

한국 영아로부터 분리한 *Enterococcus faecium*의 구강 병원균에 대한 억제 효과

정은경, 이종철, 서정윤, 김성윤, 김완수, 윤우혁, 김윤상, 피성희, 유형근, 신형식*
원광대학교 치과대학 치주과학교실

Inhibitory effects of *Enterococcus faecium* isolated from Korean infants on oral pathogens

Jeong Eun-Gyeong, Lee Jong-Cheol, Seo Jung-Yoon, Kim Seong-Yoon, Kim Wan-Su, Yun Woo-Hyuk, Kim Yun-Sang, Pi Sung-Hee, You Hyung-Keun, Shin Hyung-Shik

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

ABSTRACT

Purpose: The probiotic effects of lactic acid bacteria have widely been researched in diverse human pathogens, but only a few effects are reported against oral pathogens. The antimicrobial effects of the *Enterococcus faecium* 7413 isolated from Korean infants on the 9 pathogen including 6 oral streptococci were investigated the clinical use of the antimicrobial peptide for oral microflora control.

Materials and Methods: *E. faecium* 7413 was identified by morphological, biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. Inhibitory effects of culture supernatants were determined for their ability to grow on agar plate containing pathogenic bacteria.

Result: The culture supernatant of *Enterococcus faecium* 7413 showed inhibitory effects on oral pathogens, namely *Streptococcus pyogenes* KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268, *S. intermedius* ATCC 27823 and *Shigella flexneri* KCTC 2008. Whereas it did not affect the multiplication of *E. coli* strains, KCTC 1041 and ATCC 43894.

Conclusion: The data obtained in this study could be useful for future development of effective probiotics allowing prevention for oral pathogens. (*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:31-40)

KEY WORDS: *Enterococcus faecium*; infant; oral pathogens.

서론

사람의 구강 내에 존재하는 많은 종류의 세균들은 대부분 정상 세균 총으로서 병원성 세균이 발육을 억제할 뿐만 아니라 숙주의 면역계의 형성과 선천면역반응을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 정상 세균도 구강 환경의 생태적인 변화가 일어나거나 숙주의 방어기전이 약해지면 급속히 증식하여 치아우식증과 치주질환을 비롯한 치수 및 치근단 감염, 구강

안면 조직 또는 악골 감염 등 구강 내 질환을 일으킨다. 최근에는 이들 구강 미생물들의 심혈관 질환과 당뇨병과 같은 전신 질환에 대한 밀접한 연관성에 대한 보고가 증가하고 있다¹⁻²⁾.

유산균(lactic acid bacteria)은 자연계에 널리 존재하며 탄수화물을 이용하여 유산을 생산하는 미생물들의 총칭이다. 발효 식품 등을 통하여 섭취된 유산균은 장내로 유입된 후 장내 상피세포에 착생하게 되어 병원성 미생물의 저해 및 길항작용, 면역 활성의 증진, 암 발생률의 감소, 그리고 아토피 피부염의 감소 등 인체에 많은 도움을 준다. 따라서 유산균은 동서양을 막론하고 유제품, 육제품, 침채류 및 각종 젓갈류의 가공에 유용한 보조 수단뿐만 아니라 생균제(probiotics)로도 이용되고 있다³⁻⁵⁾.

생균제는 ‘or life’를 의미하는 그리스어에서 유래하였으

Correspondence: Dr. Shin Hyung-Shik
Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University,
344-2 Sinyong-Dong, Iksan City, Jeollabukdo, South Korea, 435-035
Email: periohs@wonkwang.ac.kr, Tel: 82-63-859-2967, Fax: 82-63-857-6364
* 본 연구는 2007년도 원광대학교의 교비지원에 의한 연구임.
접수일: 2008년 1월 16일; 채택일: 2008년 2월 29일

며, 항생제(antibiotics)의 ‘against life’와는 반대 의미를 가진다. 1908년 발효된 유제품을 먹는 불가리아 농부들의 수명이 긴 것을 관찰한 러시아 과학자 Metchnikoff에 의하여 처음으로 그 개념이 도입되었다. Stillwell과 Lilly는 생균제란 용어를 처음 사용하였으며, Parker는 생균제의 개념을 “숙주 장내세균의 억제를 통하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 물질”이라고 정의하였다⁶⁾.

가장 대표적인 생균제는 유산균으로 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*가 가장 많이 이용된다. *Lactobacillus* 종으로는 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus* 종으로는 *S. faecium*, *S. thermophilus*, *S. diacetylactus*가 주요 균종으로, 최근에 *Streptococcus*에 속하는 유산균은 *Enterococcus*라고 명명되었다⁷⁾. 생균제의 병원균에 대한 항균작용과 관련된 연구는 *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, 그리고 *Helicobacter pylori* 등과 같은 세균들을 대상으로 하여 수행되었다.

여러 구강미생물 중 *S. mutans*는 세포의 다당류를 생성하는 glucosyltransferase에 의해 비수용성 glucan을 형성하여 균체가 치아 표면에 부착하도록 하고 치태 형성 및 치아우식증을 유발한다. *S. anginosus*, *S. constellatus* 및 *S. intermedius*는 유전학적으로 동일 군에 속하며 호흡기 감염증과 세균성 심내막염의 주요 원인체이다⁸⁾. 이 균들은 현재에는 두경부 암과의 밀접한 연관성 때문에 임상적 중요성이 크게 증가하고 있다^{9,10)}. *S. pyogenes*는 인두염, 성홍열, 피부 깊숙이 감염되어 발생하는 연쇄구균성 화농증 및 대중 매체에서 ‘살 파먹는 박테리아 감염증’으로 알려진 괴사성 근막염 등과 속발질환으로 류머티즘 열과 사구체 신염

등 매우 다양한 질병을 일으킨다. *S. pneumoniae*는 호흡기를 통하거나 맥관 계통에 의해서 확산되며 신체의 다른 부위로 이동하여 폐렴, 이차선염, 결막염, 복막염, 중이염, 심내막염 및 패혈증 등과 증상을 일으킨다¹¹⁾.

구강 내 병원균으로는 *S. mutans*¹²⁾와 *S. salivarius*¹³⁾를 대상으로 수행된 바 있으나 전신질환을 일으키는 다양한 구강 병원균을 대상으로 수행된 연구는 국내·외적으로 찾아보기 어렵다. 미생물의 동정에는 주로 배양법, 효소면역법 및 생화학적 검사 등의 방법으로 수행되어 왔으나, 현재에는 환경적 요인에 의해서 거의 영향을 받지 않는 데이터를 제공하고 또한 신속한 동정이 가능하며 유전형질의 진화적 개념을 도입한 16S rDNA 분석법이 널리 사용되고 있다¹⁴⁾.

이 연구에서는 한국 영아로부터 분리한 유산균을 대상으로 구강 내 병원균과 아울러 설사를 일으키는 장내 병원균에 대한 항균효과를 조사하여 생균제로의 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 유산균의 분리

건강한 영아의 분변 1 g씩을 채취하여 멸균 Phosphate buffered saline(PBS)로 10⁶~10⁷ cfu/ml 수준까지 십적 희석하고 MRS 평판배지(Difco, Detroit, MI, U.S.A.)에 0.1 ml 씩을 도말한 후 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 36시간 동안 배양하였다. 유산균과 유사한 집락은 BCP 평판배지(Difco)에 다시 계대 배양하여 순수 집락들을 선별하였다. 배양배지의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Primers Used in PCR Amplification and Sequencing of 16S rDNA

Primer	Sequences (5'→3')	Size	Binding site		Usage	
			5'	3'	PCR	Seq.
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAAG	20	8	27	O	
MG2f	GAACGGGTGAGTAACACGT	19	107	125		O
MG3f	CTACGGGRSGCAGCAG	16	342	357		O
MG4f	AATTCCTGGTGTAGCGGT	18	675	692		O
MG5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		O
MG6f	GAACGTCAAGTCATCATGCC	19	1190	1208		O
1525r	AAGGAGGTGWTCARCC	17	1544	1525	O	

2. 분리균의 생리 화학적 검사

분리된 유산균들의 기초 동정을 목적으로 성장 검사와 생리 화학적 검사를 실시하였다. 균체를 그람 염색한 후 API 50 CHL Carbohydrate test kit(bioMerieux Co., France)를 이용하여 생리 화학적 실험을 수행하였다. MRS 평판배지에서 성장한 균체를 5 ml의 용해배지에 용해하여 Mcfarland standard 2로 균수를 맞춘 후 API 50 CHL medium에 접종하였다. 접종 후 strip에 mineral oil로 채운 후 37°C에서 48시간 배양한 후 API LAB plus software(bioMerieux)로 판정하였다.

3. 16S rDNA 분석을 이용한 분리균의 동정

분리된 유산균주들의 최종 동정을 목적으로 16S rDNA 분석을 실시하였다.

(1) Genomic DNA 분리

Genomic DNA의 분리는 Ausubel 등의 방법에 준하여 실시하였다. 3 ml의 nutrient broth(Difco)에서 배양한 분리균주를 1.5 ml tube로 옮기고 15,000 rpm에서 2분간 원심하여 균체를 침전시켰다. 침전된 균체는 100 μ l의 TE buffer(pH 8.0)를 가하여 잘 용해하고 20 μ l의 10% sodium dodecyl sulfate와 10 μ l의 proteinase K(10 mg/ml)을 가하여 50°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 균체는 200 μ l의 10% cetyl-trimethylammonium bromide/0.7 M NaCl 용액을 가하여 잘 혼합한 후 다시 65°C에서 10분간 반응하고 여기에 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24:1) 용액을 가하여 5분간 진탕한 다음 4°C에서 5분간 원심한 후 상층액만 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 1/10배의 3 M sodium acetate와 2배의 100% ethanol을 가하여 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 genomic DNA는 70% ethanol로 세척한 다음, 50 μ l의 TE 완충액에 용해하고 RNase를 최종농도가 20 μ g/ml 되도록 가하고 42°C에서 30분간 반응하여 RNA를 제거하였다. 정제된 DNA는 spectrophotometer(Model MBA 2000, Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA)를 사용하여 260 nm에서 정량하고 -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

(2) Primers

분리 유산균주들의 16S rDNA 증폭 및 염기서열 결정을

위한 primer들은 Lane의 *E. coli* 16S rDNA에 대한 보고를 기초로 하여 제작하였다. 염기서열은 Table 1과 같다. 각 primers들은 (주) 제노텍에 주문하여 200 pM scale로 합성하였다. 합성한 primer는 멸균 증류수로 PCR 용은 29 μ M, sequencing 용은 1.6 pM μ l⁻¹으로 희석하고 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(3) 16S rDNA 증폭

추출한 genomic DNA 10 μ l(50~100 ng)에 10X Taq buffer 10 μ l, 2.5 mM dNTPs 8 μ l, 1.25 mM MgCl₂ 10 μ l, D.W. 59 μ l, 10 μ M 27f primer 1 μ l, 10 μ M 1525r primer 1 μ l 및 Taq polymerase(Roches)를 0.5 μ l를 가하여 DNA thermal cycler(Model 480, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 94°C 2분, 55°C 1분, 72°C 2분간의 반응을 30회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응하여 16S rDNA를 증폭하였다. 증폭한 16S rDNA는 1.0% LE agarose gel(FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)에서 1X TAE buffer(45 mM Tris-acetate, pH 8.3, 1.0 mM EDTA), 100 V로 20분간 전기영동한 후 ethidium bromide(10 mg/ml)로 10분간 염색하고 Gel Doc 2000 system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 증폭유무와 크기를 관찰하였다.

(4) 염기서열 분석

분리 유산균들로부터 증폭된 16S rDNA는 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 16S rDNA 염기서열은 미국 National Center for Biotechnology Information의 BLAST server(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)를 이용하여 검색한 후 GenBank에 등재된 근연 세균들의 16S rDNA 유전자 염기서열들과 Clustal_X (1.7) 프로그램을 이용하여 다중 정렬하고 유사성 행렬을 구하였다¹⁵⁾. 계통도(phylogenetic trees)의 작성은 PHYLIP package를 이용하였으며 neighbour-joining 알고리즘을 이용하여 추론하였다. 진화적 거리는 Jukes와 Cantor의 neighbour-joining 방법을 이용하여 계산하였으며 unrooted tree 위상은 PHYLIP package의 SEQBOOT와 CONSENSE 프로그램을 이용하여 1,000회 resampling으로 bootstrap 분석을 수행하였다.

Table 2. The List of Pathogens Used in This Study

No.	Indicator organism	Related disease
1	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3556	pharyngitis, pyogenic disease
2	<i>S. pneumoniae</i> KCTC 5080	pneumonia
3	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	dental caries
4	<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	periodontitis, endocarditis
5	<i>S. constellatus</i> KCTC 3268	periodontitis, endocarditis
6	<i>S. intermedius</i> ATCC 27823	periodontitis, endocarditis
7	<i>E. coli</i> KCTC 1041	diarrhea
8	<i>E. coli</i> 0157 H7 ATCC 43894	bleeding diarrhea
9	<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	dysentery

* KCTC: Korean Collection for Type Cultures (Taejon, Korea), ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.).

** BHI (Brain Heart Infusion), LB (Luria Bertani Broth).

4. 병원균에 대한 항균 활성 시험

분리한 여러 유산균 중 7413 균주의 배양액으로부터 주요 구강 및 장내 병원성 세균들에 대한 항균활성을 측정하였다. 사용 균주로는 국내 유전자은행인 KCTC와 미국의 ATCC로부터 분양받은 *S. pyogenes* KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268, *S. intermedius* ATCC 27823, *E. coli* KCTC 1041, *E. coli* 0157 H7 ATCC 43894 및 *Shigella flexneri* KCTC 2008 등 다양한 구강 질환을 일으키는 연쇄구균들과 설사를 주 증상으로 하는 장내 병원성 세균들을 사용하였다(Table 2). *S. pyogenes* KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268 및 *S. intermedius* ATCC 27823의 경우 Brain Heart Infusion (BHI, Difco) 배지, *E. coli* KCTC 1041, *E. coli* 0157 H7 ATCC 43894 및 *Shigella flexneri* KCTC 2008의 경우 Luria Bertani Broth(LB, Difco)를 사용하여 배양하였다.

시험 방법으로는 먼저 시험 균주의 단일 집락을 10 ml의 MRS 액체배지(Difco)가 들어 있는 200 ml 플라스크에 접종하여 37°C에서 교반하면서 배양하였다. 시료는 1일에서 4일까지 24시간 단위로 채취하였으며 12000xg에서 10분간 원침한 후 상청액은 배양액으로, 균체 추출물은 원침 균체를 1 ml PBS에 희석한 후 sonication하여 사용하였다. 실험 방법은 agar diffusion assay를 이용하여 억제 활성을 측정하였다¹⁷⁾. 각 병원균 배양액을 10 ml의 영양배지가 들어 있는 200

ml 플라스크에 초기 O.D. = 0.1로 접종하여 7시간 동안 배양하여 총 균수가 2×10^8 이 되도록 조절한 다음 60°C의 균 지 않은 nutrient agar(Difco) 13 ml와 함께 1000 mm Petri dish에 부은 후 잘 굳혔다. 그 다음 56°C 배양기에서 24시간 동안 건조시켜 완전히 습기를 제거한 10 mm 페이퍼 디스크(Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)를 plate 위에 올려놓은 다음 각각의 디스크에 시료 100 μ l씩을 주입하였다. Plate는 37°C 배양기와 5% CO₂ 배양기에서 12시간 동안 호기 또는 혐기 배양한 다음 생성된 세균의 생육저지대 즉, 투명환(clear zone)을 확인하고 vernier calipers를 사용하여 직경을 측정하였다.

결 과

1. 유산균 7413의 생리 생화학적 특성

한국 영아 분변으로부터 분리한 여러 유산균주 중 7413으로 명명한 균주를 선택하여 생리 생화학적 특성을 조사한 결과 Table 3과 같은 성적을 얻었다. 검사 결과 양성으로 나타난 검사는 VP 반응, 0.04% NaNO₃에의 저항성, Arginine hydrolysis, L-Arabinose이었으며 Yellow pigment 생성, Methyl- α -D-glucosid, Raffinose 시험은 음성이었다. 반면 Gluconate, Mannitol, Melibiose, Sucrose D, D-Xylose D 시험은 의양성으로 유산균이 지니는 일반적인 특성을 지니고 있었다.

Table 3. Characteristics of Bacteria 7413 Isolated from Infant Feces; Characteristics Are Scored as: +, Positive; D, Intermediate

Characteristics	Results
Yellow pigment	-
VP reaction	+
Resistance to 0.04% NaNO ₃	+
Arginine hydrolysis	+
Acid from:	
L-Arabinose	+
Gluconate	D
Mannitol	D
Melibiose	D
Methyl-α-D-glucoside	-
Raffinose	-
Sucrose	D
D-Xylose	D

2. 유산균 7413의 16S rDNA 분석

유산균 7413의 16S rDNA 염기서열을 미국 NCBI의 BLAST를 통해 검색한 결과 분리균주 7413은 *Enterococcus*에 속함을 알 수 있었다. 따라서 분리균주 7413의 16S rDNA 서열을 GenBank에 등재된 *Enterococcus* 종들의 16S rDNA 염기서열들과 다중 정렬하여 유사성 행렬을 구하고 계통도를 작성한 결과 16S rDNA 상동성의 범위는 92.6~99.8%로 나타났다(Fig. 1). 유산균 7413은 *E. faecium*과 99.8%의 가장 높은 상동성을 보여 *E. faecium*으로 최종 동정하였다. 가장 낮은 상동성은 *E. solitarius*과의 92.6%이었다.

3. 유산균 7413의 병원균에 대한 항균 효과

실험 결과 유산균 7413은 구강 내 치주염을 일으키는 균주인 *S. pyogenes* KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268 및 *S. intermedius* ATCC 27823에 있어서 항균 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 유산균주 7413 배양액의 항균 효과는 치주염 원인균인 *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268, *S. intermedius* ATCC 27823에 대해 탁월한 것으로 나타났으며, 그 다음으로 치아우식균인 *S. mutans* ATCC 25175에 대해 항균 활성이

높게 나타났다. 인두염 균인 *S. pyogenes* KCTC 3556과 폐렴 균인 *S. pneumoniae* KCTC 5080에서는 미약한 활성을 보였다. 장내 세균에서는 분리균주 7413 배양액의 항균 활성은 이질균인 *Shigella flexneri* KCTC 2008에서는 비교적 높게 나타난 반면 2종의 대장균주인 *E. coli* KCTC 1041과 *E. coli* 0157 H7 ATCC 43894에 대해서는 항균 활성이 없는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Antibacterial Effects of Lactic Acid Bacteria 7413 Supernatant against Pathogenic Bacteria

No	Indicator organism	Results
1	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3556	+
2	<i>S. pneumoniae</i> KCTC 5080	+
3	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	++
4	<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	+++
5	<i>S. constellatus</i> KCTC 3268	+++
6	<i>S. intermedius</i> ATCC 27823	+++
7	<i>E. coli</i> KCTC 1041	-
8	<i>E. coli</i> 0157 H7 ATCC 43894	-
9	<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	+

* Characteristics are scored as: +++, strong positive (> 40 mm of inhibitory zone); ++, intermediate (25 to 40 of inhibitory zone); +, weak positive (< 25 of inhibitory zone); -, negative (no inhibitory zone).

4. 배양 시간에 따른 유산균 7413의 병원균에 대한 항균 활성

유산균 7413을 1일부터 4일까지 배양하면서 24시간마다 배양액을 취하여 병원균에 대한 억제 활성을 측정하였다. 실험 결과 시험균주 모두에서 경시적인 억제효과의 별 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 분리균주 7413 배양액은 구강 내 치주염을 유발하는 균주인 *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268 및 *S. intermedius* ATCC 27823에 대해서는 4일 동안 모두 상당한 억제활성을 보였으며 평균 억제 부위는 *S. anginosus* ATCC 33397는 42.45±0.17 mm, *S. constellatus* KCTC 3268는 42.5±0.39 mm, *S. intermedius* ATCC 27823는 42.25±0.91 mm로 나타났다. 그 다음으로는 *S. mutans* ATCC 25175의 20.8±2.45 mm이었는데 1~3일 배양액들은 20 mm 내외의 활성을 보였으나 4일 배양액에서 26.3 mm으로 활성이 증가하였다. *S. pyo-*

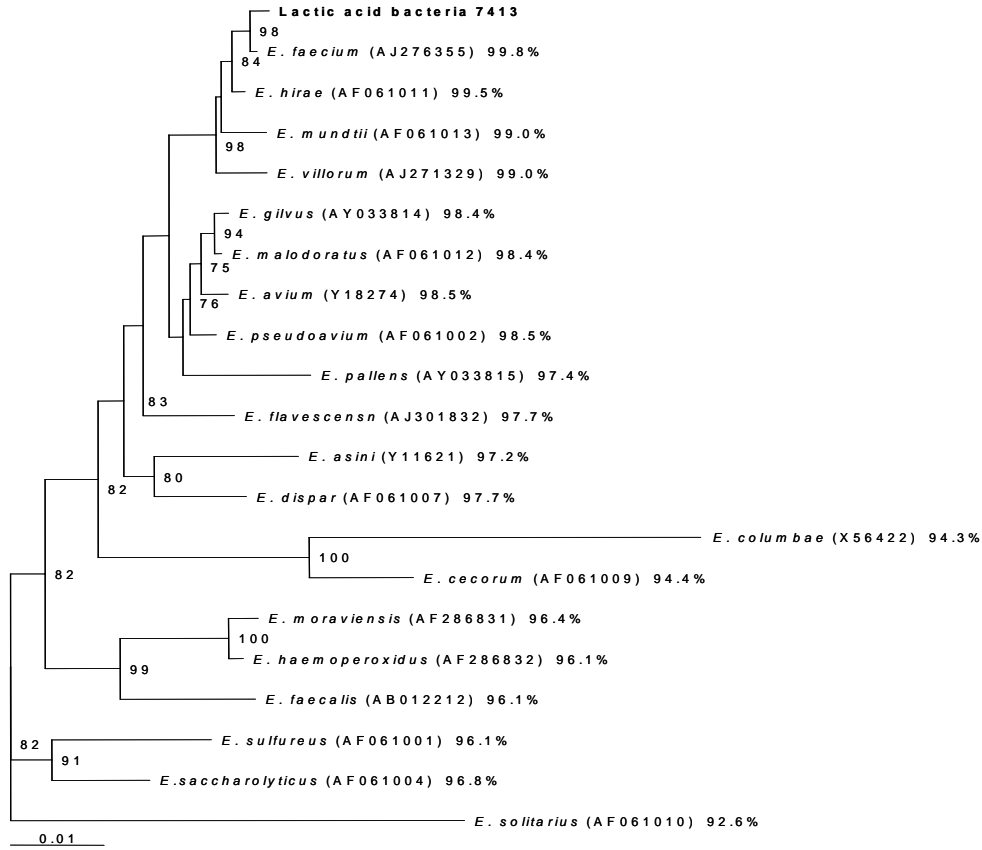


Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of lactic acid bacteria 7413 and validly described strains of the genus *Enterococcus*. The tree was constructed by using the neighbor-joining method. Scale bar represent 1 nucleotide substitution per 100 nucleotide.

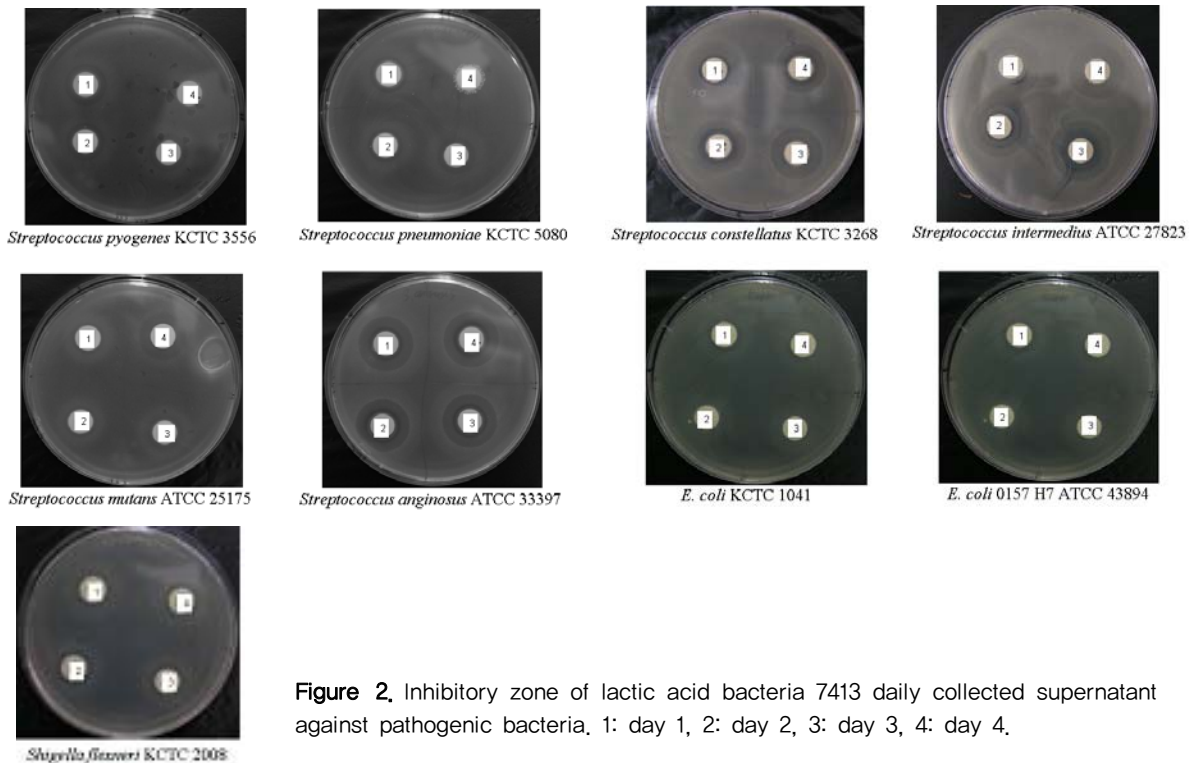


Figure 2. Inhibitory zone of lactic acid bacteria 7413 daily collected supernatant against pathogenic bacteria, 1: day 1, 2: day 2, 3: day 3, 4: day 4.

Table 5. Clear Zone of Lactic Acid Bacteria 7413 Supernatants against Pathogenic Bacteria

No.	Indicator organism	Diameter of inhibitory zone (mm)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
1	<i>S. pyogenes</i> KCTC 3556	21.3	20.8	20.8	20.6
2	<i>S. pneumoniae</i> KCTC 5080	20.8	20.4	20.6	20.2
3	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	19.0	19.2	20.8	24.3
4	<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	42.2	42.5	42.6	42.5
5	<i>S. constellatus</i> KCTC 3268	42.8	42.6	42.6	41.9
6	<i>S. intermedius</i> ATCC 27823	41.2	41.8	43.2	42.8
7	<i>E. coli</i> KCTC 1041	0	0	0	0
8	<i>E. coli</i> 0157 H7 ATCC 43894	0	0	0	0
9	<i>S. flexneri</i> KCTC 2008	21.3	21.0	21.5	21.4

genes KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080 및 *S. flexneri* KCTC 2008은 각각 20.9±0.30 mm, 20.5±0.26 mm, 21.3±0.22 mm의 활성을 나타냈다(Table 5).

고찰

생균제는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 많은 병원균과 부패균의 성장을 억제한다. 생균제 미생물이 병원균의 성장을 억제하는 기전은 장관 내에서의 한정된 영양물질에 대한 경쟁, 생성된 저급지방산, 항생물질 및 H₂O₂ 등의 작용 등이다¹⁶⁾.

유산균은 박테리옌(bacteriocin)이라는 생리활성물질을 생산하여 여러 부패성 미생물 및 병원성 미생물에 대한 생육억제 작용을 한다. 박테리옌은 여러 종의 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질 또는 단백질 계의 물질로서 박테리옌을 생산하는 균주는 면역에 관계되는 단백질을 합성하여 그것에 의해 사멸되지 않지만 형태와 계통학적으로 유사한 균종에 대하여 살균 기작을 갖는 물질을 지칭한다¹⁷⁾.

항생제의 경우 사람에게 투여 시 부작용이 있다는 단점이 있으나 박테리옌은 단백질로 이루어져 있어 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질 가수분해 효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 장점이 있다. 박테리옌을 생산하는 미생물들은 *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis and cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Escherchia coli* 그리고 *Saccharomyces*

boulardii 등이 있다¹⁸⁾.

구강 내 병원균의 억제는 치태, 치아우식, 구내염 등의 구강 질환 뿐 아니라 심혈관 질환, 당뇨병과 같은 전신 질환의 예방 및 치료에 매우 중요하다.

구강 내 병원균 억제 후보물질 개발은 식물 추출물, ba-kuchiol, propolis, 마늘 등의 천연물을 대상으로 연구들이 수행되어 항균물질의 개발 및 효과 등이 보고되고 있다. 항균 물질의 경우 대부분이 terpenoid계와 페놀성 화합물로 알려져 있으며, 이들은 당 또는 단백질과 결합할 수 있기 때문에 병원균에 대한 방어 화합물로 작용할 수 있다¹⁹⁾. 그러나 생균제 미생물을 대상으로는 극소수의 연구만이 수행되었다^{20,21)}. 본 연구에서는 구강 내 병원균을 억제하는 생균제의 개발을 위하여 당을 분해하여 유산을 생산하는 *Lactobacillus*를 비롯한 다양한 유산균을 분리하였다. 그러나 진행성 치아우식증의 경우 구강 내에서 *L. salivarius* 등 *Lactobacillus*의 수가 증가하며²²⁾, 이 균은 *S. sanguis*, *S. mutans* 및 *Actinomyces viscosus* 등과 공통 항원을 보유하고 있으므로²³⁾, 구강 내 병원균 억제용 생균제로서는 *Lactobacillus*는 적합지 않다고 판단하여 *Enterococcus*로 동정된 분리균주 7413을 구강 내 병원균을 억제하는 생균제 후보 균주로 선정하였다.

Stackbrandt와 Goebel은 세균의 종에 대하여 "16S rDNA 상동성이 97% 이상이며 DNA-DNA reassociation values가 70% 이상인 균주의 집단이라고 정의" 하였으며 현재까지 세균 종의 결정에 있어서 지표가 되고 있다¹⁴⁾. 본 연구에서는 영아로부터 분리균주 7413의 생리 화학적 검사를 실시한 결과 이 균이 유산균에 속함을 알 수 있었으며 BCP 평판배지에서 노란색 집락을 형성하지 않았으므로 *Lactobacillus*가 아닌 것으로 판

정하였다. 분리균주 7413은 16S rDNA 염기서열을 분석으로 *E. faecium*으로 최종 동정하였다.

*Enterococcus*는 사람과 동물의 장내에 서식하는 세균으로 그람 양성 세균으로 탄수화물을 이용하여 유산을 생산한다. 특히 *E. faecium*은 유해세균의 생장을 억제하고 장 점막 부착성이 좋은 것으로 알려져 있어 사람과 동물의 설사 예방제나 정장제로 사용되고 있다^{24,25)}.

본 연구에서도 분리균주 7413은 구강 내 질환을 유발하는 *S. pyogenes* KCTC 3556, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268 및 *S. intermedius* ATCC 27823에 있어서 탁월한 항균 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 장내세균에서는 분리균주 7413 배양액의 항균 활성은 이질균인 *Shigella flexneri* KCTC 2008 에서는 비교적 높게 나타난 반면 2종의 대장균주인 *E. coli* KCTC 1041와 *E. coli* O157 H7 ATCC 43894에 대해서는 항균 활성이 없어 이 균주가 장관용보다 구강용 생균제로 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 또한 배양 시간에 따른 억제 활성에서 *S. mutans* ATCC 25175를 제외한 다른 균주들에서는 대수성장기부터 사멸기까지 큰 차이를 보이지 않았다. 박테리옌은 성장기 이후 정체에 그 활력이 감소하는데 이것은 균체가 성장하면서 생산하는 단백질 분해효소 때문으로 생각되나 박테리옌이 성장기 전반에 걸쳐서 생성된다는 보고도 있다²⁶⁾. 따라서 본 연구에서 사용한 분리균주 7413은 단백질 분해효소를 생산하지 않거나 박테리옌이 대수 성장기부터 일정하게 생산되는 것으로 생각된다.

*E. faecium*은 보편적으로 안전한 미생물로 인식되고 있으나 최근에는 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF)의 출현에 대한 보고도 있어 주목되고 있다^{27,28)}. 따라서 앞으로 이 균주에 대한 vancomycin 등 항생제 내성에 대한 추가 연구와 실제 구강 환경에서 생균제로의 기능에 대한 *in vivo* 항균 활성에 대한 연구가 수행되어야 한다고 생각된다.

결론적으로, 이 연구에서는 구강 생균제의 개발을 목적으로 한국 영아로부터 유산균주를 분리 동정하여 구강 내 병원균과 장내 병원균에 대한 항균효과를 조사하였다.

1. 한국 영아 분변으로부터 분리한 유산균 7413의 생리 생화학적 특성은 VP 반응, 0.04% NaNO₃에의 저항성, Arginine hydrolysis, L-Arabinose은 양성, Yellow pigment 생성, Methyl- α -D-glucosid, Raffinose는 음성이었다. 반면 Gluconate, Mannitol, Melibiose,

Sucrose D, D-Xylose D는 의양성이었다.

2. 유산균 7413은 생리 생화학적 검사와 16S rDNA 분석으로 *Enterococcus faecium*로 동정되었다.
3. 유산균 7413은 구강 병원균인 *S. pyogenes* KCTC 3984^T, *S. pneumoniae* KCTC 5080, *S. mutans* ATCC 25175, *S. anginosus* ATCC 33397, *S. constellatus* KCTC 3268 및 *S. intermedius* ATCC 27823에는 탁월한 억제 활성이 있었다. 장내 병원균인 *Shigella flexneri* KCTC 2008에 대해서는 억제활성이 비교적 높게 나타난 반면, 대장균 *E. coli* KCTC 1041과 *E. coli* O157 H7 ATCC 43894에 대해서는 억제 활성이 없었다.
4. 배양 시간에 따른 항균활성 시험 결과 유산균 7413은 *S. mutans* ATCC 25175에 대해서는 1일째 배양액보다 4일째 배양액에서 억제 활성이 증가하였으나 다른 구강 및 장내 병원균에 대해서는 차이를 보이지 않았다.

이상으로 유산균 7413은 구강용 생균제 개발을 위한 후보균주로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol* 2000;23:9-12.
2. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the science review. *Ann Periodontol* 2001;6:9-15.
3. Guandalini S. Probiotics for children: use in diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:244-248.
4. Madsen K. Probiotics and the immune response. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:232-234.
5. Shaw L. Effects of probiotics on atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 2006;91:373.
6. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Ani Nutr Health* 1974;29:4-8.
7. Ruoff KL. Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9(2): 75-79.
8. Shinzato T, Saito, A. The *Streptococcus milleri* group as a cause of pulmonary infections. *Clin Infect Dis* 1995;21: 238-243.

9. Shiga K, Tateda M, Saijo S et al. Takasaka T, Miyagi T. Presence of Streptococcus infection in extraoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma and its implication in carcinogenesis. *Oncol Rep* 2001;8:245-248.
10. Tateda M, Shiga K, Saijo S et al. Streptococcus anginosus in head and neck squamous cell carcinoma: implication in carcinogenesis. *Int J Mol Med* 2000;6:699-703.
11. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP et al. Genetic relationships between clinical isolates of Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis, and Streptococcus mitis: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to S. mitis harboring S. pneumoniae virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* 2000;68(3):1374-1382.
12. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, et al. Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand* 2005;63:317-63320.
13. Zhou JS, Rutherford KJ, Gill HS. Inability of probiotic bacterial strains Lactobacillus rhamnosus HN001 and Bifidobacterium lactis HN019 to induce human platelet aggregation in vitro. *J Food Prot* 2005; 68:2459-2464.
14. Stackebrandt E, Goebel BM. A place for DNA-DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:846-849.
15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Res* 1997;24:4876-4882.
16. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:1901-1906.
17. Konisky J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu Rev Microbiol* 1982;36:125-144.
18. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 1976;40:722-756.
19. Lee HO, Lee KH, Park NK et al. Antibacterial Effects of Sophora flavescens on Streptococcus mutans. *The Korean Journal of Food And Nutrition* 2000;13:539-546.
20. Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of Streptococcus mutans biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:214-216.
21. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 2005;113:188-196.
22. Kohler B, Bjarnason S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987;15:332-335.
23. Aguilera Galaviz LA, Premoli G, Gonzalez A, Rodriguez RA. Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and Lactobacillus. *J Clin Pediatr Dent* 2005; 29:329-333.
24. Audisio MC, Oliver G, Apella MC. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of Enterococcus faecium. *Int J Food Microbiol* 2001;63:235-241.
25. Benyacoub J, Perez PF, Rochat F et al. Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to Giardia intestinalis in mice. *J Nutr* 2005;135:1171-1176.
26. Joerger MC, Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 481. *J Bacteriol* 1986;167:439-446.
27. Lund B, Edlund C, Barkholt L et al. Impact on human intestinal microflora of an Enterococcus faecium probiotic and vancomycin. *Scand J Infect Dis* 2000;32:627-632.
28. Lund B, Adamsson I, Edlund C. Gastrointestinal transit survival of an Enterococcus faecium probiotic strain administered with or without vancomycin. *Int J Food Microbiol* 2002;77:109-115.