

## 腸內細菌 *Bifidobacterium longum*에 의한 병원성 *Escherichia coli* A<sub>2</sub>의 生育沮害

成文喜 · 申鉉靖 · 姜國熙

성균관대학교 농과대학 낙농학과  
(1985년 6월 25일 수리)

## Effect of *Bifidobacterium longum* on Growth Inhibition of Enterotoxigenic *Escherichia coli* A<sub>2</sub>

Moon Hee Sung, Hyun Jung Shin and Kook Hee Kang

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Sung Kyun Kwan University

(Received June 25, 1985)

---

*Bifidobacteria* are normal inhabitants of the intestinal tract of humans. Using *Bif. longum* isolated from feces of Korean adult and Bifidus preparation, we observed the growth inhibitory actions of these organisms toward *E. coli* A<sub>2</sub> causing bacterial diarrhea. *Bif. longum* SKD-2001 SKD-2004 inhibited the growth of *E. coli* A<sub>2</sub> drastically. It is supposed that the mechanism of the growth inhibitory actions is due to acid conditions created by *Bif. longum*.

---

1899년 프랑스의 Tissier<sup>1)</sup>가 건강한 모유 영양아에서 분리한 Bifidus 菌은 Finegold et al.<sup>2)</sup>에 의해 건강한 사람의 장내에 존재하는 優勢菌이라 보고하였으며, 光岡<sup>3)</sup>은 인공 영양아보다 모유 영양아의 장관에 특이적으로 우세하게 존재하며,<sup>4)</sup> 또한 성인, 노인에게도 우세적으로 존재한다고 보고하였다.

이러한 Bifidus 菌은 사람의 장내에서 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>를 생산하며, 모유중의  $\alpha$ -casein을 특이적으로 분해하는 phosphoprotein phosphatase를 가지고 있어 단백질의 소화를 도와 숙주의 영양에 적극적으로 기여하며, 유산 및 초산을 생성하므로써 장내의 pH를 저하시켜 외부에서 침입한 外來菌의 증식을 방지하며, 독성물질인 Amine을 분해하며 무독화시키며, 장내부패등을 방지하는 작용을 가지고 있어,<sup>5-8)</sup> 보건학적인 견지에서 많은 연구가 이루어져 왔다<sup>9-14)</sup>. 항생물질의 투여, 정신적 스트레스, 외과적 수술에 의해 腸內菌叢의 균형이 파괴되면, Bifidus 菌의 감소나 消失이 일어나며, 여러가지 질병

의 감염이나 위장염의 원인이 되고 있다<sup>15-18)</sup>.

이것을 예방하거나, 치료하기 위해서는 유산균 및 Bifidus 菌을 경구투여하여 腸內菌叢의 균형을 정상화시켜야 한다<sup>19)</sup>. 최근에는 혐기배양기술의 발달<sup>20-25)</sup>로 Bifidus 菌의 분리·동정 및 배양이 용이하여져 이러한 Bifidus 菌을 이용한 제품이 생산되어 시판되고 있다<sup>26)</sup>.









따라서, 본 실험에서는 Bifidus 菌의 효능인 외래균의 증식을 방지하는 작용을 조사하기 위하여 건강한 한국성인과 Bifidus 菌제에서 Bifidus 菌을 분리·동정하여 대장균성 설사증의 주 원인균인 *E. coli* A<sub>2</sub>와 혼합배양하면서 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해양상을 일정한 시간 간격으로 측정하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

병원성 *E. coli*는 폐지의 대장균성 설사증의 주 원인균인 *E. coli* A<sub>2</sub> (0.57 : K88ac : H<sub>19</sub>)를 가축위

**Table 1. The cultural, cellular morphologic and staining characteristics of *Bifidobacterium longum*.**

Strain No.	Medium	Colony	Gram	Cell	Aerobic Incubation
SKD-2001	BL	 y. b	+		No.
	BS	 b	+		Growth
SKD-2004	BL	 y. b	+		No.
	BS	 b	+		Growth

y. b = Yellowish brown; b = Brown

생연구소에서 분양받아 사용하였고, *Bifidobacterium*은 光岡의 방법<sup>27, 28)</sup>과 姜등의 방법<sup>29)</sup>에 의하여 건강한 한국 성인 (Age : 24, Sex : Male)의 분변에서 분리·동정한 *Bif. longum* SKD-2001과 *Bifidus* 菌 製劑인 FD 비피더스 K (協和 醱酵 工業 株式 會社, Tokyo, JAPAN)에서 분리·동정한 *Bif. longum* SKD-2004를 사용하였다. 실험에 사용한 *Bif. longum*의 특징을 표 1에 나타내었고, 당발효성을 표 2에 나타내었다.

#### 사용배지

*Bifidobacterium*과 병원성 *E. coli*를 혼합배양하면서 *E. coli*의 생육저해 현상을 조사하기 위해 배양액은 YS medium (0.1% Yeast extract + 10% skim milk)을 사용하였다. 생균수측정을 위한 배지로서, *E. coli*에는 Desoxycholate agar (Difco)를, *Bifidobacterium*에는 선택배지인 BS agar를 사용하였다.

#### 시험균액의 준비

병원성 *E. coli*는 tryptic soy broth (Difco)에 1백금이 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 새로운 배지에 계대하여 2회째의 균액을 시험 균으로 사용하였다. *Bifidobacterium*은 Briggs liver broth에 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas를 분사하면서 1백금이 접종하여 24시간 배양한 후, 다시 새로운 배지에 계대하여 2회째의 균액을 시험균으로 사용하였다.

#### 시험균의 혐기 배양

장내와 유사한 혐기조건을 제공하기 위하여 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas로 미리 치환시킨 YS medium에 공기가 혼입되지 않도록 CO<sub>2</sub> gas를 계속 분사하면서 *E. coli*를 10<sup>5</sup>/ml 되게 접종한 후, 여기에 *Bifidobacterium*을 10<sup>5</sup>/ml, 10<sup>7</sup>/ml 되게 각각 접종한

**Table 2. Fermentation reactions of the strains of species *Bifidobacterium longum*.**

Compound	SKD-2001	SKD-2004
Gluconate	-	-
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Rhamnose	-	-
Sorbose	-	-
Ribose	+	+ <sup>w</sup>
Glucose	+	+
Mannose	+	V
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Cellobiose	-	-
Lactose	+	+
Trehalose	+	+ <sup>w</sup>
Melibiose	+	+
Raffinose	+	+
Melezitose	+	+
Starch	-	-
Glycogen	-	-
Inulin	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Inositol	-	-
Esculin	-	-
Salicin	-	-
Amygdalin	-	-

+ = positive; - = negative; +<sup>w</sup> = slight; V = variable reactions by the same strain

다음, 공기가 통하지 않는 butyl rubber로 신속히 밀전하여 37°C의 water bath에 배양하였다. 병원성 *E. coli*와 *Bifidobacterium*의 혼합배양액에서 *E. coli*의 생육저해 정도를 비교·검토하기 위해 병원성 *E. coli*만 단독으로 YS medium에 10<sup>5</sup>/ml 되게 접종하였다. 또한, *Bifidobacterium*의 생육을 비교·검토하기 위하여 *Bifidobacterium*만 단독으로 10<sup>5</sup>/ml, 10<sup>7</sup>/ml 되게 각각 접종하여 37°C에서 배양하였다.

#### *Bifidobacterium*의 생균수 측정

*Bifidobacterium*은 편성혐기성균이므로, 같은 형

기희석액을 사용하며, *E. coli*와 혼합된 배양액과 *Bifidobacterium* 단독배양액을 O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> gas를 분사하면서 십진희석을 실시하였다. 각 단계의 희석액 0.1ml를 Smi-micro/peptor (scientific manufacturing industry, U. S. A.)를 사용하여 미리 만든 BS 배지의 plate에 분주하고, conrad 봉으로 도달하여 혐기 Jar에 넣어 37°C에서 48시간 혐기배양을 하였다. BS 배지의 표면에 나타난 colony를 계수하여, 여기에 희석배율을 곱하여 *Bifidobacterium*의 생균수로 하였다.

**병원성 *E. coli*의 생균수 측정**

*Bifidobacterium*과 *E. coli*의 혼합배양액과 *E. coli* 단독배양액을 십진희석한 각 단계의 희석액 1 ml를 멸균된 petridish에 주입한 후, Desoxycholate agar를 분주하여 응고시킨다. 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 colony 수를 계수하였다.

**pH의 측정**

TOA pH Meter HM-7B를 사용하여 각 배양액의 pH를 측정하였다.

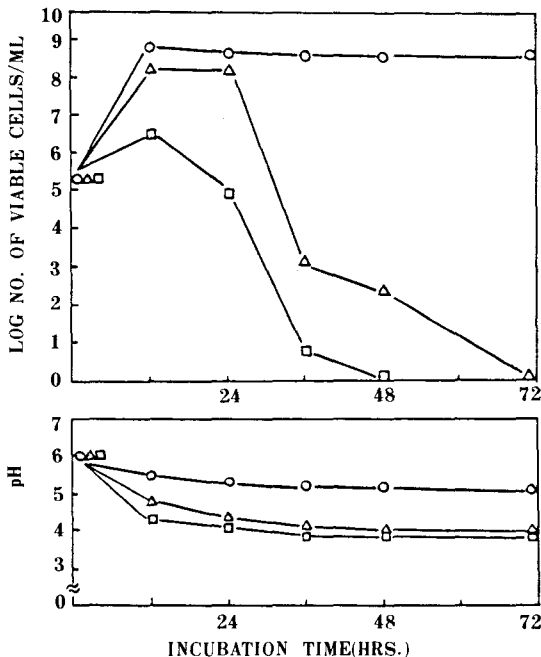


Fig. 1. Effect of *Bif. longum* SKD-2001 on the growth of *E. coli* A<sub>2</sub> in YS medium and changes of pH level of cultures.

- ○ - : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)
- △ - : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml) + *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>5</sup>/ml)
- □ - : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml) + *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>7</sup>/ml)

**결과 및 고찰**

*Bif. longum* SKD-2001에 의한 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해 병원성 *E. coli* A<sub>2</sub>에 대한 생육저해 효과를 혐기 조건에서 검토하여 본 결과는 그림 1과 같았다.

*Bif. longum* SKD-2001에 의한 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해는 배양초기부터 나타났는데, *Bif. longum* SKD-2001을 10<sup>5</sup>/ml로 혼합배양한 경우는 배양 24시간 이후부터 현저한 생육저해가 나타나 배양 72시간째에는 *E. coli* A<sub>2</sub>가 완전히 사멸하였다. 또한, *Bif. longum* SKD-2001을 10<sup>7</sup>/ml로 혼합배양한 경우에는 그 생육저해가 더욱 현저하여 배양 48시간째 *E. coli* A<sub>2</sub>가 완전히 사멸하였다. 현저한 생육저해가 나타나는 배양 24시간(10<sup>5</sup>/ml의 *Bif. longum* SKD-2001과 혼합배양한 경우)과 배양 12시간(10<sup>7</sup>/ml의 *Bif. longum* SKD-2001과 혼합배양한 경우) 계의 배양액의 pH를 살펴보면, 4.25와 4.33

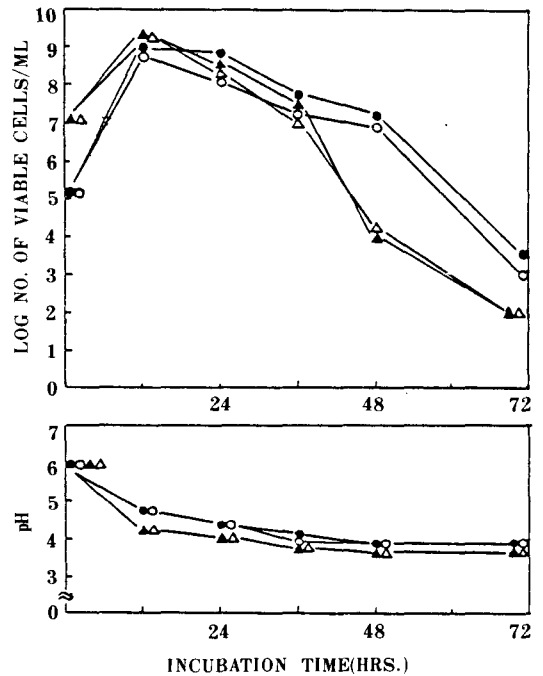


Fig. 2. Growth of *Bif. longum* SKD-2001 in YS medium and changes of pH level of cultures with and without *E. coli* A<sub>2</sub>.

- ● - : *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>5</sup>/ml)
- ○ - : *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>5</sup>/ml) + *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)
- ▲ - : *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>7</sup>/ml)
- △ - : *Bif. longum* SKD-2001 (10<sup>7</sup>/ml) + *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)

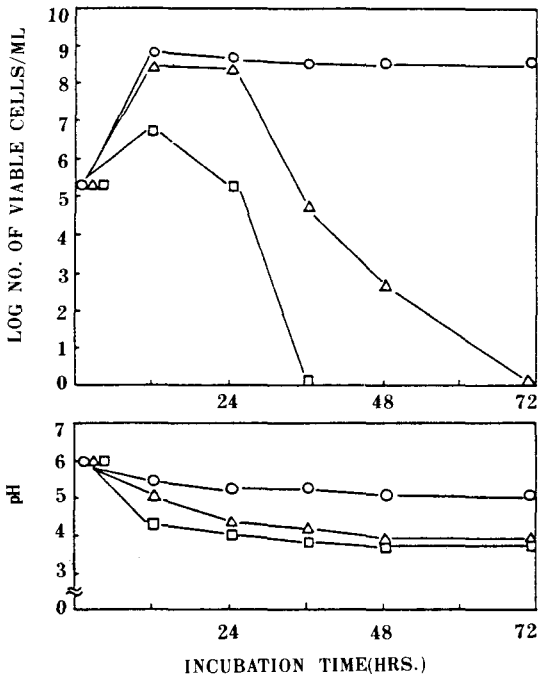


Fig. 3. Effect of *Bif. longum* SKD-2004 on the growth of *E. coli* A<sub>2</sub> in YS medium and changes of pH level of cultures.

- : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)
- △- : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml) + *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>5</sup>/ml)
- : *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml) + *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>7</sup>/ml)

으로 *E. coli* A<sub>2</sub>만 단독으로 배양한 배양액의 pH (배양 12시간째의 pH는 5.43, 24시간째의 pH는 5.25)보다 현저하게 저하되어 있음을 알 수가 있었다. 이와같이 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해가 나타나는 기간중의 *Bif. longum* SKD-2001의 생육은 그림 2에서 보는 바와 같이, *E. coli* A<sub>2</sub>에 의해 전혀 영향을 받지않고, *Bif. longum* SKD-2001만 단독으로 배양한 경우와 같은 증식을 나타내었다.

*Bif. longum* SKD-2004에 의한 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해 *Bif. longum* SKD-2004에 의한 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해는 그림 3과 같으며, 한국 성인에서 분리한 *Bif. longum* SKD-2001과 유사한 경향을 나타내고 있었다. *Bif. longum* SKD-2004를 10<sup>5</sup>/ml로 혼합 배양한 경우, 배양 24시간이후부터 *E. coli* A<sub>2</sub>는 현저하게 생육이 저해되어 배양 72시간째에는 완전히 사멸하였다. 또한, *Bif. longum* SKD-2004를 10<sup>7</sup>/ml로 혼합배양한 경우에는 배양초기부터 현저한 생육저해가 나타나, *E. coli* A<sub>2</sub>는 배양 36시간

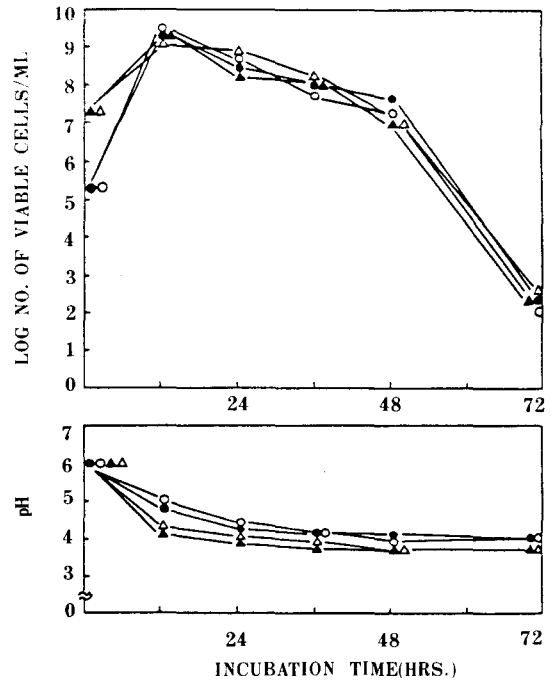


Fig. 4. Growth of *Bif. longum* SKD-2004 in YS medium and changes of pH level of cultures with and without *E. coli* A<sub>2</sub>.

- : *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>5</sup>/ml)
- : *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>5</sup>/ml) + *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)
- ▲- : *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>7</sup>/ml)
- △- : *Bif. longum* SKD-2004 (10<sup>7</sup>/ml) + *E. coli* A<sub>2</sub> (10<sup>5</sup>/ml)

만에 완전히 사멸하였다. 생육저해가 나타나는 기간인 배양 12시간 (10<sup>7</sup>/ml의 *Bif. longum* SKD-2004와 혼합배양한 경우)과 배양 24시간 (10<sup>5</sup>/ml의 *Bif. longum* SKD-2004와 혼합배양한 경우)의 배양액의 pH는 4.28과 4.33으로 *E. coli* A<sub>2</sub>만 단독으로 배양한 배양액의 pH (배양 12시간째의 pH는 5.43, 24시간째의 pH는 5.25)보다 저하되어 있었다. *Bif. longum* SKD-2004의 생육은 그림 4에서 보는 바와 같이 *E. coli* A<sub>2</sub>와 혼합배양하여도 *E. coli* A<sub>2</sub>에 의해 생육에 전혀 영향을 받지 않아 *Bif. longum* SKD-2004만 단독으로 배양한 경우와 같은 증식을 나타내었다.

이상의 결과로 부터, *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해는 배양액 pH의 저하와 동시에 나타난 것으로 보아, *Bif. longum*이 생성한 유산과 초산에 의해 배양액의 pH가 저하됨으로써 나타나는 것으로 사료되며, 한국 성인의 분변에서 분리한 *Bif. longum* SKD-2001

과 Bifidus 菌製劑에서 분리한 *Bif. longum* SKD-2004의 *E. coli* A<sub>2</sub>에 대한 생육저해 효과는 유사하였다. *E. coli* A<sub>2</sub>에 대한 생육저해는 장내세균인 *Bifidobacterium*의 기능인 외래균 및 병원성 세균의 증식을 방지한다는 것과 일치하며, 이러한 Bifidus 菌製劑를 사용하여 소화기 질환인 설사와 장염의 치료효과를 기대할 수 있다고 생각되며, 또한 장내의 정상 작용의 효과도 얻을 수 있으리라고 생각된다.

## 요 약

장내세균 *Bifidobacterium longum*에 의한 대장균성 설사증의 주 원인균인 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해를 혐기적 조건에서 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

한국 성인으로부터 분리·동정한 *Bif. longum* SKD-2001은 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육을 저해시키는 생육저해 작용을 가지고 있었다. Bifidus 菌製劑에서 분리·동정한 *Bif. longum* SKD-2004도 역시 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육을 저해하였다.

pH가 저하됨에 따라서 생육저해가 있는 것으로 보아 *E. coli* A<sub>2</sub>의 생육저해는 *Bif. longum*이 생산한 lactic acid와 acetic acid에 의해 배양액의 pH가 저하됨으로써 나타나는 것으로 사료되었다.

## 참고문헌

- Poupard, J. A., I. Husain and R. F. Norris: *Bacteriol. Rev.* **37**(2), 136 (1973).
- Finegold, S. M., H. R. Attebery and V. L. Sutter: *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 1456 (1974).
- 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社, 東京, **16** (1980).
- Kim, S. H. and K. H. Kang: *Kor. J. Dairy Sci.* **6**(2), 126 (1984).
- 本間道, 光岡知足: ビフィズス菌, ヤクルト本社, 東京, 144 (1978).
- 森下芳行: 最新醫學, **33**(10), 1998 (1978).
- Rowland, I. R. and P. Grasso: *Appl. Microbiol.* **29**(1), 7 (1975).
- Anand, S. K., R. A. Srinivasan and L. K. Rao: *Cultured Dairy products J.* **20**(1), 21 (1985).
- Bullen, C. L. and A. T. Willis: *Bri. Med. J.* **3**, 338 (1971).
- Evison, L. M. and A. James: *J. Appl. Bact.* **36**, 109 (1973).
- Mitsuoka, T., K. Hayakawa and N. Kimura: *ZBl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* **A226**, 469 (1974).
- 菅辰彦, 鈴木振一, 原田正和, 寺島経男, 務台方彦, 片岡節子, 二本武: *小児科臨床* **30**(11), 1947 (1977).
- 田中隆一郎, 菅辰彦, 手嶋久, 黒島敏方, 小平晋士, 鈴木振一, 寺島経男, 務台方彦: *小児科臨床*, **33**, 2483 (1980).
- 関増爾, 五十嵐稔, 福田芳子, 島村誠一, 川島拓司, 小笠勝啓: *栄養と食糧* **31**(4), 379 (1978).
- 山川達郎, 藤田賢一, 佐藤薫隆: *最新醫學* **33**(10), 2062 (1978).
- 坂崎利一: *最新醫學* **33**(10), 2030 (1978).
- Finegold, S. M.: *Am. J. Clin. Nutr.* **23**(11), 1466 (1970).
- Miller, C. P. and M. Bohnhoff: *J. Infect. Dis.* **113**, 59 (1963).
- 本間道, 光岡知足: ビフィズス菌, ヤクルト本社, 東京, 185 (1978).
- Mitsuoka, T., Y. Morishita: *Japan. J. Microbiol.* **13**(4), 383 (1969).
- Collee, J. G., E. B. Fowler and R. Brown: *J. Appl. Bact.* **35**(1), 71 (1972).
- Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 1324 (1972).
- Aranki, A. and R. Freter: *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 1329 (1972).
- Dowell, V. R., Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 1335 (1972).
- Anderson, K. X. and D. Y. C. Fung: *J. Food L. protect.* **46**(9), 811 (1983).
- 島村誠一: 乳技協資料 **32**(1), 2 (1982).
- 光岡知足: 感染症学雑誌 **45**(9), 406 (1972).
- 光岡知足: 日本細菌学雑誌 **29**(6), 773 (1974).
- 姜國熙, 朴勇河, 金尚希: 成大論文集 **33**, 235 (1983).