

프로바이오틱 비스루트균의 아포생산을 위한 최적배지 개발

이광호 · 박규용 · 김성미 · 김원석¹ · 백현동*
경남대학교 생명과학부, ¹(주)바이넥스 기술연구소

Development of a Culture Medium for Growth and Sporulation of *Bacillus polyfermenticus* SCD

Kwang-Ho Lee, Kyu-Yong Park, Seong-Mi Kim, Won-Seok Kim¹ and Hyun-Dong Paik*
Division of Life Sciences, Kyungnam University, ¹R&D Center, Binex Inc.

Bacillus polyfermenticus SCD, which is commonly called a "Bisroot" 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. Goal of this study was to develop an industrial medium for growth and sporulation of *B. polyfermenticus* SCD. From the results of effect of mixed carbon sources on growth and sporulation of *B. polyfermenticus* SCD, glucose 2% and starch 2% was particularly found to be the most effective for the maximum number of spore production, resulting in spore cells of 4.3×10^9 spores/mL with a sporulation yield of 91%. For the effect of nitrogen sources, the maximum spore cells of 5.7×10^9 spores/mL of *B. polyfermenticus* SCD with a sporulation yield of 97% was obtained when *B. polyfermenticus* SCD was cultivated in an optimum nitrogen source medium containing 5% soybean flour. A medium involving proper phosphate salt yielded the maximum number of a spore cells of 6.0×10^9 spores/mL with a sporulation yield of 95%. Finally, the efficacy of an industrial medium (KH5 medium) on growth and sporulation of *B. polyfermenticus* SCD was investigated in jar fermenter. The higher number of viable cells (3.3×10^{10} cells/mL) and spore cells (3.0×10^{10} spores/mL) were obtained in 5 L fermenter when compared with a 500 mL baffle flask cultivation. Thus, KH5 medium developed in this study shows promise as an industrial medium because of higher cells and sporulation yield.

Key words: Bisroot, probiotics, *Bacillus polyfermenticus* SCD, culture medium, sporulation

서 론

세계화의 흐름을 타고 국가간의 식품 교역이 매년 급격하게 증가하고 있으며, 또한 소비자들은 건강 지향적인 면에 관심을 가지게 되었고, 이에 따라 기능성 식품에 대한 수요 역시 크게 증가되고 있다. 이러한 기능성 식품의 중요한 한 부분으로 프로바이오틱 생균제(probiotics) 분야가 있는데 이는 천연자원이 부족하고 기술집약적인 산업이 절실히 필요한 우리 나라에 아주 적합한 연구 분야로 인식되어 지고 있다^(1,3).

현재 사용되는 프로바이오틱 생균제의 의미는 1965년 Lilley와 Stillwell⁽⁴⁾이 처음 사용한 이래 살아있는 균체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료

를 통해 신체기능 개선을 목적으로 생산된 제품을 말한다^(2,3).

프로바이오틱 생균제들은 살아있는 생균 상태로 사람이나 가축의 장내까지 도달하여 활성을 나타내는 것이 바람직하며 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내 생존력이 커야 한다. 또한, 이러한 생균제용 균주의 특성은 기능적 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 촉진능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능)과 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조과정 중의 생존성)으로 나눌 수 있다. 특히, 현재에 와서 위 내의 낮은 pH에서 생존할 수 있는 내산성, 십이지장의 담즙에 대한 내담즙성, 제조과정에서의 내열성, 항생제에 대한 내성 등의 요건을 갖춘 균주들이 우수한 균주임이 일반적으로 인정되어지고 있다^(2,3).

현재 많이 이용되고 활발히 연구되어지고 있는 프로바이오틱 생균제들은 *Lactobacillus*속, *Lactococcus*속 *Enterococcus*속, *Bifidobacterium*속, *Clostridium*속, *Bacillus*속, *Aspergillus*속, *Saccharomyces*속, *Pediococcus*속 등이 있다⁽⁵⁻⁸⁾. 이중 *Bacillus*속의 균주들은 프로바이오틱 생균제로서의 이용 뿐만아니라 생물산업에서 유용한 물질들을 생산하는데 있어 일반적으로 많

*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

이 사용되며, 산업적으로 매우 중요하다. 즉, *Bacillus* 균주들은 효소, 무독성 항균물질, 살충물질 등을 포함한 여러 가지의 유용한 물질들을 생산하며 또 다른 산물로서 맛의 증대와 아미노산의 생산과 관련된 핵산 관련물질들이 있다^(9,10).

특히, *Bacillus*속 프로바이오틱 생균 중에서 *B. polyfermenticus* SCD는 일반적으로 “비스루트균”이라 불리워지고 있는데 다른 프로바이오틱 생균들과 달리 아포를 형성하기 때문에 장에 도달할 때까지 활성을 거의 잃지 않아 장질환의 치료에 탁월한 효과를 보이고 있다. 이러한 비스루트균은 인공 위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성, 효소 활성, 항생물질에 대한 내성, 알콜에 대한 내성, 병원성 세균에 대한 항균기작 등을 검토한 결과 매우 우수한 프로바이오틱 생균임이 입증되었다⁽³⁾. 한편, 또 다른 연구에 의해 비스루트균은 *B. subtilis*와 매우 유사한 균이라는 것이 밝혀졌으며⁽¹¹⁾, *B. subtilis*와의 차이점은 유당을 대사할 수 있다는 점과, 포도당과 유당으로부터 많은 양의 초산과 젖산을 생산한다는 점이다.

유용 프로바이오틱 생균제의 효율적인 생산을 위한 배지 개발은 산업화에 꼭 필요하므로^(5,9,12), 본 연구에서는 프로바이오틱 생균제로서 매우 유용하다고 판단되는 비스루트균의 효율적인 생산을 위해 저렴하고 경제성이 있는 산업용 배지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용한 *B. polyfermenticus* SCD 균주는 (주)바이넥스 기술연구소에서 분양받았고 3-4회에 걸친 계대배양으로 활성화하였으며, glycerol stock법으로 -70°C 에서 보존하였다. Working culture는 한달에 1회씩 계대배양하여 사용하였다. 종균배지로는 tryptic soy broth(TSB; Difco Laboratories, USA) 배지를 사용하였으며 본배양 배지로는 실험실용(대조용) 배지로 TSB 배지를 사용하였고, 공업용 배지는 탄소원, 질소원 그리고 인산염의 조성을 달리하여 조제하였다⁽¹³⁾. 공업용 배지를 개발하기 위한 탄소원으로는 포도당과 전분이 사용되었고, 질소원으로 펩톤(peptone), 옥수수침지액(corn steep liquor), 대두분(soybean flour)이 사용되었다. 인산염은 KH_2PO_4 를 이용하였으며, 이때 basal medium은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%(w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%(w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%(w/v), MnSO_4 0.002%(w/v), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001%(w/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%(w/v), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%(w/v)이었다. 그리고 배양과정에서 과량의 거품이 발생하지 않도록 antifoam LS-300을 배양액 부피의 1%(v/v)가 되게끔 첨가하여 121°C 에서 15분간 배지를 멸균하였다⁽¹⁴⁾.

배양조건 및 방법

B. polyfermenticus SCD 균을 10 mL test tube의 TSB 배지에 접종하여 37°C 에서 교반속도 180 rpm으로 10시간동안 전배양한 다음 각각의 성분이 조제되어 있는 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에 다시 접종하여 상기와 같은 온도와 교반속도로 72시간동안 본배양을 실시하였다⁽¹⁴⁾. 발효조에서의 배양은 5 L 발효조(Korea Fermenter Co., Korea)를 이용하였으며 온도 32°C , 교반속도 450 rpm, 통기량 1 vvm,

working volume 3 L, 접종비 2%(v/v) 그리고 $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ 으로 조절의 조건으로 72시간동안 실시하였다.

균수의 측정

총균수는 배양액을 0.1% 펩톤수로 10배씩 연속적으로 희석시킨 다음, TSB agar plate에 0.1 mL씩 분주하여 도말을 하였으며, 37°C 에서 24시간 동안 배양을 한 후에 콜로니 형성 단위(colony forming unit)를 측정하여 총균수를 계산하였다. 활성아포수의 측정은 배양액을 80°C 로 조절된 water bath에서 10분간 열처리를 하여 영양세포를 사멸시킨 뒤, 총균수 측정방법과 동일하게 수행되었다⁽¹⁴⁾.

포도당 정량

배양액을 4°C 에서 20분간 $8,000 \times g$ 로 원심분리하여 얻은 상등액을 glucose analyzer(YSI Co., Yellow Springs, Ohio, USA)로 포도당 농도를 측정하였다⁽¹¹⁾.

pH 측정

시간별로 채취한 각각의 배양액을 pH meter를 이용하여 pH 값의 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

실험실용 배지에서의 배양

일반적으로 실험실용으로 *Bacillus* 균주들의 배양에 많이 쓰이는 배지에는 TSB배지와 Luria Bertani(LB) 배지가 있다⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. 본 실험에서는 개발하고자 하는 공업용 배지의 대조구로 TSB 배지를 사용하였으며 배양 조건은 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에서 온도 37°C , 교반속도 180 rpm으로 하여 72시간 동안 진탕배양하였다. 최대 총균수(1.7×10^7 CFU/mL)를 배양 12시간만에 얻었으며 최대 활성 아포수(1.2×10^8 CFU/mL)는 배양 60시간이 경과한 후 얻었다(Fig. 1).

혼합 탄소원의 영향

먼저 예비실험을 통해 *B. polyfermenticus* SCD의 최적 탄

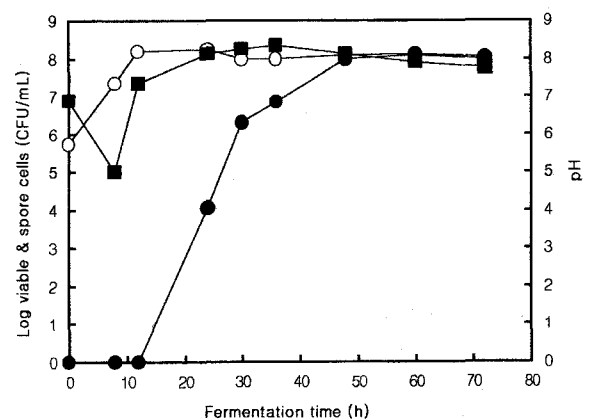


Fig. 1. Cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD in 500 mL baffled flask fermentation with TSB medium. Symbols: ○ -; viable cells(CFU/mL), ● -; spore cells(CFU/mL), ■ -; pH.

Table 1. Effect of various mixed carbon concentration on cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD

Mixed carbon concentration (%)	Final pH	Residual glucose conc. (g/L)	Maximum number of viable cells (CFU/mL)	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Sporulation (%)	Fermentation time (h)
Glucose 1 % + Starch 2 %	8.4	ND	3.3×10^9	3.2×10^9	97	72
Glucose 2 % + Starch 1 %	8.5	ND	2.7×10^9	1.5×10^9	56	72
Glucose 2 % + Starch 2 %	8.0	ND	4.7×10^9	4.3×10^9	91	72
Glucose 3 % + Starch 1 %	8.4	3.95	2.4×10^9	2.3×10^9	96	72
Glucose 3 % + Starch 2 %	5.0	13.6	3.8×10^8	3.0×10^8	79	72
Glucose 4 % + Starch 1 %	4.5	13.9	3.8×10^7	7.0×10^5	1.8	72
Glucose 5 % + Starch 1 %	4.5	15.0	3.5×10^6	2.3×10^5	6.6	72

ND: Not detected.

Table 2. Effect of various soybean flour concentration on cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD

Soybean flour concentration (%)	Final pH	Residual glucose conc. (g/L)	Maximum number of viable cells (CFU/mL)	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Sporulation (%)	Fermentation time (h)
1	4.4	ND	9.5×10^6	3.2×10^6	63	60
2	7.2	ND	1.1×10^8	3.0×10^7	27	60
3	4.2	ND	3.6×10^9	4.1×10^9	>100	60
4	4.7	ND	3.9×10^9	4.5×10^9	>100	60
5	4.8	ND	5.9×10^9	5.7×10^9	97	60
6	8.8	ND	4.4×10^9	3.0×10^9	68	60
7	9.0	ND	5.5×10^9	3.3×10^9	60	60

ND: Not detected.

소원으로 포도당과 전분이 우수하여, 이 두 탄소원의 비율을 변화하여 최적의 혼합 탄소원 농도를 결정하고자 하였다. 기본 질소원으로 펩톤 1.5%(w/v)를 첨가하였고^(18,19), 포도당과 전분의 비율이 조정된 각각의 배지에 균을 접종하고 37°C에서 72시간 동안 진탕배양을 실시하여 배양 중 균의 증식에 따른 pH의 변화와 잔존하는 포도당의 농도, 총균수와 활성 아포수를 측정하였다(Table 1). 실험 결과 배양 배지 중 혼합 탄소원의 농도가 포도당 2%와 전분 2%일 때 가장 높은 최대 총균수(4.7×10^9 CFU/mL)를 배양 24시간째에 얻었으며, 48시간이 경과한 후에 최대 활성아포수(4.3×10^9 CFU/mL)를 나타내었다. 포자의 형성은 24시간째부터 급격하게 증가하여 배양 48시간만에 최고치에 이르렀다. 이런 높은 수치의 활성 아포수를 나타낸 배경중 한가지는 α -amylase가 전분을 소비하는데 있어 많은 양의 에너지를 유리시키는데 중요한 역할을 담당했을 것이라고 생각된다⁽²⁰⁾. 그리고 과도한 당의 농도는 균체의 증식을 억제하고, 포자의 형성에 있어서도 오히려 저해할 수 있다는 연구⁽¹⁸⁾와 일치함을 본 실험에서 보였다. pH 변화에 있어서는 배양이 되면서 균의 증식이 이루어 질때 보통 배양 초기에는 pH가 감소하다가, 시간이 경과함에 따라 서서히 증가하여 pH가 거의 8.0~8.5 수준에 이르는 결과를 보였다. 그 이유는 균체가 증식함에 따라 유기산을 생성하면서 pH의 감소가 이

루어졌으며, 생성된 유기산을 세포의 동화작용에 의하여 pH가 증가된 것으로 판단할 수 있다^(21,22).

최적 질소원의 영향

질소원의 탐색에 있어서 산업적으로 구입이 용이하고 비용이 저렴한 경제적인 3종의 산업용 배지를 선정하여 균체의 증식과 아포의 형성을 검토하였다^(9,23-25). 3종의 산업용 질소원으로는 펩톤, 옥수수침지액 그리고 대두분을 이용하였다. 단독 및 혼합 질소원에 따른 *B. polyfermenticus* SCD의 최대 총균수와 활성아포수를 검토한 결과, 대두분이 가장 우수한 질소원으로 판명되었다. 질소원 중 옥수수침지액을 이용하여 배양을 실시할 때 매우 낮은 균체 증식과 아포형성을 나타내었으며, 배양액의 색깔이 진하여 외관상으로 볼 때 식품용으로는 부적절하다고 판단되었다. 그러나 대두분을 이용하여 배양할 때는 *Bacillus* 속의 특이한 냄새가 다소 줄어들었으며 배양액의 색깔 또한 다른 질소원을 이용할 때 보다 밝아 최종 제품의 색깔에 영향을 적게 주는 것으로 판단되어 최적의 질소원으로 선정하였다. 이 사실을 토대로 하여 대두분의 여러 농도에서 활성아포수를 검토한 결과, 배양배지 중에 5%로 첨가될 때 가장 높은 수치의 최대 총균수(5.9×10^9 CFU/mL)와 활성아포수(5.7×10^9 CFU/mL)를 얻을 수 있었다(Table 2). 질소원에 대한 실험은 앞에서 검토한 최적 탄소원

Table 3. Effect of various potassium phosphate concentration on cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD

Potassium phosphate concentration (%)	Final pH	Residual glucose conc. (g/L)	Maximum number of viable cells (CFU/mL)	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Sporulation (%)	Fermentation time (h)
0.1	4.8	ND	2.8×10^6	1.0×10^6	35	60
0.3	8.8	ND	3.6×10^8	4.2×10^7	11	60
0.5	8.8	ND	4.3×10^9	3.4×10^9	79	60
0.7	8.7	ND	5.4×10^9	5.0×10^9	92	60
1.0	8.4	ND	6.3×10^9	6.0×10^9	95	60
1.2	8.1	ND	4.5×10^9	4.4×10^9	97	60
1.5	7.7	ND	4.3×10^9	3.9×10^9	90	60

ND: Not detected.

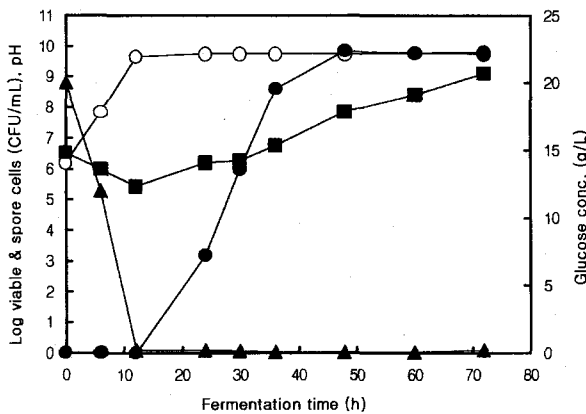


Fig. 2. Cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD in 500 mL baffle flask fermentation with KH5 medium. Symbols: -○-; viable cells(CFU/mL), -●-; spore cells(CFU/mL), -■-; pH, -▲-; glucose concentration(g/L).

(포도당 2% + 전분 2%)을 기초로 하여 실시하였으며 균체의 증식에 따른 당의 소비와 pH 변화를 탄소원 실험과 마찬가지로 측정하였다(Table 2).

인산염 영향

*Bacillus*속 균주에 있어서 포자의 형성은 고농도의 균체, 영양분 제한, 많은 무기염의 첨가, 중성의 pH, 적당한 배양 온도, 그리고 인산염 등에 의해서 큰 영향을 받는 것으로 잘 알려져 있다⁽²²⁾. 본 연구에서는 아포의 형성을 극대화하기 위하여 인산염의 농도에 따른 변화를 검토하였다. 그 이유는 인산염이 포자의 주요한 구성성분이 되기 때문이기도 하다⁽²⁰⁾. KH_2PO_4 를 인산염으로 사용하였으며, 각각의 배양배지 상에 KH_2PO_4 의 농도를 달리하여 첨가한 뒤 균을 접종하여 72시간 동안 진탕배양을 한 결과^(26,27), KH_2PO_4 가 1%(w/v) 첨가 되었을 때 최대 총균수(6.3×10^9 CFU/mL)와 활성아포수(6.0×10^9 CFU/mL)를 나타내었고 아포형성율은 95%로 나타났다. 아포형성율은 KH_2PO_4 가 1.2%로 조성되었을 때 97%로 가장 높았지만 최대 총균수와 활성아포수가 1.0%로 조성되었을 때보다 낮았기 때문에 최적 인산염 농도를 1.0%로 결정하였다(Table 3). 이와같은 결과는 인산염의 농도를 높여 줌으로서 균수와 아포수 그리고 아포형성율이 대체적으로 증가함을 알 수 있었고⁽²⁰⁾ 인산염이 아포의 형성뿐만 아니라 균

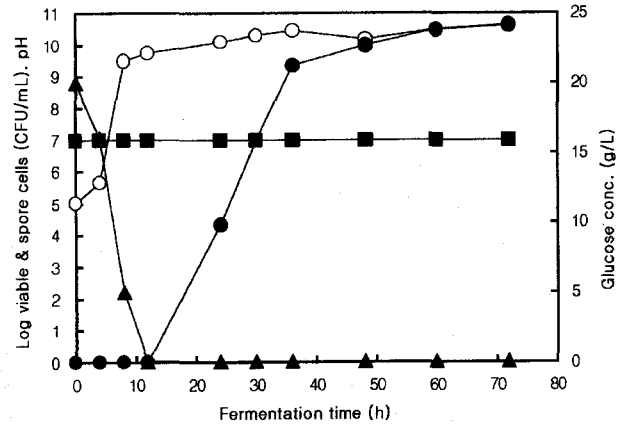


Fig. 3. pH 7.0-controlled batch fermentation of *B. polyfermenticus* SCD in 5 L jar fermenter with KH5 medium. Symbols: -○-; viable cells(CFU/mL), -●-; spore cells(CFU/mL), -■-; pH, -▲-; glucose concentration(g/L).

체의 증식에도 아주 중요한 인자로서 작용한다는 것을 보여주는 것이라 생각된다.

따라서 탄소원과 질소원 그리고 인산염에 대한 *B. polyfermenticus* SCD의 영향을 검토하여 각각의 최대 총균수와 활성아포수를 측정된 결과를 종합하여 가장 높은 생산성을 보이는 배지조성을 본 연구의 최적 산업용 배지로 선정하였고 KH5 배지로 명명하였으며, 그 조성은 다음과 같다. 기본 배지에 탄소원으로는 포도당 2% + 전분 2%, 질소원으로는 대두분 5% 그리고 인산염은 KH_2PO_4 1%이었다.

발효조에서의 배양

본 연구를 통해 *B. polyfermenticus* SCD에 대한 최적의 산업용 배지인 KH5 배지를 구하였고, 플라스크 규모에서의 배양실험은 500 mL baffle flask에서 *B. polyfermenticus* SCD를 배양하여 최대 총균수와 활성아포수를 비교 검토하였다(Fig. 2).

실험실용 규모인 5 L 발효조에서 기본적인 배양 조건하에서 배양을 실시하여 KH5 배지의 총균수와 활성아포수를 검토하였다⁽¹⁴⁾(Fig. 3). 최종적으로 500 mL baffle flask에서 TSB 배지와 KH5 배지에서의 생산성을 비교한 결과 5배 증가됨을 알 수 있었고, 5 L 발효조에서 배양하였을 경우 다시 5배 생산성이 향상된 것으로 확인되었다(Table 4). 본 연구를 통해 *B. polyfermenticus* SCD의 활성아포 생산을 위한 KH5

Table 4. Comparison of cell growth and spore production by *B. polyfermenticus* SCD

Fermentation medium/system	Final pH	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Sporulation (%)	Fermentation time (h)	Spore productivity (spores/mL/h)
TSB medium in 500 mL baffle flask	7.9	1.7×10^8	1.2×10^8	71	60	2.0×10^6
KH5 medium in 500 mL baffle flask	8.4	6.3×10^9	6.0×10^9	95	60	1.0×10^8
KH5 medium in 5 L jar fermenter	7.0±0.1	3.2×10^{10}	3.0×10^{10}	94	60	5.0×10^8

배지를 이용하여 고농도의 포자를 생산할 수 있게 되었으며, 향후 발효조에서의 배양 조건들을 검토하여 생산성을 높일 수 있는 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 프로바이오틱 생균인 비스루트균의 최적 배지 탐색을 위해 탄소원, 질소원 그리고 아포형성의 극대화를 위한 인산염의 최적 농도를 검토하였다. 500 mL baffle flask 에서 배양을 실시한 결과, 탄소원 영향 실험에서는 포도당 2%(w/v)와 전분 2%(w/v)가 첨가되었을 때 최대 총균수 (4.7×10^9 CFU/mL)와 활성아포수(4.3×10^9 CFU/mL)를 보였으며 아포형성율은 91%이었다. 질소원 영향 실험에서는 대두분 5%(w/v) 첨가되었을 때 최대 총균수(5.9×10^9 CFU/mL)와 활성아포수(5.7×10^9 CFU/mL)를 나타내었다. 그리고, 인산염 실험에서는 최대 총균수(6.3×10^9 CFU/mL)와 활성아포수(6.0×10^9 CFU/mL)를 KH_2PO_4 를 1%(w/v) 첨가되었을 때 얻을 수 있었으며 아포형성율은 95%를 보였다. 5 L 발효조에서 최적 배지인 KH5 배지를 이용하여 32°C의 온도에서 통기량 1 vvm, 교반속도 450 rpm, pH 7.0 ± 0.1로 맞추어 회분식 배양을 실시한 결과 최대 총균수는 3.3×10^{10} CFU/mL을 보였으며 최대 활성아포수는 3.0×10^{10} CFU/mL을 나타내었고, 아포형성율은 94%를 나타내었다. 이때 아포 생산성은 5×10^8 spores/mL/h이었다.

문 헌

- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E. and Salminen, S. Probiotics in the management of atopic eczema. Clin. Exp. Allergy 30: 1604-1610 (2000)
- Yoon, S.-S. Design of lactic acid bacteria aiming at probiotic culture and molecular typing for phylogenetic identification. J. Korean Dairy Technol. Sci. 18: 47-60 (2000)
- Paik, H.-D., Jung, M.-Y., Jung, H.Y., Kim, W.-S. and Kim, K.-T. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 73-78 (2001)
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. Science 147: 747-748 (1965)
- Kim, W.-J., Hong, S.-S. and Cha, S.-K. Selection of human-originated *Lactobacillus acidophilus* for production of probiotics. J. Microbiol. Biotechnol. 4: 151-154 (1994)
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S. and Okamoto, T. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Lett. Appl. Microbiol. 29: 313-316 (1999)

- Kailasapathy, K. and Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol. Cell Biol. 78: 80-88 (2000)
- Pessi, T., Sutas, Y., Hurme, M. and Isolauri, E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. Clin. Exp. Allergy 30: 1804-1808 (2000)
- Pearson, D. and Ward, O.P. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnol. Lett. 10: 451-456 (1988)
- Paik, H.-D., Lee, N.-K., Lee, K.-H., Hwang, Y.-I. and Pan, J.-G. Identification and partial characterization of cerein BS229, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* BS229. J. Microbiol. Biotechnol. 10: 195-200 (2000)
- Jun, K.-D., Lee, K.-H., Kim, W.-S. and Paik, H.-D. Microbiological identification of medical probiotic bispan strain. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 124-127 (2000)
- Hong, S.-S., Kim, W.-J., Cha, S.-K. and Lee, B.H. Growth of *Lactobacillus acidophilus* in whey-based medium and preparation of cell concentrate for production of probiotics. J. Microbiol. Biotechnol. 6: 128-131 (1996)
- Nicholson, W.L. and Setlow, P. Sporulation, germination and outgrowth, pp. 391-429. In: Molecular Biology Methods for *Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds.). John Wiley & Sons Ltd., USA.
- Paik, H.-D., Jeon, K.-D., Kim, W.-S., Kim, H.-S. and Lee, B.-C. Liquid cultivation of strains of *Bacillus polyfermenticus*. United States Patent 6,010,898 (2000)
- Kim, H.-J., Lee, N.-K., Cho, S.-M., Kim, K.-T. and Paik, H.-D. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria by lactacin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 from fermented fish food. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1035-1043 (1999)
- Lee, K.-H., Jun, K.-D., Kim, W.-S. and Paik, H.-D. Partial characterization of polyfermentacin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. Lett. Appl. Microbiol. 32: 146-151 (2001)
- Jeong, Y.K., Park, J.U., Baek, H., Park, S.H., Kong, I.S., Kim, D.W. and Joo, W.H. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. World J. Microbiol. Biotechnol. 17: 89-92 (2001)
- Kuppusamy, M. and Balaraman, K. Fed-batch fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesising delta endotoxin. Indian J. Exp. Biol. 29: 1031-1034 (1991)
- Kademi, A., Fakhreddine, L., Ait-Abdelkader, N. and Baratti, J.C. Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate thermophile *Bacillus circulans* MAS2. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 23: 188-193 (1999)
- Markkanen, P.H. and Enari, T. The effect of phosphate on α -amylase production and sporulation by *Bacillus subtilis*. Acta Chem. Scand. 26: 3543-3548 (1972)
- Spudich, J.A. and Kornberg, A. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination: protein turnover during sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 243: 4600-4605 (1968)

22. Warriner, K. and Waites, W.M. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 97-102 (1999)
23. Choi, S.H., Kang, S.K. and Ryu, Y.W. Production of *Bacillus thuringiensis* spore using an industrial medium. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 644-648 (1998)
24. Yu, X., Hallett, S.G., Sheppard, J. and Watson, A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 20: 333-338 (1998)
25. Subramaniyan, S. and Sandhia, G.S. and Prema, P. Control of xylanase production without protease activity in *Bacillus* sp. by selection of nitrogen source. *Biotechnol. Lett.* 23: 369-371 (2001)
26. Zouari, N. and Jaoua, S. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 23: 497-502 (1999)
27. Luna, C.L., Rios, E.M.M. and Lopes, C.E. On the settling of *Bacillus sphaericus* spores by pH adjustment. *Biotechnol. Lett.* 23: 1011-1013 (2001)

(2001년 9월 19일 접수)