

# Probiotic bifidobacteria의 건강 증진 작용과 산업적 이용

임광세  
(주)한국야쿠르트 중앙연구소

## Health Benefits of Probiotic Bifidobacteria and Their Industrial Application

K. S. Lim  
R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

### ABSTRACT

Bifidobacteria are normal inhabitants of the human gastrointestinal tract throughout life, starting just days after birth, and are one of several predominant species of the colonic microflora, along with *Peptostreptococcus*, *Eubacteria*, *Clostridia*, and *Bacteroides*. Bifidobacteria differ from lactic acid bacteria in that they produce not only lactic acid but also acetic acid as major fermentation products. The classification of bifidobacteria has changed numerous times since they were discovered in 1899 in the feces of breast-fed infants. Since 1994, three additional species have been included in the list (*B. lactis*, *B. inopinatum*, and *B. denticolens*), with a current total of 32 species. A variety of probiotic effects of bifidobacteria are currently being investigated. Research reports suggests several potential probiotic advantages, in particular antimicrobial effects, immuno-modulation, reduction of the cancer risk, and modulation of gastrointestinal flora. As technological challenges related to viability and enumeration are being overcome, milks fermented with these anaerobic microorganisms (alone or in combination with lactic acid bacteria) are more able to provide consistently satisfying with large numbers of viable microorganisms. Over 70 products containing bifidobacteria are currently offered around the world, including fermented milks, cheese, buttermilk, frozen desserts, candy, and pharmaceutical preparations

### I. 서론

Bifidobacteria는 1899년 파스퇴르 연구소의 Tissier에 의해서 모유 영양아의 분변에서 처음 분리되었으며, 인체의 정상 장내 균총 중에서 *Bacteroides*, *Eubacterium*에 이어서 3번째로 많은 부분을 차지하고 있다(Mitsuoka, 1978). 인체의 소화기관(gastrointestinal tracts)에는 400종 이상의 미생물이 존재하며 그 숫자는 약 100조에 이르는데, 이 미생물들은 상호 공생작용이나 길항작용을 하며 균형을 이루고 장내 균총을

형성한다(Mitsuoka, 2000). Bifidobacteria는 정상적인 장내 균총으로 출생 직후부터 일생동안 존재하며, 구강, 회장(ileum), 결장(colon), 질(vagina), 자궁경부(cervix) 등의 다양한 서식처(niche)에 분포한다. 또한 bifidobacteria는 *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* 등과 더불어 결장을 구성하는 균총의 우점종으로 이들 균총은 결장 내용물 1gram 당  $10^8 \sim 10^{11}$  수준으로 존재한다(Mitsuoka, 1978). 구강에서 발견되는 3종(*B. dentium*, *B. denticolens*, *B. inopinatum*)을 제외한 사람 유래 bifidobacteria, 특히 장내에서 유래된 종(species)은 장내 균총 정상화 등의 인체 유용작용을 한다. 이러한 장내 균총 유래 젖산

Corresponding author : K. S. Lim, R&D center, Korea Yakult Co., Ltd., Yong-in 449-901, Korea

균의 건강증진효과가 밝혀지면서 식품산업 뿐만 아니라 정장제 등의 제약산업에서도 bifidobacteria의 사용예가 늘어나고 있다.

많은 연구자에 의해서 probiotics에 대한 선발기준이 제시되었고, 이 선발기준에 따라 엄격하게 선발된 젖산균만이 섭취시에 인체내에서 다양한 유용작용을 기대할 수 있다(Collins 등, 1998). 인체에 사용할 probiotics인 경우 숙주 특이성이나 섭취시 장내 정착성 등을 고려할 때 인체에서 분리한 균종을 사용해야 하며(Huis in't Veld 등, 1994), 이미 경험적으로 안전성이 확보된 GRAS(Generally Regarded As Safe) 상태의 비병원성 균주를 사용해야 한다. 또한 섭취시 목적하는 소화기관에 도달하여 그 성능을 발휘하기 위해서는 위산과 같은 소화액과 담즙산 등에 저항성이 있는 균주를 사용해야 한다. 그리고 상업적 이용을 고려할 때 제조공정이나 완제품 유통과정중의 사용 균주의 생존력이나 활력 역시 중요한 선발기준이 되며, 생산비용이 저렴한 중균용 배지에서 증식이 용이한 것 역시 중요한 고려대상이 된다(Collins 등, 1998).

본 논문에서는 인체에서 유래한 probiotic 젖산균 중에서 bifidobacteria의 특성과 섭취시의 인체 유용 효과 및 산업적 이용에 관하여 고찰하였다.

## II. Bifidobacteria

### 1. Bifidobacteria의 분류

Bifidobacteria는 Tissier(1899)에 의해서 유아의 분변에서 처음 분리되어 *Bacillus bifidus communis*로 명명되었으며, Gram 양성, 간상형의 절대 혐기성 균으로 배양조건이나 영양상태에 따라서 가지형, Y자, V자, 만곡, 곤봉, 아령 등의 다양한 형태를 보이며(Bezkorovainy와 Miller-Catchpole, 1989), 모유를 먹고 자라는 유아의 장내에 우점하는 젖산균이다. 처음 분리된 이후에 분류학상 많은 변화를 거치면서 *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* 등의 다양한 속에 포함되다가 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(Rogosa, 1974) 8판에서 최종적으로 11종이 포함된 독립된 속(genus)으로 인정되었다. 미생물 분리와 배양기술 등의 발달로 인해 최근에 다양한 서

식처(habitat)로부터 새로운 종들이 발견되었으며, *B. denticolens*(Crociani 등, 1996), *B. inopinatum*(Crociani 등, 1996), *B. lactis*(Meile 등, 1997)를 포함해서 현재까지 32종이 보고되었다(Table 1).

Bifidobacteria는 생태학적으로 크게 사람(성인과 유아의 장, 질, 구강), 동물, 곤충, 오·폐수(sewage) 등에서 분리되는데, 성인의 장내에서는 *B. pseudocatenuatum*과 *B. longum*이 주종을 이루며, 구강에서는 치태(dental plaque) 형성에 관련 있는 것으로 보여지는 *B. dentium*이 주로 분리된다. 동물에서는 토끼, 닭, 쥐, 돼지, 소 등의 분변에서 분리되는데, 일부 종에서는 숙주 특이성(host specific)이 관찰된다. 즉, *B. magnum*과 *B. cuniculi*는 토끼의 분변에서, *B. pollorum*과 *B. gallinarum*은 닭의 장내에서, *B. suis*는 돼지의 분변에서만 발견된다. 또한 *B. asteroides*는 *Apis mellifera*의 장에서, *B. indicum*는 *Apis cerana*와 *Apis dorsata*의 장에서만 발견된다. Bifidobacteria가 발견된 초기에는 이 혐기성 젖산균은 장에만 존재한다고 생각되어 왔으나, 현재까지 발견된 32종 중에서 12종은 오·폐수에서도 분리되며 이 중에서 *B. minimum*과 *B. subtilis*는 다른 곳에서는 발견되지 않는다고 보고되었다.

### 2. Bifidobacteria의 동정

#### 1) Genus 수준의 동정

Bifidobacteria가 분리된 시대에는 전적으로 미생물의 외형적인 차이에 의한 분류가 이루어 졌다. 이러한 애매 모호한 분류 방법 때문에 많은 부분에서 bifidobacteria와 유사한 생리적 특성과 배양특성을 가지고 있는 *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*와 같은 미생물과 구별되어 독립된 genus로 인정 받기까지는 많은 논쟁이 있었다. 비록 형태학적 특성이 genus를 구별하는 데는 별 도움이 되지 않으나, 종을 구별할 경우에는 bifidobacteria의 독특한 형태적 특성이 도움이 된다. Bifidobacteria를 다른 속과 구별하는 가장 직접적이고 정확한 방법은 bifidobacteria만이 보유하고 있는 fructose-6-phosphate phosphoketolase(F6PPK, EC 4.1.2.22)의 존재 여부를 측정하는 것이다(Scardovi와 Trovatelli, 1965). 그 외에 bifidobacteria의 특성은 Table 2와 같다.

Table 1. Type strains and habitat of *Bifidobacterium* species

Species	Type strain	Habitats
<i>B. adolescentis</i>	15703 <sup>a</sup>	Feces of adult, bovine rumen, sewage
<i>B. angulatum</i>	27535	Feces of adult, sewage
<i>B. animalis</i>	25527	Feces of calf, chicken, guinea pig, rabbit, rat, sewage
<i>B. asteroides</i>	25910	Intestine of <i>Apis mellifera</i> and <i>Apis cerana</i>
<i>B. bifidum</i>	29521	Feces of adult and infant, suckling calf, human vagina
<i>B. boum</i>	27917	Bovine rumen, feces of piglet
<i>B. breve</i>	15700	Feces of infants, suckling calf, human vagina, sewage
<i>B. catenulatum</i>	27539	Feces of infant and adult, human vagina, sewage
<i>B. choerinum</i>	27686	Feces of piglet, sewage
<i>B. coryneforme</i>	25911	Intestine of <i>Apis mellifera</i> subsp. <i>mellifera</i>
<i>B. cuniculi</i>	27916	Feces of rabbit
<i>B. denticolens</i>	DSM10105 <sup>b</sup>	Human dental caries and oral cavities
<i>B. dentium</i>	27534	Human dental caries and oral cavities, feces of adult, human vagina, human clinical samples
<i>B. gallicum</i>	DSM20093	Feces of human
<i>B. gallinarum</i>	33777	Chicken caeca
<i>B. globosum</i>	25865	Feces of piglet, suckling calf, rat, rabbit, lamb, bovine rumen, sewage
<i>B. indicum</i>	25912	Intestine of <i>Apis cerana</i> and <i>Apis dorsata</i>
<i>B. infantis</i>	15697	Feces of infant, human vagina, suckling calf
<i>B. inopinatum</i>	DSM10107	Human dental caries
<i>B. lactis</i>	DSM10140	Fermented milk
<i>B. longum</i>	15707	Feces of adult and infant, human vagina, suckling calf, sewage
<i>B. magnum</i>	27540	Feces of rabbit
<i>B. merycicum</i>	49391	Bovine rumen
<i>B. minimum</i>	27538	Sewage
<i>B. pseudocatenulatum</i>	27919	Feces of adult and infant, suckling calf, sewage
<i>B. pseudolongum</i>	25526	Feces of pig, chicken, dog, bull, rat, guinea pig
<i>B. pollorum</i>	27685	Feces of chicken
<i>B. ruminatum</i>	49390	Rumen of cattle
<i>B. saeculare</i>	49392	Feces of rabbit
<i>B. subtile</i>	27537	Sewage
<i>B. suis</i>	27533	Feces of piglet
<i>B. thermophilum</i>	25525	Feces of pig, chicken, suckling calf, bovine rumen, sewage

<sup>a</sup>American Type Culture Collection (ATCC)

<sup>b</sup>Deutsche Sammlung für Mikro-organismen (DSM)

## 2) Species 수준의 동정

*Bifidobacteria*의 경우 중에 따라서 가지를 친 위치나 수, 세포의 형태나 굴곡 정도, 세포의 면적 등의 형태학적 특성이 다르기 때문에 이러한 형태학적 특성이 종을 구별하는 한가지 방법으로 사용되기도 한다. 또한 Scardovi(1981)는 DNA의 G+C contents와 inter-specific DNA homology의 수치에 의해서 일부 종의 동정이 가능하다고 보고하였다. DNA-DNA hybridization에 의

한 동정이 신뢰도가 높은 동정 방법 중에 하나이기는 하나, 일반적인 실험실에서 통상적으로 수행하기에는 어려움이 있어서 아직까지는 탄수화물의 이용성을 이용한 발효시험이 분리 균주를 동정하거나 새로운 종을 결정하는데 유용한 도구로 사용되고 있다. Mitusoka (1984)와 Scardovi(1986)는 다양한 종류의 탄수화물을 사용하여 당 발효실험을 실시하고 그 결과를 토대로 동정 기준표를 제시하였다. 당 발효실험은 실험 방법

Table 2. Differentiating characteristics of the genus *Bifidobacterium*(Rasic and Kurmann, 1983)

Morphology :	Non-spore forming and non motile bacteria. Rods variable in appearance. Freshly isolated strains have uniform or branched, bifurcated Y and V shapes, and spatulate or club shapes. On subculture: straight or curved rods. Gram-positive but often stain irregularly. Methylene blue may stain internal granules, but not the entire cell.
Physiology :	Anaerobic.
Biochemical characters :	Major products of glucose fermentation: acetic and L(+)-lactic acids in a molar ratio of 3:2. Non-acid-fast. Gas(CO <sub>2</sub> ) not produced from glucose. Catalase negative, nitrate reduction, formation of indole, and liquefaction of gelatin negative. Acid not produced from rhamnose, sorbose, adonitol, dulcitol, erythritol, and glycerol.
Cell wall composition :	The cell-wall peptidoglycan is not uniform. The basic amino acid in the tetrapeptide can be either ornithine or lysine; there are various types of cross-linkage(single amino acid residue or peptide).
Phospholipid composition :	Specific phospholipids: polyglycerolphospholipid and its lyso-derivates, alanyl phosphatidylglycerol, and lyso-derivates of diphosphatidylglycerol.
DNA-base composition :	Guanine plus cytosine (G+C) content: 57.2 ~ 64.5 moles%.

이 비교적 단순하다는 장점이 있기는 하지만 30여종의 탄수화물에 대한 발효실험을 수행해야 하고 그 실험기간 역시 10일 정도 소요되는 단점과 실험결과가 불분명할 경우에 동정 기준에 대한 논란의 여지가 있다.

최근에는 분자생물학적 기술이 도입되어 DNA-DNA hybridization, pulsed field gel electrophoresis(PFGE), randomly amplified polymorphic DNA profiles(RAPD) 등의 유전학적 방법에 의한 미생물의 동정이 가능하게 되었고, 16S rRNA gene을 이용하거나, amplified

ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA)를 이용한 동정 방법도 제시되고 있다.

### III. Probiotics

#### 1. Selection criteria

Probiotics로 사용할 젓산균을 선발할 때는 안전성(safety), 기능적인 측면(생존력, 부착능, 정착성, 항균물질 생성능, 면역력 강화능, 유해균 억제능 등), 기술적인

Table 3. Selection criteria for probiotic microorganisms(Ouwehand *et al.*, 1999)

Probiotic strain properties	Remarks
Human origin, if intended for human use	May be important for species-dependent health effects although, for example, the human probiotic <i>Saccharomyces boulardii</i> is not of human origin.
Acid and bile stability	Important for oral administration, may not be relevant for other application; for survival through the intestine, retaining cell integrity, maintaining adhesiveness and metabolic activity.
Adhesion to mucosal surfaces	Immune modulation, competitive exclusion of pathogens, prevention of pathogen adhesion, transient colonization (?)
Safe for food and clinical use	Accurate strain identification and characterization. Documented safety. No degradation of intestinal mucus. No invasion.
Clinically validated and documented health effects	Dose-response data for minimum effective dosage for each particular strain and in different products. Double blind, placebo-controlled, randomized studies.
Good technological properties	Strain stability, phage resistance, survival in product (if viable organisms are required), culturable at large scale, no negative effect on product flavor, oxygen resistance.

Table 4. Selection criteria for probiotic strains(Klaenhammer and Kullen, 1999)

---

<i>Appropriateness</i>	
Accurate taxonomic identification	
Normal inhabitant of the species targeted: human origin for human probiotics	
Nontoxic, nonpathogenic, GRAS status	
<i>Technological suitability</i>	
Amenable to mass production and storage: adequate growth, recovery, concentration, freezing, dehydration, storage, and distribution	
Viability at high populations (preferred at $10^6 - 10^8$ )	
Stability of desired characteristics during culture preparation, storage, and delivery	
Provides desirable organoleptic qualities (or no undesirable qualities) when included in foods or fermentation processes	
Genetically stable and amendable	
<i>Competitiveness</i>	
Capable of survival, proliferation, and metabolic activity at the target site <i>in vivo</i>	
Resistant to bile and acid	
Able to compete with the normal microflora, including the same or closely related species:	
potentially resistant to bacteriocins, acid, and other antimicrobials produced by residing microflora	
Adherence and colonization potential preferred	
<i>Performance and functionality</i>	
Able to exert one or more clinically documented health benefits	
Antagonistic toward pathogenic/carcinogenic bacteria	
Production of antimicrobial substances (bacteriocins, hydrogen peroxide, organic acids, or other inhibitory compounds)	
Immunostimulatory	
Antimutagenic and anticarcinogenic	
Production of bioactive compounds (enzymes, vaccines, peptides)	

---

측면(우유에서의 성장, 관능적 특성, 생산공정 및 유통 중의 안정성과 생존력 등)을 고려해야 한다(Holzapfel 과 Schillinger, 2002).

Ouwehand 등(1999)은 probiotics의 선발기준과 성공적인 probiotics 균주가 갖추어야 할 특성을 Table 3과 같이 제안하였다. 또한 Klaenhammer와 Kullen(1999)은 4가지로 구분되는 probiotics 선발기준을 제시하였다(Table 4).

우수한 probiotics가 갖추어야 할 자격에 대하여 많은 학자들이 다양한 조건을 제시하였지만, 이 모든 조건을 충족해야 하는 것은 아니다. 많은 선발 기준이 그 동안 미생물을 분리, 배양하면서 얻어진 많은 경험에 의하여 설정된 것으로서, 이러한 선발기준에 의해서 엄격히 선발된 probiotics가 실제로 섭취 후에 체내에서 동일한 작용을 하는 가에는 아직 논란의 여지가 많다.

## 2. Probiotic bacteria

인체의 장관내에 서식하는 수많은 미생물 중에서 인체에 유용한 작용을 하는 probiotics로 사용 가능한 균종에는 Table 5에서 보는 바와 같이 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* 등이 포함된다(Holzapfel 등, 1998). Probiotics로 분류된 젖산균 중에서 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostocs*, *Lactococcus* 등은 장내에서 발견되는 균종은 아니지만 발효유 제조시 starter로 사용된다. 그러나 이들 젖산균은 장내에서 정착이 어렵기 때문에 실제로 섭취했을 경우에 유용작용을 기대하기 어렵다(Alm, 1991). 또한 probiotics중에서 젖산균이 아닌 균종은 발효유나 식품보다는 분말이나 encapsulation 된 형태로 제약용으로 주로 사용된다(Holzapfel 등, 1998).

Table 5. Microorganisms applied in probiotic products(Holzappel *et al.*, 1998)

<i>Bifidobacterium</i> species	<i>Lactobacillus</i> species	Other LAB
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>a</sup>
<i>B. animalis</i>	<i>L. brevis</i> <sup>a</sup>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>B. breve</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>B. infantis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>B. lactis</i>	<i>L. gallinarum</i> <sup>b</sup>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	<i>L. gasserii</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>B. pseudolongum</i> <sup>a</sup>	<i>L. johnsonii</i>	
<i>B. thermophilum</i> <sup>a</sup>	<i>L. paracasei</i>	
	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. reuteri</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	
	<i>L. sporogenes</i> <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Mainly use for animals

<sup>b</sup>Mainly as pharmaceutical preparations

### 3. 안전성

기능성 식품이나 제약용으로 사용되는 probiotic 젖산균의 안전성은 매우 중요한데, 일반적으로 젖산균은 안전한 것으로 알려져 있고, 섭취시에 심각한 문제가 발생한 보고가 없었다. 그러나, 최근에 여러 종류의 감염부위에서 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*의 일부 종이 분리되었다. Gasser(1994)에 의하면, bacterial endocarditis 환자 (lactobacilli의 일부 종과 *Leuc. mesenteroides*), blood stream infections 환자(*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*, *Pediococcus acidilactili*, *B. dentium*, *B. adolescentis*) 등에서 많은 종류의 젖산균이 분리되었다고 보고하였다. 또한, Aquirre와 Collins(1993)도 감염부위에서 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*를 분리하였다고 보고하였고, Brook(1996)은 유아 염증 환자로부터 *B. dentium*과 *B. adolescentis* 및 수종의 *Lactobacillus*를 분리하였다고 보고하였다. 이러한 병원성 젖산균에 대한 보고는 probiotic 젖산균에 대한 안전성 논쟁을 야기 했으나, 젖산균의 안전성에 대한 European Union workshop에서 많은 연구결과를 토대로 검토한 결과, enterococci를 제외한 젖산균의 감염 위험은 매우 낮은 것으로 결론 내려졌다(Adams와 Marteau, 1995). 물론 젖산균은 인류가 오랜 기간 동안 안전하게 섭취해 왔으나, 실제

로 일부 감염 부위에서 젖산균이 발견됨에 따라 상업적으로 사용되는 젖산균에 대한 안전성 확보는 더욱 중요해졌다.

## IV. Bifidobacteria의 인체 유용 작용

Probiotics의 건강증진 효과에 대한 많은 실험결과가 보고되고 있지만, 아직까지 유용작용에 대한 정확한 기작은 완전히 밝혀지지 않은 상태이다. 장내 젖산균인 bifidobacteria 역시 probiotics로 인정되어 발효유를 비롯한 다양한 제품에 사용되고 있으며(Schaafsma, 1996), 충분한 수의 bifidobacteria를 섭취해야만 인체 유용작용을 기대할 수 있는데, 일반적으로 최소한 생균의 형태로 제품 1gram당  $10^6 \sim 10^7$  수준이 함유되어야 한다고 보고되고 있다(Berrada 등, 1991; Bouhnik, 1993).

### 1. 정상 작용(Modulation of gastrointestinal flora)

Bifidobacteria를 포함한 젖산균은 주로 발효유의 형태로 섭취되어 구강을 통해 인체로 유입된 후 소화장기에 도달하여 정상적인 장내 균총에 영향을 준다. 인체의 소화장기에 서식하는 장내 균총은 400종이 넘는 미생물로 구성된 매우 복잡한 생태계로서 개인마다 매우 다양한 균총을 형성하고 있지만, 전체적으로 보면 건강

Table 6. Factors affecting the microflora of the gastrointestinal tract( Holzapfel *et al.*, 1998)

---

<i>Host mediated factors</i>	
pH, secretion such as immunoglobulins, bile, salts, enzymes	
Motility, e.g., speed, peristalsis	
Physiology, e.g., compartmentalization	
Exfoliated cells, mucins, tissue exudates	
 <i>Microbial factors</i>	
Adhesion	
Motility	
Nutritional flexibility	
Spore, capsules, enzymes, antimicrobial components	
Generation time	
 <i>Microbial interaction</i>	
Synergy : Metabolic cooperation	
Growth factors and vitamin excretion	
Changes to $E_h$ , pH, $O_2$ tension	
Antagonism/stimulation : Short-chain fatty acids, amines	
Changes to $E_h$ , pH, $O_2$ tension	
Antimicrobial components, siderophores	
Nutritional requirements, etc.	
 <i>Diet</i>	
Composition, non-digestible fibers, drug, etc.	

---

한 성인의 경우 장내 균총을 구성하는 미생물의 종과 그 숫자는 일정한 수준을 유지하고 있다(Mitsuoka, 2000).

그러나 장내 균총의 안정 상태는 Table 6에 요약된 것과 같은 여러가지 요인에 의해서 영향을 받는데 (Holzapfel 등, 1998), 그 영향 요인에는 숙주의 생리적 변화(노화, 스트레스, 건강 상태, 심리 상태)나 식이 상태, 환경적인 요인(세균 감염, 약 복용) 등이 있다. 따라서 이러한 요인들에 의해서 소화력(pH, substrate availability, redox potential, transit time, flow of enteric fluid, IgA secretion 등)의 변화가 초래되어 장내 유익균은 감소하고, 유해균이 증가하게 된다. 일반적으로 식사의 변화, 기후, 노화, 약물 치료, 질병, 스트레스나 염증 등의 요인에 의해서 소장내 서식하는 혐기성균과 *E. coli*가 증가하며 결장에 서식하는 Enterobacteriaceae와 streptococci의 증가는 bifidobacteria의 감소를 유발시킨다(Mitsuoka, 1990, 1992).

Bifidobacteria가 함유된 발효유를 섭취하면서 분변의 미생물을 분석한 결과, 발효유 섭취에 의해서 장내 균총의 변화가 발생하여 일시적이기는 하나 분변에서

bifidobacteria의 수가 20 ~ 8000배 가량 증가하였으며 (Benno와 Mitsuoka, 1992; Bouhnik 등, 1993), 분변의 총 균수에는 변화가 없었지만 bifidobacteria의 상대적인 비율이 증가하고 bacteroides와 clostridia의 비율이 감소하였다고 보고하였고, 실험 후반부에는 분변의 pH가 현저히 떨어진다고 하였다. Benno와 Mitsuoka(1992)는 label된 bifidobacteria를 이용하여 실험한 결과 분변에서의 bifidobacteria 증가는 섭취된 bifidobacteria에 의한 것이라고 보고한 반면, Bouhnik 등(1993)은 이러한 증가가 implantation에 의한 것이라고 보고하였다.

Bifidobacteria에 의한 장내 균총 변화는 아직 정확한 기작이 밝혀지지 않았으나, 주로 대사과정 중에 생산하는 젖산과 초산과 같은 유기산에 의한 병원성 세균과 부패성 세균의 억제에 의한 것이라고 생각된다 (Yasui 등, 1992). Bifidobacteria의 항균 작용이 다른 젖산균에 비하여 강하게 나타나는 것은 bifidobacteria가 생산하는 초산이 젖산에 비하여 같은 pH 조건에서 세균 억제력(bacteriostatic activity)이 더 강하기 때문이다.

## 2. 변비 개선 및 예방

변비(constipation)는 주 1 ~ 3회 이하의 배변 습관이 있는 경우를 말하며, 배변시 통증이나 불쾌감, 복부 팽창, 배변 후 잔변감 등의 증상을 나타낸다. 또한 변비 증상이 있는 경우에는 음식물의 장 통과 시간이 길어진다. 변비의 주요 원인은 섬유소 함량이 낮거나 gluten이 함유되지 않은 식사와 같은 부적절한 식이에 의한 것이 가장 크며, 이 경우 결장(colon)의 균총이 변하기도 한다. 변비 증상은 prebiotics나 probiotic 젖산균이 함유된 식사를 통하여 예방과 개선이 될 수 있다 (Cummings, 1994).

노년층에서 발생하는 가벼운 변비증상은 bifidobacteria가 함유된 발효유의 섭취에 의해서 개선이 가능하다(Seki 등, 1978). 또한 Grimaud 등(1992)은 bifidobacteria가 함유된 발효유 섭취에 의해서 장 운동 운동이 촉진되어 음식물의 장내 체류시간이 짧아지며, 이러한 효과는 전통적인 발효유 starter인 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *S. thermophilus*로만 제조한 발효유에서는 관찰되지 않고 특이적으로 bifidobacteria가 함유된 경우에만 장 운동이 촉진되어 나타난다고 보고하였다.

## 3. 설사 예방 및 개선

설사는 전세계적으로 큰 관심을 갖는 중요한 건강 문제의 하나로, 장내 질환은 주로 미생물이나 바이러스가 오염된 식품이나 물을 섭취하거나 청결하지 못한 위생 상태에서 주로 발생한다(Claeson과 Merson, 1990). 유아와 소아의 경우 설사가 발생하기 매우 쉬우며 그에 대한 후유증 역시 심각하다. 장염(gastroenteritis)은 주로 rotavirus, *Escherichia coli*와 *Campylobacter* 등과 같은 pathogen에 의해서 발생한다(Salminen과 Deighton, 1992).

젖산균 중 일부는 세균성 설사의 예방과 치료에 효과가 있다고 보고되었는데, 이는 젖산균에 의한 장내 환경 변화와 pathogen에 대한 억제작용(Halpern 등, 1991; Grimaud 등, 1992)과 bacteriocin과 같은 젖산균이 생성하는 항균물질(Salminen과 Deighton, 1992)에 의한 것이었다.

Saavedra 등(1994)은 17개월 동안 설사로 인해서 병

원에 입원한 55명의 유아(5 ~ 24 개월)를 대상으로 젖산균의 효과에 대한 실험을 수행하였다. 그들은 *B. bifidum*과 *S. thermophilus*가 함유된 식이에 의한 acute diarrhoeal episodes와 rotaviral shedding에 대한 예방 효과에 대해서 측정하였는데, 젖산균이 함유된 식이를 급여한 실험군(29명)이 젖산균을 섭취하지 않은 대조군(26명)에 비하여 설사 증세가 현저히 호전되는 것을 발견하였으며(6.9% vs. 31%), 이외에 항생제에 의한 설사나 traveler's diarrhea에 bifidobacteria가 일부 효과가 있다고 보고되었다.

## 4. Pathogen에 대한 항균 작용

Bifidobacteria를 포함한 probiotic 젖산균은 *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. 등을 포함한 식중독 미생물에 억제 작용이 있다고 보고되었으며(Gibson과 Wang, 1994; Misra와 Kuila, 1995; Bielecka 등, 1998), pathogen에 대한 억제 기작은 다음과 같다.

- ◆ 항균 물질이나 억제 물질의 생산: 유기산, hydrogen peroxide, bacteriocins, 항생제, deconjugated bile acids
- ◆ Pathogen에 대한 길항작용: adhesion sites나 영양소에 대한 경쟁
- ◆ 면역체계 자극

젖산균에 의해서 생성된 유기산은 장내 pH를 낮추고, 장의 산화환원 전위를 변화시켜서 항균 작용을 한다. 장내의 제한된 산소 농도와 더불어 유기산은 주로 대장균과 같은 병원성 Gram 음성균을 억제한다. 특히 bifidobacteria는 유기산으로 젖산과 초산을 생성하는데, 젖산보다 상대적으로 많은 양이 생성되는 초산의 경우 젖산에 비해 강력한 억제 효과를 나타내며(Rasic, 1983), probiotic 젖산균은 장관내에서 필수 영양소나 adhesion sites에 대하여 외부에서 유입된 pathogen과 경쟁관계를 나타내거나, 항균물질 등의 생산으로 인하여 장내 환경을 pathogen의 생장에 적당하지 않은 상태로 전환시키는 등의 작용을 통하여 pathogen의 장내 정



착을 예방한다.

### 5. Immuno-modulating 작용

발효유 제조에 사용되는 starter는 항원의 역할을 하여 숙주의 면역체계를 자극하나, 장내 정착이 가능한 젖산균은 외부 유입균에 비해 면역 자극능이 덜 하다. 여러 종류의 장내 미생물의 생균과 사균의 혼합물을 germ-free mouse에 주입한 결과 단일 균주 일 때 보다 immunoglobulin A (IgA) plasmacytes의 장내 생산이 훨씬 증가하였으며, 섭취된 젖산균에 의한 면역체계의 첫 반응은 gut associated lymphoid tissue(GALT)에서 시작된다고 보고하였다(Perdigon과 Alvarez, 1992).

Yamazaki 등(1985)은 *B. longum*을 투여한 germ-free mouse에 *E. coli*가 감염된 경우, 생존율이 증가하였고 cell-mediated immunity가 나타났으며 anti-*B. longum* IgA의 생성을 보고하였다. 따라서 다량의 bifidobacteria가 함유된 발효유를 섭취할 경우 인체내에서도 면역반응이 유발된다고 판단된다. Link-Amster 등(1994)은 독성이 약화된 *Salmonella typhi*를 주입한 사람에게 bifidobacteria와 *L. acidophilus*가 함유된 발효유를 섭취시킨 경우 발효유를 먹지 않은 사람에 비하여 혈액내의 humoral IgA의 반응이 현저히 증가하였다고 보고하였다. 또한, Schiffrin 등(1995)은 *B. bifidum*이 첨가된 발효유를 섭취한 경우 *E. coli*에 대한 대식작용이 증가하였으며, 그 증가 폭은 *L. acidophilus* 만을 함유한 발효유를 먹인 경우보다 크다고 보고하였다.

### 6. 항암 작용(Anti-tumor activity)

젖산균에 의한 암 억제 작용은 아직 그 기작이 정확히 알려져 있지는 않으나 다음과 같은 기작이 포함된다고 보고되었다(McIntosh, 1996; Hirayama와 Rafter, 2000).

- ◆ 숙주의 면역 반응 강화
- ◆ 발암물질과의 결합 및 분해
- ◆ 발암물질과 발암 촉진 물질을 생산 하는 장내 미생물의 억제
- ◆ 장내 미생물의 대사 활동의 변화

- ◆ 결장(colon)의 생리화학적 환경 변화
- ◆ 숙주에 대한 생리적 영향

결장에 서식하는 미생물 중에는 결장암과 관련 있는 균주들이 있으며, procarcinogen을 carcinogen으로 전환시키는  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase, nitroreductase, urease와 같은 미생물이 분비하는 효소가 여기에 관여한다.

Kurmann과 Rasic(1991)은 실험동물을 이용하여 몇 종의 bifidobacteria가 procarcinogen을 활성화 시키는 유해효소의 농도를 낮추어 궁극적으로는 종양 발생 위험을 줄일 수 있다고 보고하였다. 이와 유사한 실험이 사람을 대상으로 실시되어 유해효소의 활성을 낮추고 분변에서의 mutagenicity를 감소 시킨다고 보고되었다(Marteau와 Rambaud, 1993; Hosoda 등, 1996). 이러한 결과는 섭취한 probiotic 젖산균에 의해서 장내 균총이 유익한 방향으로 변하기 때문이라고 판단된다.

Bifidobacteria의 종양 억제 기작은 polymorphonuclear leucocytes, macrophage,  $\gamma$ -interferon 생산 조절을 통한 natural killer cells 등과 같은 non-specific cellular factor의 활성화에 의한 것으로,  $\gamma$ -interferon은 항 바이러스와 증식억제효과가 있다고 보고되었다. 또한, 구강을 통하여 섭취된 bifidobacteria는 IgA 항체의 생산과 Peyer's patch cell의 기능을 증가시키는 역할을 한다고 보고되었다. 그러나 모든 bifidobacteria와 *L. acidophilus*가 면역 증강 효과가 있는 것이 아니며, 같은 종 중에서도 strain에 따라 매우 상이한 결과가 나타난다.

구강으로 섭취된 젖산균은 발암물질에 의한 DNA 손상을 줄일 수 있다고 보고되었는데, Pool-Zobel 등(1996)은 comet assay를 통한 실험에서 *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *S. thermophilus*, *B. breve*, *B. longum*과 같은 젖산균이 N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)와 1,2-dimethylhydrazine (DMH)에 의한 유전자 손상(genotoxicity)을 줄일 수 있다고 보고하였다.

아직까지는 발효유 섭취와 결장암 발생 빈도에 대하여 임상학적으로 많은 연구가 진행되지는 못했지만, lactobacilli나 bifidobacteria가 함유된 발효유제품을 다량 섭취할 경우 결장암의 발생을 낮출 수 있다는 가

능성도 제시되고 있다. Malhotra(1977)는 Finland 지역에서 수행한 역학조사를 통하여 이지역 사람들이 고지방 식사를 함에도 불구하고 다른 국가에 비하여 결장암 발생 빈도가 낮은 것은 우유나 발효유 같은 유제품을 다량으로 섭취하기 때문이라고 보고하였다. 또한 결장암과 발효유에 대한 역학조사를 실시한 결과에서도, 암 발생 빈도와 yogurt와 발효유 섭취량과는 반비례한다고 보고되었으며, 이러한 연구결과는 유방암의 경우에도 유사한 경향을 나타냈다.

## V. Bifidobacteria의 산업적 이용

### 1. 상업적으로 이용되는 bifidobacteria의 종류

Probiotics 제품에 사용되는 젖산균은 주로 인체에서 유래한 종류를 사용하고 있으며, 이들 장내 유래 젖산균은 다른 젖산균에 비하여 인체의 생리적 환경에 보다 용이하게 적응할 수 있다. Bifidobacteria는 현재까지 보고된 32종 중에서 인체에서 유래한 5종(*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*)이 주로 제품에 사용된다(Hoier, 1992; Kurmann, 1998). 최근에 많은 연구가 진행되면서 *B. longum*이 유제품에 가장 적합한 것으로 보고되었으며, 이외에 *B. adolescentis*와 *B. infantis*의 가능성도 제시하였다.

발효유에 사용되는 bifidobacteria중에서 동물에서 유래한 종을 사용하는 예가 보고되었는데(Iwana 등, 1993), 이 균주는 다른 인체 유래 균주에 비하여 배양이 용이하고 제조 공정에서 야기되는 환경(낮은pH, 산소에 대한 노출 등)에 대한 저항력이 강하다고 보고되었다. 또한 최근에 새로 발견된 *B. lactis*를 사용하는 경우가 증가하는데, 이 균주는 내산성 및 산소 내성 등이 우수하여 섭취 후 많은 유용 작용이 기대된다(Gomes 등, 1998<sup>a, b</sup>).

### 2. 기술적인 고려사항

Bifidobacteria를 이용한 발효유제품 제조시에는 이 균주의 까다로운 특성상 많은 어려움이 발생한다. Bifidobacteria는 우유에서의 성장 및 산생성 능력이 약하여 배양시간이 길어지고, 배양조건 역시 혐기적인 상태를

필요로 한다(Dave와 Shah, 1997). 또한 배양을 촉진하기 위하여 우유에 성장 촉진 인자를 첨가하여 배양하기도 한다(Modler, 1994; Gomes 등, 1998<sup>a</sup>). Bifidobacteria는 특성상 발효과정 중에 초산을 생성하여 지나친 경우 완제품에서 식초맛을 나타내어 제품 기호도를 감소시킨다(Hoier, 1992). 이러한 여러가지 문제점을 해결하기 위하여 bifidobacteria를 단독으로 사용하기 보다는 *L. acidophilus*나 yogurt culture 등과 함께 혼합배양을 하는 경우가 많은데(Hoier, 1992; Samona 등, 1996; Gomes 등, 1998<sup>a</sup>), 이 경우 간혹 지나친 산 생성으로 인하여 제품 유통과정 중에 bifidobacteria의 급격한 사멸을 초래하는 경우도 발생한다(Samona 등, 1996).

### 3. 유제품

유제품 시장에서 probiotic 젖산균이 함유된 제품이 가장 많이 판매되는 나라는 일본으로, 발매되는 50% 이상의 발효유에 bifidobacteria가 함유되어 있다(Scheinbach, 1998). 유럽의 경우 프랑스, 독일, 덴마크 등의 국가에서 발효유제품의 약 25% 정도가 probiotic 젖산균을 사용하고 있다(Arunachalam, 1999; Lourens-Hattingh와 Viljoen, 2001). 전세계 시장에서 80종 이상의 제품에 bifidobacteria를 사용하고 있으며, 유럽의 45개 공장에서 bifidobacteria와 *L. acidophilus*가 함유된 제품이 생산되고 있다(Hoier, 1992). 또한 이들 probiotic 젖산균에 대한 많은 연구가 진행되면서 발효유를 비롯하여, yogurt, frozen yogurt와 desserts, ice cream, cheese, soy yogurt 등에 대한 적용 실험이 진행되고 있다.

### 4. 의약품

식품이외에도 건강보조식품(neutraceuticals)이나 의약품에 probiotic 젖산균을 사용하는 경우가 증가하고 있는데(Scheinbach, 1998; Arunachalam, 1999; Lourens-Hattingh와 Viljoen, 2001). 주로 냉동건조된 형태나 encapsulation된 형태의 분말제품이 설사 등의 장 질환이나 변비, 간 질환 등의 치료 목적으로 판매되고 있다(Kaur 등, 2000).

## VI. 참고문헌

1. Adams, M.R., and P. Marteau. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27:262-264.
2. Alm, L. 1991. The therapeutic effects of various cultures - an overview. pp. 45 ~ 64. *in* Therapeutic Properties of Fermented Milks. R.K. Robinson. ed. Elsevier Science, Barking, UK.
3. Aquirre, M., and M.D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75:95-107.
4. Arunachalam, K.D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* 19:1559-1597.
5. Benno, Y., and T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiol. Immunol.* 36:683-694.
6. Berrada, N., J.F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74:409-413.
7. Bezkoronainy, A., and R. Miller-Catchpole. 1989. *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria.* CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Bielecka, M., E. Biedrzycka, E. Biedrzycka, W. Smoragiewicz, and M. Smieszek. 1998. Interaction of *Bifidobacterium* and *Salmonella* during associated growth. *Int. J. Food Microbiol.* 45:151-155.
9. Bouhnik, Y., B. Flourié, I. Mangin, J.N. Simonet, N. Besetti, P. Marteau, P. Pochart, B. Decaris, and J.C. Rambaud. 1993. Modifications durables de la flore colique induites par les antibiotiques. Rôle d'une flore de substitution. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 17:A32.
10. Brook, I. 1996. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J. Clin. Microbiol.* 45: 21-26.
11. Claeson, M., and M.H. Merson. 1990. Global progress in the control of diarrheal disease. *Pediatr. Infect. Disease.* 9:345-355.
12. Collins, J.K., G. Thorton, and G.O. Sullivan. 1998. Selection of probiotics for human application. *Int. Dairy J.* 8:487-490.
13. Crociani, F. B. Biavati, A. Alessandrini, C. Chiarini, and V. Scardovi. 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:564-571.
14. Cummings, J.H. 1994. Non-starch polysaccharides (dietary fibre) including bulk laxatives in constipation. pp. 307 ~ 314. *in* Constipation. Kamm, M.A., and J.E. Lennard-Jones. Wrightson Biomedical Publ. Ltd., Petersfield, UK.
15. Dave, R.I., and N.P. Shah. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Intl. Dairy J.* 7:31-41.
16. Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* 92:45-67.
17. Gibson, G.R., and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77:412-420.
18. Gomes, A.M.P., F.X. Malcata, and F.A.M. Klaver. 1998<sup>a</sup>. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *J. Dairy Sci.* 81:2817-2825.
19. Gomes, A.M.P., M.G. Teixeira, and F.X. Malcata. 1998<sup>b</sup>. Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cult. Dairy Prot. J.* 22:221-240.
20. Grimaud, J.C., J.G. Bouvier, J.G. Bertolino, J. Salducci, P. Chiarelli, and C. Bouley. 1992. Effects of fermented milk by *Bifidobacterium* on colonic transit time. *Hellenic J. Gastroenterol.* 5:104.
21. Halpern, G.M., K.G. Vruwink, J. van de Water, C.L. Keen, and M.E. Gershwin. 1991. Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *Int. Immunotherapy.* VII:205-210.
22. Hirayama, K., and J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infection.* 2:681-686.
23. Hoier, E. 1992. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia.* 44:418-420.
24. Holzapfel, W.H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and J.H.J. Huis in 't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85-101.

25. Holzapfel, W.H., and U. Schillinger. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 35:109-116.
26. Hosoda, M., H. Hashimoto, F. He, H. Morita, and A. Hosono. 1996. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. *J. Dairy Sci.* 79:745-749.
27. Huis in 't Veld, J.H.J, R. Havenaar, and P. Marteau. 1994. Establishing a scientific basis for probiotics R & D. *Tibtech.* 12:6-8.
28. Iwana, H., H. Masuda, T. Fujisawa, H. Suzuki, and T. Mitsuoka. 1993. Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. in commercial yogurts sold in Europe. *Bifidobacteria Microflora.* 12:39-45.
29. Kaur, I.P., K. Chopra, and A. Saini. 2000. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1-9.
30. Klaenhammer, T.R., and M.J. Kullen. 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50:45-57.
31. Kurmann, J.A. 1998. Starters for fermented milks: starters with selected intestinal bacteria. *Bull. IDF.* 227:41-55.
32. Kurmann, J.A., and J.L. Rasic. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. pp. 117 ~ 157. *in Therapeutic Properties of Fermented Milks.* R.K. Robinson. ed. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, UK.
33. Link-Amster, H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot, and J.M. Aeschlimann. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 10:55-64.
34. Lourens-Hattingh, A., and B.C. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11:1-17.
35. Malhotra, S.L. 1977. Dietary factors in a study of colon cancer from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk, and fermented milk products and vegetable fibre. *Med. Hypotheses.* 3:122-134.
36. Marteau, P. and J.C. Rambaud. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS. Microbiol. Rev.* 12:207-220.
37. McIntosh, G.H. 1996. Probiotics and colon cancer prevention. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 5:48-52.
38. Meile, L., W. Judwig, U. Rufger, C. Gut, P. Kaufmann, G. Dasen, S. Wegner, and M. Teuber. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:57-64.
39. Misra, A.K., and R.K. Kuila. 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. *Indian J. Dairy Sci.* 48:612-614.
40. Mitsuoka, T. 1978. Intestinal Bacteria and Health. An Introductory Narrative. Iwanami Shoten Publ. Tokyo. Jpn.
41. Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 3:11-28.
42. Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health, *J. Ind. Microbiol.* 6:263-268.
43. Mitsuoka, T. 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50:438-446.
44. Mitsuoka, T. 2000. Significance of dietary modulation of intestine flora and intestinal environment. *Biosci. Microflora.* 19:15-25.
45. Modler, H.W. 1994. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. *Intl. Dairy J.* 4:383-407.
46. Ouwehand, A.C., P.V. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen. 1999. Probiotic: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9:43-52.
47. Perdigon, G., and S. Alvarez. 1992. Probiotics and immune state. pp. 145 ~ 180. *in Probiotics, the Scientific Basis.* R. Fuller. ed. Chapman and Hall, London, UK.
48. Pool-Zobel, B.L., C. Neudecker, I. Domizalaff, S. Ji, U. Schillinger, C. Rumney, M. Moretti, I. Vilarini, R. Sxassellati- Sforzoline, and I. Rowland. 1996. *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer.* 26:365-380.
49. Rasic, J.L. 1983. The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health? *North European Dairy J.* 4:1-5.
50. Rasic, J.L., and J.A. Kurmann, ed. 1983. Bifidobacteria and their role. Microbiological, Nutritional, Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
51. Rogosa, M. 1974. Genus III. *Bifidobacterium* Orla-Jensen. pp. 669 ~ 676. *in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8th ed. Buchanan, R.E.,

- and N.S. Gibbons. ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
52. Saavedra, J.M., N.A. Bauman, I. Oung, J.A. Perman, and R.H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344:1046-1049.
  53. Salminen, S., and M. Deighton. 1992. Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states. *Dig. Dis.* 10:227-238.
  54. Samona, A., R.K. Robinson, and S. Marakis. 1996. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* 13:275-280.
  55. Scardovi, V. 1981. The genus *Bifidobacterium*. pp. 1951 ~ 1961. in *The Prokaryotes: A Handbook on Habitat, Isolation, and Identification of Bacteria*. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balowa, and H.G. Schlegel. ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
  56. Scardovi, V. 1986. *Bifidobacterium*. pp 1418. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. 9th ed. Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. eds. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore, MD.
  57. Scardovi, V., and L.D. Trovattelli. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annali di Microbiologica ed Enzimologia*. 15:19-29.
  58. Schaafsma, G. 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutri. Newsletter*. 5:23-24.
  59. Scheinbach, S. 1998. Probiotics: functionality and commercial status. *Biotechnol. Advances*. 16:581-608.
  60. Schiffrin, E.J., F. Rochat, H. Link-amster, J.M. Aeschlimann, and A. Donnet-Hugher. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78:491-497.
  61. Seki, M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Shimamura, T. Kawashima, and K. Ogasa. 1978. The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the "regularity" among aged group. *Nutr. Food*. 4:379-387.
  62. Tissier, H. 1899. Le *Bactérium coli* et la réaction chromophile d'Escherich. *C.R. Soc. Biol.* 51(45): 943-945.
  63. Yamazaki, S.H., K. Machii, M. Tsuyuki, H. Momose, T. Kawashima, and K. Udea. 1985. Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunol.* 56:43-50.
  64. Yasui, H., A.A. Nagaoka, K. Mike, K. Hayakawa, and M. Owaki. 1992. Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 5:155-162.