0.002 ^c
<i>Lb. plantarum</i> KFRI 708	MRS	9.03±0.004 ^a	9.02±0.04 ^a
	BCP (spread plate)	9.06±0.05 ^a	9.05±0.04 ^a
	BCP (pour plate)	8.60±0.04 ^b	8.65±0.06 ^b
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 2013	MRS	9.96±0.11 ^b	10.01±0.08 ^b
	BCP (spread plate)	10.17±0.07 ^a	9.98±0.06 ^b
	BCP (pour plate)	9.54±0.02 ^c	9.52±0.03 ^c
<i>S. thermophilus</i> KCTC 3779	MRS	8.78±0.09 ^a	8.79±0.03 ^a
	BCP (spread plate)	7.09±0.12 ^b	8.74±0.21 ^a
	BCP (pour plate)	7.15±0.21 ^b	7.97±0.24 ^b
<i>Leu. mesenteroides</i> ATCC 27258	MRS	9.03±0.06 ^a	9.01±0.04 ^a
	BCP (spread plate)	8.87±0.08 ^b	9.07±0.02 ^a

BCP (pour plate)

8.55±0.06^c

8.64±0.05^c

¹⁾ Means ± standard deviations

²⁾ Spread plate method

³⁾ Pour plate method

⁴⁾ Different letters are significantly different ($p < 0.05$)

3.2 *Bifidobacterium* 선택배지에서의 유산균 수 측정

Bifidobacterium 선택배지에서의 검출률을 비교하기 위해 MRS 액체 배지에 균을 접종한 후 18 시간, 36 시간 및 54 시간 동안 배양하여 MRS, TOS, TM, TM-DL, BL, BS 및 BS-DL 배지에 도말 후 배양하였다.

본 연구에서는 대조군으로 MRS 배지를 사용하였고, *Bifidobacterium* 선택배지로 TM 배지와 BS 배지를 사용하였다. TM 배지와 BS 배지에 첨가되는 항생제에 대한 영향을 확인하기 위해 항생제가 첨가되지 않은 TOS 배지와 BL 배지를 사용하였다. 또한, 손상된 균체의 회복률을 높이기 위해 double layer (DL)를 적용한 새로운 배지 제조 방법을 고안하여 검출 정확도를 높였다. DL 배지는 일반 선택배지의 두 배 농도로 항생제를 첨가한 배지를 분주하여 굳힌 후 항생제를 첨가하지 않은 비선택배지를 그 위에 중첩하여 제조한 배지이다.

Bifidobacterium 비선택배지 및 선택배지에서 *Bifidobacterium* 을 검출한 결과는 Table 3 에 나타내었고 일반 유산균을 검출한 결과는 Table 4 에 나타내었다.

3.2.1 *Bifidobacterium* 선택배지에서 *Bifidobacterium* 검출

Bifidobacterium 선택배지의 검증 및 개선을 위하여 본 실험을 수행하였다. 결과는 Table 3 에 나타내었으며 결과 값은 평균 \pm 표준편차 (회복능)으로 나타내었다.

회복능은 전반적으로 검출률이 높은 BL 배지에 대한 백분율로 나타내었다 [회복능 (%) = CFU_각 배지 / CFU_BL \times 100].

MRS 배지와 BL 배지는 비선택배지로 모든 균이 높은 수준으로 검출되었으며 BL 배지에서 조금 더 높게 나타났는데 이는 첨가된 혈액이 손상된 균의 회복을 도운 것으로 사료된다.

전체적으로 모든 균주에서 TOS 기반 배지에서의 콜로니 크기가 MRS 배지에서 나타나는 것보다 작게 나타났으며 특히 *B. adolescentis* KCTC 3216, *B. animalis* KCTC 3219 및 *B. thermophilum* KCCM12097 은 그 크기가 1 mm 내외로 매우 작았다.

B. adolescentis KCTC 3216 은 모든 시간 조건에서 BS-DL 배지에 배양했을 때 생균수가 유의하게 낮게 나타났다. 또한 54 시간 배양한 균액의 경우 BS 배지에서도 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). *B. animalis* KCTC 3219 는 18 시간 및 36 시간 배양한 균액은 배지별 생균수에 큰 차이가 없었으나, 오랜 시간 배양으로 인해 스트레스를 받은 54 시간 조건에서의 회복능은 TM 배지 32%, BS 배지 35%로 유의하게 낮게 나타났다. 이는 손상된 균체가 항생제의 영향으로 회복되지 못하고 사멸한 반면 TM-DL 및 BS-DL 배지에서는 손상된 균체가 회복되어 80%, 96%로 유의하게 높게 나타난 것으로 생각된다.

B. thermophilum KCCM 12097 의 경우 전체적으로 BS 배지에서 회복능이 낮게 나타났다. 36 시간 배양한 균액의 결과 TM 배지에서 94%의 회복률을 보였으며 TM-DL 배지에서 111%로 TM 배지에서 보다 높은 수준으로 검출되었다. 또한 BS 배지에서 회복률은 67%에 불과하지만 BS-DL 배지에서는 91%로 회복능이 더 좋은 것으로 관찰되었다.

B. longum RD65 균주를 18 시간 배양한 경우 항생제를 첨가한 배지 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나 36 시간 및 54 시간 배양한 경우 BS 배지에서 37%, 23%의 회복능을 보였으나 BS-DL 배지에서는 52% 및 62%로 높은 회복률을 나타냈다. 54 시간 배양한 균액은 TOS 기반의 배지에서 2% 이하로 현저히 낮게 나타났다.

B. angulatum KCTC 3236 과 *B. breve* KCTC 3220 의 경우도 마찬가지로 모든 시간 조건의 BS 배지에서 검출률이 매우 낮게 나타났다. *B. breve* KCTC 3220 의 18 시간 및 36 시간 배양한 균은 TM-DL 배지에서 유의적으로 높은 수준의 회복능을 보였다.

특히 *B. bifidum* BGN4 의 경우 BS 배지에서 검출되는 정도가 배양 시간이 길어짐에 따라 0.1% 미만으로 현저히 낮게 나타났고 BS-DL 배지에서도 검출 정도가 낮게 나타났다. 반면 BL 배지를 제외한 나머지 배지에 비하여 TM-DL 배지에서 각 시간에 따라 75%, 127% 및 94%로 유의적으로 높은 회복능을 보였다.

B. infantis KCTC 3249 균주는 BS 배지와 BS-DL 배지에서 거의 검출되지 않았으나 이에 비해 36 시간 배양한 균액의 경우 TM 배지에서 79%, TM-DL 배지에서 86%로 높은 회복률을 보였다.

B. bifidum BGN4 와 *B. infantis* KCTC 3249 균은 특히 BS 배지에 첨가되는 항생체에 영향을 많이 받으며 DL 배지에서 균체의 회복이 잘 일어나 TM-DL 배지에서 높은 수준으로 검출된 것으로 사료된다.

BS 배지에 첨가되는 네오마이신과 파로모마이신에 대한 민감성은 균주에 따라 다르며 [19-23] 그에 따라 여러 배지에서의 회복능 또한 다르게 나타났다. *B. adolescentis* KCTC 3216과 *B. animalis* KCTC 3219를 제외한 대부분의 균은 18 시간 또는 36 시간 배양한 균수에 비해 54 시간 배양한 경우 10배에서 1000배 더 낮게 검출되었다. 배양 기간이 길어짐에 따라 스스로 생성해내는 산에 의한 스트레스로 균체가 손상된 것으로 사료된다. 또한 BS 배지에서의 회복능은 배양 시간이 증가함에 따라 점차 감소되며 이는 손상된 균체가 항생체의 영향을 받아 회복되지 못하고 사멸하는 것으로 사료된다. BS-DL 배지를 사용하였을 경우 BS 배지에 비하여 균수가 상대적으로 높게 나타났다. 이는 double layer의 항생체가 없는 배지 표면에서 균이 회복된 것으로 생각된다.

두 층으로 중첩하여 만든 배지에서 손상된 균체가 회복 될 수 있다는 가능성을 보였으며 유산균 혼합 시료에서 *Bifidobacterium*의 계수를 위한 선택배지로 TM 배지 및 TM-DL 배지가 적합한 것으로 사료된다.

Table 3. The viable counts of *Bifidobacterium* grown on various non-selective and *Bifidobacterium*-selective media

<i>Bifidobacterium</i> strains		Viable counts at various incubation times		
		(log ₁₀ CFU/ml) ¹⁾		
Medium	18 h	36 h	54 h	
<i>B. adolescentis</i>	MRS	9.45±0.041(104) ^{2) a}	9.51±0.08(102) ^a	9.46±0.05(80) ^{bc}
KCTC 3216	TOS	9.45±0.03(103) ^{a 3)}	9.49±0.03(96) ^{ab}	9.51±0.04(88) ^{abc}
	TM	9.50±0.03(117) ^a	9.41±0.06(81) ^{ab}	9.51±0.05(88) ^{abc}
	TM-DL	9.31±0.28(86) ^a	9.46±0.09(92) ^{ab}	9.54±0.03(95) ^{ab}
	BL	9.43±0.03(100) ^a	9.50±0.05(100) ^a	9.56±0.03(100) ^a
	BS	9.41±0.08(95) ^a	9.41±0.02(80) ^{ab}	9.46±0.02(79) ^c
	BS-DL	8.99±0.29(41) ^b	9.33±0.13(69) ^b	9.33±0.09(60) ^d
<i>B. animalis</i>	MRS	9.19±0.06(91) ^a	8.99±0.23(60) ^b	8.92±0.12(64) ^c
KCTC 3219	TOS	9.22±0.06(98) ^a	9.22±0.10(93) ^{ab}	9.16±0.07(111) ^a
	TM	9.18±0.09(89) ^a	9.06±0.07(64) ^{ab}	8.60±0.21(32) ^d
	TM-DL	9.29±0.11(118) ^a	9.12±0.11(75) ^{ab}	9.02±0.08(80) ^{bc}
	BL	9.23±0.09(100) ^a	9.26±0.02(100) ^a	9.12±0.06(100) ^{ab}
	BS	9.19±0.08(91) ^a	9.07±0.11(67) ^{ab}	8.65±0.13(35) ^d
	BS-DL	9.21±0.11(98) ^a	9.18±0.10(85) ^{ab}	9.10±0.09(96) ^{ab}

Table 3. (continued)

<i>Bifidobacterium</i> strains		Viable counts at various incubation times		
		(log ₁₀ CFU/ml) ¹⁾		
Medium	18 h	36 h	54 h	
<i>B. thermophilum</i>	MRS	9.15±0.02(94) ^b	9.37±0.04(94) ^b	8.08±0.03(94) ^a
KCCM 12097	TOS	9.29±0.03(130) ^a	9.37±0.03(94) ^b	7.81±0.01(50) ^c
	TM	9.21±0.07(107) ^{ab}	9.37±0.03(94) ^b	7.92±0.19(70) ^{ab}
	TM-DL	9.30±0.05(132) ^a	9.44±0.02(111) ^a	7.94±0.17(72) ^{ab}
	BL	9.18±0.04(100) ^b	9.40±0.07(100) ^{ab}	8.10±0.03(100) ^a
	BS	8.90±0.23(57) ^c	9.23±0.04(67) ^c	7.53±0.14(28) ^c
	BS-DL	9.19±0.06(104) ^{ab}	9.36±0.03(91) ^b	7.88±0.04(60) ^b
	<i>B. longum</i> RD65	MRS	8.48±0.11(26) ^b	8.76±0.09(79) ^b
TOS	8.89±0.07(34) ^b	8.26±0.05(25) ^{de}	6.21±0.07(1.7) ^d	
TM	9.02±0.06(87) ^a	8.20±0.11(22) ^c	6.13±0.35(1.7) ^d	
TM-DL	9.02±0.03(87) ^a	8.41±0.01(35) ^{de}	6.28±0.12(2) ^d	
BL	9.08 ±0.05(100) ^a	8.87±0.05(100) ^a	7.97±0.05(100) ^a	
BS	9.01±0.15(88) ^a	8.45±0.03(37) ^d	7.32±0.13(23) ^c	
BS-DL	8.98±0.03(80) ^a	8.58±0.04(52) ^c	7.77±0.02(62) ^b	

Table 3. (continued)

<i>Bifidobacterium</i> strains		Viable counts at various incubation times		
		(log ₁₀ CFU/ml) ¹⁾		
Medium	18 h	36 h	54 h	
<i>B. angulatum</i>	MRS	8.81±0.04(70) ^{bc}	8.54±0.03(19) ^{cd}	7.60±0.16(34) ^b
KCTC 3236	TOS	8.88±0.13(85) ^{ab}	8.79±0.10(82) ^{abc}	7.24±0.12(14) ^{cd}
	TM	8.89±0.00(85) ^{ab}	8.95±0.03(116) ^a	7.14±0.20(12) ^{cd}
	TM-DL	8.63±0.06(47) ^c	8.84±0.04(89) ^{ab}	7.30±0.00(16) ^c
	BL	8.96±0.08(100) ^a	8.86±0.21(100) ^a	8.10±0.05(100) ^a
	BS	8.10±0.03(14) ^d	8.58±0.14(51) ^{bcd}	6.19±0.29(1.4) ^d
	BS-DL	7.84±0.09(7.7) ^d	7.98±0.59(27) ^d	6.66±0.32(4.3) ^{cd}
	<i>B. breve</i>	MRS	8.44±0.40(57) ^c	9.13±0.10(107) ^b
KCTC 3220	TOS	8.88±0.12(129) ^{ab}	9.11±0.03(102) ^{bc}	5.89±0.26(21) ^b
	TM	8.99±0.02(159) ^a	9.18±0.03(118) ^b	5.68±0.43(16) ^b
	TM-DL	8.98±0.11(159) ^a	9.28±0.01(148) ^a	5.45±0.21(7.4) ^b
	BL	8.78±0.09(100) ^{bc}	9.10±0.02(100) ^{bc}	6.61±0.05(100) ^a
	BS	5.86±0.49(0.2) ^d	5.84±0.13(0.05) ^d	<3.30(0.05) ^b
	BS-DL	8.82±0.07(111) ^{ab}	9.03±0.02(84) ^c	5.40±0.17(6.6) ^b

Table 3. (continued)

<i>Bifidobacterium</i> strains		Viable counts at various incubation times		
		(log ₁₀ CFU/ml) ¹⁾		
Medium	18 h	36 h	54 h	
<i>B. bifidum</i>	MRS	9.65±0.01(88) ^{ab}	8.56±0.10(61) ^c	7.70±0.06(24) ^d
BGN4	TOS	9.57±0.03(73) ^b	8.65±0.11(77) ^{bc}	8.05±0.14(56) ^c
	TM	9.62±0.04(82) ^b	8.50±0.03(53) ^c	8.16±0.04(71) ^{bc}
	TM-DL	9.58±0.07(75) ^b	8.87±0.09(127) ^a	8.29±0.06(94) ^{ab}
	BL	9.71±0.05(100) ^a	8.77±0.09(100) ^{ab}	8.31±0.07(100) ^a
	BS	7.47±0.23(6.3) ^c	<5.30(0.03) ^d	<5.30(0.1) ^d
	BS-DL	9.58±0.05(75) ^b	7.94±0.18(15) ^d	7.13±0.30(7.4) ^d
<i>B. infantis</i>	MRS	8.81±0.12(72) ^{ab}	9.17±0.02(76) ^b	7.04±0.11(7.4) ^d
KCTC 3249	TOS	8.95±0.06(97) ^{ab}	9.26±0.04(95) ^{ab}	7.81±0.06(44) ^c
	TM	8.80±0.03(68) ^b	9.19±0.03(79) ^b	7.83±0.03(45) ^{bc}
	TM-DL	8.83±0.05(73) ^{ab}	9.22±0.05(86) ^{ab}	7.90±0.01(52) ^b
	BL	8.96±0.05(100) ^a	9.29±0.04(100) ^a	8.18±0.01(100) ^a
	BS	<5.30(0.02) ^c	<3.30(0.0001) ^c	<3.30(0.001) ^d
	BS-DL	<5.30(0.02) ^c	<6.30(0.1) ^c	<5.30(0.1) ^d

¹⁾ Means ± standard deviations

²⁾ Recovery percent (= CFU of each medium / CFU of BL × 100)

³⁾ Different letters are significantly different ($P < 0.05$)

3.2.2 *Bifidobacterium* 선택배지에서 일반 유산균 검출

Bifidobacterium 선택배지에서 일반 유산균 검출을 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 결과는 Table 4 에 나타내었다.

Bifidobacterium 선택배지에는 일반 유산균의 생장을 저해하는 물질과 항생제가 첨가되기 때문에 일반 유산균이 검출되어서는 안 된다. 하지만 실험 결과 *E. faecium* KCTC 13225 이 BS 배지와 BS-DL 배지에서 3.1×10^5 CFU/ml, 1.2×10^5 CFU/ml 수준으로 검출되었고 *Lb. casei* KFRI 699 또한 BS-DL 배지에서 4.2×10^4 CFU/ml 로 나타났다. 일반 유산균과 *Bifidobacterium* 혼합 시료에서 *Bifidobacterium* 계수 시 선택배지로 BS 배지를 이용할 경우 오차가 발생할 가능성이 있다.

또한 *Lb. rhamnosus* KCTC 3237 도 *Bifidobacterium* 선택배지인 TM 배지에서 4.7×10^2 CFU/ml, TM-DL 배지에서 4.0×10^2 CFU/ml 수준으로 검출되었다. 하지만 이는 MRS 에 비하여 천만 배 낮은 수치이며 일반적인 유산균 검출 시험 시 문제는 없을 것으로 사료된다.

Lb. plantarum KFRI 708 은 10^2 CFU/ml 수준에서 colony 가 검출되었지만 그 크기가 매우 미세하여 계수가 불가능하였다.

Lb. acidophilus KCTC 3154, *Lb. acidophilus* KCTC 3168, *Lb. bulgaricus* KCTC 3635, *Lb. casei* KFRI 699, *Lc. cremoris* ATCC 19257, *Lc. lactis* KCTC 2013 및 *S. thermophilus* KCTC 3779 는 항생제가 첨가된 선택배지에서 콜로니가 관찰되지 않았다.

Bifidobacterium 의 초기 균수가 높을 경우 위와 같은 결과에 영향을 받지 않지만 초기 균수가 낮을 경우 *E. faecium* KCTC 13225 와 같은 일반

유산균에 의해 *Bifidobacterium* 계수에 오류가 생길 것으로 판단된다. TM 배지는 BS 배지에 비하여 *Bifidobacterium* 이 높은 회복률을 나타내며 일반 유산균의 생장도 효과적으로 저해한다. 따라서 TM 배지 및 TM-DL 배지가 *Bifidobacterium* 선택배지로 적합하다고 사료된다.

Table 4. The counts of lactic acid bacteria grown on various non-selective and *Bifidobacterium*-selective media (log₁₀ CFU/ml)¹⁾

Media	Microorganism				
	<i>E. faecium</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lb. casei</i>
	KCTC 13225	KCTC 3154	KCTC 3168	KCTC 3635	KFRI 699
MRS	9.23±0.02	9.58±0.20	8.61±0.12	9.36±0.21	9.39±0.34
TOS	9.24±0.02	5.21±0.10	<7.30	4.93±0.03	<7.30
TM	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND
TM-DL	ND	ND	ND	ND	ND
BL	9.28±0.06	9.67±0.06	8.58±0.11	9.33±0.18	9.54±0.09
BS	5.49±0.05	ND	ND	ND	ND
BS -DL	5.09±0.08	ND	ND	ND	4.62±0.04

Table 4. (continued)

Media	Microorganism				
	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lc. cremoris</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>
	KFRI 708	KCTC 3237	ATCC 19257	KCTC 2013	KCTC 3779
MRS	9.32±0.08	9.42±0.07	8.98±0.08	9.08±0.03	8.69±0.14
TOS	<7.30	9.39±0.06	8.98±0.03	9.10±0.08	≤7.30
TM	ND	2.66±0.10	ND	ND	ND
TM-DL	ND	2.60±0.30	ND	ND	ND
BL	9.22±0.07	9.34±0.08	9.00±0.16	9.16±0.09	8.49±0.34
BS	ND	ND	ND	ND	ND
BS -DL	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾ Means ± standard deviations

²⁾ Colony was not detected in 10⁻¹ diluent

3.2.3 선택배지를 이용하여 유산균 제품에서의 유산균 수 측정

시중에 판매되고 있는 *Bifidobacterium* 과 일반 유산균의 혼합 제품을 구입하여 일반 유산균과 *Bifidobacterium* 의 생균수를 측정하였다. 각 제품에서의 생균수는 Table 5 에 나타내었다.

일반 유산균은 BCP 배지를 이용하여 검출하는데 제품 F 의 경우 MRS-BCP 배지보다 BCP 배지에서 더 높은 균 수를 보였으며 F 를 제외한 나머지 제품은 MRS-BCP 와 BCP 배지에서 비슷한 결과를 보였다.

여섯 가지 제품 중 네 개 (A, B, D 및 F)의 제품에 존재하는 유산균이 TM 배지 및 TM-DL 배지에서 10^5 - 10^6 CFU/ml 정도로 검출되었으나 BS 배지와 BS-DL 배지에서는 10^7 - 10^8 CFU/ml 로 상대적으로 높게 검출되었다. BS 배지보다 TM 배지에서 회복률이 높다는 위의 결과로 미루어 보아 *Bifidobacterium* 이 아닌 것으로 생각되어 F-6-PPK (fructose-6-phosphate phosphoketolase) 활성 실험을 진행하였다. F-6-PPK 실험 결과 음성으로 *Bifidobacterium* 이 아니었다. 반면 TM 배지 및 TM-DL 배지와 BS 배지 및 BS-DL 배지의 결과가 유사한 제품 C 와 E 의 경우 F-6-PPK 결과 양성으로 나타났다.

위의 결과로 보아 BS 배지에서는 *Bifidobacterium* 이 아닌 균이 많이 검출되기 때문에 TM 배지 및 TM-DL 배지가 *Bifidobacterium* 선택배지로 더 적합한 것으로 사료된다.

Table 5. The viable cell counts of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* grown on various non-selective and *Bifidobacterium*-selective media from several commercial products (log₁₀ CFU/ml)¹⁾

Media	Commercial products					
	A	B	C	D	E	F
MRS-BCP	7.02±0.12	7.23±0.13	8.51±0.11	8.78±0.07	9.10±0.02	7.41±0.06
BCP	7.19±0.01	7.57±0.27	8.44±0.09	8.81±0.02	9.09±0.06	8.12±0.07
MRS	9.10±0.08	9.40±0.03	9.09±0.06	8.76±0.13	9.08±0.15	8.76±0.02
TM	5.22±0.11	6.79±0.02	8.14±0.06	5.00	7.37±0.32	6.46±0.02
TM-DL	6.36±0.08	6.90±0.05	8.23±0.21	4.78	7.26	6.45±0.15
BL	9.14±0.10	9.45±0.04	9.09±0.02	8.87±0.06	9.09±0.08	8.86±0.05
BS	8.79±0.03 ^{*2)}	8.72±0.03	<6.30	6.86±0.12 [*]	7.26	7.74±0.03 [*]
BS-DL	9.01±0.05 [*]	9.36±0.08 [*]	7.81±0.04	5.52±0.11 [*]	7.32±0.03	8.14±0.09 [*]

¹⁾ Means ± standard deviations

²⁾ * nonbifid colony

4. 요약 및 결론

본 연구는 비선택배지와 선택배지에서 유산균의 생존율을 검증하였고 double layer (DL)를 이용한 배지 제조 방법을 고안하여 균의 회복능과 검출 정확도를 높이고자 하였다. 또한 시중에 판매되고 있는 유산균 제품으로부터 일반 유산균과 *Bifidobacterium*을 선택적으로 검출하여 배지의 유효성을 확인하였다. 이를 통해 실험 방법 및 선택배지가 생균수에 미치는 영향을 확인하였고 새로운 배지 제조 방법을 고안하여 검출 정확도를 높였다는 점에서 본 연구의 의의가 있다.

일반 유산균 검출에 사용되는 BCP 배지를 이용한 주입평판법을 실행하였을 때 생균수가 유의하게 낮게 나타났으며 이는 배지의 높은 온도에 균체가 손상을 받아 사멸된 것으로 사료된다. 반면 도말평판법을 이용하여 호기적으로 배양한 조건에서 생균수가 비교적 높게 나타났으며 일반 유산균 검출 시 이 조건을 이용하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

BS 배지에서 모든 *Bifidobacterium*의 생균수가 유의하게 낮게 나타났으며 *E. faecium* KCTC 13225가 10^5 CFU/ml 수준으로 관찰되었기 때문에 BS 배지를 선택배지로 사용할 경우 *Bifidobacterium*의 선택적 계수에 오류가 생길 것으로 판단된다. TM 배지는 BS 배지에 비하여 높은 회복률을 나타내며 일반 유산균의 성장도 효과적으로 저해했다. 따라서 TM 배지 또는 TM-DL 배지를 *Bifidobacterium* 선택배지로 사용한다면 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Guarner, F. & Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 237-238.
2. 식품의약품안전처. 2015. 2-51 프로바이오틱스. 건강기능식품공전.
3. Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.-F. & Rambaud, J.-C. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2. 1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Brit. J. Nutr.* 64, 71-79.
4. Hatcher, G. E. & Lambrecht, R. S. 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy. Sci.* 76, 2485-2492.
5. Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Toida, T., Kasashima, T., Kataoka, T. & Hashimoto, Y. 1994. Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for in vivo immune responses in mice. *Immunopharm. Immunot.* 16, 589-609.
6. Park, S. Y., Ji, G. E., Ko, Y. T., Jung, H. K., Ustunol, Z. & Pestka, J. J. 1999. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 231-241.
7. Ishibashi, N., Yaeshima, T. & Hayasawa, H. 1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Mal. J. Nutr.* 3, 149-159.
8. Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria and microflora. 1, 3-24.

9. Gibson, G. & Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 412-420.
10. Araya-Kojima, T., Yaeshima, T., Ishibashi, N., Shimamura, S. & Hayasawa, H. 1995. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria and microflora.* 14, 59-66.
11. Samona, A. & Robinson, R. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* 44, 64-66.
12. Sanders, M. E., Walker, D. C., Walker, K. M., Aoyama, K. & Klaenhammer, T. R. 1996. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79, 943-955.
13. Roy, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 167-182.
14. Ashraf, R. & Shah, N. P. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 194-208.
15. Karimi, R., Mortazavian, A. M. & Amiri-Rigi, A. 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiol.* 29, 1-9.
16. Bunesova, V., Musilova, S., Geigerova, M., Pechar, R. & Rada, V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *J. Microbiol. Methods.* 109, 106-109.
17. Kim, E.-R., Cho, Y.-H., Kim, Y.-H., Park, S.-O., Woo, G.-J. & Chun, H.-N. 2010. Comparison of bifidobacteria selective media for the detection of bifidobacteria

- in Korean commercial fermented milk products. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30, 154-162.
18. 식품의약품안전처. 2015. 3.9.2 유산균·구균 및 비피더스균. 식품공전.
 19. Matteuzzi, D., Crociani, F. & Brigidi, P. 1983. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. Annales de l'Institut Pasteur / Microbiol. 134, 339-349.
 20. 문보연, 이시경 & 박종현. 2006. Antibiotic resistant characteristics of *Bifidobacterium* from Korean intestine origin and commercial yoghurts. Korean J. Food Sci. Technol. 38, 313-316.
 21. Lim, K. S., Huh, C. S., Baek, Y. J. & Kim, H. U. 1995. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. J. Dairy Sci. 78, 2108-2112.
 22. Dave, R. & Shah, N. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. J. Dairy Sci. 79, 1529-1536.
 23. D'Aimmo, M. R., Modesto, M. & Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. Int. J. Food Microbiol. 115, 35-42.
 24. Rada, V. 1997. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. Biotechnol. Tech. 11, 909-912.
 25. Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M. & Biavati, B. 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. Int. J. Food Microbiol. 24, 199-210.
 26. 지근억, 이세경 & 김인희. 1994. Improved Selective Medium for Isolation

- and Enumeration of *Bifidobacterium* sp. Korean J. Food Sci. Technol. 26, 526-531.
27. 정병문, 김응률, 정후길 & 전호남. 2004. *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 균주의 당 발효 특성 및 항생제 내성을 이용한 선택배지 개발연구. Korean J. Microbiol. 40, 37-42.
 28. Munoa, F. & Pares, R. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. App. Environ. Microbiol. 54, 1715-1718.
 29. Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. Lett. Appl. Microbiol. 11, 155-157.
 30. Hartemink, R., Kok, B., Weenk, G. & Rombouts, F. 1996. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. J. Microbiol. Meth. 27, 33-43.
 31. Hartemink, R. & Rombouts, F. M. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. J. Microbiol. Meth. 36, 181-192.
 32. Martineau, B. 1999. Comparison of four media for the selection of bifidobacteria in dog fecal samples. Anaerobe. 5, 123-127.
 33. Nebra, Y. & Blanch, A. 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5173-5176.
 34. Rada, V., Sirotek, K. & Petr, J. 1999. Evaluation of selective media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples. J. Vet. Med. B. 46, 369-373.
 35. Rada, V. & Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. J. Microbiol. Meth. 43, 127-132.

36. Thitaram, S., Siragusa, G. & Hinton, A. 2005. *Bifidobacterium* selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic selective agar medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 355-360.
37. Pechar, R., Rada, V., Parafati, L., Musilova, S., Bunesova, V., Vlkova, E., Killer, J., Mrazek, J., Kmet, V. & Svejstil, R. 2014. Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 32-35.
38. De Man, J., Rogosa, d. & Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
39. Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora.* 3, 11-28.
40. Mitsuoka T, S. T., Yamamoto S. 1965. Eine verbesserte methodik der qualitativen und quantitaven Analyse der darmflora von menschen und tieren. *Zbl Bakt Hyg I Orig.* 195: 445–469.
41. Koichiro, S., Mitsuo, M.. & Masahiko, M. 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J. Food Hyg. Sci. Japan.* 27, 238-244_231.
42. ISO/IDF. 2010. Milk products-enumeration of presumptive bifidobacteria-colony count technique at 37 °C. *ISO Standard 29981/IDF 220: 2010.*
43. de Vries, W. & Stouthamer, A. H. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol.* 93, 574-576.
44. Orban, J. & Patterson, J. 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 40, 221-224.

Abstract

Verification and Improvement of Selective Medium for *Bifidobacteria* and Lactic Acid Bacteria

Hyeonju Park

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Many selective media have been used for the enumeration of lactic acid bacteria including bifidobacteria in fermented food. However, antibiotics added to the selective medium inhibit the growth of the lactic acid bacteria. In this study, viability of lactic acid bacteria was verified on non-selective or selective media. Double layer medium was devised to enhance the viability of *Bifidobacterium*. MRS-BCP (de Man Rogosa and Sharpe with bromocresol purple) and BCP (plate count agar with bromocresol purple) agar were used to detect general lactic acid bacteria. Spread plate method using BCP agar was better than pour plate method in the selective enumeration of lactic acid bacteria under aerobic incubation. BS (*Bifidobacterium* selective medium) and TOS-MUP (Transgalactosylated oligosaccharides propionate agar with mupirocin) media were used for the enumeration of *Bifidobacterium*. Furthermore, TM-DL (TM-

double layer) and BS-DL (BS-double layer) media were used to increase the recovery of *Bifidobacterium*. The selective recovery of *Bifidobacterium* was significantly lower on BS agar than the other experimental media. In addition, *E. faecium* KCTC 13225 was grown on BS agar. Therefore, it was concluded that BS medium is not suitable for the selective enumeration of *Bifidobacterium*. TM agar showed better performance than BS agar, and effectively inhibited the growth of the other experimental lactic acid bacteria in both MRS medium and commercial probiotic products. In conclusion, TM or TM-DL medium may be suitable for the selective enumeration of *Bifidobacterium*.

Keywords: *Bifidobacterium*, selective medium, BS agar, TOS-MUP agar, Double layer medium

Student Number: 2014-20354

APPENDIX

(Media used in the study)

MRS broth

proteose peptone No.3	10.0 g
beef extract	10.0 g
yeast extract	5.0 g
dextrose	20.0 g
polysorbate 80	1.0 g
ammonium citrate	2.0 g
sodium acetate	5.0 g
magnesium sulfate	0.1 g
manganese sulfate	0.05 g
dipotassium phosphate	2.0 g
distilled water	1 L

MRS agar

MRS agar contains 1.5% agar

MRS-BCP agar

Bromocresol purple (0.05 g) was added to MRS agar medium

BCP (plate count agar with bromocresol purple)

peptone	5.0 g
yeast extract	2.5 g
dextrose	1.0 g
tween 80	1.0 g
L-cysteine	0.1 g
bromocresol purple	0.05 g
agar	15.0 g
distilled water	1 L

BL medium

beef extract	2.4 g
proteose peptone No. 3	10.0 g
pancreatic digest of casein	5.0 g
soybean peptone	3.0 g
yeast extract	5.0 g
liver extract	3.2 g
dextrose	5.0 g
lactose	5.0 g
starch	0.5 g
potassium phosphate monobasic	1.0 g
potassium phosphate dibasic	1.0 g
magnesium sulfate	0.2 g
ferrous sulfate	0.01 g
sodium chloride	0.01 g
manganese sulfate	0.007 g
antifoam A	0.2 g
polysorbate 80	1.0 g
L-cysteine hydrochloride	0.5 g
Agar	15.0 g
distilled water	1 L

* BL agar contains 5% defibrinated horse blood

BS medium

sodium propionate	15.0 g
paromomycin sulfate	0.05 g
neomycin	0.1 g
lithium chloride	3 g
BL agar	1 L

* BS agar contains 5% defibrinated horse blood

TOS medium

casein peptone	10.0 g
yeast extract	1.0 g
monopotassium phosphate	3.0 g
dipotassium hydrogen phosphate	4.8 g
ammonium sulfate	3.0 g
magnesium sulfate heptahydrate	0.2 g
L-cysteine-HCl.H ₂ O	0.5 g
sodium propionate	15.0 g
TOS ¹⁾	10.0 g
agar	15.0 g
distilled water	1 L

¹⁾ Transgalactooligosaccharide

* Sterilize at 115°C for 15 minutes. Cool to 45-50°C and add 2 vials MUP supplement

TOS-MUP medium

TOS agar was cooled to 45-50°C and added 2 vials MUP supplement