

# 한국인으로부터 분리한 비피더스균의 특성과 *Bifidobacterium longum* A-2의 임상실험에 관한 연구

김영찬  
매일유업(주) 중앙연구소

## Abstract

This study was conducted to investigate the probiotics(acid and bile resistance, fermentation properties, viability, cholesterol assimilation, antimicrobial activity, antimutagenicity, and immunoactivation) of the strains of bifidobacteria isolated from healthy Koreans and to investigate the effects of oral administration of *Bifidobacterium longum* A-2 on the fecal microflora,  $\beta$ -glucuronidase activity, pH values, Ammonia concentration. The experimental results are summarized as follows:

The probiotics were tested for 23 strains including three commercial strains as controls. Compared to other strains, strains of A-2 and A-9 showed more acid resistance whereas A-2, A-5, A-13, A-14, A-18 and A-22 showed excellent bile resistances. The properties of bifidobacteria during fermentation were tested. Strains of A-1, A-2, A-3, A-4, A-6, and A-23 resulted in less than pH 4.5 and titratable acidity over 0.90 after 24 hr of fermentation. When the strains of A-2 was grown with glucose, maltose, and fructooligosaccharide, the acetic acid production were higher than with sorbitol and mannitol. The storage stability of the strains of A-2 and A-22 were tested, indicating the strain A-2 was more stable over 10 days of storage at both 4°C and 20°C than A-22. The strains of A-8, A-10, A-11, A-12 and A-20 assimilated more than 30% of cholesterol included in the media. The strains of A-1 and A-2 showed antimicrobial activity against *Sta aureus*. The antimutagenicity of the strains were also tested, showing that the mutation was suppressed more by three strains(A-2, A-12, and A-23). In addition, strain A-5 improved immunological activity(phagocytosis, TNF- $\alpha$ , IL-6) more than other strains.

In the effects of oral administration of *Bif. longum* A-2, the number of fecal bifidobacteria was significantly increased( $p < 0.01$ ) and the level of fecal  $\beta$ -glucuronidase also was significantly reduced( $p < 0.05$ ). However there were no significant differences in the level of *Lactobacilli*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, pH and ammonia by the administration. The results suggested that *Bif. longum* A-2 may be met the criteria for probiotics culture.

(Key words : Bifidobacteria, probiotics, acid resistance, bile resistance, fermentation property, cholesterol assimilation, antimicrobial effect, antimutagenicity, phagocytosis, TNF- $\alpha$ , IL-6, oral administration, fecal microflora,  $\beta$ -glucuronidase activity, pH values, Ammonia concentration)

## I. 서 론

인체 유익균과 유해균이 공존하는 사람의 개인 장내균총을 일정기간 경시적으로 검색하여보면 개인 특유의 상당히 안정된 패턴을 갖고 있지만 숙주의 생리, 음식물, 약물, 기후, 감염, 스트레스, 외래균에 의해서 장내균총은 변동한다. 특히 연령에 따른 장내균총의 변화에 있어서 노년기에 접어 들면서 장내 유익균인 비피더스균은 급격하게 감소한다<sup>(1)</sup>. 그러나 장수하는 노인의 장내균총은, 일반 성인의 장내균총과 같이 비피더스균이 많다는 보고<sup>(2)</sup>와 같이 비피더스균에 의한 장건강은 장수의 기본 요건이라 할 수 있다. 장내균총의 변동에 대비하여 장내 유익균을 우세하게 지킬수 있는 방법은 장내에 상재하는 젖산균을 식품으로 투여하는 것이 바람직하다<sup>(3)</sup>. 그러나 인체에서 분리한 비피더스균이라 하여도 건강에 기여하기 위해서는 기본적인 요건이 필요하다.

즉 Probiotics 균주의 조건으로는 내산성, 내담즙성, 인체 분리종, 장내 부착성, 소화관 정착성, 항미생물질의 생성, 병원박테리아에 대한 항미생물 작용, *in vitro*에서의 성장성, 인체 섭취시 안전성이 있어야 한다<sup>(4)</sup>. 따라서 비피더스균의 균주별 내산성의 차이에 대한 보고<sup>(5)</sup>와 내담즙성에 대한 보고<sup>(6)</sup>, 발효시 발효 특성의 차이에 대한 보고<sup>(7)</sup> 및 요구르트에 함유된 비피더스균의 생존성 차이에 대한 보고<sup>(8)</sup>와 같이 비피더스균은 균종에 따라 특성의 차이가 많다. 또한 젖산균의 콜레스테롤 저하 효과는 균종에 따라 많은 차이가 있으며<sup>(9)</sup> 비피더스균의 박테리옌에 의한 항미생물 작용<sup>(10)</sup>과 비발효 우유에 비하여 발효유는 항돌연변이 작용이 약 2.5배 높은데 이는 발효 과정에서 기인된 것이다<sup>(11)</sup>. 그리고 비피더스균을 투여하면 Macrophage 식균 능력이 증가하고<sup>(12)</sup> 면역증강 작용은 균체의 성분 차이에 의한 것으로 보고<sup>(13)</sup>된 바 있다.

비피더스균의 임상응용은 비피더스균의 최초 발견자인 Tissier 자신이 효시인 이후 비피더스균의 일반적인 임상 응용의 계기는 모유영양아가 인공영양아에 비하여 사망률과 발병률이 확실히 낮았고 또한 모유 영양아 특유의 비피더스균총이 감염 저항에 기여하는 점이 널리 알려지게 되었다<sup>(7)</sup>. 그 후 임상실험을 통하여 비피더스균의 섭취에 따른 인체 유익균의 증가 및 인체 유해한 인체 유해한 성분, 효소, 세균의 감소에 미치는 영향에 관한 많은 연구 결과가 보고되었다. 그 중에서 모유 영양아로부터 분리한 *Bifidobacterium longum*으로 제조한 *B. longum* preparation을 1일 3회 성인 5명에게 섭취시킨 결과 비피더스균은 유의성 있게 증가한 반면에 Clostridia, pH, 암모니아 및  $\beta$ -glucuronidase는 유의성 있게 감소되었고 기타 장내균총의 변화는 없었다<sup>(20)</sup>. 그러나 비피더스균이 *Enterobacteriaceae* 및 *Clostridium* 균수 수준을 유의적으로 감소시킨다는 보고<sup>(7, 21)</sup>도 있다. 본 실험에서는 한국인 유래 비피더스균 20종과 상업종균 3종의 특성을 비교분석하고 최종 선정된 *Bifidobacterium longum* A-2를 건강한 한국인에게 섭취시켜 장내 변화(bifidobacteria, lactobacilli, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, pH, 암모니아,  $\beta$ -glucuronidase activity)를 분석하고자 하였다.

## II. 본 론

### 1. 비피더스균의 특성 비교

### 1) 비피더스균의 선발

한국인 유아 및 성인의 분변으로부터 비피더스균을 선발하기 위하여 지 등<sup>(17)</sup>에 의해 개발된 내산성 및 내담즙성이 뛰어난 bifidobacteria의 선택배지인 TP(Transgalactooligosaccharide and propionate) broth를 사용하였다. 분변을 최초 TP broth에 접종시켜 37℃에서 12시간 배양한 후, TP broth에 1% 접종하여 배양하는 과정을 6회 반복하여 강화 배양시켰다. 강화 배양시킨 배양액에 대하여 1차적으로 균의 형태를 관찰하여 전형적인 비피더스균 형태의 것을 선정하고, 2차적으로 F6PPK (Fructose-6-phosphate phosphoketolase) 실험으로 확정하여 분리 동정을 하였다.

한국인에서 분리한 200여종의 비피더스 균주는 장기보관 하였고 그 중에서 본 실험에 사용한 20종의 비피더스균은 5 ml TPY(Trypticase Peptone Yeast) broth에서 3차 계대하여 활력을 증가시킨 후 원심분리하여 균체를 회수하고 여기에 suspending medium(11% 멸균 환원 탈지유)을 1 ml 첨가하여 Freeze Dryer (EYELA FD-81, Tokyo Rikakikai)로 동결건조시켰으며, 완료된 균주는 -70℃ Deep Freezer (SO-LOW U85-13, USA)에 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 2) 균주

본 실험에 사용한 비피더스균 20종(A-1~A-20)은 Table 1과 같이 한국인의 분변에서 유래한 비피더스균으로 동결건조하여 사용하였으며 상업종균 3종(A-21~A-23)은 대조균으로 CHR. Hansen(Denmark), Wiesby(Germany), Rhone-Poulenc(U.S.A.)으로 부터 구입하여 사용하였다.

Table 1. The Origin of 20 strains of bifidobacteria isolated from healthy korean

Bifidobacteria No.	Origin(Korean)	
	Sex(M, F)	Age
A-1	F	24
A-2	M	22
A-3	M	37
A-4	F	below 1 year
A-5	M	25
A-6	F	28
A-7	F	28
A-8	M	37
A-9	M	30
A-10	M	29
A-11	F	below 1 year
A-12	F	below 1 year
A-13	F	below 1 year
A-14	F	below 1 year
A-15	M	10
A-16	F	9
A-17	F	11
A-18	M	11
A-19	M	10
A-20	F	9

### 3) 내산성 및 내담즙성

pH를 조정한 MRS broth와 담즙산을 0, 0.3, 0.5, 1.0% 첨가한 MRS broth에서 비피더스균을 각각 24시간 배양하면서 경시적으로 600 nm에서 흡광도를 측정후 저산도 및 담즙함유 배지에서 비

피더스균의 성장을 비교하였다.

초기 pH 4.0인 MRS broth에서 24시간 배양한 결과 Table 2와 같이 2균주(A-2, A-9)는 흡광도가 0.1 이상으로 나타났으며 흡광도가 0.01~0.04 범위인 상업종균(A-21, A-22, A-23) 보다 내산성이 높은 것으로 판단되었다.

담즙염이 0.5% 함유된 MRS broth에서 24시간 배양한 결과 Table 3과 같이 6균주(A-2, A-5, A-13, A-14, A-18, A-22)는 흡광도가 0.45 이상 이었고 그 중에서 A-14 균주는 흡광도가 0.75로 가장 높게 나타났다.

Table 2. Growth ( $A_{600}$ )<sup>1)</sup> of bifidobacteria strains at various pHs

pH	Time (Hrs)	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	A 15	A 16	A 17	A 18	A 19	A 20	A 21	A 22	A 23
7.0	6	0.20	0.06	0.30	- <sup>2)</sup>	0.34	0.18	0.17	0.80	0.48	0.35	-	0.02	0.21	0.18	0.68	0.12	0.14	0.12	0.04	0.06	0.06	0.25	0.80
	14	1.10	0.95	1.10	-	1.20	0.52	0.80	1.30	1.10	0.73	0.38	0.95	0.75	0.75	1.40	0.34	0.85	0.80	0.49	0.29	0.21	0.90	1.30
	19	1.30	1.30	1.30	-	1.50	0.90	1.00	1.30	1.30	0.92	0.52	1.50	0.90	0.95	1.40	0.55	1.20	1.10	0.70	0.50	0.52	1.20	1.40
	24	1.30	1.40	1.30	-	1.50	1.00	1.00	1.30	1.40	0.95	0.64	1.50	1.00	0.90	1.40	0.61	1.20	1.20	0.80	0.74	0.80	1.30	1.50
5.0	6	0.09	0.20	0.09	0.02	0.10	0.13	0.10	0.18	0.35	0.16	0.02	0.09	0.06	0.05	0.13	0.06	0.04	0.10	0.02	0.16	0.05	0.09	0.35
	14	0.10	0.50	0.28	0.04	0.12	0.15	0.42	0.26	0.80	0.17	0.04	0.08	0.39	0.07	0.19	0.10	0.11	0.22	0.07	0.33	0.10	0.29	0.95
	19	0.08	0.75	0.64	0.08	0.12	0.14	0.70	0.32	0.95	0.17	0.08	0.07	0.60	0.11	0.20	0.12	0.26	0.32	0.07	0.53	0.15	0.52	1.20
	24	0.10	1.00	1.00	0.29	0.13	0.17	0.85	0.46	1.00	0.23	0.29	0.08	0.66	0.31	0.24	0.29	0.60	0.46	0.50	0.64	0.19	0.70	1.20
4.5	6	0.09	0.15	0.12	0.04	0.09	0.09	0.05	0.10	0.16	0.05	0.03	0.03	0.06	0.02	0.11	0.04	0.02	0.09	0.07	0.07	0.06	0.06	0.16
	14	0.10	0.15	0.09	0.02	0.10	0.15	0.07	0.17	0.29	0.14	0.02	0.05	0.08	0.02	0.09	0.09	0.02	0.05	0.05	0.10	0.05	0.10	0.33
	19	0.12	0.13	0.10	0.02	0.09	0.16	0.07	0.22	0.45	0.12	0.03	0.06	0.08	0.02	0.09	0.12	0.01	0.08	0.05	0.09	0.04	0.13	0.49
	24	0.11	0.16	0.08	0.01	0.10	0.19	0.07	0.21	0.60	0.11	0.01	0.06	0.07	0.04	0.09	0.12	0.01	0.07	0.05	0.11	0.02	0.18	0.51
4.0	6	0.10	0.13	0.09	0.06	0.09	0.10	0.08	0.06	0.13	0.04	0.06	0.06	0.07	-	0.13	0.04	0.03	0.05	0.04	0.05	0.03	0.06	0.07
	14	0.10	0.14	0.10	0.05	0.10	0.12	0.12	0.09	0.17	0.08	0.05	0.06	0.07	0.02	0.13	0.04	0.03	0.10	0.02	0.08	0.05	0.10	0.09
	19	0.09	0.14	0.11	0.05	0.10	0.13	0.13	0.07	0.17	0.09	0.05	0.06	0.11	0.01	0.11	0.03	0.03	0.08	0.02	0.06	0.08	0.09	0.10
	24	0.08	0.11	0.08	0.05	0.04	0.09	0.08	0.05	0.13	0.09	0.02	0.01	0.06	-	0.07	0.04	-	0.03	0.01	0.06	0.01	0.03	0.04

<sup>1)</sup>Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>2)</sup>- : not detected

Table 3. Growth ( $A_{600}$ )<sup>1)</sup> of bifidobacteria strains at various bile concentrations(%)

Bile (%)	Time (Hrs)	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	A 15	A 16	A 17	A 18	A 19	A 20	A 21	A 22	A 23
0.1	6	0.18	0.09	0.15	- <sup>2)</sup>	0.42	0.20	0.10	0.60	0.42	0.05	0.04	0.15	0.25	0.07	0.27	0.04	0.26	0.15	0.05	0.06	0.05	0.31	0.90
	14	0.53	0.18	0.45	-	0.10	0.40	0.24	0.70	0.66	0.17	0.21	0.37	0.47	0.42	0.58	0.08	0.85	0.70	0.24	0.13	0.21	0.75	1.50
	19	0.75	0.20	0.64	-	1.20	0.64	0.35	0.80	0.75	0.20	0.29	0.66	0.50	0.60	0.64	0.14	0.85	0.75	0.44	0.18	0.30	0.90	1.50
	24	0.80	0.23	0.75	0.25	1.20	0.68	0.38	0.80	0.80	0.25	0.26	0.80	0.46	0.60	0.60	0.25	0.90	0.80	0.52	0.25	0.33	0.90	1.50
0.3	6	0.05	0.04	0.07	0.15	0.29	0.16	0.19	0.11	0.17	0.04	0.07	0.11	0.10	0.14	0.24	-	0.25	0.18	0.16	0.05	0.12	0.28	0.47
	14	0.04	0.04	0.07	0.14	0.44	0.17	0.18	0.21	0.04	0.13	0.09	0.16	0.23	0.25	-	0.30	0.90	0.20	0.05	0.13	0.50	0.75	0.75
	19	0.07	0.06	0.11	0.18	0.49	0.22	0.22	0.23	0.24	0.05	0.15	0.13	0.20	0.24	0.30	-	0.35	0.60	0.21	0.06	0.18	0.54	0.75
	24	0.06	0.04	0.07	0.16	0.47	0.26	0.21	0.22	0.22	0.05	0.14	0.10	0.23	0.24	0.31	-	0.32	0.47	0.26	0.05	0.17	0.60	0.70
0.5	6	-	0.02	-	-	0.20	-	0.04	0.03	0.11	-	-	-	0.09	0.06	-	-	0.13	0.04	-	-	-	0.15	0.15
	14	-	0.31	-	-	0.31	-	0.04	0.09	0.15	-	-	-	0.41	0.18	-	-	0.22	0.10	-	-	-	0.38	0.30
	19	0.04	0.40	0.02	0.03	0.40	-	0.11	0.14	0.25	-	0.08	-	0.50	1.00	0.11	-	0.32	0.85	-	-	-	0.50	0.40
	24	-	0.45	-	-	0.45	-	0.07	0.14	0.20	-	0.10	-	0.49	0.75	0.10	-	0.25	0.45	-	-	-	0.49	0.37
1.0	6	-	-	-	-	0.15	-	-	0.13	0.25	-	-	-	0.03	-	-	-	0.12	0.12	-	-	-	0.03	0.04
	14	-	-	-	-	0.22	-	-	0.35	0.58	-	-	-	0.05	0.03	0.25	-	0.29	0.14	-	-	-	0.10	0.06
	19	0.12	-	0.04	-	0.34	-	-	0.40	0.70	-	0.06	0.15	0.15	1.50	0.18	-	0.45	0.35	0.10	-	-	0.21	0.15
	24	0.03	-	-	-	0.28	-	-	0.36	0.68	-	0.04	0.02	0.12	1.30	0.14	-	0.41	1.10	0.09	-	-	0.20	0.09

<sup>1)</sup>Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>2)</sup>- : not detected

#### 4) 발효 특성

한국인 분변으로부터 분리한 비피더스균 20종과 상업종균 3종을 11% 탈지유(0.05% Cysteine, 0.05% MRS broth 함유)에서 37℃ 24시간 배양하면서 pH, TA, 비피더스균수, 유기산(초산과 젖

산)의 비율을 비교하였으며 특히 *Bifidobacterium longum* A-2에 대해서는 탄수화물이 함유되지 않은 PYF broth에 탄수화물 7종(Glucose, Fructooligosaccharide, Maltose, Melibiose, Mannitol, Sorbitol,  $\alpha$ -Methyl-D-glucose)을 각각 최종 배지에 1%되게 첨가하고 MRS broth에서 37°C 12, 24시간 배양후 유기산 조성을 HPLC(Waters, U.S.A.)로 분석하였다.

24시간 배양한 결과 Table 4와 같이 6균주(A-1, A-2, A-3, A-4, A-6, A-23)는 pH 4.5 이하, TA 0.90 이상, 젖산균은  $1 \times 10^8$  CFU/ml 이상으로 나타났으며 이 수치는 24시간 발효후 일반적인 발효유가 될수 있는 pH 및 TA이므로 이들 균주는 발효 특성상 산업적 이용가치가 있는 균주로 판단되었다.

그리고 Table 5와 같이 균주별 젖산(0.03 Mol이상/g)에 대한 초산의 생성을 가장 적게 시킨 균주는 A-23 이었으며 가장 많이 시킨 균주는 A-5로 나타났다. 특히 *Bifidobacterium longum* A-2의 탄수화물(7종) 이용성을 24시간 발효후 비교한 결과 Table 6과 같이 Mannitol<Sorbitol< $\alpha$ -Methyl-D-glucose<Glucose<Melibiose<Maltose<Fructooligosaccharide 순으로 젖산에 대한 초산을 많이 생성시켰다. 즉 Fructooligo- saccharide보다는 Mannitol이 초산을 적게 생성시켰다. 이 결과에서 초산취가 적은 발효유를 제조하기 위해서는 탄수화물중에서 Mannitol을 사용하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

Table 4. Fermentation properties(pH, TA, CFU/ml)<sup>1),2),3)</sup> of the strains of bifidobacteria grown on skim milk medium

Bifidobacteria	pH	TA	Viable count (CFU/ml)
A-1	4.42 <sup>g</sup>	0.9743 <sup>b</sup>	$3.55 \times 10^{8bcd}$
A-2	4.41 <sup>g</sup>	0.9140 <sup>b</sup>	$4.75 \times 10^{8abc}$
A-3	4.46 <sup>fg</sup>	0.9245 <sup>b</sup>	$4.08 \times 10^{8bcd}$
A-4	4.39 <sup>g</sup>	0.9835 <sup>b</sup>	$2.98 \times 10^{8bcd}$
A-5	4.77 <sup>de</sup>	0.6058 <sup>fgh</sup>	$2.98 \times 10^{8bcd}$
A-6	4.37 <sup>g</sup>	0.98 <sup>b</sup>	$2.47 \times 10^{8cd}$
A-7	5.33 <sup>bc</sup>	0.3861 <sup>i</sup>	$4.26 \times 10^{8e}$
A-8	4.41 <sup>g</sup>	0.8315 <sup>bcde</sup>	$3.84 \times 10^{8bcd}$
A-9	6.23 <sup>a</sup>	0.1780 <sup>j</sup>	$1.10 \times 10^{8g}$
A-10	4.42 <sup>g</sup>	0.8253 <sup>bcde</sup>	$2.26 \times 10^{8cd}$
A-11	4.41 <sup>g</sup>	0.7133 <sup>defg</sup>	$2.75 \times 10^{8bcd}$
A-12	4.56 <sup>efg</sup>	0.7383 <sup>cdef</sup>	$3.08 \times 10^{8bcd}$
A-13	4.47 <sup>fg</sup>	0.885 <sup>bc</sup>	$5.08 \times 10^{8abc}$
A-14	5.44 <sup>b</sup>	0.3787 <sup>l</sup>	$5.64 \times 10^{8f}$
A-15	4.46 <sup>fg</sup>	0.8413 <sup>bcd</sup>	$6.53 \times 10^{8ab}$
A-16	4.74 <sup>df</sup>	0.6812 <sup>efg</sup>	$3.49 \times 10^{8bcd}$
A-17	5.38 <sup>bc</sup>	0.39 <sup>i</sup>	$5.76 \times 10^{8e}$
A-18	- <sup>4)</sup>	-	-
A-19	4.39 <sup>g</sup>	0.87 <sup>bc</sup>	$2.19 \times 10^{8cd}$
A-20	4.84 <sup>de</sup>	0.5837 <sup>gh</sup>	$2.83 \times 10^{8bcd}$
A-21	4.87 <sup>d</sup>	0.5737 <sup>gh</sup>	$4.06 \times 10^{8bcd}$
A-22	5.15 <sup>c</sup>	0.5038 <sup>hi</sup>	$1.77 \times 10^{8d}$
A-23	3.78 <sup>h</sup>	1.3363 <sup>a</sup>	$9.86 \times 10^{8a}$

<sup>1)</sup>pH, <sup>2)</sup>TA and <sup>3)</sup>Viable cells are data of fermented milk after fermentation(24hrs).

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j Means in row without a common superscript are significantly different(P<0.05).

1),2),3) Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

4) -: not tested

**Table 5.** Fermentation properties(Organic acids) of the strains of *bifidobacteria*<sup>1)</sup> grown on skim milk medium

Strains	Organic acid <sup>2)</sup> (Mol/g)		
	Lactic	Acetic	Ratio
A-1	0.04436	0.05688	1 : 1.282
A-2	0.04760	0.06845	1 : 1.438
A-3	0.04958	0.06785	1 : 1.368
A-4	0.04795	0.06026	1 : 1.257
A-5	0.03073	0.04809	1 : 1.565
A-6	0.04999	0.06768	1 : 1.135
A-7	0.01791	0.02138	1 : 1.194
A-8	0.05161	0.07409	1 : 1.436
A-9	0.00515	0.00671	1 : 1.303
A-10	0.03021	0.02550	1 : 0.844
A-11	- <sup>3)</sup>	-	-
A-12	0.04607	0.06030	1 : 1.309
A-13	0.04812	0.06314	1 : 1.312
A-14	0.01007	0.01350	1 : 1.341
A-15	0.04676	0.06193	1 : 1.324
A-16	0.03467	0.04184	1 : 1.207
A-17	0.00363	0.00075	1 : 0.206
A-18	-	-	-
A-19	0.04589	0.06118	1 : 1.333
A-20	0.02022	0.02663	1 : 1.317
A-21	0.01252	0.01739	1 : 1.389
A-22	-	-	-
A-23	0.13646	0.04841	1 : 0.355

<sup>1)</sup> Bifidobacteria were incubated for 18hrs and 24hrs at 37°C on 11% Skim milk

<sup>2)</sup> Organic acid means concentration and ratio of lactic acid and acetic acid in the milk fermented for 24hrs at 37°C on 11% Skim milk

<sup>2)</sup> Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>3)</sup> - : not tested

**Table 6.** Production of Organic acids by *Bifidobacterium longum* A-2 on various carbohydrate sources

Carbohydrate	Time (Hrs)	Organic acids <sup>1)</sup>		
		Acetic acid (mM)	Lactic acid (mM)	A/L ratio <sup>2)</sup>
Glucose	12	26.8	16.4	1.63
	24	39.1	25.3	1.54
Fructoligosaccharide	12	18.6	7.2	2.58
	24	29.3	8.1	3.62
Maltose	12	6.07	2.99	2.03
	24	38.14	15.8	2.41
Melibiose	12	26.5	10.0	2.65
	24	45.3	22.4	2.02
Mannitol	12	22.2	21.6	1.03
	24	27.8	37.3	0.75
Sorbitol	12	10.1	8.7	1.16
	24	13.6	12.6	1.08
$\alpha$ -Methyl-D-glucose	12	2.23	2.25	0.99
	24	2.74	2.26	1.10

<sup>1)</sup> Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>2)</sup> A/L ratio = Acetic acid(mM) / Lactic acid(mM)

### 5) 생존성

생존성은 최종 선정된 비피더스균 A-2와 상업적으로 상용되고 있는 A-22의 생존성을 특히 비교하기 위하여 10% 탈지유(0.05% Cysteine, 0.05% MRS broth 함유)에서 37℃로 배양하여 TA 0.90에서 종료한 발효유를 4℃, 20℃에 보관하면서 10일간 비피더스균의 생존성을 비교하였다. 보관 조건은 식품공전중 유가공품 발효유류의 유통조건인 냉장(0~10℃) 및 계절별 유통조건을 고려하여 20℃의 조건을 함께 설정하였다.

*Bif. longum* A-2와 *Bif. lactis* A-22는 4℃에서 10일간 보존한 결과 Fig. 1과 같이 균수의 감소는 거의 없어 안정적이었지만, 20℃에서는 보존 10일후 감소하는 경향이 있었고 *Bif. longum* A-2가 *Bif. lactis* A-22보다는 다소 안정적 이었다. 이 결과는 발효유의 경시변화를 4℃, 10℃, 16~27℃, 35℃ 저장온도에서 35일간 측정된 결과 저장온도가 높을수록 유산균수가 급격하게 감소하였다는 보고<sup>(19)</sup>와 일치하였다.

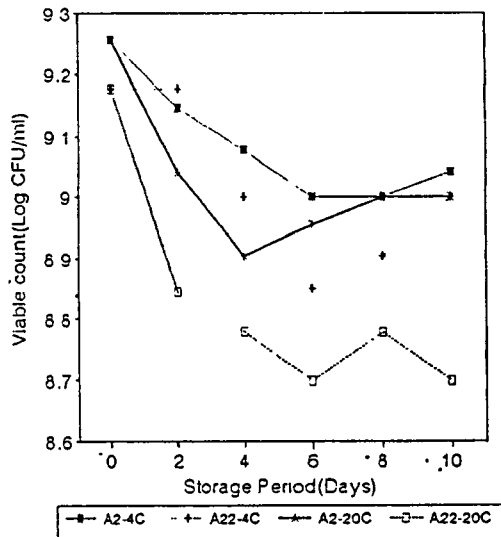


Fig. 1. Comparison of the viability of *Bif. longum* A-2 and *Bif. lactis* A-22 during storage

## 6) 콜레스테롤 분석

비피더스균 23균주를 MRS broth(Polyoxyethanylcholesteryl sebacate 0.045%, Cysteine 0.05% 함유)에 24시간 배양후 원심분리하여 상등액을 0.5ml 취하였다. 여기에 50% KOH 2ml와 95% Ethanol 3ml를 첨가하여 반응시켜 냉각시킨후 5ml의 Hexane과 3ml의 증류수를 첨가하였다. 2.5ml의 상층을 옮겨 증발시킨후 4ml의 *o*-phthalaldehyde reagent를 첨가하고 반응시킨 다음 2ml의 농황산(95%이상)을 첨가하여 반응시킨후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 저하율을 산출하였다.

$$\text{Cholesterol reduction(\%)} = \frac{\text{Cholesterol added}-\text{Cholesterol left}}{\text{Cholesterol added}} \times 100$$

Fig. 2와 같이 실험에 사용한 23균주 중에서 20균주가 10% 이상 콜레스테롤을 저하시켰으며 그 중에서도 3균주(A-10, A-11, A-20)는 35% 이상으로 콜레스테롤을 저하시켰다. 동물성 지방을 많이 섭취하면 혈중 콜레스테롤이 증가하지만 콜레스테롤을 감소시키는 데는 젖산균이 작용한다는 연구 결과<sup>(14)</sup>를 참고할 때 콜레스테롤을 저하시키는 균주는 발효유 식품에 이용할 가치가 있을 것으로 판단되었다.

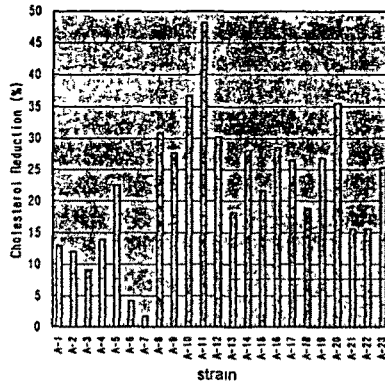


Fig. 2. Cholesterol assimilation of the strains of bifidobacteria

## 7) 항미생물 분석

10% 탈지유(0.5% yeast extract 함유)에 비피더스균을 37℃ 48시간 발효하고 pH 조정전 발효유와 pH 조정(10N NaOH) 후의 발효유를 원심분리한 후 상등액을 시료로 120 μl 주입하였다. *Escherichia coli* 6-9E-4(경북대), *Staphylococcus aureus* 7473(경북대), *Pseudomonas flores* ATCC 21541를 활성화 시켜 사용하였다. Plate count agar에 *E. coli*를, Nutrient agar에는 *St. aureus*, *Pseudo. flores*를 각각 1% 첨가하여 petri dish에 균한 후 배지에 Paper disc(Advantec, Thick 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 고정시키고 pH 조정전·후의 상등액 시료를 주입후 48시간 배양하여 디스크 주변의 환의 크기로 항미생물작용을 판정하였다.

Table 7과 같이 비피더스균은 *Pseudo. flores*와 *E. coli*보다 상대적으로 *St. aureus*의 생육을 억제시켰다. 비피더스균 20균주 중에서 비피더스균 A-1, A-2가 *St. aureus*에 대한 항미생물 분석치가 높았다. 그러나 pH를 조정한 시료는 *Pseudo. flores*, *E. coli*, *St. aureus*의 생육을 억제시키지 못하였으나, 비피더스균 A-20은 pH를 조정하여도 *St. aureus*에 대하여 항미생물 분석치가 높게 나타났다. 유산균은 옛부터 정균작용이 인정되었으며 이는 유산균이 생성한 젖산의 작용 또는 유산균이 생성한 항균성 물질에 의한 것이며 비피더스균의 pH 조정전·후의 발효유는 *E. coli*, *St. aureus* 등 에 대한 항미생물작용이 있음을 보고<sup>(10)</sup>한 결과와 유사하게 본 실험에서도 A-20을 제외한 모든 균주는 pH 조정전 시료에서만, A-20균주는 pH 조정전·후의 시료에서 항미생물 효과가 나타났다. 이는 비피더스균이 생성한 젖산(초산) 또는 비피더스균이 생성한 항균물질에 기인된 것으로 추정되었다.



Table 7. Antimicrobial effect<sup>1)</sup> of the strains of bifidobacteria

Strain	<i>E. coli</i>		<i>Sta. aureus</i>		<i>Pseudo. flores</i>	
	A <sup>2)</sup>	B <sup>3)</sup>	A <sup>2)</sup>	B <sup>3)</sup>	A <sup>2)</sup>	B <sup>3)</sup>
A-1	+	+	++++	-	+	-
A-2	++	+	++++	-	+	-
A-3	++	+	+++	-	+	-
A-4	+	+	+++	-	+	-
A-5	+	-	+++	-	+	-
A-6	+	-	+++	-	+	-
A-7	+	-	+++	-	+	-
A-8	+	-	+++	-	+	-
A-9	+	-	+++	-	+	-
A-10	++	+	+++	-	+	-
A-11	++	+	+++	-	+	-
A-12	++	-	+++	-	+	-
A-13	+	-	+++	-	+	-
A-14	+	-	+++	-	+	-
A-15	+	-	+++	-	++	-
A-16	+	-	++	-	+	-
A-17	+	-	++	-	+	-
A-18	+	-	++	-	+	-
A-19	+	+	++	-	+	-
A-20	+	-	++	++	+	-
A-21	+	-	++	-	+	-
A-22	++	-	++	-	+	-

<sup>1)</sup> Estimation by the agar diffusion method, Steril zone in mm

<sup>1)</sup> Means of four trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>2)</sup> A : pH 3.35~3.97, pH of supernatants was not adjusted

<sup>3)</sup> B : pH 5.40~5.52, pH of supernatants was adjusted to 5.4±0.1

- : negative (Steril zone, ϕ mm around the DISC)

+ : 9~14 mm (Steril zone, ϕ mm around the DISC)

++ : 15~25 mm (Steril zone, ϕ mm around the DISC)

+++ : 26~35 mm (Steril zone, ϕ mm around the DISC)

++++ : 36~45 mm (Steril zone, ϕ mm around the DISC)

### 8) 항돌연변이 분석

Direct mutagen인 NQO(4-Nitroquinoline-1-Oxide)와 Indirect mutagen인 IQ(2-Amino-3-methylimidazoquinoline)를 사용하였고 Maron과 Ames의 방법<sup>(14)</sup>에 따라 항돌연변이성을 실험하였다. 즉 0.2 M phosphate buffer(pH 4.0) 0.3ml에 돌연변이원인 NQO, IQ를 각각 혼합하여 37℃, 3시간 배양후 상등액을 취하였다. 45℃ Top agar(0.5 mM His/Biotin) 2.3 ml에 Salmonella TA 98 배양액 100μl, S9 Mix 500μl 및 상기 상등액을 각각 10μl 혼합후 37℃, 48시간 배양하여 복귀 colony 수를 측정하였다. 돌연변이 억제효과(antimutagenicity : %)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Antimutagenicity(inhibition, \%)} = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

A : 돌연변이원만 있을 때 복귀 colony수

B : 시료와 돌연변이원을 동시에 첨가하였을 때 복귀 colony수

C : 시료와 돌연변이원 모두 없는 경우의 복귀 colony수

Fig 3과 같이 비피더스균 23균주 중에서 3균주(A-2, A-12, A-23)는 돌연변이원인 NQO와 IQ

에 대하여 모두 70% 이상의 높은 항돌연변이가 있는 것으로 나타났다.

발효유가 direct mutagen인 NQO와 2-nitrofluorene에 대하여 유의성 있게 항돌연변이 분석을 보고<sup>(18)</sup>하였고 또한 발효유를 acetone으로 추출한 추출액이 NQO에 대해서 유의성 있게 항돌연변이 성이 나타났다고 보고<sup>(11)</sup>한 결과와 같이 본 실험에서도 돌연변이원인 NQO에 대하여 항돌연변이가 유사하게 분석되었다. 따라서 한국인 유래 비피더스균주(A-2, A-12) 및 상업종균 A-23은 돌연변이원인 NQO와 IQdp 대하여 항돌연변이 분석치가 매우 높게 나타난 것은 매우 의미있는 결과라고 분석되었다. 이런 결과가 일반적인 식생활에서 경구적으로 섭취될 수 있는 각종 돌연변이원에 대하여 장내의 유익균에 의한 항돌연변이 효과가 있을 수 있는 추가적인 연구에 기초자료로 사용될 수 있다면 가치가 있을수 있다고 판단하였다.

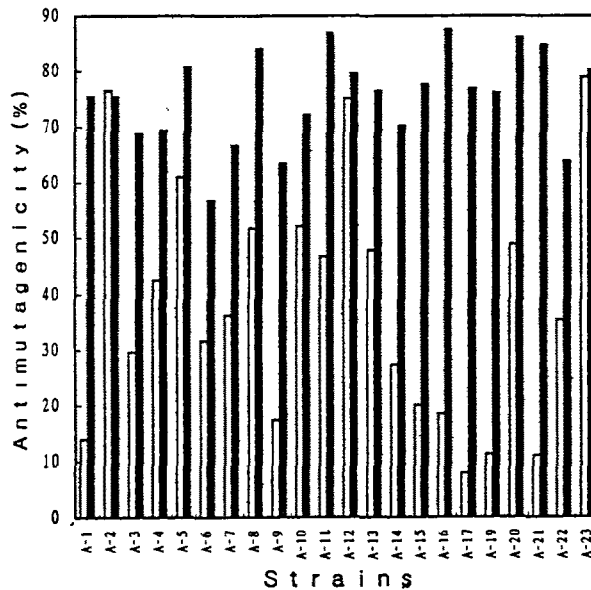


Fig. 3. Effects of the strains of bifidobacteria on the antimutagenicity against NQO<sup>1)</sup> and IQ<sup>2)</sup> in *Salmonella typhimurium*  
 NQO<sup>1)</sup>; 4-Nitroquinoline-1-Oxide, □ NQO  
 IQ<sup>2)</sup>; 2-Amino-3-methylimidazo quinoline, ■ IQ

9) 세포배양

Mouse macrophage cell line raw 264.7을 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 성장시켰고 모든 배양은 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건에서 배양시켰다. 세포수는 hemacytometer로 trypan blue dye exclusion을 이용하여 측정하였고 세포는 well에서 5×10<sup>5</sup> cell/ml 농도로 배양하였다.

#### 10) Phagocytosis, TNF-α 및 IL-6분석

Phagocytosis분석은 Wan 등<sup>(15)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. Bifidobacteria와 macrophage cell(raw 264.7)를 well에서 배양후 상등액은 제거하였다. 실온에서 HBSS(Hanks balanced salt solution)로 가온시킨 fluorescein-conjugated *E. coli*를 sonication시킨후 각 well에 100μl를 첨가하였다. 그 후 37°C에서 배양후 plate의 buffer는 제거하고 extracellular fluorescence는 trypan blue(250μg/ml, pH 4.4) 100μl를 첨가하여 형광을 제거하였다. 비교군으로는 fluorescein particle만을 함유하는 well을 사용하였다. 1분후 염색약을 제거하고 480nm excitation 및 530nm emission wavelength에서 측정하여 phagocytosis를 분석하였다.

TNF-α와 IL-6 분석 생성은 Dong 등<sup>(16)</sup>의 방법을 개량한 방법으로 Elisa로 정량하였다. Well은 0.1 M sodium bicarbonate buffer(pH 8.2)에 TNF-α 또는 IL-6 antibody (rat-anti-mouse)에 대한 정제된 antibody(1mg/1ml)를 50ml 첨가한 후 4°C에서 1일 방치한다. well은 BSA(Bovine serum albumin) 3% 용액 300ml에서 단백질 결합을 방지하기 위하여 37°C에서 30분간 배양하였다. Standard recombinant murine TNF-α와 IL-6를 희석시켜 50ml aliquot에 첨가한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. PBST(0.01M PBS containing 0.2% Tween 20)로 4회 수세한 후 biotinylated rat anti-mouse TNF-α와 IL-6를 각각 1mg/ml, 1mg/ml 되게 희석시켜 50ml를 첨가하여 실온에서 1시간 배양하였다. Plate는 6회 수세후 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate(1.5mg/ml in BSA-PBST) 50ml로 실온에서 1시간 배양하였다. 그후 8회 수세후 well당 기질 용액을 100ml 첨가하여 bound peroxidase conjugate를 검출하였고 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 동일량 첨가하여 반응을 정지시켜 450nm에서 측정함으로써 생성량을 분석하였다.

비피더스균중에서 4균주(A-1, A-5, A-9, A-20)가 Phagocytosis(Table 8) 및 TNF-α(Table 9, IL-6(Table 10)의 분석치가 높았으며 그 중에서도 A-5균주는 분석치가 가장 높게 나타났다.

장내세균중에서 몸이 건강할 때는 독성이 약하여 어떤 부작용을 나타내지 않지만 수술이나 몸이 쇠약해져 면역능이 약화되었을 경우 비록 독성이 약한 장내세균일지라도 질병을 일으킨다는 보고<sup>(15)</sup>내용을 참고로 할때 면역능을 증가시킬 수 있는 인체 유익균을 개발하는 것은 의의가 크다고 할 수 있다.

**Table 8. Effect of the strains of bifidobacteria on phagocytosis<sup>1),2),3)</sup> by Raw 264.7 cells**

Bifidobacteria	Bifidobacteria concentration( $\mu\text{g/ml}$ )		
	10	50	250
Fluorescence Unit( $\text{ng/ml}$ )			
A- 1	152.6	220.5	231
A- 2	43.4	114.9	288.4
A- 3	- <sup>4)</sup>	-	-
A- 4	127.4	205.8	261.8
A- 5	152.6	306.6	311.5
A- 6	54.6	115.5	305.2
A- 7	46.9	193.2	359.8
A- 8	-	-	-
A- 9	72.1	254.8	389.2
A-10	90.3	275.1	317.1
A-11	121.1	214.9	220.5
A-12	35.7	233.8	322.7
A-13	123.9	275.1	375.9
A-14	-	-	-
A-15	-	-	-
A-16	127.4	225.4	291.9
A-17	94.5	245	382.9
A-18	-	-	-
A-19	163.1	314.3	336
A-20	142.8	352.1	437.5
A-21	65.1	242.9	312.9
A-22	79.1	175.0	208.6
A-23	194.6	270.2	307.3

<sup>1)</sup> Data are means of triplicate cultures.

<sup>2)</sup> Data of 18 strains bifidobacteria incubated with raw 264.7 cells for 24hrs are presented here.

<sup>3)</sup> In all experiments,  $1 \times 10^5$  raw 264.7 cells/well were plated.

<sup>4)</sup> - : not tested

**Table 9.** Effect of the strains of bifidobacteria on TNF- $\alpha$ <sup>4)</sup> production<sup>1),3)</sup> by Raw 264.7 cells

Bifidobacteria	Bifidobacteria concentration( $\mu\text{g/ml}$ )		
	10	50	250
	TNF- $\alpha$ concentration( $\text{ng/ml}$ )		
A- 1	32.00	49.82	109.8
A- 2	6.12	29.39	74.84
A- 3	- <sup>5)</sup>	-	-
A- 4	21.11	29.57	42.62
A- 5	12.33	47.03	82.67
A- 6	1.76	21.33	49.77
A- 7	ND <sup>2)</sup>	15.26	51.80
A- 8	-	-	-
A- 9	2.07	14.27	45.32
A-10	3.24	26.46	44.69
A-11	15.80	27.41	74.97
A-12	2.25	21.38	65.66
A-13	4.23	20.25	51.57
A-14	-	-	-
A-15	-	-	-
A-16	8.33	25.29	67.77
A-17	6.08	25.02	64.13
A-18	-	-	-
A-19	8.10	26.10	61.65
A-20	15.08	30.33	61.38
A-21	2.48	25.97	79.25
A-22	8.15	23.18	78.21
A-23	6.17	12.51	32.04

<sup>1)</sup> Data are means of triplicate cultures.

<sup>2)</sup> Data of 18 strains bifidobacteria incubated with raw 264.7 cells for 24hrs are presented here.

<sup>3)</sup> Cells were cultured for 24 hrs in the presence of heat-killed bifidobacteria and supernatants analyzed for cytokines by ELISA

<sup>4)</sup> TNF; Tumor Necrosis Factor

<sup>5)</sup> - : not tested

**Table 10.** Effect of the strains of bifidobacteria on IL-6<sup>1)</sup> production<sup>3),4),5)</sup> by Raw 264.7 cells

Bifidobacteria	Bifidobacteria concentration( $\mu\text{g/ml}$ )		
	10	50	250
IL-6 concentration( $\text{ng/ml}$ )			
A- 1	1.07	6.15	21.15
A- 2	ND <sup>2)</sup>	0.15	8.60
A- 3	- <sup>6)</sup>	-	-
A- 4	0.72	2.40	13.85
A- 5	ND	1.71	27.60
A- 6	ND	0.11	3.86
A- 7	ND	0.03	2.79
A- 8	-	-	-
A- 9	ND	0.14	3.08
A-10	ND	0.47	6.57
A-11	0.62	0.66	4.04
A-12	ND	0.18	4.55
A-13	ND	0.59	7.16
A-14	-	-	-
A-15	-	-	-
A-16	0.23	2.88	11.01
A-17	0.69	2.51	11.64
A-18	-	-	-
A-19	0.29	0.18	4.13
A-20	0.32	2.76	9.95
A-21	ND	0.38	9.12
A-22	ND	0.56	12.29
A-23	0.17	0.39	2.54

<sup>1)</sup> IL-6; Interleukin-6

<sup>2)</sup> ND = Not Detected

<sup>3)</sup> Number in parenthesis represents IL-6 concentration.

<sup>4)</sup> Data are means of triplicate cultures.

<sup>5)</sup> Cells were cultured for 24 hrs in the presence of heat-killed. bifidobacteria and supernatants analyzed for cytokines by ELISA.

<sup>6)</sup> - : not tested

## 2. *Bifidobacterium longum* A-2의 임상실험

### 1) 검사 방법

건강한 한국인 성인 7명(남성, 평균연령 36세)을 대상으로 *B. longum* A-2를 냉동 건조한 분말( $5.0 \times 10^9$ CFU/g/회)로 매일 식후 2회 7일간 섭취시킨 후 분변을 검사하였다. 그리고 피험자에게는 섭취 7일전부터 절식 14일후 까지 4주동안 장내균총에 영향을 줄수 있는 음주, 약물섭취 및 유산균 함유제품은 일체 음용을 금지시켰다. 분변검사 횟수는 총 4회로 비피더스균 섭취 7일전· 1일전, 섭취 7일중, 절식 14일후에 실시하였다. 또한 분변처리는 30분내에 처리하여 외부 요인에 의한 균총 변화 가능성을 배제시켰다.

### 2) bifidobacteria 검사

비피더스균 선택배지<sup>(1)</sup>인 BS medium에서 37°C 2~3일간 혐기배양후 배지위에 성장한 colony는 현미경 검경을 통하여 bifidobacteria colony만을 계측하였다.

Table 11과 같이 *Bif. longum* A-2의 섭취 7일전  $1.0 \times 10^8$ , 섭취 1일전  $1.1 \times 10^8$ , 섭취 7일중  $2.5 \times 10^8$ , 절식 2주일후  $1.8 \times 10^8$ 으로 검출되었으며 비피더스균 섭취전에 비하여 섭취중, 절식후에 비피더스균수의 증가가 유의성( $P < 0.05$ )이 있었다. 또한 피험자별 비피더스균수도 Table 12와 같이 고도로 유의성( $P < 0.01$ )이 있었다. 이 결과는 비피더스균을 섭취함에 따라 분변중에서 비피더스균이 증가한다는 보고<sup>(7,23,24,25)</sup>와도 일치하였다. 즉 비피더스균을 섭취하면 장내 비피더스균의 수를

증가시킬 수 있음을 입증하는 결과라고 추정되었다.

**Table 11.** Effects of oral administration of *Bifidobacterium longum* A-2 on the level of Bifidobacteria, Lactobacilli, *Enterobacteriaceae*, *C. perfringens* in faeces

Periods	The level of <sup>1</sup>			
	Bifidobacteria (CFU/ml)	Lactobacilli (CFU/ml)	<i>Enterobacteriaceae</i> (CFU/ml)	<i>C. perfringens</i> (CFU/ml)
Before administration				
D-7(7th Day)	<sup>b</sup> 1.0×10 <sup>8</sup>	<sup>a</sup> 1.2×10 <sup>6</sup>	<sup>a</sup> 3.0×10 <sup>7</sup>	<sup>a</sup> 1.1×10 <sup>6</sup>
D-1(1st Day)	<sup>b</sup> 1.1×10 <sup>8</sup>	<sup>a</sup> 2.0×10 <sup>5</sup>	<sup>a</sup> 2.6×10 <sup>7</sup>	<sup>a</sup> 1.3×10 <sup>6</sup>
During administration				
D+7(7th Day)	<sup>a</sup> 2.5×10 <sup>8</sup>	<sup>a</sup> 1.2×10 <sup>5</sup>	<sup>a</sup> 1.1×10 <sup>7</sup>	<sup>a</sup> 7.5×10 <sup>5</sup>
After administration				
D+14(14thDay)	<sup>ab</sup> 1.8×10 <sup>8</sup>	<sup>a</sup> 5.0×10 <sup>4</sup>	<sup>a</sup> 1.6×10 <sup>8</sup>	<sup>a</sup> 2.3×10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Data expressed mean of values detrmined by Duncan's Multifle Range Test.

<sup>1)</sup> Means of three trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>a,b,ab</sup> Means with the same letter are not significantly different at each column.

**Table 12.** Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal bifidobacteria in seven healthy subjects

Subjects	Before administration		During administration	After administration
	D-7	D-1	D+7	D+14
A	2.5×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	8.3×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>
B	5.8×10 <sup>8</sup>	3.5×10 <sup>8</sup>	8.3×10 <sup>8</sup>	6.9×10 <sup>8</sup>
C	3.1×10 <sup>7</sup>	4.8×10 <sup>7</sup>	9.7×10 <sup>7</sup>	2.9×10 <sup>7</sup>
D	4.6×10 <sup>7</sup>	1.8×10 <sup>8</sup>	2.7×10 <sup>8</sup>	5.6×10 <sup>7</sup>
E	2.2×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>8</sup>	2.4×10 <sup>8</sup>
F	8.5×10 <sup>6</sup>	4.1×10 <sup>7</sup>	4.7×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>
G	3.6×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>8</sup>	2.7×10 <sup>8</sup>	2.4×10 <sup>8</sup>

1. Data expressed CFU of bifidobacteria in faeces(1g).
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Statistically significant at the P<0.01 level when compared with the numbers obtained among the subjects
4. Statistically significant at the P<0.05 level when compared with the numbers obtained before of the administration.

### 3) lactobacilli 검사

lactobacilli 선택배지<sup>(1)</sup>인 LBS medium에서 37℃ 2~3일간 호기배양후 배지위에 성장한 colony를 계측하였고 현미경 검경을 통하여 *Streptococcus*가 아닌 *Lactobacillus* colony만을 계측하였다.

Table 11과 같이 *Bif. longum* A-2의 섭취 7일전에는 1.2×10<sup>6</sup>, 섭취 1일전에는 2.0×10<sup>5</sup>, 섭취 7일중에는 1.2×10<sup>5</sup>, 절식 14일후에는 5.0×10<sup>4</sup>로 검출되어 섭취전에 비하여 섭취중과 절식후에는

유의성이 없었고 피험자에 따라서도 Table 13과 같이 유의성이 없었다. 이와 같은 결과는 비피더스균 섭취에 따라 장내 *Lactobacillus*는 증가하지 않음을 입증하는 것으로 판단되었다.

**Table 13.** Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal *Lactobacilli* in seven healthy subjects

Subjects	Before administration		During administration		After administration	
	D-7	D-1	D+7	D+7	D+14	D+14
A	$1.9 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	$4.7 \times 10^4$		$6.2 \times 10^3$	
B	$2.0 \times 10^4$	$6.4 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$		$2.2 \times 10^5$	
C	$1.8 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$	$1.7 \times 10^6$		$8.9 \times 10^5$	
D	$1.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$6.5 \times 10^6$		$5.3 \times 10^4$	
E	$1.9 \times 10^3$	$2.3 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$		$2.4 \times 10^5$	
F	$3.6 \times 10^3$	$6.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^4$		$2.7 \times 10^3$	
G	$1.6 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$		$5.5 \times 10^4$	

1. Data expressed CFU of *Lactobacilli* in faeces(1g)
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Data is not different Statistically when compared with the numbers obtained among the subjects & before of the administration.

#### 4) *Enterobacteriaceae* 검사

*Enterobacteriaceae* 선택배지<sup>(1)</sup>인 DHL medium에서 2~3일간 호기배양한후 배지위에 성장한 colony를 계측하였다.

Table 11과 같이 *B. longum* A-2의 섭취 7일전에는  $3.0 \times 10^7$ , 섭취 1일전에는  $2.6 \times 10^7$ , 섭취 7일중에는  $1.1 \times 10^7$ , 절식 14일후에는  $1.6 \times 10^8$ 로 검출되어 섭취전에 비하여 섭취중과 절식후에 유의성 있게 감소하지 않았다. 피험자에 따라서도 Table 14와 같이 유의성 있게 감소하지는 않았다. 따라서 본 실험에서는 비피더스균의 섭취로 *Enterobacteriaceae*가 감소되지는 않았다. 이 결과는 비피더스균을 섭취후 비피더스균의 회수수준이  $10^8$  이상일때 *Enterobacteriaceae*가 고도로 유의성(P<0.01) 있게 감소되었다는 보고<sup>(7)</sup>와 절식 2주후는 섭취전에 비해 유의성 있게 증가하였고 절식 2주후는 섭취 2주전에 비해 고도로 유의성 있게 증가하였다는 보고<sup>(20)</sup>와는 상이하게 분석되었다.

**Table 14.** Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal *Enterobacteraceae* in seven healthy subjects



Subjects	Before administration		During administration		After administration	
	D-7	D-1	D+7	D+7	D+14	D+14
A	$1.3 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$
B	$5.9 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$4.6 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$
C	$8.8 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$	$7.1 \times 10^6$	$7.1 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$
D	$7.6 \times 10^7$	$8.4 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
E	$3.8 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$4.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$
F	$8.1 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$	$2.3 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$
G	$3.1 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$

1. Data expressed CFU of *Enterobacteraceae* in faeces(1g)
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Data is not different Statistically when compared with the numbers obtained among the subjects & before of the administration.

#### 5) *Clostridium perfringens* 검사

*C. perfringens* 선택배지<sup>(1)</sup>인 NN medium에서 2~3일간 혐기배양한후 배지위에 성장한 colony 즉 colony 주위에 환이 형성된 colony만을 계측하였다.

Table 11과 같이 *C. perfringens*는 섭취 7일전에는  $1.1 \times 10^6$ , 섭취 1일전에는  $1.3 \times 10^6$ , 섭취 7일중에는  $7.5 \times 10^5$ , 절식 14일후에는  $2.3 \times 10^5$ 로 검출되어 섭취전에 비하여 섭취중과 절식후에 유의성 있게 감소하지는 않았다. 또한 피험자에 따라서도 Table 15와 같이 유의성있게 감소하지 않았다. 이 결과는 비피더스균을 섭취후 유아와 성인 모두 섭취전에 비하여 섭취중에 또한 섭취전에 비하여 섭취후에 모두 고도로 유의성( $P < 0.01$ ) 있게 감소된 보고<sup>(21)</sup>와는 상이하게 분석되었다. *C. perfringens* 균은 장내부패균으로서 발암물질을 생성시키는 유해균으로서 *Bif. longum* 섭취에 의해 감소될 수 있다는 보고<sup>(20)</sup>와 같이 비피더스균 섭취에 따른 *C. perfringens* 균이 유의성 있게 감소될 수 있는 추가 실험이 필요할 것으로 추정되었다.

Table 15. Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal *C. perfringens* in seven healthy subjects

Subjects	Before administration		During administration		After administration	
	D-7	D-1	D+7	D+7	D+14	D+14
A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C	n.d	$1.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	n.d	n.d
D	$2.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$
E	$2.8 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$
F	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
G	$1.2 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$

1. Data expressed CFU of *Cl. perfringens* in faeces(1g)
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Data is not different Statistically when compared with the numbers obtained among the subjects & before of the administration.

4. n.d means not detected

6) pH 및 암모니아검사

암모니아 검사 Kit(Wako Ammonia, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)를 사용하여 암모니아 함량을 분석하였다. 즉 검체를 회석후 Wako 시약을 사용하여 발색시키고 38℃에서 20분간 가온 및 냉각시켜 원심분리(2,500 rpm, 10분)하고 상등액을 630 nm에서 흡광도를 측정하여 암모니아 함량을 측정하였다. 검체를 직접 Test Paper(pH 5.4~7.0)에 묻혀 변화된 색상을 기준색상과 비교하여 pH를 측정하였다.

Table 16과 같이 *Bif. longum* A-2의 섭취후 분변의 pH는 섭취 7일전에는 6.22, 섭취 1일전에는 6.31, 섭취 7일중에는 5.97, 절식 14일후에는 6.42로 섭취전에 비하여 섭취중과 절식후 모두 pH가 감소하는 경향이 있었으나 유의성 있게 감소하지는 않았다. 또한 피험자에 따라서도 Table 17과 같이 유의성 있게 감소하지 않았다.

암모니아도 Table 16과 같이 역시 섭취전에 비해 섭취중과 절식후 모두 유의성 있게 감소되지 않았고 피험자에 따라서도 Table 18과 같이 유의성이 인정되지 않았다.

성인에게 비피더스균을 섭취시킨 결과 섭취 7일전 pH 6.1, 섭취 5주중 pH 5.6, 절식 14일후 pH 6.1로서 섭취전에 비하여 섭취중에 또한 절식후에 비하여 섭취중에 모두 유의성(P<0.05) 있게 감소하였고 암모니아의 경우도 섭취중의 암모니아는 섭취전 및 절식후에 비해 유의성 있게 감소하였다. Enterobacteria, bacteroides 및 clostridia를 포함하는 장내 박테리아가 암모니아를 생성시키는데 식이로 섭취한 비피더스균이 bacteroides 및 clostridia를 감소시킴으로 섭취중의 암모니아는 섭취전에 비해 유의성 있게 감소되었다는 보고<sup>(20)</sup>와 본 실험 결과는 상이하게 분석되었다.

Table 16. Effects of oral administration of *Bif. longum* A-2 on the level of pH, Ammonia, and  $\beta$ -Glucuronidase activity in faeces

Periods	The level of <sup>1</sup>		
	pH	Ammonia ( $\mu$ g/g)	$\beta$ -Glucuronidase ( $\mu$ g/hr/g)
Before administration			
D-7(7th Day)	<sup>a</sup> 6.22	<sup>a</sup> 684.3	<sup>a</sup> 14.148
D-1(1st Day)	<sup>a</sup> 6.31	<sup>a</sup> 820.9	<sup>a</sup> 13.447
During administration			
D+7(7th Day)	<sup>a</sup> 5.97	<sup>a</sup> 727.0	<sup>b</sup> 8.123
After administration			
D+14(14th Day)	<sup>a</sup> 6.42	<sup>a</sup> 532.6	<sup>ab</sup> 10.612

<sup>1</sup>Data expressed mean of values determined by Duncan's Multiple Range Test.

<sup>1)</sup>Means of three trials and each trial were examined in duplicate.

<sup>a,b,ab</sup>Means with the same letter are not significantly different at each column

Table 17. Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal pH in seven healthy subjects

Subjects	Before administration		During administration		After administration	
	D-7	D-1	D+7	D+14	D+7	D+14
A	6.6	6.2	6.8	7.0	6.8	7.0
B	7.0	6.8	5.6	6.5	5.6	6.5
C	5.6	5.6	5.6	6.5	5.6	6.5
D	6.2	6.5	5.6	6.8	5.6	6.8
E	7.0	7.0	6.2	6.4	6.2	6.4
F	5.6	6.5	5.6	6.2	5.6	6.2
G	5.6	5.6	6.4	5.6	6.4	5.6

1. Data expressed pH in faeces
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Data is not different Statistically when compared with the numbers obtained among the subjects & before of the administration

Table 18. Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal ammonia concentration in seven healthy subjects

Subjects	Before administration		During administration		After administration	
	D-7	D-1	D+7	D+14	D+7	D+14
A	1442.2	1365.7	1248.1	829.1	1248.1	829.1
B	716.7	740.5	356.6	547.2	356.6	547.2
C	419.4	658.8	348.0	197.8	348.0	197.8
D	320.8	352.3	946.6	266.4	946.6	266.4
E	1108.6	1508.2	814.0	163.1	814.0	163.1
F	355.2	541.0	200.5	302.7	200.5	302.7
G	427.1	579.9	1175.4	1358.9	1175.4	1358.9

1. Data expressed Ammonia concentration( $\mu\text{g/g}$ ) in faeces
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Data is not different Statistically when compared with the numbers obtained among the subjects & before of the administration.

### 8) $\beta$ -glucuronidase activity 검사

Goldin 등<sup>(22)</sup>의  $\beta$ -glucuronidase assay 방법에 준하여 실시하였다.

Table 16과 같이 *B. longum* A-2의 섭취후 장내세균에 의해 생성되는 대장암 유발성 효소인  $\beta$ -glucuronidase는 섭취 7일전 14.148  $\mu\text{g/hr/g}$ , 섭취 1일전 13.447  $\mu\text{g/hr/g}$ , 섭취 7일중 8.123  $\mu\text{g/hr/g}$ , 절식 14일후 10.612  $\mu\text{g/hr/g}$  으로 검출되어, 섭취전에 비하여 섭취중과 절식후에 유의성 있게 감소하였다. 또한 피험자에 따라서도 Table 19와 같이 유의성 있게 감소하였다. 이 결과는 비피더스균을 섭취시킨 후  $\beta$ -glucuronidase가 섭취 7일전에는 16  $\mu\text{mol/hr/g}$  이었으나 섭취 5주중에는 6.1  $\mu\text{mol/hr/g}$  로서 섭취전에 비해 섭취중, 절식후에 비해 섭취중에 유의성 있게 감소하였고 이것은 비피더스균이  $\beta$ -glucuronidase를 생성하는 enterobacteria, clostridia, bacteroides를 감소시킨 결과라는 보고<sup>(20)</sup>와 일치하였다. 즉  $\beta$ -glucuronidase를 생성하는 인체 유해균에 영향을 줄수 있는 유산균을 섭취하는 방법도 건강을 유지할 수 있는 한 방법임을 입증하는 사실이라고 판단하

었다.

**Table 19.** Effect of oral administration of *Bif. longum* A-2 on fecal  $\beta$ -glucuronidase activity in seven healthy subjects

Subjects	Before administration During administration After administration			
	D-7	D-1	D+7	D+14
A	10.833	13.0518	7.278	10.096
B	12.988	11.386	4.6081	10.247
C	21.579	15.057	6.9795	11.797
D	10.018	15.062	5.4974	17.355
E	18.763	17.613	15.280	12.093
F	12.093	12.241	9.8697	8.9804
G	12.760	9.7215	7.3501	3.7188

1. Data expressed  $\beta$ -glucuronidase activity( $\mu\text{g/hr/g}$ )
2. Means of three trials and each trial were examined in duplicate.
3. Statistically significant at the  $P<0.05$  level when compared with the numbers obtained among the subjects
4. Statistically significant at the  $P<0.01$  level when compared with the numbers obtained before of the administration.

9) colony 검색

선택배지에서 성장한 colony를 MRS agar에서 순수 계대배양을 3~4회 실시한후 현미경 검경 및 당발효성(API 50 CHL)를 통하여 비피더스균 A-2 또는 lactobacilli임을 확인하였다.

BS agar에서 성장한 colony와 LBS agar에서 성장한 colony를 취하여 염색한후 형태 차이를 현미경으로 검경함으로서 bifidobacteria와 lactobacilli로 확인하였다. 또한 API 50 CHL Kit를 사용하여 당발효성을 검색한 결과 Table 20과 같이 BS agar의 colony는 *Bif. longum* A-2, LBS agar 의 colony는 각각 *L. acidophilus*, *L. casei*로 동정되었다.

**Table 20.** Carbohydrate utilization of colonies on BS medium and LBS medium

Carbohydrate	colony on BS & LBS		
	Colony 1	Colony 1	Colony 2
	on BS medium	on LBS medium	on LBS medium
Control	0		
Glycerol	1	-	-
Erythritol	2	-	-
D-Arabinose	3	-	-
L-Arabinose	4	+	-
Ribose	5	+	-
D-Xylose	6	+	-
L-Xylose	7	-	-
Adonitol	8	-	-
$\beta$ -Methyl-xyloside	9	-	-
Galactose	10	+	+
D-Glucose	11	+	+
D-Fructose	12	+	+
D-Mannose	13	+	+
L-Sorbose	14	-	-
Rhamnose	15	-	-
Dulcitol	16	-	-
Inositol	17	-	-
Mannitol	18	+	+
Sorbitol	19	+	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	20	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	21	+	-
N-Acetyl glucosamine	22	-	-
Amygdaline	23	-	+
Arbutine	24	-	-
Esculine	25	+	+
Salicine	26	+	+
Cellobiose	27	-	+
Maltose	28	+	+
Lactose	29	+	-
Melibiose	30	+	-
Saccharose	31	+	+
Trehalose	32	-	+
Inuline	33	-	-
Melezitose	34	+	+
D-Raffinose	35	+	-
Amylon	36	-	-
Glycogene	37	-	-
Xylitol	38	-	-
$\beta$ -Gentlobiose	39	+	-
D-Turanose	40	+	-
D-Lyxose	41	-	-
D-Tagatose	42	-	-
D-Fucose	43	-	-
L-Fucose	44	-	-
D-Arabitol	45	-	-
L-Arabitol	46	-	-
Gluconate	47	-	-
2-ceto-gluconate	48	-	-
5-ceto-gluconate	49	(+)	-
Identification	<i>Bif. longum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>

### III. 요약

본 실험은 건강한 한국인의 분변으로부터 분리한 20종과 상업종균 3종을 대조군으로 하여 비피더스균의 특성을 내산성, 내담즙성, 발효특성, 생존성, 콜레스테롤 분석, 항미생물 분석, 항돌연변이 분석, Phagocytosis 분석, TNF- $\alpha$  및 IL-6 분석치를 균주간 비교 분석하였다.

또한 비피더스균의 균주간 비교 분석 결과 최종 선정된 *Bifidobacterium longum* A-2의 임상실험에 의한 장내 변화를 분석하고자 건강한 한국인 성인 7명(남성, 평균 연령 36세)를 대상으로 *Bif. longum* A-2를 냉동건조한 분말( $5.0 \times 10^9$ /g/회)로 매일 식후 2회 7일간 섭취후 분변을 검색하였다. 분변검사 횟수는 총 4회로 비피더스균 섭취 7일전, 1일전, 섭취 7일중, 절식 14일후에 실시하였다. 비피더스 균주간 특성 비교 결과와 *Bif. longum* A-2의 임상실험 결과는 다음과 같다.

1. 내산성에서는 2균주(A-2, A-9가, 내담즙성에서 6균주(A-2, A-5, A-13, A-14, A-18, A-22) 균

주가 높게 나타났다.

2. pH, TA, 비피더스균수를 비교한 발효특성에서는 6균주가 pH 4.5이하, TA 0.90이상으로 나타났다. A-23 균주는 젖산에 대한 초산의 생성이 가장 낮았다. 특히 A-2의 탄수화물 이용성에서 젖산에 대한 초산의 비율이 가장 낮은 것은 Mannitol로 분석되었다.
3. 생존성에서는 A-2가 상업종균 A-22에 비하여 4℃, 20℃ 보관중에서도 감소 경향이 적어 안정성이 있는 것으로 나타났다.
4. 콜레스테롤 분석에서는 5균주(A-8, A-10, A-11, A-12, A-20)가 30% 이상 감소시켜 콜레스테롤 저하 효과가 매우 높게 나타났다.
5. *E. coli*, *Sta. aureus*, *Pseudo. flores*에 대한 항미생물 분석에서 *Sta. aureus*에 대하여 A-1, A-2가 높게 나타났다. 특히 pH를 조정하여도 *Sta. aureus*에 대하여 항미생물 작용이 높게 나타난 A-20균주는 추가실험의 가치가 있을 것으로 판단되었다.
6. 항돌연변이 분석에서는 돌연변이원인 NQO와 IQ에 대하여 공히 70%이상 항돌연변이작용을 나타낸 A-2, A-12 및 A-23 균주가 높게 나타났다.
7. 면역능 분석은 phagocytosis, TNF- $\alpha$  생성, IL-6 생성에 있어서 균주 4종(A-1, A-5, A-9, A-20)이 높게 나타났으며 그중에서도 A-5균주는 매우 높은 수치를 보였다.
8. *Bif. longum* A-2 식이에 따른 장내 비피더스균의 변화는 섭취 7일전  $1.0 \times 10^8$ , 섭취 1일전  $1.1 \times 10^8$ , 섭취 7일중  $2.5 \times 10^8$ , 절식 14일후  $1.8 \times 10^8$ 으로 검출되어 섭취전에 비해 섭취중과 절식후에 비피더스균수는 유의성(P<0.05)이 있게 증가하였고 피험자에 따라서도 비피더스균수는 고도로 유의성(P<0.01)이 있게 증가하였다.
9. *Bif. longum* A-2의 섭취후 장내세균에 의해 생성되는 대장암 유발성 효소인  $\beta$ -glucuronidase의 변화는 섭취 7일전 14.148  $\mu\text{g/hr/g}$ , 섭취 1일전 13.447  $\mu\text{g/hr/g}$ , 섭취 7일중 8.123  $\mu\text{g/hr/g}$ , 절식 14일후 10.612  $\mu\text{g/hr/g}$ 으로 검출되어 섭취전에 비해 섭취중과 절식후 고도로 유의성(P<0.01)이 있게 감소하였고 피험자에 따라서도 유의성(P<0.05)이 있게 감소하였다.
10. 한편 lactobacilli, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, pH, 암모니아의 변화는 유의성이 없었다.
11. 임상실험에서 BS 배지에서 성장한 colony의 당발효성을 검색한 결과 식이로 섭취한 *Bif. longum* A-2의 당발효성과 동일하게 나타난 점으로 보아 경구 섭취한 *Bif. longum* A-2는 살아서 장까지 도달하며 장내에 정착할 수도 있을 것으로 추정되었다.

상기 결과와 같이 비피더스균주간 특성을 비교한 결과 많은 특성에서 좋은 결과를 나타낸 *Bif. longum* A-2 균주를 최종적으로 선발하게 되었고 이 균주가 외국의 상업종균과 특성의 비교에 의의가 있었다. 또한 본 연구는 한국인으로부터 분리한 *Bif. longum* A-2에 대하여 한국인을 대상으로 임상실험에서 장내의 변화를 검증한 점에서 의의가 있었다.

#### IV. 인용 문헌

1. 光岡知足. 1980. 腸内菌の世界. 叢文社, 東京.
2. 光岡知足. 1985. 牛乳についての新しい知見. 73. 牛乳普及協會.
3. 강국희. 1996. 乳酸菌食品學, 성균관대학교 출판부.
4. Salminen, S. and A.V. Wright. 1993. Lactic Acid Bacteria. New York.
5. Clark, P.A., L.N. Cotton, and J.H. Martin. 1993. Selection of Bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* 11-14.
6. Ibrahim, S.A., and A. Bezkorovainy. 1993. Survival of Bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci. Food. Agric.* 62:351-354.
7. 光岡知足. 1994. ビフィズス菌の研究. (財)日本ビフィズス菌センター.
8. Martin, J.H. and K.M. Chou. 1992. Selection of Bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: I-Tolerance to pH of yogurt. *Cult. Dairy Prod. J.* 27(4). 21-26.
9. Gilliland, S.E. and D.K. Walker. 1990. 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.
10. 三橋重之, 村田信子. 1991. *Bifidobacterium*의他細菌의増殖にする抑制作用について. 日本營養·食糧學會誌. 44(5):365-372.
11. Nadathur, S.R., S.J. Gould, A.T. Bakalinsky. 1995. Antimutagenicity of an acetone extract of yogurt. *Mutation. Res.* 334:213-224.
12. Hatcher, G.E., and R.S. Lambrecht. 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76:2485-2492.
13. 吉田眞次. 1996. 乳酸菌の科學と技術, 乳酸菌研究集談會, 東京.
14. Maron, D.M. and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173.
15. Wan, C.P., C.S. Park, and B.H. Lau. 1993. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods.* 162:1-7.
16. Dong, W., J.I. Azcona-Olivera, K.H. Brooks, J.E. Linz, and J.J. Pestka. 1994. Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, 6 during exposure to vomitoxin (deoxyvalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127: 282-290.
17. 지근억, 이세경, 김인희. 1994. 개량된 *Bifidobacterium*의 선택배지 개발. *Korean J. Food Sci. Technol* 26(5):526-531.
18. Pierrette cassand, H. Abdelali, C. Bouley, G. Denariaz, and J.F. Narbonne. 1994. Inhibitory effect of dairy products on the mutagenicities of chemicals and dietary mutagens. *J. Dairy Res.* 61: 545-552.
19. 김대을. 1976. 유산균 발효유의 경시변화에 대한 연구. *공중보건잡지.* 제13권 제1호. 85-90
20. Benno, T. and T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.* 36(7):683-694.
21. 田中隆一郎, 遠山清, 諸富正巳, 高山博夫, 南野昌信, 黒島敏方, 務台方彦. 1981. 乳酸産菌の implantation-腸内腐敗生産物抑制. 光岡知足 編, 腸内フローラと發癌, 學會出版センター, 東京.
22. Goldin, B.R., L. Swenson, J. Dwyer, M. Sexton, and S.L. Gorbach. 1980. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl.*

Cancer Inst. 64(2):255-261.

23. Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. J. Lin. Microbial. 6: 263-268.
24. Bouhnik, Y., P. Pochart, P. Marteau, G. Arlet, I. Goderel, and J.C. Rambaud. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium*. sp. ingested in fermented milk. Gastroenterology 102:875-878.
25. Pochart, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlioux, and J.C. Rambaud. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. Am. J. Clin. Nutr. 55:78-80.