

## *Bacillus polyfermenticus* SCD의 Three Layer Coating에 의한 pH, 열, 높은 Glucose 농도에 대한 안정성효과

이진옥 · <sup>1</sup>전경동 · <sup>1</sup>강재선 · †이재화  
신라대학교 공과대학 생명공학과, <sup>1</sup>(주)바이넥스 중앙연구소  
(접수 : 2004. 3. 12., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

## Increased Stability of *Bacillus polyfermenticus* SCD in Low pH, High Temperature and High Glucose Concentration via Three Layer Coating

Jin-Ok Lee, Kyoung-Dong Jun<sup>1</sup>, Jae-Seon Kang<sup>1</sup>, and Jae-Hwa Lee†

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Pusan 617-736, Korea

<sup>1</sup>Research and Development Center, Binex Co. Ltd., Pusan 604-846, Korea

(Received : 2004. 3. 12., Accepted : 2004. 6. 24.)

*Bacillus polyfermenticus* SCD derived from *Bacillus* sp., which is commonly called as Bisroot<sup>®</sup>. The goal of this study, is to increase stability of *Bacillus polyfermenticus* SCD in low pH, high temperature and high glucose concentration via three layer coating. The viability of coated *Bacillus polyfermenticus* SCD increased to 30%, 20%, 14% in the condition of pH 2, 4, 6 than that of uncoated *Bacillus polyfermenticus* SCD at 37°C for 4 h. Final viability of the coated *Bacillus polyfermenticus* SCD in 80°C increased to 40% than that of uncoated *Bacillus polyfermenticus* SCD. In high glucose concentration, coated *Bacillus polyfermenticus* SCD is more stable than uncoated about 50%. In conclusion, the three layer coated *Bacillus polyfermenticus* SCD is very stable for low pH, high temperature and high glucose concentration.

**Key Words :** *Bacillus polyfermenticus* SCD, probiotic, three layer coating, stabilization

### 서론

항생물질에 대한 내성균의 출현으로 항생제 대체 방법에 있어서 생균제 (probiotics)의 사용이 적극 권장되고 있다(1).

생균제 (probiotics)란, 항생물질 (antibiotics)에 대비되는 말로써 살아있는 미생물 균체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료를 통해 신체기능 개선을 목적으로 생산된 제품을 말한다(2). 이런 생균제는 기술적인 측면에서 관능적 특성이나 안정성(3), bacteriophage 저항성, 제조 과정 중의 생존성이 우수해야 하며, 기능적인 측면으로는 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능 그리고 antigenotoxic에 있어 우수성이 있어야 한다(4, 5, 6). 특히 장내 생존력이 우수해야 상업적으로 이용가치가 증대된다(7). 대표적인 주요 생균 미생물은 유산균 (*Lactobacillus*), 유산

구균 (*Streptococcus*), 비피더스균, 호기성아포균 (*Bacillus*), 혐기성아포균 (*Clostridium*), 효모 (*Yeast, Saccharomyces*) 등이 있다(8, 9). 이 중 *Bacillus* 속 균주들은 무독성 항균물질이나 살충물질 등을 포함한 여러 유용한 물질들을 생산하는 것으로 알려져 있다(10, 11). 특히 생균제에 사용되는 미생물 중 젖산균은 장내 유해미생물의 억제, 장 이상발효나 설사의 방지, 가축 성장의 촉진, 사료 이용률 증대 등에 효과적이기 때문에 산업적으로 큰 관심의 대상이다(12).

최근 산업적으로 이용가치가 우수하며, 식품용 생균제로서 주목받고 있는 *Bacillus polyfermenticus* SCD는 일반적으로 Bisroot<sup>®</sup>라고도 불린다. 이 균의 장점은 아포를 형성하고 있어, 여타 생균 미생물에 비해 장에 도달할 때까지 활성을 대부분 유지할 수 있어서 장질환의 치료에 탁월한 효과를 보이고 있다. 그리고 인공위액에 대한 내성이나 인공담즙산에 대한 내성, 효소 활성, 항생물질에 대한 내성, 알콜에 대한 내성, 병원성 세균에 대한 항균기작 등이 비교적 뛰어난 생균제이다(13). 그러나 섭취된 생균제가 장에 도달하기 위해 위를 거쳐 췌장과 십이지장을 통과하게 된다. 이때 가장 중요한 점은 분비되는 위산에 견뎌야 하는데, 이미 알려진 연구에 의하면 *Bacillus polyfermenticus* SCD는 인공위액 (pH 2)

† Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Pusan 617-736, Korea  
Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636  
E-mail : jhalee@silla.ac.kr

에서 시간이 경과함에 따라 생존율이 급격히 감소하는 결과가 보고 되었다(4). 이점을 보완하기 위한 다양한 연구가 진행 중에 있다.

본 연구에서는 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 three layer coating하여 인공위액의 pH 농도에서의 안정성을 검토함과 동시에 산업적인 생균제로 이용하기 위해 고온에서의 안정성, glucose 농도 변화에 대한 안정성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 *Bacillus polyfermenticus* SCD균은 (주)바이넥스에서 분양 받아 3~4회 걸친 계대배양으로 활성화하였으며, glycerol stock법으로 -80℃에서 보존하였고, 한달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다. 배양배지는 agar와 TSB 배지가 들어있는 고체배지를 사용하였고, 300 ml Erlenmeyer flask를 이용하여 0.2% potassium phosphate 100 ml씩 분주하여 사용하였다. 그리고 배양온도는 37℃에서 24시간 배양한 것을 측정하였다.

### 균수의 측정

총균수는 배양액을 0.2% potassium phosphate로 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말한다. 그리고 최적온도인 37℃에서 배양하여 콜로니 형성단위(colony forming unit)를 측정한 후 총균수를 계산하였다.

### Three layer coating

Fig. 1에서는 3중 코팅한 것을 그림으로 모식화한 것이다. *Bacillus polyfermenticus* SCD를 코팅하기 위해 ascorbate 1.5%, lactose 2.5%, tween 80 0.2%를 첨가한 용액에 *Bacillus polyfermenticus* SCD 원분말과 혼합한 후 2% sodium alginate solution과 다시 혼합한다. 이후 0.1 M calcium chloride solution을 spray gun으로 분무하여 원심분리한다. 그리고 1% chitosan solution을 섞어 원심분리하여 동결건조한다. 건조후 250 mesh에 거른 후 HPMC-P (Hydroxy propyl methyl cellulose-phthalate) solution과 혼합한 뒤 자연건조시켰다.

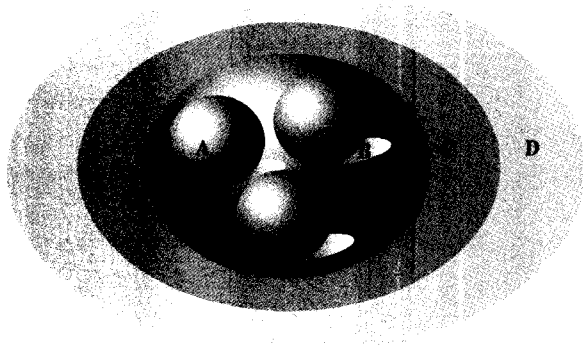


Figure 1. Three layer coating of *Bacillus polyfermenticus* SCD.

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| A: <i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD | B: Alginate-Calcium coating |
| C: Soluble Chitosan coating            | D: HPMCP coating            |

### 인공위액에 대한 내성

인공위액은 1N HCl을 사용하여 pH 2, 4, 6로 조절한 0.2% potassium phosphate를 멸균하여 사용하였다. 인공위액에 대한 내성을 실험하기 위해 코팅된 *Bacillus polyfermenticus* SCD와 코팅되지 않은 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 0.1 g 각각 취하여 멸균된 인공위액에 접종하였다. 시료채취는 각각 0, 1, 2, 3, 4시간 배양한 것을 이용하여 1 ml을 회수한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하였다. 그리고 최적온도에서 배양하여 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정한 후 총균수를 계산하였다.

### 열안정성

코팅된 *Bacillus polyfermenticus* SCD와 코팅되지 않은 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 0.1 g 취하여 각각 멸균된 0.2% potassium phosphate 100 ml에 접종하였다. 온도변화는 80℃와 100℃로 배양하고, 각각 1 ml을 회수하여 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말한다. 그리고 37℃에서 배양하여 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정한 후 총균수를 계산하였다.

### Glucose 농도변화에 대한 안정성

Glucose의 농도는 2, 5, 30%로 하였고, 각각 pH 4.5, 7.0로 조절하였다. Alginate coating한 *Bacillus polyfermenticus* SCD와 코팅하지 않은 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 0.1 g씩 취하여 멸균된 glucose 용액에 접종하였다. 시료는 0, 4시간, 1 day, 2 day, 4 day, 8 day에 1 ml씩 채취한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하여 총생균수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 인공위액에 대한 내성

본 연구에서는 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 three layer coating한 것과 coating하지 않은 것을 대조군으로 하여 인공위액에서의 안정성 증대 효과를 관찰하였다. 분석 시간은 위에서 음식물이 머물러 있는 1~2시간과 소화되는 3~4시간을 선택했다. Fig. 1에서는 pH 2, 4, 6으로 변화시킨 후 코팅된 *B. polyfermenticus* SCD와 코팅되지 않은 *B. polyfermenticus* SCD를 0.1 g 접종하여 실험하였다. 그 결과 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD는 pH 2일 때 배양 1시간에서 80%의 생존율을 보였고, 2시간에서는 50%에도 미치지 못하는 생존율을 보였다. pH 4일 때도 pH 2일 때와 유사한 생존율을 보였지만, pH 6에서는 배양 2시간째 70% 이상의 생존율을 보였다. 다른 pH에 비해 pH 6에서 높은 생존율을 보인 이유는 대부분의 균체가 pH 5~6에서 안정하기 때문으로 사료된다. 하지만, 코팅된 *B. polyfermenticus* SCD는 pH 2일 때 배양 1시간에서 90%의 생존율을 보였고, 2시간에서는 80%에 육박하는 생존율을 보였다. pH 4일 때도 배양 2시간에서는 약 85%의 생존율을 보였고, pH 6에서는 배양 2시간째 90% 이상의 생존율을 보였다. 인공위액에서 코팅하지 않았을 때 보다 코팅했을 때 *B. polyfermenticus* SCD의 생존율을 비교해본 결과 배양 4시간을 기준으로 pH 2는 30%, pH 4는 20%, pH

7는 14% 상승효과가 있었음을 알 수 있었다.

**고온에서의 안정성**

멸균된 0.2% potassium phosphate 100 ml씩 만들어 코팅한 것과 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD 0.1 g 취하여 접종한다. 배양온도는 80℃와 100℃로 하고, 시료는 0-2시간동안 30분 간격으로 1 ml을 취하여 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하였다. 그 결과 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD의 배양온도 80℃에서는 배양 1시간째 42%의 생존율을 보였고 100℃에서는 콜로니 개수를 찾아볼 수 없었다. 그러나 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD의 배양온도 80℃에서는 배양 1시간째 85%의 생존율을 보였다. 그리고 배양온도 100℃에서는 콜로니 개수가 1~2개 정도 확인할 수 있었다. 결국 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD가 80℃에서 2시간 기준으로 안정성이 약 40% 증진됨을 확인할 수 있었다.

**Glucose 농도에 따른 안정성**

Glucose의 농도를 달리하여 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD와 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD의 안정성을 보았다. 농도변화는 2, 5, 30%로 하고, pH는 4.5, 7.0로 하였다. 그 결과 8시간을 기준으로 pH 4.5에서는 glucose 농도가 2%일 때 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD 생존율이 76%였고, 5%일 때 85%, 30%일 때 83%로 나타났다. 그러나 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD 생존율은 glucose 농도가 2%일 때 35%, 5%일 때 41%, 30%일 때 33%로 나타났다. 이 결과로 보아 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD는 코팅을 하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD보다 전체적으로 생존율이 40% 이상 증진됨을 알 수 있었다. 그리고 pH 7.0에서 glucose 농도가 2%일 때 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD 생존율이 92%였고, 5%일 때 95%, 30%일 때 95%로 나타났다. 그러나 코팅하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD 생존율은 glucose 농도가 2%일 때 50%, 5%일 때 58%, 30%일 때 46%로 나타났다. 이 결과

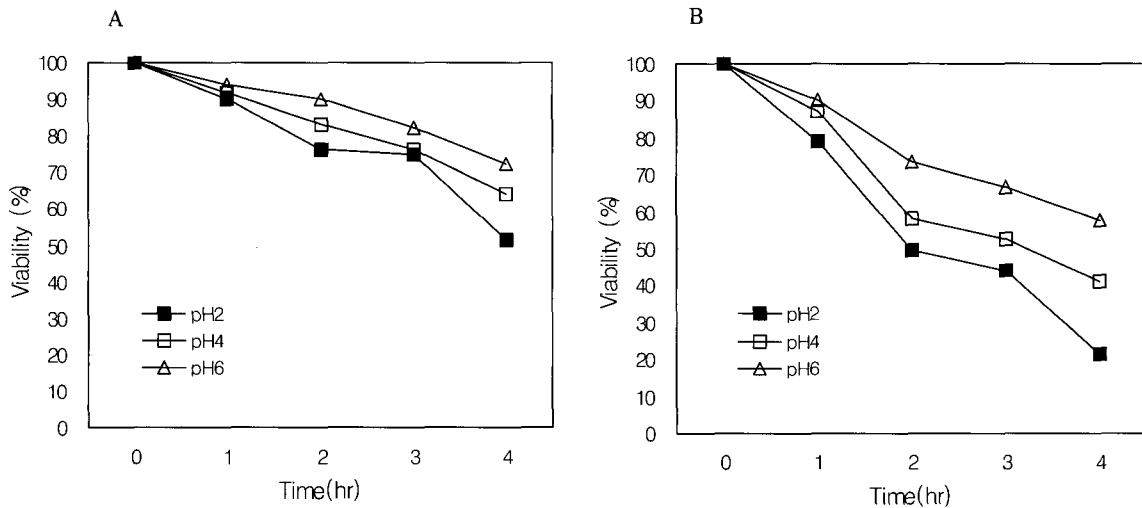


Figure 2. Effects of three layer coating on stability of *Bacillus polyfermenticus* SCD in various range of pH (A: Coating, B: Uncoating).

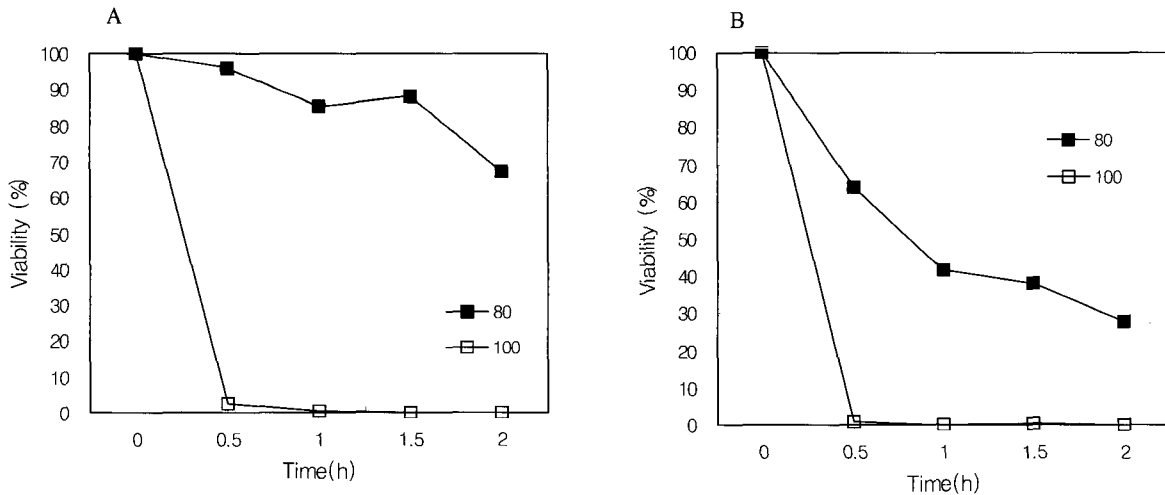
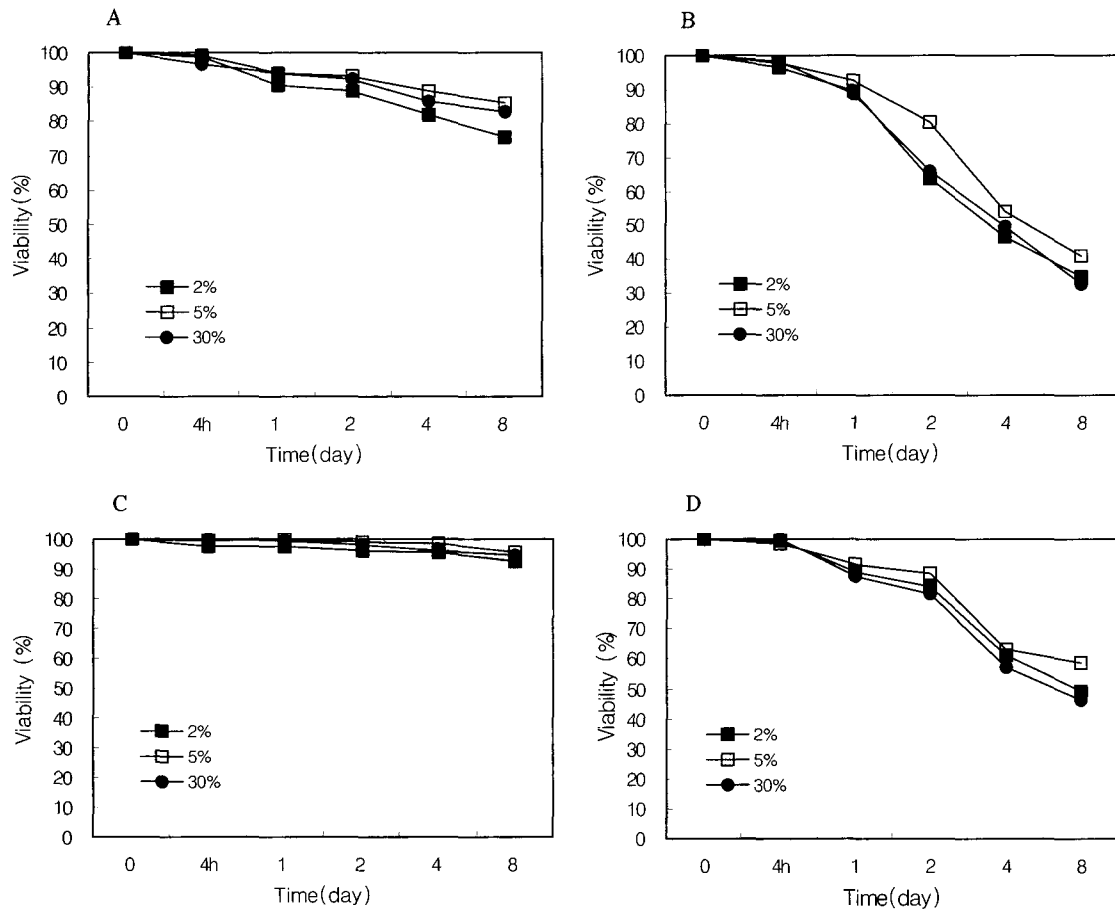


Figure 3. Effects of three layer coating on stability of *Bacillus polyfermenticus* SCD in various range of temperature (A: Coating, B: Uncoating).



**Figure 4.** Effects of three layer coating on stability of *Bacillus polyfermenticus* SCD in various range of Glucose concentration (A: Coating - pH 4.5, B: Uncoating - pH 4.5, C: Coating - pH 7.0, D: Uncoating - pH 7.0).

로 보아 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD는 코팅을 하지 않은 *B. polyfermenticus* SCD보다 전체적으로 생존율이 42% 이상 증진됨을 알 수 있었다.

### 요 약

*Bacillus* sp. 유래의 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 Bisroot<sup>®</sup>라고 부르고, 이것은 생균제로서 산업적으로 매우 유용하다. 본 연구에서는 *B. polyfermenticus* SCD를 산업적으로 활용성을 증대시키기 위해 three layer coating법을 사용하여 인공위액의 pH변화에 대한 안정성과 열안정성, glucose 농도에 따른 안정성을 연구하였다. 그 결과 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD가 인공위액에 대한 내성에서는 배양 4시간을 기준으로 pH 2는 30%, pH 4는 20%, pH 6은 14% 상승효과가 있었음을 알 수 있었고, 온도변화에 대한 안정성에서는 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD가 80℃에서 2시간 기준으로 안정성이 약 40% 증진됨을 확인할 수 있었다. 고농도 (30%)의 glucose에서 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD는 안정하였으며, 코팅하지 않은 것보다 약 50% 안정성이 증대됨을 확인할 수 있었다. 그리고 pH 4.0에서는 코팅한 *B. polyfermenticus* SCD는 코팅을 하지 않은 *B.*

*polyfermenticus* SCD보다 전체적으로 생존율이 40% 이상, pH 6.0에서는 생존율이 42% 이상 증진됨을 알 수 있었다.

### 감 사

본 연구는 2003년 중소기업 기술혁신 개발사업으로 수행되었으며, 이진옥은 부산광역시의 Brain Busan 21 사업에서 인건비 지원을 받아 수행되어 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Snyder, and W. Champness (1997), Molecular Genetics of Bacteria, *Am. Soc. Microbiol.* 7-10.
2. Jun, K. D., H. J. Kim, K. H. Lee, H. D. Paik, J. S. Kang (2002), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a Probiotic, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 359-366.
3. Khedkar, C. D., J. M. Mantri, and S. A. Kulkarni (1989), Therapeutic properties of acidophilus milk, *Indian Dairyman* **41**, 562-565.
4. 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.
5. Campbell, G. L. and M. R. Bedford (1992), Enzyme applications

- for monogastric feeds. *A review. Can. J. Anim. Sci.* **72**, 449-466.
6. Fuller, R. (1989), Probiotics in man and animals, *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
  7. Jun, K. D. (1998), Microbiological Identification, Antimicrobial Activity and Enhanced Production of Bisroot Strain, M. S. Thesis, Kyungnam University.
  8. Ko, Y. H., T. K. Oh, Y. H. Park, Y. S. Kim, D. Y. Yoo, and K. H. Cho (1991), *Lactobacillus* sp. KCTC 8458 BP and its application, *Kor. Patent Publ. No. 91004344*, 187-195.
  9. Pearson, D. and O. P. Ward (1988), Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protin crystal endotoxin, *Biotechnol. Lett.* **10**, 451-456.
  10. Paik, H. D., N. K. Lee, K. H. Lee, Y. L. Hwang, and J. C. Pan (2000), Identification and partial characterization of cerein BS229, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* BS229, *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 195-200.
  11. Chang, Y. H., J. K. Kim, J. H. Yoon, and W. Y. Park (1999), Characteristics of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 isolated from swine intestine, *Kor. J. Microbiol.* **27**, 23-27.
  12. Finegold, S. M. (1970), The significance of the intestinal microflora, *Del. Med. J.* **42**, 341-345.
  13. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim (2001), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders, *Korean. J. Food Sci. Technol.* **34**, 73-78.