

## *Bacillus licheniformis*의 생균제로서의 특성

김진욱 · <sup>1</sup>전경동 · <sup>2</sup>강재선 · <sup>1</sup>장정수 · 하배진 · †이재화  
신라대학교 공과대학 생명공학과, <sup>1</sup>(주) 바이넥스 중앙 연구소, <sup>2</sup>인제대학교 제약공학과  
(접수 : 2005. 6. 9., 게재승인 : 2005. 10. 23.)

## Characterization of *Bacillus licheniformis* as a Probiotic

Jin-Wook Kim, Kyoung-Dong Jun<sup>1</sup>, Jae-Seon Kang<sup>2</sup>, Jung-Su Jang<sup>1</sup>, Bae-Jin Ha, and Jae-Hwa Lee†

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University

<sup>1</sup>Research and Development Center, Binex Co. Ltd., Busan, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Inje University

(Received : 2005. 6. 9., Accepted : 2005. 10. 23.)

*Bacillus licheniformis* was an useful material for improvement of fecal microflora. The stability of *Bacillus licheniformis* in low pH (pH 2, 3, 4, 6, 7), artificial bile acid, high concentration of salt (0, 5, 10, 20, 30%), and ethanol (0, 4, 8, 16, 32%) was investigated in this study. The viability of *Bacillus licheniformis* was stable for pH 3, 4, 6, 7. Final viability of *Bacillus licheniformis* was confirmed below 25% in the bile acid. In high concentration of salt, *Bacillus licheniformis* showed optimal viability in 10% of salt. The viability of *Bacillus licheniformis* was over 95% in condition of ethanol concentration 4%, 8%, 16%, 32% contrast with uncontained ethanol at 37°C for 4h. It was verified that *Bacillus licheniformis* was stable for pH 4, 6, 7, high concentration of salt and ethanol but was unstable in pH 2 and bile acid.

**Key Words :** *Bacillus licheniformis*, probiotic, fecal microflora

### 서론

소득 수준이 향상되면서 소비자는 건강 지향적인 제품에 관심을 가지고 있으며, 기능성 식품에 대한 수요 역시 크게 증가되고 있다. 이에 따라 생균제의 기능성과 효능을 이용한 식품개발은 기능성 식품의 중요한 분야로 인식되고 있다(1, 2).

생균제 (probiotics)란, 항생물질 (antibiotics)에 대비되는 말로서 살아있는 미생물 균체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 향균물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료를 통해 신체기능 개선을 목적으로 생산된 제품을 말한다. 이러한 생균제는 장내 균총의 정상화, 유해 세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 질병예방, 면역의 활성화, 간접적인 항암 작용, 클레스테롤 저하, 유당 불내증의 감소, 변비 억제 및 예방과 관련되어 기능성이 인정되어 있다(2, 3).

생균제로 많이 이용되고 있는 세균은 *Lactobacillus*속, *Streptococcus*속, *Bifidobacterium*속, 유포자 유산균인 *Bacillus*속, 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 등이 있다(4).

생균제는 생존성, 정확성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 촉진능, antigentoxic 활성, 병원성 세균의 억제능 등의 기능적 측면과 관능적 특성, 안정성, 박테리오파지 저항성, 제조과정 중의 생존성 등의 기술적 측면, 안전성이 우수하여야 하며, 특히 미생물로써 장내 생존력이 우수해야 상업적으로 이용가치가 증대된다(5-8).

생균제는 설사와 같은 위장 장애와 염증성 장염, pouchitis, 민감성 장 증후군, 결장암, 유당흡수, *Helicobacter pylori* 감염 그리고 변비 등의 질병에 효과적이기 때문에, 치료에 대한 사용이 증가되고 있다(9).

치료적 목적으로 사용되는 생균제는 인체에서 유래되어야 안전하며, 유전적으로도 안정하다. 또한 위액, pancreatic 효소와 담즙에 분해 되지 않아야 하며, 장내에 다량으로 정착하여야만 생균제로서의 작용을 하게 된다(10, 11).

따라서 본 연구에서는 생균인 *Bacillus licheniformis*의 산성 pH에 대한 내성, 인공 담즙산에 대한 내성 및 염, 에탄올에 대한 안정성 등을 검토하여 산업적인 유용성을 밝히고자 하였다.

† Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Kwaebop-dong 1-1, Busan 617-736, Republic of Korea

Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jhalee@silla.ac.kr

**재료 및 방법**

**균주 및 배양 배지**

본 연구에 사용된 *Bacillus licheniformis* 균은 (주)바이넥스에서 분양 받아 3~4회 걸친 계대배양으로 활성화하였으며, glycerol stock법으로 -80℃에서 보존하였고, 한달에 1회씩 계대배양하여 사용하였다. 배양배지는 agar와 TSB (Difco) 배지가 들어있는 고체배지를 사용하였다. 그리고 배양온도는 37℃에서 24시간 배양한 것을 사용하였다.

**균수의 측정**

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

**산성 pH에 대한 내성**

산성 pH는 0.2% potassium phosphate solution을 1 N HCl로 pH 2, 3, 4, 6, 7로 조절된 인공위액을 사용하였다. 산성 pH에 대한 내성을 실험하기 위해 *B. licheniformis*를 0.1 g 취하여 위에서 조절한 다양한 pH 용액에 각각 접종하였다. 시료채취는 각각 0, 1, 2, 3, 4시간 배양한 것을 이용하여 1 ml 회수한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하고, 최적온도에서 배양하여 콜로니 형성단위를 측정 후 총균수를 계산하였다.

**인공 담즙산에 대한 내성**

인공 담즙산 (artificial bile acid)은 TSB 배지에 0.2% sodium thioglycolate (Sigma), 1mM sodium taurocholate (Sigma), 1mM sodium glycolate (Sigma)를 첨가하여 제조하였다. 인공 담즙산에 대한 내성을 실험하기 위해 *B. licheniformis*를 0.1 g 취하여 인공 위액 (artificial gastric juice, pH 2.5)에서 2시간 배양한 배양액을 멸균된 인공 담즙산 배지에 접종하였다. 시료채취는 24시간 동안 각각 0, 1, 4, 8, 12, 24 시간 배양한 것을 이용하여 1 ml 회수한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하고, 최적온도에서 배양하여 콜로니 형성단위를 측정 후 총균수를 계산하였다.

**염농도에 따른 안정성**

염농도에 따른 안정성을 측정하기 위해 *Bacillus licheniformis*를 0.1 g 취하여 염 (0, 5, 10, 20, 30%)이 첨가된 0.2% potassium phosphate solution에 접종하였다. 시료채취는 37℃에서 4시간 동안 배양한 것을 이용하여 1 ml 회수한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하고, 최적온도에서 배양하여 콜로니 형성단위를 측정 후 총균수를 계산하였다.

**에탄올에 대한 내성**

에탄올에 대한 내성을 측정하기 위해 *Bacillus licheniformis*를 0.1 g 취하여 에탄올 (0, 4, 8, 16, 32%)이 첨가된 0.2% potassium phosphate solution에 접종하였다. 시료

채취는 37℃에서 4시간 동안 배양한 것을 이용하여 1 ml 회수한 후 10배씩 연속적으로 희석시켜 평판배지에 0.1 ml씩 분주하여 도말하고, 최적온도에서 배양하여 콜로니 형성단위를 측정 후 총균수를 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**산성 pH에 대한 내성**

생균제로서 가져야 할 특성은 여러 가지가 있는데, 이 중에서 가장 중요한 특성 중 하나가 생존력이 높아야 한다는 점이다(6). 구강을 통하여 섭취되는 균은 위와 십이지장을 통해 생존하여 최종 목적 부위인 장에 도달하게 된다. *Bacillus licheniformis*가 생균제로서의 기능을 발휘하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여야 한다. 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 된다. 하지만 섭취한 음식의 완충작용으로 인해서 다소 pH가 높아져 미생물의 사멸율이 어느 정도 감소하게 된다. 내산성 실험으로는 *in vivo*에서 직접 생존율을 확인하는 방법과 인공 위액을 이용한 간접적으로 측정하는 방법이 알려져 있다. 생균의 사멸은 주로 낮은 pH에 의한 것이며, *in vitro*와 *in vivo*에서의 실험결과가 거의 일치한다는 사실이 보고 되어있다(10-12).

pH 2, 3, 4, 6, 7로 조정된 산성 pH에서의 실험 결과, *B. licheniformis*는 pH 3, 4, 6, 7에서 80% 이상의 균이 생존하는 매우 높은 생존율을 보였다(Fig. 1).

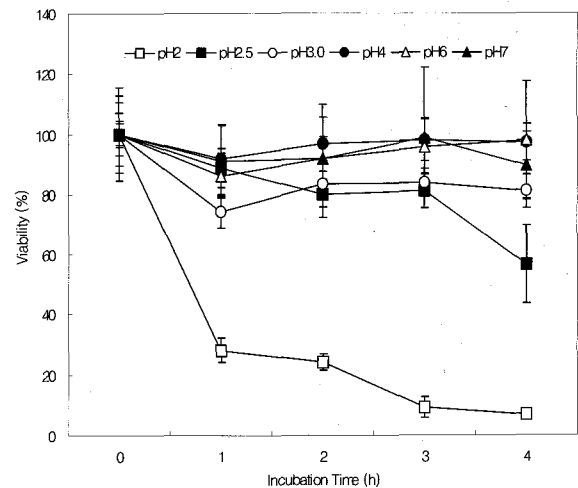


Figure 1. Survivals of *Bacillus licheniformis* in various ranges of pH.

**인공 담즙산 (artificial bile acid)에 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 높은 농도의 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다(13).

인공 담즙산에 대한 내성을 실험한 결과, Fig. 2에서 보

는 바와 같이 pH 2.5으로 조절된 0.2% potassium phosphate 에 2시간 반응한 *B. licheniformis*를 인공 담즙이 포함된 배지와 인공 담즙이 포함되지 않은 배지에 접종 후 배양한 것을 비교하였을 때 인공 담즙이 포함되지 않은 배지에 비해 매우 낮은 생존율을 보였다. 따라서 보다 원활한 생균제로서의 기능을 수행하려면 *B. licheniformis*의 담즙에 대한 내성을 강화할 수 있는 방법의 개발이 필요하겠다.

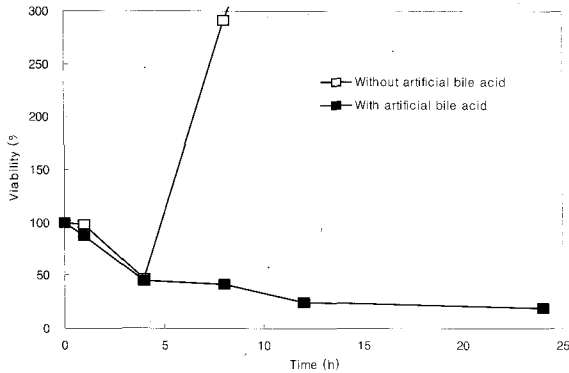


Figure 2. Survivals of *Bacillus licheniformis* in artificial bile acid after treated with artificial gastric juice for 2h at 37°C.

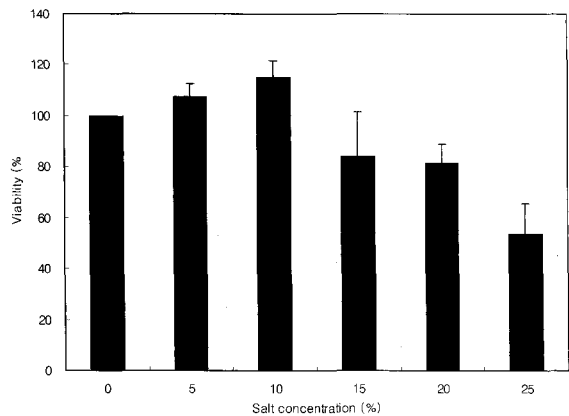


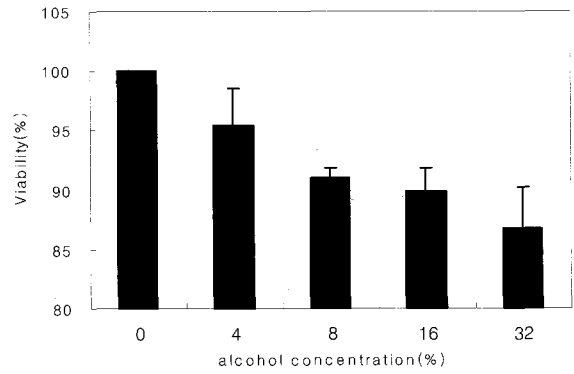
Figure 3. Stability of *Bacillus licheniformis* in high concentration of salt.

**염농도, 에탄올에 따른 안정성**

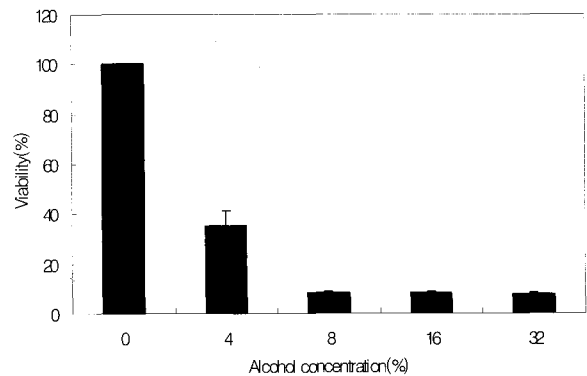
염농도에 따른 안정성 실험은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 염이 10% 첨가된 배양액에서 가장 높은 생존율이 확인되었다. 이는 생균인 *B. licheniformis*의 성장 과정에서 비교적 높은 염농도에서 최적의 성장함을 알 수 있었다. 이는 *B. licheniformis*가 고추장, 된장과 같이 염농도가 높은 환경에서 분리된 사실과도 일치하는 결과이다.

에탄올에 대한 내성 실험은 Fig. 4(A)에서 보는 바와 같이 아포를 형성한 상태의 *B. licheniformis*는 모든 농도에서 90% 이상의 균이 생존하는 높은 생존율을 보였다. 하지만 Fig. 4(B)에서는 아포를 형성하지 않은 *B. licheniformis*는 4%에서 35%, 8% 이상에서는 8%의 생존율을 보였다. 본 연구에서는 생균제의 제품형태가 아포인 점을 고려해 볼 때 에탄올에 대한 내성은 높은 것으로 확인할 수 있다.

성인병은 현대의 복잡한 사회구조에 따르는 스트레스 및 생활의 변화로 발병율이 증가되고 있다. 그 중 하나가 고염의 생활에서 발생한다. 또한 알코올은 높은 기호성에도 불구하고 인간의 건강적인 측면에서는 유해한 식품 중에 하나로서, 상습적인 음주로 인해 증가되는 동맥경화 당뇨, 간경화 등의 대표적인 성인병을 초래한다. 이런 고염의 생활과 상습적인 음주 생활에서 생균제의 기능을 제대로 발휘하기 위해서는 생균이 고염, 에탄올에 대한 내성을 가지고 있어야 한다.



(a)



(b)

Figure 4. Ethanol resistance of *Bacillus licheniformis* (A: The viability of spore of *Bacillus licheniformis* in ethanol. B: The viability of vegetative *Bacillus licheniformis* in ethanol).

**요 약**

*Bacillus licheniformis*는 장내 균총을 개선하는데 유용한 물질이다. 본 연구의 목표는 *B. licheniformis*의 낮은 pH (pH 2, 3, 4, 6, 7), 인공 담즙산, 높은 농도의 염 (0.5, 10, 20, 30%) 그리고 에탄올 (0, 4, 8, 16, 32%)에 대한 안정성을 확인하려고 한다. *B. licheniformis*는 pH 3, 4, 6, 7에서 안정적인 생존율을 보였다. *B. licheniformis*의 담즙 내에서의 최종 생존율은 25% 이하로 확인되었다. 높은 농도의 염에서는 *B. licheniformis*는 10%의 염에서 최적 생존율을 보였다. *B. licheniformis*의 에탄올이 포함되지 않은 것에 비해 에탄올이 4, 8, 16, 32% 포함된 것에서 95% 이상의 생존율을 보였다. 그러므로 *B. licheniformis*가 pH 3, 4, 6, 7, 높은 농도의 염, 에탄올에서 안정하나 pH 2와 담즙산에서 불안정하다는 것을

확인할 수 있었다.

## REFERENCES

1. Tannock, G. W. (1997), Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D, *Trends. Biotechnol.* **15**, 270-274.
2. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim (2002), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for Oral Bacteriotherapy of Gastrointestinal Disorders, *Korean. J. Food. Sci. Technol.* **34**, 73-78.
3. Jung, K. D., H. J. Kim, K. H. Lee, H. D. Paik, and J. S. Kang (2002), Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a Probiotics, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 359-366.
4. Bongaerts, G., R. Severijnen, and H. Timmerman (2005), Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy, *Med. Hypotheses* **64**, 64-68.
5. Koo, S. M., Y. H. Cho, C. S. Huh, Y. J. Beak, 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.
6. Campbell, G. L. and M. R. Bedford (1992), Enzyme applications for monogastric feeds, *A reievew. can. J. Anim. Sci.* **72**, 449-466.
7. Fuller, R. (1989), Probiotics in man and animals, *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
8. Jun, K. D. (1998), Microbiological identification, antimicrobial Activity and enhanced production of bisroot strain, *M. S. Thesis, Kyungnam University.*
9. Goossens, D., D. Jonkers, M. Russel, A. thijs, A. van den Bogaard, E. Stobberingh, and R. Stockbrügger (2005), Survival of the probiotics, *L. plantarum* 299v and its effect on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition, *Digest. Liver Dis.* **37**, 44-50.
10. Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin (1987), Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to interstitial cells, *J. Dairy Sci.* **70**, 1-12.
11. Giannella, R. A., S. A. Broitman, and N. Zamcheck (1972), Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: Studies *in vivo* and *in vitro*, *Gut.* **13**, 251-256.
12. Berrada, N., J. F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia (1991), *Bifidobacterium* from fermented milks: Survivals during gastric transit, *J. Dairy Sci.* **74**, 409-413.
13. Gilliland, S. E., T. E. Staley, and L. J. Bush (1984), Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct, *J. Dairy Sci.* **67**, 3045-3051.