

Culture-independent Analysis of Human Gut Microbiota and New Probiotic Effect for Human Health

Yoshimi Benno, DVM, Ph.D

RIKEN BioResource Center
Microbe Division / JCM

Culture-independent Analysis of Human Gut Microbiota and New Probiotic Effect for Human Health

Yoshimi Benno, DVM, Ph.D

RIKEN BioResource Center
Microbe Division / JCM

A portion of these bacteria, more than 500 species of human gut microbiota, with an estimated total weight of approximately 1.5 kg, is excreted with the feces - nearly one trillion per gram of dry feces. The whole analysis of gut microbiota is gradually coming into focus through the efforts of our laboratory. Recently, an association has been found between gut microbiota and many diseases beyond those of the gastrointestinal system, including today's three leading causes of death - cancer, heart disease, and cerebrovascular disease - as well as allergies and dementia. Our group is trying to capture the whole analysis of gut microbiota, which constantly changes with age and lifestyle-related factors such as diet, and apply it to preventive medicine.

Probiotics have been defined in several ways, depending on our understanding of the mechanisms of action of their effects on health and well-being of humans. At present, the most commonly used definition is that of Fuller (1989): *Probiotics are live microbial feed supplements, which beneficially affect the host animal by improving its intestinal microbial balance.* Recently a European expert group (Salminen et al., 1998, Salminen & von Wright, 1998) widened the definition to include mechanisms other than just microbiota mediated ones. Now, the definition was as follows: Probiotics are live microbial; food ingredients that have a beneficial effect on human health (Salminen et al., 1999).

To include the current application and scientific data on proven effects of probiotics, we proposed the following definition: Probiotics are microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host.

In my presentation, I will introduce a new culture-independent analysis of human gut microbiota and the new function of probiotics. Then, I also need to describe my research history of human intestinal microbiota in RIKEN for above 30 years.

We were only seeing 20% of whole gut microbiota ?

In the mid-19th century, Theodor von Escherich of the University of Vienna found bacteria

in feces - the species that would eventually be called *Escherichia coli*. However, until the mid-20th century, few fecal bacteria other than *E. coli* had been successfully cultured, leading most to believe that the majority of bacteria existing in the intestines were dead. The dispeller of this long-held belief was Dr. T. Mitsuoka, a RIKEN scientist who, in the 1950s, began to reveal that there are many living bacteria in the gut tract using some agar media and an anaerobic culture procedure. It turned out that most gut bacteria are anaerobic bacteria that cannot survive in the presence of oxygen.

I spent my younger days with gut microbiota and joined Dr. Mitsuoka's laboratory at RIKEN approximately 30 years ago. Our work can be likened to artisanship - creating agar medium by trial and error, and counting individual culturable bacteria to record bacterial species and numbers as given in Table 1. Numerous microbial species consist of the gut microbiota in 30 health Japanese. Microbial species with high numbers and incidence in

Table 1. Composition of fecal microbiota in 30 Japanese

High counts High occurrence	Low counts High occurrence	High counts Low occurrence
<i>Bacteroides fragilis</i> group		<i>Bacteroides ovatus</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i> , <i>Bacteroides distasinis</i> ,		<i>Bacteroides splanchnicus</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides uniformis</i>		<i>Bacteroides ureolyticus</i>
<i>Bacteroides</i> spp.		<i>Bacteroides putredinis</i>
<i>Prevotella buccae</i>		<i>Prevotella veroralis</i>
<i>Prevotella oris</i>		<i>Fusobacterium naviforme</i>
<i>Prevotella</i> spp.		<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Fusobacterium prausnitzii</i>		<i>Fusobacterium mortiferum</i>
<i>Fusobacterium russii</i>		<i>Fusobacterium varium</i>
	<i>Lactobacillus cateniforme</i>	<i>Mitsuokella multiacida</i>
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Bifidobacterium longum</i>		<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.		
<i>Collinsella aerofaciens</i>		
<i>Eubacterium rectale</i>		<i>Eubacterium moniliforme</i>
<i>Eubacterium</i> spp.		
<i>Ruminococcus productus</i>		
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Ruminococcus</i> spp.	<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Clostridium coccoides</i>	
	<i>Clostridium butyricum</i>	
<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>	
<i>Clostridium ramosum</i>		
<i>Clostridium clostridioforme</i>		

human gut microbites are *Bacteroides vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *Collinsella aerofaciens*, *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. Then, fecal microorganisms with low number and high incidence were *Clostridium clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* and *Escherichia coli*.

Not only does it require a great deal of perseverance and energy, but also the stool specimens are malodorous and pose a constant risk of bacterial infection. No one is excited to take on this assignment.

Dr. Mitsuoka received the Japan Academy Award in 1988 for his work on systematic research on gut microbiota utilizing original culturing techniques. "Everyone thought that we knew all there was to know about gut microbiota, and that Dr. Mitsuoka's work was complete." However, we could not help but wonder if the culturing methods would be available at that time had really taught us everything. Culture-independent analysis, which became available for the study of gut microbiota in the mid-1980s, enabled researchers to determine the presence of gut microbiota without culturing. In 1996, we came across a stunning paper produced by a group of molecular biologists who analyzed DNA extracted from bacteria isolated from human feces, reporting that 10% to 25% of the bacteria can be cultured but the remaining 75% are either extremely difficult or impossible to culture, and that the gut microbiota that had been thought to comprise approximately 100 species are in fact 500 to 1000 species. The gut microbiota that seemingly had been almost fully elucidated by the culturing methods available at that time, which were the sum total of the efforts of many researchers, were merely around 20~30% of the extant bacteria.

Capturing the whole analysis of human gut microbiota

In 1998, we shifted his research focus to elucidating the whole analysis of gut microbiota, including those "Yet-unexploit" bacteria, by incorporating DNA analysis with conventional culturing methods. Seven hundred and forty-four DNA clones bacteria isolated from the fecal specimens of three healthy Japanese subjects, and found that 75% were novel gut bacteria, and that there are great individual variations in the composition of gut microbiota.

The human gut microbiota from three healthy subjects and elderly persons were compared using sequence analysis of 16S rDNA libraries (Hayashi et al., 2002, Hayashi et al., 2003). Direct counts ranged from 1.9×10^{11} to 4.0×10^{11} cells/g (wet weight) while plate counts totaled 6.6×10^{10} to 1.2×10^{11} CFU/g (wet weight). Sixty to seventy percent of the bacteria in human intestinal tract cannot be cultured with currently available methods. The 16S rDNA libraries from three healthy subjects and three elderly subjects were generated from total community DNA in the intestinal tract, using universal primers sets. Randomly selected clones were

partially sequenced. All purified colonies detected from the surface of the agar plate were used for partial sequencing of 16S rDNA. On the basis of sequence similarities, the clones and colonies were classified into several clusters corresponding to the major phylum of the domain *Bacteria*. Among a total of 984 clones (744 clones from three healthy subjects and 240 clones from elderly subjects) obtained, approximately 25% of the clones belonged to 31 known species for healthy subjects and 46% belonged to 27 known species for elderly subjects. About 75% in healthy subjects and 54% in elderly persons of the remaining clones were novel “phylotypes” (at least 98% similarity of clone sequence). The predominant intestinal microbial community consisted of 130 species or phylotypes for healthy subjects and 56 novel phylotypes according to the sequence data in our study. The 16S rDNA libraries (Table 2) included the *Bacteroides* group, the Streptococcus group, the *Bifidobacterium* group, and *Clostridium* rRNA clusters IV(Fig. 1), IX, XIVa (Fig. 2), and XVIII in healthy subjects and the *Bacteroides* group, *Clostridium* rRNA cluster IV(Fig. 1), IX, *Clostridium* rRNA

Table 2. Composition of fecal microbiota in three healthy subjects and three elderly subjects as revealed by 16S rRNA gene libraries (%)

	Healthy subjects			Elderly subjects		
	O	B	S	A	B	C
<i>Clostridium</i> Cluster I	0	1.1	0	0	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> group)	22.7	12.4	11	34.7	16.1	9.5
<i>Clostridium</i> Cluster IX	0	9.8	34	0	35.8	14.3
<i>Clostridium</i> Cluster XI	0	0.4	0.8	0	1.2	0
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa (<i>Clostridium coccoides</i> group)	58.8	23.7	29	25.3	2.5	3.5
<i>Clostridium</i> subcluster XIVb	0.5	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster XVI	0	4.1	0	4	0	0
<i>Clostridium</i> Cluster VXII	0	8.3	0	0	2.5	0
<i>Clostridium</i> Cluster XVIII	0	0	0.4	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	0	0.4	5.3	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	1.2	0
<i>Cytophaga-Flabobacter-Bacteroides</i>	5	9.4	16.3	20	8.6	15.4
<i>Streptococcus</i>	3.7	28.8	0.4	2.7	1.2	0
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.5	0.8	1.6	5.3	17.3	54.8
Others	8.8	0.8	1.2	8	13.6	2.4

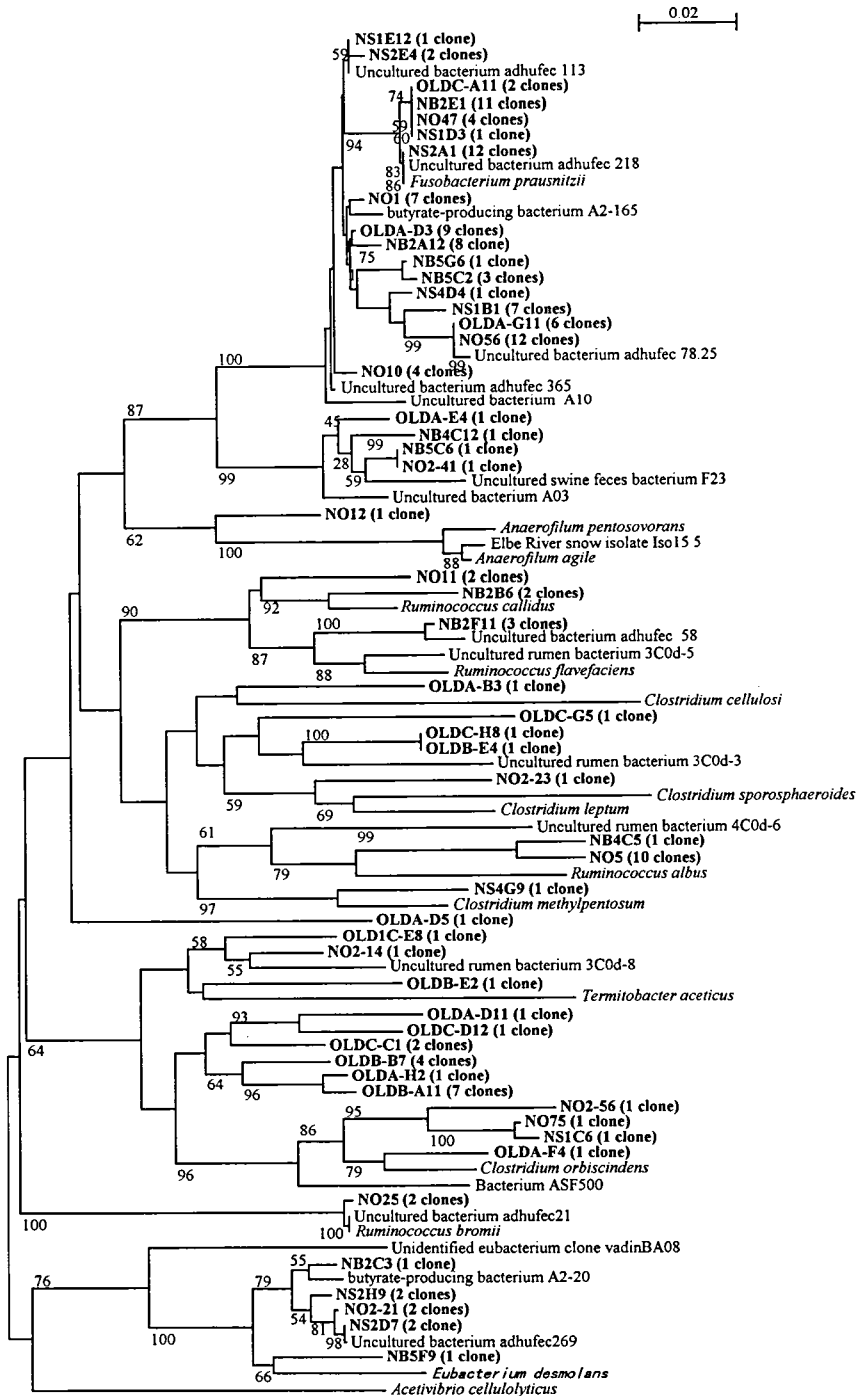


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA sequences from fecal samples of healthy subjects and elderly subjects within the *Clostridium* rRNA cluster IV (*Clostridium leptum* group). The tree was constructed by the use of neighbor-joining analysis based on 16S rDNA sequences. Bootstrap values (n=100 replicates) of ≥ 50 are considered pparentages. The scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Clone from the 16S rDNA library are shown by each character (NO, sample O; NB, sample B; NS, sample S; OLDA, sample A, OLDB, sample B; OLDC, sample C).

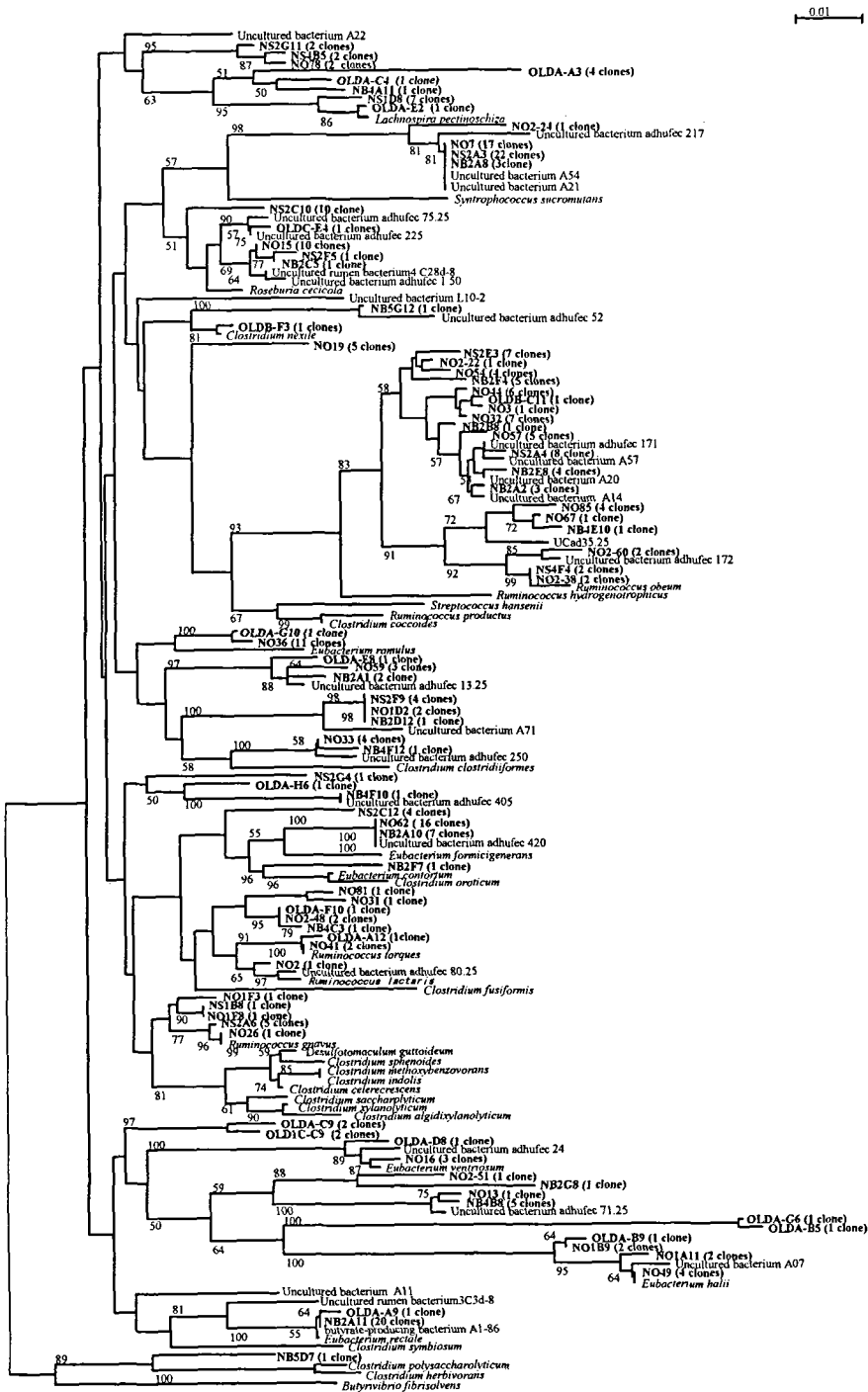


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA sequences from fecal samples of healthy subjects and elderly subjects within the *Clostridium* rRNA subcluster XIVa (*Clostridium coccoides* group). The tree was constructed by the use of neighbor-joining analysis based on 16S rDNA sequences. Bootstrap values ($n=100$ replicates) of ≥ 50 are considered per parentages. The scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Clone from the 16S rDNA library are shown by each character (NO, sample O; NB, sample B; NS, sample S; OLDA, sample A, OLDB, sample B; OLDC, sample C).

subcluster XIVa (Fig. 2) and “*Gammaproteobacteria*” in elderly subjects. In addition, a number of previously uncharacterized and uncultured microorganisms were recognized in clone libraries. Our results also showed marked individual differences in the composition of intestinal microbiota.

Subsequently, around 2000, we began to use T-RFLPs (terminal restriction fragment length polymorphisms) to facilitate determination of the compositional patterns of human gut microbiota (Sakamoto et al., 2003). T-RFLP analysis consists of extraction of genes for 16S ribosomal RNA gene from various gut bacteria in feces, amplification using primers (molecules that provide a starting point for DNA synthesis) labeled with fluorescent dyes, and digestion with two different restriction enzymes (*Msp*I and *Hha*I). Restriction enzymes cleave DNA, which is composed of four different bases, at specific sequences, generating DNA fragments of various lengths depending on the number of bases. The amount of each DNA fragment is determined based on the intensity of its fluorescence signal, and aligning the DNA fragments by the number of bases provides a gut microbiota profile reflecting the composition of gut microbiota and their amounts illustrated in Fig 3.

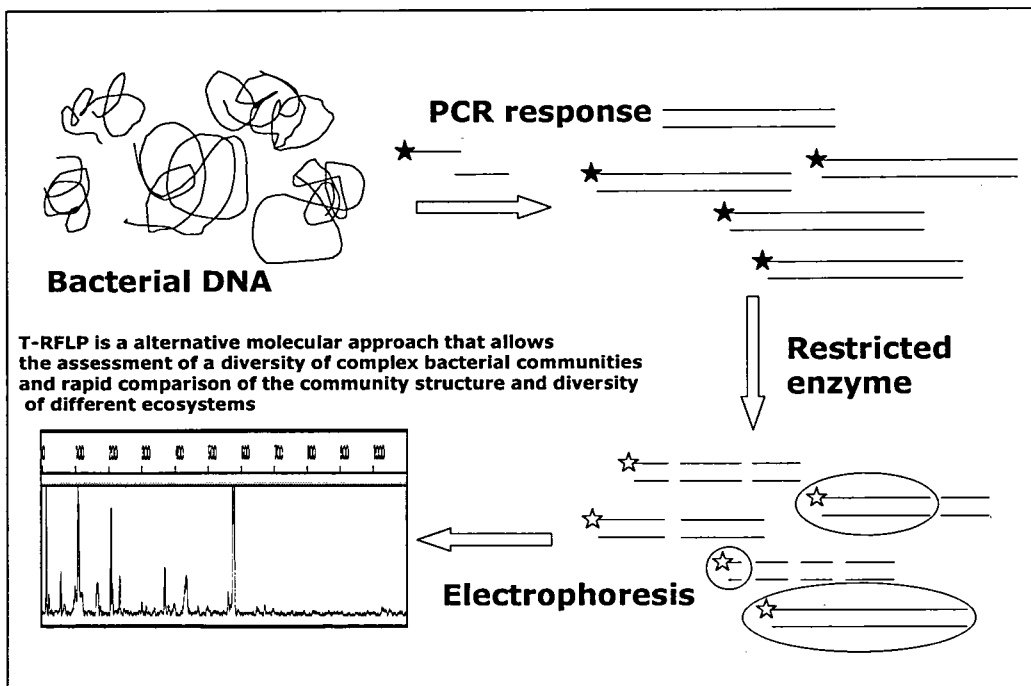


Fig. 3. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) method.

Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota.

Various molecular-biological approaches using the 16S rRNA gene sequence have been used for the analysis of human colonic microbiota. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis is suitable for a rapid comparison of complex bacterial communities. Terminal-restriction fragment (T-RF) length can be calculated from a known sequence, thus one can predict bacterial species on the basis of their T-RF length by this analysis. Finally, we can build a phylogenetic assignment database for T-RFLP analysis of human colonic microbiota (PAD-HCM), and demonstrate the effectiveness of PAD-HCM compared with the results of 16S rRNA gene clone library analysis. PAD-HCM was completed to include 342 sequence data obtained using four restriction enzymes (Matsumoto et al., 2005). Approximately 80% of the total clones detected by 16S rRNA gene clone library analysis were the same bacterial species or phylotypes as those assigned from T-RF using PAD-HCM (Table 3). Moreover, large T-RFs consisted of common species or phylotypes detected by both analytical methods. All pseudo-T-RFs identified by mung bean nuclease digestion could not be assigned to a bacterial species or phylotype, and this finding shows that pseudo-T-RFs can also be predicted using PAD-HCM. We conclude that PAD-HCM built in this study enables the prediction of T-RFs at the species level including difficult-to-culture bacteria, and that it is very useful for the T-RFLP analysis of human colonic microbiota.

Exploring the relationship between gut microbiota and disease

Gut bacteria live in the colon, which is a “wellspring of disease”; in fact, the colon is associated with the greatest number of different diseases of any human organ. The gastrointestinal tract is also on the “front line of immunity”, as it is connected to the outside world. Certain gut bacteria generate putrefactive products such as ammonia and hydrogen sulfide, bacteriotoxins, and carcinogens. These toxic substances damage the gut tract and induce colon cancer and a variety of other colonic diseases, and some of them are absorbed and circulated throughout the body by the blood, causing damage to various organs. Thus, there is an increasing body of evidence that gut bacteria can be the causes of carcinogenesis, aging, and various pathological conditions, including arteriosclerosis resulting from cholesterol deposition, liver damage, dementia, autoimmune diseases, and weakened immunity.

For example, *Clostridium* species are found at high levels in the feces of persons suffering from senile dementia. Once the toxic substances produced by these bacteria are spread throughout the body, the functions of neurotransmitters etc. are inhibited, resulting in impaired

Table 3. Bacterial species and phylotypes detected from a Japanese feces by 16S rDNA clone library analysis

Species or phylotype	No. of clones	(%)	
Uncultured firmicute clone N062	13	14.1	AB064740
Human intestinal firmicute clone CB17	6	6.5	AB064890
Uncultured bacterium clone HuCB21	5	5.4	AJ408996
Phylotype 41A10	1	1.1	
Uncultured human intestinal bacterium clone JW1A10	1	1.1	AB080866
Uncultured firmicute clone NB4F10	1	1.1	AB064778
<i>Clostrisium nexile</i>	2	2.2	AF499909
<i>Eubacterium rectale</i>	6	6.5	AY169438
Uncultured firmicute clone NO16	2	2.2	AB064715
Phylotype 41F10	1	1.1	
Uncultured human intestinal bacterium clone JW1A1	3	3.3	AB080865
Phylotype 41F09	1	1.1	
Uncultured bacterium clone OLDA-F10	2	2.2	AB099739
Uncultured bacterium clone p-2431-55G5	8	8.7	AF371596
Uncultured firmicute clone NB5F9	1	1.1	AB064783
Uncultured firmicute clone N02-21	1	1.1	AB064784
Uncultured firmicute clone NS2D7	1	1.1	AB064710
Butyrate-producing bacterium A2-165	15	16.3	AJ270469
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6	6.5	AY169427
Uncultured <i>Clostridium</i> sp. clone NO6	3	3.3	AB064860
<i>Streptococcus mitissalivarius</i>	1	1.1	AF393762/ AY188352
Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone NO44	3	3.3	AB064754
Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone NB4C1	1	1.1	AB064765
Uncultured bacterium clone p-2746-24E5	2	2.2	AF371546
<i>Ruminococcus obeum</i>	3	3.3	AB064755
Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone NO3	1	1.1	AB064755
<i>Ruminococcus</i> sp. CO12	1	1.1	AB064896
<i>Eubacterium halii</i>	1	1.1	L34621
Total	92	100.0	

Bacterial species and phylotypes detected from both of T-RFLP and 16S rRNA gene clone library analysis in red

brain function. Recent molecular biological studies suggest that toxic substances produced by gut bacteria may promote cholesterol deposition in blood vessels, inducing arteriosclerosis, which in turn causes heart and cerebrovascular disease. The gut bacteria have also been reported to convert bile acids into secondary bile acids, thereby promoting the development of colon cancer. To date, six species of bacteria that produce secondary bile acids have been identified, three of which were identified and proposed by our laboratory. Thus our lifespan is evidently controlled by the endogenous bacteria in our bodies.

Developing an gut environment database

While the relationship between gut microbiota and disease is becoming clearer, we strongly feels that conventional research methods require significant modification if we are to further advance gut microbiota research and to apply the knowledge gained to actual preventive medicine and other fields. “Previously, researchers primarily targeted bacteria that can be cultured, and studied bacterial dynamics in patients with particular diseases, which did not produce the intended results. Now we need to focus on studying the interactions between bacteria as a whole and our bodies and food, and identify the substances they produce. The first step is to develop an gut environment database integrating gut microbiota profiles that reflect the composition of gut microbiota as a whole, with gut metabolic profiles that reflect the composition of the products they generate, namely metabolites. The accumulation of lifestyle-related data on diet, medical condition, and so on, and a study of the correlations present provide information about healthy gut environmental states and gut environments associated with particular diseases. We can then utilize this gut environment data for prevention and early detection of diseases. Our laboratory is leading the way in this area through research aimed at elucidating the whole analysis of gut microbiota and linking the data obtained to preventive medicine.

The gut environment is unique to each individual, and changes depending on lifestyle factors such as diet and age. Therefore, the development of a gut environment database requires both samples from a broad range of areas and age groups and quick analysis of large numbers of samples. We are attempting to expand the routes to acquire large numbers of samples (100,000+) from throughout Japan. Recently, the number of colon cancer patients, including young people, has been increasing nationwide. If we could use the gut microbiota patterns associated with high susceptibility to colon cancer to screen for individuals at high risk, we could implement prevention and early detection at the national level and greatly reduce medical costs. Colon cancer has some of the highest associated medical costs among diseases. The gut microbiota research will bring us closeto order-made medicine, which allows selection of drugs suitable for an individual.

Connecting medicine and diet with gut microbiota

The Japanese like to say ‘Food is medicine’, but the door between food and medicine can only be opened with gut microbiota. Development of gut microbiota research has brought with it progress in our understanding of the mechanisms of lactic acid bacteria, which confer beneficial effects on our health. These advances have triggered a boom in probiotics - functional foods incorporating these bacteria. The best-known examples of probiotics are fermented milk and yogurt, which are both listed as “food for specified health uses (FOSHU)”. The “FOSHU” designation is permitted by the Japanese government on labels for foods expected to confer health effects based on data obtained in medical and/or nutritional studies. Japan became the first country to adopt this system in 1991.

“Health claim” for FOSHU utilizing lactobacilli and bifidobacteria is limited to regulation of gut function at present, but there are data suggesting the potential for future enhancement of health claims to include reduction of cancer risk via immune reactivity, prevention of atopic dermatitis, prevention of respiratory infection, regulation of blood glucose level, blood pressure, and cholesterol, prevention and improvement of gastric ulcers, and inhibition of the causative bacteria of diseases such as periodontal disease. The boom in FOSHU is not merely a transient fad, but is founded on solid evidence presented by the elucidation of the functions of microorganisms such as lactobacilli and bifidobacteria along with the whole analysis of gut microbiota. The keys are individual efforts to improve one's lifestyle, including diet, thereby altering the overall balance of gut microbiota, and to practice health promotion and disease prevention.

Impact of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly persons.

The health effects of probiotics seem to be induced by improvement of intestinal environment, which depends on metabolites produced by probiotics or improved intestinal microbiota composition. *Bifidobacterium lactis* Bb-12 is a probiotic strain with ideal properties including acid-tolerance and adhesion to human intestinal mucosa (Matsumoto et al., 2004, Matsumoto et al., 2002). The improvement of intestinal environment by intake of *B. lactis* Bb-12 yogurt was examined using polyamine (Fig. 4), haptoglobin (Fig. 5) and mutagenicity (Fig. 5) as indexes, which directly reflect the health condition of the host (Matsumoto et al., 2001). The concentration of spermine in feces increased significantly by 3-fold ($P < 0.05$) at week 2 of the Bb-12 yogurt intake compared with before administration, and that of putrescine and spermidine also tended to increase with the yogurt intake. The haptoglobin content in

feces decreased significantly ($P<0.05$) at week 2 of the yogurt intake. Fecal mutagenicity was measured using fecal extract and fecal precipitate. Both preparations showed similar significant decrease ($P<0.05$) by the Bb-12 yogurt intake, as well as a negative correlation with polyamine content. This result indicates that antimutagenicity due to the Bb-12 yogurt intake was not based on binding of the mutagen to the bacterial cell wall. Many reports have suggested that polyamines increased by the Bb-12 yogurt intake led to inhibition of inflammation and mutagenicity in the human intestinal tracts.

Reference Literature

1. Fuller R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:365-378 (1989).
2. Hayashi H., Sakamoto M., and Benno Y.: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based method. *Microbiol. Immunol.*, 46:535-548 (2002).
3. Hayashi H., Sakamoto M., and Benno Y.: Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA libraries and T-RFLP. *Microbiol. Immunol.*, 47:557-570 (2003).
4. Matsumoto M., Tadanuma T., Kume H., Imai T., Kihara R., Ohishi H., Tani H., and Benno Y.: Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on fecal microflora in the aged persons with chronic constipation. *Microbial Ecol. Health Dis.*, 12:77-80 (2000).
5. Matsumoto M., Ohishi H., and Benno Y.: Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 31:181-186 (2001).
6. Matsumoto M., Tani H., Ohishi H., Watanabe M., and Benno Y.: H-ATPase activity in bifidobacteria with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.*, 93:109-113 (2004).
7. Matsumoto M., Tani H., Ono H., Ohishi H., and Benno Y.: Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. *Curr. Microbiol.*, 45:212-215 (2002).
8. Matsumoto M., Sakaomoto M., Hayashi H., and Benno Y.: Novel phylogenetic assignment database for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J. Microbiol. Method*, 61:305-319 (2005).
9. Sakamoto M., Hayashi H., and Benno Y.: Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for qualitative analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol. Immunol.*, 47:133-142 (2003).
10. Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Rualt M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M. and Rowland I. : Functiona food science and

gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* S1:147-171 (1998).

11. Salmine S. and von Wright A.: Current human probiotics- safety assured?, *Microbial Ecol. Health Dis.*, 10:68-77 (1998).
12. Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., and Lee, Y.K.: Probiotics - How should they be defined? *Food Sci. Technol.*, 10:107-110 (1999)s

장내균총의 배양 - 비의존성 분석 및 인체 건강에 미치는 새로운 프로바이오틱 효과

요시미 베노 박사/수의사

일본 이화학연구소 생물자원센터/일본 규주은행

대략 1.5kg의 총 중량을 가지는 500여 종 이상의 인체내 장내균총의 일부는 건조 분변 1g당 약 10^{12} 균수 수준으로 분변 중으로 배설된다. 당 연구소의 노력을 통하여 장내균총의 총체적인 분석에 대한 관심이 점차 부각되고 있는데, 최근 들어 현대인의 3가지 주요 사망원인 질환인 암, 심장 질환, 뇌혈관성 질환 뿐만 아니라, 알레르기나 치매와 같은 각종 질환들과 장내균총과의 연관성이 밝혀지고 있다. 본 연구팀에서는 연령 및 식이와 같은 생활환경과 연관된 요인들에 의해서 변화되는 장내균총에 대한 총체적인 분석법을 정립하여 예방의학에 응용하는데 진력하고 있다.

프로바이오틱(probiotic)이란 인간의 건강과 행복에 미치는 효과에 대한 작용 기작을 어떻게 이해하는가에 따라서 여러 가지로 정의된다. 현재, 가장 보편적으로 사용되고 있는 프로바이오틱의 정의는 장내 미생물 균형을 향상시키므로서 숙주 동물에 유익한 영향을 주는 살아 있는 미생물 급이 보충제로 되어 있다(Fuller, 1989). 최근 들어, 유럽의 전문가들은 미생물 균총과 연관된 것과는 다른 기작을 포함하는 방향으로 프로바이오틱의 정의를 확대 해석하였는데(Salminen et al., 1998 ; Salminen & von Wright, 1998), 프로바이오틱은 살아 있는 미생물로서 인체 건강에 유익한 효과를 주는 식품 소재라는 것이다 (Salminen et al., 1999). 한편 프로바이오틱의 효과 입증에 관한 과학적인 자료와 기존의 응용 분야를 포함시키기 위해서, 우리는 다음과 같은 정의를 제안한다. 즉, 프로바이오틱이란 숙주의 건강과 행복에 유익한 효과를 나타내는 미생물 세포 성분이나 조성물이라는 것이다.

본 주제 발표에서는 배양을 하지 않고 인체 장내균총을 분석하는 새로운 방법과 프로바이오틱의 기능에 대하여 소개할 것이다. 또한 본인이 30여 년 이상 일본 이화학연구소에서 수행한 인체 장내균총에 관한 연구 업적을 소개하고자 한다.

전체 장내균총의 단지 20%만?

19세기 중반에 Vienna대학의 Theodor von Escherich 교수는 분변 중에서 미생물을 발견하여 *Escherichia coli*로 명명하였다. 그러나, 20세기 중반까지 *E. coli* 이외의 분변 유래 미생물이 성공적으로 배양되지 않았기 때문에, 장내에 존재하는 대다수의 세균은 죽은 상태로 존재한다고 대부분의 사람들이 믿게끔 되었다. 이러한 오랜 믿음을 떨쳐 버리게 한 사람이 일본 이화학연구소의 T. Mitsuoka 박사로서, 그는 1950년도에 몇 가지 한천 배지와 혐기배양 기법을 이용하여 장

관 내에는 많은 미생물이 살아 있다는 것을 밝혀내기 시작하였다. 또한 대부분의 장내세균은 산소의 존재 하에서 생존할 수 없는 혐기성 미생물이라는 것도 밝혀졌다.

본인은 젊은 시절을 장내균총과 함께 보냈으며, 약 30년전에 일본 이화학연구소의 Mitsuoka 박사 연구실에 합류하였다. 우리의 연구 테마는 시행착오를 통해서 특정 생육배지를 개발하고, Table 1에 제시한 바와 같이 미생물 균종과 균수를 조사하기 위하여 배양이 가능한 개개의 미생물을 계수하는 일이었다. 30명의 건강한 일본인의 장내균총은 수많은 미생물 균종으로 구성되어 있는데, 인체 장내균총 중에서 높은 균수와 빈도를 차지하는 우세균종은 *Bacteroides vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. disitasonis*, *Collinsella aerofaciens*, *Ruminococcus* spp., *Faecalbacterium prausnitzii*, 그리고 *Bifidobacterium adolescentis* 등으로 밝혀졌다. 반면에 낮은 균수와 빈도를 차지하는 열세균종은 *Clostridium clostridioforme*, *C. innocum*, *C. ramosum*, *C. perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, 그리고 *Esherichia coli* 등으로 밝혀졌다.

이러한 연구에는 수 많은 인내와 노력이 필요할 뿐만 아니라, 분변 시료의 악취 및 미생물 오염의 위험에 항상 노출되어 있기 때문에, 어느 누구에게도 흥미로운 일은 아니다. Mitsuoka 박사는 고유의 배양 기술을 이용하여 인체 장내균총에 대해서 체계적으로 연구를 수행한 업적을 인정받아 1988년에 일본 학술상을 수상하였다. 모든 사람은 우리가 장내균총에 대해서 알아야 하는 모든 것을 알았고 또한 Mitsuoka 박사의 연구가 완성된 것으로 생각했다. 그러나, 우리는 그 당시에 이용 가능했던 배양법이 과연 우리에게 모든 진실을 알려주었는가 하는 것에 대해서 의구심을 가지지 않을 수 없었다.

배양에 의존하지 않는 미생물 분석법은 1980년대 중반의 장내균총 연구에 이용되기 시작하였으며, 연구자로 하여금 배양을 하지 않고서도 장내균총의 존재를 확인할 수 있게 되었다. 1996년에 우리는 인체 유래의 분변에서 분리된 미생물로부터 추출된 DNA를 분석한 일단의 분자생물학자들이 발표한 놀라운 연구논문을 접하게 되었다. 연구논문에는 미생물 중에서 단지 10~25%만이 배양될 수 있고 나머지 75%는 배양이 매우 어렵거나 불가능하며, 대략 100여 종으로 이루어져 있다고 생각해 온 장내균총이 사실은 500~1,000종이라고 보고되었다. 수많은 연구자들의 노력으로, 당시 이용 가능한 배양기법으로 장내균총에 대해서 거의 완전하게 밝혀냈지만, 실제로는 현존하는 미생물 균총의 단지 20~30%에 불과하였다.

인체 장내균총의 총체적인 분석법 확립

1998년에 우리는 전통적인 배양법과 DNA 분석법을 결합시켜 아직까지도 여전히 밝혀지지 않고 있는 미생물을 포함한 모든 장내균총을 총체적으로 명백하게 분석하는 연구로 초점을 전환하였다. 744개의 DNA clone을 건강한 3명의 일본인 분변으로부터 분리하였는데, 여기서 75%가 새로운 종류의 장내 미생물이었으며, 장내균총의 조성은 개개인별로 커다란 편차를 보인다는 사실을 알게 되었다. 각각 3명의 건강한 사람과 노인으로부터 분리한 인체 장내균총을 16S rDNA 염기서열 분석법을 이용하여 비교한 결과(Hayashi et al., 2002, 2003), 직접 계수법에서는 1.9×10^{11} - 4.0×10^{11} cells/g(wet weight) 수준의 균수를 나타냈지만, 평판배지법에서는 6.6×10^{10} - 1.2×10^{11} cfu/g(wet weight) 수준의 균수만을 나타냈다.

인체 장관 유래 미생물의 60~70%는 현재 이용 가능한 방법으로는 배양할 수가 없다. 따라서 universal primer set를 이용하여 각각 3명의 건강한 사람과 노인 장관 내의 공통적인 전체 DNA로부터 16S rDNA 염기서열 자료를 만들어냈다. 무작위로 선정된 clone은 부분적으로 염기서열을 분석하였으며, 평판배지의 표면으로부터 순수분리된 모든 집락은 16S rDNA의 부분적인 염기서열 분석에 이용되었다. 염기서열의 상동성에 근거하여, clone과 집락을 세균 분류상 문(phylum)에 상응하는 몇 개의 군집으로 분류하였다.

전체 984 clone(3명의 건강한 사람으로부터 유래된 744 clone과 노인 유래의 240 clone) 중에서, 대략 25%의 clone이 건강한 사람으로부터 유래된 31개의 이미 알려진 균종에 속하는 것으로 확인되었으며, 노인 유래의 clone에서는 대략 46%의 clone이 27개의 이미 알려진 균종에 속하는 것으로 확인되었다. 나머지 clone(건강한 사람 유래의 clone 중에서 약 75%와 노인 유래의 clone 중에서 약 54%)은 새로운 종류의 계통형(phenotypes, 적어도 98%의 clone 염기서열 상동성을 보유)인 것으로 확인되었다.

본 연구의 염기서열 자료에 의하면, 건강한 사람으로부터 유래된 장관의 최우세균 그룹은 130개의 균종이거나 계통형, 그리고 56개의 새로운 종류의 계통형으로 구성되었다. *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*에 대한 16S rDNA 염기서열 자료는 Table 2에 나타냈으며, 건강한 사람 유래의 *Clostridium* rRNA clusters IV, IX, XIVa 및 XVIII에 대해서도 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. 또한 노인 유래의 *Bacteroides*, *Clostridium* rRNA cluster IV, IX, *Clostridium* rRNA subcluster XIVa 및 *Gammaproteobacteria*에 대해서도 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. 더불어, 예전에 특성이 파악되지 않고 배양이 불가능했던 미생물이 clone의 염기서열 분석에 의해 확인되었다.

또한 우리의 연구 결과는 장내균총의 구성에 있어서 개인별로 현저한 차이점이 있다는 사실을 보여주고 있다. 이후, 2000년에 들어서면서 우리는 인체 장내균총을 조성하는 패턴을 손쉽게 결정하는 도구로서 T-RFLP(terminal-restriction fragment length polymorphisms) 방법을 이용하기 시작하였다(Sakamoto et al., 2003). T-RFLP 분석기법은 분변 중의 다양한 장관 미생물로부터 16S rRNA 유전체를 추출하여 형광물질을 붙인 primer(DNA 합성의 시작점을 제공하는 분자)를 이용하여 증폭시킨 후, 두 가지의 다른 제한효소(*MspI*과 *HhaI*)를 이용하여 분해하는 방법이다. 제한효소는 특이적인 배열을 가지는 4가지의 다른 염기로 구성되어 있는 DNA를 분해하는데, 이것은 염기의 수에 따라서 다양한 길이의 DNA 분획을 만들어낸다. 각각의 DNA 분획의 함량은 형광신호의 강도에 근거해서 결정되며, 염기수에 따라서 DNA 분획을 정렬하면 장내균총의 구성과 균수를 반영하는 장내균총의 패턴을 제시하게 된다(Fig. 3).

인체내 대장 유래 미생물 균총의 T-RFLP 분석에 의한 새로운 계통학적 염기서열 분석

16S rRNA 유전체 염기서열을 이용한 다양한 분자생물학적 접근은 인체 대장 유래의 미생물 균총의 분석에도 이용되고 있다. T-RFLP 분석법은 혼합되어 있는 다양한 미생물간의 신속한 비

교에 적합하다. T-RF(terminal-restriction fragment)의 길이는 이미 알려진 염기서열에 의해 산출될 수 있으며, 또한 이러한 분석법에 의한 T-RF 길이를 근거로 하여 미생물 균종을 예측할 수 있다. 결론적으로, 우리는 T-RFLP 분석법을 이용한 인체 대장 미생물 균종의 계통학적 염기서열 자료(PAD-HCM, phylogenetic assignment database for T-RFLP analysis of human colonic microbiota)를 구축하였으며, 또한 16S rRNA 유전체 clone의 염기서열 분석 결과와 비교해서 PAD-HCM의 효율성을 입증하였다.

PAD-HCM은 4가지의 제한효소를 이용하여 얻어진 342개의 염기서열 자료를 완벽하게 포함하고 있다(Matsumoto et al., 2005). 16S rRNA 유전체 clone의 염기서열 분석에 의해 검출된 전체 clone 중에서 대략 80%가 PAD-HCM을 이용한 T-RF로부터 분석된 결과와 동일한 미생물 균종이거나 계통형이었다(Table 3). 게다가, 거대 T-RF들은 2가지 분석법에 의해 결정된 공통의 균종이나 계통형으로 구성되어 있다. 녹두(mung bean)의 nuclease digestion 처리로 동정된 모든 pseudo-T-RFs는 미생물 균종이나 계통형으로 결정할 수 없었으며, 이러한 발견은 PAD-HCM을 이용하여 pseudo-T-RFs를 예측할 수 있다는 것을 보여준다. 우리는 이러한 연구 결과로 구축된 PAD-HCM이 배양하기 어려운 미생물을 포함한 균종 수준에서 T-RFs의 예측을 가능케 하였으며, 또한 그것은 인체 대장내 미생물 균종의 T-RFLP 분석에 매우 유용한 것으로 결론지었다.

장내균총과 질병과의 연관성에 대한 탐색

장내세균은 대장에서 생존하는데 대장은 질병의 원천지라고 할 수 있다. 실제로 대장은 모든 신체 기관의 다종다양한 질병과 연계되어 있는데, 장관은 외부 세계와 연결되어 있기 때문에 면역의 최전선에 위치한다고 할 수 있다. 몇몇 장내세균은 암모니아, 황화수소, 세균성 독소, 그리고 발암물질 등의 부패성 산물을 생성한다. 이러한 독성물질은 장관에 손상을 일으키며, 대장암 및 다양한 종류의 다른 대장성 질병을 유도한다. 한편 몇몇 독성물질은 체내로 흡수되어 혈액을 통해 몸 전체로 순환되면서 여러 신체 기관에 위해를 야기시킨다.

따라서 장내세균이 발암, 노화, 다양한 병리학적 조건, 예를 들면 콜레스테롤 축적에 따른 동맥경화증, 간의 손상, 치매, 자가면역증, 면역력 약화 등과 같은 질환의 원인일 수도 있다는 여러가지 증거가 늘어나고 있다. 예를 들면, *Clostridium* 균종은 노년기 치매로 고통을 받고 있는 사람의 분변에서 다량으로 발견된다. 일단 이들 세균에 의해서 생성된 독성물질이 몸 전체를 통해서 퍼지게 되면 신경전달계 등의 기능이 억제되어 뇌 기능의 손상으로 이어진다.

최근의 분자생물학적 연구결과에 의하면 장내세균에 의해서 생성되는 독성물질은 혈관 내의 콜레스테롤 축적을 촉진하여 동맥경화를 일으키며, 그 결과로 심장 및 뇌혈관성 질환을 야기시키는 것으로 밝혀졌다. 장내세균은 또한 담즙산을 2차 담즙산으로 변환시켜 대장암의 전개를 촉진시키게 된다. 최근에 2차 담즙산을 생성하는 6종의 세균이 동정되었으며, 그 중의 3종이 당 연구소에서 동정되어 새로운 균종으로 제안되었다. 따라서 우리의 수명은 우리 몸 안의 내재적인 세균에 의해서 조절되고 있음을 분명히 알 수 있다.

장내환경 database의 개발

장내균총과 질병과의 연관성이 보다 더 명백해지고 있지만, 장내균총에 대한 연구를 더욱 발전시키고 또한 여기서 얻어진 지식을 실질적인 예방의학이나 다른 분야에 응용하기 위해서는 전통적인 연구 방법에 상당한 변화가 필요하다. 예전에 연구자들은 배양이 가능한 세균을 일차적인 목표로 설정하여 특정 질환을 가진 환자에 있어서 세균의 역학관계를 연구하였지만 의도하는 결과를 얻지 못하였다.

현재 우리는 전체 세균과 신체 및 식품 사이의 상호작용을 연구하고, 또한 그들이 생성하는 물질을 동정하는데 집중하는 것이 필요하다. 그 첫번째 단계는 장내균총 전체의 구성에 영향을 미치는 장내균총 패턴과 더불어 그들이 생성하는 물질, 즉 대사산물의 구성에 영향을 미치는 장내 대사 패턴을 전체적으로 통합할 수 있는 장내환경 database를 개발하는 것이다. 식이와 치료 조건 등의 생활양식과 연관된 자료의 축적 및 상관관계에 대한 연구는 건강한 장내환경 상태 및 특정 질환과 연계된 장내환경에 대한 정보를 제공한다. 따라서 우리는 이러한 장내환경 자료를 질병의 예방 및 조기 검사에 이용할 수 있게 된다.

당 연구소는 장내균총을 총체적으로 분석, 해명하는 것을 목표로 하는 연구를 통해서 여기서 얻어진 자료를 예방의학과 연결시키는 분야를 선도해 나가고 있다. 장내환경은 개개인에 따라서 독특하며 식이나 연령과 같은 생활양식 요인에 의해서 변하게 된다. 따라서 장내환경 database의 개발은 광범위한 지역과 연령층으로부터의 시료 모두를 필요로 하며, 또한 다량의 시료를 신속하게 분석할 수 있어야 한다. 우리는 일본 전역으로부터 100,000 이상의 다량의 시료를 얻는 경로를 확대하고자 시도하고 있다.

최근에 젊은 사람을 포함해서 대장암 환자의 수가 전국적으로 증가하고 있다. 만약에 대장암에 높은 감수성을 나타내는 장내균총 패턴을 이용하여 개인별로 고도의 위험도 여부를 screening할 수 있다면, 우리는 국가적인 차원에서 예방과 조기검사를 도입할 수 있고 의료 비용을 더욱 절감할 수 있게 된다. 왜냐 하면 대장암은 여러가지 질병 중에서 의료비와 가장 밀접하게 연계되어 있기 때문이다. 궁극적으로, 장내균총에 대한 연구는 우리들 개개인에게 적절한 약을 선택할 수 있게 하는 주문제작 의학에 보다 가까이 갈 수 있게 할 것이다.

의약과 식이의 장내균총과의 연결

일본 사람들은 식품이 의약이라고 말하는 것을 좋아하지만, 이러한 식품과 의약 사이의 연관관계는 장내균총에 대한 연구를 통해서만 규명할 수 있다. 장내균총 연구의 발전은 우리들의 건강에 유익한 효과를 부여하는 유산균의 작용 기작에 대한 이해력을 보다 진일보할 수 있게 한다. 이러한 진보는 유산균을 포함하는 기능성 식품인 프로바이오틱에 대한 관심을 촉발시켰다. 가장 잘 알려진 프로바이오틱의 실례는 발효유로서 모두 특정보건용식품(food for specified health uses, FOSHU)으로 등재되었다. 일본 정부는 의학적이거나 영양학적인 연구결과로 얻어진 자료에 근거해서 건강 효과에 기여하는 것으로 기대되는 식품의 경우에 FOSHU라는 명칭을 사용할 수 있도록 허락하고 있는데, 일본은 이러한 시스템을 1991년에 도입한 최초의 국가이다.

유산간균(lactobacilli)과 비피더스균을 이용하는 특정보건용식품의 health claim은 현재 장관 기능의 조절에만 국한되어 있다. 그러나 자료에 의하면 향후 미래에는 health claim을 고양시킬 수 있는 무한한 잠재력을 가지고 있는 것으로 추론되고 있다. 예를 들면, 면역 반응성에 의한 암 위험도의 감소, 아토피성 피부염의 예방, 호흡기 감염의 예방, 혈당 수준과 혈압 및 콜레스테롤의 조절, 위궤양의 예방과 개선, 그리고 치주병 등과 같은 질병의 원인균을 억제하는 것 등을 들 수 있다.

FOSHU에 대한 지대한 관심은 단순히 과도기적인 일시적인 유행이 아니며 장내균총에 대한 전반적인 분석과 함께 유산간균과 비피더스균 등의 미생물의 기능에 대한 해석에 의해서 제공되는 여러가지 확실한 증거가 발견되고 있다. 주된 열쇠는 식이를 포함한 자신의 생활양식을 개선 시키고자 하는 개인별 노력이며, 그러므로서 장내균총의 전체적인 균형을 변경시킬 수 있으며, 건강 증진 및 질병 예방을 실천할 수 있다.

비피더스 요구르트가 노인의 장내환경 개선에 미치는 영향

프로바이오틱의 건강증진 효과는 장내환경의 개선을 유도하는 것으로 보여지며, 이러한 효과는 프로바이오틱이 생성하는 대사산물이나 장내균총 조성의 개선에 의해서 좌우된다. 실레로 *Bifidobacterium lactis* Bb-12 균주는 내산성과 인체 장내 점막에 정착할 수 있는 능력을 가지고 있는 이상적인 특성의 프로바이오틱 유산균이다(Matsumoto et al., 2002, 2004). *B. lactis* Bb-12 요구르트의 섭취에 따른 장내환경의 개선 여부를 숙주의 건강 상태를 직접적으로 반영하는 polyamine, haptoglobin, mutagenecity 등을 지표로 사용하여 조사한 결과는 다음과 같다(Matsumoto et al., 2001).

분변 중의 spermine 농도는 섭취 전과 비교했을 때, 요구르트 섭취 2주차에 3배까지 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 그리고 putrescine과 spermidine 농도도 요구르트 섭취에 따라서 증가하는 경향을 나타냈다. 분변 중의 haptoglobin 함량은 요구르트 섭취 2주차에 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 한편 분변 추출물 및 분변 침전물을 이용하여 분변 돌연변이원성을 측정된 결과는 다음과 같다. 상기의 preparation 모두 요구르트의 섭취에 따라서 polyamine 함량과 아무런 상관관계가 없을 뿐만 아니라 모두 유사하게 유의적인 감소 현상을 나타냈다($P<0.05$). 이러한 결과로부터 요구르트의 섭취에 의한 항-돌연변이원성은 변이원성 물질이 세균의 세포벽에 결합하여 이루어지는 것이 아니라는 것을 알게 되었다. 많은 연구 결과, 요구르트의 섭취에 의해서 증가되는 polyamine은 사람의 장관 내에서 염증과 돌연변이원성을 억제하는 것으로 추론하고 있다.

Reference Literature

1. Fuller R.: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., 66:365-378 (1989).
2. Hayashi H., Sakamoto M., and Benno Y.: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based method. Microbiol. Immunol., 46:535-548 (2002).

3. Hayashi H., Sakamoto M., and Benno Y.: Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA libraries and T-RFLP. *Microbiol. Immunol.*, 47:557-570 (2003).
4. Matsumoto M., Tadanuma T., Kume H., Imai T., Kihara R., Ohishi H., Tani H., and Benno Y.: Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on fecal microflora in the aged persons with chronic constipation. *Microbial Ecol. Health Dis.*, 12:77-80 (2000).
5. Matsumoto M., Ohishi H., and Benno Y.: Impact of LKM512 yogurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 31:181-186 (2001).
6. Matsumoto M., Tani H., Ohishi H., Watanabe M., and Benno Y.: H-ATPase activity in bifidobacteria with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.*, 93:109-113 (2004).
7. Matsumoto M., Tani H., Ono H., Ohishi H., and Benno Y.: Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. *Curr. Microbiol.*, 45:212-215 (2002).
8. Matsumoto M., Sakaomoto M., Hayashi H., and Benno Y.: Novel phylogenetic assignment database for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J. Microbiol. Method*, 61:305-319 (2005).
9. Sakamoto M., Hayashi H., and Benno Y.: Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for qualitative analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol. Immunol.*, 47:133-142 (2003).
10. Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Rualt M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M. and Rowland I. : Functiona food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* S1:147-171 (1998).
11. Salmine S. and von Wright A.: Current human probiotics- saftey assured?, *Microbial Ecol. Health Dis.*, 10:68-77 (1998).
12. Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., and Lee, Y.K.: Probiotics - How should they be defined? *Food Sci. Technol.*, 10:107-110 (1999)s