

Bacillus licheniformis AJ 균주제제의 설사원인 미생물의 성장 억제효과

김지영¹ · 배은아¹ · 한명주¹ · 김동현^{2,*}

¹경희대학교 식품영양학과, ²경희대학교 약학대학

Inhibitory Activity of *Bacillus licheniformis* AJ on the Growth of Diarrheal Pathogens

Ji-Young KIM,¹ Eun-Ah BAE¹, Myung Joo HAN¹ and Dong-Hyun KIM^{2,*}

¹Department of Food and Nutrition, ²College of Pharmacy, Kyung Hee University, 1, Hoegi-dong, Dongdaemun-ku, Seoul, 130-701, Korea

(Received November 3, 1999; accepted December 13, 1999)

Abstract—The inhibitory effect of *Bacillus licheniformis* AJ isolated from genitourinary normal flora as a new probiotics on the growth of diarrheal pathogens was studied. This *B. licheniformis* AJ inhibited the growth of *E. coli* O-157, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei* as well as the infectivity of rotavirus. However, it did not inhibit the growth of *Helicobacter pylori* and human intestinal bacteria although it inhibited the harmful enzyme activity of human intestinal bacteria. *B. licheniformis* AJ seems to excrete heat-labile growth-inhibitory protein, bacteriocin, into the media. These results suggest that *B. licheniformis* AJ could be used as a new type of probiotics.

Keywords □ *Bacillus licheniformis*, Probiotics, Diarrheal pathogen, Rotavirus, Bacteriocin

최근 건강에 대한 관심이 많아지면서 유산균약품 및 probiotics에 대한 인식도가 높아지고 있을 뿐만 아니라 시장이 급격하게 증가되고 있다. 이러한 probiotics 제제는 첫째 장내유해균의 성장을 억제하고, 둘째 변비를 개선하고, 셋째 유당불내증(lactose intolerance)을 개선하고, 넷째 항암활성을 나타내고, 다섯째 비타민등을 합성하는 활성을 갖고 있다 (Huges and Hoover, 1990; Ishibashi and Shimamura, 1993; Salminen *et al.*, 1974; Tomoko *et al.*, 1996). 그러나 이러한 것은 대부분 유산균제제를 중심으로 연구된 결과이며 그외의 probiotics에 대한 연구는 거의 없다. 이러한 probiotics는 사람의 장내세균총의 분포와 장내의 건강상태에 따라 차이를 보일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 건강한 산모의 산도로부터 분리한 *B. licheniformis*에 대해 설사원인 미생물인 *E. coli* O-157, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei* 및 rotavirus에 대해 성장억제효과가 있는지와 장내세균이 생산하는 유해효소의 생산성을 억제하는지에 대한 조사를 실시하였다.

실험재료 및 방법

시약

p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-glucuronide, tryptophan, dimethylaminobenzaldehyde, urea, sodium nitroprusside, fructose-6-phosphate, sodium thioglycolate는 Sigma Chem. Co. (미국)에서 구입하였고 기타 시약은 특급시약을 사용하고, 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 구입하여 사용하였다. 기타시약은 특급시약을 사용하였다. *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*와 *Escherichia coli* O-157:H7은 국립보건연구원으로부터 분양받았으며 *Bacillus licheniformis* AJ는 아주약품 (주)로부터 제공받아 사용하였다.

실험방법

설사원인균의 성장억제측정

TS배지에서 미리 배양한 *B. licheniformis*균주를 이용하여 *E. coli* O-157, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*균주의 성장저해율을 Kim 등이 보고한 방법(1995)에 따라 측정하였다. 또한 *B. licheniformis*와 *E. coli* O-157를

*To whom correspondence should be addressed.

GAM에서 일정비율 ($10^5:0$, $10^5:10^6$, $10^5:10^7$, $0:10^5$)로 동시 배양한 후 앞에서와 같이 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 배로 희석하여 선택배지 (Eosin-methylene blue agar, *Salmonella*/*Shigella* agar, MacConky배지)에 이식하여 24시간 배양한 후에 *Bacillus licheniformis* 및 *E. coli* O-157 (또는 *Salmonella typhi*, 또는 *Shigella sonnei*)의 균수를 측정하였다. 또한 *B. licheniformis*와 설사균 원인균을 각각 일정 비율 ($10^5:10^7$)로 동시배양하면서 경시적으로 배양액을 취하여 10^5 , 10^6 배로 희석하여 *B. licheniformis*와 *E. coli* O157, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*의 균수를 측정하였다.

Helicobacter pylori 증식억제효과

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. *B. licheniformis*은 TS broth에 배양하여 집균하고 7% horse serum을 가한 brucella agar plate에 섞은 후 *H. pylori*를 배양하여 그 증식억제정도를 관찰하였다.

*Bacillus licheniformis*의 장내세균총의 유해효소활성에 미치는효과 측정

24시간 배양한 *E. coli* HGU-3와 total microflora를 균수가 ml당 10^7 개가 되도록 GAM broth로 적당히 희석하고 GAM broth 5 ml에 분리한 *Bacillus licheniformis*와 *E. coli* HGU-3 (또는 total microflora)의 농도비를 4가지 (*Bacillus licheniformis*: total microflora = $10^5:0$, $10^5:10^7$, $10^5:10^8$, $0:10^5$)가 되게 이식하여 24시간 배양후 배지의 각 효소활성을 이미 보고한 방법 (Park et al., 1998)에 따라 측정하였다.

효소액 조제

균 배양액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml를 가해 잘 현탁하고 효소액으로 사용하였다.

β -Glucosidase 효소활성 측정

0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.3 ml에 2 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.2 ml, 효소액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH 0.4 ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1 ml를 가하여 원심분리 (3,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 취해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

β -Glucuronidase 효소활성 측정

0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.38 ml에 10 mM p-nitrophenyl β -D-glucuronide 0.02 ml, 효소액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 0.5 N NaOH 0.5 ml를 가해 반응을 종료시키고 증류수 1 ml를 가하여 원심분리 (3,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 취

해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tryptophanase 효소활성 측정

반응혼합액 (0.05 N potassium phosphate (pH 7.5) 22.5 ml, pyridoxal phosphate 2.75 mg, disodium EDTA dihydrate 19.6 mg, bovine serum albumin 10 mg, 증류수 87.5 ml) 0.2 ml, 0.02 M tryptophan 0.2 ml 및 효소액 0.1 ml를 가하여 37°C에서 30분 반응시키고 발색시약 (발색시약-95% EtOH 94.8 ml, 36 N H₂SO₄ 5.2 ml, p-diaminobenzaldehyde 1.47 g) 2 ml를 가하여 반응을 종료시킨 후 원심분리 (3,000 rpm, 10 min)하고 상등액을 취해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Urease 효소활성 측정

0.1 M 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 l가하여 반응을 종료시킨후 용액 1 (1% phenol, 0.005% sodium nitroprusside), 용

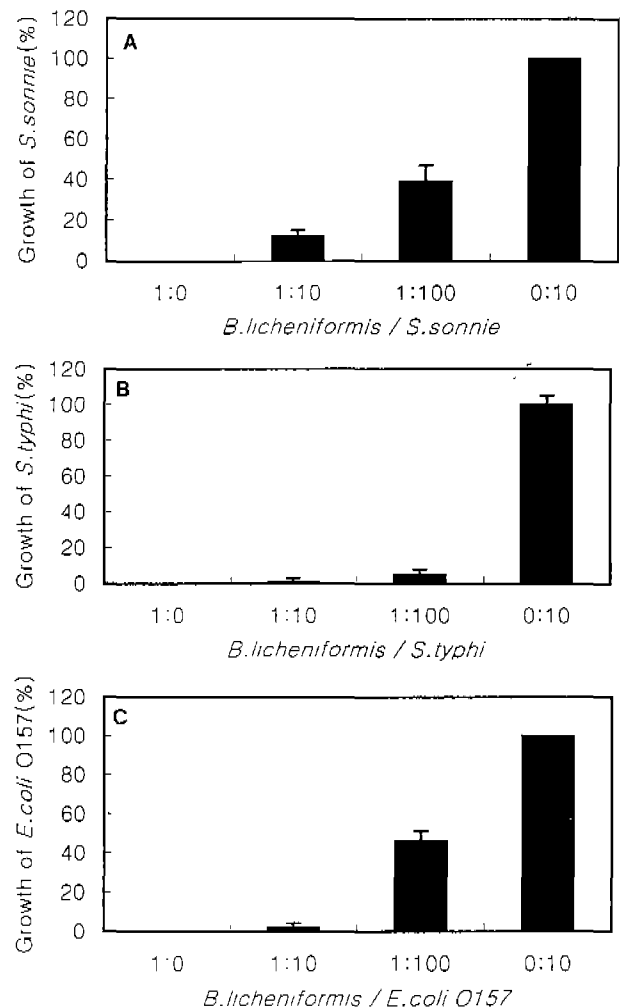


Fig. 1. Inhibitory activity of *B. licheniformis* on the growth of diarrheal pathogen (A, *S. sonnei*; B, *S. typhi*; C, *E. coli* O-157).

액 2 (5.5% Na₂HPO₄ · H₂O, 0.5% NaOH, 0.1% NaOCl)를 각각 1 ml씩 가한 후 60°C에서 20분간 가열한 후 상온에 20분간 방치하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Rotavirus 감염억제효과

MA 104 cell을 이미 보고한 방법(Song and Kim, 1998)에 따라 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 떼어낸 다음 new media를 가하고 이것을 1,200 rpm에서 5분동안 원심분리한 후 상등액을 버리고 원하는 농도인 5×10⁵ cells/ml이 되도록 infection media로 조절하였다. MA 104 cell과 Wa virus (MOI=2~3)를 가한 well에 B. licheniformis 균체, 이 균주의 세포질 또는 세포벽 분획을 가하여 CO₂ incubator에서 37°C, 5% CO₂ gas로 포화된 조건에서 5일간 배양한 후 Plaque assay로 rotavirus 감염 억제정도를 측정하였다.

결 과

B. licheniformis의 설사원인균의 성장 억제효과

B. licheniformis균주와 E. coli O-157 또는 S. typhi 또는 S. sonnei 균주를 장내환경과 유사한 혐기성배지에서 20시간 동안 동시배양하여 이들 설사원인균의 성장저해율을 조사하였다 (Fig. 1). B. licheniformis균주의 수가 증가할수록 유해균의 성장은 억제되었다. E. coli O-157의 경우 E. coli O157균주가 B. licheniformis의 수보다 10배 많아도 E. coli O157의 성장은 5%이하였다. 이러한 성장 억제효과는 S. typhi나 S. sonnei에서도 비슷한 경향을 나타냈다. E. coli O-157과 S. sonnei를 B. licheniformis보다 100배 많은 균수와 동시배양한 경우는 50-60% 정도의 성장억제를 보였으나 S. typhi의 경우에는 B. licheniformis보다 100배 많은 균수를 동시배양하여도 90% 이상의 성장 억제를 보였다. B. licheniformis의 설사원인균 성장억제 효과의 원인을 찾기 위해 먼저 B. licheniformis 균주를 배양한 배양액 분획 (분비성분, E)과 균체를 초음파처리한 후 세포질 분획 (C)과 세포벽 분획 (W)에 대해 E. coli O-157균주의 성장억제효과를 조사하였다 (Fig. 2). 그 결과 배양여액 분획에서 성장억제효과를 나타냈으며, 그외에도 이 배양여액 분획은 S. typhi나 S. sonnei에 대해서도 성장 억제를 나타냈다.

Helicobacter pylori 성장 억제효과

7% horse serum을 가한 brucella agar plate에 Helicobacter pylori와 B. licheniformis를 동시배양하면서 H. pylori의 성장억제를 관찰하였다 (Fig. 3). 그 결과, B. licheniformis의 균주를 증가시켜도 Helicobacter pylori의 성장은 억제되지 않았으며, B. licheniformis의 분획물인 배양여액, 균체의 세포질액, 균체의 세포막 및 세포벽성분에

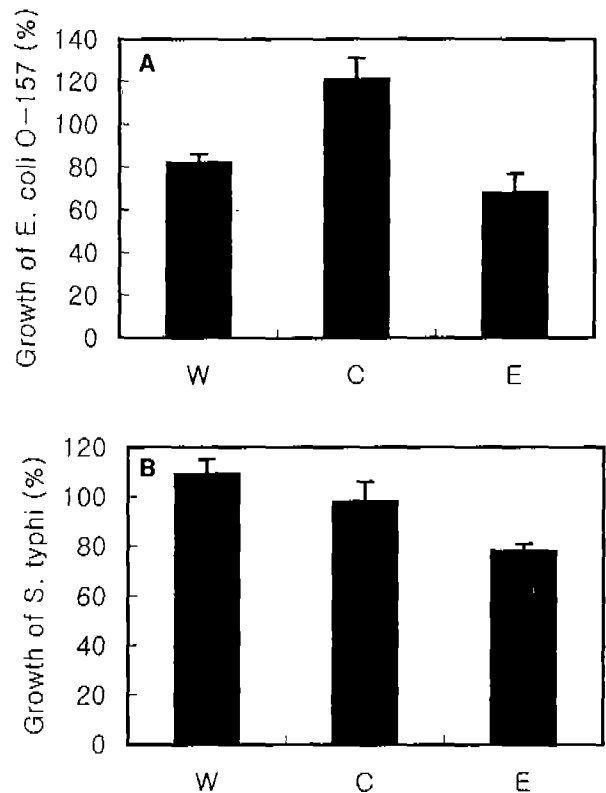


Fig. 2. Inhibitory activity of cellular fraction from B. licheniformis on the growth of diarrheal pathogens (A, E. coli O-157; B, S. typhi). W, whole cell; C, cystosolic fraction; E, fraction excreted into media.

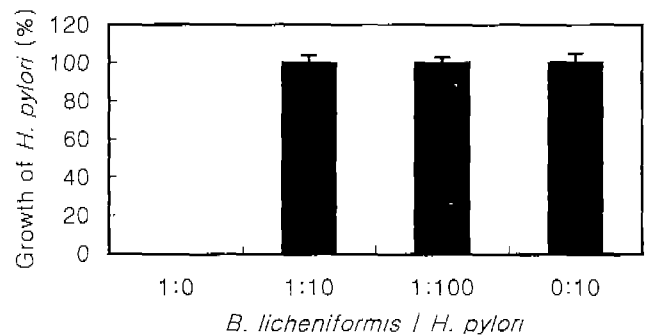


Fig. 3. Inhibitory activity of B. licheniformis on the growth of Helicobacter pylori.

대해 H. pylori 성장억제효과를 조사한 경우 역시 성장 억제효과는 없었다.

B. licheniformis의 E. coli HGU-3 및 장내세균의 유해효소 억제효과

사람의 장내세균인 E. coli HGU-3를 B. licheniformis와 동시배양하면서 E. coli HGU-3 균주가 생산하는 유해효소의 억제효과를 측정하였다 (Fig. 4A). E. coli HGU-3가 생산하는 유해효소인 -glucuronidase 효소활성은 E.

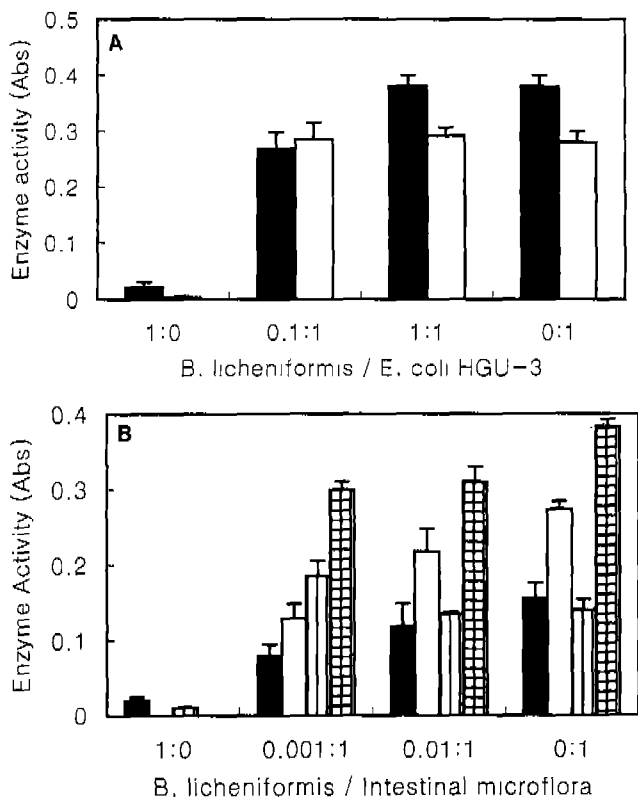


Fig. 4. Inhibitory activity of *B. licheniformis* on the harmful enzymes of *E. coli* HGU-3 (A: ■, β -glucuronidase; □, tryptophanas) and human intestinal bacteria (B: ■, β -glucosidase; □, β -glucuronidase; ▨, tryptophanase; ▩, urease).

coli HGU-3와 *B. licheniformis*를 1:1로 혼합배양한 경우는 거의 활성의 변화가 없었으나 1:10인 경우는 효소활성이 29% 저해되었으며, tryptophanase 효소활성은 혼합배양한 경우 거의 변화가 없었다. *B. licheniformis* 균주와 사람의 장내세균총을 동시배양하면서 장내세균총이 생산하는 유해효소의 활성을 측정하였다 (Fig. 4B). 장내세균 유래 유해효소인 β -glucuronidase 효소활성은 *B. licheniformis*와 장내세균총의 균수가 1:10³인 경우 45%의 저해활성을 보였으며, 1:10²인 경우 23%의 저해활성을 보였다.

Tryptophanase 효소활성은 *B. licheniformis*의 농도의 변화에 따라 차이를 보이기는 하였으나 대부분의 경우 5-20%정도의 저해활성을 보였다. Urease의 저해활성도 20% 정도의 저해활성을 보였다. 그외의 β -glucosidase의 경우는 50%정도 저해하는 경향을 보였다.

***B. licheniformis*과 설사 원인균 동시 배양시 유해균의 성장에 미치는 효과**

*B. licheniformis*와 *E. coli* O-157, *S. typhi* 또는 *S. sonnei*를 1:10의 비율로 동시에 이식하여 배양하면서 *B. licheniformis* 균주와 유해균의 성장변화를 관찰하였다 (Fig.

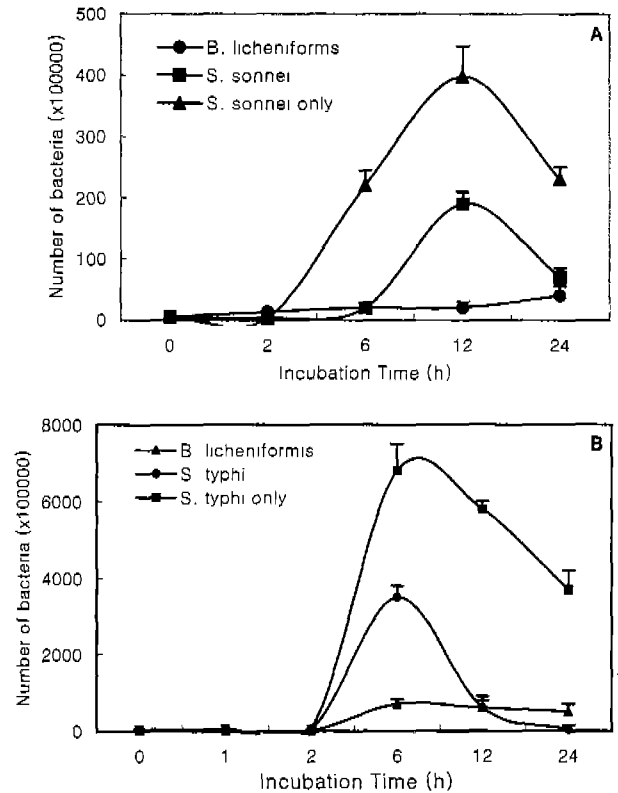


Fig. 5. Inhibitory activity of *B. licheniformis* on the growth of *S. sonnei* (A) and *S. typhi* (B).

5). 이식 6시간부터 대부분의 설사원인 균주가 성장하기 시작하나 12시간에서는 *B. licheniformis*의 성장이 활발해지면서 설사원인 균주들의 성장이 크게 억제되었다. 배양 12시간과 24시간에서 *S. typhi*은 대조군에 비해 약 90% 이상의 성장억제를 보였으며, *S. sonnei*만을 이식한 군에 비해 95% 이상의 성장억제를 보였으며, *E. coli* O-157도 50% 이상의 성장억제를 보였다.

Rotavirus 감염억제 효과

MA 104 cell를 이용하여 Wa virus를 배양하면서 *B. licheniformis*의 감염억제효과를 조사하였다 (Table 1). *B. licheniformis*의 세포벽성분에서는 감염억제효과가 거의 없었으나, 세포질 성분에서는 우수한 rotavirus 감염억제효과를 나타냈다.

Table 1. Inhibitory activity of *B. licheniformis* on Rotavirus infection

Fraction	Infection (%)
whole cell	80±10
cell wall fraction	100
cysolic fraction	0

^{a)}Final concentration was 0.05 mg/ml.

고찰 및 결론

건강한 산모의 산도로부터 분리한 *Bacillus licheniformis*는 통성혐기성균으로 그람양성간균의 장내감염 유해균에 대해 성장억제를 조사하였다. 사람의 위염 및 위암의 원인균으로 지목받고있는 *Helicobacter pylori*와 *B. licheniformis*를 동시 배양한 결과 *H. pylori*의 성장을 억제하지 못했다. 그러나, 설사원인 균인 *Salmonella typhi*와 *B. licheniformis*, 또는 *Shigella sonnie*와 *B. licheniformis*, 또는 *E. coli* O-157과 *B. licheniformis*, 또는 *E. coli* HGU-3과 *B. licheniformis*를 동시 배양하면서 설사원인균의 성장억제를 관찰한 결과 *B. licheniformis*균주의 수가 증가할수록 유해균의 성장을 유의적으로 억제하였다. *B. licheniformis*와 유해균과 동시 배양하면서 유해균의 성장억제를 조사한 결과 *B. licheniformis* 균주가 성장과 동시에 억제되는 것으로 나타났다. 유산균이 *E. coli* O-157 등의 유해균의 성장을 억제하는 것은 유산균이 생산하는 유기산 또는 대사산물에 의한 것으로 생각되어지고 있다 (Miller *et al.*, 1994; Dahiya and Speck, 1968; Gilliland and Speck, 1977; Ahn *et al.*, 1977). 유산균이 미생물의 억제 기전은 유산균의 포도당대사과정중에서 생산되는 유산은 해리되지않은 상태에서 미생물 세포내로 들어가 세포내의 pH를 변화시켜 미생물의 성장을 억제하거나 산화환원전위를 변화시켜 성장을 억제하는 것으로 알려져있다 (Rubin *et al.*, 1982). 여기에서는 *B. licheniformis*가 유기산을 다량 생산하여 pH의 변화를 줄만큼 생산하지는 않았을뿐만 아니라 산화환원전위를 크게 변화시킬 것으로 생각되지는 않는다. 그러므로 *B. licheniformis*이 설사원인 균들의 성장을 나타내는 분획을 분리한 결과 *B. licheniformis* 균주를 배양하고난 배양여액에서 가장 강한 유해균의 성장억제효과를 나타냈다. 그러나, 이러한 배양여액중에 함유한 성분 특성을 조사하기 위해 열처리 등을 실시한 결과 실패되었다. 이러한 결과로 미루어 저해활성물질은 단백질성 성분인 bacteriocin으로 추정된다. 또한 바이러스성 유아 설사의 원인 미생물인 rotavirus의 감염억제효과를 조사한 결과 *B. licheniformis*의 세포질 분획에서 감염억제효과를 나타냈다. 이와 같이 *B. licheniformis*는 사람의 장내설사원인균에 대해 성장을 억제하는 효과를 갖고있어 probiotics로서의 가치가 있을 것으로 생각된다. 또한 사람의 장내세균총이 생산하는 유해효소중에서는 대장암의 발생원인 효소중에 하

나인 β -glucuronidase와 장내부패환경을 만드는 효소중의 하나인 urease 효소활성을 억제하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 *B. licheniformis*가 단지 장내의 유해균의 성장억제 뿐만아니라 성인병의 예방효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Ahn, T. T., Lim, J. H., Kang, H. J., Jang, Y. H. and Kim, H. U. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* ser. typhimurium in fermented milk products. *J. Fd. Hyg. Safety*, **12**, 175-180.
- Dahiya, R. S., and Speck, M. L. (1968). Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1568-1572.
- Gilliland, S. E., and Speck, M. L. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. *J. Fd. Protection*, **40**, 820-823.
- Huges, D. B. and Hoover, D. G. (1990). Bifidobacteria-their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **45**, 74-81.
- Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993). Bifidobacteria-research and development *Food Technol.* **47**, 128-135.
- Kim, D.-H., Lee, J.-H., Bae, E.-A. and Han, M. J. (1995). Induction and inhibition of indole of intestinal bacteria. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 351-355.
- Miller, L. G. and Kaspar, C. W. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Fd. Protection*, **57**, 460-464.
- Park, H.-Y., Bae, E.-A., Han, M. J., Choi, E.-C. and Kim, D.-H. (1998). Inhibitory effects of Bifidobacterium spp. isolated from a healthy Korean on harmful enzymes of human intestinal microflora. *Arch. Pharm Res.* **21**, 54-61.
- Rubin, H. E. and Vaughan, F. (1979). Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Sci.*, **62**, 1873-1879.
- Salminen, S., Deighton, M. and Gorbach, S. (1974) Lactic acid bacteria in health and disease, In Salminen, S. and von Wright, A. (Eds). *Lactic acid bacteria* pp 199-226 Marcel Dekker, Inc., New York.
- Song, M.-J., and Kim, D.-H. (1998). Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infection. *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 125-128.
- Tomoko, A. K., Tomoko, Y. and Ishibashi, N. (1996). Inhibitory effect of human-derived Bifidobacterium on pathogenic *Escherichia coli* serotype O-111. *Biosci. Microflora* **15**, 17-22.