

Bacillus polyfermenticus SCD의 병원성 세균에 대한 항균성과 동물 및 임상에 미치는 영향

강재선 · 전경동 · 김원석 · 조우성 · 권주열* · 문경호*[#]

(주)바이넥스 중앙연구소, *경성대학교 약학대학

(Received December 10, 2003; Revised February 18, 2004)

Antibacterial Activities of *B. polyfermenticus* SCD Against Pathogenic Bacteria and Effects on Animals and Humans

Jae Seon Kang, Kyoung Dong Jun, Won Suk Kim, Woo Sung Jo, Ju Yeol Kwon* and Kyung Ho Moon*[#]

R&D center of Binex Co., Ltd.

*College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract — *Bacillus polyfermenticus* SCD which is commonly called as Bisroot[®] has been appropriately used for the treatment of long-term intestinal disorders. This strain strongly inhibited against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) and various pathogenic microorganisms. Effects of *B. polyfermenticus* SCD administration on death rates and egg-laying rates in two groups of hens were investigated. This strain decreased the death rates of two groups by 16.26% and 11.72%, respectively. Also this strain increased the egg-laying rates of those 2.74% and 2.66%, respectively. Clinical tests of *B. polyfermenticus* SCD administration to healthy adults showed not adverse effects but decreased glyceride concentration from 154.52 mg/dl to 135.41 mg/dl after two week administrations.

Keywords □ *B. polyfermenticus* SCD, pathogenic bacteria, animal test, clinical test

새로운 항생제가 개발됨에도 불구하고 내성균은 꾸준히 증가하고 있으며 특히 *Staphylococcus aureus*는 methicillin에 대한 내성균주(MRSA)가 큰 문제로 대두되고 있다. 더욱이 MRSA는 methicillin에만 내성을 보이는 것이 아니고 대부분의 항생제에 강한 내성을 보이는 다제내성을 가지고 있다.¹⁾

또한 양계업이 대규모로 산업화되면서 설사와 질병으로 인한 경제적 손실이 늘어나게 되었으며 이를 해결하기 위하여 항생제의 개발과 화학치료제의 사용으로 생산성이 향상되는 성과를 이루었다.^{2,3)} 그러나 항생제의 잔류로 인한 잠재적 위해성이 제기되면서 1986년 스웨덴에서 처음으로 사료첨가제로의 사용이 금지되었으나 국내에서는 여전히 사료에 사용되고 있어 항생제 내성세균들의 출현이 계속되고 있다.

이러한 관점에서 probiotics와 prebiotics에 의한 가축의 질병 예방과 육질개선을 위해 다양한 노력들이 시도되고 있다.²⁾ 이러한 생균제로서의 요건으로 제조 보관이 용이하고 위액과 담즙산

에 대한 내성이 있어야 하고 장내점착력이 있어야 하며 빠른 활성도와 유용균의 증식을 촉진해야 한다. 가축의 경우 증체율의 개선, 사료 효율의 증가, 가축의 변비, 설사의 예방 및 치료 등 가축의 건강 개선을 유도 할 수 있어야 한다. 그리고 투여 방법의 용이성과 함께 가격이 저렴해야 한다.⁴⁻⁸⁾

Bacillus polyfermenticus SCD균은 일본약국방외의약품성분규격에 당화균(amyolytic *Bacillus*)이라 하여 *B. subtilis* 및 *B. mesentericus*와 함께 기재되어 있으며, 형태 및 생화학적인 성상을 비교해 볼 때, *B. subtilis*와 상당히 유사한 균으로 인정되고 있으나, *B. subtilis*와 다른 점은 유당을 분해하는 능력이 있고 포도당과 유당에서 초산과 젖산을 더욱 많이 생산하는 것 등이다.^{9,10)}

Bacillus polyfermenticus SCD균의 생균제로의 특성으로 인공 위액 및 인공담즙산에 대한 높은 내성을 보이고 비타민을 생성하며 장내 미생물의 분포 변화를 관찰함으로써 장내에서의 빠른 활성도와 *Lactobacillus*, Lactic acid bacteria, *Bifidobacterium* 등과 같은 유익균의 증식을 촉진하며, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* 등과 같은 유해균의 증식을 억제하며, ammonia, indole, skatole, p-cresol과 같은 발암성 물질의 생성을 억제한다는 사실이 보고되었다.^{11,12)}

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-628-6540
(E-mail) khmun@star.ks.ac.kr

본 연구에서는 여러 가지 병원성 균에 대해 항균작용을 가지는 *Bacillus polyfermenticus* SCD균이 생산하는 천연의 무독성 항균물질인 박테리오파지와 유기산 등에 의한 MRSA균을 포함한 병원성 세균에 대한 항균작용을 확인하였다. 또한 임상적 적용에 따른 효능을 증명하기 위하여 가축에 대한 폐사율 감소 및 산란율 증가를 알아보았으며 건강한 성인에 대한 투여 후 혈액학적 검사, 소변 검사 및 생화학적 검사를 수행하였다.

실험방법

균주

B. polyfermenticus SCD는 (주)바이넥스 연구소에서 개발하여 종균협회에 등록하고 보관중인 종균을 사용하였다. MRSA균으로는 항생제 다제내성균인 *Staphylococcus aureus* SA2¹¹를 사용하였으며 그 밖에 병원성 세균들은 종균협회에서 분양된 표준균주를 사용하였다.

배지 및 시약 기구

Tryptic Soy Broth는 Difco(USA)에서 구입하였으며, agar는 Junsei chemical Co., Ltd.(Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 혐기성 배양은 Anaerocult[®] A gas pack(Merck Co., Ltd. USA)을 사용하였다. 판크레아틴은 (주)바이넥스에서 생산하는 제품을 사용하였다.

항균 실험

병원성 세균에 대한 항균성 실험은 Flip plate method에 의하여 수행하였다.⁹⁾ *B. polyfermenticus* SCD를 TSA에서 24시간 배양한 다음 백금으로 취하여 TSA 배지에 백금으로 1회 도말하고 24시간 배양하고 그 위에 병원성 세균이 들어 있는 50°C의 TSA(0.75% Agar) 10 ml를 증충하여 균한 후 37°C에서 배양하여 세균의 성장 억제를 확인하였다. 세균의 성장이 억제된 경우에는 *B. polyfermenticus* SCD의 성장에 따른 박테리오파지와 유산 및 초산의 생성으로 주위에 투명지역이 형성되었다.

동물실험

B. polyfermenticus SCD를 함유하는 시료를 시중에서 판매하는 사료에 일정량 첨가하여 닭에 복용시켰다. *B. polyfermenticus* SCD를 함유하는 시료 1 kg을 다음과 같이 만들었다. 아포균으로서 *B. polyfermenticus* SCD 2×10^{10} CFU를 주성분으로 하여 제조하였고 판크레아틴 0.1 배산과 부형제를 사용하여 총 1 kg을 만들었다. 이 생균 제제를 시중에서 판매되는 사료 1톤 당 1 kg을 첨가하여 산란계에 복용시켰다. 사료의 복용은 통상적인 방법으로 가축에 제공하였고 복용 전후의 폐사율과 산란율을 비교하였다. 경남에 위치한 A 농장에서 22만 4천 마리를 18주령에서

80주령까지, B 농장에서 20만 4천 마리를 19주령에서 71주령까지 투여한 후 관찰하였다.

임상실험

B. polyfermenticus SCD와 식이섭유를 장기복용한 경험이 없으며 항생제 등 약물을 남용하지 않은 20세 이상의 건강한 성인 남녀 27 인을 대상으로 실시하였다. 실험대상자들은 주기적인 교육을 통하여 유사 유산균과 항생제 복용을 피하게 하였으며 이상 발생시에 복용을 중지할 것, 장내 소화계에 직접적 영향을 미치는 것을 피할 것을 주지시키고 규칙적인 생활을 하도록 하였다. *B. polyfermenticus* SCD 복용은 3.3×10^7 CFU를 하루 세 번씩 복용시켰다. 복용 전에 혈액학적 검사, 생화학적 검사, 소변 검사를 실시하였으며 2 주간 복용 후 동일한 실험 항목을 재검사하였다. 검사는 부산 백병원의 건강검진센터에서 실시하였다.

실험결과

항균효과

B. polyfermenticus SCD균은 MRSA균에 대해 뚜렷한 항균작용을 나타내었으며(Fig. 1), 그 외 다른 병원성세균인 *E. coli* O157, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae* O139 등의 다양한 병원성 균에 대해 폭 넓은 항균효과를 나타내었다(Table I).

동물시험의 결과

A군 22만 4천 마리의 산란계에 대한 복용 결과로 복용전의 폐사율이 19.5%인데 비하여 복용 후 3.24%를 보여 16.26%의 폐사를 줄였고, 평균 산란율이 69.0%에서 71.74%로 개선되어

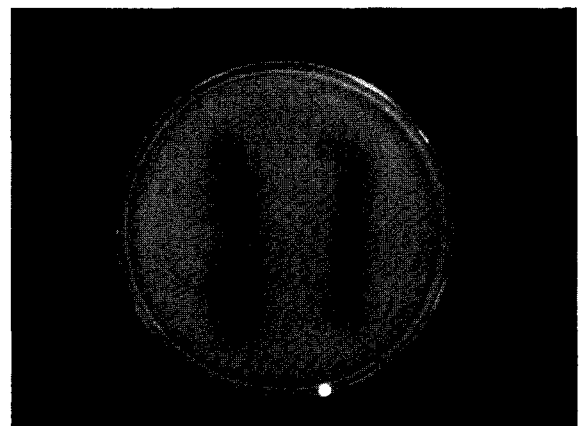


Fig. 1 – Antibacterial activities of *B. polyfermenticus* SCD against MRSA, *Staphylococcus aureus* SA2. *B. polyfermenticus* SCD was streaked twice separately in one plate.

Table I – Antibacterial activities of *B. polyfermenticus* SCD against various harmful intestinal bacteria

Pathogenic microorganisms	Inhibition size
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3264 ³⁾	+++
<i>Escherichia coli</i> O157	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	++
<i>Salmonella typhi</i>	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	++
<i>Salmonella enteritidis</i>	++
<i>Salmonella paratyphi A</i>	++
<i>Shigella flexneri</i>	++
<i>Shigella boydii</i>	++
<i>Shigella sonnei</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 28923	++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	+
<i>Vibrio cholerae</i> O139	++
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+++
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 6902	++

- 1) Culture medium : TSA (Trypticase soy agar)/Incubation temp. : 37°C/Culture time : 12 hr.
- 2) +++ : Inhibited strongly, ++ : Inhibited clearly, + : Inhibited weakly.
- 3) Incubated at anaerobic jar equipment.

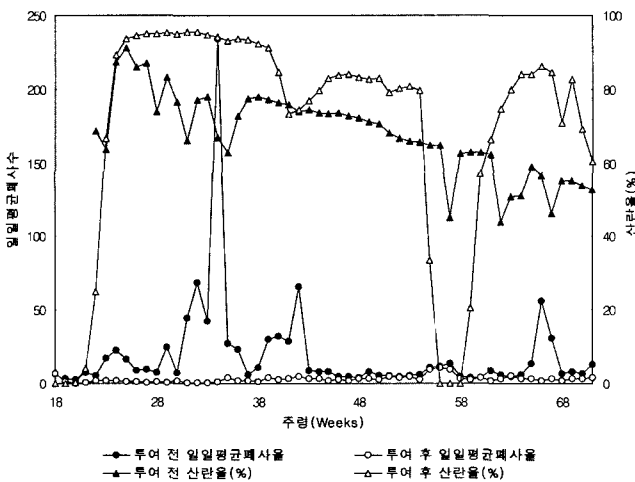


Fig. 2 – Effects of *B. polyfermenticus* SCD administration on death and egg-laying rates in A group.

2.74% 증가된 산란율을 보여 주었다. 이는 뉴케슬병으로 인한 강제환우 기간에 의한 산란율 감소를 반영한 수치이다. 또한 산란율 90% 이상을 유지한 일수도 연속적으로 15주를 보이는 효과를 나타내었다(Fig. 2). 투여 전 실험 34주 째에 농장 지역에 티프스병이 발생하여 폐사수가 급격히 증가하였으며, 투여 후 41주 째에 뉴케슬병으로 인하여 강제환우를 실시하였다. B군 20만 4천 마리의 산란계에 대한 복용 결과로 복용전의 폐사율이 14.5% 인데 비하여 복용 후 2.78%를 보여 11.72%의 폐사를 줄였고, 평균 산란율이 73.96%에서 76.62%로 개선되어 2.66% 증가된 산

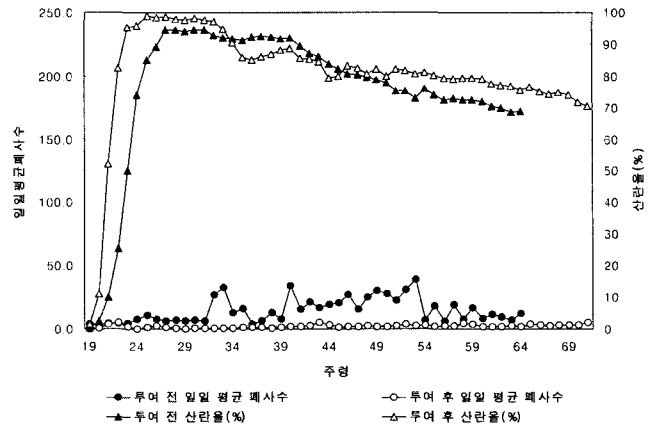


Fig. 3 – Effects of *B. polyfermenticus* SCD administration on death and egg-laying rates in B group.

란율을 보여 주었다. 또한 산란율 90% 이상을 유지한 일수도 연속적으로 12주를 보이는 효과를 나타내었다(Fig. 3).

건강한 성인에 투여한 후 임상적 분석 시험

건강한 성인을 대상으로 투여한 결과를 분석하였다(Table II). 중성지방의 경우에는 154.52 mg/dl서 135.41 mg/dl를 보여 복용 후 뚜렷한 감소 경향을 나타내었으며 복용 전 200 mg/dl 이상을 나타낸 9명 모두에게서 2주 복용 후에 평균치가 284.11 mg/dl서 168.88 mg/dl의 수치를 나타내어 감소 폭이 뚜렷하였다.

고 찰

B. polyfermenticus SCD는 MRSA 및 *E. coli* O157, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae* O139 등의 다양한 병원성균에 대해 폭 넓은 항균작용을 나타내었는데 이는 *B. polyfermenticus* SCD가 성장하면서 생성하는 박테리옌 및 유기산 등에 의한 생육억제 작용에 의한 것으로 사료된다. 동물실험에서 A군 22만 4천 마리, B군 20만 4천 마리의 산란계에 대해 투여한 결과 폐사율은 각각 16.26%, 11.72% 감소시켰으며, 산란율은 2.74%, 2.66%가 증가된 산란율을 나타내었다. 또한 산란율 90% 이상을 유지한 일수도 연속적으로 15주, 12주를 나타내었다. 또한 70주 이상 계속하여 산란하는 우수한 결과를 보여주었으며, 그 후 90주까지도 산란하였다(자료 생략). 또한 위 2개의 농장에서 티프스와 뉴케슬병으로 일정기간 폐사와 등외란이 발생하였음에도 불구하고 평균 산란율 증가와 빠른 회복력으로 폐사율과 등외란이 급격히 감소하였으며, 강제환우 이후에도 급격한 회복력과 계군의 안정화를 유지하였다. 그리고 사료효율 증가(약 10%)와 기형란을 감소시키고 난각질과 난황색도 및 신선도를 향상시키는 결과를 얻었다(자료 생략). 건강한 성인에 대한 임상실험에서 중

Table II - Clinical effects of *B. polyfermenticus* SCD administration in healthy adults

검사항목		투여 전	투여 후	검사항목		투여 전	투여 후
소변 검사	요당	-	-	전해질 검사	칼슘 (mg/dl)	9.766	9.738
	노빌리루빈	-	-		인 (mg/dl)	3.566	3.759
	케톤체	-	-		나트륨 (mEq/l)	143.552	142.517
	비중	1.028	1.022		칼륨 (mEq/l)	4.4893	4.3380
	pH	6.776	6.672	염소 (mEq/l)	106.552	105.552	
	노잠혈	정상	정상	체장기능 검사	아밀라제 (Unit)	74.897	71.379
	노백혈구	정상	정상		철결합능력 (µg/dl)	349.828	363.862
	아질산염	-	-		Ferritin(ng/ml)	59.514	63.034
유로빌리루빈	trace	trace					
동맥경화 검사	CPK(U/l)	119.276	114.690	류마티스 검사	RA factor(IU/ml)	9.169	9.107
	HDL cholesterol(mg/dl)	57.034	56.931		CRP(mg/dl)	0.121	0.118
	총콜레스테롤 (mg/dl)	181.552	176.966		혈당 (mg/dl)	93.069	93.552
	LDL(mg/dl)	108.414	105.828		요산 (mg/dl)	5.376	5.159
	중성지방 (mg/dl)	154.517	135.414		요소질소 (BUN)(mg/dl)	13.138	11.862
간기능 검사	총단백 (g/dl)	7.6936	7.6760	혈액학적 검사	크레아틴 (mg/dl)	0.907	0.921
	알부민 (g/dl)	4.845	4.807		백혈 (10 ⁹ /l)	6.920	6.705
	총빌리루빈 (mg/dl)	0.707	0.741		적혈구 (10 ¹² /l)	4.573	4.581
	직접빌리루빈 (mg/dl)	0.159	0.217		혈색소 (g/dl)	14.164	14.131
	간접빌리루빈 (mg/dl)	0.548	0.524		적혈구용적 (Ratio)	41.703	42.383
	GOP(U/l)	24.586	23.069		평균혈구용적 (fl)	91.300	92.583
	GPT(U/l)	28.655	26.724		임파구 (%)	38.221	38.686
	r-GPT(U/l)	25.759	27.034		단핵구 (%)	8.762	8.783
	Alkaline phosphatase(U/l)	168.759	152.138		호염구 (%)	0.434	0.410
	LDH(U/l)	310.793	308.586				

성지방의 복용 전후 결과가 154.52 mg/dl에서 135.41 mg/dl를 보여 복용 후 뚜렷한 감소 경향을 나타내었으며 복용 전 200 mg/dl 이상을 나타낸 9명 모두에게서 2주 복용 후에 평균치가 284.11 mg/dl에서 168.88 mg/dl의 수치를 나타내어 감소 폭이 뚜렷하였다. 그 외의 임상수치에는 큰 변화가 없어 안전한 생균제로 평가될 수 있었다. 이상의 결과로서 *B. polyfermenticus* SCD는 MRSA 및 병원성 균들에 대해 폭 넓은 길항작용을 나타내므로 장관 관련 감염성 질환에 사용 할 수 있으며 화학적 치료법의 단점을 보완할 수 있다고 사료되며 산란계 투여를 통한 동물실험에서도 폐사율은 감소시키고 산란율을 증가시키므로서 사료 첨가제로서의 가치도 우수하다고 할 수 있겠다. 또한 건강한 성인에 대한 임상실험에서도 지방간을 초래하는 중성지방의 뚜렷한 감소 경향을 나타내었으므로 생균제로서의 유효성이 매우 높은 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2003학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1) Kang, J. S. and Moon, K. H. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Pusan. *Yakhak Hoeji* 34(2),

122 (1990).
 2) Chang, Y. H., Kim, J. K., Kim, H. J., Kim, W. Y., Kim, Y. B. and Park, Y. H.: Probiotic effects of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 on Piglets. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28(1), 8 (2000).
 3) Visek, W. J. : The mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.* 46, 1447 (1978).
 4) Cho, M. K., Kim, K., Kim, C. H., Lee, T. K. and Kim, K. Y. : Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28(5), 279 (2000).
 5) Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P. and Piaia, M. : Bifidobacterium from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74, 409 (1991).
 6) Conway, P., Gorbach, L. and Goldin, B. R. : Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70(1), 1 (1987).
 7) Mcdonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. : Acid tolerance of *Leuconostoc mensenterides* and *Lactobacillus Plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7), 2120 (1990).
 8) Park, C. J., Pyeon, J. S., Cho, Y. K., Hong, S. S. and Lee, H. S. : Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from animal intestine and powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(4), 393 (1996).
 9) Jun, K. D., Lee, K. H., Kim, W. S. and Paik, H. D. : Microbiological identification of medical probiotic Bispan strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28(2), 124 (2000).
 10) Lee, K. H., Jun, K. D., Kim, W. S. and Paik, H. D. : Partial

- characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 146 (2001).
- 11) Jun, K. D., Kim, H. J., Lee, K. H., Paik, H. D. and Kang, J. S. : Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a probiotic. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**(4), 359 (2002).
- 12) Park, K. Y., Jung, H. Y., Woo, K. L., Jun, K. D., Kang, J. S. and Paik, H. D. : Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD administration on fecal microflora and putrefactive metabolites in healthy adults. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**(4), 657 (2002).