

비스판 변이주에 의한 활성아포 생산성 증가

전경동¹, 이광호, 김원석¹, 백현동

경남대학교 생명과학부, (주)순천당제약 기술연구소¹

전화 (0551) 249-2689, FAX (0551) 243-8133

Abstract

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. The goal of this study were to get the novel bispan mutant strain and to get higher spore number of bispan mutant in submerged fermentation. Bispan mutant KD21 was obtained using NTG mutagenesis of bispan strain, and bispan mutant was cultivated in 5 L jar fermenter. In this study, productivity and sporulation rate of the bispan mutant KD21 showed approximately 77% increase when compared with bispan strain.

서 론

프로바이오틱 생균제란 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. 현재 시판되는 생균제품은 대부분 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Streptococcus*속, *Bacillus*속 등이 있다. 이들 중에서도 비스판균은 일본에서 분리되어 국내에서 10여년간 의약품으로 장질환 치료제로서 판매되고 있는 *Bacillus polyfermenticus*라고 알려진 아포형성의 유용한 미생물이다. 일반적인 유산균 제제는 위산이나 장내소화효소 등에 대한 불안정성으로 인해 기타 복합 성분들을 첨가해서 제품으로 시판되는데 비해 비스판 제제는 장내에서의 20여종의 효소를 분비하고, 아포형성으로 매우 안정적이며 무독성 항균물질의 생산으로 장내 병원성 미생물을 억제하여 장내 균총의 정상화를 도와주므로 장질환 개선에 탁월한 효과를 보여주고 있다.¹⁾ 본 연구에서는 유용한 비스판균의 생산성을 증대시키기 위해 아포 형성능이 우수한 변이주를 획득하고, 발효조 배양에서 활성아포의 생산성의 증대를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

(주)순천당제약 기술연구소에서 분양받은 비스판균을 3~4회에 걸친 계대배양으로 균주를 활성화하였으며, *Bacillus polyfermenticus* SCD라고 명명하였다. 본 실험에서 사용된 비스판 균주들은 glycerol stock법으로 -70°C 에서 보존하였고, working culture는 한 달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다.

배지

중균 및 전배양으로는 TSB배지를 사용하였고 발효조의 본배양은 *Bacillus* 균주에 많이 이용되고 아포형성에 뛰어난 배지로서 예비 실험에 의해 배지 조성이 결정되었다 (결과 미제시). 우수한 배지를 구성하고 있는 성분들을 가격적인 면에서 저렴하고 국내에서 비교적 쉽게 공급받을 수 있도록 조제된 H5산업용배지를 사용하였다.²⁾

비스판 변이주 선별

우수 비스판 변이주를 획득하기 위해 Uguru 등의 방법을 변형하여 사용하였다.³⁾ LB배지에서 배양된 균주를 PAB (Antibiotic medium 3) 배지에 접종하여 충분한 통기하에서 대수증식기 ($\text{OD}_{600} = 0.7\sim 1.0$)까지 37°C 에서 배양하여, 원심분리로 상등액을 제거하고 따뜻한 SC용액 (0.15 M Sodium chloride, 0.01 M sodium citrate, pH 7.0) 10 mL로 한번 씻고 NTG를 30분간 처리하여 따뜻한 PAB배지로 씻어 내고 적당히 희석하여 LB평판배지에서 배양하였다. 변이주는 α -amylase활성, 콜로니의 색상 및 크기, 아포형성능 등을 기준으로 분리하였다.

배양조건 및 방법

중균배양은 500 mL baffled flask (working volume: 100 mL)을 이용하였으며, 본배양은 5 L 발효조 (한국발효기, working volume: 3 L)를 사용하여 수행되었다. 비스판균은 순수분리되어 TSA plate에 보존중인 균주를 500 mL baffled flask의 TSB배지에 한 백금이 접종하여 37°C 에서 교반속도 150 rpm으로 10시간 진탕배양하여 제조되었다. 발효조에서의 본배양의 배양조건은 총용량은 5 L, 실용량은 3 L, 배양온도는 37°C , pH는 7.0 ± 0.1 , 교반속도는 500 rpm, 통기량은 1 vvm이었다.

균수의 측정

총균수의 측정은 배양액을 0.1%펩톤수로 연속적인 희석을 시킨 다음, TSA 평판배지에 0.1 mL씩 분주한 후, 37°C 에서 24시간 배양한 후 콜로니형성단위 (CFU/mL)를 측정하여 총균수를 계산하였으며, 아포수의 측정은 배양액을 80°C 에서 2시간 열처리하여 영양세포를 사멸시키고, 0.1%펩톤수로 연속으로 희석한 후, 0.1 mL씩 TSA 평판배지에 분주하여 측정하였다.

결과 및 고찰

NTG 처리에 의한 비스판 변이주의 선별

NTG ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 사멸율을 조사한 결과, 30분간 처리하였을 때 99~99.9%의 사멸율을 보였으며 (Fig. 1), 변이주의 선별은 LB평판배지에서

콜로니의 크기와 색상, 증식속도, 아포형성능 등을 기준으로 3000여 종을 선별하여 최종적으로 KD21균주를 우수 비스판 변이주로 선별하였다.

비스판 변이주의 발효조에 의한 아포생산성

선별된 우수 비스판 변이주 KD21균주를 5 L jar fermenter에서 배양을 검토한 결과, 36시간만에 총균수가 5.5×10^9 CFU/mL에 도달했으며, 최대 활성아포수는 2.7×10^9 CFU/mL에 도달하였다 (Fig. 2). 이는 비스판 친균주가 2일만에 최대아포수를 얻은 것에 비해 배양시간이 단축되었으며, 생산성은 약 77%정도 증가되었다.

비스판 변이주의 안전성 실험

비스판 변이주 KD21균주의 독성(급성 및 아급성)시험에서 안전한 것으로 확인되었다 (결과 미제시).

요 약

본 연구에서 비스판균에 비해 아포형성능이 우수한 변이주를 선별하고, 발효조 배양에서 활성아포 생산성의 증가를 확인하였다.

최종 선별된 변이주 KD21균주를 5 L jar fermenter에서 배양한 결과, 36시간만에 총균수는 5.5×10^9 CFU/mL에 도달하고, 최대 활성아포수는 2.7×10^9 CFU/mL에 도달하였다. 이는 비스판 친균주에 비해 활성아포의 생산성이 77%증가하였음을 확인 할 수 있었다. 장질환 치료제로 판매되고 있는 비스판 제제의 활성아포 생산성이 우수한 변이주를 획득함으로써 친균주에 비해 가격경쟁력을 가질수 있을것으로 판단된다.

참고문헌

1. Park, H.-S., S.-H. Lee, and T.-B. Uhm (1998). Selection of microorganism for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 433-440.
2. U. S. Patent. 6,010,898 (1999) Liquid cultivation of *Bacillus polyfermenticus*.
3. Uguru, G. C., D. A. Robb, J. A. Akinyanju, and A. Sani (1997). Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive α -amylase from *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 273-279.
4. Choi, S.-H., S.-K. Kang, and Y.-W. Ryu (1998). Production of *Bacillus thuringiensis* spore using an industrial medium. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**: 644-648.
5. 전경동, 성승희, 김원석, 백현동, (1998) 정장세균인 비스루트균의 미생물학적 특성 및 배양최적화. 한국생물공학회 추계학술 발표대회 프로시딩. pp 65-70.

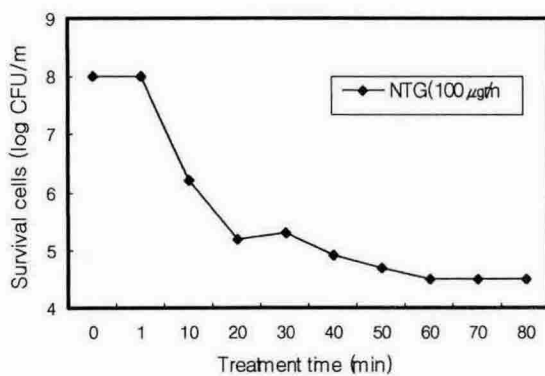


Fig. 1. Survival curve of bispan strain for NTG mutation.

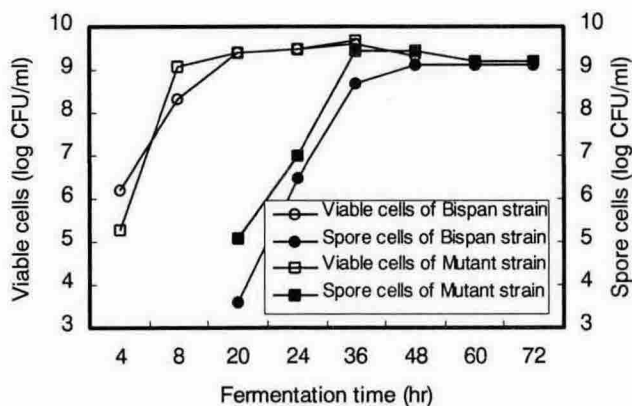


Fig. 2. pH-controlled fermentation profiles of bisroot strain and mutant KD21 in H5 medium.

Table 1. Comparison of productivity between Bispan strain and mutant KD21 in jar fermenter.

Strain	Maximum number of active spore (CFU/mL)	Culture time (hr)	Overall productivity (CFU/mL/day)	Increase (%)
Bispan strain	1.3×10^9	48	6.5×10^8	-
Mutant KD21	2.7×10^9	36	1.8×10^9	77