

내산소성 비피더스균의 분리와 생육 특성

1. 내산소성 비피더스균의 분리와 동정

매일유업(주)중앙연구소
정 후 길

I . 서론

비피더스균은 모유 영양아의 분변에서 최초로 분리되었다(Tissier,1899). 비피더스균의 주요한 서식처는 인체내 장관으로서 소장보다는 대장에서 훨씬 많이 검출되며 구강 및 여성 생식기 등에서도 발견된다. 신생아의 경우에는 출생후 1주일 동안 장내균의 대부분을 점유하며 성인에 있어서도 우세균종으로 장내균총을 형성한다(Mitsuoka,1984;Stark와 Lee,1982;Yoshioka등,1991). 그밖에 소, 닭, 돼지, 양, 쥐, 토끼, Guinea Pig, 꿀벌 등의 동물 장관과 하수에서도 발견된다(Mitsuoka, 1969;Trovatelli와 Matteuchi,1976 ;光岡, 1974). 따라서 최근에는 수질 및 환경 오염의 지표균으로서도 주목을 받고 있다(Carrilo 등, 1985; Resnick과 Levin, 1981 a,b).

한편 유아 뿐만 아니라 성인에 있어서도 비피더스균의 균수 변동이 스트레스나 병, 암, 노화 등과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라서 비피더스균의 건강 기여 효과가 각광을 받게 되었다 (Brown과 Townsley,1970; Driessen과 De Boer,1989; Hoover Hughes,1991; Kim, 1988; Laroia와 Martin,1990;Mitsuoka, 1982 ; Mizutani와 Mitsuoka,1980; Poupard 등 1973; Rowland와 Grasso,1975 ; Sandine 등, 1972; Suzuki 등,1989;神邊,1986; 湧口, 1987 ; 渡邊 과 務

台, 1975).

이러한 비피더스균은 유가공 산업에서 일반적으로 사용되고 있는 호기적인 조건에서는 배양하기 어려운 문제점을 가지고 있다. 즉, 비피더스균은 극도의 혐기적인 배양조건을 필요로 하며 영양 요구성도 매우 까다롭기 때문이다. 결국 일반적인 유산균을 배양할 때와 동일한 공정에 의해서 비피더스균을 배양하거나 특히 산업적인 규모로 비피더스균을 발효하는 데에는 커다란 어려움이 있다.

따라서 특별히 혐기적인 조건을 필요로 하지않고 호기적인 조건에서도 생육이 가능한 비피더스 균종을 선택하는 것이 중요하다. 비피더스균은 편성 혐기성 비피더스균이지만 내산소성을 가지게 되는데 비피더스균을 이용한 호기적인 우유 발효에 대하여 최초로 보고한 것은 Mayer(1948)이다. 국내에서도 혐기성 비피더스균의 장내 분포와 우유중에서도 생육에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만(姜과朴,1985 ; 高. 1986 ; 金과姜, 1984 ; 張 등, 1983 ; 許 등, 1989) 호기성 비피더스균의 분리와 생육 특성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 건강한 성인의 인체 분변으로부터 호기적인 생육이 가능한 비피더스균을 선별 분리하고 이러한 비피더스균의 호기적인 생육 특성 및 영향 인자에 대한 기초적인 자료를 얻고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 내산소성 비피더스균의 분리

건강한 성인의 분변을 생리식염수에 희석하고 탈삼유소 말혈액(日本生物材料センタ, 日本)을 첨가한 BLB Agar Medium(Ochi등, 1964 ;Mitsuoka 1965 ; Teraguchi 등, 1978) 평판배지에 도말한 후 37℃에서 4일 동안 호기적으로 배양하였다.

그밖에 생육배지는 각각의 제조 방법에 따라서 사용하였으며 선택배지를 사용하는 경우에는 CPA Agar Medium(Beerens,1990)과 Arabinose Agar Medium(Wijsman등,1989)을 변형시킨 AP Agar Medium 평판배지에 분변 희석액을 상기와 동일한 방법으로 도말하여 호기적으로 배양하였다. 한편 대조 배양구로서 상기와 동일한 분변 희석액을 혐기 배양장치(BBL,USA)를 이용하여 37℃에서 3일 동안 혐기 배양한 후 집락 성상, 총균수, 현미경, 검경 균상 등을 상호 비교하였다.

2. 내산소성 비피더스균의 증균 배양 및 보존

상기의 방법에 의해서 형성된 집락 중에서 현미경 검경 결과 전형적인 비피더스균의 형상을 나타내는 집락을 선별하여 TPY Broth에 이식하고 37℃에서 24시간동안 호기적으로 정치 배양하였다. 그후 TPY Broth Culture를 0.05%의 Thioglycollate Broth와 0.05%의 Ascorbic Acid를 첨가한 12% 탈지유에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 5℃로 냉장 보존하였으며 1주일마다 계대 배양하였다. 한편 상기의 탈지유 배양액을 37℃에서 24시간 동안 2회 계대배양하여 활성화시킨 후 실험에 사용하였다. 최종적으로 분리주의

균종 동정이 완료된 후에는 상기의 12% 탈지유 배양액을 TPY Agar Medium에 1백금침 접종하여 37℃에서 24시간 동안 천자배양한 후 -50℃에서 냉동 보존하였다.

3. 내산소성 비피더스균 분리주의 동정

상기의 내산소성 비피더스균 분리주를 동정하기 위하여 0.05%의 Thioglycollate Broth와 0.05%의 Ascorbic Acid를 첨가한 12% 탈지유 배양액을 BLB Agar Medium에 호기적으로 표면 배양하였다. 여기서 취택한 집락을 API 50 CHL Medium(API,France)에 현탁시키고 이 현탁액을 API 50 CH Strip에 분주하여 37℃에서 72시간 동안 호기적 조건에서 배양하였으며 (Samona와 Robinson, 1991)

MILS Broth(Iwata와 Morishita, 1989)와 TPY Broth를 이용한 탄수화물 실험을 병행하였다. 한편 내산소성 비피더스균 분리주의 탄수화물 발효 양식은 Bergey's Manual(Scarodovi,1986)에 따라서 결정하였으며 한국 과학기술원 유전공학 연구소의 표준균주를 대조구로 사용하였다.

4. 생육 곡선의 작성

내산소성 비피더스균 분리주의 탈지유 배양액을 BLB Agar Medium 평판배지에 도말하여 37℃에서 4일 동안 호기적으로 배양했을 때 출현한 집락을 현미경으로 검경하여 전형적인 비피더스균의 형상을 나타내는 집락을 총균수로 계측하였으며 Gram 염색법과 Methylene Blue염색법을 현미경 검경시 병용하였다. 한편 혐기배양시의 총균수를 대조구로 하여 생육조건에 따른 차이점을 규명하였으며 Jar Fermentor(韓國醱酵機器)를 이용하

여 일정한 시간별로 배양액을 채취하여 pH와 적정산도, 생균수의 경시적인 변화를 측정하였다.

5. 초산의 정량 분석

비피더스균의 전형적인 대사 산물인 초산을 정량적으로 분석하기 위하여 초산 정량용 분석시약 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하였다. 초산의 정량분석은 DU-68 UV Spectrophotometer (Beckman, USA)를 사용하여 NADH생성량에 따른 340nm에서의 흡광도의 증가로 측정하여 계산하였다.

6. 흡광도의 측정

내산소성 비피더스균의 탄수화물 이용능을 측정하기 위하여 1%의 탄수화물을 유일한 탄소원으로 첨가한 MILS Broth와 TPY Broth에 비피더스균 분리주의 배양액을 접종하여 37℃에서 배양하면서 DU-68 UV Spectrophotometer(Beckman,USA)를 사용하여 650nm에서 액체 배양액의 흡광도를 경시적으로 측정하였다.

7. 효소적 특징

내산소성 비피더스균 분리주의 효소 특성을 규명하기 위하여 APIZYM Test Kit (API, France)를 사용하였다(Chevalier등, 1990; Samana와 Robinson, 1991). 즉, BLB Agar Medium에 37℃에서 4일동안 호기적으로 배양하여 얻은 집락을 TPY Broth에 현탁한 후 상기의 현탁액을 APIZYM Test Strip에 2방울씩 분주하였다. 37℃에서 12시간 동안 배양한 후 발색시약을 첨가하여 발색여부 및 색상의 강도에 따라서 효소의 존재 여부와 활성을 비교하였다. 한편 F6PPK효소는 비피더스균의 탄수화물 대사의 주효소로서 비피

더스균의 동정에 매우 유용하게 사용된다.

따라서 Scardovi(1986)의 방법에 따라서 상기의 내산소성 비피더스균 분리주의 F6PPK 효소의 존재 여부를 정색반응으로 관찰하였다.

Ⅲ 결과 및 고찰

1. 내산소성 비피더스균의 분리

건강한 성인의 분변을 생리 식염수에 희석하여 탈섬유소 말혈액 (日本生物材料 センタ, 日本)을 첨가한 BLB Agar Medium에 도말한 후 37℃에서 4일 동안 호기적으로 배양했을 때 0.2-0.5mm, 연유갈색, 원형, 용기상의 윤택한 집락이 1.5×10^9 cfu/g수준으로 형성되었으며 현미경 검경 결과 Y자형 분지상, 팽윤상, V자형 만곡간균상 등이 혼재되어 있는 전형적인 비피더스균의 형상을 나타냈다. 따라서 상기와 같은 방법으로 BLB Agar Medium에서 호기적인 생육이 가능한 비피더스균을 분리하여 본 실험균으로 사용하였다.

상기의 내산소성 비피더스균 분리주를 12% 탈지유에 순수배양하여 Methylene Blue 용액으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였을 때 V자형 만곡간균상이 주종으로서 Y자형 분지상 등의 전형적인 비피더스균의 다형성을 나타내지 않았으며 균체 부위마다 이염소체(Volutin)가 존재하였다. 한편 탈지유 배양액을 BLB Agar Medium에 도말하여 37℃에서 4일 동안 호기적으로 배양했을 때 초기 분리시와 동일한 집락을 형성하였으며 현미경 검경 결과 Y자형 분지상 등의 전형적인 비피더스균 형상을 나타냈다. 그러나 내산소성 비피더스균 분리주를 TPY Broth Culture에서 배양했을 때에는 우유 중에서도 달리 Y자형 분지상 팽윤상, V자형 만곡간균상이

혼재되어 있는 전형적인 비피더스균 형상을 나타냈다. 한편 상기의 TPY Broth Culture를 BLB Agar Medium에 도말하여 37℃에서 4일동안 호기적으로 배양했을 때에는 0.2-0.5mm, 연유갈색, 원형, 용기상의 윤택한 집락을 형성하였으며 현미경 검경 균상 또한 전형적인 비피더스균 형상을 나타냈다.

2. 내산소성 비피더스균의 생육배지별 집락 성상 및 현미경검경 균상

내산소성 비피더스균 분리주의 12% 탈지유 배양액을 각각의 생육배지별로 37℃에서 3일동안 혐기적으로 배양하면서 생균수를 비교한 결과는 다음과 같다. 즉, 실험에 사용된 모든 생육배지의 경우 생균수의 커다란 차이를 나타내지 않았으나 전체적으로 혈액을 첨가한 BLB Agar Medium과 비교했을때 집락 성상 및 현미경 검경 균상 모두 전형적인 비피더스균의 형상을 나타냈다. 반면에 혈액을 첨가하지 않은 BL Agar Medium의 경우에는 균수가 현저하게 저하되었으며 BLB Agar Medium과 비교했을때 집락 성상 및 현미경 검경 균상이 명확한 차이를 나타냈다.

호기적인 배양조건에서는 BLB Agar Medium에서 0.5mm, 연유갈색, 원형, 용기상의 윤택한 집락이 11×10^9 cfu/ml수준으로 형성되었으며 현미경, 검경 결과 Y자형 분지상과 팽윤상, 그리고 V자형 만곡간균상 등이 혼재되어 있는 전형적인 비피더스균의 균상을 나타냈다. 반면에 호기적인 조건에서는 혈액을 첨가하지 않은 BL Agar Medium을 포함한 모든 배지에서 생육이 불가능하기 때문에 비피더스균의 호기 배양시에는 혈액이 절대적으로 필요하다는 것을 알 수 있다. 따라서 내산소성 비피더스균 분리주의 생육배지로서는 혈액을 첨가한 BLB Agar Medium이 가장

양호하였다.

한편 건강한 성인의 분변을 생리식염수에 희석하여 AP Agar Medium에 도말한 후 37℃에서 3일동안 혐기적으로 배양했을때 총균수는 1.7×10^{10} cfu/g수준으로서 0.2-1.0mm, 유백색, 원형, 용기상의 윤택한 집락을 형성하였다. 한편 현미경 검경결과 크기의 집락은 Y자형 분지상과 팽윤상이 최우세한 전형적인 비피더스균 형상을 나타냈다.

상기의 집락을 TPY Broth에 이식하여 호기적으로 정치배양했을때 전형적인 비피더스균의 형상을 나타냈다. 또한 이 TPY Broth Culture를 BLB Agar Medium에 도말하여 37℃에서 3일동안 혐기적으로 배양했을때 2-3mm, 원형, 갈색중심, 주변부 유갈색, 유백색, 돌기상의 집락을 형성하였으며 현미경검경결과 전형적인 비피더스균의 형상을 나타냈다. 따라서 상기의 AP Agar Medium은 Arabinose를 이용하는 비피더스균에 대한 선택성이 매우 양호하다는 것을 알 수 있다.

3. 내산소성 비피더스균의 동정

내산소성 비피더스균 분리주를 BLB Agar Medium에 37℃에서 4일동안 호기적인 조건에서 표면 배양하여 얻은 집락을 API 50 CHL Medium(API, France)에 현탁시키고 이 현탁액을 API 50 CH Strip에 분주하여 37℃에서 72시간동안 호기적으로 배양했을때 다음과 같은 탄수화물 발효 형상을 나타냈다. 한편 상기의 현탁액을 API 20 E Test Kit (API, France)에 사용했을때 H₂S생성능(-), Urease생성능(-), Indole 생성능, Gelatin 액화능(-)등의 실험 결과를 얻었다.

또한 유일한 탄소원으로서 각각의 탄수화물을 1%씩 첨가한 MILS Broth와 Broth에 내

산소성 비피더스균 분리주의 배양액을 3%첨가한 후 37℃에서 3일동안 호기적으로 정치배양하며 pH 지시제로서 첨가한 BCP (Bromo Cresol Purple)의 변색여부로 탄수화물의 이용 가능성 여부를 계측했을때 상기와 동일한 탄수화물 발효 형상을 나타냈다. 이러한 실험 결과로부터 상기의 내산소성 비피더스균 분리주는 *Bif.adolescentis* KCTC 3216 표준균주와 동일한 탄수화물 발효형상을 나타냈다.

4. 내산소성 비피더스균의 효소적 특성

내산소성 비피더스균 분리주를 BLB Agar Medium에 37℃에서 4일 동안 호기적인 조건에서 표면 배양하여 얻은 집락을 현탁한 후 APIZYM Test Kit(API,France)에 분주하여 37℃서 12시간 동안 배양하였다. 그후 발색시약을 첨가하여 발생 여부 및 색상의 강도에 따라서 내산소성 비피더스균 분리주의 효소적 특성을 관찰한 결과는 다음과 같다.

즉, 상기의 내산소성 비피더스균 분리주는 α -Galactosidase, β -Galactosidase, α -Galactosidase 의 경우 매우 높은 효소 활성을 나타냈다. 여기서 α -Galactosidase 의 활성이 높다는 것은 상기 분리주가 비피더스균이라는 것을 입증하는 것이다. 왜냐하면 α -Galactosidase는 비피더스균이 가지고 있는 특유의 효소로서 Streptococci와 Lactobacilli 등의 유산균은 거의 대부분이 α -Galactosidase활성을 나타내지 않기 때문이다. 한편 내산소성 비피더스균 분리주를 TPY Broth에 배양하여 수집한 균체를 Scardovi(1986)의 방법에 따라서 F6PPK의 존재 여부를 정색 반응으로 관찰했을때 적자색으로 발색되는 양성 반응을 나타냈다.

5. 비피더스균 표준균주의 호기적인 생육 특성

한국과학기술원 유전공학연구소 유전자원 센터의 유전자은행으로부터 분양받은 비피더스균 표준균주를 TPY Broth에 접종하여 37℃에서 호기적으로 정치배양하면서 650nm에서의 흡광도와 pH의 경시적인 변화를 계측한 결과는 다음과 같다.

즉, *Bif. longum* KCTC 3128과 *Bif. infantis* KCTC 3226의 흡광도는 1.4 이상으로서 매우 높은 흡광도를 나타냈으며 배양액의 pH또한 4.1수준으로서 호기적인 조건에서도 산 생성능 및 생육성이 양호하였다. 한편 그밖의 인체 유래의 비피더스균은 1.2-1.3 수준의 흡광도를 나타냈으나 *Bif. adolescentis* KCTC 3216은 실험에 사용된 인체 유래의 비피더스균 중에서 생육성이 비교적 열악하였다.

동물 유래종의 경우에는 *Bif. pseudolongum* KCTC 3224와 *Bif. globosum* KCTC 3234 균주가 1.1-1.3 수준의 흡광도를 나타냈기 때문에 호기적인 생육 상태가 양호한 것으로 판단되며 기타 비피더스 균종은 비교적 낮은 흡광도를 나타냈다. 이때에 배양액의 pH는 4.2 수준으로서 양호한 산 생성능을 나타냈다.

상기 비피더스균 표준균주의 배양액을 BLB Agar Medium에 도말하여 37℃에서 혐기 및 호기 조건에서 배양했을 때 혐기 조건에서는 비교적 생육성이 양호하였다. 그러나 호기적인 조건에서는 인체 유래종에서 *Bif. longum* KCTC 3128, *Bif. breve* KCTC 3220 과 *Bif. catenulatum* KCTC 3221, 동물 유래종에서는 *Bif. pseudolongum* KCTC 3224, *Bif. globosum* KCTC 3234 등의 균주가 집락을

형성하여 호기적인 생육이 가능하였다.

한편 비피더스균 표준균주를 TPY Broth에 37℃에서 48시간 동안 호기적으로 정지배양하여 BLB Agar Medium에 도말한 후 37℃에서 4일 동안 호기적으로 배양했을때 형성된 집락을 현미경으로 검경한 결과는 다음과 같다. 즉, 비피더스균 표준균주는 균종에 따라서 고유한 형상을 나타냈으며 *Bif. longum* KCTC 3128 의 경우에는 Y자형 분지상과 팽윤상, V자형 만곡간균상 등이 혼재되어 존재하는 전형적인 비피더스균 형상을 나타냈다.

IV. 요약

건강한 성인의 분변으로 부터 호기적인 평판배지에서의 생육이 가능한 비피더스균을 선별 분리하는 조건과 상기 분리주의 특성을 규명한 결과는 다음과 같다.

1. 5%의 탈선탄소 말혈액을 첨가한 BLB Agar Medium에 인체 분변을 호기적으로 표면 배양하여 내산소성 비피더스균 변이주를 분리하였다. 상기 분리주는 BLB Agar Medium 평판배지에 호기적으로 배양했을때 1.1×10^9 cfu/ml 이상의 높은 균수를 유지하였다.
2. 상기의 내산소성 비피더스균 분리주를 BLB Agar Medium에 호기적으로 배양했을때 0.5mm, 연유갈색, 원형, 융기상의 윤탁한 집락을 형성하였으며 현미경 검경 결과 Y 자형 분지상과 V자형 만곡간균상, 팽윤상 등의 전형적인 비피더스균 형상으로 나타났다.
3. 탄수화물 발효실험 결과 상기의 내산소성 비피더스균 분리주는 *Bif. adolescentis*로 동정되었으며 F6PPK GKA효소 활성 함계 매우 높은 α -Galactosidase, β -Galac-

tosidase, α -Galactosidase, 효소 활성을 나타냈다. 한편 아무것도 첨가하지 않은 순수한 우유 중에서의 발효성 및 호기적인 생육능이 매우 양호하였다.

V. 참고문헌

- Beerens, H. 1990. An Elective and Selective Isolation Medium for Bifidobacterium spp. Lett. Appl. Microbiol. 11:155-157
- Brown, C.D. and P. M. Townsley. 1970. Fermentation of Milk by *Lactobacillus bifidus*. J. Inst. Can. Technol Aliment 3(4):121-129
- Carrillo, M., E. Estraba, and T.C. Hazen. 1985. Survival and Enumeration of the Fecal Indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a Tropical Rain Forest Watershed. Appl. Environ. Microbiol. 50(2):468-476
- Chevalier, P., D. Roy, and P. Ward. 1990. Detection of Bifidobacterium Species by Enzymatic Methods. J. Appl. Bacteriol. 68:619-624
- Driessen, F.M. and R. De Boer. 1989. Fermented Milks with Selected Intestinal Bacteria: A Healthy Trend in New Products. Neth. Milk Dairy J. 43:367-382
- Hoover, D.G. and D.B. Hughes. 1991. Current Status and Future Trends of Bifidobacteria Related Research and Products in the USA. Bifidobacteria Microflora. 10(2):113-121
- Iwata, M. and T. Morishita. 1989.

- The Presence of Plasmids in *Bifidobacteriumm breve* Lett Appl Microbiol Microbiol 9:165-168
- Kim,H.S. 1988. Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as Applied to Dietary Adjuncts. Cultured Dairy Products J. 23(3): 6-8
- Laroya,S. and J.H.Martin. 1990. Bifidobacteria as Possible Dietary Adjuncts in Cultured Daivy Products -A Review. Cultured Daivy Products J. 25(4):18-22
- Mayer,J.B. 1948. Development of a New Infant Food with *Lactobacillus bifidus*.
I. The-Bulgarian Sour Milk(Yoghuet)
II. Culture of *Lactobacillus bifidus*, in the Presence of Oxygen III. Bifidus Milk
IV. *Streptococcus lactis-Bifidus* Milk
V. Lactic Acid-Bifidus Milk.lactic Z. Kinderheilk. 65(4):319-345
- Mitsuoka, T., T.Sega, and S. Yamamoto. 1965. Ein Verbesserte Methodik der Qualitativen und Qualntitativen Analyse der Darmflora von Menschen- und Tieren. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig 195:455-469
- Mitsuoka, T. 1969. Vergleichende Untersuchung uber die Bifidobakterienaus demVerdarungstrakt von Menschen und Tieren Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig 210 : 52-64
- Mitsuoka, T. 1982. Recent Trends in Research on Intestinal Flora. Bifidobacteria Microflora. 1(1):3-24
- Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and Ecology of Bifidobacteria. Bifidobacteria, Microflora 3(1):11-28
- Mizutani,T. and T.Mitsuoka. 1980. Inhibitory Effect of Some Intestinal Bacteriaon Liver Tumorigenesis in Gnotobiotic C3H/He Male Mice. Cancer Lett. 11:89-95
- Ochi,Y., T.Mitsuoka, and T. Sega. 1964. Studies on the Intestinal Flora of Chicks. III. The Development of the Flora from Chicks till Hens. Zbl. Bakt.I.Abt.Orig. 193:80-95
- Poupard,J.A., I.Husain, and R.F.Norris. 1973. Biology of the Bifidobacteria. Bacteriol.Rev. 37:136-165
- Resnick,I.G. and M.A.Levin. 1981 a. Quantitative procedure for Enumeration of Bifidobacteria.Appl.Environ.Microbiol. 42(3):427-432
- Resnick,I.G. and M.A.Levin. 1981 b. Assessment of Bifidobacteria as Indicators of Human Fecal Pollution. Appl.Environ.Microbiol. 42(3):433-438
- Rowland,I.R. and P.Grasso. 1975. Degradation of N-Nitrosamines by Intestinal Bacteria. Appl.Microbiol. 29(1):7-12.
- Samona,A.and R.K.Robinson. 1991. Enumeration of Bifidobacteria in Dairy Products. J.Soc.Dairy Technol. 44(3):64-66
- Sandine,W.E., K.S.Muralidhara, P.R.Elliker, and D.C.England. 1972. Lactic Acid Bacteria in Food and Health:A Review with Special Reference to Enteropathogenic *Escherichia coli* as

- well as Certain Enteric Diseases and Their Treatment with Antibiotics and Lactobacilli. *J.Milk Food Technol.* 35(12):691-702
- Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Ed. Vol.2. Ed. Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. pp.148-1434. Williams and Wilkins Publishers. Baltimore. MD
- Stark, P.L. and A. Lee. 1982. The Microbiological Ecology of the Large Bowel of Breast Fed and Formula Fed Infants during the First Year of Life. *J. Med. Microbiol.* 15:189-203
- Suzuki, K., Y. Kodama, and T. Mitsuoka. 1989. Stress and Intestinal Flora. *Bifidobacteria Microflora*. 8(1):23-38
- Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa, and T. Mitsuoka. 1978. Enumeration of *Bifidobacteria* in Dairy Products. *Jap. J. Bacteriol.* 33(6):753-761
- Tissier, M.H. 1899. La Reaction Chromopile d' *Escherichia coli* et le *Bacterium coli*. *C.R.A cad. Sci.* 51:943-945
- Trovatelli, L.D. and D. Matteuzzi. 1976. Presence of *Bifidobacteria* in the Rumen of Calves Fed Different Rations. *Appl. Environ. Microbiol.* 32(4):470-473
- Wijsman, M.R., J.L.P.M. Hereijgers, and J.M.F.H. De Groote. 1989. Selective Enumeration of *Bifidobacteria* in Fermented Dairy Products. *Neth. Milk Dairy J.* 43:395-405
- Yoshioka, H., K. Fujita, H. Sakada, K. Murono, and K. Iseki. 1991. Development of the Normal Intestinal Flora and Its Clinical Significance in Infants and Children. *Bifidobacteria Microflora*. 10(1):11-17
- 神邊道雄. 1986. 腸内乳球菌の利用と保健. *New Food Industry*. 28(8):41-51
- 光岡知足. 1974. 腸内菌叢の研究における最近の進歩-とくに酪酸性菌を中心として. *日本細菌學雜誌*. 29(6):773-788
- 渡邊章子, 務方彦. 1975. *Bifidobacterium* の臨床への應用. *小兒科臨床*. 28(1):19-28
- 湧口浩也, 工藤力, 小比木成夫. 1989. 發酵乳・乳酪菌飲料と腸内菌叢. *New Food Industry*. 29(7):71-87
- 姜國熙, 朴勇河. 1985. 한국 성인의 장내세균 분포에 관한 연구. *대한보건협회지*. 11(2):59-65
- 高浚洙, 權一慶, 金英玉. 1986. *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863의 우유내 성장에 관한 연구 *한국낙농학회지* 8(1):48-56
- 金尙希, 姜國熙. 1984. 한국 유아의 분변중 *Bifidobacterium*의 분포. *한국낙농학회지*. 6(2):126-134
- 張準桓, 權一慶, 金顯旭. 1983. 한국 모유아 장내에 분포하는 *Bifidobacteria*에 관한 연구. *한국낙농학회지*. 5(2):111-120
- 許喆成, 李守遠, 尹快炳. 1989. 한국 유아 분변에 분포하는 *Bifidobacteria*에 관한 연구. *한국낙농학회지*. 11(1):16-25