

양돈용 생균제 개발을 위한 유산균주 선발

변재원 · 김정태* · 배형석* · 백영진* · 이완규

충북대학교 수의과대학

*(주)한국야쿠르트 중앙연구소

(2000년 10월 27일 게재승인)

In vitro selection of lactic acid bacteria for probiotic use in pigs

Jae-won Byun, Gyung-tae Kim*, Hyoung-suk Bae*, Young-jin Baek*, Wan-kyu Lee

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

*Korea Yakult Ltd. R & D Center

(Accepted by October 27, 2000)

Abstract : This study was carried out to select the lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium*) and yeast for probiotic use in pigs. Acid-tolerant 536 strains were isolated from the feces of 30 pigs. To select useful strains, the first screened strains were treated with strong acid solution (pH 2.5 to 3.0) for 3 hours and subsequently treated with the anaerobic diluent solution containing 0.15% Oxgall for 3 hours. Among these strains, 151 strains showed strong tolerance to both acid and bile. *Lactobacillus* and *Streptococcus* tolerant to the acid and bile were treated with heat at 80°C for 15 min, and at 70°C for 5 min in *Bifidobacterium* and yeast. As a result of heat treatment, 38 strains were obtained as heat-tolerant strains. All of heat-tolerant strains were tested for antibiotic resistance against virginiamycin, sulfathiazole, aureomycin, neomycin, linsmycin, tiamulin and ASP250 which were used as feed additives for growth promotion in pigs. Finally, one strain each from *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* and yeast that showed resistance to acid, bile, heat and antibiotics was selected for probiotic use in pigs.

Key words : probiotics, lactic acid bacteria, acid and bile tolerance, heat tolerance, antibiotic resistance

서 론

현재 사용되는 생균제(Probiotics)의 의미는 1965년 Lilley와 Stillwell이 최초로 사용한 이래¹, 1974년 Parker가 장관내 세균총의 균형을 조절할 수 있는 세균이나 물질로 정리한 후², 1989년 Fuller에 의하여 「장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주동물에게 유익하게 작용하는 생균 첨가물」로 정의되고 있다³.

생균제를 사용하여 가축의 질병예방 및 생산성 향상을 이루기 위해서는, 먼저 위산 및 담즙산에 대한 저항성, 소장하부에서의 정착능력 및 증식능력, 안전성이 탁월한 균주들을 확보, 개발하는 것이 무엇보다 중요하다⁴. 또한 이와 같은 생균제를 산업화하여, 성공적으로 개발하기 위해서는, 실제 가축에서 가장 많은 경제적 손

실을 일으키는 설사증에 대한 예방효과, 증체율 증가에 따른 사료효율의 향상, 투여방법의 용이성, 그리고 제품 가격의 저렴함 등이 중요시되고 있다.

현재 양돈용으로 사용되고 있는 생균제용 유산균주로는 정상 장관세균총(normal intestinal microflora) 중에서 유용한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus*, *Streptococcus*(*Enterococcus*), *Bifidobacterium* 등이 잘 알려져 있다. 이와 같은 유산균주는 위산에 대한 저항성(pH 2 - pH 3에서의 생존성)^{5,6}, 담즙산에 대한 저항성(Oxgall 0.15% 및 0.3%에서의 생존성)⁷, 사료 첨가시 펠렛 제조 과정에서의 내열성 및 기존의 사료 첨가용 항생제에 대한 저항성이 높은 균주를 선발하여 양돈용 생균제로 사용하는 것이 바람직하다. 그러나 이와 같은 가축용 생균제의 원료인 원말은 거의

대부분 외국으로부터의 수입에 의존하고 있어, 외화낭비를 막고, 기술개발을 위해서는 국내에서도 가축용 생균제를 위한 균주 개발이 필요한 실정이다.

현재 가축의 질병예방 및 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있는 사료첨가 항생제(Antibiotics)는 매년 그 사용이 증가 추세에 있지만, 무분별한 항생제의 남용과 오용은 오히려 내성균주의 증가로 질병예방 및 치료에 문제점이 되고 있다⁸⁾. 또한 축산물의 항생제 잔류문제로 사람의 건강마저 위협하는 심각한 상황을 초래하고 있어, 외국의 경우에는 사료첨가 항생제의 사용을 엄격히 규제하여 가고 있는 실정이다. 따라서 앞으로는 사료첨가 항생제의 역할을 대신하면서, 가축과 사람에게 안전한 생균제에 대한 많은 연구와 개발이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 돼지의 분변으로부터 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*의 유산균 및 Yeast 균주를 분리하여, 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성 등의 특성을 검사하고, 그 중에서 가장 성상이 우수한 균주를 선발하여, 향후 이유자돈 설사증 예방 및

증체율 향상을 위한 양돈사료첨가 생균제용 유산균주의 개발을 실험의 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

생균제용 유산균주를 분리할 목적으로 건강한 포유자

Table 1. The media and cultural methods used in this study for selection of probiotic strains in pig

Medium	Organisms usually enumerated	Incubation method	Incubation time (hr)
BL	<i>Anaerobes</i>	Steel wool method	48
LBS	<i>Lactobacillus</i>	Steel wool method	48
BS	<i>Bifidobacterium</i>	Steel wool method	48
TATAC	<i>Streptococcus</i>	Steel wool method	48
P	yeast	Aerobic culture	24

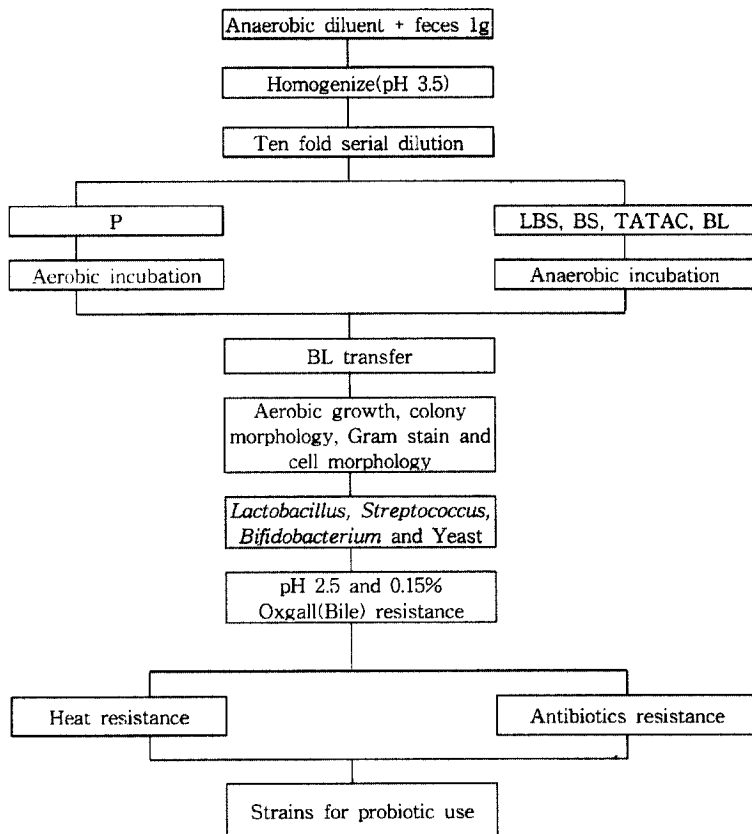


Fig 1. Scheme for the *in vitro* selection of strains for probiotic use from the feces of pigs

돈(14-20일령), 이유자돈(35일-40일령), 성돈 각 10두씩, 합계 30두의 공시동물을 사용하였다.

생균제용 유산균주의 분리

가축의 생균제용 유산균주 선발을 위하여 공시동물의 신선한 분변 1g을 정량하여 멸균된 99 ml의 Anaerobic diluent⁹에 넣고 균질화 한 후, 농염산(원액 HCl)으로 pH를 3.5로 조정하고, 1시간 동안 처리하여, 내산성 균주를 예비선발하였다. 그 후 10배 단계 희석하여, Table 1에서와 같은 Mitsuoka 방법의 선택배지(LBS, BS, TATAC, P) 및 비선택배지(BL)에 도말하였다^{9,10}. LBS, BS, TATAC, BL 배지는 37°C, 48시간 steel wool method를 사용한 혐기배양을 실시하였으며^{9,11}, P 배지는 37°C, 24시간 호기배양 하였다. 각 배지에서 우세균총으로 배양된 colony를 선별하여, BL medium에 계대 배양한 후, aerobic growth, Gram stain, cell morphology를 검사하여, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* 및 Yeast 균주를 선별하였다. 가축 생균제용 균주의 분리에 관한 모식도는 Fig 1에 나타내었다.

내산성 및 내담즙성 검사

선발된 분리 균주의 내산성 및 내담즙성 검사를 위하여, 분리된 모든 균주를 EGF broth(pH 7.0)⁹에 접종하고, 48시간 배양액을 검사의 접종액으로 사용하였다. 내산성 검사를 위하여 *Lactobacillus*, *Streptococcus*는 pH 2.5, *Bifidobacterium*, Yeast는 pH 3.0으로 조정된 멸균 Anaerobic diluent 용액 2 ml에 각 균주의 접종액 50 µl를 분주하고, 37°C에서 3시간 반응시켰다. 그 후 BL 배지에 도말하여 37°C, 24시간 혐기배양(단 Yeast는 호기배양) 후, 성장한 colony를 내산성 균주로 판정하였다.

내담즙성 검사는 0.15% Oxgall(Bile)이 첨가된 멸균 Anaerobic diluent(pH 7.0) 2 ml에 각 균주의 접종액 50 µl를 분주하고, 내산성 시험방법과 동일하게 실험한 후, 성장한 colony를 내담즙성 균주로 판정하였다.

내열성 및 항생제 내성 검사

분리 균주 중에서 내산성 및 내담즙성이 확인된 균주를 대상으로 내열성 및 항생제 내성 검사를 실시하였다. 내열성 시험은 EGF broth⁹에서 배양시킨 접종액 100 µl를 멸균 Anaerobic diluent 2 ml에 분주하고, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 균주는 80°C water bath에서 15분, *Bifidobacterium*, Yeast 균주는 70°C에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후 생존한 내열성 균주를 확인하기 위하여, 반응액을 BL 배지에 도말하고 37°C, 48시간 배양하였다.

현재 가축사료에 존재하는 여러 가지 항생제 농도에 대한 균주 저항성을 검사하기 위하여, 국내에서 가축사료에 첨가하고 있는 7종류의 항생제를 사용하였다. 각 항생제의 원말은 10% 농도로 용해시킨 후, 모두 membrane filter(0.45 µm)를 통과시켜 stock solution을 만들고, Tryptic soy agar 배지 100 ml 당 Linsmycin (lincomycin + spectinomycin) 1 ml, Virginiamycin 2.5 ml, Neotera(neomycin + teramycin) 1 ml, ASP 250(chlortetracyclin + sulfathiazole + penicillin) 1 ml, Sulfathiazole 0.5 ml, Aureomycin 1 ml, Tiamulin 2 ml의 농도로 배지에 각각 첨가하였다. 각 항생제를 함유한 TS 한천배지에 선발 균주를 접종하고, 37°C, 48시간 배양하였다. 그 후 항생제가 첨가되지 않은 TS 배지에서의 positive control과 비교하여, 발육이 유지되어 항생제 저항성이 있으면 resistant(+), 발육이 미약하면 intermediate(W), 발육이 억제되어 저항성이 없으면 susceptible(-)로 판정하였다.

결 과

생균제용 유산균주의 분리

본 실험에 사용한 포유자돈, 이유자돈, 성돈 각 10두씩, 합계 30두의 분변으로부터 pH 3.5에서 1시간 동안 저항성을 나타내는 유산균주와 Yeast를 분리한 결과는 Table 2에 나타내었다. 그 결과 *Lactobacillus* 392균주, *Streptococcus* 102균주, *Bifidobacterium* 35균주, Yeast 7균주의 합계 536균주가 분리되었다.

Table 2. Number of selected strains after acid, bile and heat treatment from feces of pigs

Bacterial groups	No. of isolates	Acid resistance (pH 2.5)	Bile resistance (0.15% oxgall)	Heat resistance (70°C, 15 min)
<i>Lactobacillus</i>	392	114/392(29) ¹⁾	111/392(28)	18/111(16)
<i>Streptococcus</i>	102	12/102(12)	12/102(12)	4/12(33)
<i>Bifidobacterium</i>	35	21/35(69) ³⁾	21/35(69)	13/21(62) ²⁾
Yeast	7	7/7(100) ³⁾	7/7(100)	3/7(38)
Total	536	154/536(28)	151/536(28)	38/151(25)

¹⁾ No. of strains selected / No. of strains isolated(%) ²⁾ Heat treated at 80°C for 5 min ³⁾ Acid resistance to pH 3.0

내산성 및 내담즙성 균주 선발

생균제용 유산균주로 분리된 536균주들을 대상으로, pH 2.5 및 pH 3.0에서 3시간 동안 내산성을, 그리고 0.15% 담즙에서 3시간 동안 내담즙성을 나타내는 균주를 선발한 결과는 Table 2와 같았다. *Lactobacillus*의 경우 1차로 분리된 392주 중에서 29% 인 114균주가 내산성을, 28% 인 111 균주가 내담즙성을 나타내었다. *Streptococcus*는 102균주 중에서 12% 인 12균주가, *Bifidobacterium*에서는 35균주 중에서 69% 인 24균주가 각각 내산성과 내담즙성을 모두 나타내었다. Yeast는 분리된 8균주 모두 내산성 및 내담즙성을 나타내었다.

내산성과 내담즙성을 모두 갖고 있는 151균주의 왜지의 연령별 분포에 대해서 분석한 결과를 Table 3에

Table 3. Distribution of acid and bile resistant strains in different age of pig

Bacterial groups	No. of resistant strains(%)			
	Adult	Weaning	Suckling	Total
<i>Lactobacillus</i>	50(45)	45(40)	16(15)	111(100)
<i>Streptococcus</i>	9(75)	1(8)	2(17)	12(100)
<i>Bifidobacterium</i>	-	2(9)	19(91)	21(100)
Yeast	6(86)	-	1(14)	7(100)

나타내었다. *Lactobacillus*는 성돈, 이유자돈에서 비숫하게 분리되었으며, *Streptococcus*와 Yeast는 주로 성돈에서, *Bifidobacterium*은 포유자돈에 대부분 분포하고 있었다.

내열성 및 항생제 내성 균주 선발

내산성과 내담즙성을 모두 갖고 있는 151균주를 대상으로 내열성 및 항생제 내성 시험을 실시하였다. Table 2에서와 같이 내열성 시험결과, *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 각각 16%와 32%의 균주가 내열성을 나타내었으며, *Bifidobacterium*은 21균주 중 13균주(62%)가 높은 내열성을 나타내었다. 또한 Yeast는 38%의 균주가 내열성을 나타내었다.

또한 가축 사료첨가용 항생제 7종류에 대한 저항성을 검사한 결과는 Table 4에서와 같이, *Lactobacillus*는 Neomycin에 대해서 44균주(39%)만이 내성을 나타내었지만, 나머지 6종류의 항생제에 대해서는 45%-76%의 비교적 중등도 이상의 내성을 나타내었다. 또한 *Streptococcus*는 7종류의 항생제 모두에 대해 83%-100%의 높은 내성을 보였으며, *Bifidobacterium*은 Virginiamycin(33%), Linsmycin(43%)을 제외한 항생제에 대해 61%-81%의 비교적 높은 내성을 나타내었다. Yeast 7균주는 모든 항생제에 대하여 100%의 내성을 나타내었다.

Table 4. Number of antibiotic resistant strains from the acid and bile resistant strains

Antibiotics	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Yeast	Total
Virginiamycin	58/111(52) ¹⁾	11/12(91)	7/21(33)	7/7(100)	83/151(55)
Sulfathiazole	78/111(70)	12/12(100)	16/21(76)	7/7(100)	113/151(74)
Aureomycin	84/111(76)	12/12(100)	16/21(76)	7/7(100)	119/151(79)
Neomycin	44/111(39)	11/12(91)	13/21(61)	7/7(100)	75/151(50)
Linsmycin	50/111(45)	10/12(83)	9/21(43)	7/7(100)	76/151(50)
Tiamulin	80/111(72)	12/12(100)	17/21(81)	7/7(100)	116/151(77)
ASP 250	74/111(67)	12/12(100)	15/21(71)	7/7(100)	108/151(72)

¹⁾ No. of resistant strains / No. of strains isolated(%)

Table 5. Bacterial characteristics of selected strains for probiotic use in pigs

No.	Cell ¹⁾	Gram	AE ²⁾	Acid	Bile ³⁾	Heat ⁴⁾	Antibiotics ⁵⁾						
							Vir.	Sul.	Aur.	Neo.	Lin.	Tia.	ASP 250.
<i>Lactobacillus</i> -62	R	+	+	+	+	+	W	W	-	W	W	W	W
<i>Streptococcus</i> -1	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bifidobacterium</i> -5	R	+	-	+	+	+	-	W	W	+	-	W	+
Yeast-8	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1) Cell morphology(R: rods, C: coccus, O: ovoid). 2) Aerobic growth. 3) 0.15% Oxgall resistance.

4) *Lactobacillus* and *Streptococcus* : 80°C 15 min, *Bifidobacterium* and Yeast : 70°C 5 min.

5) Vir: Virginiamycin, Sul: Sulfathiazole, Aur: Aureomycin, Neo: Neotera(Neomycin + Teramycin), Lin: Linsmycin(Lincomycin + Spectinomycin), Tia: Tiamulin, ASP 250: Chlortetracycline + Sulfathiazole + Penicillin, +: Resistant, W: Intermediate, -: Susceptible

생균제용 최종 선발 균주

본 실험에서 분리된 유산균주 중에서 내산성, 내담즙성, 내열성 및 항생제내성이 가장 우수한 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Yeast*를 각각 1균주씩 최종 선발균주로 선발하였으며, Table 5에서 그 최종 선발 균주의 특성을 나타내었다.

고 찰

양돈산업의 사육규모가 점점 대규모화 됨에 따라, 설사증, 폐렴 등의 여러 가지 질병발생도 증가하여 가축의 폐사 및 증체를 저하 등의 경제적 손실을 가져오고 있으며, 이와 같은 손실을 예방하기 위하여 항생제 처치가 일반적으로 널리 이용되고 있다^{12,13}. 그러나 최근 항생물질의 사용 증가로 인한 항생제 내성균주의 증가 및 항생제 잔류 등의 문제점이 대두되고 있다. 따라서 이와 같은 문제점을 보완하면서 질병예방 및 증체를 개선할 수 있는 생균제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 생균제로 사용할 수 있는 균주를 국내에서 직접 개발하기 위하여 돼지의 분변에서 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*의 유산균과 *Yeast*를 분리하여 내산성, 내담즙성, 내열성, 항생제 내성 등을 검사한 후 균주를 선발함으로써 앞으로 양돈용 생균제로 사용할 수 있는 우수 균주의 개발을 실시하였다.

돼지의 장관에 많이 분포하고 있는 유산균으로는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*^{14,15}, *Enterococcus bovis*, *Ent. bovis*, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Streptococcus intestinalis*^{16,17,18}, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bif. suis*^{19,20} 등이 보고되고 있다. 이 중에서 *Lactobacillus* spp. 나 *Streptococcus* (*Enterococcus*) spp.가 생균제로 많이 사용되고 있으며, *Bifidobacterium*은 편성 혐기성 유산균으로 산소에 대한 감수성이 높아 제품개발에 장애 요인이 될 수 있다^{21,22}. 이외에도 *Bacillus* spp., *Clostridium butyricum*²³, *Saccharomyces*, *Yeast*²⁴ 등이 생균제 균주로 사용되고 있다. 따라서 본 연구의 균주선발에서도 *Lactobacillus*, *Streptococcus*(*Enterococcus*), *Bifidobacterium*에 초점을 맞추어 분리하였으며, 기타 균주로 *Yeast*를 선발하였다.

가축에 사용하는 생균제들은 살아 있는 생균 상태로 가축의 장내까지 도달하여 효력을 나타내는 것이 바람직하다. 그러므로 이러한 생균제용 균주가 갖춰야 할 요건으로서 위내의 낮은 pH에서 생존할 수 있는 내산성, 십이지장의 담즙에 대한 내담즙성, 사료에 첨가시 펠릿 제조 과정에서의 내열성 및 기온사료에 첨가하여 사용하고 있는 항생제에 대한 항생제 내성 등을 갖춘 균주

들이 우수한 균주임이 현재 일반적으로 인정되고 있다^{5,7,25}. 또한, 저장상태에서나 사료 첨가시 안정성 및 생존성이 중요시 되고 있다. 실제로 위내 투여시 1일 약 10^8 - 10^9 /g로 처치되어야 위와 십이지장을 통과한 후 실제 작용부위인 하부장관에 도달하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 여러 연령의 돼지 분변으로부터 536 균주의 유산균주가 분리되었으며, 그 중 내산성 균주와 내담즙성 균주는 각각 29% 인 154균주와 28% 인 155균주이었다. 따라서 본 연구 결과 돼지분변 유래의 내산성 균주는 대부분 내담즙성도 함께 갖고 있는 것으로 추측된다. 균종별로는 *Streptococcus* 균주가 12%로 낮은 내산성, 내담즙성을 보유하고 있는 반면, *Bifidobacterium*은 69%의 높은 비율로 내성을 갖고 있었다. 또한 내산성과 내담즙성을 모두 갖고 있는 151균주의 25%가 내열성 균주임을 알 수 있었다. 항생제내성 시험결과 *Streptococcus* 균주는 sulfathiazole, aureomycin, tiamulin, ASP250에 100% 저항성을 나타내었으며, *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 균주도 약 70% 전후의 높은 내성을 갖고 있었다. 전체적인 항생제 내성 시험결과, *Streptococcus*, *Yeast* 균주가 모든 7종류의 항생제에 대하여, 우수한 균주인 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 분리균주 중에서 가장 성상이 우수한 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Yeast* 각 1균주씩을 이우자돈 설사예방 목적으로 사용할 수 있는 생균제용 균주로 최종 선발하였으며, 앞으로 실용화 하기 위해서는 대량배양방법, 유통기간중의 안정성 확인, 또한 최종 선발균주를 사용한 실제 야외 효능 실험이 반드시 필요할 것으로 생각된다.

결 론

자돈의 생균제용 유산균주의 개발을 목적으로, 포유자돈, 이우자돈, 성돈 30두의 분변으로부터 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Yeast*의 536균주를 분리하였다. 분리균주를 대상으로 pH 2.5 및 pH 3.0에서 3시간 동안 내산성을, 그리고 0.15 % 담즙에서 3시간 동안 내담즙성을 나타내는 균주를 선발한 결과, *Lactobacillus*의 경우 분리된 29% 인 114균주가 내산성을, 28% 인 111균주가 내담즙성을 나타내었다. *Streptococcus*는 12%가, *Bifidobacterium*은 69%의 균주가 각각 내산성과 내담즙성을 모두 나타내었으며, *Yeast*는 분리된 8균주 모두 내산성 및 내담즙성을 나타내었다.

내산성 및 내담즙성을 모두 갖는 151균주에 대하여 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 80°C에서 5분, *Bifidobacterium*과 *Yeast*는 70°C에서 15분간 내열성 시험을 실시한 결과, *Lactobacillus*와 *Streptococcus*는 각각 16%와

32%의 균주가 내열성을 나타내었으며, *Bifidobacterium* 은 21균주 중 13균주(62%)가 높은 내열성을 나타내었다. 또한 Yeast는 38%의 균주가 내열성을 나타내었다.

또한 가축 사료 첨가용 항생제 7종류에 대한 저항성을 검사한 결과, *Lactobacillus*는 Neomycin에 대해서는 44균주(39%)만이 내성을 나타내었지만, 나머지 6종류의 항생제에 대해서는 45%-76%의 비교적 중등도 이상의 내성을 나타내었다. 또한 *Streptococcus*는 7종류의 항생제 모두에 대해 83%-100%의 높은 내성을 보였으며, *Bifidobacterium*은 Virginiamycin(33%), Linsmycin(43%)을 제외한 항생제에 대해 61%-81%의 비교적 높은 내성을 나타내었다. Yeast 7균주는 모든 항생제에 대하여 100%의 내성을 나타내었다.

이와 같은 내산성, 내담즙성, 내열성 및 항생제내성이 가장 우수한 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, Yeast를 각각 1균주 씩 최종 선발균주로 선발하였으며, 이 선발균주들은 양돈용 생균제로 개발하기에 매우 적합한 우수균주로 판단되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처가 시행한 국책과제인 '미생물과 발효'의 세부과제로서 "유산균을 이용한 사료첨가제의 개발" 과제로 수행되어진 것입니다.

참고 문헌

- Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147:747-748, 1965.
- Parker RB. The other half of the antibiotics story. *Anim Nutr Health*, 29:4-8, 1974.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66:365-378, 1989.
- Fuller R. History and development of probiotics. In *Probiotics - the science basis*, ed R. Fuller, Champman and Hall:1-8, 1992.
- Hood SK, Zottola EA. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J Food Sci*, 53(5):1514-1516, 1988.
- Giannella RA, Broitman SA, Zamcheck N. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*. 13:251-256, 1972.
- Gilland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci*, 67:3045-3051, 1984.
- Fox SM. Probiotics; intestinal inoculants for production animals. *Vet Med*, 806-830, 1988.
- Mitsuoka T. The World of Anaerobic Bacteria; A Color Atlas of Anaerobic bacteriology. 1st ed. Sobun Press, Tokyo, 53-92, 1980.
- Lee WK, Lee SM, Bae HS, et al. Effect of *Bifidobacterium longum* HY8001 administration on human fecal bacterial enzymes and microflora. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27:267-272, 1999.
- Parker CA. Anaerobiosis with iron wool. *Aust J Exp Biol Sci* 33:33-38, 1955.
- Vissek WJ. The mode of growth promotion by antibiotics. *J Ani Sci*, 46(5):1447-1469, 1978.
- Jonsson E, Conway P. Probiotics for pigs. In *Probiotics - the science basis*, ed R. Fuller, Champman and Hall, 260-316, 1992.
- Fuller R, Barrow PA, Brooker BE. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl Environ Microbiol*, 35:582-591, 1978.
- Axelsson L, Lindgren S. Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine. *J Appl Bacteriol*, 62:433-440, 1987.
- Raibaud P, Caulet M, Galpin JV, et al, G. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. *Streptococci*: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *J Appl Bacteriol*, 24:285-306, 1961.
- Barrow PA., Fuller R. Newport MJ. Changes in the microflora and physiology of the anterior tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infect Immun*, 18:586-595, 1977.
- Robinson IM, Stromley JM, Varel VH, et al. EP. *Streptococcus intestinalis*, a new species from the colons and feces of pigs. *Int J Syst Bacteriol*, 38:245-248, 1988.
- Zani G, Biavati B, Crociani F, et al. Bifidobacteria from the feces of piglets. *J Appl Bacteriol*, 3:537-547, 1974.
- Robinson IM, Whipp SC, Bucklin JA, et al. MJ. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol*. 48:964-969, 1984.
- Kurman JA. The development and significance of new cultures with bifidobacteria as an example. *North Eur Dairy J*. 3:65-74, 1983.
- Lee WK. Studies on the distribution of intestinal microflora and characterization of Bifidobacterium isolated from the intestine of domestic animals. *Kor J Vet Res*. 34:107-113, 1994.
- Han IK, Kim JD, Lee JH, et al. Studies on the growth promoting effects of probiotics. III. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the microbial flora of the feces of growing pigs. *Kor J Anim Sci*, 26:166-171, 1984.
- Burnett GS, Neil EL. A note on the effect of probioticum feed additive on the live-weight gain, feed conversion and carcass quality of bacon pigs. *Anim Prod*, 25:95-98, 1977.
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*, 70:1-12, 1987.