

유산균의 장내 환경개선효과

Isolation of bifidobacteria inhibiting harmful enzymes of Korean intestinal bacteria

김동현, 송미정, 김숙영, 박혜영, 이영경, 배은아, 한명주
경희대학교 약학대학 / 식품영양학과

Five hundreds of bifidobacteria were isolated from an healthy Korean and the inhibitory effects of these isolated bacteria on harmful enzymes of human intestinal microflora were examined by cocultivation of the isolated bifidobacteria with *E. coli* HGU-3 or total human intestinal microflora. In comparison with the results of *E. coli* or intestinal microflora cultivation, *Bifidobacterium breve* K-110, *B. breve* K-111 and *B. infantis* K-525 effectively inhibited harmful enzymes (β -glucuronidase and tryptophanase) of *E. coli* and lowered the pH of the culture media. Also they inhibited the harmful enzymes (β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase and urease) and ammonia production of intestinal microflora, and lowered pH of the culture media by increasing the number of bifidobacteria on intestinal microflora. The inhibitory effect of bifidobacteria on Growth of *Helicobacter pylori* and Rotavirus infection were exammed. *Bifidobacterium* K-110 and K-111 inhibited effectively them. When these isolated bifidobacteria were administered to mice, the activities of fecal harmful enzymes were inhibited and the AC and ACF formation were suppressed. Among tested bifidobacteria, *B. breve* K-110 had high inhibitory effect of fecal harmful enzymes and ACF formation.

서 론

사람의 장내에는 약 100종류, 10^{14} 의 세균이 서식하고 있으며, 일생동안 건강에 많은 영향을 주고 있다. 장내세균에는 사람의 건강을 지켜주는 유용균과 나쁜 영향을 주는 유해균이 있는데 이들 양자의 균형에 의하여 건강상태가 조절되고 있는 것이다. 이러한 장내미생물은 섭취하는 음식물, 생활환경, 스트레스에 의해 영향을 받으며 질병의 발생과 밀접한 관계가 있다. 예를 들면, 육류의 섭취가 많은 서양인들은 동양인들보다 대장암 발생이 높다. 그러나, 핀란드인의 경우는 육류의 섭취가 많은데도 대장암의 발생이 현저히 낮았으며 그 이유는 요구르트 섭취에 의한 것으로 밝혀졌다. 따라서 장내환경은 대장암 등과 같은 성인병연구에

매우 중요하다고 생각된다. 식생활의 차이에서 오는 환경적 영향으로 식품섭취에 따른 장내균의 분포도 차이가 나므로 한국인의 장내에서의 정착 및 적응 수준을 볼 때 외국인으로부터 분리한 균주보다는 한국인으로부터 분리한 유산균이 우리몸에 더 적합하다고 본다. 따라서 저자들은 장내 세균중 우세균이며 유용균인 *Bifidobacterium spp.*을 건강한 한국인으로부터 분리하고 장내환경에 미치는 생리활성(완화작용, 항사하효과, 장내유해효소억제효과, 항바이러스효과, 항*Helicobacter pylori*효과, IgA생산성증가효과 등)을 조사하였다.

실험재료 및 방법

시약

p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- β -D-glucuronide, tryptophan, dimethylaminobenzaldehyde, urea, sodium nitroprusside, fructose-6-phosphate, sodium thioglycolate, disodium p-nitrophenylphosphate hexahydrate, hydroxylamine은 Sigma Chem. Co. (미국)에서 구입하였고 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. General anaerobic medium (GAM), Glucose blood liver agar (BL)은 Nissui Pharm. Co., Ltd., (일본)에서 구입하였으며 Tryptic soy (TS) broth와 agar는 Difco. Co. (미국)에서 구입하였다.

실험방법

유산균의 분리

건강한 잡식성 성인 남자 (20대, 60-70kg)의 분변으로부터 얻은 장내 세균총을 혐기성 희석 배지를 이용하여 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 배로 희석한후 BL plate에 도말하여 37°C에서 4일간 혐기적으로 배양하였다. 자라나온 여러 집락들 중 *Bifidobacterium spp.*로 추정되는 것을 선별하여 각각을 GAM 반고형배지에 접종하고 배양하여 자라나온 500여 균주중 fructose-6-phosphate phosphoketolase positive와 gram-positive 간균류를 선별하여 실험에 사용하였다.

Bifidobacteria와 HGU-3 또는 장내세균총과 동시배양

24시간 배양한 *E. coli* HGU-3와 total microflora를 균수가 ml당 10^7 개가 되도록 GAM broth로 적당히 희석하고 GAM broth 5ml에 분리한 *Bifidobacterium spp.*와 HGU-3 또는 total microflora의 농도비를 5가지 (*Bifidobacterium spp.* : total microflora = 10:0, 10:1, 10:10, 1:10, 0:10)가 되게 이식하여 24시간 배양후 배지의 pH와 각 효소활성을 측정하였다.

효소활성 측정

효소액 조제 균 배양액을 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전에 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 1ml를 가해 잘 현탁하고 효소액으로 사용하였다.

β -Glucosidase 효소활성 측정 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.3ml에 2mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.2ml, 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5N NaOH 0.4ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1ml를 가하여 원심분리 (3000rpm, 10min)한 후 상등액으로 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

β -Glucuronidase 효소활성 측정 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.38ml에 10mM

p-nitrophenyl β -D-glucuronide 0.02ml, 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 0.5N NaOH 0.5ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1ml를 가하여 원심분리 (3000rpm, 10min)한 후 상등액으로 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tryptophanase 효소활성 측정 반응혼합액 0.2ml, 0.02M tryptophan 0.2ml 및 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 30분 반응시키고 발색시약 2ml를 가하여 반응을 종료시킨 후 원심분리 (3000rpm, 10min)하고 상등액으로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. (반응혼합액 - 0.05N potassium phosphate (pH 7.5) 22.5ml, pyridoxal phosphate 2.75mg, disodium EDTA dihydrate 19.6mg, bovine serum albumin 10mg, 증류수 87.5ml; 발색시약 - 95% EtOH 94.8ml, 36N H₂SO₄ 5.2ml, p-diaminobenzaldehyde 1.47g)

Alkaline phosphatase 효소활성 측정 2mM disodium-4-nitrophenyl phosphate hexahydrate 0.1ml, 0.2M NaOH-glycine buffer (pH 9) 0.3ml 및 효소액 0.1ml를 가하여 37°C에서 3분 반응시키고 0.5N NaOH 0.5ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1ml를 가하여 원심분리 (3000rpm, 10min)한 후 상등액으로 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Urease 효소활성 측정 0.1M sodium phosphate buffer (pH7.0) 80 μ l, 효소액 20 μ l 및 5M urea 50 μ l를 가하여 37°C에서 30분 반응시키고 1N H₂SO₄ 100 μ l 가하여 반응을 종료시킨 후 용액 1 (1% phenol, 0.005% sodium nitroprusside), 용액 2 (5.5% Na₂HPO₄ · H₂O, 0.5% NaOH, 0.1% NaOCl)를 각각 1ml씩 가한 후 60°C에서 20분간 가열한 후 상온에 20분간 방치하고 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

대장암 병태 모델동물

실험에서 사용한 생쥐는 대한동물사에서 구입 후 실험실에서 일주일이상 적응시킨 후, 사용하였으며 사료는 삼양사사료를 분말화하여 공급하였고 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 실험실에서 분리한 유산균주 K-110, K-111, K-525이 1,2-dimethylhydrazine (DMH)에 의한 대장암 유발을 억제하는지를 조사하기 위하여 생쥐를 정상식이군, K-110식이군, K-111식이군, K-525식이군, DMH투여 정상식이군의 5군으로 분류하여 분말화된 식이에 각 유산균을 습중량이 체중 10g당 50mg이 되게 섞어서 공급하였다. 아울러 Kg당 20mg의 DMH를 K-110식이군, K-111식이군, K-525식이군, DMH투여 정상식이군에게 피하주사하고 정상식이군에는 DMH대신에 생리식염수를 피하주사했다. 생리식염수 및 화학적발암원인 DMH 주사는 1주일 1회씩 총 10회에 걸쳐 실시하였고 각 군별 분변의 pH 및 장내 유해효소 활성을 1주 1회 측정하여 변화를 살펴보았다. 그리고 16주 되었을 때 ether로 마취시킨 후 대장을 절개하고 10% buffered formalin 고정액에 담그었다. 24시간 방치한후 rectum, descending, transverse, ascending의 4부분으로 나누어 0.2% salined methylene blue로 염색하여 광학현미경으로 대장암 발생의 지표가 되는 aberrant crypt (AC)와 aberrant crypt focus (ACF)수를 관찰하였다.

소장 및 대장 수송능 실험

소장 수송능의 측정에는 하룻밤 절식시킨 생쥐 1군을 10마리로 하여 검액 (한국형 유산균 현탁액)을 경구 투여하고난 1시간 후, 25% BaSO₄ 용액 0.2ml를 경구투여하여 60분 후, 개복해 전체 소장길이에 대한 BaSO₄의 이동 거리 비를 구했다.

이동율(%)=(BaSO₄ 이동거리 / 위유문부로부터 맹장까지의거리) x 100

대장 수송능의 측정은 하룻밤 절식시킨 생쥐 1군을 10마리로 하여 검액 (한국형 유산균 현탁액)을 경구 투여하고난 1시간 후, 25% BaSO₄ 용액 0.2ml를 경구투여하고 분변 중 BaSO₄가 배설될 때까지 걸린 시간을 측정하였다.

항사하효과 실험

생쥐 1군을 10마리로 하여 검액 (한국형유산균현탁액)을 투여하고 3시간후 45% castor oil (용매 olive oil) 0.1mg/10g씩을 경구투여하고 castor oil 투여후1시간 간격으로 분변의 수분량 (%)을 측정한다.

항돌연변이 실험

한국형유산균 *Bifidobacterium* K-110, K-111, *Bifidobacterium* K-525을 사용하여 돌연변이원으로 S9 mix를 필요로하는 1,2-benzopyrene, 2-aminofluorene과 S9 mix를 필요로하지않는 돌연변이원으로 sodium azide 등을 사용하였다. Maron과 Ames의 방법에 준하여 preincubation test를 이용하여 *Bifidobacterium*의 돌연변이 억제효과를 조사하였다. *Bifidobacterium* 균주들은 TS (환원제첨가)배지에서 혐기적으로 배양후 균체를 20mM phosphate buffer (pH 7.4)로 3회 세척후 동결건조시켰다. 20mM phosphate buffer (pH 7.4) 용액 0.25ml에 돌연변이원 1-nitropyrene (100µg/ml), 1,2-benzopyrene (5mg/ml), sodium azide(150µg/ml), 2-aminofluorene (1 mg/ml in DMSO)를 30µl 등을 섞고 동결균체 0.02ml (3mg)을 첨가하여 37C에서 3시간 배양후 원심분리하여 얻은 상등액을 취하였다. 이 상등액의 30µl를 취하여 45°C의 2.3ml top agar와 TA98균주 또는 TA100균주 배양액 100µl 와 S9mix 500µl (sodium azide 및 1-nitropyrene은 제외)를 첨가하여 최소 글루코스 한천평판배지에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양후 복귀콜로니수를 측정하였다.

Ig A 항체생산성 측정

분리한 lymphocytes를 96well plate에 well당 5x10⁵개씩 되게 하고 유산균을 첨가하고 MEM배지에서 7일동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양했다. Anti-LPS Ab 측정을 7일 후 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의하여, 먼저 증류수에 현탁한 *E coli* LPS(1 µg/well)를 well에 1시간동안 coating한 후 sample을 첨가하고 1시간 방치했다. Anti-mouse IgG와 anti-mouse IgA (peroxidase labeled)(1:10000)를 첨가하고 1시간 방치후 OPD solution (4mg/5ml D.W.)과 0.02% H₂O₂ 혼합액을 첨가하고 40분 방치 후 2.5M H₂SO₄로 반응을 정지시키고 492nm에서 흡광도를 측정했다.

Rotavirus 감염억제효과

MA 104 cell을 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 떼어낸 다음 new media를 가하고 이것을 1200rpm에서 5분동안 원심분리한 후 상등액을 버리고 원하는 농도인 5x10⁵cells/ml이 되도록 infection media로 맞췄다. MA 104 cell과 Wa virus를 가한 well에 유산균 및 유산균성분을 가하여 CO₂ incubator에서 37°C, 5% CO₂ gas로 포화된 조건에서 7일간 배양한 후 cpe를 관찰하여 rotavirus 감염억제효과를 측정했다.

***Helicobacter pylori* 증식억제 효과**

7% horse serum을 가한 brucella agar plate에 *Helicobacter pylori*를 37°C, 미호기성조건에서 3일간 배양한 후 집균하여 10% FBS를 가한 brucella broth로 이식하고 37°C, 미호기성조건에서 3일간 배양하여 균액으로 사용했다. 유산균은 GAM broth에 배양하여 집균하고 7% horse serum을 가한 brucella agar plate에 섞은 후 *H. pylori*를 배양하여 그 증식억제정도를 관찰했다. 또한 유산균에 의해 생성되는 acetic acid, lactic acid, propionic acid 등의 유기산에 대해서도 같은 방법으로 *H. pylori* 증식억제효과를 측정했다.

결과

분리한 유산균주 중 우수균 선별

건강한 20대의 한국인으로부터 장내균총을 받아 적당량 희석하여 BL배지에 도말하여 500여개의 유산균을 분리하였다. GAM배지에 2-3일 배양후 자라 나온 것을 다시 GAM broth 배지에서 배양후 gram염색하여, gram양성을 나타내는 간균이나 구균을 선택하여 F6PPK, β -glucuronidase 및 tryptophanase 효소활성, pH 저하 활성, 유해균인 *E. coli* HGU-3와 동시배양시의 pH, 유해효소 생산억제활성에 대한 결과로 10종의 우수균을 선별하였다. 우수균은 Table 1를 통하여 2가지 기준으로 선별하였다 (Table 1). 첫째는 단독으로 배양했을 때 F6PPK의 활성이 나타나며, 배지의 pH 저하정도가 크고 β -glucuronidase와 tryptophanase의 활성이 나타나지 않는 것이고 둘째는 *E. coli* HGU-3와 동시배양했을 때 배지의 pH저하효과가 크고 *E. coli* HGU-3이 생산하는 유해효소인 β -glucuronidase와 tryptophanase의 활성을 억제하는 효과가 우수한 균주로 한국인 유래의 우수균으로 선별된 bifidobacteria는 K-103, K-105, K-110, K-111, K-309, K-311, K-321, K-506, K-513, K-525이다. 10종의 우수균중에서도 유해효소활성의 저해효과와 F6PPK의 활성이 가장 우수하게 나타난 균주는 K-110, K-111이었다.

Bifidobacteria와 장내 세균총을 동시배양시 유해효소의 억제 효과

Bifidobacteria와 장내세균총을 5가지의 농도차 (*Bifidobacterium spp.* : total microflora = 10:0, 10:1, 10:10, 1:10, 0:10)로 동시배양하여 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, alkaline phosphatase, urease, ammonia를 측정하였다. 이 실험은 장내세균총이 지니는 각각의 효소들이 bifidobacteria에 의해서 얼마나 억제되어지고, bifidobacteria의 농도에 얼마만큼 의존적인가를 알아보고자 하였다.

β -Glucosidase 효소활성은 장내세균총을 bifidobacteria와 동시배양함에 의해 현저히 억제되었으며 bifidobacteria의 농도증가에 따른 억제정도가 비례하였고, 동시배양한 결과 β -glucuronidase효소활성을 강력하게 억제하였다 (Fig. 1). β -Glucuronidase는 *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Eubacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.* 균주에 의해서 생산되며 이 효소의 활성은 장내의 pH가 증가하면 유도되는 것으로 알려져졌다. Tryptophanase는 대부분의 모든 장내세균총에 의해 생산되나, 특히 *E. coli*, *Parcolobacterium coliform*, *Proteus vulgaris*, *Bacterodes spp.*, *Aeromonas liquefacienes*, *Photobacterium harveri*, *Corynebacterium acnes*에서

는 이 효소의 생산성이 높다. 이러한 방광암 및 대장암을 일으키고 있는 것으로 알려진 인들을 생산하는 장내세균총의 tryptophanase 효소활성은 bifidobacteria와 동시배양한 경우 현저히 억제되었으며 bifidobacteria의 농도에 따른 억제정도가 비례하였으며, K-105, K-110, K-111 등이 가장 우수하였다. 이러한 결과로부터 이 bifidobacteria는 인들의 생산을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. Alkaline phosphatase 효소활성도 bifidobacteria에 의해 생산성이 억제되었으며 bifidobacteria의 농도에 의존적이었다. 그러나 ammonia를 생산하는 urease는 실험에서 측정된 효소중 bifidobacteria에 의해서 억제되는 정도가 가장 약하였으나 그중 K-110, K-309가 우수하게 나타났다. 장내 ammonia의 생산에 미치는 효과를 측정된 결과 분리한 bifidobacteria 모두가 암모니아 생산을 억제하였으며 bifidobacteria의 농도에 의존적이었다 (Fig. 1). 이처럼 bifidobacteria과 장내세균총을 동시 배양했을 때 효소에 따라 차이는 있으나 bifidobacteria에 의한 유해효소의 저해효과를 볼 수 있었고 또한 농도에 의존적이었다. 따라서 장내세균총이 유해세균에서 bifidobacteria 등의 유익한 균주로 바뀐다는 것은 유해세균의 독소분비량을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 발암유도 효소의 생산활성을 저해시킨다는 면에서도 바람직한 현상으로 기대되어진다.

***In vivo*에서의 bifidobacteria의 증식효과와 장내유해효소 억제효과**

선별한 우수균 10종 중에서 최종적으로 가장 우수한 균 3종인 *Bifidobacterium* K-110, K-111, K-525에 대해 *in vivo*에서의 유산균 증식효과와 장내 유해효소 억제효과를 알아보았다.

생쥐를 4군으로 나누어 각각 정상식이, K-110, K-111, K-525 등의 분리한 bifidobacteria를 경구투여한 후 분변을 받아 BL blood agar, GAM, TS agar배지를 이용하여 총균수, 대장균수, *Bacteroides*균수, bifidobacteria균수 등을 측정하였다. 측정결과, K-525를 섭취시킨 군에서 bifidobacteria가 가장 높은 비율로 관찰되었고 K-110군과 K-111군은 같은 수준으로 나타났다. K-525군은 총균에 대한 bifidobacteria의 비율이 대조군의 2배 수준으로 나타나 2배의 증식효과를 갖는 것을 알 수 있었다. *Bacteroides*는 K-110군과 K-111군이, *Eubacterium*은 K-525군에서 높게 나타났다. Bifidobacteria를 생쥐에 투여하여 장내의 효소활성변화를 관찰한 결과, β -glucosidase, β -glucuronidase활성은 bifidobacteria 투여 후 2-3주까지는 억제효과가 거의 없었으나 투여 4주후부터 억제되기 시작하여 그 이후는 대조군에 비해 현저히 억제됨이 관찰되었고 tryptophanase활성은 투여 4주후부터 서서히 억제되기 시작하여 그 이후는 대조군에 비해 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다. Alkaline phosphatase활성에는 분리한 bifidobacteria가 영향을 미치지 못했고 urease 및 ammonia생산은 bifidobacteria 투여 3주후부터 현저히 억제되었으며 K-110이 가장 우수한 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 따라서 본 실험도 bifidobacteria를 직접 섭취시킴으로 인해 장내 유해균의 저하에 기인하여 각 효소활성의 저하결과가 나타난 것으로 사려된다.

Bifidobacteria의 대장암 억제효과

실험실에서 분리한 *Bifidobacterium* spp. K-110, K-111, K-525의 DMH에 의한 대장암 유발을 억제하는지를 조사하기 위하여 생쥐를 정상식이군, K-110식이군, K-111식이군, K-525식이군, DMH투여 정상식이군 5군으로 나누어 실험하였다. 앞서 실험한 것과 같이 각 bifidobacteria의 식이투여 기간 중에 실험동물의 분변으로부터 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, alkaline phosphatase, urease 및 ammonia 효소활성을 조사하였다. 그 결과는

Fig. 2에서와 유사한 결과를 나타냈다 (Fig. 3). β -Glucosidase와 β -glucuronidase는 bifidobacteria 투여 초기에는 변화가 없다가 투여 5주가 지나면서 감소효과가 나타났고 tryptophanase와 urease의 활성은 bifidobacteria투여 3주, 4주째부터 꾸준한 저하효과가 나타났다. Ammonia생산은 bifidobacteria투여 3주후부터 현저히 억제되었으며 Fig. 2에서와는 달리 K-111이 가장 우수한 효과를 나타내었다.

Bifidobacteria 식이섭취후 16주가 되었을 때 대장암 발생의 지표가 되는 AC수를 측정하여 대장암억제효과를 관찰하였다. DMH만을 투여한 군은 실험한 생쥐 10마리중 10마리 모두 AC가 발생하였으나 bifidobacteria를 투여한 군에서는 발생률이 각각 10%정도 낮아졌다 (Table 2). DMH만을 투여한 군에서는 총 AC/focus의 수나 총 ACF의 수가 각각 5.3, 68.5로, 각 bifidobacteria투여 군은 DMH군에 비해 억제된 결과를 볼 수 있다. 특히 K-525투여군은 focus당 AC와 총 ACF가 4.7, 6.2로 AC의 발생이 현저히 감소된 것을 볼 수 있었으며 K-110, K-111군주 모두 비슷한 정도의 ACF발생 억제효과를 나타냈다. AC의 발생분포를 보면, 직장 보다는 하행결장과 횡행결장에 발생비율이 높게 나타났다.

소장 수송능효과

K-110의 고농도를 투여한 경우를 제외하고는 실험에 이용한 한국형 유산균의 소장의 수송능효과는 거의 효과가 없었다 (Table 3).

대장수송능효과

유산균을 투여한 군 모두 효과가 우수했으며 K-110을 투여한 경우가 가장우수했으며 그다음은 K-111, K-525순이다. 특히 K-110의 경우는 저농도에서는 35%, 고농도의 경우는 약 45%이상의 배변 촉진효과를 나타내 변비를 예방하거나 치료하는 효과가 우수할 것으로 사려되었다 (Table 4).

항사하 효과

항사하효과는 K-110과 K-525군주는 약하게 효과는 있었으나 유의한 효과는 없었다. 그러나 K-111의 경우는 castor oil에 의한 설사를 거의 대조군 수준으로 억제하여 우수한 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 유산균이 설사와 변비를 동시에 치료할 수 있다는 근거를 마련함과 동시에 K-111과 같은 경우는 항생물질 또는 신경성설사에 유효할 것으로 생각되었다 (Table 5).

항돌연변이효과

한국형 유산균 모두 우수한 항돌연변이효과를 나타냈으며 실험군주중에서는 K-110, K-111, K-525 순이었다(Table 6). 이미 유산균이 항돌연변이효과가 있다고 보고된 것보다 우수한 20-80% 이상의 항돌연변이효과를 나타냈다. 시험한 군주중에서는 K-110군주가 우수하였으며 16-75% 정도의 항돌연변이효과를 나타냈다. 이러한 효과가 세포벽성분에 의한 것인지를 조사하기위해 세포벽성분에 대해 조사한 결과 K-110CW, K-111CW, K-525CW순이었다. 가장우수한 효과를 나타냈던 K-110CW군주는 10-80% 정도의 항돌연변이효과를 나타냈다.

Rotavirus의 감염억제 효과

시험에 이용한 유산균 (50 여종 이상)에 따라 현저한 차이가 있었으며 분리유산균중에서는 K-110균주가 가장 감염억제효과가 우수했다. K-100이 생산하는 바이러스 감염억제물질은 열에 불안정한 분자량 20만이상의 단백질로 생각된다.

IgA생산성증가효과

시험에 이용한 유산균(50 여종 이상)에 따라 현저한 차이가 있었으며 분리유산균중에서는 K-110균주가 가장 감염억제효과가 우수했다.

***Helicobacter pylori*에 대한 항균효과**

시험에 이용한 유산균(50 여종 이상)에 따라 현저한 차이가 있었으며 분리유산균중에서는 K-110균주가 가장 감염억제효과가 우수했다. 유산균이 생산하는 유기산류에 의한 항균력도 있었지만 이것보다는 유산균이 생산하는 특특한 화합물에 기인되는 것으로 추정된다.

참고 문헌

1. 김석중 : 올리고당의 건강증진효과, 식품기술, 8, 140-145 (1995)
2. 임상동 : 비피더스균과 올리고당의 관계, 식품기술, 8, 97-105 (1995)
3. 하성규 : 기능성 식품, 광일문화사 (1992)
4. B. Goldin and L. Gorbach *Cancer*, 40, 2421-2426 (1997)
5. 박현서, 이영순, 구성자, 한명주, 조여원 : 식생활과 건강, 효일문화사, pp185-206 (1995)
6. 光岡知足 : 유산균과 건강생활, 유한문화사, pp62-160 (1990)
7. D. G. Hoover *Food Technol.* 47, 120-124 (1993)
8. 강국희 : 유산균식품학. 성균관대학교 출판부, pp17-69 (1996)
9. G. R. Gibson and M. B. Roberfroid *J. Nutr.*, 125, 1401-1412 (1995)
10. S. Seppo, M. Laine, A. V. Wright, V. V. Jaana, K. Timo and M. S. Tina : *Biosci. Microflora*, 15, 61-67 (1996)
11. I. Hirokazu, M. Hiroko, F. Tomohiko, S. Hideki and M. Tomotari : *Bifidobacteria Microflora*, 12, 39-45 (1993)
12. C. P. Champagne, Y. Raymond, F. Mondou and J. P. Julien : *Bifidobacteria Microflora*, 14, 7-14 (1995)
13. I. Noria and S. Seichi : *Food Technol.*, 47, 126-135 (1993)
14. 차성관 : 식품기술, 7, 3-12 (1994)
15. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons : *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1974)
16. S. Salminen and A. V. Wright : *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, Inc, pp1-63 (1993)
17. B. J. B. Wood : *Sci*, pp171-192 (1992)
18. G. Gottschalk : *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag (1986)
19. H. W. Modler, R. C. McKellar and M. Yaguchi : *J. Inst. Can. Sci. Technol.*, 23, 29-41 (1990)
20. 양한철, 식품신소재학, 한림원, pp187-199 (1996)

21. D. J. Hentges : Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press. New York (1983)
22. 고가영, 식품기능화학, 지구문화사, pp177-232 (1993)
23. A. D Hitchins, P. Wells, F. E. McDonough and N. P. Wong : *Am. J. Clin Nutr.*, 41, 92-100 (1985)
24. D. B. Hughes and D. G. Hoover : *Food Technol.*, 45, 74-81 (1991)
25. M. S. Shin, Y. J. Kim, H. S. Bae and Y. J. Baek : *Kor. J. Appl Microbiol. Biotechnol.*, 24, 254-260 (1996)
26. M. A. Daeschel : *Food Technol.*, 43, 164-167 (1989)
27. 김동현, 한명주 : 약학회지, 39, 169-174 (1995)
28. B. Yoshimi and M. Tomotari : *Microbiol Immunol*, 36, 683-694 (1992)
29. 이기은, 최원호, 지근역 : 한국식품과학회지, 28, 981-986 (1996)
30. A. K. Tomoko, V. Tomoko, I. Norio, S. Seiichi and H. Hirotooshi : *Biosci. Microflora*, 15, 17-22 (1996)
31. V. N. Scott and S. L. Taylor : *J Food Sci.*, 46, 117-120 (1981)
32. 강국희 : 비피더스균과 올리고당, 유한문화사, pp88-108 (1994)
33. A. D. Newcomer, H. S. Park, P. C. O'Brien and D. B. McGill : *Am J. Clin. Nutr.*, 38, 257-263 (1983)
34. D. A. Savaiano, A. AbouElAnouar, D. E. Smith and M. D. Levitt : *Am. J Clin Nutr.*, 40, 1219-1223 (1984)
35. H. S. Kim : *Cult dairy Prod J.*, August, 6-9 (1988)
36. F. E. McDonough, A. D. Hitchins, N. P. Wong, P. Wells and C. E. Bodwell : *Am J. Clin Nutr.*, 45, (1987)
37. 이상영, 콜레스테롤, 신광출판사 (1990)
38. G. Hepner, R. Fried, S. Jeor, L. Fusetti and R. Mori : *Am J Clin. Nutr.*, 32, 19-24 (1979)
39. D. R. Rao, C. B. Chawan and S. R. Pulusani : *J. Food Sci.*, 46, 1339-1341 (1981)
40. C. Osamu, M. Kumiko, I. Humiyasu, I. Akira and W. Masaaki : *Biosci. Microflora*, 16, 19-21 (1997)
41. J. E. Spiegel, R. Rose, P. Karabell, V. H. Frankos and D. F. Sahmitt : *Food Technol.*, 48, 85-89 (1994)
42. 윤종원, 노태욱, 강선철 : 한국식품과학회지, 28, 203-206 (1996)
43. 한명주, 배은아, 이영경, 김동현 : 한국식품과학회지, 28, 947-952 (1996)
44. G. R. Gibson, E. R. Beatty, X. Wang and J. H. Cummings : *Gastroenterology*, 108, 975-982 (1995)
45. M. Yoshiyuki, Y. Hideaki, S. Kiwamu, K. Nobutake and T. Hajime : *Bifidobacteria Microflora*, 12, 19-24 (1993)
46. 최소영, 김유경, 윤선 : 한국식품과학회지, 28, 987-993 (1996)
47. M. D. Howard, D. T. Gordon, K. A. Garleb and M. S. Kerley : *J Nutr.*, 125, 2604-2609 (1995)
48. 김동현, 한명주 : 성인병과 장내세균, 효일문화사, pp35-36 (1997)

49. B. S. Reddy, A. Mastromarino and E. Wynder : *Cancer*, 39, 1815-1819 (1977)
50. J. H. Weisburger, B. S. Reddy and E. L. Wynder : *Cancer*, 40, 2414-2420 (1977)
51. K. Kyotaro, K. Fumio, M. Tomotari, T. Atsushi, I. Kikuji, N. Seiko, K. Megumi, K. Hiroyuki : *Cancer*, 77, 1701-1706 (1996)
52. T. Narisawa, R. Maronpot, J. H. Weisburger and E. L. Wynder : *Cancer Res.*, 35, 3421-3426 (1975)
53. A. J. Mastromarino, B. S. Reddy and E. L. Wynder : *Cancer Res.*, 38, 4458-4462 (1978)
54. J. L. Freudenheim, S. Graham, P. J. Horvath, J. R. Marshall, B. P. Haughey and G. Wilkinson : *Cancer Res.*, 50, 3295-3300 (1990)
55. T. Keisuke, H. Emiko, G. U. Nakagawa and S. Masuo : *Biosci. Microflora*, 15, 77-84 (1996)
56. S. Kazunori, W. S. Emiko, O. Jun, T. Tomohiro, T. Taro, K. Takuji and H. Yoshiyuki : *Bifidobacteria Microflora*, 13, 65-77 (1994)
57. T. Hideho, H. Takao, H. Yoshifumi and Y. Masakatsu : *Cancer Res.*, 42, 331-334 (1982)
58. J. H. Weisburger : *Biosci. Microflora*, 15, 53-60 (1996)
59. Y. Hisako and M. Ohwaki : *J. Dairy Sci.*, 74, 1187-1195 (1991)
60. Y. Hisako, A. Mike, and M. Ohwaki : *J. Dairy Sci.*, 72, 30-35 (1989)
61. Q. Liu, O. Masaki, K. Shiro and K. Kyotaro : *Biosci. Microflora*, 15, 85-92 (1996)
62. S. Kazunori, T. Tomohiro, S. Minoru, K. Morio, K. Takuji and H. Yoshiyuki : *Cancer Res.*, 45, 1300-1307 (1985)
63. P. Chevalier, D. Roy and P. Ward : *J Appl Bacteriol*, 68, 619-624 (1990)
64. P. Y. Lee, P. B. McCay and R. Hornbrook : *Biochem. Pharmacol*, 31, 405-409 (1982)
65. 서보권, 정연봉, 김용규, 신옥진, 이종철 : *약학회지*, 37, 270-277 (1993)
66. 김남재, 이석주, 권창호, 홍남두 : *생약학회지*, 26, 3680-376 (1995)
67. K. Murai, K. Hisamitsu, L. Imamura and K. Kobashi : *Bifidobacteria Microflora*, 13, 91-98 (1994)

Table 1. The inhibiting effect of the representative bifidobacteria isolated from human intestinal microflora on the harmful enzyme activity of *E coli* HGU-3.

<i>Bifidobacterium</i>	pH	F6PPK ¹⁾	Inhibition ²⁾	
			β -Glucuronidase	Tryptophanase
K-103	4.8	+	+++	+++
K-105	4.6	++	+++	+++
K-110	4.8	+++	+++	+++
K-111	4.9	+++	+++	+++
K-309	5.5	+++	++	++
K-311	5.5	++	++	+++
K-321	5.5	+++	++	+++
K-506	4.8	+	+++	+++
K-513	5.3	+	+	+++
K-525	5.4	+	++	+++

¹⁾ -, None ; +, Weak ; ++, Moderate ; +++, Strong.

²⁾ -, None ; +, Weak inhibition ; ++, Moderate inhibition ; +++, Strong inhibition.

Table 2. Effect of the isolated bifidobacteria on formation of ACF and AC in mouse colon induced by DMH

Group	Incidence	No.ACF/colon	No.AC/focus	Distribution(%)	
				R	S&D
DMH control	10/10	68.5	5.3	23.5	76.5
<i>Bifidobacterium</i> K-110	9/10	7.2	4.6	25.0	75.0
<i>Bifidobacterium</i> K-111	9/10	10.3	4.7	26.2	73.8
<i>Bifidobacterium</i> K-525	9/10	6.2	4.7	19.4	80.6

Table 3. Effect of the Korean Bifidobacteria on transport of barium sulfate in the small intestine of mice (n=10)

Group	Dosage (mg)	Mobility (%)
Control	0	61.4 ± 7.9 ^{a)}
	250	64.8 ± 4.9
K-110	500	54.4 ± 3.7
	250	58.8 ± 4.0
K-111	500	58.7 ± 6.1
	250	55.1 ± 5.0
K-525	500	65.1 ± 5.2

^{a)} Mean ± SD

Table 4. Effect of the Korean Bifidobacteria on transport of barium sulfate in the large intestine of mice (n=10)

Group	Dosage (mg)	Mean ± SD (min)
Control	0	321.8 ± 11.3
K-110	250	215.0 ± 25.0 ^b
	500	179.6 ± 10.8*
K-111	250	280.2 ± 29.3*
	500	235.8 ± 22.6*
K-525	250	272.4 ± 29.0*
	500	276.2 ± 28.8*

^{a)} Mean ± S.D.

* statistically significant compared to control group (p<0.05).

Table 5. Effect of the Korean bifidobacteria on the fecal water contents of castor oil-induced diarrheal mice

Group	Dosage (mg)	Hours after Caster Oil Treatment		
		0	1	3
Control		47.62 ± 5.38	59.17 ± 1.36	60.65 ± 4.54
K-110	500	46.86 ± 4.84	59.82 ± 9.71	56.82 ± 2.62
K-111	500	43.01 ± 0.54	50.00 ± 7.12*	46.64 ± 1.89*
K-525	500	45.00 ± 4.31	66.10 ± 0.63	59.26 ± 4.72

a) Mean ± S.D.

* statistically significant compared to control group (p<0.05).

Table 6. Effects of *Bifidobacterium* cells on the antimutagenicity against 1,2-benzopyrene, 1-nitropyrene, 2-aminofluorene, sodium azide in *Salmonella typhimurium*

	No. of Revertants by Mutagen Minus No of Spontaneous Revertants							
	TA98				TA100			
	1-Nitro pyrene	Sodium azide	1,2-Benzo pyrene	2-Amino fluorene	1-Nitro pyrene	Sodium azide	1,2-Benzo pyrene	2-Amino fluorene
Control	1170 ± 41 ^{a)}	- ^{b)}	82 ± 7	725 ± 52	-	358 ± 6	212 ± 8	631 ± 57
K-110	984 ± 262*	-	22 ± 26*	322 ± 26*	-	74 ± 44*	97 ± 15*	439 ± 48*
K-111	879 ± 164*	-	3 ± 4*	306 ± 34*	-	172 ± 5*	50 ± 23*	529 ± 11*
K-525	1194 ± 13*	-	4 ± 1*	516 ± 77*	-	188 ± 7*	76 ± 17*	324 ± 72*

a) not detected.

b) Mean ± S.D.

* statistically significant compared to control group (p<0.05).

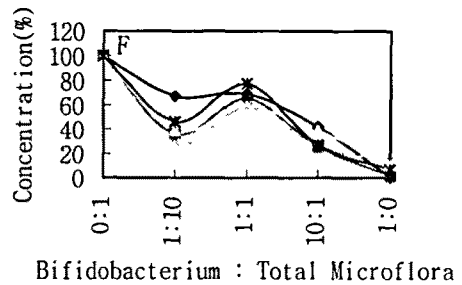
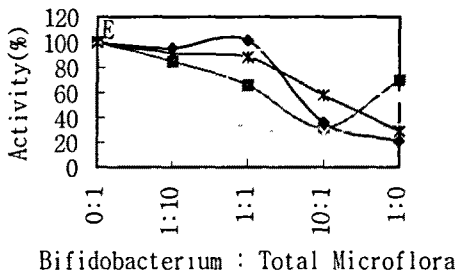
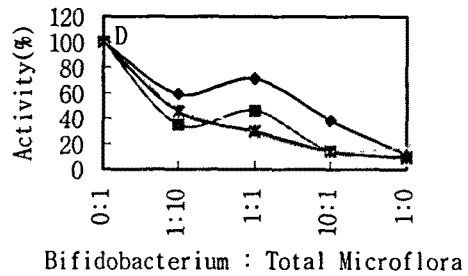
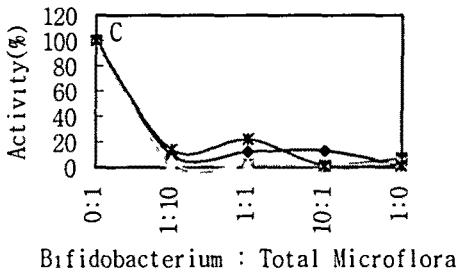
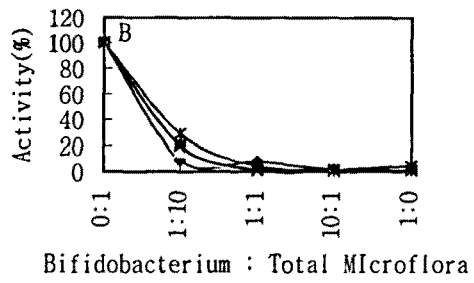
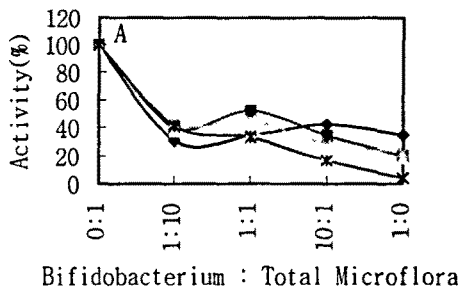


Fig 1. The inhibitory effect of the isolated bacteria on harmful enzyme activities and ammonia production of human intestinal microflora. A, β -glucosidase; B, β -glucuronidase; C, tryptophanase; D, alkaline phosphatase; E, urease; F, ammonia. \blacklozenge , K-103; \blacksquare , K-105; \blacktriangle , K-110; \blacklozenge , K-111; \blackstar , K-309.

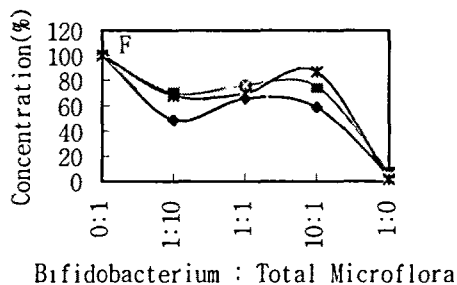
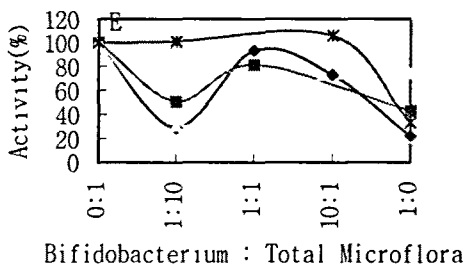
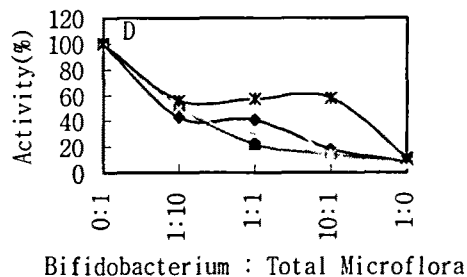
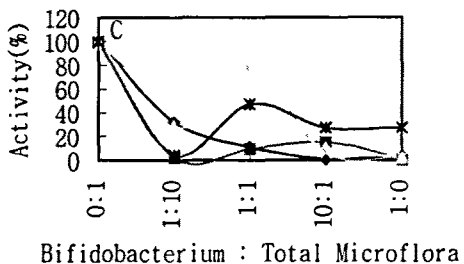
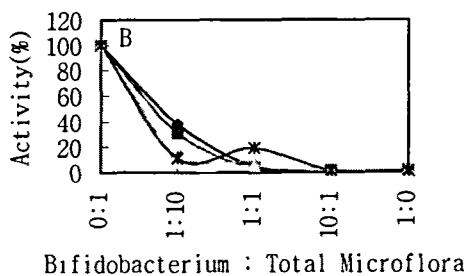
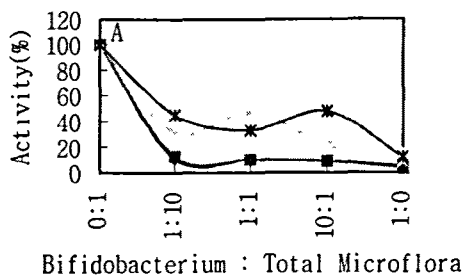


Fig. 1. (continued)

The inhibitory effect of the isolated bacteria on harmful enzyme activities and ammonia production of human intestinal microflora. A, β -glucosidase; B, β -glucuronidase; C, tryptophanase; D, alkaline phosphatase; E, urease; F, ammonia. ◆, K-311; ■, K-321; ●, K-506; ▲, K-513; ※, K-525.

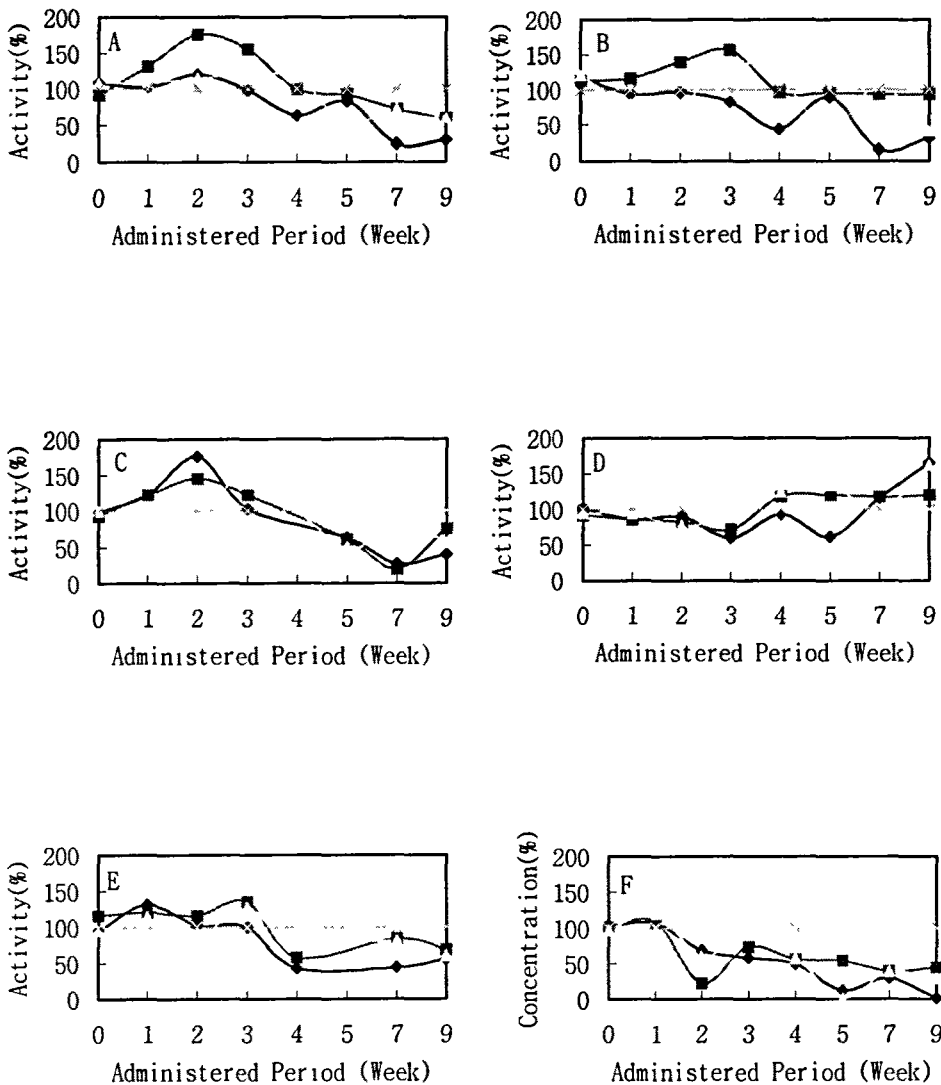


Fig. 2. *In vivo* inhibitory effect of the isolated bacteria on harmful enzyme activities and ammonia production of feces on mice. A, β -glucosidase; B, β -glucuronidase; C, tryptophanase; D, alkaline phosphatase; E, urease; F, ammonia. \blacklozenge , K-110; \blacksquare , K-111; \triangle , K-525; \circ , Control.

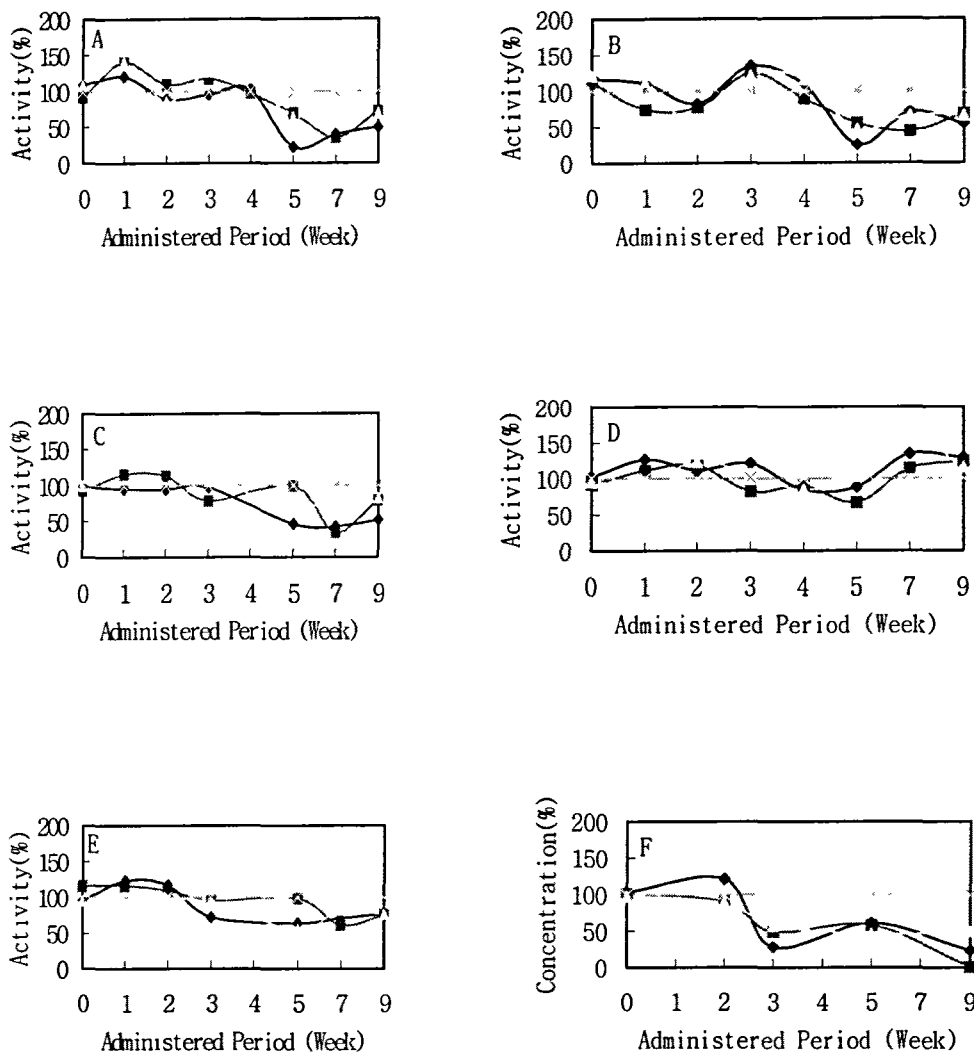


Fig. 3. In vivo inhibitory effect of the isolated bacteria on harmful enzyme activities and ammonia production of feces on mice. A, β -glucosidase; B, β -glucuronidase; C, tryptophanase; D, alkaline phosphatase; E, urease; F, ammonia. ♦, K-110; ■, K-111; ▲, K-525; ○, DMH.