

## ***Bifidobacterium longum* HY8001의 섭취가 사람의 장내세균총 및 장내세균 효소에 미치는 영향**

이완규\*, 이상명·배형석<sup>1</sup>·백영진<sup>1</sup>

충북대학교 수의과대학, <sup>1</sup>(주)한국야쿠르트 중앙연구소

**Effect of *Bifidobacterium longum* HY8001 Administration on Human Fecal Bacterial Enzymes and Microflora.** Lee, Wan-Kyu\*, Sang-Myeong Lee, Hyoung-Suk Bae<sup>1</sup>, and Young-Jin Baek<sup>1</sup>. College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>1</sup>Korea Yakult Company Ltd., R & D Center, Komae-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si, Kyunggi-Do 449-900, Korea – The effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 supplement intake on the fecal microflora and fecal bacterial enzyme activity were studied in ten healthy human volunteers, before, during and after intake (respectively for 3 weeks). During intake of *B. longum* HY8001 supplement, fecal,  $\beta$ -glucuronidase and nitroreductase activities significantly decreased 44.6% ( $p<0.005$ ) and 32.3% ( $p<0.01$ ), respectively. Although numbers of major bacterial groups of fecal microflora were not affected by *B. longum* HY8001 intake for 3 weeks, the number of *Bifidobacterium* was significantly increased ( $p<0.05$ ). This result indicates that intake of *B. longum* HY8001 might be potentially beneficial for the prevention and inhibition of colon cancer and improvement of human intestinal microflora composition.

**Key words:** *Bifidobacterium longum* HY8001,  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase, fecal microflora

현대인들은 건강에 많은 관심을 가지게 되었으며, 우리나라에서도 최근에 암이 중요한 사망 원인을 차지하면서 많은 관심을 받게 되었다. 북미와 북서 유럽 사람들에서는 결장암이 많이 발생하며, 한국과 일본 사람들에서는 위암이 많이 발생하는 것은 잘 알려진 사실이다[6]. 그러나 최근에는 우리나라와 일본에서도 결장암의 발생이 증가하고 있으며, 이것은 식생활의 서구화에 의한 것으로 생각되어진다. 결장암의 발생은 육류 소비와 밀접한 관계가 있으며[1], 지방식의 다량 섭취와 식이섬유의 섭취 감소가 결장암 발생을 증가시키는 것으로 알려지고 있다.[23, 24]. 핀란드의 쿠퍼오족은 고지방식의 식생활에도 불구하고, 다른 서유럽의 민족에 비해 결장암 발생률이 낮은 것으로 역학조사 결과 밝혀졌으며[15], 이것은 그들이 많은 발효유제품과 섬유질을 섭취하기 때문이라고 생각되어진다.

Drasar 등은 결장암의 발생이 장내세균총에 의한 발암물질과 발암촉진 물질의 생성에 기인한다고 보고하였다[5]. 즉 섭취된 식이와 담즙으로 배설된 담즙산이 장내미생물의 효소작용에 의해 여러 가지 화학물질로 전환되고, 이들 중 빌암물질과 발암촉진물질이 결장암, 유방암, 위암의 발생을 촉진하는 것으로 추측하였다[5, 24]. 이 반응에 관여하는 대표적인 장내세균의 효소로는  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase, nitroreductase, steroid 7 $\alpha$ -dehydroxylase들이 알려져 있다[8]. 결장암의 발생에 관여하는 이와 같은 장내세균 효소는 사람이

매일 섭취하는 음식물에 의해서도 많은 영향을 받으며 [18, 24]. 또한 장내에 서식하는 세균의 조성에 의해서도 이와 같은 효소의 활성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다[10, 26].

Goldin과 Gorbach 등은 발효유 제품에 사용되는 *Lactobacillus acidophilus* 균을 렛드와 사람에 경구 투여함으로써 분변내  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase, nitroreductase, steroid 7 $\alpha$ -dehydroxylase의 활성이 감소함을 확인함으로써 유산균의 결장암 예방효과를 간접적으로 시사하였다[8-10]. 또한 결장암 유발물질인 1, 2-dimethylhydrazine를 투여한 렛드에 *Lactobacillus acidophilus*를 투여한 경우 결장암의 발생이 유의성 있게 감소하였다[9].

*Bifidobacterium*은 *Lactobacillus*와 함께 대표적인 장내 유익균으로 알려져 있으며. 따라서 장관 내의 높은 균수 유지는 사람의 건강 유지와 질병 예방에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다[3, 11]. 그러나 사람에 있어서 *Bifidobacterium* 섭취에 의한 장내세균학적인 효능에 관한 연구는 현재까지 부족한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 한국인의 장관에서 분리된 *Bifidobacterium longum* HY8001 균주의 능률배양액을 건강한 성인에게 음용시킨 후, 장내세균총을 검색하고, 장내세균효소인  $\beta$ -glucuronidase와 nitroreductase의 활성을 측정함으로써 *B. longum* HY8001의 결장암 예방에 대한 효과를 확인함을 실험의 목적으로 하였다.

### **재료 및 방법**

#### **유산균**

\*Corresponding author  
Tel. 82-431-261-2960, Fax. 82-431-267-3150,  
E-mail: wklee@cbucc.chungbuk.ac.kr

본 실험에 사용한 유산균은 먼저 *B. longum* HY8001 균주[14]를 paraffin oil이 중층된 BL broth에서 37 °C, 18시간, 2회 계대 배양하고, 농축증균용 배지(TPYL media, pH 6.8)에 2% 접종한 후, ammonia gas로 pH 6.5를 유지하면서 37 °C에서 15시간 배양하였다. 배양액을 4 °C, 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 멸균된 생리식염수로 2회 세척한 후, 멸균우유에 혼탁하여 최종농도가  $1 \times 10^9$  cfu/ml 되도록 제조하였다.

### 실험대상자

임상호능실험 지원자는 21세~28세의 건강한 성인 남녀 10명(여자 5명, 남자 5명)으로 구성되었다. 실험기간 중 지원자들은 밀도유 제품, 항생제 등 장내세균총에 변화를 줄 수 있는 식품의 섭취를 제한하였으며, 그 밖에는 각자의 평소 식생활을 유지하도록 하였다.

### 유산균 음용

유산균 투여실험은 음용전 3주, 음용중 3주, 음용후 3주 씩 총 9주간 이루어졌으며, 음용중 3주 동안 임상실험 지원자들은 *B. longum* HY8001 균주 농축배양액( $1 \times 10^9$  cfu/ml) 30 ml를 매일 1회씩, 음용하였다.

### 효소활성의 측정

임상실험 지원자들의 신선한 분변 1 g을 4 °C의 협기적 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 9 ml에 회석하고 O<sub>2</sub>-free-N<sub>2</sub> 가스로 충진하였다. 원증용액은 최소한 실험 하루 전에 O<sub>2</sub>-free-N<sub>2</sub> 가스로 충진하면서 부틸 고무마개를 하여 협기적 상태를 만들고, 4 °C의 냉장상태에서 보관하였다. 분변회석액은 잘 혼합하여 4 °C에서 보관한 후, 이 회석액을 사용하여 각 효소활성을 측정하였다. 각각의 효소활성 측정시, 원심분리 후 그 상층액을 이용하여 Lowry법에 따라 단백질 정량을 실시하였다[17].

### $\beta$ -Glucuronidase assay

Goldin과 Gorbach에 의한  $\beta$ -glucuronidase 활성측정 방법을 일부 수정하여 측정하였다[8, 9]. 앞에서 만든 분변 회석액을 0°C-4°C에서 30분간 초음파 처리 후 1 ml를 취하여 eppendorf tube에 분주하였다. 이 분변 회석액은 4 °C에서 1,000×g로 10분간 원심분리한 후, 상층액 0.1 ml를 취하여 미리 37 °C에 방치한 반응액 0.9 ml와 37 °C의 항온수조에서 1시간 반응시켰다. 반응액은 최종농도가 0.02 M potassium phosphate buffer(pH 6.8), 0.1 mM EDTA, 1.0 mM phenolphthalein- $\beta$ -D-glucuronide로 구성되었다. 0.2 M glycine buffer(0.2 M NaCl 함유, pH 10.4)를 5 ml 첨가하여 반응을 정지시키고, 10분간 정치시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하고 standard phenolphthalein curve를 이용하여 유리된 phenolphthalein의 양을 구하였다. 효소활

성은 mg phenolphthalein released/hr/mg fecal protein으로 나타내었다.

### Nitroreductase 활성측정

Nitroreductase는 협기적 상태에서 활성을 나타내는 효소이므로, 분변채취 후 4시간 이내에 Rowland의 활성측정법을 일부 수정하여 실시하였다[25]. Nitroreductase 반응액(1.5 mM m-nitrobenzoic acid(Sigma사))은 측정 24시간 이전에 제조 후 4 ml씩 분주하여 협기적 상태로 냉장 보관하였다. Nitroreductase 활성은 37 °C에서 예비 가온시킨 1.5 mM m-nitrobenzoic acid(Sigma사)을 함유한 협기적 0.1 M PPB(potassium phosphate buffer(pH 7.0)) 4 ml에 앞에서 기술한 분변 회석액 1 ml을 협기적으로 첨가하였다. 그 후 37 °C의 항온수조에서 1시간 동안 진탕 배양한 후 2.5 ml의 1.2 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 후 1.5 ml를 취하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액 1 ml를 취하고 0.1% sodium nitrite 1 ml를 첨가하여 혼합한 후 3분간 반응시켰다. 그 후 0.5% ammonium sulfamate 1 ml를 첨가하여 혼합한 후 2분간 반응시키고, 0.1% naphthylethylenediamine 0.5 ml를 첨가하여 발색시켰다. 이 반응액은 550 nm에서 흡광도를 측정하고, standard curve에 기준하여 m-nitrobenzoic acid로부터 생성된 aminobenzoic acid의 양을 계산하였다. 효소의 활성은  $\mu$ g aminobenzoic acid formed/hr/mg fecal protein로 표시하였다.

### 장내세균총의 검색

임상실험 지원자들을 대상으로 1주일에 한번씩 총 9주 동안 Mitsuoka 방법에 의한 장내세균총 검색을 실시하였다[19]. 정상 장내세균총 변화를 검색하기 위하여 사용한 평판배지로는 EG, BL, TS의 비선택 배지 3종류와, DHL, TATAC, PEES, P, LBS, BS, NN의 선택배지 7종류의 합계 10종류를 사용하였다[16].

실험지원자의 신선한 분변 1 g을 협기적 회석액인 Diluent B[19] 9 ml에 회석하고, O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas로 협기적으로 치환시킨 후, 10배 단계회석을 실시하였다. 각 단계 회석액을 무균적으로 0.05 ml씩 각각의 평판배지에 1/3-1/4 구획에 접종한 후, 멸균된 spreader로 도말하였다. TS, DHL, TATAC, PEES, P 배지는 37 °C에서 호기배양을 실시하였으며, EG, BL, LBS, BS, NN 배지는 anaerobic jar에 steel wool method를 사용하여 37 °C에서, 48시간 협기배양을 실시하였다[20].

배양 종료 후, 각각의 평판배지에서 배양된 colony의 morphology를 기입한 후, 균수를 측정하였으며, Gram stain을 실시하였다. 그 후 광학현미경으로 1,000배에서 cell morphology를 확인하고 분변에 존재하는 균군을 Mitsuoka 방법에 의해 확인하였다[19]. 분변 1 g당 균수는 상용로그

값으로 환산하여 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 장내세균 효소 활성에 미치는 효과

건강한 임상실험 지원자 남녀 10명을 대상으로 *B. longum* HY8001 균주 농축배양액( $1 \times 10^9$  cfu/ml) 30 ml를 매일 1회씩, 3주간 음용시킨 후, 측정된 장내세균효소의 활성변화 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

$\beta$ -Glucuronidase 활성은 음용전 1주, 2주 3주째의 결과가  $4.7 \pm 2.57$ ,  $5.6 \pm 5.12$ ,  $4.3 \pm 2.34$ (3주간 평균  $4.85 \pm 0.65$ ) mg/hr/mg fecal protein이었지만, 음용중 3주간에는  $2.9 \pm 2.49$ ,  $2.8 \pm 2.21$ ,  $2.3 \pm 1.10$ (3주간 평균  $2.69 \pm 0.32$ )mg/hr/mg fecal protein으로 44.6%의 현저한 감소가 확인되었다( $p < 0.005$ ).  $\beta$ -Glucuronidase는 간에서 glucuronic acid와 포함되어 대장으로 이동된 발암성 물질 포함체를 가수분해하여 carcinogenic aglycone을 방출시킴으로써 암 발생에 관여하게 되므로[13], *B. longum* HY8001의 3주간 음용은  $\beta$ -glucuronidase의 활성 저하에 매우 유익한 효능이 있을 것으로 기대된다.

Nitroreductase의 활성은 음용전 1주, 2주 3주째의 결과가  $18.3 \pm 8.66$ ,  $23.6 \pm 10.40$ ,  $27.3 \pm 12.56$ (3주간 평균  $23.04 \pm 4.54$ )mg/hr/mg fecal protein이었지만, 음용중 3주간에는  $19.2 \pm 11.46$ ,  $13.6 \pm 5.93$ ,  $14.0 \pm 8.31$ (3주간 평균  $15.60 \pm 3.12$ )mg/hr/mg fecal protein으로 유의성 있게 32.3%가 감소하였다( $p < 0.01$ ). Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons(nitro-PAHs)은 주위 환경에 아주 흔한 오염물질이며[21, 27], 섭취되어 장에 도달하게 되면 nitroreductase에 의해 aromatic amine으로 전환되며, 이들 대부분은 발암성 물질로 알려져 있다[4]. 즉 이와 같은 두 가지 효소의 활성이 높다는 것은 결장암에 걸릴 가능성이 높음을 시사하며, 또한 *B. longum* HY8001의 섭취에 의한 이러한 장내미생물효소 활성의 억제는 결장암 발생을 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하게 된다.  $\beta$ -Glucuronidase와 nitroreductase의 활성은 매일 섭취하는 음식물이나 식습관에 의해서도 많은 영향을 받으며, 특히 고지방, 고단백의 식사시에 증가한다[18, 24]. 본 실험에서는 임상 실험 지원자들의 식사를 엄격히 조절하지 않았기 때문에 각 효소의 활성이 기간별 혹은 개인별로 비교적 많은 변동이 나타났다. 또한  $\beta$ -glucuronidase의 경우에는 남자보다 여자지원자에서 낮은 활성치를 나타내었는데, 이것은 남녀간의 식생활 습관의 차이도 한 요인이 될 것으로 생각된다. 예를 들어 실험 지원자에 대한 설문조사 결과, 남자 지원자의 80%가 흡연자이었던데 비해, 여자 지원자는 흡연자가 없었으며, 대체적으로 남자지원자의 음주 정도가 많았으며, 육류식사의 횟수 및 선호도도 남자가 높았다.

위와 같은 *B. longum* HY8001 농축배양액의 섭취로 분

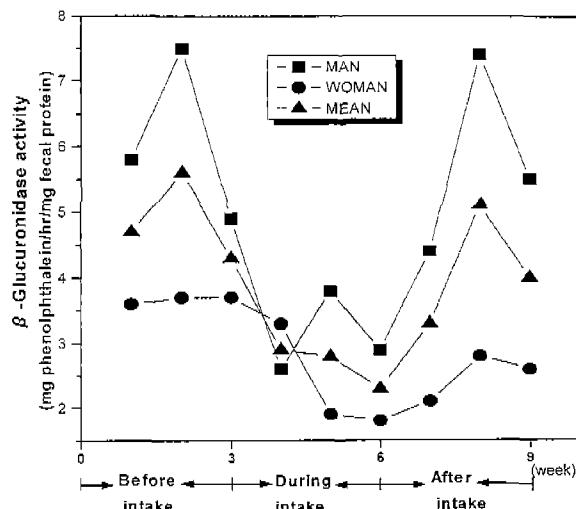


Fig. 1. Effect of *B. longum* HY8001 intake,  $\beta$ -glucuronidase on activity.

Fresh fecal suspension was disrupted by sonication at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min, and then centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min. The enzyme reaction was run at  $37^{\circ}\text{C}$ (pH 6.8) in a total volume of 1 ml containing final concentration of 0.02 M PPB, 0.1 mM EDTA, 1 mM phenolphthalein- $\beta$ -D-gucuronide and 0.1 ml supernatant of fecal suspension. The reaction was stopped after 1 hour by addition of 5 ml 0.2 M glycine buffer(pH 10.4) containing 0.2 M NaCl. Readings were taken at 540 nm.

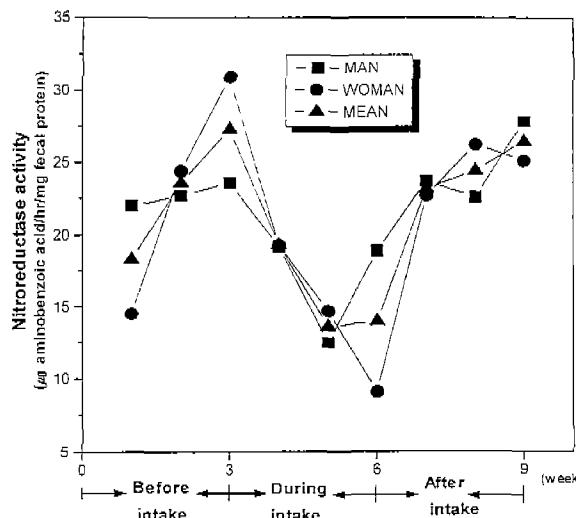


Fig. 2. Effect of *B. longum* HY8001 intake on nitroreductase activity.

Fresh fecal suspension was added in prereduced 0.1 M PPB (pH 7.0) containing 1.5 mM *m*-nitrobenzoic acid and then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. The reaction was stopped by addition of 2.5 ml 1.2 N HCl. It was then centrifuged, and the supernatant was used to determine aminobenzoic acid formed. Readings were taken at 550 nm.

변내  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase의 활성이 감소한다는 것은 *B. longum* HY8001의 섭취가 사람의 장내미생물에

의한 대사작용을 조절하여 발암성 물질, 또는 발암촉진 물질의 생성을 감소시키는 유익한 영향을 나타내는 것으로 추측된다.

### 장내세균총에 미치는 효과

건강한 임상실험 지원자 남녀 10명의 음용전 장내세균총

을 검색한 결과 Table 1에서와 같이, 1주, 2주, 3주째의 총세균수(Total counts)는  $10.5 \pm 0.21$ ,  $10.9 \pm 0.33$ ,  $10.7 \pm 0.16$  이었으며, 최우세균총은 Bacteroidaceae로서  $10.3 \pm 0.28$ ,  $10.3 \pm 0.41$ ,  $10.4 \pm 0.30$ 이었다. 호기성 세균군에서는 Enterobacteriaceae가  $7.8 \pm 0.60$ ,  $7.6 \pm 0.88$ ,  $7.3 \pm 1.03$ 의 비교적 높은 세균수를 나타내었지만, 장관내 통과균의 일종인 *Staphylo-*

**Table 1. Effect of *B. longum* HY8001 intake on fecal microflora of 10 human volunteers**

Bacterial group	Before intake		
	1 wk	2 wk	3 wk
Enterobacteriaceae	$7.8 \pm 0.60^1$ (100)	$7.6 \pm 0.88$ (100)	$7.3 \pm 1.03$ (100)
<i>Salmonella</i>	$5.6 \pm 0.99$ (20) <sup>2</sup>	$2.3 \pm 0.00$ (10)	$5.1 \pm 1.81$ (50)
<i>Streptococcus</i>	$8.1 \pm 1.13$ (100)	$8.1 \pm 0.90$ (100)	$8.4 \pm 0.96$ (100)
<i>Staphylococcus</i>	$2.9 \pm 0.29$ (80)	$2.8 \pm 0.63$ (60)	$3.7 \pm 1.61$ (80)
Yeast	$3.6 \pm 1.09$ (80)	$2.7 \pm 0.36$ (80)	$3.1 \pm 0.58$ (100)
<i>Bacillus</i>	$7.3 \pm 0.00$ (10)	$6.5 \pm 1.73$ (30)	$6.3 \pm 0.00$ (10)
<i>Lactobacillus</i>	$6.9 \pm 1.33$ (100)	$7.7 \pm 0.82$ (100)	$7.5 \pm 1.49$ (100)
<i>Bifidobacterium</i>	$9.5 \pm 0.30$ (100)	$9.5 \pm 0.51$ (100)	$9.7 \pm 0.41$ (100)
<i>Eubacterium</i>	$9.8 \pm 0.31$ (100)	$9.8 \pm 0.24$ (100)	$10.1 \pm 0.23$ (100)
<i>Bacteroidaceae</i>	$10.3 \pm 0.28$ (100)	$10.3 \pm 0.41$ (100)	$10.4 \pm 0.30$ (100)
Peptococcaceae	$9.0 \pm 0.4$ (30)	$9.4 \pm 0.17$ (30)	$9.2 \pm 0.47$ (40)
<i>Clostridium</i>	$9.2 \pm 0.33$ (60)	$9.2 \pm 0.61$ (50)	$9.3 \pm 0.33$ (60)
<i>C. perfringens</i>	-	$5.8 \pm 0.64$ (20)	-
<i>Veillonella</i>	$8.8 \pm 0.28$ (20)	$8.9 \pm 0.00$ (10)	$8.4 \pm 0.00$ (10)
<i>Megasphaera</i>	-	$8.6 \pm 0.00$ (10)	$7.3 \pm 0.00$ (10)
Total counts	$10.5 \pm 0.21$	$10.9 \pm 0.33$	$10.7 \pm 0.16$

Bacterial group	During intake			After intake		
	4 wk	5 wk	6 wk	7 wk	8 wk	9 wk
Enterobacteriaceae	$7.1 \pm 0.75$ (100)	$7.8 \pm 0.61$ (100)	$7.5 \pm 0.58$ (100)	$7.5 \pm 0.78$ (100)	$7.1 \pm 0.78$ (100)	$8.1 \pm 1.09$ (100)
<i>Salmonella</i>	$2.9 \pm 0.00$ (10)	$5.2 \pm 0.00$ (10)	- <sup>3</sup>	$5.6 \pm 1.15$ (30)	$6.4 \pm 0.63$ (30)	$5.1 \pm 0.98$ (30)
<i>Streptococcus</i>	$7.8 \pm 1.17$ (100)	$7.4 \pm 1.27$ (100)	$7.8 \pm 0.79$ (100)	$7.4 \pm 1.48$ (100)	$8.4 \pm 1.10$ (100)	$7.7 \pm 1.03$ (100)
<i>Staphylococcus</i>	$2.8 \pm 0.55$ (50)	$3.2 \pm 0.91$ (30)	$2.3 \pm 0.00$ (10)	$3.2 \pm 0.64$ (40)	$3.1 \pm 1.10$ (60)	$3.8 \pm 0.67$ (30)
Yeast	$3.7 \pm 1.95$ (70)	$4.1 \pm 0.74$ (60)	$3.9 \pm 0.54$ (60)	$3.1 \pm 0.86$ (60)	$3.0 \pm 0.82$ (100)	$3.3 \pm 0.84$ (70)
<i>Bacillus</i>	-	$4.3 \pm 2.83$ (20)	$6.3 \pm 0.00$ (20)	$6.7 \pm 0.46$ (30)	$6.8 \pm 0.48$ (40)	$5.6 \pm 1.15$ (30)
<i>Lactobacillus</i>	$7.6 \pm 1.05$ (100)	$7.4 \pm 1.33$ (100)	$7.4 \pm 0.91$ (100)	$7.9 \pm 1.27$ (100)	$7.8 \pm 1.22$ (100)	$7.7 \pm 1.09$ (100)
<i>Bifidobacterium</i>	$9.7 \pm 0.55$ (100)	$9.8 \pm 0.37$ (100)	$10.0 \pm 0.32^*$ (100)	$9.4 \pm 0.34$ (100)	$9.5 \pm 0.33$ (100)	$9.6 \pm 0.44$ (100)
<i>Eubacterium</i>	$9.9 \pm 0.45$ (100)	$10.0 \pm 0.29$ (100)	$9.9 \pm 0.26$ (100)	$9.7 \pm 0.31$ (100)	$9.7 \pm 0.26$ (100)	$9.6 \pm 0.91$ (100)
<i>Bacteroidaceae</i>	$10.4 \pm 0.25$ (100)	$10.2 \pm 0.31$ (100)	$10.4 \pm 0.20$ (100)	$10.2 \pm 0.31$ (100)	$10.3 \pm 0.23$ (100)	$10.3 \pm 0.21$ (100)
Peptococcaceae	$8.6 \pm 0.48$ (40)	$8.2 \pm 0.92$ (20)	$9.3 \pm 0.00$ (10)	$9.1 \pm 0.51$ (30)	$9.2 \pm 0.06$ (30)	$8.8 \pm 0.00$ (10)
<i>Clostridium</i>	$8.9 \pm 0.49$ (60)	$9.6 \pm 0.13$ (50)	$8.9 \pm 0.92$ (60)	$9.0 \pm 0.49$ (50)	$9.2 \pm 0.29$ (40)	$9.2 \pm 0.40$ (60)
<i>C. perfringens</i>	-	$5.3 \pm 0.00$ (10)	$2.3 \pm 0.00$ (10)	-	$5.2 \pm 3.39$ (20)	$4.3 \pm 0.00$ (10)
<i>Veillonella</i>	$9.3 \pm 0.00$ (10)	$8.3 \pm 0.00$ (10)	$9.3 \pm 0.00$ (10)	$8.9 \pm 0.49$ (40)	$8.2 \pm 0.78$ (40)	-
<i>Megasphaera</i>	-	-	$8.8 \pm 0.00$ (10)	$8.3 \pm 0.07$ (20)	$8.3 \pm 0.00$ (10)	$8.5 \pm 0.44$ (30)
Total counts	$10.6 \pm 0.20$	$10.6 \pm 0.10$	$10.7 \pm 0.18$	$10.5 \pm 0.2$	$10.6 \pm 0.16$	$10.6 \pm 0.16$

<sup>1</sup> Data expressed as mean  $\pm$  S.D. of  $\log_{10}$  counts of bacteria/g of feces. <sup>2</sup> Figures in parentheses are frequency of occurrence (%).

<sup>3</sup> Negative in all volunteers. \* Significant difference from the levels before intake:  $p < 0.05$ .

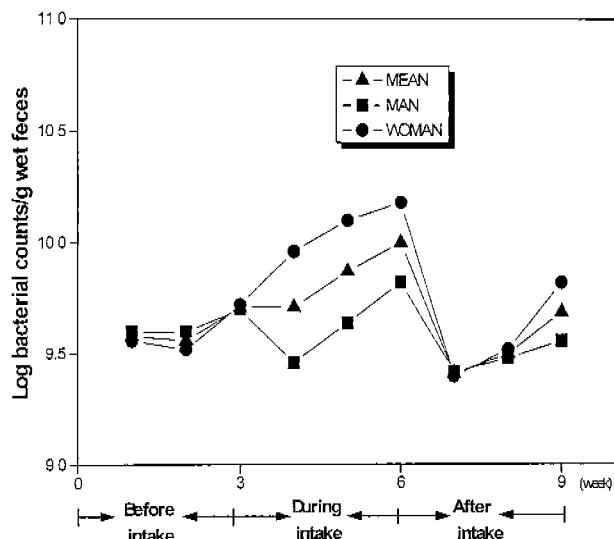


Fig. 3. Effect of *B. longum* HY8001 intake on the number of fecal *Bifidobacterium*.

*coccus*, Yeast, *Bacillus*의 경우는 낮은 균수 및 분리율(%)을 나타내었다. 협기성 세균군에서는 *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Clostridium*속 세균이 높은 균수를 나타내고 있었다. 유산균군 중에서는 *Bifidobacterium*이  $9.5 \pm 0.30$ ,  $9.5 \pm 0.51$ ,  $9.7 \pm 0.41$ 로서 남녀 10명(분리율 100%)에게서 모두 높은 균수로 검출되었다. *Lactobacillus*는  $6.9 \pm 1.33$ ,  $7.7 \pm 0.82$ ,  $7.5 \pm 1.49$ 의 균수이었으며, 한편 *Streptococcus*의 경우에는  $8.1 \pm 1.13$ ,  $8.1 \pm 0.90$ ,  $8.4 \pm 0.96$ 의 균수로 검출되었다.

한편 *B. longum* HY8001 균주 농축배양액( $1 \times 10^9$  cfu/ml) 30 ml를 매일 1회씩, 3주간 음용시킨 후, 장내세균총에 미치는 변화를 관찰한 결과, 총세균수는  $10.6 \pm 0.20$ ,  $10.6 \pm 0.10$ ,  $10.7 \pm 0.18$ 로서 음용 전과 비교하여 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 음용 기간중인 4주, 5주, 6주째의 *Bifidobacterium* 균수는 각각  $9.7 \pm 0.55$ ,  $9.8 \pm 0.37$ ,  $10.0 \pm 0.32$ 로서 투여전에 비해 유의성 있게 균수의 증가가 관찰되었으며( $p < 0.05$ ), 여자지원자들이 남자지원자들에 비해 현저한 증가추세를 나타내었다. 이와 같은 결과는 여자지원자들의  $\beta$ -glucuronidase 활성이 낮은 것과도 상관관계가 있을 것으로 추측된다. 이와 같은 균수의 증가는 음용 종료 후에 다시 음용 전의 균수 수준으로 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한 *Bifidobacterium* 이외의 세균총에서는 *B. longum* HY8001 음용에 따른 뚜렷한 세균총의 변화가 관찰되지 않았다.

사람의 장내세균총에 대한 *B. longum*의 음용효과를 조사한 Benno의 연구에서는 분변내  $\beta$ -glucuronidase의 활성저하와 함께 lecithinase negative clostridia의 수가 유의적으로 감소하였다[2]. 그러나 본 실험에서는 *Clostridium*속 세균 변화와 효소활성 변화 사이에 뚜렷한 연관관계가 나타나지는 않았다. Fujisawa와 Mori는 동일한 사람들에게서 오

랜 기간에 걸쳐  $\beta$ -glucuronidase 활성이 있는 *E. coli* 균주와, 활성이 없는 균주의 균수를 측정하였는데, 이를 균주 조성에 있어서 현저한 다양성을 발견하였다[7]. 이것은 세균의 균종만이 아니라 균주차원의 조성도 전체 분변내 효소활성에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다[7, 12]. 이번 실험에서는 효소를 생성하는 세균 조성에 대한 연구가 이루어지지 않았으므로 Fujisawa와 Mori의 주장은 확인할 수는 없지만, 효소활성감소와 장내세균총사이의 연관성이 적은 것을 일부 설명할 수 있었다.

$\beta$ -Glucuronidase와 nitroreductase의 활성은 장내세균총의 조성에 의해 영향을 받으며[10, 26], 주로 *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Bacteroides* 등의 장내 유해세균에 의해 생성되는 것으로 알려지고 있다[21, 22] 유산균 음용에 의한 장내세균효소의 활성감소는 유산균에 의한 유해세균의 증식억제 효과로 추측된다.

## 요약

한국인의 장에서 분리한 *Bifidobacterium longum* HY8001 균주의 고농축배양액 음용이 사람의 장내세균총 및 장내세균효소에 미치는 영향을 조사하였다. 건강한 성인 남녀 10명을 대상으로 음용전, 음용중, 음용후의 3주씩 총 9주 동안 실시하였으며, 매주 장내세균총 및  $\beta$ -glucuronidase와 nitroreductase의 활성을 측정하였다.  $\beta$ -Glucuronidase 활성은 음용전 3주간의 평균이  $4.85 \pm 0.65$  mg/hr/mg fecal protein에서 음용중 3주간의 평균은  $2.69 \pm 0.32$ 로 44.6%나 현저히 감소하였다( $p < 0.005$ ). 한편 nitroreductase의 활성은 음용전 평균  $23.06 \pm 4.54$   $\mu\text{g}/\text{hr}/\text{mg}$  fecal protein에서 음용중 평균  $15.60 \pm 3.12$ 로 유의성 있게 32.3%가 감소하였다( $p < 0.01$ ). 또한 장내세균총 검색 결과, *B. longum* HY8001 음용중 *Bifidobacterium*의 균수는 현저히 증가하였으나( $p < 0.05$ ), 그 외의 세균총에 있어서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 본 실험의 결과는 *B. longum* HY8001의 지속적인 음용이  $\beta$ -glucuronidase와 nitroreductase의 활성을 낮추고 장내유익균인 *Bifidobacterium*의 균수를 현저히 증가시킴으로서 결장암 발생을 예방할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

## REFERENCES

1. Armstrong, B. and R. Doll. 1975. Environmental factors of cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary factors. *Int. J. Cancer* **15**: 617–631.
2. Benno, Y. and T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.* **36**: 683–694.
3. Benno, Y., T. Mitsuoka, and K. Kanazawa. 1991. Human

- fecal flora in health and colon cancer. *Acta Chir Scand S* **256**: 15–23.
4. Cerniglia, C. E. 1985. Metabolism of 1-nitropyrene and 6-nitrobenzo[ $\alpha$ ]pyrene by intestinal microflora. *Prog. Clin. Biol. Res.* **181**: 133–137.
  5. Drasar, B. S. 1972. Intestinal bacteria and cancer. *J. Clin. Nutr.* **25**: 1399–1404.
  6. Finegold, S. M., H. R. Attebery, and V. L. Sutter. 1974. Effect of diet on human fecal flora: Comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**: 1456–1469.
  7. Fujisawa, T. and M. Mori. 1992.  $\beta$ -Glucuronidase activity of *Escherichia coli* isolated over a long term from feces of the same human. *Bifidobact. Microfl.* **11**: 77–80.
  8. Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1977. Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and DMH. *Cancer* **40**: 2421–2426.
  9. Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 263–265.
  10. Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**: 759–761.
  11. Gorbach, S. L. 1980. Intestinal microflora in inflammatory bowel disease-implications for etiology and therapy, pp. 55–77. In J. B. Krisner and R. G. Shorter(eds.), *Inflammatory Bowel Disease*. Lea and Febiger, Philadelphia.
  12. Gradclle, D., P. Raib, and E. Saquent. 1985.  $\beta$ -Glucuronidase activities of intestinal bacteria determined both *in vitro* and *in vivo* in gnotobiotic rats. *Appl. Env. Microbiol.* **49**: 682–685.
  13. Greenwald, P. 1992. Colon cancer overview. *Cancer* **70**(5 suppl.): 1206–1215.
  14. Hill, M. J. 1975. The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids, and its relation to colon cancer. *Cancer* **36**: 2387–2390.
  15. Hill, M. J., B. S. Drasar, V. Aries, J. S. Crowther, G. Haworth, and R. E. O. Williams. 1971. Bacteria and etiology of cancer of the large bowel. *Lancet* **1**: 95–100.
  16. Huh, C. S., S. W. Lee, and K. B. Yoon. 1989. Studies on the occurrence of *Bifidobacterium* in Korea. *Kor. J. Dairy Sci.* **11**: 16–25.
  17. IARC. Intestinal microbiology group. 1977. Dietary fiber, transit time, fecal bacteria, steroids and colon cancer in two Scandinavian populations. *Lancet* **2**: 207–211.
  18. Lee, W. K. 1991. Isolation and identification of clostridia from the intestine of laboratory animals. *Lab. Anim.* **25**: 9–15.
  19. Lowry, O. H., J. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. L. Randall. 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
  20. Mallet, A. K., I. R. Rowland, C. A. Bearne, J. C. Flynn, B. J. Fehilly, Y. S. Udeen, and M. J. G. Farthing. 1988. Effect of dietary supplements of apple pectin, wheat bran or fat on the enzyme activity of the human fecal flora. *Microbial Ecol. in Health and Dis.* **1**: 23–39.
  21. Mitsuoka, T. 1980. *The World of Anaerobic Bacteria; A color Atlas of Anaerobic Bacteria*, pp. 53–65. Sobun Press, Tokyo.
  22. Mitsuoka, T., Y. Morishita, and A. Terada. 1969. A simple method(" plate-in-bottle method ") for the cultivation of fastidious anaerobes. *Jap. J. Microbiol.* **13**: 383–385.
  23. Raffi, F. and C. E. Cerniglia. 1993. Comparison of the azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(6): 1731–1734.
  24. Raffi, F., W. Franklin, R. H. Helflich, and C. E. Cerniglia. 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4): 962–968.
  25. Reddy, B. S. 1995. Nutritional factors and colon cancer (review). *Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.* **35**: 175–190.
  26. Reddy, B. S., D. Hanson, S. Mangat, L. Mathews, M. Sbaschnig, C. Sharma, and B. Simi. 1980. Effect of high fat high beef diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols. *J. Nutr.* **110**: 1880–1887.
  27. Rowland, I. R., A. Wise, and A. K. Mallett. 1983. Metabolic profile of caecal microorganism from rats fed indigestible plant cell-wall components. *Food Chem. Toxicol.* **21**: 25–29.
  28. Saito, Y., T. Takano, and I. R. Rowland. 1992. Effect of soybean oligosaccharides on the human gut microflora *in vitro* culture. *Microbial Ecol. in Health and Dis.* **5**: 105–110.
  29. Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Horikawa, and A. Ohkubo. 1987. The nature of the mutagenicity and carcinogenicity of nitrated aromatic compounds in the environment. *Environ. Health Perspect.* **73**: 191–199.

(Received February 10, 1999)