

Bacillus polyfermenticus SCD의 생균제로서의 특성

전경동 · 김혜진 · 이광호 · 백현동¹ · 강재선*

(주)바이넥스 중앙연구소, ¹경남대학교 생명과학부 식품생물공학과

Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a Probiotic. Jun, Kyoung-Dong, Hye-Jin Kim, Kwang-Ho Lee, Hyun-Dong Paik¹, and Jae-Seon Kang*. Research and Development Center, Binex Co. Ltd., 480-2, Jangrim-dong, Saha-gu, Busan, Korea, ¹Department of Food Science and Biotechnology Division of Life Science, Kyungnam University, 449, Wolyong-dong, Masan, Korea. - *Bacillus polyfermenticus* SCD which is commonly called as Bisroot strain is being used for functional foods through the treatment of long-term intestinal disorders, since the live strains in the form of active endospores can successfully reach the target intestine in humans. The cells of *B. polyfermenticus* SCD were treated for 4h in artificial gastric juice (pH 2.0, 3.0) and bile acid. Final viability of the strain in artificial gastric juice (pH 2.0, 3.0) is reached to 62.8% and 81.2% respectively. *B. polyfermenticus* SCD is resistant to antibiotics such as streptomycin, rifampicin, nystatin and ampicillin. *B. polyfermenticus* SCD is well known supplies the nutrients by synthesizing vitamin B₁, B₂, C and K. *B. polyfermenticus* SCD produces various digestive enzymes and the enzymes enable to completely digest diets in our body. Above all, α -amylase and protease activities are very higher than *B. subtilis* KCTC1020, about two fold and twenty five fold respectively. *B. polyfermenticus* SCD is very stable during long-term storage period in phosphate buffers of wide-range pH, solutions of various concentrations of sodium chloride, 5% glucose solution and water.

Key words: Bisroot, *Bacillus polyfermenticus* SCD, probiotic, characterization

소득 수준이 향상되면서 소비자는 건강 지향적인 제품에 관심을 가지고 있으며, 기능성 식품에 대한 수요 역시 크게 증가되고 있다. 실제로 생균제의 기능성과 효능을 이용한 식품개발은 기능성 식품의 중요한 분야로 인식되고 있다. *Salmonella typhimurium* DT104는 기존의 *Salmonella* 균과는 달리 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides 와 tetracycline에 대한 다제약제내성(R-Type)을 보이며 이미 미국, 영국, 캐나다, 독일, 프랑스, 오스트리아, 덴마크 등의 선진국을 포함하여 세계 여러 나라에서 보고되고 있다 [8,10,25]. 이 균은 감염증에 대한 항생제 치료의 어려움 외에 transformation 등을 통해서 다른 균들로 항생제 내성에 관여하는 유전자의 전파를 일으킬 위험성이 있으며 [23], 영국에서는 이미 trimethoprim과 ciprofloxacin에 대한 additional resistance를 가지는 *S. typhimurium* DT104가 보고되었다 [10]. 또한 *Escherichia coli* O157:H7은 미국과 일본에서 대량 식중독 사태를 일으킨 바 있으며, 감염 시 출혈성 신증후군(hemolytic uremic syndrom) 및 출혈성 장염(hemolytic colitis) 등의 증상을 나타내고 특히 유아나 노약자의 경우에는 치명적인 균으로 알려져 있다. 이러한 균들의 감염 시 항

생제의 치료가 주가 되지만 항생제 남용으로 인한 각종 항생제에 대한 내성이 증가되고 있으며 살균성 항생제를 투여할 경우 세포벽의 파괴로 인한 verotoxin의 용출이 생겨 더 위험할 수 있기 때문에 생균제의 투여에 의한 장내균총의 정상화가 더 바람직한 치료효과를 보이기도 한다 [1,9,11,17,20,24]. 따라서 기능성 식품으로 생균제를 이용하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

생균제(Probiotic)란 살아있는 미생물 균체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균 물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료를 통해 신체기능 개선을 목적으로 생산된 제품을 말한다 [11]. 이러한 프로바이오틱 생균제는 장내 균총의 안정화, 유해 세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병예방, 면역의 활성화, 간접적인 항암작용, 콜레스테롤 저하, 유당 불내증의 감소, 변비 억제 및 예방과 관련되어 기능성이 인정되어 있다.

생균제로 많이 이용되고 있는 세균은 *Lactobacillus* 속, *Streptococcus* 속, *Bifidobacterium* 속 그리고 유포자 유산균인 *Bacillus* 속 등이 있다. 한편, 생균제로서 필요한 특성은 안전성, 기능적 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 촉진능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능), 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조 과정 중의 생존성)에 있어서 우수성이 있어야 하고, 그

*Corresponding author
Tel. 82-51-263-9277, Fax. 82-51-265-6864
E-mail: jskang28@hanmail.net

리고 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내 생존력이 커야 한다는 것 등이다[3,4,7,12,14-16,21].

최근 들어 *Bacillus*속 생균제에 대한 산업적인 유용성이 증대되고 있으며, 그 중에서도 비스루트균이라 불리는 *B. polyfermenticus* SCD는 식품용 생균제로 주목받고 있다. *B. polyfermenticus* SCD는 *B. subtilis*와 매우 유사한 균으로 동정되어 있으며, *B. polyfermenticus* SCD 활성아포의 경제적인 생산을 위한 액체발효법이 밝혀져 있다[11]. 본 연구에서는 생균제로 사용되고 있는 *B. polyfermenticus* SCD의 인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성 및 담즙산의 분해력, 항생물질에 대한 내성, 비타민 생산, 효소활성, 안정성 등을 검토하여 산업적인 유용성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 *B. polyfermenticus* SCD는 3~4회에 걸친 계대배양으로 활성화하였으며 glycerol stock법으로 -70°C에서 보존하였고, working culture는 한 달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다. *B. polyfermenticus* SCD의 배양 배지는 TSB 배지(Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였으며, 항생제에 대한 최소생육억제농도(Minimal Inhibitory Concentration: MIC) 검증을 위해 사용된 배지는 Mueller Hinton(MH: Merck, Germany) 배지를 사용하였다.

배양조건 및 방법

B. polyfermenticus SCD를 test tube의 TSB broth 10 ml에 접종하여 37°C에서 교반속도 150 rpm으로 12시간 전 배양한 다음 다시 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에 접종하여 7일간 본배양하여 내생포자를 완전히 형성시켜 실험에 사용하였다. 유산균은 MRS배지에서 37°C에서 48시간 정지배양하여 사용하였다.

균수의 측정

총생균수는 배양액을 0.1% 펩톤수로 10배씩 연속적으로 희석시킨 다음, 평판배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후, 최적온도에서 배양하여 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정하여 총생균수를 계산하였다. 아포수의 측정은 배양액을 80°C에서 2시간 열처리하여 영양세포를 사멸시킨 후, 희석수(0.5% NaCl, 1.0% peptone)로 10배씩 희석하여 이후의 조작은 총생균수의 측정 방법과 동일하게 수행되었다.

인공위액에 대한 내성

인공위액은 1N HCl을 사용하여 pH 2.0, 3.0으로 조절한 TSB, MRS broth를 사용하였다. *B. polyfermenticus* SCD를 포함한 *Bacillus* sp.은 7일, 유산균은 2일 배양된 배양액을 인공위액에 10%(O.D_{660nm}: 0.5~1.0)로 접종하여 37°C에서

0, 1, 2, 3, 4 시간 각각 배양하여 균수를 측정하여 생존율을 측정하였다[5,16].

인공담즙산에 대한 내성

TSB broth에 0.2% sodium thioglycolate와 1 mM의 sodium taurocholate와 1 mM의 sodium glycolate를 첨가한 배지를 제조하여 121°C, 15분, 15 Lb, 고온증기멸균하였다[4]. 멸균된 액체 배지에 pH 2.5에서 4시간을 처리한 균주를 1% 농도로 접종하고 37°C에서 교반속도 150 rpm으로 배양하였다. 시간별로 시료를 취하여 생균수를 측정하였다.

항생물질에 대한 내성 측정

항생물질의 내성을 측정하기 위해서 액체배지 희석법(macrobroth 희석법)을 사용하였다. MH배지에 각 항생제를 2배씩 희석하여 7일간 배양된 *B. polyfermenticus* SCD를 10⁶~10⁷ CFU/mL(O.D_{660nm} 0.5)의 농도로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 UV/Vis spectrometer로 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하여 내성을 확인하였다.

비타민 분석

Ethanol과 증류수는 HPLC grade(Burdick & Jacks-on, USA)를 사용하였다. 표준물질로 비타민 B₁, B₂, B₃, B₅, C는 각각 20 mg씩, 비타민 B₁₂는 10 mg을 취하여 희석액을 넣어 100 ml로 한다. 검액은 *B. polyfermenticus* SCD 배양 상등액 5 ml를 취하여 희석액을 넣어 50 ml로 한다. HPLC 조건은 Table 1과 같다.

비타민 C의 생성 확인

B. polyfermenticus SCD의 배양상등액 1.0 ml에 0.1 N HNO₃ 0.4 ml과 0.1 N AgNO₃ 0.4 ml를 첨가하여 침전시킨 후 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물에 묽은 염산 3 ml를 첨가하여 녹인 다음 원심분리하여 상등액으로 흡광도를 측정하여 확인하였다.

효소활성 측정

TSB배지, 37°C, 150 rpm, 5시간 배양한 후 TSB배지로 OD_{660nm} 0.5로 조절한 후 원심분리하여 상등액을 취한 후 전분분해력과 지방분해력 시험에 사용하였다. 단백질분해력은 배양 후기에 protease의 활성이 증가하므로 9시간 배양 후 위

Table 1. Condition of HPLC for analysis of vitamins.

Instrument	HPLC (HITACHI D-7000 Series)
Column	Shiseido
Mobile phase	H ₂ O:ethanol:glacial acetic acid = 73:27:1
Dilute solution	H ₂ O:acetonitrile:glacial acetic acid = 94:5:1
Flow rate	1.0 ml/min
Wavelength	254 nm

과 같은 조작을 하여 단백소화력을 측정하였다. 전분소화력, 지방소화력, 단백소화력은 KFDA 판크레아틴 항의 시험방법에 준하여 행하였다.

B. polyfermenticus SCD의 안정성 시험

인산으로 pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5로 각각 조절한 0.02 mol/L 인산염완충액 100 ml에 *B. polyfermenticus* SCD 원분말 1 g (5.0×10^7 CFU/g)을 각각 현탁시켜 진탕배양기에서 37°C, 150 rpm으로 배양하여 pH안정성을 확인하였다. 보관온도에 따른 안정성은 위의 실험결과 pH 3.5의 배양액을 5°C, 실온(25°C), 40°C에 각각 보관하여 안정성을 확인하였다. 또한 물과 5% glucose, 그리고 NaCl의 각 농도별(0.9, 5.0, 10.0, 5.0, 20.0% w/v)에서의 안정성도 확인하였다.

장내미생물 및 부패산물에 대한 영향

분변실험의 경우 실험대상자(성인남자 4명, 성인여자 2명)들의 선발은 *B. polyfermenticus* SCD를 장기 복용하지 않은 자, 유제품 발효유를 장기 복용하지 않은 자,식이섬유 식품의 장기 복용이 없었던 자, 항생제 등 약물남용을 하지 않은 자와, 지원자 연령 20~30세로 한정하였으며, 실험대상자들에 대한 주기적인 교육과 홍보는 *B. polyfermenticus* SCD 이외의 기타 유산균 복용을 피할 것, 항생제 복용을 주의할 것, 소화계통의 이상 발생 시 중지할 것, 김치 등 발효음식은 가급적 피할 것, 장내소화계통에 직접적 영향을 미치는 것은 피할 것을 주의시켰고, 시험기간 동안 일반적인 규칙적 생활을 강조하였다. *B. polyfermenticus* SCD의 복용은 1.0×10^8 CFU/day (3.3×10^7 CFU 3 times)로 복용하였다.

분변의 채취

실험지원자들로부터 *B. polyfermenticus* SCD 복용 전, 복용 중, 복용 후별로 1주일 간격으로 분변 5~10 g을 채취하여 1 g을 희석수에 넣고, 2시간 이내에 실험을 완료하였으며, 잔여시료는 -70°C에 N2치환을 하여 밀봉한 상태로 보관하였다.

균수의 측정

분변 1 g을 멸균된 0.85%생리식염수에 넣고 10배수 희석법으로 각 균주의 선택배지와 비선택배지에 0.1 ml를 도말하였다. Nutrient agar에서의 총균수의 경우, 호기성과 통성 혐기성균들은 37°C incubator에서 24~48시간 배양 후 colony를 관찰하였으며, 혐기성균들의 경우 gaspak anaerobic jar system을 이용한 37°C incubator에서 24~48시간 배양 후 colony를 측정하였다. 장내 유해균수의 경우 멸균된 0.85% 생리식염수에 10배수 희석법으로 희석 후, plate에 도말하여 선택적배지와 비선택적배지(Table 2)에 나타난 colony를 gram stain, 현미경적 관찰, 구균, 간균, catalase반응, oxidase

Table 2. Media used for counting fecal microflora

Selective media	Fecal microflora	Culture condition
Nutrient Agar	<i>Aerobic total cell</i>	37°C
Nutrient Agar	<i>Anaerobic total cell</i>	37°C, gaspak anaerobic jar system
Mannitol salt agar	<i>Staphylococcus</i>	
EMB	<i>Escherichia</i>	
CATC Agar	<i>Enterococcus</i>	37°C
M _{AC} Conkey Agar	<i>Pseudomonas</i>	
Selenite Agar	<i>Salmonella</i>	
MRS	<i>Lactobacillus</i>	
TSA	<i>Bacillus</i>	37°C
PDA	<i>Yeast</i>	

반응, gaspak anaerobic jar system 등을 통해 균총의 변화를 측정하였다.

부패산물의 측정

장내 대표적 부패산물인 암모니아의 양은 암모니아 정량용 kit(Aquaquant 1.14423, Merck Co., Germany)를 사용하였으며, 분변 1 g을 희석하여 kit사용법에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

인공위액에 대한 내성

식품용 생균제로서 가져야 할 특성이 여러 가지가 있는데, 이 중에서 가장 중요한 특성 중의 하나가 생존력이 높아야 한다는 점이다. 구강을 통하여 섭취되는 균은 위와 십이지장을 통해 생존하여 최종 목적 부위인 장에 도달하게 된다. *B. polyfermenticus* SCD가 생균제로서의 기능을 발휘하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여야 한다. 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 된다. 하지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸률이 어느 정도 감소하게 된다. 내산성 실험으로는 *in vivo*에서 직접 생존율을 확인하는 방법[22]과 인공위액을 이용한 간접적으로 측정하는 방법이 알려져 있다. 생균제의 사멸은 주로 HCl에 의한 낮은 pH에 의한 것이며[6], *in vitro*와 *in vivo*에서의 실험결과가 거의 일치한다는 사실이 보고 되어 있다[3,6,18].

pH 2.0과 3.0으로 조정된 인공위액에서 산업적으로 이용되는 생균제들의 내성을 확인하였다. *B. polyfermenticus* SCD와 *Bacillus* sp. 균들은 충분히 내생포자를 형성시켜 실험하였다. 그 결과, 2시간에서의 생존율은 pH 2.0(Fig. 1), 3.0(Fig. 2)에서 각각 85.6과 92.6%의 생존율을 나타내었으며 4시간에서도 각각 62.8%와 81.2%의 높은 생존율을 나타냈는데, 이는 다른 *Bacillus* sp. 들과 비교했을 때 매우 높은 생존율이었다. 반면 내생포자를 형성하지 않는 유산균들의 생존율은 매우 낮았다.

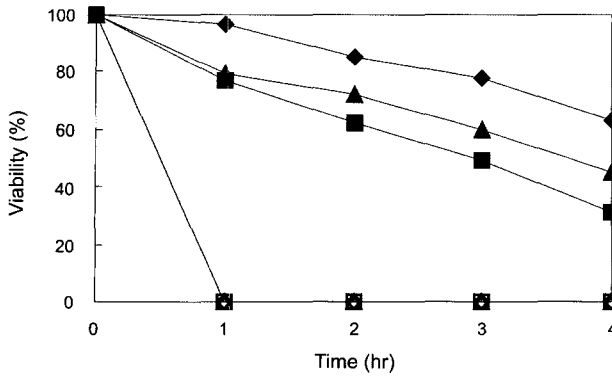


Fig. 1. Comparison of viability of *B. polyfermenticus* SCD strain to other commercial beneficial bacteria with artificial gastric juice (pH 2.0). —◆—, *B. polyfermenticus* SCD; —■—, *B. subtilis*; —▲—, *B. mesentericus*; —△—, *L. casei*; —□—, *L. bulgaricus*; —△—, *St. faecalis*.

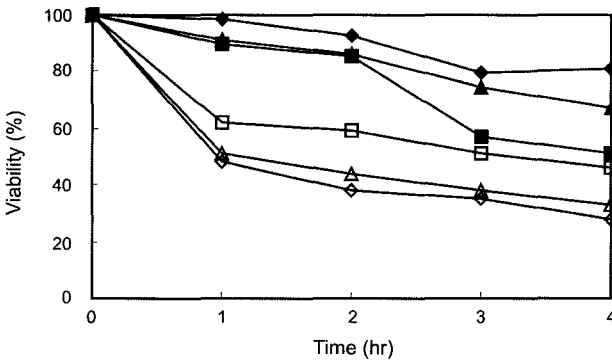


Fig. 2. Comparison of viability of *B. polyfermenticus* SCD strain to other commercial beneficial bacteria with artificial gastric juice (pH 3.0). —◆—, *B. polyfermenticus* SCD; —■—, *B. subtilis*; —▲—, *B. mesentericus*; —△—, *L. casei*; —□—, *L. bulgaricus*; —△—, *St. faecalis*.

담즙산에 대한 내성

섭취된 생균제가 장에 도달하기 위해서 위를 거쳐 췌장과 십이지장을 통과하게 된다. 이 부위에서 분비되는 담즙액에 대한 내성 또한 생균제가 가져야 할 중요한 특성이다. 생균제로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도 (0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다. 또한 생균제가 혈중 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고들이 발표되었다. 그 이유로서 생균제들의 담즙산염의 분해 능력을 들고 있다. 담즙산염은 일종의 비누적 성질을 갖고 있어 장에서 지방과 콜레스테롤을 용해하여 소화 흡수를 도와주는데 분해된 담즙산은 비누로서의 성질을 잃어버려서 결국 그 만큼 지방과 콜레스테롤이 흡수되지 못하고 변과 함께 배설되도록 한다. 이와 같은 이유로 결국 혈중 콜레스테롤이 감소한다는 것이 현재의 가설인데 앞으로 더욱 연구가 필요한 분야이다.

B. polyfermenticus SCD의 인공담즙산에 대한 내성을 확

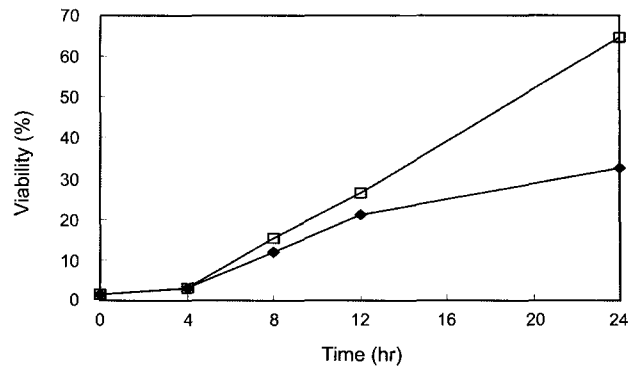


Fig. 3. Survival rates of *B. polyfermenticus* SCD strain in artificial bile acid after treated with artificial gastric juice for 4h at 37°C. —◆—, TSB; —□—, TSB + Bile acid.

인한 결과 인공담즙산에 대한 내성을 가질 뿐만 아니라 인공담즙산이 함유되지 않은 대조구(3.2×10^7 CFU/ml)보다 균수(6.5×10^7 CFU/ml)가 더 많이 증식되었다(Fig. 3). 이는 *B. polyfermenticus* SCD가 20여 종의 다양한 소화효소를 분비함으로 인한 여러 가지 탄소원들을 쉽게 이용할 수 있기 때문이라고 여겨진다. 이는 이 등이 보고한 실험에서도 동일한 결과를 보였다[19]. 이러한 현상은 유산균이 인공담즙산에 저해를 받는 것에 비해 *B. polyfermenticus* SCD의 큰 장점이라 판단된다. 따라서 인공위액을 통과한 *B. polyfermenticus* SCD는 인공담즙산에 대하여 내성을 보일 뿐만 아니라 오히려 증식됨으로서 목적부위인 장에 도달하여 생균제로서의 역할을 충분히 수행할 수 있을 것이다.

항생제에 대한 내성

생균제의 항생제 내성을 검토하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 생균제의 선택에 도움이 될 수 있고, 그 생균제의 미생물학적인 특성을 밝히는 것이다. 생균제는 여러 가지 항생제에 대해서 내성을 가지고 있으나, 이러한 내성은 전이되지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 생균제의 고유 항생제 내성을 특별히 안전성과 관련되어 생각하지는 않는다.

B. polyfermenticus SCD와 다른 생균제들은 roxythromycin의 경우 2 µg/ml 이상의 농도에서 생육저해를 받는 감수성을 나타내었으며, *B. polyfermenticus* SCD의 경우 streptomycin과 rifampicin, nystatin, ampicilin은 128 µg/ml 이상의 농도에서도 저해를 받지 않는 내성을 나타내었으며, chlorotetracycline은 16 µg/ml 이상에서 생육저해를 보이는 내성을 나타내었다. 이는 다른 *Bacillus* sp.들도 비슷한 양상을 나타내었다. 유산균들의 경우 streptomycin과 nystatin에 대해 128 µg/ml 이상의 농도에서도 저해를 받지 않는 내성을 나타내었으나 다른 항생제에 대한 내성은 *Bacillus* sp.들 보다는 비교적 낮은 항생제 내성을 나타내었다(Table 3). *B. polyfermenticus* SCD와 같이 항생제에 대해 내성을 가지는 생균제를 여러 가지 항생물질과 병용투여 시 균교대증을 예방하여 치료효

Table 3. Comparison of minimal inhibitory concentration (MIC) of *B. polyfermenticus* SCD strain to other commercial beneficial bacteria against antimicrobial agent.

Antimicrobial agent	Strain	<i>B. polyfermenticus</i> SCD	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>St. faecalis</i>
Streptomycin		> 128	64	64	> 128	> 128	> 128	> 128
Rifampicin		> 128	> 128	> 128	N.C*1	N.C	N.C	N.C
Chlorotetracycline		32	64	128	<1	<1	<1	<1
Clotrimazole		> 128	>128	>128	>128	>128	4	>128
Ampicillin		> 128	64	>128	8	8	<1	<1
Carbamazepine		8	8	<1	<1	4	<1	2
Chloramphenicol		64	16	16	16	<1	<1	2
Clotrimazole		4	4	4	N.C	N.C	N.C	N.C

*CCLS criteria: ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$: sensitivity, $\geq 4 \mu\text{g/mL}$: tolerance), N.C: Not checked.

과를 극대화시킬 수 있다.

비타민 분석

B. polyfermenticus SCD는 비타민 B₁과 B₂, K를 생산하는 것이 잘 알려져 있다. 이 실험에서 비스쿠트는 비타민 C를 농도(54.754 ppm)로 생산한다는 것이 확인되었다 (Table 4). 이는 비타민의 생산에 따른 영양공급과 비타민 C의 항산화작용에 의한 피부노화의 방지 및 항암작용 등의 효과를 기대할 수 있겠다. *B. polyfermenticus* SCD 배양상등액과 비타민 C 표준품으로 흡광도를 측정한 결과 같은 파장에서 최대흡광도를 나타내어 *B. polyfermenticus* SCD에 의한 비타민 C의 생산이 확인되었다(data not shown).

효소활성 측정

최근 유럽의 광우병 파동으로 인한 반추동물 유래의 의약품원료 및 식품원료의 안전성이 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 특히 소화제의 원료인 판크레아틴은 돼지의 췌장 등을 원료로 하기 때문에 향후 소화제의 시장은 판크레아틴을 대체할 수 있는 의약품 원료가 시급하다 할 수 있다. 일본에서는 *B. polyfermenticus* SCD를 당화균이라 하여 그 소화력은 이미 잘 알려져 있다. *B. polyfermenticus* SCD는 20여 종의 소화효소를 분비하여 인체로 섭취된 음식물의 완전한 소화를 돕는다. *B. subtilis* KCTC1021과 소화력을 비교한 결과 지방소화력은 비슷한 결과를 나타내었으나, 전분소화력의 경우 약 2배, 단백소화력의 경우 약 25배 정도의 높은 소화력

Table 4. Analysis of Vitamins in cell-free culture supernatant by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

No.	RT	Area	Conc.	비고
1	1.71	144131	9.571	Vit B1
2	2.02	288497	19.158	Vit B2
3	2.27	248731	16.517	Unknown
4	2.59	824541	54.754	Vit C

을 나타내었다. 이는 *B. polyfermenticus* SCD를 섭취했을 때 소화제로서의 활성도 매우 크다고 할 수 있겠다(Fig. 4).

***B. polyfermenticus* SCD의 안정성 시험**

인산으로 pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5로 각각 조절한 인산염완충액에서 *B. polyfermenticus* SCD의 pH 안정성을 확인한 결과, pH 4.5를 제외한 실험군에서 초기 1일 동안은 안정성이 감소하였다가 2일 이후부터 증식하는 양상을 나타내었다(Fig. 5). 이는 일반 균들에서도 나타나는 현상으로서 유도기를 거쳐 대수증식기로 접어들면서 일어나는 전형적인 현상으로 보인다. pH 3.5의 배양액을 5°C, 실온(25°C), 40°C에 각각 보관하여 안정성을 확인한 결과, 5°C와 실온의 경우에는 매우 안정하였으나, 가혹조건(40°C, RH 70%)에서는 6일째에 26.8%로서 다소 낮은 안정성을 나타내었다(Fig. 6).

또한 물과 5% glucose, 그리고 NaCl의 각 농도별(0.9, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0% w/v)에서의 안정성을 확인한 결과 매우 높은 안정성을 나타내었다(Fig. 7).

이상의 결과에서 *B. polyfermenticus* SCD의 식품을 포함

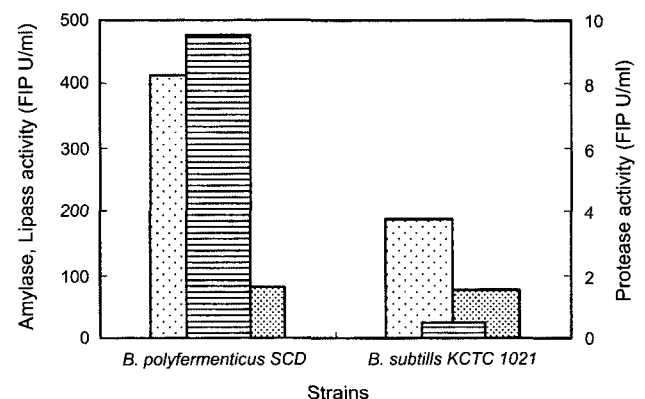


Fig. 4. Comparison of digestive power of *B. polyfermenticus* SCD strain and *B. subtilis* KCTC 1021. ■ α-Amylase, ■ lipase, ▨ protease.

한 다양한 형태의 제품 등에 적용했을 때 안정성이 탁월하여 그 응용 가능성이 매우 넓다고 할 수 있겠다.

장내미생물의 변화

복용 1 주일 후 *B. polyfermenticus* SCD는 4.0×10^5 CFU/

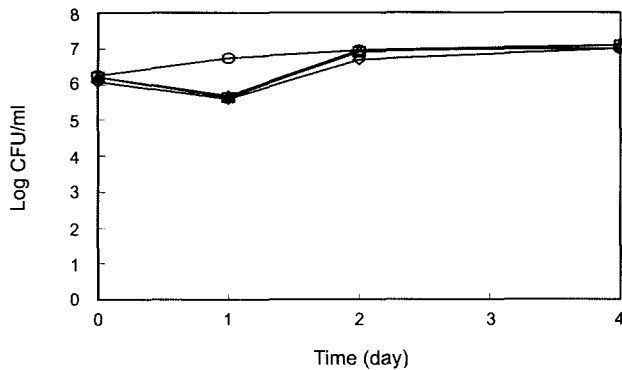


Fig. 5. pH-Dependent growth profiles of *B. polyfermenticus* SCD strain in phosphate buffers wide-range pH. ◇—pH 3.0, □—pH 3.5, △—pH 4.0, ○—pH 4.5.

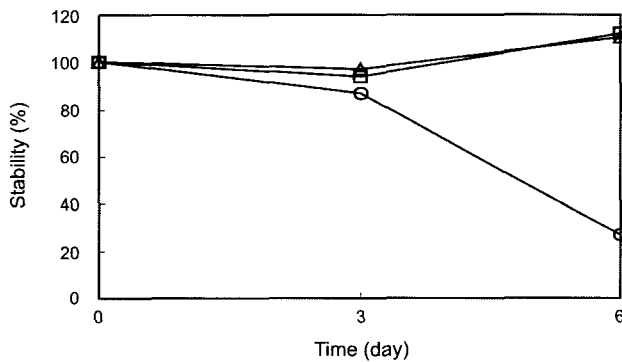


Fig. 6. Stability of *B. polyfermenticus* SCD strain against storage temperature in phosphate buffer (pH 3.5). △—5°C, □—25°C, ○—40°C, RH 70%.

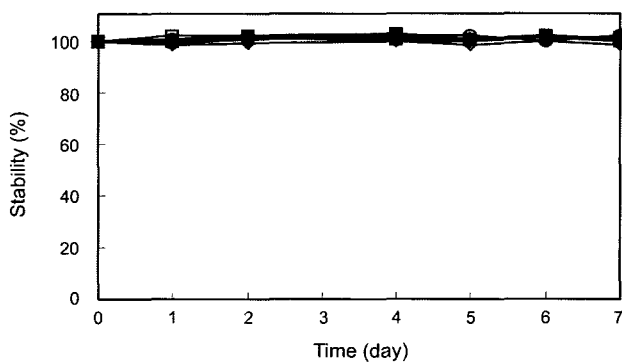


Fig. 7. Stability of *B. polyfermenticus* SCD strain against water, glucose and various concentrations of sodium chloride. ◆—Water, ■—5% Glucose, ▲—0.9% NaCl, ●—5.0% NaCl, ◇—10.0% NaCl, ○—15.0% NaCl, □—20.0% NaCl.

g의 균수가 검출되었다. 이는 *B. polyfermenticus* SCD의 장내 환경에서의 여러 효소에 대한 안정성과 활성아포의 발아에 기인한 장내점착성 및 장내균총의 정상화에 우수한 특성을 나타내는 결과라 하겠다. 실험대상자들의 장내 호기적 총생균수는 복용 기간 중 감소하는 경향을 보였으며, 혐기적 총생균수의 경우 증가하는 경향을 보였다. *Salmonella*와 *E. coli*, *Staphylococcus*는 *B. polyfermenticus* SCD를 복용하는 기간 동안 확실한 감소효과를 나타내었으며, *Enterococcus*는 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 8). *B. polyfermenticus* SCD의 장내 유익균과의 공생작용과 유익균 생육촉진효과에 의해 *Lactobacillus*의 균체수가 증가하였다(data not shown).

장내 암모니아의 변화

암모니아는 장내세균이 지니고 있는 urease, deaminase 등에 의하여 장내의 요소와 아미노산으로부터 생성된다. 탈아미노효소를 지닌 장내균으로는 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Proteus*와 *Staphylococcus* 등이 있다. 요소로부터 암모니아를 생성하는 장내균은 *Pseudomonas aeruginosa* 등과 같은 호기성세균과 많은 혐기성 세균들이 urease를 함유하고 있다. 암모니아 정량용 kit(Aquaquant 1.14423, Merck Co., Germany)를 사용하여 장내 암모니아의 변화를 관찰하였는데, 유의성 있는 감소효과를 보였으며(Fig. 9), 이는 탈

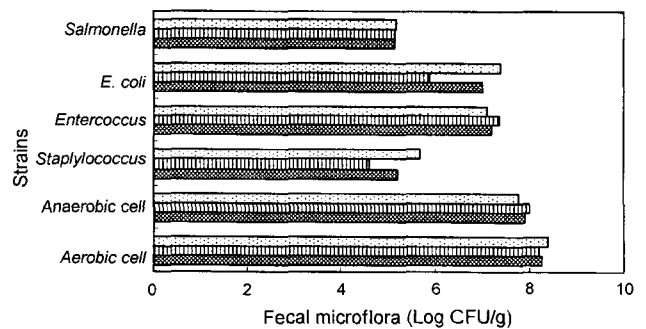


Fig. 8. Effect of the administration of *B. polyfermenticus* SCD strain on fecal microflora. □—before intake, ▨—during intake, ▩—after intake.

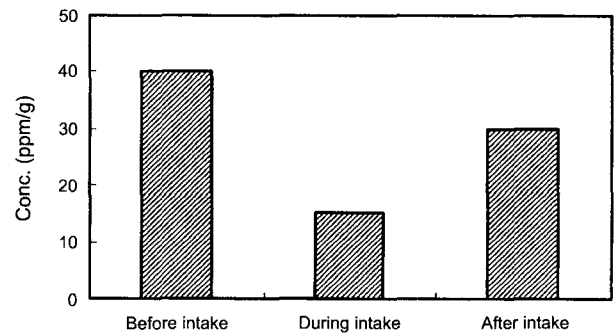


Fig. 9. Effects of the administration of *B. polyfermenticus* SCD strain on the fecal putrefactive metabolites of volunteers.

아미노기 효소를 생산하는 *E. coli*, *Salmonella* 및 *Staphylococcus* 등 장내부패산물 생성 균총들의 저해에 의한 영향으로 보이며, 우수 생균제의 복용 시 장내균총의 개선의 변화에 따른 부패산물 생성의 감소로 보인다.

요 약

B. polyfermenticus SCD와 상업적으로 사용되는 생균제들의 pH 2.0, 3.0에서 내산성을 비교한 결과, 2시간에서의 생존율은 pH 2.0, 3.0에서 각각 85.6과 92.6%의 생존율을 나타내었으며 4시간에서도 각각 62.8%와 81.2%의 높은 생존율을 나타내었다. *B. polyfermenticus* SCD의 인공담즙산에 대한 내성을 확인한 결과, 인공담즙산이 함유되지 않은 대조구(3.2×10^7 CFU/ml)보다 균수(6.5×10^7 CFU/ml)가 더 많이 증식되었다. 또한 *B. polyfermenticus* SCD는 비타민 B₁, B₂를 생산하고 장내유해균에 의한 비타민 B군의 분해를 억제하여 영양을 공급한다. 게다가 비타민 C를 다량 생산하여 공급하므로 비타민 C의 항산화작용에 의한 피부노화 방지 및 항암작용 등의 여러 가지 효능들도 기대할 수 있다. *B. polyfermenticus* SCD의 소화력을 다른 *Bacillus* sp.과 비교했을 때 지방소화력은 비슷한 활성을 나타내었으나, 전분 소화력은 약 2배, 단백소화력은 약 25배의 높은 소화력을 가지고 있었다. *B. polyfermenticus* SCD는 낮은 pH에서도 안정성이 확보되었으며 저장온도는 가혹조건(40°C, RH 70%)에서 26.8%의 비교적 낮은 안정성을 나타내었을 뿐 저온 및 실온에서는 매우 안정하였다. 그리고 수중에서와 5% glucose 용액, 고농도의 NaCl 에서도 매우 높은 안정성을 나타내어 식품을 포함한 다양한 형태의 제품에 적용했을 때에도 그 안정성이 탁월하여 응용성이 크다고 할 수 있겠다. *B. polyfermenticus* SCD 복용에 따른 장내균총의 변화에서는 *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus* 등 유해균의 유의성 있는 감소효과를 나타내었으며, 유익균과의 공생작용과 유익균에 대한 생육촉진작용을 나타내었다. 장내 암모니아의 변화에서는 복용 중에 유의성 있는 감소효과를 보였다.

이상의 결과로서 *B. polyfermenticus* SCD의 생균제로서의 특성은 기능성 식품의 개발 등 산업적으로 매우 유용하다고 판단된다.

감사의 말

본 연구는 (주)바이넥스 중앙연구소 일반과제 연구비로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Berg, R. D. 1998. Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends in Microbiol.* 6: 89-92.
- Berrada, N., J. F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409-413.
- Campbell, G. L. and M. R. Bedford. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 449-466.
- Chang, Y.-H., J.-K. Kim, J.-H. Yoon, W.-Y. Kim, Y.-W. Choi, W.-J. Lee, Y.-B. Kim, and Y.-H. Park. 1999. Characteristics of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 isolated from swine intestine. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 23-27.
- Cho, M.-K., K. Kim, C.-H. Kim, T.-K. Lee, and K.-Y. Kim. 2000. Isolation and characterization of *Lactobacillus fermentum* YL-3 as a poultry probiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 279-284.
- Conway, P., L. Gorbach, and B. R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12.
- Finegold, S. M. 1970. The significance of the intestinal microflora. *Del. Med. J.* 42: 341-345.
- Gosek, G., D. Leschinsky, and S. Irons. 1996. Multidrug resistant *Salmonella* serotype. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46: 308-310.
- Greene, W. A., A. M. Gano, K. L. Smith, J. S. Hogan, and D. A. Todhunter. 1991. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with evaluated somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 74: 2976-2981.
- Hogue, A., J. Akkina, and F. Angulo. 1997. *Salmonella typhimurium* DT104. *Situation Assessment. USA*, Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.
- Jun, K.-D. 1998. Microbiological identification, antimicrobial activity and enhanced production of Bisroot strain. *MS thesis*, Kyungnam University.
- Khedkar, C. D., J. M. Mantri, and S. A. Kulkarni. 1989. Therapeutic properties of acidophilus milk. *Indian Dairyman.* 41: 562-565.
- Kim, G.-B., J.-H. Lee, K.-S. Lim, C.-S. Huh, H.-S. Bae, Y.-J. Baek, and H.-U. Kim. 1999. Bile salt deconjugation activity of *Lactobacillus* strain isolated from yogurt products. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 385-390.
- Ko, Y.-H., T.-K. Oh, Y.-H. Park, Y.-S. Kim, D.-Y. Yoo, and K.-H. Cho. 1991. *Lactobacillus* sp. KCTC 8458BP and its application. *Kor. Patent Publ.* No. 91004366: 187-195.
- Ko, Y.-H., T.-K. Oh, Y.-H. Park, Y.-S. Kim, D.-Y. Yoo, and K.-H. Cho. 1991. New *Lactobacillus* sp. TSC-66 with acid and bile tolerance. *Kor. Patent Publ.* No. 91007817:229-236.
- Koo, S.-M., Y.-H. Cho, C.-S. Huh, Y.-J. Baek, and J.-Y. Park. 2001. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 376-383.
- Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M. L. Grayson. 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acid and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 475-479.
- Park, C.-J., J.-S. Pyeon, Y.-K. Cho, S.-S. Hong, and H.-S. Lee. 1996. Characteristics of *Enterococcus* sp. isolated from

- animal intestine and powder. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 393-398.
19. Park, H.-S., S.-H. Lee, and T.-B. Uhm. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 433-440.
 20. Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, and N. Gobbato. 1996. Symposium: Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J. Dairy Sci.* **78**: 1597-1606.
 21. Shahani, K.M. and A. D. Ayobo. 1980. Role of dietary *Lactobacilli* in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 2448-2457.
 22. Shin, M.-S., H.-M. Kim, G.-T. Kim, C.-S. Huh, H.-S. Bae, and Y.-J. Baek. 1999. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 495-501.
 23. Snyder, L. and W. Champness. 1997. Molecular Genetics of Bacteria. *Am. Soc. Microbiol.* 7-10.
 24. Watkins, B. A. and B. F. Miller. 1983. Competitive gut exclusion of Avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.* **62**: 1772-1779.
 25. Yang, S.-J., J.-W. Yoon, K.-S. Seo, H.-C. Koo, S.-H. Kim, H.-S. Bae, and Y.-J. Baek. 1999. Prophylactic effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 enteric infection and evaluation of vero cytotoxin neutralizing effects. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 419-425.

(Received Apr. 20, 2002/Accepted Oct. 30, 2002)