

의약품 프로바이오틱 비스판균의 미생물학적 동정

전경동¹ · 이광호 · 김원석¹ · 백현동*
경남대학교 생명과학부, ¹(주)순천당제약 기술연구소

Microbiological Identification of Medical Probiotic Bispan Strain. Jun, Kyung-Dong¹, Kwang-Ho Lee, Won-Seok Kim¹, and Hyun-Dong Paik*. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ¹R&D Center, Soon Chun Dang Pharm. Co., Ltd., Pusan 604-040, Korea – Beneficial bacteria, which have been used for medical purpose and for medicines for treating intestinal disorders, include strains of *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polyfermenticus* and the like. *Bacillus polyfermenticus* SCD which is commonly called as Bispan strain has been appropriately used for the treatment of long-term intestinal disorders, since the live strains in the form of active endospores can successfully reach the target intestine. In this study, the identification and characterization of Bispan strain was done using SEM observation, API 50CHB kits, isoprenoid quinone analysis, and fatty acid analysis. These results suggest that Bispan strain is very similar to *Bacillus subtilis*.

Key words: Probiotics, Bispan, identification, *Bacillus*, quinone, fatty acid

의약품 프로바이오틱 생균제로 사용되고 있는 세균은 *Bifidobacterium*속, *Lactobacillus*속, *Enterococcus*속, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus polyfermenticus* 등이다. 이 중에서도 *Bacillus*속 생균제들은 활성 아포를 형성하여 생균 대부분이 장에 도달되어 장기간 장질환에 대해 치료효과를 보이는 등 장점이 많다[2].

생균제 관련 업제에서 비스판균으로 불리우는 *B. polyfermenticus*는 1933년 일본의 Terakado가 공기로부터 분리한 아포성 간균으로서, 20여종의 효소를 분비하여 영양소를 재 활용하게 하며, 비타민 B₁, B₂, K를 합성하여 영양을 보급 시킨다. 또한, 인체의 3대 영양소인 탄수화물, 지방, 단백질 및 섬유소를 소화, 흡수시키며 병원성 균들인 티프스균, 파라티프스균, 적리균, 콜레라균 등을 용균시켜 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다. 한편, 섭취할 경우 비경구적 감염방어작용과 경구적 면역능이 증강 된다는 사실도 밝혀져 있으며, 숙주의 면역 기능을 강화하고 발암 물질과 발암촉진 물질을 생성하는 장내 미생물의 생육을 억제하며, 대장균의 항종양 물질이나 항돌연변이 물질을 생성함으로써 종양 발생을 억제한다. 특히 현재 시판되고 있는 유산균 제제나 비피더스균 제제 등은 장까지 도달하기 위해서는 위산이나 여러 효소들 때문에 특별한 코팅이나 캡슐 제품들을 생각해 야 되지만, 이 비스판균은 아포를 형성하는 균이기 때문에 장에 도달할 때까지 활성을 거의 잃지 않아 장질환의

치료에 탁월한 효과를 보이고 있다. 한편, 비스판균이 다른 *Bacillus*속 프로바이오틱 생균제들보다 환경 적응력이 뛰어났으며 설사 유발 대장균 및 *Salmonella*에 대한 생육 억제력도 우수한 것으로 알려져 있다[8]. 또한 배양 후 냉동건조시킨 뒤 37°C에서 42일까지 보관한 후에도 생존율이 상당히 높은 것으로 나타나 생균제로서의 우수성이 보고된 바 있다. 국내에서는 이 비스판균의 원분말을 일본의 (주)미꾸니화학산업으로부터 수입한 후, 부형제를 첨가하여 다양한 비스판 제제를 만들어 (주)순천당제약 등에서 판매해 오고 있다.

미생물학적인 세균 동정은 형태적 관찰, 생리적 실험결과, 여러 기기분석에 의한 결과 및 유전적인 실험결과 등을 학명이 정해진 기존의 균주와 비교하여 새로운 종류의 미생물 집단에 대해서는 명명법에 따라 학명이 주어진다. 최근 *Bacillus*속 균주의 동정을 위해 FT-IR[6], API 50CHB kits system[14], 균체지방산조성분석[4,11,13], a microtitre tray 방법[5], 16S rRNA gene oligonucleotide probe이용 방법[1] 등이 이용되고 있다.

비스판균은 일본약국방의약품성분규격에 당화균(*amylolytic Bacillus*)이라 하여 *B. subtilis* 및 *B. mesentericus*와 함께 기재되어 있으나, 국제명명규약(예를 들어 Bergey's manual)에 의한 분류명에는 존재하지 않는다[12]. 그러나 여러 연구에 의하면, 형태 및 생화학적인 성상을 비교해 볼 때, *B. subtilis*와 상당히 유사한 것으로 인정되고 있으나, *B. subtilis*와 다른 점은 유당을 분해하는 능력이 있고 포도당과 유당에서 초산과 젖산을 더욱 많이 생산하는 것 등이다. 그러나 비스판균의 산업적인 중요성에 비해 보다 체계적인 동정 실험은 거의 이루어지지 않았다. 본 연구에

*Corresponding author
Tel. 82-551-249-2689, Fax. 82-551-243-8133
E-mail: hdpaik@kyungnam.ac.kr

서는 의약품 프로바이오틱 생균제로 널리 사용되고 있으며 산업적으로 매우 유용한 비스판균을 여러 동정 기술을 활용하여 최종적인 동정을 위한 기초 자료를 제시하고자 한다.

본 연구에 사용된 비스판균은 (주)순천당제약 기술연구소로부터 분양 받아 3~4회에 걸친 계대배양으로 균주를 활성화 하였다. 이 비스판 균주는 glycerol stock법으로 -70°C에서 보존하였고, working culture는 한달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다. 형태학적 및 배양학적 특성을 알기 위해 배양배지로는 Tryptic Soy Broth(Difco Laboratories, Detroit, USA)를 이용하였으며, 37°C에서 배양하였다. 배양된 균의 아포형성 여부를 알기 위해 80°C에서 2시간 반응 후 회석도말법으로 아포수 측정을 하였다. 비스판균의 형태학적 관찰을 위하여 주사전자현미경(Scanning electron microscope, S-4200 FE-SEM, Hitachi, Japan)으로 조사하였으며, 방법은 다음과 같다. 즉 배양액으로부터 균체를 원심분리하여 얻은 후, glutaraldehyde 25%용액으로 4°C에서 하룻동안 고정화 시키고, 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)으로 3회 수세하고 에탄올로 건조시켰다. Slide glass로 spot하여 건조한 후 진공건조기에서 1주일 정도 건조시켰다. 감압 증발기에서 200 nm에서 ion-sputter coating시켜 사진을 얻었다(Fig. 1). 탄소원 이용성을 이용한 비스판균 동정실험은 상품화된 API 50CHB kits를 사용하여 kit system에 따라 조작하였고, 판독은 ATB computer data base를 이용하였다. 비스판균의 균체를 얻어 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 Isoprenoid quinone 성분을 분석하였다[10]. 분석 조건은 instrument, Hitach L-5000LC controller; pump, Hitach L-6000; column, YMC-Pack ODS-AM; column temp., 30°C; eluent, methanol/isopropanol(7:5, v/v) for menaquinone; flow rate, 1 ml/min이었다. 균체의 지방산조성 분석[13]은 TSB배지에서 37°C에서 12시간 배양한 후, 균체만 회수하여 50 mg(wet weight)을 취하여 1N NaOH(50% methanol)을 1 ml에 현탁한 후, 100°C에서 30분간 가열

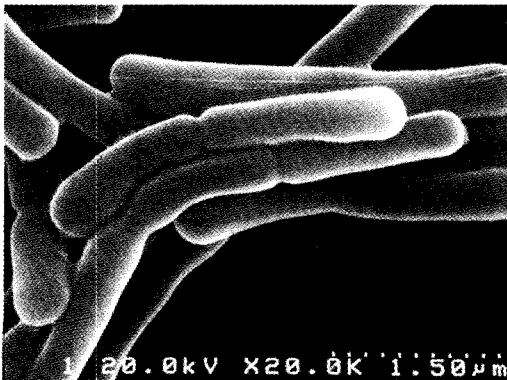


Fig. 1. Scanning electron microscopic observation of Bispan strain.

하여 비누화한 다음 실온에서 식혔다. 여기에 6N HCl (46% methanol) 2 ml 첨가하여 80°C에서 10분간 가열하여 메틸화 시킨 다음 급냉한 후 추출용매 1.25 ml을 넣고 10분간 가법계 진탕하였다. 실온에 정치한 후 반응액이 2개의

Table 1. Microbiological identification of Bispan strain using its carbon source utilization pattern

Carbohydrate	Bispan strain	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 310
Control	-	-	-
Glycerol	+	+	+
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
D-Xylose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-
Galactose	-	-	-
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+
N-Acetyl glucosamine	-	-	-
Amygdaline	+	-	-
Arbutine	+	+	+
Esculine	+	+	+
Salicine	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	-
Melibiose	+	-	+
Saccharose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Inuline	-	+	+
Melezitose	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+
Amidon	+	-	+
Glycogen	+	+	+
Xylitol	+	-	-
β-Gentibiose	+	-	+
D-Turanose	-	+	+
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-
Gluconate	-	-	-
2-Keto gluconate	-	-	-
5-Keto gluconate	-	-	-

+: utilized, -: not utilized

층으로 분리되면 하층액만을 제거하고 염세척시약 3 ml을 첨가하여 5분간 섞어준 후, 반응액 중 상등액의 2/3정도를 septum-capped sample vial로 옮겨 capping하여 시료로 사용하였다. 이 시료를 균체의 지방산 분석용 시료로 하여 Gas chromatography(Hewlett Packard 5890A, Microbial ID, Inc., USA)을 이용하여 분석하였다[7]. 이때, 분석조건은 carrier gas, hydrogen; column head pressure, 10 psi; split ratio, 100:1; split vent, 50 ml/min; septum purge, 5 ml/min; FID nitrogen, 30 ml/min; FID air, 400 ml/min; initial temp., 170°C; program rate, 5°C/min; final temp, 270°C; FID temp., 300°C; injection port, 250°C; injection volume, 2 µl이었다.

본 실험에서의 결과에 따르면, 비스판균은 그람 양성균이었으며, 아포를 형성하였고, Plate 배양시 콜로니의 색상은 옅은 황색을 보였다. 배양된 비스판균은 주사전자현미경을 통하여 균주의 모양과 크기를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 균주의 형태는 간균이었으며, 약 0.8×3~4 µm의 크기로 관찰되었다. 최근 *Bacillus*속의 동정에 이용되고 있는 API 50CHB kits system을 제조회사의 사용방법에 따라 조작하여 ATB computer data base로 확인한 결과, 99.5%의 유사성으로 *B. subtilis*와 일치하였다(Table 1). HPLC를 이용한 isoprenoid quinone 분석을 통해 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 MK-7(menaquinone-7)이 주성분으로 검출되었다(Fig. 2). 이는 *Bacillus*속의 특징 중의 하나로 알려져 있다. 세균의 균체지방산의 GC분석을 이용한 동정방법은, 이미 여러 연구들을 통해 확인되었다[9,15]. 이 방법을 이용한 동정 결과는 species수준까지 80%정도 신뢰할 수 있다고 알려져 있다. 지질은 세균의 세포막과 세포벽의 주요 구성물

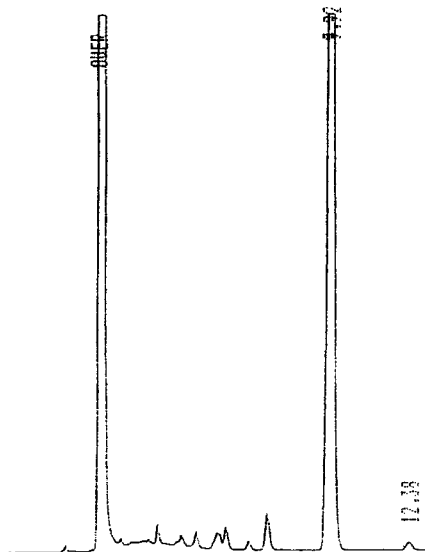


Fig. 2. HPLC chromatogram of menaquinones from Bispan strain.

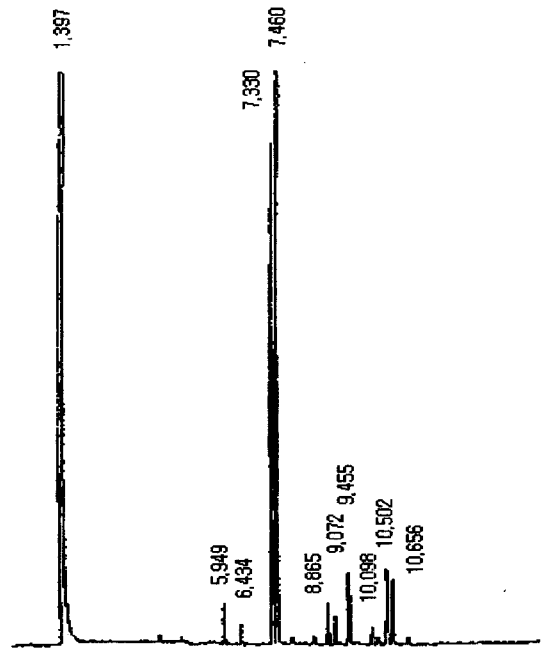


Fig. 3. GC chromatogram for the analysis of fatty acids of Bispan strain.

질로 long chain fatty acid를 포함하고 있으며 그 조성이 세균의 종류에 따라 매우 차이가 심하다. 균체의 지방산 조성은 분류학상의 단위에서 특징이 확실한 분류군도 있으므로 균체의 지방산 조성을 조사함으로써 분류학상의 위치를 알 수 있다. 비스판균의 균체지방산조성을 분석한 결과는 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 12-methyltetradecanoic acid (15:0 anteiso-Cn)와 13-methyltetradecanoic acid(15:0 iso Cn) 성분이 주성분으로 *Bacillus*속에서 볼 수 있는 특징을 가지고 있었다[3,4]. 불포화 지방산이 매우 적고(3.35%), anteiso-C₁₅ acid 와 iso-C₁₅ acid가 각각 41.92%, 32.75% 이고, chain의 길이가 C₁₄~C₁₇로만 구성되어 있으며, 데이터베이스를 이용한 검색결과, 50%의 유사성으로 *Bacillus subtilis* group으로 확인되었으므로 *Bacillus subtilis* group으로 판단되었다. 결론적으로, 위와 같은 결과를 종합해 볼 때 비스판균을 *B. subtilis*와 매우 유사한 균으로 동정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 산업기반기술개발사업 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이광호는 1999년도 두뇌한국 21사업 핵심분야에 의해 장학 지원되었기에 감사드립니다. 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터에서 isoprenoid quinone 및 균체지방산조성 분석이 수행되었으며 데이터 해석에도 도움을 주신 것에 대해 감사드립니다.

REFERENCES

1. Akhurst, R. J., E. W. Lyness, Q. Y. Zhang, D. J. Cooper, and D. E. Pinnock. 1997. A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece. *J. Invertebr. Pathol.* **69**: 24–31.
2. Green, D. H., P. R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca, and S. M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4288–4291.
3. Jin, S. H. and B. H. Ryu. 1995. Isolation and identification of a bacteriolytic enzyme-producing bacterial strain from Pusan coastal sea. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 580–587.
4. Kaneda, T. 1977. Fatty acid of the genus *Bacillus*, an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Rev.* **41**: 391–418.
5. Kotzekidou, P. 1996. A microtitre tray procedure for a simplified identification of *Bacillus* spp. in spoiled canned foods. *Food Microbiol.* **13**: 35–40.
6. Lin, S. F., H. Schraft, and M. W. Griffiths. 1998. Identification of *Bacillus cereus* by fourier transform infrared spectroscopy. *J. Food Prot.* **61**: 921–923.
7. Miller, L. and T. Berger. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application Note. pp. 228–248.
8. Park, H. S., S. H. Lee, and T. B. Uhm. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 433–440.
9. Sasser, M. and M. D. Wichman. 1991. Identification of microorganism through use of gas chromatography and high-performance liquid chromatography, pp. 111–118. In W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
10. Shin, Y. K., J. S. Lee, C. O. Chun, H. J. Kim, and Y. H. Park. 1996. Isoprenoid quinone profile of the *Leclercia adecarboxylata* KCTC 1036. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 68–69.
11. Siegel, J. P., A. R. Smith, and R. J. Novak. 1997. Comparison of the cellular fatty acid composition of a bacterium isolated from a human and alleged to be *Bacillus sphaericus* with that of *Bacillus sphaericus* isolated from a mosquito larvicide. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1006–1010.
12. Sneath, P. H. A. Endospore forming gram positive rods and cocci. pp. 1104–1207. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
13. Stoakes, L., T. Kelly, B. Schieven, D. Harley, M. Ramos, R. Lannigan, D. Groves, and Z. Hussain. 1991. Gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for identification of Gram-negative anaerobic bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2636–2638.
14. Te Giffel, M. C., R. R. Beumer, P. E. Granum, and F. M. Rombouts. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **34**: 307–318.
15. Welch, D. F. 1991. Application of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 422–438.

(Received March 22, 2000)