

프로바이오틱 유산균의 선발기준 및 산업적 응용

Selection Criteria for Probiotics and Their Industrial Applications

정 후 길
매일유업(주) 중앙연구소

머리말

1950년대에 항생제가 가축용 치료제와 생육 촉진제로 널리 사용되었는데, 그 이후로 새로운 항생제 저항성 세균이 출현하기 때문에 치료 목적으로 항생제의 지속적인 사용이 어려워질 것이라는 관심이 증폭되었다. 또한 항생제를 치료제로 사용할 때의 부작용은 항생제를 경구 투여함에 따라서 종종 장내균총의 교란이 수반된다는 것이다. 비록 항생제가 질병 치료에 효과적이기는 하지만 내재적 장내균총에 미치는 영향은 치료가 종료된 후에도 지속되는 문제점이 대두되고 있다. 따라서 항생제를 가축용 생육 촉진제로 더 이상 사용하는 것을 중단할 수 있는 가능성 여부와 항생제를 치료제로 사용했을 때 야기되는 부작용에 대한 우려가 항생제 대체물을 추구하는 경향을 나타내게 되었다. 프로바이오틱(probiotics)은 이러한 역할을 충족시킬 수 있는 것으로 인정되고 있으며 이미 항생제 대체물로 선호하여 사용되고 있다[10].

이러한 프로바이오틱 유산균의 다종다양한 선발조건이 부분적이거나 설정되어 있지만 선발기준의 척도가 완전하게 설정되어 있지 못하다. 결국 연구자 및 실험 조건에 따라서 커다란 차이를 나타내기 때문에 각각의 선발조건 및 항목별로 일정한 수준과 범위를 제시하는 객관적인 판정 기준이 필요하게 된다 (Fig. 1). 최근 유럽에서는 프로바이오틱 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위한 잠재력을 평가하기 위하여 프로바이오틱 유산균의 선발기준에 대한 연구가 다국적으로 광범위하게 진행되었다[32,40]. 여기에서는 보다 새롭고 효율적인 프로바이오틱 유산균을 개발하는데 있어서 균주 선발에 대한 방법론이 주로 강조되고 있다.

현재 프로바이오틱 유산균은 발효유와 유아식, 유제품, 축산농가 사료용, 화장품, 건강보조식품, 정장약품, 캡슐제제 등에 사용되고 있는데 최근에 유산균 업계에서 가장 각광을 받고 있다[13,25,36]. 건강을 추구하는 현대에 있어서 성인과 관련된 질병의 예방 및 치료 측면에서 볼 때, 병원성 세균의 억제, 콜레스테롤 저하능, 면역 증강능, 항돌연변이원성, 항종양 활성 및 항암 효과, 장내 정착성 및 서식성, 안전성 등의 생리

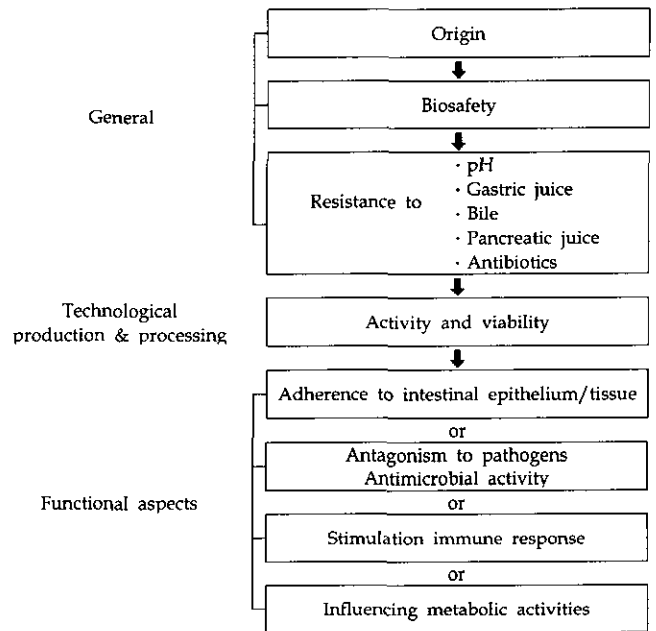


Fig. 1. Strategy for selection of probiotic strains

활성 및 기능성을 가진 유산균을 선발하여 제품화하는 것은 소비자의 욕구를 충족시키고 신규 수요를 창출하는데 있어서 매우 커다란 기폭제가 될 것으로 기대된다[2,22,28,41,46,47].

프로바이오틱 유산균

프로바이오틱이란 원래 원생동물에 의해서 생성되는 물질로서 다른 원생동물의 생육을 촉진하는 물질[23]을 지칭하였는데, 숙주의 장내균총에 영향을 미치므로서 숙주에게 유익한 효과를 나타내는 동물용 사료 첨가제로서 장내 미생물 균형에 공헌하는 생물체나 물질[29], 숙주의 장내 미생물 균형을 향상시키므로서 숙주에 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물 사료 첨가제[9], 사람이나 동물에 건조된 세포 형태나 발효산물 형태로 급여되어 사람이나 숙주 동물의 장내균총을 개선하여 유익한 영향을 주는 단일 또는 복합균주 형태의 생균[17,18,19] 등을 말한다.

Table 1. Use of probiotic cultures for man and animals

	<i>Lb. acidophilus</i> ,	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. plantarum</i> *, <i>Lb. murinus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. lactis</i> *
Lactic acid bacteria	<i>Streptococcus</i>	<i>Str. thermophilus</i>
Lactobacillus	<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i> *
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> *
	<i>Pediococcus</i>	<i>Ped. cerevisiae</i> *, <i>Ped. acidilactici</i> *
Bifidobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bif. longum</i> , <i>Bif. breve</i> , <i>Bif. infantis</i> , <i>Bif. animalis</i> <i>Bif. thermophilum</i> *, <i>Bif. pseudolongum</i> *
Yeast and moulds	<i>Saccharomyces</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Sacch. fragilis</i> , <i>Sacch. boulardii</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Asp. oryzae</i> *
	<i>Torulopsis</i> *	
Spore formers	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> *, <i>B. toyoi</i> (toyocerin), <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> *
	<i>Clostridium</i>	<i>Cl. butyricum</i> *

*Only or mainly for animals

이렇듯 저농도에서 다른 미생물의 생육을 억제하는 저분자량의 미생물 대사 생성물인 항생제와 달리 프로바이오틱이란 숙주의 장내 미생물 균형을 향상시키므로서 건강 증진 효과를 나타내는 활성 미생물 식이 보충제를 말하는데 대표적인 프로바이오틱으로는 유산균을 들 수 있다(Table 1). 반면에 프레바이오틱(prebiotics)이란 대장 내에 이미 상재하고 있는 특정 균종의 활성화와 생육을 선택적으로 촉진하여 숙주에 유익한 영향을 미치므로서 숙주의 건강을 증진시키는 난소화성 식품 성분을 말하는데 대표적으로는 올리고당을 들 수 있다[12,15]. 한편 probiotics와 prebiotics를 통칭하여 synbiotics라고 한다(Table 2).

한편 colonic foods란 대장 내에서 소화 흡수되어 인체 건강의 증진 효과를 나타내는 식품을 말하며, 기능성 식품(functional foods)은 인체 건강에 직접적으로 관계되는 여러가지 계통의 특별한 생리 조절작용에 유리하도록 제조되어 인간의 건강 유지와 증진, 질병의 방지 등을 주 목적으로 하는 식품으로서 일상적으로 섭취하는 형태를 가지며 영양적 기능과 감각적 기능을 동시에 가지는 식품을 말하는데 일본의 특정보건용 식품(FOSHU)이 대표적이다(Table 3). 이외에 영양학적 효과와 제약 효과를 동시에 가지는 nutraceutical 및 세균과 유전자를 이용한 질병 치료 측면에서 bacteriotherapy와 gene therapy 등의 biotherapeutic 개념이 새롭게 도입되고 있다.

프로바이오틱 유산균의 선발 기준

역사적으로 요구르트 제조용 유산균이 최초의 프로바이오틱이라고 할 수 있다. 이러한 프로바이오틱 유산균의 선발을 위한 이론적인 근거는 안전성, 기능성 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역 촉진능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능), 기술적 측면(우유 중에서의 생육성, 관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조 과정 중의 생존성) 등을 들 수 있다(Table 4). 프로바이오틱 균주로 사용하기 위해서 적절한 유산균을 선발하는 데에는 몇가지 변수가 결정되어야 한다. 여러 연구자에 의해서 프로바이오틱 유산균의 선발 방법 및 기준이 제시되고 있는데 다음은 상업적으로 이상적인 프로바이오틱 유산균의 선발을 위해서 중요한 개괄적 고려 사항 및 관심 사항이다[26,44].

인체 유래종

프로바이오틱 유산균의 건강 증진 효과는 균종 의존성을 나타내기 때문에 프로바이오틱 유산균의 선발에 있어서 중요한 척도는 인체 유래종이어야 한다는 것이다. 최근에 인체 유래종 여부에 대해서 논란이 있지만 기존의 대부분의 성공적인 프로바이오틱 유산균은 인체 유래종으로 알려지고 있다. 이렇듯 프로바이오틱 유산균을 선발하는데 있어서 사용되는 하나의 선

Table 2. Nutritional additives within a new yoghurt generation

Probiotics	<ul style="list-style-type: none"> Selected cultures of microorganisms <ul style="list-style-type: none"> -which are able to survive stomach/duodenum passage -which are able to multiply in the small and the large intestine
Prebiotics	<ul style="list-style-type: none"> Selected substrates <ul style="list-style-type: none"> -which can not be digested in the upper intestinal tract -which enforce the growth of autochthonous microorganisms in the bowel, eg. bifidobacteria -which stimulate bowel movement(ballast substrates)
Synbiotics	<ul style="list-style-type: none"> Mixtures of probiotic cultures and prebiotic substrates in dairy products

Table 3. Probiotic bacteria with FOSHU clearance and products in Japan

Probiotic strain with FOSHU* clearance	Example of product based on this strain	Producer and statements allowed*
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Onaka-He GG Drink Yoghurt	Takanashi Milk Products
<i>Bif. longum</i> BB536	Bifidus Plain Yoghurt	Morinaga Milk Industries
<i>Lb. bulgaricus</i> <i>Str. thermophilus</i>	Bulgaria Yoghurt LB81 Bulgaria Nomu Yoghurt LB81 Plain	Meiji Milk Product
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-2062 <i>Bif. longum</i> SBT-2928	Yukijirushi Nature Yoghurt	Snow Brand Milk Products
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult(Fermented Milk Drink) Joy(Fermented Milk Drink)	Yakult Honsa
<i>Bif. breve</i> strain Yakult	Mil-Mil Mil-Mil E	Yakult Honsa

*FOSHU : Foods for specified health uses.

*Statements allowed : Reaches the intestine alive, Increases the intestinal beneficial bacteria, Promotes the maintenance of good intestinal environment, Regulates/helps maintain good gastrointestinal condition, Help balance the intestinal flora, Maintain the intestine in good health, Reduce harmful bacteria.

발기준은 균종 호환성(species compatability)이다. 즉, 하나의 숙주에서 분리된 프로바이오틱은 다른 숙주에는 효율이 저하된다는 일반적인 원리에 근거를 두고 있다. 그러나 많은 프로바이오틱 유산균이 미지의 기원을 가지고 있기 때문에 프로바이오틱 유산균의 균종간 사용이 보편화되어 있다.

내산성 및 내담즙성

한편 장관에서 효과를 나타내는 것으로 기대되는 모든 프로바이오틱 유산균의 경우에 있어서 산과 담즙에 대한 안정성을 기본적으로 보유해야 하는 것은 자명한 사실이다. 프로바이오틱 유산균의 위장 통과와 장내 정착성을 용이하게 하기 위해서는 내산성과 내담즙성 형질을 요구하게 된다. 프로바이오틱 유산균을 경구 섭취하는 경우에 위의 pH가 3.0이하로 내려가는 환경 하에서 생존해야 하고, 일단 소장에도 도달한 후에도 분비되는 담즙산에 의한 생육 저해를 극복해야 대장에 도달할 수 있다. 이와 같은 필요성 때문에 내산성 및 내담즙성 프로바이오틱 유산균의 선발에 대한 연구가 필요하다. 프로바이오틱 유산균의 내산성 기작은 명확히 규명되지 않았지만 일반적으로 원형질막에 결합되어 있는 H⁺-ATPase 활성 및 합량과 관계되어 있는 것으로 알려져 있다.

일반적으로 유산균은 호흡계를 가진 호기성 세균에 비해서 유기산에 대한 내성을 가지고 있다. 비피더스균 역시 pH 5.0 이하의 100mM 이상의 유기산이 존재할 때에도 생육을 계속하는 내산성 유산균이다. 한편 비피더스균의 내부 pH가 상대적으로 낮기 때문에 내산성을 유지할 수 있는 하나의 원인이 될 수 있을 것으로 추정된다. 그러나 낮은 내부 pH도 H⁺나 HA의 세포내 유입으로 인해서 한계치를 초과하면 세포 내의 항상성이 깨지고 세포 내의 pH gradient가 소실되어 생육할

수 없게 된다. 결국 이를 방지하기 위해서 세포막 결합 ATPase가 H⁺를 pumping하는 것으로 추정된다. 이렇듯 비피더스균의 세포내 환경은 최적 pH가 산성인 효소가 활성을 나타내기 적합한 낮은 pH를 유지하므로 산성 환경에 내성을 보이는 한편, 세포벽의 투과성을 낮추어 산의 세포내 유입을 방지한다고 생각된다. 또한 세포내 낮은 pH와 세포막의 투과성 감소로 자연히 ATPase의 작용에 의한 H⁺ pumping 비율은 상대적으로 감소될 것으로 추측할 수 있다.

Table 4. Desirable properties of probiotic bacteria

Health and clinical properties
<ul style="list-style-type: none"> • Human origin • Resistance to acid and bile • Adherence to human intestinal cells • Colonization of the human gut • Production of antimicrobial substances • Antagonism against cariogenic and pathogenic bacteria • Safe for human consumption • Clinically validated health effects
Stability and technical properties
<ul style="list-style-type: none"> • Ability to maintain verified viability • Maintenance of good flavor and aroma profile after fermentation • Maintenance of mild acidity throughout storage : good • Maintenance of colonizing properties throughout processing acidity profile and storage • Development of good storage stability in fermented products • Stability after freeze drying and other drying methods • Accurate strain identification • Dose-response data for required effects

한편 담즙에 대한 내성은 소장에도 도달한 프로바이오틱 유산균의 생존 및 기능성에 중요한 역할을 하기 때문에 발효유 제품의 종균으로서 반드시 갖추어야 할 특성이다. 즉, 프로바이오틱 유산균이 생존한 상태로 장관에 도달하려면 체장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다. 실제로 유산균이 프로바이오틱 균주로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6g/l)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가지고 있어야 한다.

내산소성

비피더스 유산균은 장내의 대표적인 유익균으로서 인체 건강과 밀접한 관계를 맺고 있으며 유산균 업계에서 가장 각광을 받고 있다. 그러나 비피더스균의 다양한 유용성에도 불구하고 식품산업에서의 이용성이 용이하지 못한 이유는 비피더스균이 산소 존재시 생육이 거의 불가능하기 때문이다. 이러한 비피더스균은 편성 혐기성 세균으로서 배양 공정상 혐기적인 조건을 유지하여야 하고 까다로운 영양 조건을 만족시켜 주어야 하기 때문에 일반적으로 산업체에서 채택하고 있는 호기적인 배양 조건에서는 생육이 어려운 단점이 있다. 따라서 비피더스균의 생존성을 증가시키고 고농도 배양을 하기 위해서 중점을 두어야 할 기술로는 배양 중의 용존산소 제거 및 산화환원 전위를 -350mV 이하로 유지하는 공정 개발 기술이 필요하다. 결국 비피더스균을 유가공 산업에 이용하기 위해서는 특별히 혐기적인 조건을 필요로 하지 않고서도 호기적인 조건에서 생육이 가능한 균종을 선택하는 것이 중요하다.

그러나 비피더스균은 편성 혐기성 세균이지만 계대배양이 진행됨에 따라서 혐기 요구도가 완화되어 cysteine이나 ascorbic acid 등의 환원제를 첨가한 액체배지 중에서 산소에 노출되어도 생육이 가능하게 되는 경우가 있다. 결국 비피더스균의 내산소성은 균종에 따라서 매우 다양함을 알 수 있는데 이는 환경에의 적응력 때문이라고 생각된다. 그러나 비피더스균의 산소 감수성과 효소 활성과의 상관관계 및 정확한 기작은 아직 밝혀지고 있지 않다. 일부 유산균의 경우에 NADH oxidase는 외부 환경의 산소를 제거하는 중요한 역할을 하고 있으며, 혐기성 세균으로 알려져 있는 비피더스균의 경우에 NADH oxidase 효소는 산소 독성으로 인한 손상 보호에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그밖에 비피더스균의 내산소성은 주로 산소 대사와 관련된 효소인 NADH peroxidase 및 SOD(superoxide dismutase) 효소 활성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

콜레스테롤 저하능

경제 발전 및 소득 수준이 향상되면서 각종 성인성 질환이 급증하고 암과 동맥경화 등이 현대인의 사망 요인으로 가장 중요하게 대두되었다. 따라서 유제품 산업에서도 유산균 및 발효유

제품이 이들 질환에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서 커다란 관심을 가지게 되었다. 최근에는 동물성 식품의 포화지방산과 콜레스테롤의 과다 섭취가 혈중 콜레스테롤 농도의 증가와 동맥경화증을 유발하는 중요한 요인으로 인식되고 있다. 이렇듯 현대인의 식생활 패턴이 변화함에 따라서 성인성 질환을 유발시키는 요인 중에서 가장 중요한 것은 동물성 지방의 과다한 섭취로 인한 고 콜레스테롤 혈증이다. 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키려면 체내 콜레스테롤 생합성의 억제, 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 식품의 섭취 및 식품으로부터의 콜레스테롤 섭취를 감소시키는 등의 방법이 있는데, 최근에 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키는 효과가 인정된 식품으로서 발효유와 유산균이 관심의 대상이 되고 있다.

발효유 또는 유산균 섭취에 의한 혈중 콜레스테롤 저하 효과에 대한 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않고 있지만, 일반적으로 소장 내의 유산균은 포함 담즙산을 분해하여 담즙산의 재흡수를 억제하거나, 장내 콜레스테롤의 흡수 억제, 콜레스테롤의 동화(assimilation), 또는 콜레스테롤의 세포벽 흡착 등의 기능이 혈중 콜레스테롤 저하의 원인으로 추정되고 있다. 이렇듯 유산균 및 발효유 제품을 다량으로 섭취하면 HMG (hydroxy methyl glutarate), orotic acid, uric acid 등의 우유 성분 및 발효 산물, 유산균 자체의 콜레스테롤 분해능에 따라서 혈중 콜레스테롤 수준이 저하된다고 알려져 왔다. 이러한 혈중 콜레스테롤 함량의 저하는 콜레스테롤 합성의 변경, 섭취와 흡수, 담즙산으로의 전환, lipoprotein의 합성과 분해 등에 의해서 일어나게 된다. 따라서 혈관 질환의 개선을 위해서 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키는 프로바이오틱 유산균의 개발이 필요하다.

병원성 세균의 생육 억제능

항미생물제 생성능은 종종 병원성 세균의 생육을 억제하는 하나의 수단으로 생각되고 있다. 프로바이오틱 유산균은 *in vitro* 조건에서 식품 유래의 병원성 세균과 부패세균의 생육을 억제하는데 이러한 억제 기작은 유산균에 의해서 생성된 유산 및 초산, 저급 지방산, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin, 포함 담즙산, 항생물질 및 면역 체계 자극 등의 작용이라고 설명할 수 있다[1]. 한편 프로바이오틱 유산균은 감염성 설사의 발병 단계에서 장관 내에 침입한 병원성 세균의 서식성 및 영양소 섭취 저항에 기여하거나 병원성 세균이 장관 상피세포의 수용체에 정착하는 것을 방지하며, 장관 내에 생성된 설사 유발 독소의 중화 및 세포 침입을 저지한다. 또한 물과 전해질 흡수 균형의 회복 및 설사에 의한 장관 상피세포의 회복 등과 같은 효과를 나타낼 수 있다. 그 밖에도 유산균은 bacteriocin 과 같은 항균성 물질을 생성하여 병원성 세균의 생육을 억제하는 작용을 한다.

항생제 내성 및 선택배지 개발

프로바이오틱 유산균의 항생제 감수성을 조사하는 것은 항생제를 복용하는 환자에 대하여 적절한 유산균의 선택에 참고 자료로 활용될 수 있고 아울러 균주별 선택적 차별화에도 도움이 된다. 유산균은 원래 여러가지 항생제에 대해서 저항성을 가지고 있다. 그러나 이러한 항생제 저항성은 전이되지 않으며, 또한 유산균과 연계된 기회적 감염의 경우에도 임상적으로 사용되는 여러가지 항생제에 대해서 민감하기도 하다. 따라서 유산균의 이러한 고유의 항생제 저항성을 특별히 안전성과 관련지어 고려하지 않고 있는 실정이다.

그러나 최근에 종종 발생하고 있는 플라스미드와 연계된 항생제 저항성은 별개의 문제라고 할 수 있다. 왜냐하면 이러한 항생제 저항성이 다른 보다 유해한 균종과 균속으로 전이될 가능성이 있기 때문이다. 특히 플라스미드에 의한 전이가 가능한 *Enterococci*의 vancomycin 저항성은 특별히 주목해야 하는데, vancomycin은 몇몇 다중약제 저항성 병독원의 치료에 있어서 마지막으로 효과를 발휘하는 항생제로 남아있기 때문이다. 이러한 vancomycin은 glycopeptide 계통의 항생제에 속하며 peptidoglycan의 합성을 저해하는 작용을 한다. 여기서 peptidoglycan은 세균 세포벽의 중요한 구성 성분이기 때문에 Gram 양성균이 특히 vancomycin 처리에 치명적이다.

항돌연변이원성

발효유 제품과 유산균은 *in vitro* 조건에서 돌연변이 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 특히 비피더스균은 돌연변이 유발 물질인 trp-p-1, glu-p-1, IQ 등에 대한 흡착능을 보유한 것으로 밝혀졌다. 실제로 *Bifidobacterium bifidum*은 2-nitrofluorene과 NQO(4-nitroquinoline oxide)에 대한 돌연변이 억제능이 보고되어 있다. 따라서 돌연변이 억제능이 우수한 프로바이오틱 유산균을 선발하기 위해서 *Salmonella typhimurium* TA-98 균주를 이용한 Ames test 방법으로 돌연변이 억제 효과를 조사하여야 한다. 즉, preincubation test를 이용하여 돌연변이 억제 효과를 조사하는데, 돌연변이 유발 물질로는 S9 분획물을 필요로 하지 않는 direct mutagen인 NQO와 S9 분획물을 필요로 하는 indirect mutagen인 IQ를 사용한다. 한편 *Sal. typhimurium* reversion assay를 위해서 minimal glucose agar 평판배지에 균일하게 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 형성된 복귀 집락을 계수하여 돌연변이 억제능을 산정한다.

이와 같이 프로바이오틱 유산균과 발효유 제품은 *in vitro* 실험 결과 이미 알려진 화학적 돌연변이 유발 물질의 변이원성을 감소시키는 것으로 보고되어 있다. 또한 *in vivo* 실험 결과에서도 프로바이오틱 유산균이 돌연변이 유발 물질이나 발암 물질의 활성화와 관계된 분변 효소의 활성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 앞서 언급한 Nordic Project[40]의 주요

한 목적 중의 하나는 인공장관 체계(gastrointestinal tract model)를 이용하여 정상적인 식품에 존재하는 돌연변이 유발 물질에 대한 프로바이오틱 유산균의 예상되는 돌연변이 억제 특성을 비교 및 평가하는 것이다. 실험에 사용된 돌연변이 유발 물질로는 단백질이 풍부한 식품을 가열할 때 형성되어 높은 돌연변이원성을 가지는 IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP 등의 heterocyclic amine 혼합물을 사용하였다. 한편 인공장관 체계의 서로 다른 부분의 시료를 채취하여 *Sal. typhimurium*을 사용하여 대사 활성과 관계된 돌연변이원성을 평가하였다.

항암 및 항종양 활성

프로바이오틱 유산균은 종양에 대해서 활성을 나타내는 물질을 생성하는데, 이러한 프로바이오틱 유산균의 항종양 활성은 직접적인 종양 세포의 억제, nitrosamine 등의 장관 내의 발암 물질의 불활성화 및 nitrosamine의 합성에 관여하는 nitroreductase 등의 장내세균 효소의 활성 억제, 면역반응의 자극 및 증강, 그리고 예비적 발암물질을 발암물질로 변환시키는 β -glucuronidase, β -glucosidase, azoreductase 등의 장내세균 효소의 활성 억제 등에 기본을 두고 있다고 추정된다. 한편 유산균 세포벽의 peptidoglycan이나 polysaccharide 등이 돌연변이 유발물질을 강력하게 흡착하여 체외로 배설하기 때문에 유해물질의 작용을 억제할 수 있다.

면역 증강 효과

면역계는 macrophage, T cell 및 B cell 등의 다양한 면역세포의 상호 작용 및 이들이 생성하는 면역호르몬 cytokine의 유기적인 조절에 의해서 유해인자에 대한 방어 기능을 담당한다. 이들 면역계 중에서 macrophage는 항원을 인식하여 제거하기도 하며, 직접 또는 간접적으로 B cell의 조절 기능도 수행한다. 따라서 프로바이오틱 유산균이 macrophage의 활성화에 관여하는 양상을 조사하기 위해서는 프로바이오틱 유산균을 농도별로 처리하여 macrophage가 TNF(tumor necrosis factor)- α 와 IL(interleukin)-6 등의 면역호르몬 생성능에 미치는 영향을 조사하여야 한다[27,30]. GALT(gut associated lymphoid tissue)는 정착성 프로바이오틱 유산균과 오랫동안 접촉할 수 있으며 정착성은 면역 효과를 유발시키는 한가지 방법이다. 즉, 프로바이오틱 유산균의 정착성 및 서식능은 강력한 면역 증강 효과와 매우 밀접하게 연관되어 있다. 이러한 프로바이오틱 유산균의 면역 효과는 급성 장염, 대장 및 방광암에서 볼 수 있는 프로바이오틱 활성 효과와 깊은 관계를 맺고 있다. 따라서 유용한 면역 반응이 항후의 프로바이오틱 유산균 개발을 위해서 보다 더 연구될 필요성이 있다.

Nordic Project[40]에서는 프로바이오틱 유산균이 TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, TGF(transforming growth factor)- β , IFN(interferon)- α 등의 면역호르몬 생성능에 미치는 상호 작

용을 연구하였다. 더욱이 *in vitro* 조건의 인공장관 체계에서 프로바이오틱 유산균이 TNF- α 와 IL-6 등의 면역호르몬 생성을 유도하는 능력을 분석하였다. 주요한 연구 목적은 프로바이오틱 유산균이 *in vitro* 조건에서 면역호르몬을 생성하여 면역체계를 자극하는가의 여부를 규명하는 것이다. 실험 결과에 의하면 glutaraldehyde로 고정시키지 않은 균주는 농도 의존형 형태로 IFN- α 의 생성을 유도하였다. 그 결과 면역 유도제로 널리 알려진 LPS(lipopolysaccharide)보다도 강력한 억제 효과를 나타냈다. 반면에 IL-6 생성능은 상당히 변화무쌍함을 보여주었으며 실험에 사용된 균주는 IL-10을 유도하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 Gram 음성균의 LPS는 예비염증성 면역호르몬(proinflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-6의 생성을 유도하며 IL-10도 생성하는데, IL-10은 TNF- α 와 IL-6의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이들 면역호르몬은 세균의 서식 및 침입에 반응하여 숙주의 방어 기작에 공헌하지만 과도하게 분비되면 면역병리학적(immunopathological) 질환을 유발하게 된다.

장 점막은 유해성이 강한 식이성 항원과 미생물의 배출 및 제거에 있어서 중심적인 역할을 담당하며 영양소를 선택적으로 흡수한다[3,24]. 이러한 항원의 배출은 장 점막이 secretory IgA와 점질물을 생성하는 능력과 깊은 관계가 있는데, secretory IgA는 내부 항원이 장 점막 표면에 정착하는 것을 억제하며 점질물은 미생물의 침입을 억제한다. 한편 장내균총도 항원 배출에 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 상재성 균총은 영양소 및 정착 부위에 대한 상호 경쟁, 항미생물제의 생성, 또는 특정 항체 분비세포와 점질물 생성을 증가시켜 항원의 정착을 억제한다.

장내 정착성

프로바이오틱 유산균은 장내 유익균과 유해균 사이의 건강 균형을 유지하는 역할을 담당한다. 이러한 프로바이오틱 유산균의 유용 효과는 이들 프로바이오틱 유산균이 장내에 정착하여 증식 및 서식할 수 있을 때 효율적이다. 인체 장관에 최소한 일시적으로라도 서식할 수 있는 능력이 있어야 하는데 대부분의 프로바이오틱 유산균은 섭취 후 분변 중의 균수를 측정했을 때 일시적이거나 인체 장관에 서식하는 것으로 알려져 있다. 장내 세포벽에의 정착성은 인체 장관에 서식하기 위한 중요한 선결 조건으로서 프로바이오틱 유산균은 장내 세포 표면에 정착하므로써 장내에 서식하는 것으로 알려지고 있다 [20,21]. 따라서 프로바이오틱 유산균이 장내세포에 정착하는 능력은 프로바이오틱 유산균을 선발하는 기준의 하나로 설정되어 있다. 정착성은 프로바이오틱 유산균이 인체 장관에 서식하고 또한 장내 조건에서 생육할 수 있는 잠재력을 입증하는 것이다. 정착성은 또한 장 점질막 표면과의 상호 작용을 제공하여 국소적이거나 전신성 면역 효과를 매개하는 GALT와의 생물산업

접촉을 용이하게 한다. 따라서 단지 정착성이 있는 프로바이오틱 유산균만이 면역 효과를 유도할 수 있으며 장내 점질막 장벽을 안정화시킬 수 있는 것으로 생각되고 있다.

Nordic Project[40]에서는 *in vitro* 조건에서 Caco-2 model, 고정화된 fibronectin, basement membrane material 등을 이용하여 프로바이오틱 유산균의 정착성 연구가 수행되었다. 즉, 장내세포(Caco-2, intestine 407), 세포외 물질(Caco-2, intestine 407, fibronectin type, I, III, V collagen), basement membrane material(Matrigel, Laminin, Type IV Collagen) 등에 대한 프로바이오틱 유산균의 정착 특성을 비교하였다. 또한 *in vitro* 조건에서 인공장관 체계로부터 회수한 프로바이오틱 유산균의 정착 특성을 실험하였으며 프로바이오틱 유산균이 *Sal. typhimurium*과 *Yersinia enterocolitica* 등의 병원성 세균이 Caco-2 장내세포에 침입하는 것을 억제하는 능력도 연구하였다.

실험에 사용된 모든 프로바이오틱 유산균은 균주에 따라서 Caco-2 세포에의 정착성에 커다란 차이를 나타냈다. 이렇듯 새로운 프로바이오틱 유산균의 정착 잠재력과 상이한 정착 기작을 규명하기 위해서는 Caco-2 cell line 실험과 더불어 다른 실험 체계가 필요함을 알 수 있다. 한편 정착 체계는 프로바이오틱 유산균이 병원성 세균의 침입 억제에 대한 잠재력을 연구하는데 사용되고 있다. 프로바이오틱 유산균이 *Sal. typhimurium*의 침입에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과, 프로바이오틱 유산균에 따라서 매우 상이한 침입 억제 행동을 보이고 있는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 특성을 임상 환경과 연계된 방법으로 평가하기 위해서는 새로운 방법론이 필요하게 된다. 이렇듯 정착성 실험은 서로 다른 프로바이오틱 유산균의 서식능 잠재력에 있어서의 차이점을 명확하게 해주며 임상 자료와 연계되었을 때 향후의 프로바이오틱 유산균의 선발 및 방법론 개발의 기초 자료로 유용하게 사용할 수 있다.

현재 프로바이오틱 유산균의 생존성 및 서식능의 중요성에 대해서는 광범위한 논의가 지속되고 있다. 실제로 이러한 생존성 및 서식능은 프로바이오틱 유산균이 장관 내에서 살아 남아야만 목적하고 있는 여러가지 기능을 발휘하는데 있어서 필수적이다. 프로바이오틱 유산균이 장관에서 생존하여 서식하는 능력은 대부분이 분변 치료 중의 생균수를 측정하여 이루어지는데, 이러한 실험 방법만으로는 프로바이오틱 유산균의 장관 내에서의 생태학을 명백히 밝히는 데 충분하지 못하다. 따라서 대장의 상행, 횡행, 하행 결장 등의 여러 부위에서 대장경(colonoscopy)을 통하여 얻은 생체조직검사(biopsy)를 이용하여 프로바이오틱 유산균이 *in vivo* 조건에서도 인체 장 점막에 정착하는가의 여부를 동시에 규명하여야 한다.

안전성

유산균은 전통적으로 식품에 사용되어 왔기 때문에 오랜 세월동안 안전하다고 인지되어 왔다(GRAS, generally recognized

Table 5. Important studies for the safety assessment of probiotic lactic acid bacteria and other bacteria

Type of property studied	Safety factor to be assessed
Intrinsic properties of lactic acid bacteria	<ul style="list-style-type: none"> · Adhesion factors · Antibiotic resistance · Existence of plasmids and plasmid transfer potential · Harmful enzyme profiles
Metabolic products	<ul style="list-style-type: none"> · Concentration · Safety and other effects
Toxicity	<ul style="list-style-type: none"> · Acute and subacute effects of ingestion of large amounts of tested bacteria
Mucosal effects	<ul style="list-style-type: none"> · Adhesion · Invasion potential · Intestinal mucus degradation · Infectivity in immunocompromised animals(e.g. following lethal irradiation)
Dose-response effects	<ul style="list-style-type: none"> · Dose-response studies by oral administration in volunteers · Potential for side-effects
Clinical assessment	<ul style="list-style-type: none"> · Careful evaluation in healthy volunteers · Disease specific studies
Epidemiological studies	<ul style="list-style-type: none"> · Surveillance of large populations following introduction of new strains and products

as safe). 무엇보다도 프로바이오틱 유산균의 안전성이 가장 중요하다고 할 수 있다[34,35,37]. 이러한 유산균은 인간의 건강에 유용하며 안전하다고 생각되기 때문에 안전성 및 독성 연구가 요구되지 않았다. 그러나 유산균의 감염에 대한 임상연구 뿐만 아니라 새로 도입되는 균주에 의한 질병의 발병 가능성과 관련된 연구의 필요성이 증가되고 있다(Table 5). 이미 유럽에서는 새로운 식품으로서 프로바이오틱 유산균, prebiotics, 유전자 조작 세균 등을 사용하고자 할 때에는 안전성 측면에 대한 선결 조건으로서 급성 독성(acute toxicity)과 관련된 기초적인 조사 자료를 요구하고 있다[6,7,8,11,42,45]. 한편 프로바이오틱 유산균은 장내 점질성 glycoprotein을 분해하지 않아야 치료용으로 안전하게 사용할 수 있다[31,33, 38,39]. 또한 정착성 세균은 혈소판 응고 위험성을 증가시키는 것으로 의심받을 수 있는데 장내세균은 구강 위생이 불량하거나 장내 손상, 또는 외과적 수술에 의해서 혈류로 인입될 수 있다[16]. 이에 따라서 내피세포 표면에서 혈소판 응고나 혈소판과 fibrin의 clot formation에 참여하므로써 패혈증 징후를 나타내게 된다. 이것은 유산균의 peptide와 protein이 fibrinogen이나 fibronectin의 결합 부위를 간섭하기 때문인 것으로 추정된다.

맺음말

경제 발전 및 소득 수준의 향상에 따라서 소비자는 건강 지향적인 제품에 많은 관심을 가지게 되고 기능성 식품에 대한 요구성이 증가된다. 이러한 요구성은 새로운 생리활성 유산균에 대한 관심이 증가하는 경향으로 나타난다. 실제로 프로바이오틱 유산균의 생리적인 기능성과 효능은 균주에 따라서 커다

란 차이를 나타내기 때문에 우량균주를 선발하는 것이 연구의 성패에 커다란 영향을 미치게 된다. 지금까지 유용한 프로바이오틱 유산균을 선택하기 위해서 여러가지 선발 기준이 사용되고 있는데 여기에는 내산성, 내담즙성, 장내 세포에의 정착성 및 서식성, 분변에서의 검출능, 면역 증강능, 항돌연변이원성, 콜레스테롤 저하능, 항암 및 항종양 활성, 병원성 세균의 생육 억제능, 그리고 안전성 등이 포함된다[14,43].

최근 몇년 동안에 새로운 프로바이오틱 유산균의 분리와 개발에 커다란 관심을 가지게 되었다. 금세기 들어 프로바이오틱 유산균의 유용 효과가 제시되고 있지만 아직까지도 이러한 신뢰성을 뒷받침해 줄 수 있는 증거가 불충분한 실정이다. 향후 프로바이오틱 유산균 개발 기술은 기술 집약형 방식으로 전개될 것이고 이에 따라서 유제품 산업의 발효유, 유아식, 유산균 강화 우유류 제품, 의약품 제제, 건강보조식품, 축산용 사료 첨가제, 화장품 등에 광범위하게 응용될 수 있을 것이다. 그리고 이러한 기술과 밀접한 관련성을 가지고 있는 이들 제품의 세계 및 국내 시장 규모는 지속적인 수준으로 증가할 것으로 예상된다.

기능성 식품에 사용하기 위한 목적에 적합한 특정 형질을 신속하고 용이하게 동정하기 위해서는 새로운 프로바이오틱 유산균의 screening에 향상된 방법론이 필요하다[4,5]. 최근에는 새롭고 보다 효과적인 프로바이오틱 유산균의 개발과 임상 연구를 통한 생리활성 효과의 입증의 주요한 강조점으로 부각되고 있다(Table 6, 7). 최근에 수행된 북유럽 제국의 연구 계획은 새롭고 보다 효과적인 프로바이오틱 유산균의 개발에 있어서 현재까지 얻어진 결과와 향후의 계획에 대하여 설명하고 있다. 즉, 프로바이오틱 유산균의 선발, 인체 장내에의 정착성

Table 6. Researched effects of probiotic bacteria

Target health benefits	Suspected mechanism
Aid in lactose digestion	· Bacterial lactase acts on lactose in the small intestine
Resistance to enteric pathogens	· Adjuvant effect increasing antibody production · Systemic immune effect · Colonization resistance · Alteration of intestinal conditions to be less favorable for pathogenicity (eg. pH, SCFA, bacteriocins)
Anti-colon cancer effect	· Antimutagenic activity · Alteration of pro-cancerous enzymatic activity of colonic microbes · Stimulation of immune function · Influence on bile salt concentration
Small bowel bacterial overgrowth	· Lactobacilli influence activity of overgrowth flora, decreasing toxic metabolite production · Antibacterial characteristics
Immune system modulation	· Strengthening of non-specific and antigen-specific defense against infection and tumors · Adjuvant effect in antigen-specific immune responses · Regulating/influencing Th1/Th2 cells, production cytokines
Allergy	· Prevention of antigen translocation into blood stream
Blood lipids Heart disease	· Assimilation of cholesterol by bacterial cell · Alteration of activity of bile salt hydrolase enzyme · Antioxidative effect
Antihypertensive effect	· Bacterial peptidase action on milk protein results in antihypertensive tripeptides · Cell wall components act as ACE* inhibitors
Urogenital infections	· Adhesion to urinary and vaginal tract cells · Competitive exclusion · Inhibitor production(H ₂ O ₂ , biosurfactants)
Infection caused by <i>Helicobacter pylori</i>	· Competitive colonization
Hepatic encephalopathy	· Competitive exclusion or inhibition of urease-producing gut flora

*angiotensin converting enzyme

및 서식성, 면역 호르몬의 분비를 통한 면역 효과의 잠재력, 장관 모델 체계의 사용과 antigenotoxic 특성 등을 위한 새로운 방법론 등의 평가에 대한 자료가 포함되어 있다.

실제로 연속식 유동배양 장치를 이용하여 장내와 유사한 환경 조건을 설정함으로써 유산균의 다기능적인 생리활성 및 건강증진 효과를 파악하고 동물 실험 등의 *in vivo* 전단계 실험

Table 7. Requirements for good clinical studies of demonstration of unique probiotic properties for functional food use

- Extrapolation of data from closely related strains not acceptable
- Well-defined studies and well-designed clinical trials
- Double-blind : placebo controlled
- Randomized human studies
- Results confirmed by different groups
- Publication in peer-reviewed journals
- Each strain documented and tested independently, on its own merit

조건으로 대체 응용할 수 있다. 이러한 연속식 유동배양 장치의 기대 효과로서는 장내와 유사한 환경 하에서 유산균의 기능성을 보다 신속하고 간편하게 파악할 수 있으며, 실험동물 사용시의 오류 및 윤리적 문제의 해결이 가능하다는 것이다. 그의 인체 소장 및 대장과 유사한 조건 하에서 유익균과 유해균의 상호 작용에 따른 장내균총 변화의 검색, 유산균의 장내 정착성 검증 연구(cell line/matrix), 대사산물의 활성 연구, 내산성 및 내담즙성 실험, 항돌연변이능, 면역 증강능 및 면역 호르몬 생성능, 항종양 활성 및 항암 효과, 안전성 검증, 식이 성분의 용용성 및 투과성 연구 등이 가능하다. 또한 보다 향상된 특성을 가지는 프로바이오틱 유산균 개발이라는 측면에서 볼 때 유전학적인 연구는 절대적으로 중요하다. 따라서 프로바이오틱 유산균의 플라스미드의 특성을 파악하고 유전자 재조합 기술 등을 적용함으로써 유산균 균종 개량과 cloning vector 개발 등의 유전공학적인 접근이 가능해 질 것이다.

참고문헌

1. Aguirre, M. and M. D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.
2. Arai, S., T. Osawa, H. Ohigashi, M. Yoshikawa, S. Kaminogawa, M. Watanabe, T. Ogawa, K. Okubo, S. Watanabe, H. Nishino, K. Shinohara, T. Esashi, and T. Hirahara. 2001. A mainstay of functional food science in Japan - History, present status, and future outlook. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 1-13.
3. Brassart, D. and E. J. Schiffrin. 1997. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends. Food Sci. Technol.* **8**: 321-326.
4. Castellanos, M. I., A. Chauvet, A. Deschamps, and C. Barreau. 1996. PCR methods for identification and specific detection of probiotic lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.* **33**: 100-103.
5. Clydesdale, F. M. 1997. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr. Rev.* **55**: 413-422.
6. Donohue, D. C., M. Deighton, J. T. Ahokas, and S. Salminen. 1993. Toxicity of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria*. Eds. Salminen, S. and A. von Wright. pp. 307-313. Marcel Dekker Inc. New York.
7. Donohue, D. C. and S. Salminen. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **5**: 25-28.
8. Donohue, D. C., S. Salminen, and P. Marteau. 1998. Safety of probiotic bacteria. In : *Lactic Acid Bacteria*. pp.369-383. Ed. Salminen, S. and A. von Wright. Marcel Dekker Inc. New York.
9. Fuller, R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
10. Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut.* **32**: 439-442.
11. Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* **92**: 45-67.
12. Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**: 1401-1412.
13. Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Protect.* **42**: 164-167.
14. Goldin, B. R. 1998. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* **80(Suppl. 2)**: S203-S207.
15. Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. 1998. Prebiotics: A review of their effects on the intestinal flora and health benefits. *Gastroenterology International. 1st International Meeting on Intestinal Microflora.* **11(Suppl. 1)**: 1-3.
16. Harty, D. W. S., M. Patrikakis, E. B. H. Hume, H. J. Oakey, and K. W. Knox. 1993. The aggregation of human platelet by *Lactobacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2945-2951.
17. Havenaar, R. and J. H. J. Huis In't Veld. 1992. Probiotics: A general view. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. pp. 151-170. Ed. Wood, B. J. B. Elsevier Applied Science. London and New York.
18. Huis In't Veld, J. H. J. and R. Havenaar. 1991. Probiotics and health in man and animal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **51**: 562-567.
19. Huis In't Veld, J. H. J. and P. Marteau. 1997. The role of LAB in relation to human health: Progress over the last three years. In: *Actes du Colloque LACTIC 97. Lactic Acid Bacteria*. pp. 13-30. Caen. France.
20. Kirjavainen, P. V., A. C. Ouweland, E. Isolauri, and S. J. Salminen. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 185-189.
21. Lankaputhra, W. E. V. and N. P. Shah. 1998. Adherence of probiotic bacteria to human colonic cells. *Biosci. Microflora.* **17**: 105-113.
22. Lee, Y. K. and S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends. Food Sci. Technol.* **6**: 241-245.
23. Lilly, D. M. and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* **147**: 747-748.
24. Majamaa, H. and E. Isolauri. 1997. Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **99**: 179-185.
25. Marteau, P. and T. Vesa. 1998. Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents in humans. *Biosci. Microflora.* **17**: 1-6.
26. McCann, T., T. Egan, and G. H. Weber. 1996. Assay procedures for commercial probiotic cultures. *J. Food Protect.* **59**: 41-45.
27. Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Varkila. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* **64**: 5403-5405.
28. O'Sullivan, M. G., G. Thornton, G. C. O'Sullivan, and J. K. Collins. 1992. Probiotic bacteria: Myth or reality? *Trends. Food Sci. Technol.* **3**: 309-314.
29. Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health.* **29**: 4-8.
30. Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agueero, and N. Gobbato. 1995. Symposium: Probiotic bacteria for humans - Clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* **78**: 1597-1606.
31. Pessi, T., Y. Suetas, A. Martinen, and E. Isolauri. 1998. Probiotics reinforce mucosal degradation of antigens in rats: Implications for therapeutic use of probiotics. *J.*

- Nutr.* **128**: 2313-2318.
32. Reuter, G. 1997. Present and future of probiotics in Germany and in central Europe. *Biosci. Microflora.* **16**: 43-51.
 33. Ruseler-van Embden, J. G. H., L. M. C. van Lieshout, M. J. Gosselink, and P. Marteau. 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. J. Gastroenterol.* **30**: 675-680.
 34. Salminen, S. and M. Saxelin. 1996. Comparison of successful probiotic strains. *Nutr. Today Suppl.* **31**: 32S-34S.
 35. Salminen, S. and R. Tanaka. 1995. Annual review on cultured milks and probiotics. *IDF Nutr. Newsletter.* **4**: 47-50.
 36. Salminen, S. and R. Tanaka. 1996. Role of cultured and culture-containing dairy products and probiotic bacteria in health and disease. *IDF Nutr. Newsletter.* **5**: 32-34.
 37. Salminen, S. and A. von Wright. 1998. Current probiotics - Safety assured? *Microb. Ecol. Health. Dis.* **10**: 68-77.
 38. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen. 1996a. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek.* **70**: 347-358.
 39. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen. 1996b. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **5**: 53-56.
 40. Salminen, S., M. Laine, A. von Wright, J. Vuopio-Varkila, T. Korhonen, and T. Mattila-Sandholm. 1996c. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: A Nordic and European approach. *Biosci. Microflora.* **15**: 61-67.
 41. Salminen, S., A. C. Ouwehand, and E. Isolauri. 1998a. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **8**: 563-572.
 42. Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland, and T. Mattila-Sandholm. 1998b. Demonstration of safety of probiotics - A review. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 93-106.
 43. Salminen, S., C. Bouley, M. C. Boutron-Ruault, J. H. Cummings, A. Franck, G. R. Gibson, E. Isolauri, M. C. Moreau, M. Roberfroid, and I. Rowland. 1998c. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80(Suppl.1)**: S147-S171.
 44. Sanders, M. E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv. Food. Nutr. Res.* **37**: 67-130.
 45. Saxelin, M., H. Rautelin, S. Salminen, and P. H. Maekelae. 1996. Safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infect. Dis. Clin. Practise.* **5**: 331-335.
 46. Saxelin, M., S. Salminen, and E. Isolauri. 1998. Clinical efficacy of a human *Lactobacillus* strain as a probiotic. In: *Functional Foods: The Consumer, the Products, and the Evidence.* pp. 25-29. Ed. Sadler, M. J. and M. Saltmarsh. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
 47. Steer, T., H. Carpenter, K. Tuohy, and G. R. Gibson. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* **13**: 229-254.