

The Preventive Effect of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 and *Bacillus mojavensis* KJS-3 on Triton WR-1339-induced Hyperlipidemia

Jin Young Lee¹, Seung Jae Lee¹, Hyung Hoi Kim² and Jae Seon Kang^{1*}

¹Department of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 48434, Korea

²Biomedical Research Institute, Busan National University Hospital, Busan 49241, Korea

Received January 27, 2021 / Revised February 17, 2021 / Accepted February 18, 2021

The purpose of this study was to evaluate the possibility that administration of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2), *Bacillus mojavensis* KJS-3 (Moja3), and their mixtures could control serum lipid levels. We observed changes in the blood cell level, metabolic function evaluation, and blood lipid levels after two weeks of oral administration of these microbial strains to hyperlipidemia-induced rats. Measurements of major cell changes in the white blood cells (WBC) indicated no significant effects due to the administration of the microbial strains. Platelet (PLT) levels decreased by 18.4% in the Triton WR-1339-treated group (NCON) and recovered to the control (CON) group levels in the positive control (PCON) group and the microbial strain-administered groups ($p < 0.05$). No functional changes were observed in red blood cells (RBC) by Triton WR-1339-induced hyperlipidemia. The blood AST, ALT, BUN, and creatinine levels did not indicate effects on liver and kidney function, and all rats administered the microbial mixture recovered. The blood lipid levels in the microbe-treated groups indicated reduced levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC), and increased levels of serum HDL cholesterol. The HMG-CoA inhibition rate of 7-O-succinyl macrolactin A (SMA) produced by BP2 showed similar activity at a concentration of 1,000 times lower than that achieved with atorvastatin. The administration of the microbial strains to the Triton WR-1339-induced rat model of hyperlipidemia resulted in reduced weight gain without affecting the food and water intake. Thus, blood circulation can be improved by controlling serum lipid levels by the combined administration of the BP2 and Moja3 microbial strains.

Key words : *Bacillus mojavensis* KJS-3, *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, HMG-CoA reductase, hyperlipidemia, lipid metabolism

서론

과량의 콜레스테롤(cholesterol) 섭취로 인한 고콜레스테롤혈증이나 고탄수화물 식이로 당질유도에 의한 고중성지질혈증과 같은 지질대사이상으로 순환기계질환의 발병위험이 증가된다[17]. 이러한 지질대사의 이상으로 체내 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC), 중성지방(triglyceride, TG), 저밀도 지단백 콜레스테롤(low density lipoprotein, LDL-cholesterol)과 같은 혈중지질이 기준값보다 증가된 상태를 고지혈증이라 한다[18]. 이러한 고지혈증을 치료하기 위해 경증인 경우 식이요법만으로 개선이 가능하지만 중증인 경우에는 약물요법이 필요하다. 고지혈증의 치료에 사용되는 대표적인 치료제로는 스타틴계(Statin), 프로부콜(Probucol), 피브레이트계(fibrate) 약

물, cholesteryl ester transfer protein (CETP) 저해제, acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) 저해제 등이 있다[9]. 현재 statin계 약물이 가장 많이 사용되고 있으며 이는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase의 구조 유사체로 콜레스테롤 합성을 저해하는 효과가 있다[9]. *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P, 이하 BP2 균주)는 Bispan (TOA 제약, 일본)으로부터 분리하여 한국미생물보존센터에 종균기탁된 균주로 비타민과 유산을 생성하고, 대사산물로 macrolactin A (MA), macrolactin E (ME), 7-O-succinyl macrolactin A (SMA), 7-O-malonyl macrolactin A (MMA)와 같은 macrolactin계 화합물을 생산한다[2, 10] *Bacillus mojavensis* KJS-3 (이하 Moja3 균주)는 음식물쓰레기에서 분리된 등록균주(KCCM10961P)로 항균 및 항진균 작용을 가지고 있고, 젖산을 생산할 수 있는 능력, 인공위액과 담즙산에서의 안정성 등이 확보된 산업적으로 매우 유용한 균주이다[3]. 설치류에 인위적인 고지혈증 유발을 위해 양친매성 계면활성제인 Triton WR-1339를 사용하였다. Triton WR-1339에 의한 고지혈증 유발 모델은 내인성 세포의 지단백 지방분해효소인 lipoprotein lipase (LPL)의 활성을 억제하여 혈중 중성지방을 증가시킨다[24]. Triton WR-1339로 유도한 고지혈증에서 일어

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4882, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : jskang28@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나는 비정상적 지질대사로 인해 혈청 내 LDL-콜레스테롤, TC, TG의 증가와 함께 고밀도지단백-콜레스테롤(High density lipoprotein - cholesterol, HDL-cholesterol)이 감소하므로 대표적인 고지혈증 동물모델로 사용되어져 왔다[7, 14]. 본 연구에서는 Triton WR-1339로 유도한 고지혈증 설치류에서 BP2 균주와 Moja3 균주의 혈중지질수준의 개선 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

균주 배양에 사용된 Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB)와 Bacto™ Agar (TSA)는 Dickinson and company (Becton, USA)에서 구입하여 사용하였다. Potassium phosphate, Sodium chloride, Potassium chloride, Manganese (II) sulfate monohydrate, Potassium phosphate, Magnesium sulfate, Calcium chloride, Bile extract porcine 및 모든 사용된 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며 배양기는 Seyoung scientific Co. (Bucheon, Korea)사를 이용하였다. Triton WR-1339 (Tyloxapol)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. TG는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI)에서, TC, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 분석을 위한 키트는 Abcam사(Cambridge, MA, UK)에서 구매하여 사용하였다. 혈액 분석은 ADVIA 2120i (Siemens, Munich, Germany)를 사용하여 측정하였다.

BP2와 Moja3의 endospore 형성배양 및 확인

BP2와 Moja3는 TSB에서 배양한 다음 nutrient broth (NB)에 potassium phosphate, sodium chloride, potassium chloride, manganese (II) sulfate monohydrate, potassium phosphate, magnesium sulfate 및 calcium chloride를 첨가한 배지를 배양기를 이용하여 150 rpm으로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. Endospore 형성을 위해서 Choi [3] 등의 방법에 따라 배지 1 l 당 NB (Difco) 13 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.51 g, KCl 0.97 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.2 g, MnSO₄ · H₂O 0.003 g, Fe₂SO₄ · 7H₂O 0.00055 g, 10% skim milk를 포함하는 배지에 배양기를 이용하여 150 rpm으로 37°C에서 7~8일 동안 배양하여 endospore를 형성하였다. Endospore 균수 측정은 80°C에서 2시간 동안 열처리 후 총 0.1% 펩톤수로 희석하여 최적 온도에서 배양 후 콜로니 형성단위(colony forming unit)를 확인하였다[8]. 또한, 미생물의 포자는 malachite green 염색 후 현미경(DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 endospore 형성 유무를 확인하였다.

BP2에서 SMA의 생산 및 HMG-CoA reductase 저해활성 평가

본 연구진의 선행연구에서 BP2 균주가 분비하는 물질 중 항균, 항암 등 다양한 효능[10, 11]이 밝혀져 있는 SMA의 HMG-CoA reductase 저해 활성을 평가하였다. 먼저 BP2 균주로부터 SMA를 생산하기 위해 본 연구진의 이전 논문에서 기술한 방법에 따라 발효, 추출, 분리 정제하여 얻었다[10]. 구체적으로는, BP2 균주를 TSB 배지에서 종균 배양한 뒤 SMA를 생성하기 위해 종균 배양액 200 ml를 HP-20 레진(100 g)을 포함한 TSB 배지 2l에 접종한 뒤 30°C, 200 rpm, pH 7.0의 조건에서 2.5일 배양하였다. 배양액을 140 mesh sieve를 이용하여 여과하고 HP-20 레진을 에틸아세테이트와 메탄올로 세척을 반복하여 여액을 진공농축한 것을 메탄올에 용해하여 HPLC로 분석하여 SMA를 확인하였다. 기존 연구에서 효능이 있었던 SMA 농도[10, 11]를 기준으로 하여 HMG-CoA reductase assay kit (ab204701, abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 *in vitro*에서 측정하였다. HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 HMG-CoA reductase에 의해 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 간접적으로 측정하는 방법으로 340 nm에서 15분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 양성 대조군으로 atorvastatin을 사용하여 비교하였고, HMG-CoA reductase 활성 저해율(%)은 다음과 같은 계산식에 의해 계산하였다.

$$\text{활성저해율(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도 변화} / \text{Blank의 흡광도 변화}) \times 100$$

실험동물 및 시료 처리

6주령의 웅성 Sprague Dawley rat (200±50 g body weight)을 (주) 효창 사이언스(대구, 한국)에서 분양받아 사육실 내 실험동물용 케이지에서 개별로 1주일의 적응기간을 거친 후 실험에 투입하였다. 동물실은 무균으로 실내온도 22±2°C, 습도 55±5%를 자동 유지하고 12시간 단위로 자동조절 하였다. 실험동물은 크게 정상군(CON), Triton WR-1339를 투여하는 음성대조군(NCON), atorvastatin을 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 그룹을 양성대조군(PCON), BP2 (1×10⁵ cfu/kg/day)를 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(BP2), Moja3 (1×10⁵ cfu/kg/day)를 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(Moja3), BP2와 Moja3 (각각 1×10⁵ cfu/kg/day)를 투여하고 Triton WR-1339를 투여한 실험군(BM) 등 총 6 그룹으로 구성하고 각 그룹당 5 개체씩 배치하였다. Triton WR-1339는 0.15% KCl에 희석하여 사용하였고, 투여용량은 300 mg/kg의 용량으로 복강투여 하였다. 약물 및 시험물질은 매일 오전 일정한 시간에 경구투여 하였고 2~3일마다 사료복용량, 음용수량, 체중을 측정하였다. 실험 종료 15시간 전에는 사료의 공급을 중단하고 실험종료 시점에서 복대정맥에서 혈액시료를 채취하여 전혈은 complete blood cell (CBC) 측정을 위해 사용하였고, 혈청을 분리한 시료는 생체지표 측정에 사용하였다. 본 연구는 경성대학교 동물실험윤리위원회(Kyung Sung University, Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인

(승인번호: 연구-20-005A)을 받아 지침에 따라 관리하였다.

CBC counter를 이용한 혈액 내 세포수준 변화 측정

0.1% EDTA 처리된 전혈을 이용하여 채혈 후 2시간 이내에 CBC 측정을 하였다. 측정 장비는 ADVIA 2120i (Siemens, Munich, Germany)를 사용하였으며, 개별 혈액에 대해 3회 반복 측정하여 데이터 분석을 하였다.

주요 대사기능 및 이상평가

혈중 아스파테이트 트랜스아미네이스(aspartate transaminase, AST), 알라닌 트랜스아미네이스(alanine transaminase, ALT), 요소질소 농도(blood urea nitrogen; BUN), creatinine 은 아산제약(주)(Seoul, Korea) kit를 사용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 측정하였다.

혈액내 지질 수준 변화 측정

혈중 지질 수준 측정을 위해 복대정맥에서 채혈 직후 상용 혈청분리튜브(Vacurette® Tube, Greiner Bio-One GmbH, Austria)를 이용하여 원심분리 후 -80℃에 보관한 혈청을 사용하였다. TG는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI)에서 제공한 분석법에 따라 혈청을 사용하여 측정하였다. TC, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 Abcam사(Cambridge, MA, UK)에서 제공한 분석법에 따라 혈청을 사용하여 측정하였다.

통계 처리

본 연구의 모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 각 그룹간의 차이를 검정하기 위하여 Duncan의 사후테스트를 실시하였으며, 통계 분석은 SPSS 통계 소프트웨어 (Ver. 13.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.5$, $p < 0.05$ 및 $p < 0.005$ 로 표현하였다.

결과 및 고찰

기초생체변화

실험기간 동안 체중변화는 Fig. 1A에서 보는 바와 같이 실험 시작시점과 종료시점에서 개체의 평균 체중변화의 차이를 보면 NCON 그룹에 비해 PCON 그룹의 체중증가율은 CON 그룹에 준하는 수준으로 감소하였고, NCON 그룹의 체중증가율에 비해 BP2 그룹은 약 73%, Moja3 그룹은 약 74%, BM 그룹은 약 71% 수준으로 증가하여 약물투여 그룹보다 혼합군주투여 그룹에서 체중증가율이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 체중변화 등의 측정만으로도 그룹간 차이가 확실히 나타났다. 개체당 일일 사료섭취량 및 음용수량은 그룹간 유의적인 변화는 없는 것으로 판단해 볼 때 체중증가율의 변화는 사료섭취량과 무관한 변화인 것으로 판단된다(Fig. 1B, Fig. 1C). 체중 대비 간, 비장, 양쪽 신장의 무게 또한 Triton WR-1339처리 및 군주 투여에 의한 차이가 없었다(Table 1). BP2는 유산을 분비하는 유산균으로 항염, 항암, 면역조절 작용, 정장작용 등을 통해 생체에 유익한 작용을 하는 것으로 보고되어 있다[13]. Moja3 또한 젖산을 생성하며 항산화 활성, 항균작용, 세포내 지방산 분해 등 다양한 작용을 하는 균주로 알려져 있다[3]. 두 균주의 이러한 특성들이 체중을 감소시키는데 직접 혹은 간접적으로 영향을 미쳤을 것이라 사료된다. 결국 군주의 투여가 음용수나 사료섭취 등의 행태에 큰 변화를 가져오지는 않으면서 체중증가율이 감소하는 효과를 가지는 것으로 판단된다.

혈액 내 세포 수준 변화

혈액내 존재하는 다양한 세포수의 변화를 통해 여러가지 정보를 얻을 수 있다. 특히, 염증면역 관련 질병 진행여부를 알 수 있는 백혈구(white blood cell, WBC), 체내 대사 및 호흡에 대한 이상 여부를 알 수 있는 적혈구(red blood cell, RBC), 그리고 외상 등에 대비한 체내 보호 능력에 대한 상태를 알 수 있는 혈소판(platelet, PLT) 등의 평균 수치를 비교하여 판단할 수 있다[1]. Fig. 2는 군주 투여에 따른 혈소판 및 백혈구 내 주요세포인 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophil), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil)의 변화를 확인하였다. 분석결과 군주 투여에 따른 혈중 백혈구 수준은 크게 영향을 받지 않았다(Fig. 2A). 단위 혈액 내 혈소판

Table 1. Body, liver, spleen and kidney weight of control and triton WR-1339 induced hyperlipidemia rat

Groups	Body weight (g)	Relative organ weight (g) (organ/100 g body weight)		
		Liver	Spleen	Kidney (both)
CON	337±8.9	3.206±0.218	0.225±0.029	0.782±0.089
NCON	353±0.1	3.573±0.069	0.253±0.027*	0.799±0.049
PCON	353±0.4	3.470±0.081*	0.235±0.023*	0.834±0.044*
BP2	316±0.3	3.434±0.069	0.228±0.031*	0.778±0.033
Moja3	316±0.1	3.581±0.087	0.267±0.038	0.848±0.028
BM	309±0.1*	3.592±0.050	0.265±0.034*	0.802±0.035*

All values are mean ± SD (n=5). Significantly different from the CON group (* $p < 0.05$).

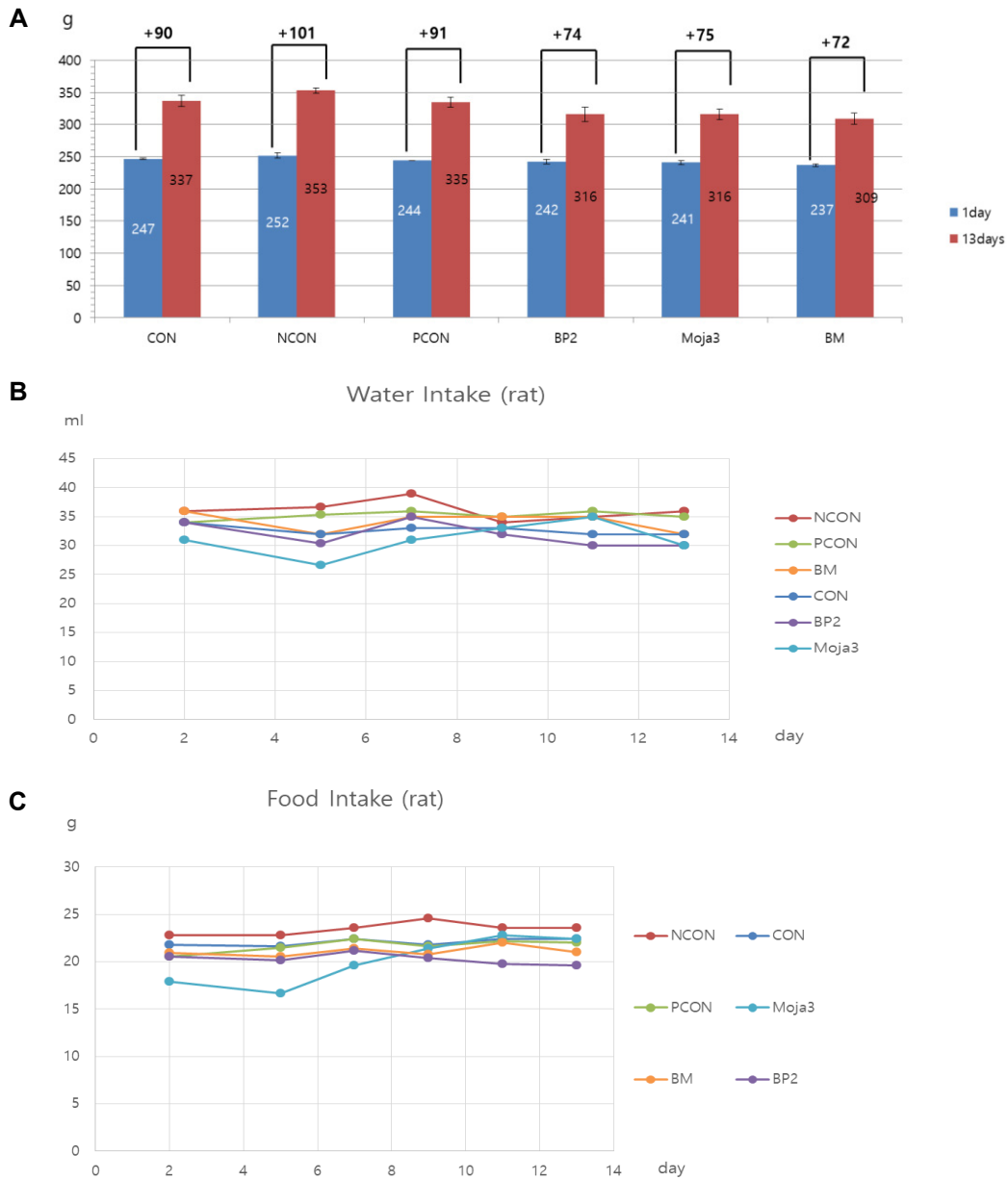


Fig. 1. Changes of (A) body weight (B) water intake (C) food intake after BP2 and Moja3 administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia rats. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, BP2: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, Moja3: *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, BM: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) and *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means \pm SD.

수치는 Triton WR-1339 처리시 18.4% 감소하였고, PCON 그룹 및 균주 투여군에서 다시 CON 그룹 수준으로 회복되었다 (Fig. 2B). 혈소판은 염증과 면역 반응에 중요한 역할을 하는데 혈소판이 감소하는 원인은 여러가지로 측면에서 고려해볼 수 있으며 본 연구의 경우는 외부의 약물투여(Triton WR-1339) 등에 의해 자가면역 기전의 일환으로 감소된 것이라 볼 수 있으며[19], 약물 및 균주투여로 다시 회복된 것으로 판단된다. 탐식작용을 하는 호중구는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에

서 약 4.3배 증가했다. 약하기는 하지만 균주 혼합투여그룹인 BM 그룹에서 낮아졌다($p < 0.5$) (Fig. 2C). 항체 생산을 담당하는 림프구는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 약 52.7% 수준으로 떨어졌다. BM 그룹에서는 CON 그룹 대비 56.3% ($p < 0.5$) 수준으로 약간 높아졌다(Fig. 2D). 조직 내에서 대식세포가 되어 면역에 관여하는 단핵구는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 감소했지만 BM 그룹에서는 CON 그룹만큼 회복되었다 (Fig. 2E). 헤파린, 히스타민을 포함하는 과립으로 주로 과민반

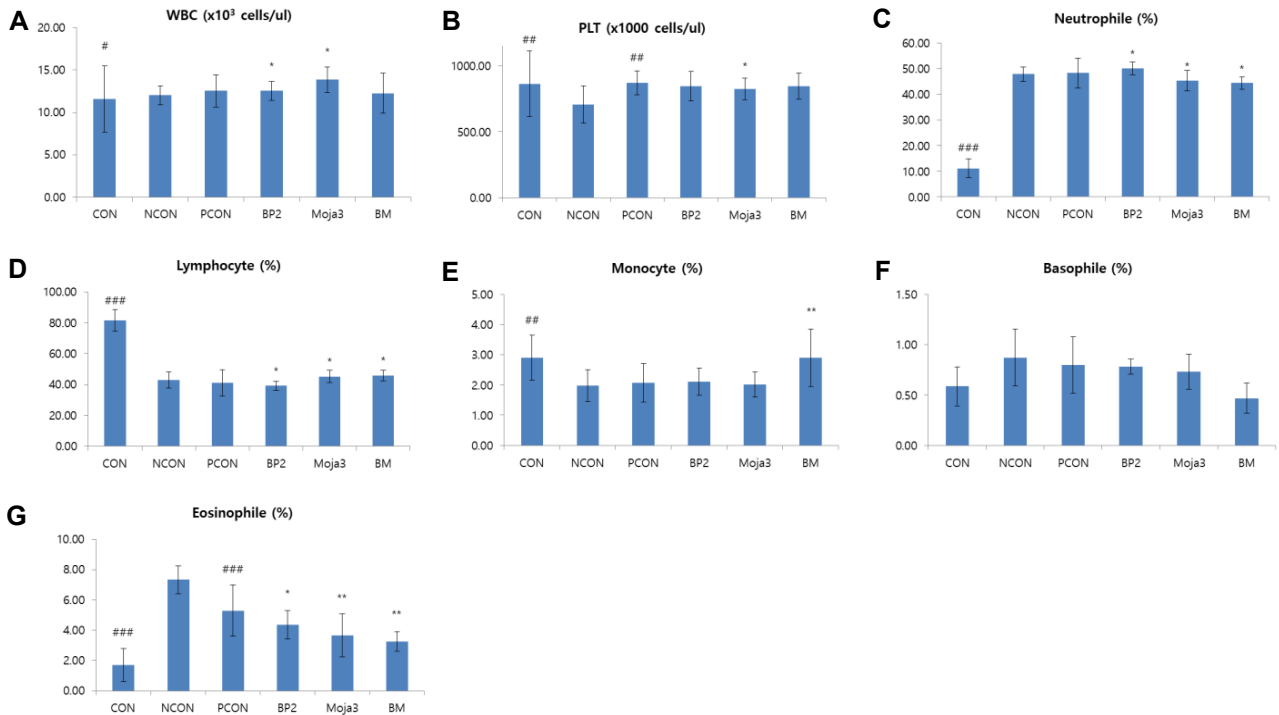


Fig. 2. Levels of (A) white blood cell, (B) Platelet, (C) neutrophil, (D) lymphocyte, (E) monocyte, (F) basophil, and (G) eosinophil after BP2 and Moja3 administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, BP2: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, Moja3: *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, BM: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) and *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means \pm SD. Significant difference from negative control value are indicated by # $p < 0.05$, ## $p < 0.05$ and ### $p < 0.005$. Significant difference from positive control value are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$.

응에 작용하는 것으로 알려져 있는 호염기구는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 약 47.5% 높아졌지만, BM 그룹에서는 CON 그룹보다 20.4%가 더 낮아졌다(Fig. 2F). 기생충, 알러지 등 과민증에서 증가하고 ACTH (부신피질자극호르몬) 등에 의해 소실되는 호산구는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 약 4.3배 증가하였으며, PCON 그룹에서는 NCON 그룹에 비해 약 27.8% 감소하였고, BM 그룹에서는 NCON 그룹에 비해 약 55.9% 감소하여 약물 투여군 보다 2배 이상 감소효과가 나타났다(Fig. 2G) [21]. 혈액 내 구성세포 중 백혈구 계열의 세포 변화를 관찰한 결과 전반적으로 Triton WR-1339 투여에 따른 고지혈증 유발 시 국소적인 염증반응이 활성화되어 나타나는 결과에 기인한 것으로 보여지며 군주 단독투여보다는 복합 투여시 이러한 증상이 회복되는 것으로 판단된다. 단위 혈액 당 적혈구(RBC) 수는 고지혈증 유발 및 군주 투여에 의해 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 헤모글로빈 농도(hemoglobin, HGB), 헤마토크릿(hematocrit, HCT), 평균 혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균 혈구 내 혈액색소(mean corpuscular hemoglobin), 평균 혈구내 헤모글로빈 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)는 적혈구의 기능적인 면을 평가하고 빈혈을 분류하는 중요한

적도가 되는데 본 연구에서는 이들 수치가 그룹간 큰 차이가 나지 않아서 rat에서 약물유도 고지혈증에 의한 적혈구에 기능적인 변화는 초래하지 않는 것으로 판단된다(Fig. 3B - Fig. 3F).

주요 대사 기능

간과 신장은 외부 물질의 섭취에 의해 일반적으로 가장 먼저 영향을 받는 장기이며 간의 해독 기능, 신장의 뇨배출 기능과 깊은 연관성을 가진다[4]. 따라서, 간기능의 지표로 알려진 AST, ALT 수치와 신장기능의 일반적인 지표로 잘 알려진 BUN, creatinine 수치를 혈액으로 확인하였다. Triton WR-1339 투여시 AST는 CON 그룹에 비해 1.68배 증가하였고, PCON 그룹은 NCON 그룹에 비해 약 20.3% 떨어졌다($p < 0.05$). 군주 투여 그룹은 PCON 그룹 보다는 약간 높은 수치이기는 하지만 NCON 그룹과 비교했을 때 7~15.5%로 유의적인 감소를 보였다(Fig. 4A). Triton WR-1339 투여시 ALT는 CON 그룹에 비해 1.86배 증가하였고, PCON 그룹은 NCON 그룹에 비해 약 24.8% 떨어졌다($p < 0.05$). 군주 투여 그룹은 NCON 그룹과 비교하여 볼 때 모두 감소하였고, 특히 BM 그룹(47.33 U/l)은 PCON 그룹(49.95 U/l)과 비슷한 수준으로 감소하였다

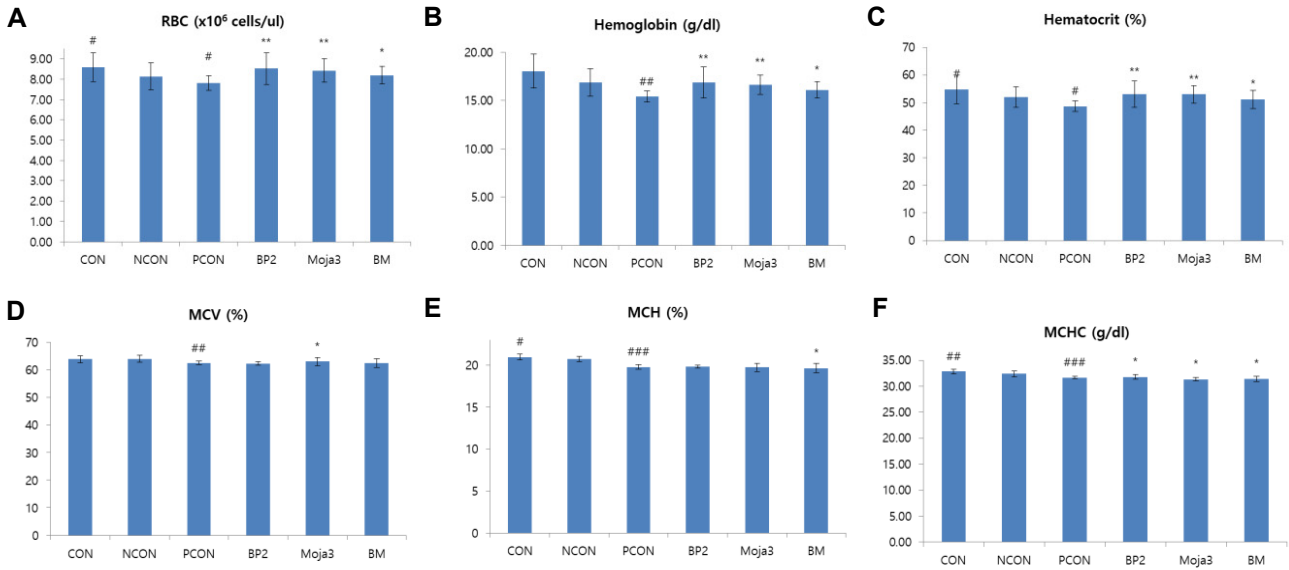


Fig. 3. Levels of (A) red blood cell, (B) hemoglobin, (C) hematocrit, (D) mean corpuscular volume, (E) mean corpuscular hemoglobin, and (F) mean corpuscular hemoglobin concentration after BP2 and Moja3 administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, BP2: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10⁵ CFU/kg/day) + Triton WR-1339, Moja3: *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10⁵ CFU/kg/day) + Triton WR-1339, BM: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10⁵ CFU/kg/day) and *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10⁵ CFU/kg/day) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means ± SD. Significant difference from negative control value are indicated by [#]p<0.05, ^{##}p<0.01 and ^{###}p<0.001. Significant difference from positive control value are indicated by ^{*}p<0.05 and ^{**}p<0.01.

(Fig. 4B). AST와 ALT는 간세포의 사멸 또는 손상 시 혈중으로 배출되므로 혈중농도 증가는 곧 간세포의 손상을 의미한다 [20]. BUN의 혈중 농도 변화를 측정하여 관련 기능을 확인 하였다. Triton WR-1339 투여에 따라 BUN의 수치가 약간 줄어들기는 하였으나 모든 그룹에서 정상범위 내에 있었다(Fig. 4C). Creatinine 또한 BUN과 비슷한 양상으로 나타났다(Fig. 4D). 따라서 신장기능 변화에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 결과에 따르면 군주의 복합투여가 간 기능개선에도 효능을 가질 것으로 사료된다.

혈액 내 지질 수준 변화

모든 개체는 시험 기간 동안 특별한 이상징후 없이 정상적으로 진행되었다. 2주간 군주 투여가 고지혈증을 유발한 설치류에서 혈중 지질대사에 어떠한 영향을 미치는지 측정하였다. 혈중 TG는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 약 1.6배 증가하였고, atorvastatin을 투여한 PCON 그룹에서는 NCON 그룹에 비해 31.5% 감소(p<0.005)했지만, 각각의 군주 투여군도 PCON 그룹과 비슷한 수준으로 감소하였다. BM 그룹(79 mg/dl)은 CON 그룹(82.80 mg/dl)보다 낮은 값으로 감소하였다. 중성지질이 현저히 줄어든 것은 혈중으로 방출하는 중성지질의 양이 줄어들었거나 체내에서 중성지질의 이용이 증가한 결과 나타날 가능성이 있어 이는 군주 투여가 체내 에너지-지질대사에 영향을 미치는 것으로 생각된다. TC는 Triton

WR-1339 처리시 CON 그룹에 비해 약 1.3배 증가하였고, NCON 그룹에 비해 군주 각각 또는 복합처리군 모두 약물처리군인 PCON 그룹과 비슷한 수준으로 감소하였다(Fig. 5B). HDL-콜레스테롤은 NCON 그룹이 CON 그룹에 비해 64.3% 감소하였고, PCON 그룹은 NCON 그룹에 비해 1.8배 증가하였다(p<0.05). 역시 군주 복합투여 그룹인 BM 그룹에서 PCON 그룹과 유의한 수준으로 증가하였다(p<0.05)(Fig. 5C). LDL 콜레스테롤 수치는 CON 그룹에 비해 NCON 그룹에서 약 2.6배 증가하였다. PCON 그룹의 LDL콜레스테롤 수치는 NCON 그룹에 비해 감소하지는 않았고(p<0.05), BP2 그룹에서 PCON에 비해 약간 감소하는 경향은 있었지만(p<0.005), 군주 투여 그룹에서 현저히 감소하지는 않았다(Fig. 5D). 따라서, 군주 투여에 따른 지질 수준의 감소는 중성지질의 감소폭이 상대적으로 크며, 총콜레스테롤의 감소는 크지 않았다. 특히, LDL-콜레스테롤 감소보다는 HDL-콜레스테롤 증가가 뚜렷했다. 기존 고지혈증 약물인 atorvastatin의 경우는 HMG-CoA reductase 활성 억제제를 통한 LDL 콜레스테롤 수준을 낮추어주는 메커니즘으로 작용하는데 반해 [15] 본 연구에서는 혈중 LDL 콜레스테롤 수준의 감소보다는 혈중 HDL 콜레스테롤 증가를 통해 지질의 체외 배출과 말초조직에서의 지질 이용률 증가에 의해 중성지질이 감소했을 가능성을 고려할 수 있다 [16]. 따라서, HMG-COA reductase에 대한 작용 메커니즘도 관찰해 볼 필요가 있다고 생각되어 본 연구팀의 기존 연구에 의해 밝혀진

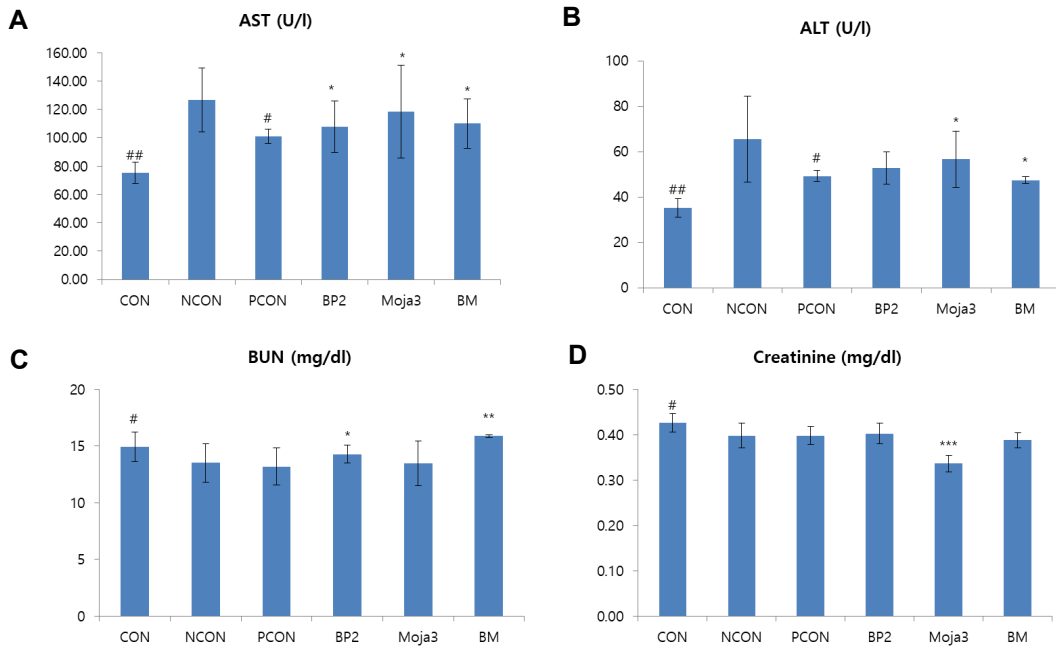


Fig. 4. Levels of (A) AST, (B) ALT, (C) BUN, and (D) Creatinine after BP2 and Moja3 administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, BP2: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, Moja3: : *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, BM: : *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) and *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means \pm SD. Significant difference from negative control value are indicated by # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$. Significant difference from positive control value are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

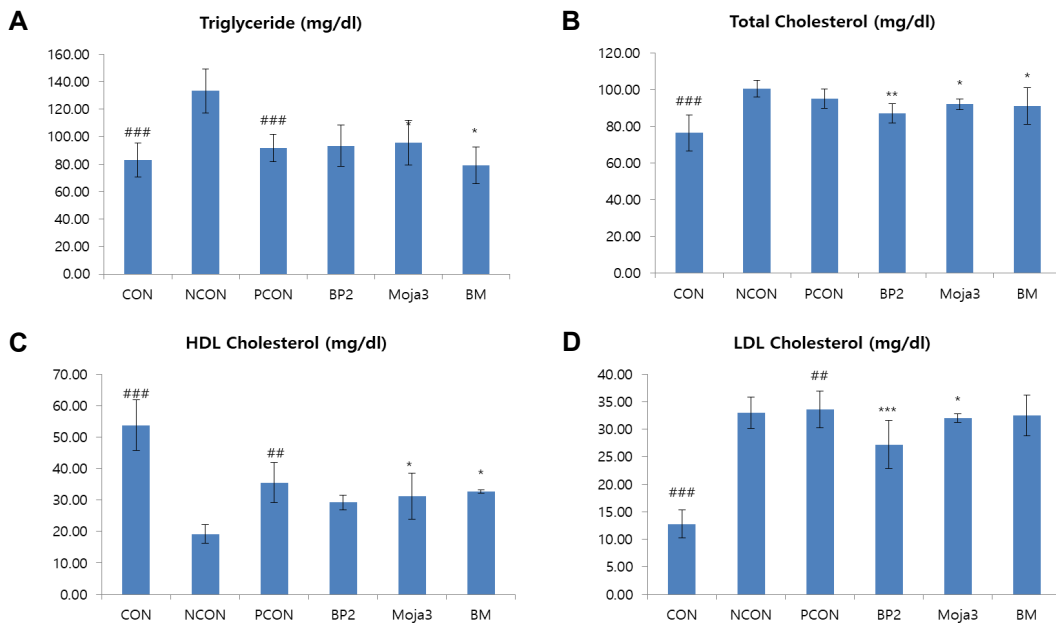


Fig. 5. Levels of (A) triglyceride, (B) total cholesterol, (C) HDL-cholesterol, and (D) LDL cholesterol after BP2 and Moja3 administration for 2 weeks in Triton WR-1339 induced hyperlipidemia. CON: Saline, NCON: Saline + Triton WR-1339, PCON: Atorvastatin (1 mg/kg/day) + Triton WR-1339, BP2: *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, Moja3: : *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339, BM: : *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (1×10^5 CFU/kg/day) and *Bacillus mojavensis* KJS-3 (1×10^5 CFU/kg/day) + Triton WR-1339. All the values were expressed as means \pm SD. Significant difference from negative control value are indicated by # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$. Significant difference from positive control value are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

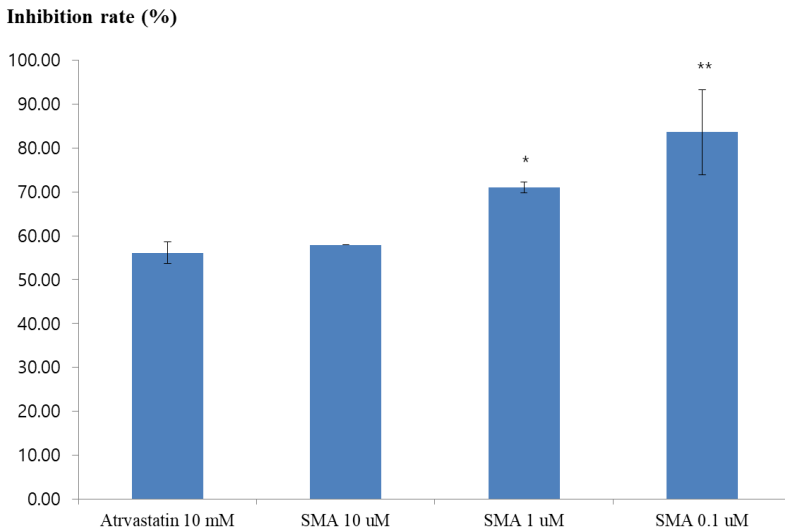


Fig. 6. HMG-CoA reductase inhibition rate (%) of 7-O-succinyl macrolactin A produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. All the values were expressed as means \pm SD. Significant difference from atorvastatin are indicated by * p <0.5 and ** p <0.05.

물질이자 본 연구에 사용된 BP2 균주가 생산하는 대표적인 항균물질인 SMA의 HMG-CoA reductase 활성 저해율을 관찰해 보았다.

BP2 유래 SMA에 의한 HMG-CoA reductase 저해활성

콜레스테롤은 70% 이상이 체내에서 합성되는데, 혈장 콜레스테롤을 감소시키기 위해서는 콜레스테롤 합성을 저해하는 것이 가장 효과적인 방법이다[6]. HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 과정의 속도조절효소[5]로 이 효소의 활성이 저해되면 세포 내 콜레스테롤 농도가 감소하고 결국 혈중 콜레스테롤 농도는 낮아지게 된다[23]. 이전 연구에서 참당귀 추출물과 BP2 혼합 투여에 의해 고지혈증 억제 효과를 연구한 결과 참당귀 추출물 20 mg/ml에서 HMG-CoA reductase를 약 50% 저해하여 고지혈증 치료제 후보로서의 가능성을 제시한 바 있다[12]. 본 연구에서는 두 균주 중 BP2가 생산하는 SMA가 HMG-CoA reductase 저해활성이 있는지를 탐색하였다. 그 결과, atorvastatin 10 mM 농도에서 HMG-CoA reductase 저해활성이 약 56.14%였고(Fig. 6), 이는 Virginia [22] 등의 연구와 비슷한 효과로 보인다. SMA의 경우 10 μ M에서 57.9%, 1 μ M에서 71.05%, 0.1 μ M에서 83.6%를 저해하였고, atorvastatin에 비하면 약 1,000배 낮은 농도에서 비슷한 효능을 나타내었다(Fig. 6). 하지만 저농도임에도 불구하고 농도가 낮아질수록 HMG-CoA reductase 저해율이 높은 결과를 보인 것은 SMA가 약간의 세포독성을 가지고 있음을 유추해볼 수 있다. 이는 과거 본 연구팀의 암세포 신생혈관 억제능에 대해 SMA를 적용시킨 연구 결과와도 비슷한 경향으로 나타났다. 또한 Kim 등[11]에 따르면, 반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant enterococci, VRE)에 대해서는 SMA의 minimal inhibitory concentration (MIC)가 1~2 ug/ml에서, 메티실린 내성 황색 포도상 구균(methicillin-resistant *Staphylococ-*

cus aureus, MRSA)에 대한 SMA의 MIC는 0.25 ug/ml 이하인 저농도에서 나타났다. BP2 섭취 이후 장내에서 생산되는 SMA의 역할에 대해 추후 연구가 필요하나, SMA의 세포독성보다는 강력한 항균, 항염 등의 효과로 인체에 긍정적인 것으로 판단된다. 또한, 저농도에서 HMG-CoA reductase 활성 억제 효과로 인해서 고지혈증을 효율적으로 제어할 수 있을 것이라 판단된다. 따라서, BP2와 Moja3 두 균주의 복합투여는 식이행태에 영향을 미치지 않으면서 체중증가율을 감소시키고 Triton WR-1339에 의한 고지혈증 유발 시 혈액 내 세포 구성성분 중 염증과 관련된 변화를 회복시켰으며, 간기능 및 신장기능에는 큰 영향을 주지 않았다. 특히 지질대사에 있어서는 중성지방 감소효과가 뛰어났으며 LDL 콜레스테롤의 변화보다는 HDL 콜레스테롤 증가에 도움을 주는 것으로 나타났다. HMG-CoA reductase 활성은 대표적으로 BP2 균주가 생산하는 SMA를 중심으로 관찰해 본 결과 atorvastatin에 비해 현저히 낮은 농도에서 저해율이 매우 뛰어남을 알 수 있었다. 따라서, 고지혈증 예방 및 치료에 도움이 되는 기능성식품으로 개발할 수 있는 가능성이 있을 것이라 사료되며 본 연구를 기반으로 향후 관련 효과에 대한 의약품 개발도 기대할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 농림기술기획평가원의 고부가가치 식품개발사업(과제번호 317067-3, 2017. 11. 1. ~ 2020. 10. 31.) 연구비 지원으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Akrami, R., Gharaei, A., Mansour, M. R. and Galeshi, A. 2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hemato-biochemical parameters of beluga (*Huso huso Linnaeus, 1754*) juvenile. *Fish Shellfish Immunol.* **45**, 828-834.
- Cho, M. S. 2010. Production optimization of spore and macrolatin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. Master. dissertation, Inje university, Kimhae, Korea.
- Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M. and Kang, J. S. 2011. Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for industrial applications. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 289-298.
- El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I. and El-Naga, N. I. 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 57-63.
- Endo, A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* **33**, 1569-1582.
- Grundy, S. M. 1998. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation* **97**, 1436-1439.
- Huang, X., Wu, X., Yan, S. and Lan, T. 2018. Lipid-lowering effect of propolis in mice with triton-WR1339-induced hyperlipidemia and its mechanism for regulating lipid metabolism. *Nan. Fang. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* **38**, 1020-1024.
- Jun, K. D., Kim, H. J., Lee, K. H., Paik, H. D. and Kang, J. S. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a probiotic. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 359-366.
- Kawamoto, S., Kawamura, T., Miyazaki, Y. and Hosoya, T. 2007. Effects of atorvastatin on hyperlipidemia in kidney disease patients. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* **49**, 41-48.
- Kim, D. H., Kang, K. R., Kim, H. W., Yoon, S. Y., Kim, C. G., Yamaguchi, T., Kyung, S. J. and Kang, J. S. 2010. Structure determination of macrolactin compounds with antibacterial activities isolated from *Bacillus polyfermenticus* KJS2. *J. Life Sci.* **20**, 1792-1800.
- Kim, D. H., Kim, H. K., Kim, K. M., Kim, C. K., Jeong, M. H., Ko, C. Y., Moon, K. H. and Kang, J. S. 2011. Antibacterial activities of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 147-152.
- Kim, K. M., Kim, B. S. and Kang, J. S. 2018. The preventive effect of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 and *Angelica gigas* Nakai extract on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia. *J. Life Sci.* **28**, 726-732.
- Kim, K. M., Kim, D. H., Park, Y. S. and Kang, J. S. 2009. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 as a Probiotic. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1013-1018.
- Kwon, R. H. and Ha, B. J. 2014. Protection of *Saururus Chinensis* extract against liver oxidative stress in rats of Triton WR-1339-induced hyperlipidemia. *Toxicol. Res.* **30**, 291-296.
- Lennernäs, H. 2003. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 1141-1160.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. and Dumon, H. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **92**, 272-283.
- Park, Y. H., Lee, J. S. and Lee, Y. J. 1993. Distribution of serum lipid by age and the relation of serum lipid to degree of obesity and blood pressure in Korean adults. *Kor. J. Lipidology* **3**, 165-180.
- Pearlman, B. L. 2002. The new cholesterol guidelines. Applying them in clinical practice. *Postgrad. Med.* **112**, 13-48.
- Sonmez, O. and Sonmez, M. 2017. Role of platelets in immune system and inflammation. *Proto. Biomed. J.* **2**, 311-314.
- Takahashi, A., Sekiya, C., Yazaki, Y., Ono, M., Sato, H., Hasebe, C., Ishikawa, Y., Okuno, K., Yamada, M. and Namiki, M. 1986. Hepatic GOT and GPT activities in patients with various liver diseases-especially alcoholic liver disease. *Hokkaido Igaku Zasshi* **61**, 431-436.
- Vetsika, E. K., Koukos, A. and Kotsakis, A. 2019. Myeloid-Derived suppressor cells: major figures that shape the immunosuppressive and angiogenic network in cancer. *Cells* **8**, 1647.
- Virginia, A., Rachmawati, H., Riani, C. and Retnoningrum, D. S. 2016. Study of HMG-CoA reductase inhibition activity of the hydrolyzed product of snakehead fish (*Channa striata*) skin collagen with 50 kDa collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *Sci. Pharm.* **84**, 81-88.
- Wierzbicki, A. S. 2003. New lipid-lowering agents. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **8**, 365-376.
- Zarzecki, M. S., Araujo, S. M., Bortolotto, V. C., Paula, M. T., Jesse, C. R. and Prigol, M. 2014. Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol. Rep.* **12**, 200-208.

초록 : Triton WR-1339로 유도된 고지혈증에 대한 *Bacillus polyfermenticus* KJS-2와 *Bacillus mojavensis* KJS-3의 예방효과

이진영¹ · 이승재¹ · 김형희² · 강재선^{1*}

(¹경성대학교 약학과, ²부산대학교 의과대학 의생명연구원)

이 연구의 목적은 *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (BP2)와 *Bacillus mojavensis* KJS-3 (Moja3) 및 이들 균주 복합물의 투여가 혈청 지질 수준을 조절할 수 있는지에 대한 가능성을 밝히기 위한 것이다. 고지질혈증 유발 설치류를 대상으로 균주를 2주 동안 경구 투여한 후 혈액 내 세포수준의 변화, 대사기능 평가, 혈중 지질 수준의 변화를 관찰하였다. 백혈구내 주요세포변화를 측정된 결과 균주 투여에 따른 혈중 백혈구(WBC) 수준에는 크게 영향을 미치지 않았다. 단위 혈액 내 혈소판(PLT) 수치는 Triton WR-1339처리시 18.4% 감소하였고 약물투여그룹 및 균주 투여그룹에서 다시 정상 그룹 수준으로 회복되었다($p < 0.05$). Triton WR-1339로 유도된 고지혈증에 의해 적혈구의 기능적인 변화는 초래하지 않았다. 혈중 AST, ALT, BUN, Creatinine 수치는 혼합 균주투여 그룹에서 모두 회복하여 간기능, 신장기능에 영향을 미치지 않았다. 혈중 지질수준 변화는 미생물 균주 투여그룹에서 트리글리세라이드(TG)와 총콜레스테롤(TC) 혈청 수치가 감소했고, 혈청 HDL 콜레스테롤 수치는 증가했다. BP2가 생산하는 SMA의 HMG-CoA reductase 저해율은 atorvastatin에 비해 1,000배 낮은 농도에서 비슷한 활성을 보였다. 또한, 고지혈증 유발 설치류에 미생물 균주의 복합투여는 식이에 영향을 미치지 않으면서 체중증가율은 감소시켰다. 따라서 BP2와 Moja3 균주 복합투여시 혈청 지질 수치를 조절함으로써 혈액 순환을 개선시킬 수 있을 것이다.