

식품용 프로바이오틱 비스루트균의 주요 생균제 특성

백현동* · 정민용 · 정황영 · 김원석¹ · 김기태²
경남대학교 생명과학부, ¹(주)바이넥스, ²프로코바이오텍(주)

Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for Oral Bacteriotherapy of Gastrointestinal Disorders

Hyun-Dong Paik*, Min-Yong Jung, Hwang-Young Jung,
Won-Seok Kim¹ and Kee-Tae Kim²

Division of Life Sciences, Kyungnam University,
¹BINEX Co. Ltd., ²PROCO Biotech Co.

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 both humans and animals. The cells of *B. polyfermenticus* SCD were treated for 24 h in artificial bile after incubation for 2 h in artificial gastric juice and final number of the strain was reached to around 3.3×10^7 CFU/mL. In test of API ZYM kit, β -glucuronidase or β -glucosidase was not produced by *B. polyfermenticus* SCD. *B. polyfermenticus* SCD was resistant to antibiotics, such as nisin, streptomycin, tetracycline, and rifamycin. *B. polyfermenticus* SCD was also affected by alcohol concentration up to 4%, but more than 8%, their growth was not affected significantly. Finally, *B. polyfermenticus* SCD was shown to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 completely within 24 h of incubation, which indicated its bactericidal nature.

Key words: bisroot, *Bacillus polyfermenticus*, probiotics, characterization

서 론

소득 수준이 향상되면서 소비자는 건강 지향적인 제품에 관심을 가지고 있으며, 기능성 식품에 대한 수요 역시 크게 증가되고 있다. 실제로 프로바이오틱 생균의 기능성과 효능을 이용한 식품개발은 기능성 식품의 중요한 분야로 인식되고 있다. 따라서 기능성 식품으로 프로바이오틱 생균을 이용하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁽¹⁾. 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⁽²⁾. 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⁽³⁻⁹⁾.

프로바이오틱 생균제로 많이 이용되고 있는 세균은 *Lactobacillus*속, *Streptococcus*속, *Bifidobacterium*속 그리고 유포자 유산균인 *Bacillus*속 등이 있다. 한편, 프로바이오틱 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), 그리고 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내 생존력이 커야 한다는 것 등이다.

최근 바실러스속 프로바이오틱 생균에 대한 산업적인 유용성이 증대되고 있으며⁽¹⁰⁻¹²⁾, 그 중에서도 비스루트균이라 불리는 *B. polyfermenticus* SCD는 식품용 프로바이오틱 생균제로 주목받고 있다. *B. polyfermenticus* SCD는 *B. subtilis*와 매우 유사한 균으로 동정되어 있으며⁽¹³⁾, 비스루트균 활성화 포의 경제적인 생산을 위한 액체발효법이 밝혀져 있다⁽¹⁴⁾. 본 연구에서는 식품용 프로바이오틱 생균으로 사용되고 있는 비스루트균의 인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성, 효소 활성, 항생물질에 대한 내성, 알콜에 대한 내성, 병원성 세균에 대한 항균기작 등을 검토하여 산업적인 유용성을 밝히고자 하였다.

*Corresponding author: Hyun-Dong Paik, Division of Life Sciences, Kyungnam University, 449 Wolyoung-Dong, Masan 631-701, Korea

Tel: 82-55-249-2689

Fax: 82-55-243-8133

E-mail: hdpaik@kyungnam.ac.kr

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 비스루트균은 (주)바이텍스에서 분양 받은 후 3~4회에 걸친 계대배양으로 활성화하였으며 glycerol stock법으로 -70°C 에서 보존하였고, working culture는 한달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다⁽¹³⁾. 비스루트균의 배양 배지는 TSB 배지(Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였으며, 항균활성 검정을 위해 사용된 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111는 TSB 배지(Difco)를 배양 배지로 사용하였고, 선택배지로는 *Listeria Selective Agar base*(Unipath, UK)를 사용하였다.

배양조건 및 방법

비스루트균을 10 mL test tube의 TSB broth에 접종하여 37°C 에서 교반속도 150 rpm으로 12시간 동안 전배양한 다음 다시 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에 접종하여 12시간 본배양하였다⁽¹³⁾. 항균활성 측정에 사용된 *Listeria*는 TSB 배지에서 37°C 에서 24시간 배양하여 사용하였다.

균수의 측정

총균수는 배양액을 0.1% 펄톤수로 10배씩 연속적인 희석을 시킨 다음, 평판배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후, 최적온도에서 배양한 후, 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정하여 총균수를 계산하였다. 아포수의 측정은 배양액을 80°C 에서 2시간 열처리하여 영양세포를 사멸시킨 후, 총균수의 방법과 동일하게 수행되었다⁽¹⁴⁾.

인공위액에 대한 내성

인공위액은 Kobayashi 등의 방법에 따라 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 broth에 pepsin 1%를 첨가하여 사용하였다⁽¹⁵⁾. 인공위액에 대한 내성을 실험하기 위해 비스루트균의 3일 배양된 배양액을 80°C 에서 10분간 열처리하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 배양 상등액을 버리고 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 다시 인공위액을 상등액과 동량으로 첨가하여 9 mL test tube 인공위액에 넣어 2시간 동안 37°C 에서 배양하여 총 아포균수를 측정하였다. Control은 pH를 조절하지 않고 또한 pepsin을 첨가하지 않은 broth를 사용하여 위와 같은 동일한 방법을 거쳤다.

인공담즙산에 대한 내성

인공담즙액은 살균된 broth에 멸균한 10% oxgall (Difco) 용액을 1% 첨가하여 사용하였다⁽¹⁶⁾. 인공담즙산 내성을 실험하기 위해서 인공위액을 거친 배양액을 인공담즙액이 있는 시험관에 첨가하여 37°C 에서 24시간 동안 배양한 후 생존력을 조사하기 위해서 인공위액과 마찬가지로 총 아포균수를 측정하였다. 대조구는 oxgall이 첨가되지 않은 broth에 위와 같은 동일한 방법을 사용하여 실험하였다.

효소활성 측정

효소활성을 측정하기 위해서 비스루트균 배양액을 원심분리하여 균체만을 회수하여 멸균수로 2회 반복하여 세척한 후

멸균수에 현탁하여 10^6 CFU/mL 정도의 농도가 되도록 하였다. 이 현탁액을 API ZYM(bioMerieux Co., France)에 접종하여 어두운 곳에서 37°C 의 조건으로 4시간 배양하였다. 표 현활성 증가와 용해를 돕기 위해 ZYM A, B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨린 후 밝은 곳에서 약 5분간 반응시킨 후 색깔의 변화를 관찰하여 효소활성을 측정하였다.

항생물질에 대한 내성 측정

항생물질 내성을 측정하기 위해서 paper disc 방법을 사용하였다. 즉, 비스루트균의 최적의 온도에서 12시간 배양하고, soft agar(0.7%)에 배양액을 100 μL 로 접종하여 agar plate에 overlay하였다. Overlay된 plate에 각 농도별의 항생물질(nisin, streptomycin, tetracycline, rifamycin)을 충분히 적신 paper disc를 올려서 24시간 배양하여 항생물질 내성을 측정하였다.

알콜에 대한 내성 측정

알콜 내성을 측정하기 위해서 배양액에서 회수된 균체를 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)에 희석하였다. 알콜이 각 농도(0, 4, 8, 16, 32%)별로 첨가된 0.1 M 인산 완충용액 5 mL에 희석한 균체액을 접종후 37°C 진탕배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 생존 활성을 조사하기 위해서 총 아포균수를 측정하였다.

항균활성 측정

항균활성을 측정하기 위해서 비스루트균과 *L. monocytogenes* ATCC 19111을 각각 12시간 동안 배양한 다음 균수를 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 수준으로 희석하고 1:1 volume으로 각각 시험관에 5 mL를 혼합하여 37°C 진탕배양기에서 배양하였다. 배양을 하면서 1, 2, 4, 8, 24 시간 간격으로 sampling하여 *Listeria* 선택배지를 사용하여 균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

인공위액에 대한 내성

식품용 프로바이오틱 생균으로서 가져야 할 특성이 여러 가지가 있는데, 이 중에서 가장 중요한 특성 중 하나가 생존력이 높아야 한다는 점이다⁽²⁾. 구강을 통하여 섭취되는 균은 위와 십이지장을 통해 생존하여 최종 목적 부위인 장에 도달하게 된다. 비스루트균이 프로바이오틱 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 사멸율이 어느 정도 감소하게 된다⁽¹⁷⁾. 내산성 실험으로는 *in vivo*에서 직접 생존을 확인하는 방법과 인공위액을 이용한 간접적으로 측정하는 방법이 알려져 있다. 프로바이오틱 생균의 사멸은 주로 낮은 pH에 의한 것이며 *in vitro*와 *in vivo*에서의 실험결과가 거의 일치한다는 사실이 보고되어 있다⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

이러한 점을 감안한 pH 2.5로 조정된 인공위액에서의 실험결과, 비스루트균은 2시간 경과후 2.4×10^7 CFU/mL 수준의 균이 생존하는 매우 높은 생존율을 보였다(Fig. 1). 이는 박 등이 보고했던 인공위액에서의 생존율은 영양 세포에 대

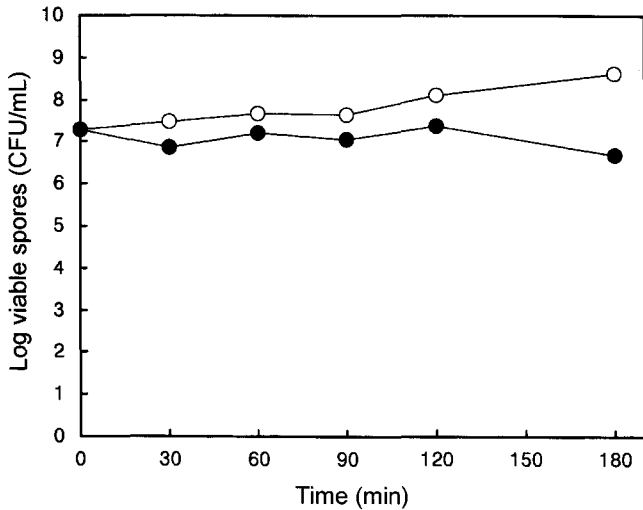


Fig. 1. Survival of *B. polyfermenticus* SCD in artificial gastric juice
 Symbols: - ○ -; non-treated with artificial gastric juice (control),
 - ● -; treated with artificial gastric juice

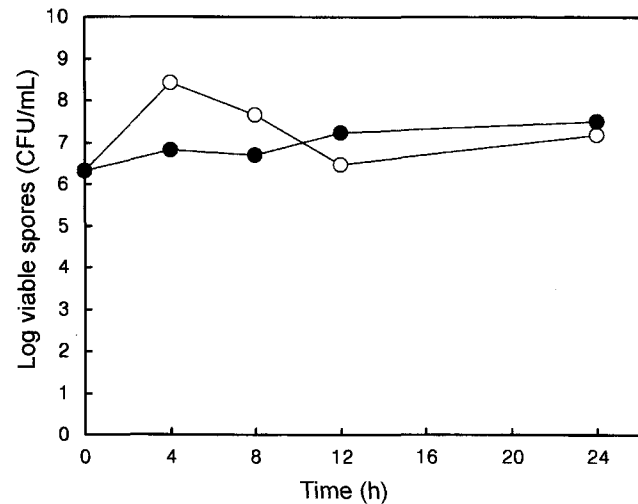


Fig. 2. Survival of *B. polyfermenticus* SCD in artificial bile after treated with artificial gastric juice for 2 h at 37°C
 Symbols: - ○ -; non-added bile after treated with artificial gastric juice (control), - ● -; treated with artificial gastric juice and bile

한 내성인 반면 본 연구에서는 식품용 프로바이오틱 생균의 제품형태가 아포인 점을 고려해 아포에 대해 내성을 확인한 것도 차이가 될 수 있다⁽¹⁰⁾.

인공담즙산에 대한 내성

섭취된 프로바이오틱 생균이 장에 도달하기 위해서 위를 거쳐 췌장과 십이지장을 통과하게 된다. 이 부위에서 분비되는 담즙액에 대한 내성 또한 프로바이오틱 생균이 가져야 할 중요한 특성이다. Gilliland 등은 프로바이오틱 생균이 가져야 할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고한 바 있다⁽²⁰⁾. 실제로 프로바이오틱 생균으로서의 기능은 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다.

Table 1. Enzyme activities of *B. polyfermenticus* SCD by API ZYM kit

Enzyme	<i>B. polyfermenticus</i> SCD
Control	0 ¹⁾
Alkaline phosphatase	2
Esterase(C ₄)	5
Esterase lipase(C ₈)	5
Lipase(C ₁₄)	2
Leucine arylamidase	2
Valine arylamidase	1
Crystine arylamidase	1
Trypsin	1
α-Chymotrypsin	1
Acid phosphatase	1
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3
α-Galactosidase	0
β-Galactosidase	1
β-Glucuronidase	0
α-Glucosidase	1
β-Glucosidase	0
N-Acetyl-β-glucosaminidase	0
α-Mannosidase	0
α-Fucosidase	0

¹⁾0: 0 nmole, 1: 5 nmole, 2: 10 nmole, 3: 20 nmole, 4: 30 nmole, 5: ≥40 nmole

인공담즙산에 대한 내성을 실험한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH 2.5를 통과한 비스루트균은 oxgall이 함유되지 않은 대조구(1.6 × 10⁷ CFU/mL)에 비해 오히려 균수(3.3 × 10⁷ CFU/mL)가 증식되었으며, 이 등이 보고한 실험에서도 동일한 현상을 보였다⁽¹⁶⁾. 이러한 현상은 유산균이 인공담즙산에서 저해를 받는 것에 비해 비스루트균의 큰 장점이라 판단된다. 따라서 인공위액을 통과한 비스루트균은 인공담즙산에 대하여 내성을 보일 뿐만 아니라 오히려 증식됨으로서 목적 부위인 장에 도달하여 프로바이오틱 생균으로서의 역할을 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

효소활성

프로바이오틱 생균이 가져야 할 특성 중에 이들 균이 생산하는 효소 또한 중요한 부분을 차지하고 있다. 예를 들어 발암효소로 알려진 β-glucuronidase이다. Benzo(a)pyrene 등의 발암물질이 체내에 들어오면 간에서 glucuronic acid와 포합되어 해독작용이 이루어지지만, 이것이 담즙과 함께 장내에 배설되어 장내 세균의 β-glucuronidase에 의해 탈포합되면 다시 독성을 가지게 된다⁽²¹⁾. 따라서 프로바이오틱 생균으로서 사용되는 균들이 발암효소인 β-glucuronidase의 활성을 갖고 있다는 것은 바람직하지 않다. 그리고 프로바이오틱 생균들의 유일한 효소는 사람이나 동물이 영양분을 섭취하였을 때 위와 장을 통해 흡수되지 않거나 분해되지 않아서 장내에서 이상발효를 일으킬 수 있는 경우를 방지해 준다.

본 연구에서는 비스루트균을 API ZYM kit에 의해 확인한 결과, Table 1과 같이 발암 효소인 β-glucuronidase에 대한 활성이 없는 것으로 나타났다. 그리고 예비적 발암물질을 발암

Table 2. Antibiotic resistances of *B. polyfermenticus* SCD

Antibiotics ($\mu\text{g/mL}$)	<i>B. polyfermenticus</i> SCD	
0	+ ¹⁾	
Nisin	25	+
	50	+
	100	+
Streptomycin	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Tetracycline	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Rifamycin	0	+
	5	+
	10	-
	20	-

¹⁾+: growth, -: no growth

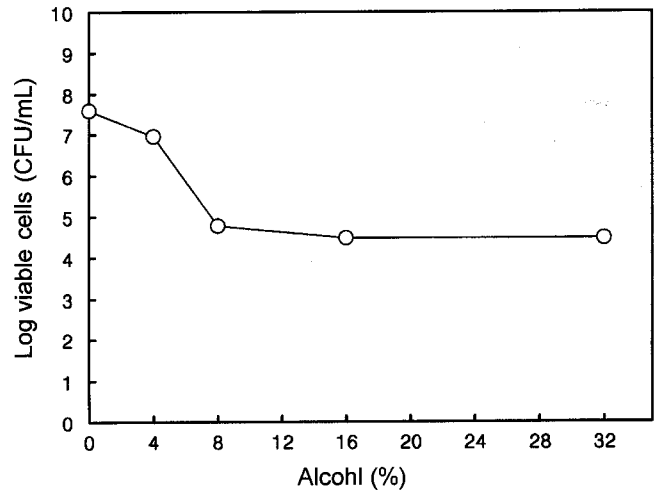
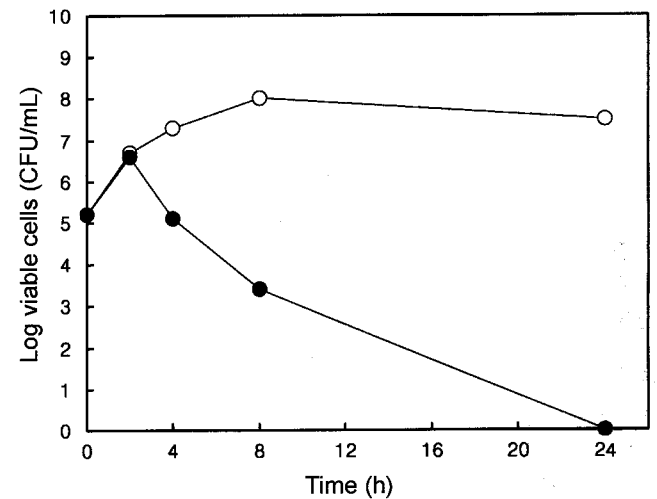
물질로 변환시키는 β -glucosidase의 활성 역시 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 프로바이오틱 생균으로 인해 발생할 수 있는 발암 유발의 위험성이 없다는 사실을 뒷받침한다. 한편, 한국인 분변으로부터 선발된 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*처럼 50 nmole 이상의 높은 β -galactosidase 활성을 보이지는 않았으나⁽²²⁾, β -galactosidase의 비교적 약한 활성(5 nmole)이 확인되었으며, 우유를 비롯한 여러 기능성 식품에서 유당불내증의 저하에 작용할 것이다.

항생물질에 대한 내성

프로바이오틱 생균의 항생제 내성을 검토하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 생균의 선택에 도움이 될 수 있고 그 생균의 미생물학적인 특성을 밝히는 것이다. 프로바이오틱 생균은 여러 가지 항생제에 대해서 내성을 가지고 있으나, 이러한 내성은 전이되지 않은 것으로 알려져 있다. 따라서 프로바이오틱 생균의 고유의 항생제 내성을 특별히 안전성과 관련되어 생각하지는 않는다. 비스루트균은 rifamycin인 경우 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 생육 저해를 받았으나 nisin(100 $\mu\text{g/mL}$), streptomycin(20 $\mu\text{g/mL}$) 그리고 tetracycline(20 $\mu\text{g/mL}$)에 대하여 내성을 나타내었다(Table 2). 이러한 다른 바실러스속 프로바이오틱 생균들(*Bacillus subtilis*)의 streptomycin(10 $\mu\text{g/mL}$), rifamycin(5 $\mu\text{g/mL}$), tetracycline(10 $\mu\text{g/mL}$)에 대한 내성을 볼 때 비스루트균의 항생물질 내성은 유사하다고 생각되어지나⁽¹²⁾, 일부 다른 바실러스 프로바이오틱 생균 중에는 저농도의 tetracycline에 대해서도 민감하다고 보고된 논문도 있었다⁽¹¹⁾.

알콜에 대한 내성

성인병은 현대에서는 복잡한 사회구조에 따르는 스트레스 및 생활의 변화로 발병율이 증가되고 있다. 이 중 알콜은 높은 기호성에도 불구하고 인간의 건강적인 측면에서는 금기되는 식품 중에 하나로서, 상습적인 음주로 인해 증가되는

Fig. 3. Alcohol resistances of *B. polyfermenticus* SCDFig. 4. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 by *B. polyfermenticus* SCD

Symbols: - ○ -; non-treated (control), - ● -; treated

동맥 경화, 당뇨, 간경화 등의 대표적인 성인병을 초래하며 이는 알콜과 함께 육류내의 cholesterol 및 포화지방산의 과도한 섭취 등에 의해 발병율이 높아진다. 이를 막기 위한 방법의 하나로서 알콜에 대한 내성을 프로바이오틱 생균이 갖고 있다면 기능성 식품 개발에 있어 유용하게 활용될 수 있다.

알콜내성 실험에서 Fig. 3에서와 같이 비스루트균은 4% 이상의 알콜 농도에서 저해를 받기 시작하였고, 8%의 농도에서 더욱 저해를 받으나, 8~32%의 사이에서 log 값에는 큰 변화가 없었다.

병원성 세균에 대한 항균기작

비스루트균은 항생제 투여후 장내 균총의 정상화와 장내 병원균의 감염 및 성장을 억제하기 위해 사용되기도 한다. 비스루트균에 의한 식품부패 및 병원성 세균에 대한 항균활성은 *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*(2/2), *Clostridium perfringens*, *Bacillus* sp.(2/2), *Micrococcus* sp.(2/2) 및 *Listeria* sp.(2/2) 등 그람양성균에 대해 항균활성을

나타내었고, 그람음성균은 *Yersinia* sp.(2/2), *Vibrio* sp.(3/3), *Aeromonas hydrophila*(1/1), *E. coli*(5/5), *Salmonella* sp.(4/4), *Shigella* sp.(3/3) 및 *Pseudomonas* sp.(2/2) 등 측정에 사용된 모든 그람음성균에 대한 항균효과를 나타내었다⁽²³⁾.

병원성 세균인 *Listeria*는 그람 음성의 무포자 간균으로서 가축(소, 말, 양, 돼지, 산양 등) 및 가금(닭, 오리 등)에 감염되는 질환을 일으키고 때로는 사람에게 감염된다. 사람은 감염동물과 직접 접촉 및 오염된 식육이나 유제품 등에 의한 경구감염이 되는 경우가 주이며, 때로는 오염된 먼지에 의한 호흡을 통하여 감염되기도 한다. 잠복기는 3일에서 수주일이며 증상은 수막염, 패혈증 및 자가내막염(임산부) 등을 일으킨다.

비스루트균의 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111에 대한 항균활성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 24시간 이전에 완전한 저해를 보였으며 bactericidal한 양상을 나타내었다. 이러한 저해는 비스루트균이 생산하는 여러 효소들과 polyfermentin SCD라고 명명된 박테리오킨을 생성하기 때문으로 알려져 있다⁽²⁴⁾.

위와 같은 결과에 의해 만약 *Listeria*에 감염이 되었을 경우라도 장내에 상주하는 프로바이오틱 비스루트균에 의해 억제될 수 있을 것이라 판단된다.

요 약

본 연구에서는 식품용 프로바이오틱 생균인 비스루트균의 인공위액과 인공담즙산에 대한 내성, 효소활성, 항생물질과 알콜에 대한 내성, 그리고 병원성 세균에 대한 항균기작 등 주요 생균제 특성에 대하여 검토하였다. 인공위액 내성 실험에서는 pH 2.5로 조정된 인공위액을 통과한 생존율이 매우 높았으며 균수가 2.4×10^7 CFU/mL의 수준이었다. 인공담즙산에 대한 내성에서는 pH 2.5의 인공위액을 통과한 비스루트균의 인공담즙산의 내성은 oxgall이 함유되지 않은 대조구 (1.6×10^7 CFU/mL)에 비해 오히려 균수가 증가되었으며, 최종적인 생존수가 3.3×10^7 CFU/mL 으로 확인됨으로써 프로바이오틱 생균으로 매우 우수한 특성을 가지고 있었다. 효소활성을 측정된 결과, 비스루트균은 발암효소인 β -glucuronidase 및 β -glucosidase의 활성이 나타나지 않았다. 또한 항생물질에 대한 내성은 rifamycin 10 μ g/mL 이상의 농도에 대해서는 생육 저해를 보였으나, nisin(100 μ g/mL), streptomycin(20 μ g/mL), tetracycline(20 μ g/mL)에 대해 내성을 보였다. 그리고 비스루트균의 알콜에 대한 내성은 4%의 농도에서 저해를 받았으며, 8%의 농도에서 더욱 저해를 받으나, 8~32% 범위의 농도에서는 균수가 더욱 크게 감소를 하지는 않았다. *Listeria*에 대한 항균기작을 측정된 결과, 24시간 이내에 *L. monocytogenes* ATCC 19111을 완전히 저해를 하였으며, bactericidal한 양상을 나타내었다. 본 연구를 통해 밝혀진 비스루트균의 프로바이오틱 특성은 기능성 식품의 개발 등 산업적으로 매우 유용하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술개발사업(HMP-00-

VN-01-22000-0014)에 의해 수행되었으며, 정민용은 2000년도 두뇌한국 21사업 핵심분야에 의해 장학 지원되었기에 감사드립니다.

문 헌

1. Tannock, G.W. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. Trends. Biotechnol. 15: 270-274 (1997)
2. Fuller, R. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378 (1989)
3. Goldin, B.R. and Borbach, S.L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. Cancer 40: 2421-2426 (1977)
4. Gilliland, S.E. and Walker, D.K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73: 905-911 (1990)
5. Fuller, R. Probiotics in human medicine. Gut 32: 439-442 (1991)
6. Hilton, E., Henry, D.I., Phyllis, A., Kenneth, F. and Michael, T.B. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. Ann. Int. Med. 116: 353-357 (1992)
7. Shah, N. *Lactobacillus acidophilus* and lactose intolerance, a review. ASEAN Food J. 9: 47-54 (1994)
8. Matsuzaki, T., Hashimoto, S. and Yokokura, T. Effects on antitumor activity and cytokine production in the thoracic cavity by intrapleural administration of *Lactobacillus casei* in tumor-bearing mice. Med. Microbiol. Immunol. Berl. 185: 157-161 (1996)
9. Takiguchi, R., Mochizuki, E., Suzuki, Y., Nakajima, I. and Benno, Y. *Lactobacillus acidophilus* SBT 2062 and *Bifidobacterium longum* SBT 2928 on harmful intestinal bacteria. J. Int. Microbiol. 11: 11-17 (1997)
10. Park, H.S., Lee, S.H. and Uhm, T.B. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. J. Food Sci. Nutr. 3: 433-440 (1998)
11. Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. and Cutting, S.M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4288-4291 (1999)
12. Hoa, N.T., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, P.H., Ammendola, S., Ricca, E. and Cutting, S.M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5241-5247 (2000)
13. Jun, K.-D., Lee, K.-H., Kim, W.-S. and Paik, H.-D. Microbiological identification of medical probiotic bispan strain. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 124-127 (2000)
14. Paik, H.-D., Jun, K.-D., Sung, S.-H., Kim, W.-S., Kim, H.-S. and Lee, B.-C. Liquid cultivation of strains of *Bacillus polyfermenticus*. United States Patent 6,010,898 (1999)
15. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. 1974. Tolerance of the multiple antibiotic resistant strain, *L. casei* PSR 3002, to artificial digestive fluids. Jpn. J. Microbiol. 29: 691-697 (1974)
16. Lee, S.H. and No, M.J. Viability in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from Kimchi. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6: 617-622 (1997)
17. Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12 (1987)
18. Giannella, R.A., Broitman, S.A. and Zamcheck, N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: Studies *in vivo* and *in vitro*. Gut 13: 251-256 (1972)
19. Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P. and Piaia, M. *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. J. Dairy Sci. 74: 409-413 (1991)
20. Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J.

- Dairy Sci. 67: 3045-3051 (1984)
21. Cole, C.B., Fuller, R. and Carter, S.M. Effect of probiotic supplements of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* 2204 on β -glucosidase and β -glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human fecal flora. Microb. Ecol. Health Dis. 2: 223-225 (1989)
22. Shin, M.-S., Kim, H.-M., Kim, G.-T., Huh, C.-S., Bae, H.-S. and Baek, Y.-J. Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 495-501 (1999)
23. Kim, H.-J. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria by novel bacteriocins. MS thesis, Kyungnam university (1998)
24. Lee, K.-H., Jun, K.-D., Kim, W.-S. and Paik, H.-D. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. Lett. Appl. Microbiol. 32: 1-6 (2001)
-

(2001년 6월 22일 접수)