Microbiol. Biotechnol. Lett. (2015), 43(4), 401–404
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1511.11014
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

볏짚으로부터의 *Bacillus coagulans* 빠른 분리법

이빛나라[1], 이현동[1], 정도원[2], 이종훈[1]*
[1]경기대학교 식품생물공학과
[2]신안산대학교 식품생명과학과

Received: November 26, 2015 / Revised: December 10, 2015 / Accepted: December 11, 2015

A Rapid Isolation Method for *Bacillus coagulans* from Rice Straw

Bitnara Lee[1], Hyundong Lee[1], Do-Won Jeong[2], and Jong-Hoon Lee[1]*
[1]*Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, Shinansan University, Ansan 425-792, Republic of Korea*

Bacillus coagulans has been considered to be a prominent candidate for probiotics as well as a thermotolerant biomaterial producer. However, the species has not attracted the attention of Korean researchers, nor has it been commercialized in Korea. Therefore, isolates for functional studies are not readily available. To secure *B. coagulans* resources for future applications, we developed a rapid isolation method for the species from rice straw. Introduction of the enrichment culture at 50°C, the selection of acid producers with $CaCO_3$ supplemented medium, and the elimination of enterococci by selective medium, rendered the successful and rapid isolation of *B. coagulans* strains.

Keywords: *Bacillus coagulans*, rapid isolation, rice straw, thermotolerance

프로바이오틱스(probiotics)는 숙주의 건강에 유익한 효과를 부여하는 살아있는 생명체(세균 또는 효모)를 의미한다[1]. 우리나라 건강기능식품법에서는 프로바이오틱스가 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균으로 정의되어 있고, 2015년 현재 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* 속의 유산균이 건강기능식품의 소재로 허가되어 있다(http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/). 정장작용뿐만 아니라 *Helicobacter pylori* 감염 예방, 면역활성 증강 등의 다양한 건강기능성이 지속적으로 보고되고 있는 *Lactobacillus* 속 유산균이 주요 프로바이오틱스 소재로 상용화되고 있지만, 섭취 후의 위산 및 담즙산에 의한 생존율 저하와 제조 및 유통과정에서의 생존율 저하에 대한 문제점 해결이 숙제로 남아 있다[13].

한편, 프로바이오틱스로 상품화된 역사는 *Lactobacillus* 속에 비하여 길지 않지만 *Bacillus* 속은 *Lactobacillus* 속이 가지고 있는 생존율 및 유통기한 측면의 문제점을 포자 형성을 통하여 해결할 수 있는 장점을 가지고 있다[2, 12]. 따라서 포자 형태의 *Bacillus* 프로바이오틱스는 실온에서의 유통기한을 정할 필요가 없으며, 섭취한 포자가 모두 소장에 도달할 수 있다[5]. 이러한 장점을 배경으로 *Bacillus* 프로바이오틱스는 인간의 식이보조제(dietary supplements) 뿐만 아니라 축산 및 수산 양식 사료의 생장 촉진제 및 질병 예방제로 사용되고 있고, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* 등의 균주가 프로바이오틱스로 제품화되었다[5]. 이들 *Bacillus* 속 중에서 *B. coagulans*는 이미 2 균주의 포자가 미국 food and drug administration(FDA; http://www.fda.gov/)의 generally recognized as safe(GRAS) 규격으로 인정되어 있어 프로바이오틱스로 개발될 수 있는 가능성이 높은 *Bacillus* 종(species)으로 평가된다.

*B. coagulans*는 포자 형성뿐만 아니라 유산(lactic acid)을 생산하는 *Bacillus*와 *Lactobacillus* 속의 특성을 모두 가지고 있어 Bergey's Manual 5판[3]에서는 *Lactobacillus sporogenes*로 명명되기도 하였지만, 미생물의 동정에 분자생물학적 방법론이 도입되면서 Bergey's Manual 7판[4]에서 *B. coagulans*로 변경되었다. 이 bacteria는 Gram 양성의 통성혐기성 간균으로 30°C에서 55°C 범위에서 생육하고, 최

*Corresponding author
Tel: +82-31-249-9656, Fax: +82-31-253-1165
E-mail: jhl@kgu.ac.kr
© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

적 생육온도는 50°C이다[6]. *B. coagulans*는 건강기능성 측면뿐만 아니라 L형-유산, 내열성 효소, 항균성 펩타이드 coagulin의 생산 균주로도 주목을 끌고 있으며, 이러한 생물소재의 생산이 고온에서 가능하기 때문에 오염문제를 최소화 할 수 있는 추가적 장점을 가지고 있다[11].

건강기능식품 소재로서뿐만 아니라 고부가가치 생물소재 생산 측면에서 *B. coagulans*의 높은 미래가치가 지속적으로 보고되고 있음에도 불구하고, 우리나라 연구자들에게는 관심의 대상이 되지 못하고 있다. *B. coagulans*의 산업적 활용에 앞서 기능연구를 통한 우수 균주의 선발이 필요하지만, 국내에서는 연구대상 균주가 충분히 확보되지 않은 상태에 있다. 본 연구자들은 국내 *B. coagulans* 균주 자원의 확보를 위한 균주 분리 과정에서 개발한 빠른 분리법을 보고한다.

토양미생물로 분류되는 *B. coagulans*는 육탄당뿐만 아니라 xylose와 같은 오탄당을 탄소원으로 이용하는 능력을 가지고 있어 lignocellulose를 함유하고 있는 식물성 소재로부터 L형-유산을 생산하기 위하여 많이 분리되었으며[14, 15], 쌀겨의 우점종으로 분리된 바 있다[10]. 본 연구에서는 우리

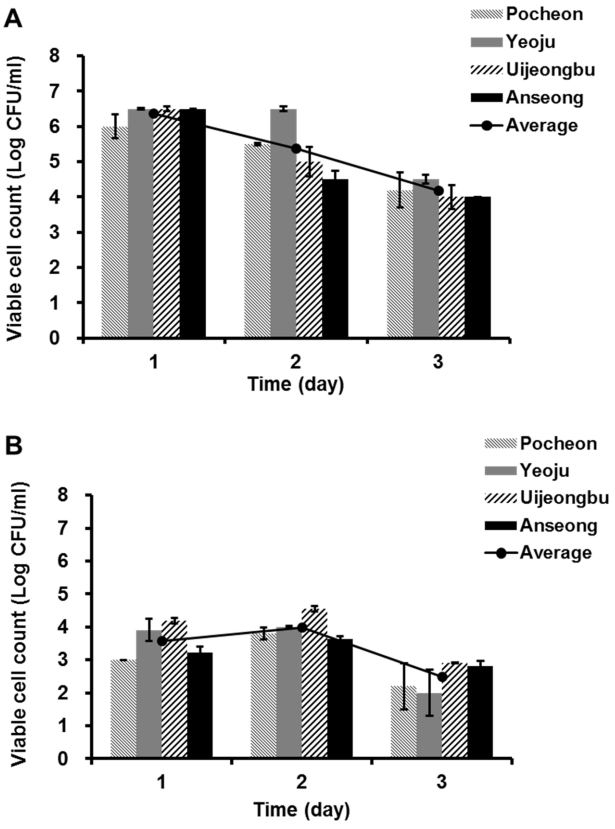

Fig. 1. Effects of enrichment cultures at 50°C (A) and 55°C (B). Rice straw samples for *B. coagulans* isolation were collected from four different locations. MRS broth was used for enrichment cultures and cell counting was conducted at least three times on separate platings.

나라 도처에서 쉽게 구할 수 있으며, 높은 확률의 *B. coagulans* 분리가 예상되는 볏짚을 분리원으로 선택하였고, 볏짚은 경기도 일대의 안성, 여주, 의정부, 포천의 농가에서 수집하였다. 약 2 cm 크기로 자른 볏짚 10 g을 항진균제 cycloheximide (Sigma, USA)를 100 mg/l의 농도로 첨가한 멸균 MRS broth (Difco, USA) 100 ml에 접종한 다음, *B. coagulans*의 최적 및 한계 생육온도로 알려진 50°C 및 55°C에서 3일간 배양하면서 24시간 단위로 생균수를 측정하였다(Fig. 1)[9]. 생균수 측정에는 plate count agar(PCA; Difco)를 사용하였고, 37°C에서 배양하였다. 다양한 환경에서 높은 생장을 보이는 *Bacillus* 속 bacteria의 생장을 최소화 하기 위하여 집적배양 단계에서는 유산균의 배양에 주로 사용하는 MRS broth를 사용하였고, 가능한 많은 종류의 bacteria의 검출을 위하여 생균수 측정 단계에서는 일반세균 검출에 사용하는 PCA를 사용하였다. 50°C 배양에서는 24시간 후에 평균 10^6 CFU/ml 수준의 생균수가 검출되었고, 3일 후에는 모든 시료의 생균수가 평균 10^4 CFU/ml 수준으로 감소하였다. 55°C 배양에서는 24시간 후에 10^4 CFU/ml 수준의 생균수가 검출되었고, 2일차에 약간 증가하였다가 3일 후에는 10^3 CFU/ml 수준까지 감소하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 55°C 집적배양을 통하여 10^4 CFU/ml 정도의 균수 확보가 가능한 것으로 나타났지만, 가능한 충분한 균수의 확보를 위하여 50°C에서 3일간 집적배양한 배양액을 십진희석하여 PCA에 도말하고, 50°C에서 72시간 배양하였다. PCA에서 생장한 콜로니의 다양성을 고려하여 각 시료당 30 균주를 순수분리하여 보존하였고, 각 시료로부터 순수분리한 균주들 중, 3 균주씩을 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의해 계통발생학적으로 동정하였다. 분리된 균주의 16S rRNA 유전자 증폭은 colony PCR을 이용하여 수행하였고 primer는 eubacterial universal primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다[8]. PCR은 T professional TRIO thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였고, 50 µl 반응계에는 소량의 colony, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase(Inclone biotech, Korea), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 94°C에서 1분간 변성, 52°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 중합반응의 과정을 30회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit(RBC Bioscience, Taiwan)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(Genotech, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고, 염기서열 결정을 위한 primer는 16S rRNA 유전자 증폭에 사용하였던 27F와 1492R을 사용하였다. 결정된 염기서열은 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide BLAST를 통해 상동성을 분석하였고, 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열과

가장 높은 상동성을 나타내는 표준균주(type strain)를 포함하는 분류학적 단위를 해당 균주의 종(species)으로 결정하였다. 4개 시료로부터 순수분리한 총 12 균주의 동정 결과, *B. coagulans*는 5 균주가 분리되었고, *Enterococcus faecalis* 2 균주, *Enterococcus faecium* 2 균주, *B. licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*가 각각 1 균주씩 분리되었다.

Bacillus 속 bacteria에는 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성이 99% 이상인 계통발생학적 근연종이 존재하는 경우가 있어, 동정의 신뢰성 확보를 위하여 근연종과의 16S rRNA 유전자 상동성을 분석하였다. *B. coagulans* C4는 근연종 *Bacillus smithii* PR3와 95%, *Bacillus jeotgali* BVC61와 94% 수준의 상동성을 나타내었고, 발효식품에서 자주 검출되는 다른 *Bacillus* 속 bacteria와도 93% 수준의 상동성을 나타내었다. *B. coagulans* 균주 및 근연종의 16S rRNA 유전자를 ClustalW multiple sequence alignment program을 이용하여 나열한 결과, *B. coagulans* C4의 염기서열 기준으로 59–89 bp 구간 및 180–214 bp 구간에서 확연히 구분되는 두 곳의 변이영역(variable region)의 존재가 확인되었다(Fig. 2). 따라서 16S rRNA 염기서열 분석은 *B. coagulans*의 근연종과의 구분에 충분한 효용성이 있는 것으로 확인되었다.

50°C 집적배양의 결과, *B. coagulans*와 함께 *Bacillus* 및 *Enterococcus* 속 균주가 검출됨에 따라, 유산 생성 유무에 따른 *Bacillus* 속의 제거와 *E. faecalis* 검출배지 *Streptococcus faecalis*(SF) agar(MBcell, Korea)를 사용한 *Enterococcus* 속 균주의 제거를 시도하였다[7]. 유산 생성의 확인에는 0.7% $CaCO_3$(w/v)가 첨가된 MRS agar(Difco)를 이용하였고, 37°C에서 24시간 배양하여 불용성의 상태로 존재하던 배지 중의 $CaCO_3$가 생성된 유산에 의해 투명환(clear zone)을 생성하는 콜로니를 선발하였다[8]. 유산 생성 균주들 중, SF agar를 이용한 37°C, 24시간 배양에서 생장하는 균주를 *Enterococcus* 속으로 간주하였다.

50°C에서 3일간의 집적배양을 통해 각 시료로부터 순수분리한 총 120 균주를 유산 생성을 확인할 수 있는 $CaCO_3$ 첨가배지에서 배양한 결과, 각 시료에서 분리된 균주들의 60%에서 83%가 투명환을 형성하여 유산을 생성하는 것으로 나타났다(Table 1). 2차 선발에서 확보된 균주들을 SF agar에서 배양한 결과, 1차 선발에서 분리된 균주들의 20%에서 50%가 선발되었다. 각 시료로부터 최종적으로 선발된 42 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 동정 결과, 모두 *B. coagulans*로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 수행한 50°C에서의 집적배양, $CaCO_3$ 첨가배지를 이용한 *Bacillus* 속 균주의 제거, SF agar를 이용한 *Enterococcus* 속 균주의

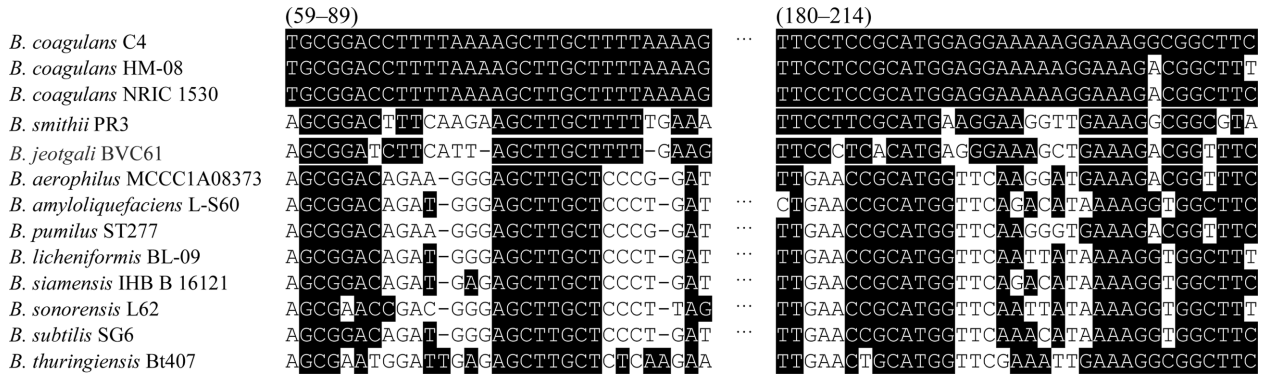

Fig. 2. The regions in the 16S rRNA gene sequences from *B. coagulans* and other *Bacillus* species. Conserved nucleotide sequences are shown by shades.

Table 1. Effects of selection methods for *B. coagulans* isolation.

Step	Selection method	Media	No. of selected colonies			
			Anseong	Pocheon	Yeoju	Uijeongbu
1st	Incubation at 50°C	MRS broth, PCA	30 (100)	30 (100)	30 (100)	30 (100)
2nd	Acid production test	MRS agar + $CaCO_3$	18 (60)	25 (83)	24 (80)	19 (63)
3rd	Enterococci elimination	SF agar	6 (20)	15 (50)	9 (30)	12 (40)

Rice straw samples for *B. coagulans* isolation were collected from four different locations.
The numbers in parentheses represent the proportion of selected colonies (%).

제거는 *B. coagulans* 선발을 위한 빠르고 정확한 방법이 될 수 있는 것으로 확인되었다.

요 약

*Bacillus coagulans*는 프로바이오틱스 및 내열성 생물소재의 생산에 활용 가능성이 높은 미생물로 주목받고 있지만, 우리나라에서는 관심의 대상이 되지 못하고 있으며 상용화된 바 없다. 따라서 기능연구를 통한 산업화 대상 균주가 국내에는 충분히 확보되지 못한 상태에 있다. 본 연구자들은 미래 활용을 위한 *B. coagulans*의 확보를 위하여 볏짚으로부터 *B. coagulans*의 빠른 분리법을 개발하였다. 50°C에서의 집적배양, 산 생성 확인을 통한 *Bacillus* 속 균주의 제거, 선택배지를 이용한 enterococci 균주의 제거는 *B. coagulans* 선발을 위한 빠르고 정확한 방법이 될 수 있는 것으로 확인되었다.

References

1. Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.
2. Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 968–978.
3. Bergey DH, Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP. 1939. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 5th Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
4. Breed RS, Murray EGD, Smith NR. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
5. Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* **28**: 214–220.
6. De Clerck E, Rodriguez-Diaz M, Forsyth G, Lebbe L, Logan NA, DeVos P. 2004. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 50–60.
7. Hajna AA, Perry CA. 1943. Comparative study of presumptive and confirmative media for bacteria of the coliform group and for fecal streptococci. *Am. J. Public Health Nations Health* **33**: 550–556.
8. Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. 2014. Bacterial community migration in the ripening of *doenjang*, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 648–660.
9. Labuda R, Piovarciová Z, Tancinová D. 2008. Sensitivity of the *Alternaria infectoria* species-group 1 to cycloheximide. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**: 673-675.
10. Lee S-H, Park P. 2010. Isolation of major microflora *Bacillus coagulans* from rice bran. *Korean J. Food Preserve.* **17**: 165-168.
11. Qin J, Zhao B, Wang X, Wang L, Yu B, Ma Y, *et al.* 2009. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2–6. *PLoS One* **4**: e4359.
12. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, *et al.* 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiol.* **151**: 361–368.
13. Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L, McCartney AL, Gibson GR. 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 1026–1032.
14. Ye L, Zhou X, Hudari MS, Li Z, Wu JC. 2013. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresour. Technol.* **132**: 38–44.
15. Zhang Y, Chen X, Luo J, Qi B, Wan Y. 2014. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. *Bioresour. Technol.* **158**: 396–399.