

특집: 식품유래 미생물의 산업적 활용

포스트바이오틱스(Postbiotics): 신규 기능성 미생물 소재의 개발

이 영 경

한국식품연구원 전통식품연구단

Postbiotics: Development of Novel Probiotic Product

YoungKyoung Rhee

Research group of Traditional Food, Korea Food Research Institute, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea

서 론

교통(운송)수단의 발달로 세계는 1일 생활권을 눈앞에 두고 국가 간, 지역 간의 인적·물적 교류 증가가 확산되었다. 하지만 그로 인한 부작용으로 사스(SARS), 메르스(MERS) 등의 판데믹(pandemic) 질병 증가, 환경오염, 스트레스 증가, 초고령사회의 가속화 등 주변 요인, 즉 사회·환경 요인의 변수들로 인해 예방 차원의 개인 건강에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 특히 장내 미생물과 건강 간의 관계가 밝혀지면서 이 균형에 직접적인 영향을 주는 프로바이오틱스의 성장세가 눈부시다. 2012년 519억 원 규모였던 국내 프로바이오틱스 시장은 2015년 1,579억 원으로 3배 이상 성장하였고, 2016년엔 1,903억 원 매출을 기록하여 2,000억 원대 시장진입을 눈앞에 두고 있다(Table 1)(1). 특히 여러 미생물 중 *Lactobacillus* sp. 등의 유산균은 일반인들에겐 ‘프로바이오틱스=유산균’으로 인식될 정도로 많은 소재와 관련 제품들이 시판되고 있다. 제품의 범위를 건강기능식품(이하 ‘건기식’)에서 과자류 등 일반 식품으로까지 빠르게 확대되고 있으며, 건기식 소재에서 시작한 빠른 성장세는 식품 범위를 넘어 해외 수입 군주들이 주류를 이루는 제약사업 분야까지 확장될 것으로 예측되고 있다(2).

현재 우리나라 건강기능성 미생물 시장은 ‘프로바이오틱스’, 즉 ‘살아있는’ 미생물 소재에 지나치게 치우쳐 있어 나노화 기술, 기능성 사균 소재 개발 등 소재 변형 기술이 다양하게 발달한 해외시장에 비해, 코팅기술 등 생균 활

성 유지를 위한 기술들에 집중되어 있다. 고시형 건강기능성 소재의 규격에도 생균수를 규격 기준으로 제시하고 있어 새로 개별인정형 소재로 등록하지 않는다면 건기식 소재로 인정받기 위해선 이 규격을 따라야 한다. 생균 제제에는 생균만 존재하며, 살아있는 균만이 기능성을 부여하는 역할을 하는가. 물론 프로바이오틱스는 우리 건강에 좋은 영향을 미치는 우수한 기능성 소재이고, 앞으로의 발전 가능성도 무궁무진하다. 그러나 ‘살아있는’ 소재라는 제한점은 ‘살아있는’ 상태를 유지해야만 한다. 이 때문에 건조공정에도 분무건조나 다른 경제적인 건조법 대신 비용이 많이 드는 동결건조방법을 적용해야 하며, 상온에 두면 생균수가 급격히 감소하기 때문에 유통기한을 연장하기 위해서는 에너지 소모가 많고 값비싼 냉장 유통 기술을 적용해야 한다. 또한 미생물이 존재하기 때문에 가공·유통 중에 부발효 진행을 막기 위해서는 과립이나 캡슐 같은 제약형 제재형태를 유지해야 한다. 생균 상태로는 수분 활성이 높은 음료, 열처리 공정이 많은 조리나 가공식품에는 미생물 증식으로 인한 식품 자체의 품질 저하나 생균수 저하에 대한 우려로 적용할 수 없기 때문이다.

본 고에서는 소비자가 우수한 유산균 소재를 일반 식품 형태로도 저렴하고 손쉽게 접할 수 있도록 하기 위한 유산균 소재인 균체 활용 소재, 즉 유산균으로 만드는 포스트바이오틱스 소재에 대한 정보를 제공하고자 한다(3).

포스트바이오틱스는 프로바이오틱스의 생리활성이 아닌 미생물의 외벽을 이루고 있는 세포벽 성분에 의해 기능이 발현되므로 ‘고스트 프로바이오틱스(Ghost probiotics)’ 또는 ‘좀비 프로바이오틱스(Zombie probiotics)’로 별칭되기도 한다. 사균 소재의 기능성 발현을 이해하기 위해 먼저 프로바이오틱스의 세포벽 구조, 특히 유산균이 포함된 Gram 양성균의 세포벽 특성을 살펴보고자 한다.

유산균의 세포벽 구조와 역할

세포벽의 구성이 단조로운 효모의 경우, 다양한 β -glucan 추출 기술은 물론, 세포벽 변형을 통한 vaccine 제조

Table 1. Domestic probiotic market status

	Total sales amount (Billion, won)	Annual growth (%)
2012	519	Δ 27.9
2013	804	Δ 54.9
2014	1,388	Δ 72.6
2015	1,579	Δ 13.8
2016	1,903 ¹⁾	Δ 20.5

¹⁾Domestic: 1,569, Exports: 334

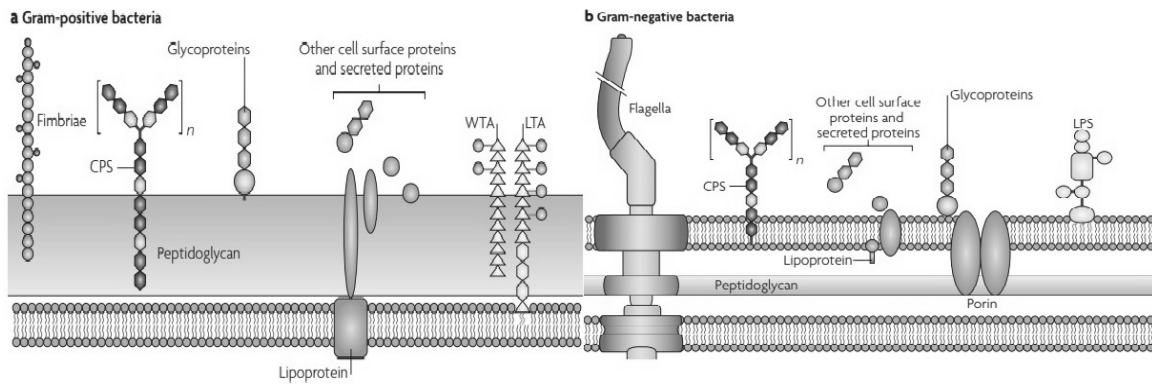


Fig. 1. The cell wall structure of gram (+) and gram (-) bacteria (6).

기술까지, 한 종(種)의 미생물에 대해 적용할 수 있는 여러 가지 기술이 개발되어 있다. 그러나 Gram 양성균인 *Lactobacillus* sp. 등의 세포벽은 미생물의 내부기관을 보호하기 위해, 세포막을 둘러싸고 있는 펩티도글리칸(Peptidoglycan, PG)과 이를 수식하고 있는 테이코산(Teichoic acids, TA), 피막 다당(Capsular polysaccharides(CPS)), 세포벽 다당(Wall polysaccharides (WPS)), 세포외 다당(Extracellular polysaccharides (EPS)), 표면 단백질(Surface protein 또는 Cell wall protein)의 복잡한 구조로 구성되어 있다. Gram 음성균의 구조에 비하면 펩티도글리칸층이 훨씬 더 두꺼운 특징

이 있다(Fig. 1)(1,4).

Gram 양성균 세포벽 구성과 역할은 다음과 같다 (Table 2).

펩티도글리칸

Gram 양성균 세포벽의 주된 구성 요소인 펩티도글리칸은 N-acetylglucosamine(GlcNAc)과 N-acetylmuramic acid(MurNAc)가 β -1,4 결합을 이루고 있으며, 30~100 nm의 두꺼운 두께로 내부를 보호한다. 이 구조를 기반으로 테이코산인 Wall teichoic acids(WTA)가 공유 결합으로 연결되어 있고, anion glycopolymers인 CPS

Table 2. Role of cell wall constituents in lactic acid bacteria (4)

	Role
PG	<i>O</i> -acetyl of MurNAc
	Resistance to lysozyme
	Activation of autolysis
	<i>O</i> -acetyl of GlcNAc
	Inhibition of major autolysin Acm2
	<i>N</i> -deacetylation of GlcNAc
Teichoic acids	Resistance to lysozyme
	Inhibition of autolysis
	Inhibition of AcmA major autolysin
	Amidation of D-Asp
	Resistance to lysozyme
	Inhibition of autolysis
Polysaccharides	Amidation of mDAP
	Resistance to nisin
	Essential for growth
	Control of septation
	Increase DacB L,D-carboxypeptidase activity
	WTA
Polysaccharides	Bacterial morphogenesis and division
	LTA
	Immunomodulatory properties
	TA alanylation
	Cell morphology
	UV stress response
	Protein secretion
	Resistance to nisin
	Bacteriophage receptor
	Adhesion to epithelial cells
	Decrease of anti-inflammatory properties
	Colonization of mouse GI tract
Polysaccharides	Cell division and morphology
	Bacteriophage receptor
	Protection against phagocytosis
	Immunosuppressive function
	Decrease adhesion and biofilm formation
Polysaccharides	Protection against antimicrobial peptides

와도 연결되어 있다. 펩티도글리칸층은 많은 기능을 수행하지만 가장 핵심적인 것은 20기압에 달하는 압력으로부터 세포막의 형태를 유지하며 세포 생존에 크게 기여한다는 것이다. 또한 이 층에 연결된 구조들로 인해 세포 분열 또는 증식 중에 세포 외형을 재구성하는 것이 가능해지고, 외부로부터 유입되는 영양물질이나 금속의 제거, 표면 결합과 군집(colony) 형성을 촉진하는 역할이 이뤄진다(4). 이렇듯 펩티도글리칸층은 그 자체뿐 아니라 결합된 구조들의 튼튼한 기반 역할을 담당하고 있기 때문에 미생물을 제어하는 항생제 개발 전략의 주요 타깃으로 제시되고 있으며, β -lactam 계열 항생제는 펩티도글리칸 합성 기작에 관여하는 대표적인 약물로 손꼽히고 있다(5).

테이코산

Gram 양성균에서 많이 발견되는 성분이다. 테이코산은 크게 펩티도글리칸층에 연결된 WTA와 세포막 외부에 당지질(glycolipid) 구조에 의해 연결된 Lipoteichoic acid (LTA) 2가지로 구분할 수 있다. 일반적으로 세포구조에서 테이코산은 세포벽에 근접한 이온 저장소로서 세포내 효소 활성화를 위해 필요한 이온을 공급하는 역할을 한다. 그 외에도 자가분해효소 조절, 미생물의 세포 형태 유지, bacteriophages 감지, 생체 면역체계와의 상호작용, 생체 정착의 기능을 수행한다(4).

WTA는 대부분 poly-ribitol phosphate 또는 poly-glycerophosphate chains로 이뤄져 있으며, 펩티도글리칸층의 MurNAc의 C6-hydroxyl기에 phosphodiester 결합으로 연결되어 있다. 미생물 세포 생장 및 형태 유지에 중요한 요소로 알려져 있다.

일부 예외적인 경우를 제외한 대부분 미생물에서 WTA와 LTA의 생합성 과정은 서로 별도의 경로를 거쳐 만들어지게 된다. *Lactococcus lactis*에 대한 연구결과에선 D-anlylation으로 단백질 분비에 영향을 미칠 뿐 아니라 UV stress에 대한 저항성, 양이온계 항생물질인 nisin에 대한 저항성을 갖게 한다. 또한, TLR2(Toll-like receptor 2)와 결합하여 생체 면역체계에서 cytokines 분비를 유도하고, 소수성 작용기전을 통해 상피세포에 정착하는 것과 상관이 있는 것으로 나타났다(4).

세포벽 다당

Gram 양성균의 세포벽에는 그 구조에 종종 다당층이 포함된다. 다당층을 크게 3가지 종류로 구별하면 1) 미생물이 세포 밖으로 분비한 다당이 세포벽에 느슨하게 연결된 세포 외 다당, 2) 미생물 세포에 영구적으로 단단한 결합을 이루고 있는 피막 다당, 3) 앞의 두 가지 다당 형태에 비해 비정형성을 띠는 기타 세포벽 다당으로 나눌 수 있다. 이들 세포벽에 연결된 다당들은 종류, 조성, 결합 방법들이 매우 다양하며 면역세포 감작과 같은 생체 상호작용과의 연관성 외에도 biofilm 형성을 통해 세포의 저항성뿐 아니라 발효제품의 물성을 변화시키는 데에도 크게

관여한다(4).

표면 단백질

세포질에서 합성된 단백질의 5~10%는 미생물 세포 외부로 분비되고, 세포 외부와 결합을 유지하는 층을 이루게 된다. 이 구조는 프로바이오틱스의 장 정착, GI(Gastrointestinal) tract 중에서의 생존, 장관면역계와의 상호작용 등과 관련 있는 것으로 알려져 있다. GRAS(Generally Recognized as Safe) grade로 여겨지는 유산균이 GI tract의 장관면역을 활성화하는 치료용 단백질 또는 항원을 운반하는 편리한 벡터로 여겨져서 경구 백신 개발에 기여할 것으로 기대되는 부분이 이 구조층에 해당한다(4).

이러한 세포벽 구조물들은 자체 기능 유지를 위해서도 필요하지만, 외부 환경과 세포의 상호작용이 일어나는 원인을 제공하기 때문에 생균이 아닌 미생물 소재에서도 생체면역체계를 활성화하는 등의 기능성을 기대할 수 있게 된다.

포스트바이오틱스 소재 공정: 미생물 불활성화

프로바이오틱스는 건강에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물로 정의한다. 그러나 프로바이오틱스에 기대할 수 있는 생리활성은 미생물의 세포벽 구조물로 인해 작동하는 부분이 적지 않기 때문에 ‘생균만 유효한 소재인가’라는 논쟁의 여지가 남아 있다. Table 3에 ‘살아있는’ 또는 ‘불활성화’된 미생물 소재의 대표적 특성을 간략히 비교 정리하였다.

생균소재, 프로바이오틱스에 대해서는 많은 연구가 진행된 데 반해, 포스트바이오틱스(불활성화된 유산균 또는 세포벽 분획물)에 대한 연구는 상대적으로 적은 수준을 유지하고 있다. 현재까지의 연구결과에 따르면, 생균 대비 사균(포스트바이오틱스)의 효능 발현 정도는 어떤 처리 방법을 사용했는가와 밀접한 관련이 있다. 소재 미생물의 세포벽 특성에 따라 사균화 과정의 처리 방법이 구성 단백질 변성을 유도하거나 구조 결합을 약화시켜 효능 정도에도 영향을 미친다. 대체로 생균에 비해 사균의 효능이 낮게 나타나는 것은 포스트바이오틱스를 만들기 위한 공정 처리로 세포벽 구조 변형이 오고 이로 인해 생체 면역체계 자극 정도가 달라지기 때문으로 설명되고 있다(3).

다음은 연구 목적 또는 상업적으로 활용되는 미생물 불활성화 공정, 포스트바이오틱스 처리 공정을 설명한 것이다.

• **열처리:** 살균, 멸균, 토탈화 등 온도, 가열 시간 등의 조건을 조절하여 미생물을 불활성화시키게 되며, 미생물마다 구조적 특성에 따라 세부적인 조건이 다르다. 가열에 의한 불활성화는 활성 유지가 불가능하게 되는 임계점

Table 3. Differences between probiotics and their products

	Probiotics (live organisms)	Probiotic products (dead organisms)
Definition	Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host (7)	Nonviable bacterial cells and their cell wall fractions
Mechanisms for functionality	<ul style="list-style-type: none"> • Direct inhibition against harmful bacteria producing carcinogenic substances in the GI tract • Producing organic acids, essential nutrients and bacteriocin • Influence on the microbiota and immune response of the host 	<ul style="list-style-type: none"> • Influence on the mucosal immune response of the host • Normalization of microbiota by host immune system recovery
Characteristics during products processing, storages and distribution	<ul style="list-style-type: none"> • Application of expensive processing storage technology to prevent degradation of living cells during production, storage and distribution (freeze drying, cold chain system, etc.) • Restricted product form considering water activity to prevent the degeneration of live organisms (Powder or capsule) 	<ul style="list-style-type: none"> • Storage on room temperature • By some kinds of bacterial strains, application of economic drying methods such as spray drying • No restriction for product type (Beverage, snack, candies etc.)

이상에서 세포의 구성 요소 변형으로 자가 복제가 불가능해지거나 비가역적인 기능 손상을 거쳐 나타난다. 세포벽 구조 변형으로 Mg 이온을 킬레이션하여 세포 내 대사 저해를 가져오거나 원형질 세포막의 손상으로 인한 이온이나 UV 흡수물질 유입 이상, 삼투압 및 pH에 대한 항상성 손상, 단백질 구조 손상을 예로 들 수 있다. 이 공정에선 생장상, 생장 온도, 배지조성, pH, 수분 활성 등을 불활성화 조건의 주요 요인으로 꼽을 수 있다(8).

• **UV 조사:** Vacuum UV(100~200 nm), UVC(200~280 nm), UVB(280~315 nm), UVA(315~400 nm) 중 미생물 불활성화에 가장 크게 영향을 미치는 것은 UVC이다. 세포벽 변형에 의해서라기보다 유전체 변형을 유도하여 불활성화시키는 것으로 알려져 있다(9).

• **초음파 처리(Sonication):** 1960년대부터 사용된 이 방법은 세포막 박막화, 부분 가열 효과, free radical 생성이 주요 미생물 불활성화 원인으로 작용한다. 초음파가 액체를 만나면 종파(longitudinal waves)의 작용으로 압축과 팽창이 번갈아 일어나는 영역이 만들어지고, 이로 인한 압력 변화로 기포가 생성된다. 그러나 여기에 작용하는 초음파 에너지는 기포가 팽창하여 증기화되기엔 부족하기 때문에 빠른 응축상태가 진행되고, 응축된 분자가 충돌하여 충격파를 생성하며, 이 충격파는 매우 높은 온도와 압력(최대 5,500 jc/50,000 kPa)을 만들어 미생물을 불활성화시킨다. 이 공정은 초음파의 진폭, 노출 시간, 처리 시료량, 온도 등의 요소에 의해 영향을 받는다(10).

• **펄스 전기장(Pulsed electric fields):** 전기장 처리에 의해 세포 표면이 매우 거칠어지고, 정착과 관련한 세포 소수성 특성도 소실되면서 미생물이 불활성화된다(11).

• **저온 플라즈마:** 아르곤, 헬륨, 질소, 압축 공기 등이 이온화한 하전된 가스이며, 라디칼, 대전 입자, UV 광자 등이 포함된다. 미생물 불활성화와 상관성이 있는 플라즈마는 활성산소, 과산화수소, UV 광자가 대표적이다. 작용

기전은 1차적으로 세포벽 파괴에 의한 세포기관의 유출, 2차적으로 활성산소 같은 반응성 종이 세포 내로 유입되면서 DNA 등이 손상되는 것으로 여겨진다(12).

• **효소 처리:** 세포벽 성분인 펩티도글리칸을 분해하는 murein 가수분해효소가 주로 이용되며, 다당 결합을 끊는 glycosidase, 펩타이드 결합을 끊는 endopeptidase, 다당과 펩타이드의 연결을 끊는 amidase로 구분된다. 이외에도 펩티도글리칸 분해와는 무관하지만 세포막 손상을 야기하는 c-type lysozyme, lysozyme 저항성이 있는 Gram 양성균 분해효소 등이 있다(13).

• **세포 분획물 추출:** 미생물 파쇄와 원심분리 과정 등을 거쳐 얻은 세포벽 분획, 테이코산(WTA, LTA)을 포함한 미생물 구성 요소들이 *in vitro* 상에서 면역 세포 활성 조절(자극/저해)이 있는 것으로 보고되고 있다(3).

프로바이오틱스(생균) 섭취 시 장내 균총의 변화를 가능하게 하는 것은, ‘생장과 정착’이라는 살아있는 균만이 가질 수 있는 특성 때문에 나타나는 고유 기능성이라 상식처럼 여겨졌다. 그러나 불활성화된 포스트바이오틱스 소재를 섭취했을 때도 생체 면역기능 변화와 함께 GI tract의 균총 변화도 가능하다는 연구결과들이 제시되고 있으며, 이와 관련된 포스트바이오틱스 기능성 소재도 개발된 바 있다(14~17). 생균과 비교해도 효능에 차이가 없는 포스트바이오틱스 소재 개발을 위해서는 먼저 공정 중 변형이 적은 세포벽 구조의 미생물 종(種) 또는 strains를 선택해야 하고, 세포벽 변형을 최소화하는 불활성화 공정 조건을 찾는 것이 중요한 관건이 될 것이다.

해외 시장 포스트바이오틱스 소재 연구 및 개발 현황

Zorzela 등은 전문검색 엔진을 통해 2017년 2월까지

유산균 포스트바이오틱스 소재 임상연구 결과를 수집하여 systematic review 결과를 보고하였다(18). 설사, 구강건강, 호흡기 질환, 아토피, 알레르기, 패혈증 등의 다양한 증상 또는 병명에 대한 임상연구에서 예방 효과 연구의 86%, 치료 효과 연구의 69%가 생균과 비교했을 때 유의적인 차이가 없다는 분석 결과를 제시하였다. 프로바이오틱스와 포스트바이오틱스 중 어느 것이 더 효과가 좋은가에 대한 질문은 여전히 남아있다. 그러나 포스트바이오틱스가 프로바이오틱스 처방이 어려운 고위험 환자군에게 제시할 수 있는 대체제가 된다는 점, 경제성과 적용할 수 있는 응용 분야에 대한 확장성이 좋다는 점, 소재 보안성이 좋다는 점 등은 해당 소재의 발전 가능성을 높이는 긍정적인 요소라 하겠다.

이미 일부 국내업체에서 포스트바이오틱스를 개발하여 출시하거나 개별 인정형 건기식 소재로 등록하기 위해 준비 중이지만 일반 소비자에게 아직은 낯선 소재 분야이다. 그러나 홍보 부족으로 익숙지 않을 뿐, 오래전부터 해외에서는 유산균 사균체(포스트바이오틱스)를 정장제 등으로 판매하고 있다. 대표적인 예로 우리나라에서도 판매하고 있는 락테올 포르테(Lacteol Forte, 원제조사 프랑스 Aptalis Pharma사)는 *Lactobacillus acidophilus* strain LB(Lacteol Boucard) 열처리물을 동결건조하여 원료로 한 제품으로, 전 세계 50여 개국에서 시판되고 있다(19).

나아가 해외시장에선 조금 더 소비자 친화적인 포스트바이오틱스 제품의 개발이 진행 중이다. 포스트바이오틱스를 활용한 다양한 제품 및 시장 개척이 활발한 이웃 나라 일본의 경우, 불활성화시킨 유산균을 장 건강 증진에만 국한하지 않고 다양한 용도의 전문 소재로 발굴하여 제품 개발로 연결시키고 있다. 오랄케어사는 구강건강에 도움을 주는 *Lactobacillus plantarum* L-137(HK L-137)을 열처리한 유산균이 주원료인 Lacdent pro 캡슐 제품을 시판하고 있으며, 하우스 식품그룹은 피부 보습에 도움을 주는 열처리 유산균 소재 *Lactobacillus plantarum*을 미국 등에 특허등록 했다. 또한, 용도뿐 아니라 제품의 형태도 파우더나 캡슐 같은 제약형 제제에서 벗어나 쉽게 다가갈 수 있는 식품 형태의 제품으로 선보이고 있다. 일본의 유명 식품회사 모리나가 유업은 LAC-Shield™(*Lactobacillus paracasei* MCC 1849의 열처리 소재)를 개발하여 자사의 기술을 접목한 초컬릿, 타블렛형 캔디를 출시한 것이 대표적인 사례이다.

전통발효식품과 포스트바이오틱스

현재 우리나라 식약처에서는 고시형 프로바이오틱스로 *Lactobacillus* sp. 11종, *Bifidobacterium* sp. 4종, *Lactococcus* sp. 1종, *Enterococcus* sp. 2종, *Streptococcus* sp. 1종을 인정하고 있다. 여기에 개별인정형 품목으로 포스트바이오틱스 소재가 일부 등록되어 있고, 신

규 인정을 위한 소재 개발과 효능 평가가 진행 중이다. 프로바이오틱스나 또는 포스트바이오틱스, 그 핵심은 '미생물'이다. 생물 유전자원 이익 공유에 대한 국제적 합의문인 나고야 의정서의 국내 시행이 2018년 8월 17일로 다가오면서 이것이 미생물을 포함한 유전자원 이용 시장에 미칠 영향은 관련 업계 주요 관심사가 되고 있고, 국내에서도 독자적인 미생물 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 기능성 소재 개발을 위해 사람의 장내에서 분리한 유산균을 활용하는 사례도 많으나 우리나라에는 김치, 장류, 주류 등 다양한 전통발효식품이 있고, 여기서 분리할 수 있는 유전자원 또한 다양하다. 그래서 전통발효식품은 우리 선조들이 남겨 준 보고인 것이다. 지금 우리나라는 종균이나 프로바이오틱스 등의 미생물 자원의 수입이 수출을 크게 상회하고 있다. 그러나 아직 개발되지 않은 용도의 제품이나 신규 시장 창출을 위한 기술 개발 등을 위해 꾸준히 매진한다면, 우리나라 토종 미생물 이용 기술이 프로바이오틱스를 넘어서 포스트바이오틱스를 이용한 '먹는 백신' 개발이 다른 나라 이야기만은 아닐 것이다.

참고문헌

1. Korea Agency of HACCP Accreditation and Service. 2017. Analysis of domestic market size and trend of 2016 Health Functional Foods. p 59-63.
2. Kim YK. 2016. Development of probiotics and its market trends. *BRIC-view* 2016-T13: 1-10.
3. Taverniti V, Guglielmetti S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 6: 261-274.
4. Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13: S9.
5. Rajagopal M, Walker S. 2017. Envelope structures of gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 404: 1-44.
6. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 8: 171-184.
7. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. Available at: http://www.who.int/food-safety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (accessed May 30).
8. Cebrián G, Condón S, Mañas P. 2017. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods* 6: E107.
9. Dai T, Vrahas MS, Murray CK, Hamblin MR. 2012. Ultra-violet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections?. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10: 185-195.
10. Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol*

- 87: 207-216.
11. Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols MP. 2016. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci Rep* 6: 19778.
12. Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep* 6: 38610.
13. Salazar O, Asenjo JA. 2007. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* 29: 985-994.
14. Yoda K, He F, Miyazawa K, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M. 2012. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 alters respiratory immune responses and intestinal microbiota of diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol* 113: 155-162.
15. Vieira AT, Fukumori C, Ferreira CM. 2016. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clin Transl Immunology* 5: e87.
16. Asama T, Kimura Y, Kono T, Tatefuji T, Hashimoto K, Benno Y. 2016. Effects of heat-killed *Lactobacillus kun-keei* YB38 on human intestinal environment and bowel movement: a pilot study. *Benef Microbes* 7: 337-344.
17. Rhee YK, Hong HD, Cho CW, Lee YC, Kim KT, Kim YC, Hong SM, Yoon BR. 2017. Novel *Lactobacillus Sakei* K040706 for multi function and culture method thereof. *Korea Patent* KR101761379B1.
18. Zorzela L, Ardestani SK, McFarland LV, Vohra S. 2017. Is there a role for modified probiotics as beneficial microbes: a systematic review of the literature. *Benef Microbes* 8: 739-754.
19. Seo JG, Lee GS, Kim JE, Chung MJ. 2010. Development of probiotic products and challenges. *KSBB Journal* 25: 303-310.