



산, 담즙산, 산소 노출에 대한 비피도박테리아의 생존에 관한 연구

임 광 세* · 허 철 성
한국야쿠르트 중앙연구소

Viability of Bifidobacterial Strains against Acid, Bile Acid, and Oxygen Exposure

Kwang-Sei Lim* and Chul-Sung Huh
R & D Center, Korea Yakult Company Limited

Abstract

Survival and stability of 19 bifidobacterial strains included 13 isolates from Korean infants against acid, bile acid and oxygen exposure were examined. Acid resistance of selected strains at pH values of 4.0, 3.0 and 2.0 was tested. Among the bifidobacterial strains tested, *B. bifidum* B3, *B. longum* D6, and *B. adolescentis* F1 exhibited higher viable cell counts exposed to acid whereas other strains had various results. The abilities of the strains to grow in the MRS broth containing 0.2% thioglycolic acid and 0.2% oxgall were tested and the tolerance of *B. bifidum* B3 and *B. longum* D6 to bile acid were higher than that of others. Even though in same species, the tolerance of tested strains to bile acid were variable. Stabilities of tested strains to oxygen exposure were variable and *B. bifidum* and *B. longum* strains showed relatively higher viable cell counts after 48 hours exposure to aerobic incubation. These results demonstrated that the survival and stability of bifidobacterial strains to acid, bile acid, and oxygen exposure were variable and strain-dependent. Due to their tolerant ability to environmental factors like acid, bile acid, and oxygen, *B. bifidum* B3 and *B. longum* D6 had good potential properties as probiotic cultures and may be useful for industrial application.

Key words : bifidobacteria, probiotics, survival, acid, bile acid, oxygen

서 론

전통적으로 발효유 제조에는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*가 주로 사용되어 왔다. 최근에 인체의 장내 균총에 대한 연구가 활발해지고 probiotics의 인체 건강 증진 효과에 대한 연구가 많이 진행되면서 인체의 장내에 존재하는 젖산균 중에서 *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp. 등이 발효유 제조용 starter로 주로 사용되고 있다(Rasic과 Kurmann, 1983; Buchenhüskes, 1993; Scheinbach, 1998; Arunachalam, 1999). Bifidobacteria는 1899년 파스퇴르연구소의 Tissier에 의해

모유 영양아의 분변에서 처음 분리된 Gram 양성의 편성 혐기성균으로 주로 인체와 동물의 소화기관에 존재한다. 까다로운 생육 조건이나 영양소 요구 특성에 의해서 제품 적용에 많은 제약이 있었음에도 불구하고 꾸준한 시도와 기술 발전이 이루어져 전 세계 많은 발효유 제품에 적용되고 있다(Scheinbach, 1998; Gomes와 Malcata, 1999; Lourens-Hattingh와 Viljoen, 2001; Saxelin 등, 2005).

식품의 제조에 사용되는 bifidobacteria는 숙주 특이성이나 섭취시 장내 정착성 등을 고려할 때 인체에서 분리한 균종을 사용해야 하며(Huis in't Veld 등, 1994), 안전성이 확보된 GRAS(Generally Regarded As Safe) 상태의 비병원성 균주를 사용해야 한다. 또한 섭취시 목적으로 하는 소화 기관에 도달하여 그 성능을 발휘하기 위해서는 위산과 같은 소화액과 담즙산 등에 저항성이 있는 균주를 사용해야 하며, 제조 공정이나 완제품 유통 과정 중에 생존력이나 활력이 충분히 유지되어야

* Corresponding author : Kwang Sei Lim, R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd., #418-12, Komae-dong, Kiheung-gu, Yongin, Kyunggi-do, 446-901, Korea. Tel: 82-31-899-7811, Fax: 82-31-899-7710, E-mail: kslim@re.yakult.co.kr

한다(Collins 등, 1998).

본 연구에서는 한국인 유아에서 선발한 균주를 포함한 bifidobacteria의 내산성, 담즙산 내성, 산소 노출시의 생존력 등을 측정하여 균종간의 차이 여부와 상업적으로 유용한 균주를 선발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

사용 미생물과 배지

본 연구에 사용된 bifidobacteria는 경인 지역에서 출생한 12개월령 이하의 건강한 유아 15명의 분변으로부터 분리하여 한국야쿠르트 중앙연구소에 보관중인 13개 균주와 공시 균주 2개 균주 및 상업용으로 판매되는 4개 균주 등 총 19개 균주를 실험에 사용하였다(Table 1). 공시 균주로는 *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 상업적으로 판매되고 있는 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12와

Table 1. Bifidobacterial strains tested in this study

Species / strains	Source
<i>Bifidobacterium bifidum</i> A1	Korean infants feces
<i>Bifidobacterium infantis</i> B1	Korean infants feces
<i>B. bifidum</i> B3	Korean infants feces
<i>Bifidobacterium longum</i> D2	Korean infants feces
<i>B. longum</i> D4	Korean infants feces
<i>B. longum</i> D6	Korean infants feces
<i>B. longum</i> D7	Korean infants feces
<i>Bifidobacterium breve</i> E1	Korean infants feces
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> F1	Korean infants feces
<i>B. longum</i> H4	Korean infants feces
<i>B. breve</i> M1	Korean infants feces
<i>B. bifidum</i> N3	Korean infants feces
<i>B. longum</i> N4	Korean infants feces
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	Human
<i>B. longum</i> ATCC 15707	Human
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12	Commercial culture (Denmark)
<i>B. bifidum</i> BB46	Commercial culture (Denmark)
<i>B. infantis</i> 877	Commercial culture (USA)
<i>B. longum</i> 2	Commercial culture (Germany)

Bifidobacterium bifidum BB46(Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Denmark)과 *B. longum* 2(Wiesby Laboratorium, Niebüll, Germany) 및 *B. infantis* 877(Rhodia, Madison, WI, USA) 등을 각종 균사로부터 분양 받아서 사용하였다.

실험에 사용된 bifidobacteria는 paraffin oil이 증충된 modified BL broth(Teraguchi 등, 1978)를 사용하여 37°C에서 18~24시간 배양하였으며, 실험 전에 2회 이상의 계대 배양을 통해 활력을 충분히 높인 후에 사용하였다. 순수 분리 및 동정이 완료된 bifidobacteria는 paraffin oil이 증충된 modified BL broth에 18시간 배양한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Union 32R, Hanil Science Industrial, Korea)하고 상층액을 3% sodium glutamate가 함유된 12% 멸균 환원 탈지유로 치환하여 -70°C deep freezer(MDF-U6086S, Sanyo Electronic Co., Ltd. Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

내산성

실험 균주의 내산성은 Berrada 등(1991)의 방법을 개선하여 사용하였다. Paraffin oil이 증충된 modified BL broth에 계대배양하여 충분히 활력이 높아진 실험 균주를 0.2% yeast extract가 함유된 12% 탈지유에 3%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 균주 배양액에 1.25 N HCl을 첨가하여 각각 pH 4.0, 3.0, 2.0으로 조정된 후에 37°C에서 2시간 유지하면서 1시간 간격으로 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 혐기성 희석액(Ochi 등, 1964)을 사용하여 십진 희석한 후 BL agar(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 도말하여 steel wool과 함께 anaerobic jar(FA-12, Hirayama Manufacturing Co., Tokyo, Japan)에 넣고 CO₂ 가스로 2회 치환한 후 37°C에서 2일간 혐기적으로 배양한 후 생균수의 변화를 측정하였다.

담즙산 내성

실험 균주를 modified BL broth에서 37°C, 18시간 배양한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 생리적 식염수에 2회 세척한 후 재현탁하여 최종 농도가 약 10⁶ cfu/mL이 되도록 0.05% L-cysteine-HCl, 0.2% thioglycolic acid(Sigma)와 0.2% oxgall(Difco)이 각각 함유된 MRS(Difco) broth에 접종하여 37°C에서 24시간 혐기적으로 배양하면서 4시간 간격으로 시료를 채취하여 620 nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Lambda 25, PerkinElmer, USA)로 측정하였다.

산소 내성

실험 균주를 paraffin oil이 증충된 modified BL broth에서 37°C, 18시간 배양하고 혐기 희석액으로 십진 희석하여 BL agar에 도말하였다. 실험 균주가 접종된 plate를 37°C에서 48

시간까지 호기적으로 배양하면서 12시간마다 plates를 다시 꺼내서 steel wool과 함께 anaerobic jar에 넣고 CO₂ 가스로 2회 치환한 후 37°C에서 2일간 혐기적으로 배양한 후 생균수의 변화를 측정하였다. 모든 실험은 균주별로 2회 반복하여 실시하였다.

결과 및 고찰

내산성

Bifidobacteria 10개 균주를 0.2% yeast extract가 함유된 12% 탈지유에서 24시간 배양한 균주 배양액의 pH를 각각 pH 2.0, 3.0, 4.0으로 조정하고 37°C에서 유지하면서 실험 균주의 생존력을 측정하였다. pH 4.0으로 조정된 배양액의 경우, 실험 균주 모두 배양 2시간까지 생균수의 변화가 거의 없었으나, pH 3.0과 pH 2.0에서의 실험한 결과는 Fig. 1~10에 나타난 것과 같이 실험 균주에 따라 매우 다른 결과를 나타내었다. 실험 균주 중에서 *B. bifidum* B3, *B. longum* D6, *B. adolescentis* F1의 내산성이 가장 우수하여 pH 3.0과 4.0에서는

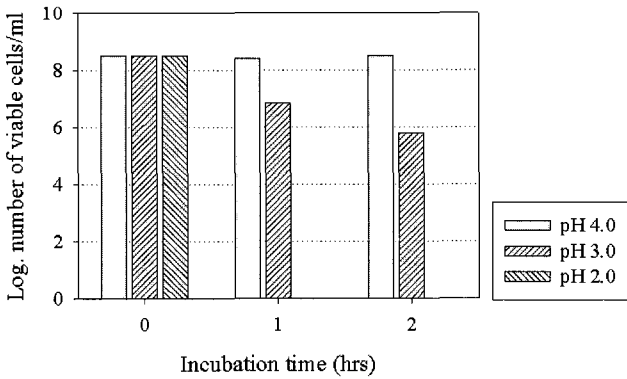


Fig. 1. Survival of *B. bifidum* A1 in various pH conditions.

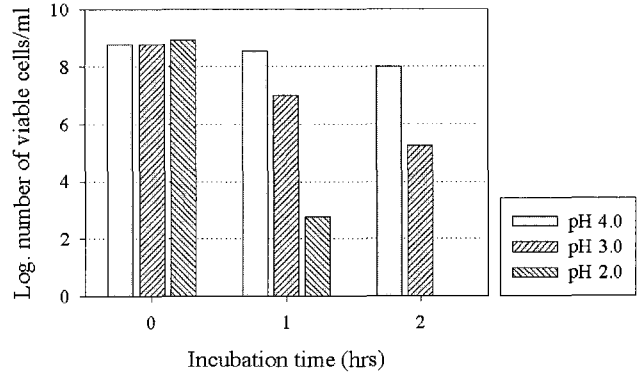


Fig. 4. Survival of *B. longum* D7 in various pH conditions.

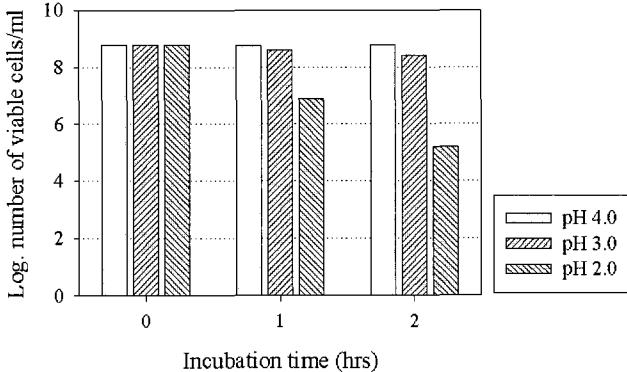


Fig. 2. Survival of *B. bifidum* B3 in various pH conditions.

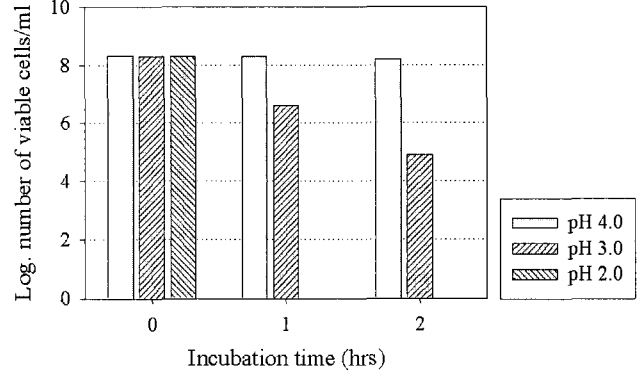


Fig. 5. Survival of *B. breve* E1 in various pH conditions.

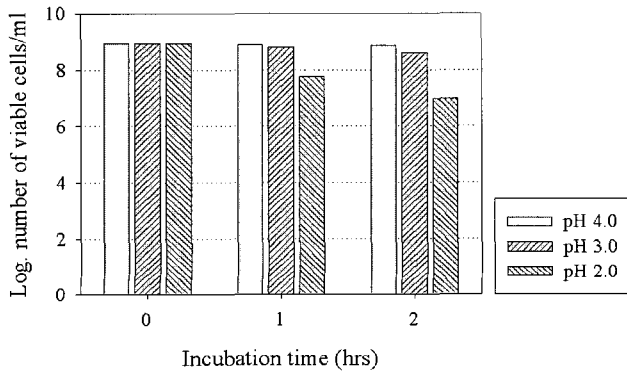


Fig. 3. Survival of *B. longum* D6 in various pH conditions.

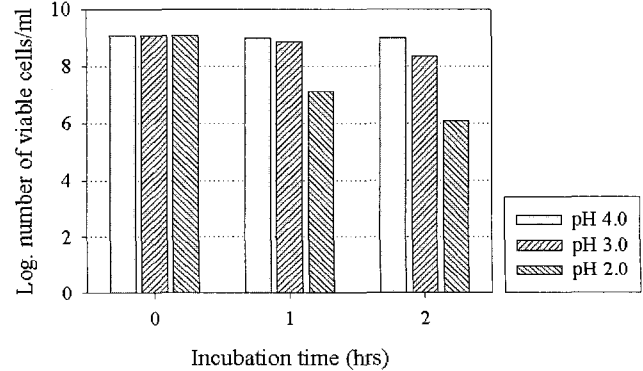


Fig. 6. Survival of *B. adolescentis* F1 in various pH conditions.

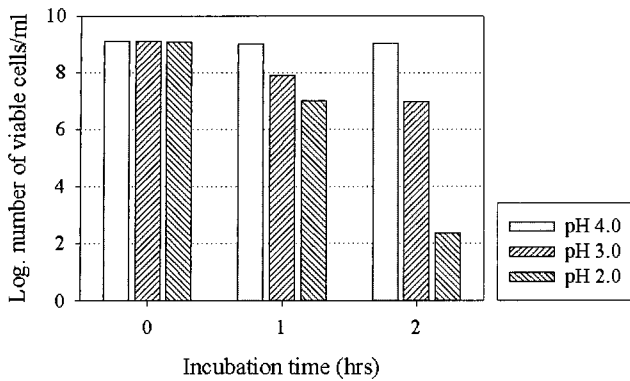


Fig. 7. Survival of *B. longum* H4 in various pH conditions.

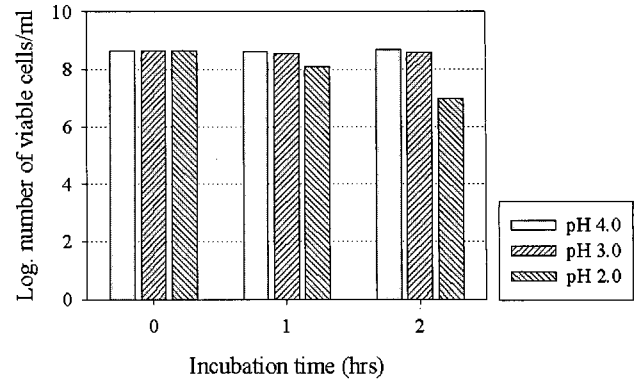


Fig. 10. Survival of *B. infantis* 877 in various pH conditions.

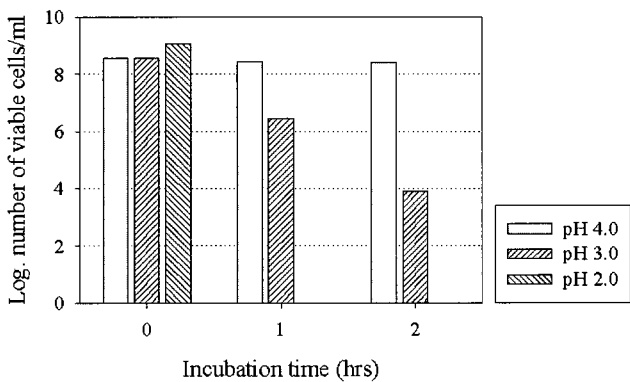


Fig. 8. Survival of *B. breve* M1 in various pH conditions.

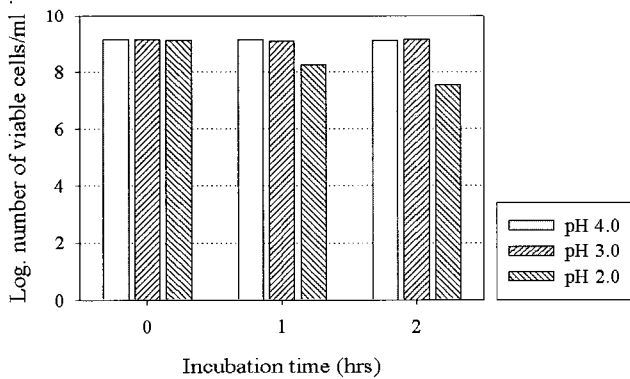


Fig. 9. Survival of *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 in various pH conditions.

생균수의 변화가 관찰되지 않았으며, pH 2.0에서는 2시간이 경과한 후에도 50% 이상의 생존율을 나타내었다.

상업용 종균 중에서 *B. animalis* subsp. *lactis* BB12와 *B. infantis* 877 균주를 대조군으로 비교 실험한 결과, Fig. 9와 10에서 보는 것과 같이 내산성이 매우 강하여 pH 2.0에서 2시간 경과한 후에도 초기 생균수의 80% 이상이 생존하고 있었다.

Lankaputhra와 Shah(1995)는 9종 bifidobacteria를 이용하

여 pH 1.5~3.0에서의 내산성을 시험한 결과, *B. longum*과 *B. pseudolongum*이 내산성이 가장 우수하여 pH 3.0에서 3시간 배양하는 경우에도 사멸하지 않았으나, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*는 내산성이 매우 약하다고 보고하였다. Clark 등(1993)은 *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*을 이용하여 pH 1.0~3.0에서의 생존율을 측정 한 결과, 실험 균주 모두 pH 2.0 이상에서는 배양 3시간까지 거의 사멸하지 않는다고 하였으며, bifidobacteria 중에서 내산성이 가장 우수한 *B. longum*이 발효유의 제조에 적합하다고 보고하였다. 또한 Ahn 등(1999)은 시판 발효유 제품과 상업용 발효유 starter에서 분리한 9종의 bifidobacteria와 3종의 ATCC 균주 (*B. bifidum* ATCC 11863, *B. longum* ATCC 15707, *B. infantis* ATCC 15697)에 대하여 내산성을 비교한 결과, 상업용으로 이용되는 bifidobacteria의 내산성이 높았다고 보고하였다. Madureira 등(2005)은 7종의 상업용 bifidobacteria와 lactobacilli 균주를 대상으로 인공 소화액에서의 생존력을 측정 한 결과, 내산성은 종(species)에 따른 경향이 보이지 않고 strain에 따라 매우 상이한 결과를 나타낸다고 보고하였다. 한편 Matsumoto 등(2004)은 17개의 bifidobacteria 균주를 대상으로 내산성을 실험한 결과, 균주보다는 종에 의한 내산성 경향이 나타난다고 하였으며 실험균주 중에서 *B. lactis*와 *B. animalis*가 내산성이 강하다고 하였다. 또한 이러한 내산성은 H⁺-ATPase 활력과 연관이 있다고 보고하였다.

담즙산 내성

Bifidobacteria 균주를 0.2% thioglycolic acid와 0.2% oxgall이 함유된 MRS broth에서 배양하면서 담즙산 내성을 시험한 결과는 Fig. 11~13에 보는 바와 같이 균주에 따라 담즙산 내성은 차이가 크게 나타났다. 균종에 따른 담즙산의 내성 차이는 관찰되지 않았으며, 내산성이 우수한 *B. bifidum* B3와 *B. longum* D6가 담즙산에 대한 내성 역시 높게 나타났다. 이 결

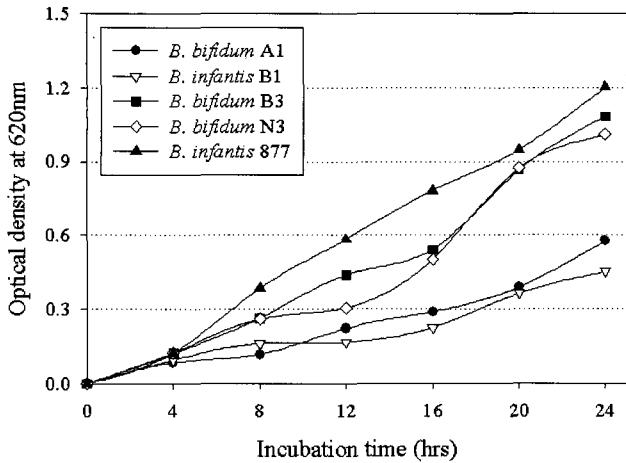


Fig. 11. Growth of *B. bifidum* and *B. infantis* strains in MRS broth containing 0.2% thioglycolic acid and 0.2% oxgall.

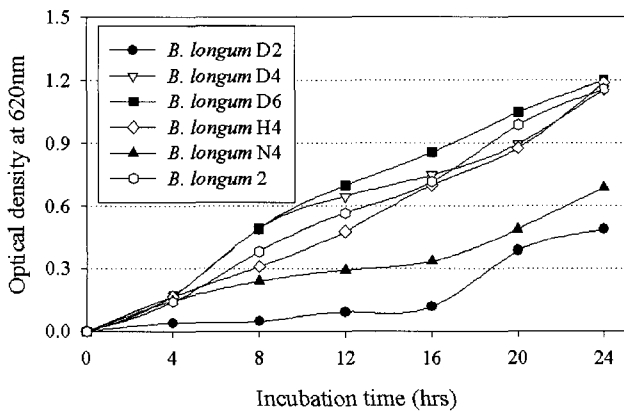


Fig. 12. Growth of *B. longum* strains in MRS broth containing 0.2% thioglycolic acid and 0.2% oxgall.

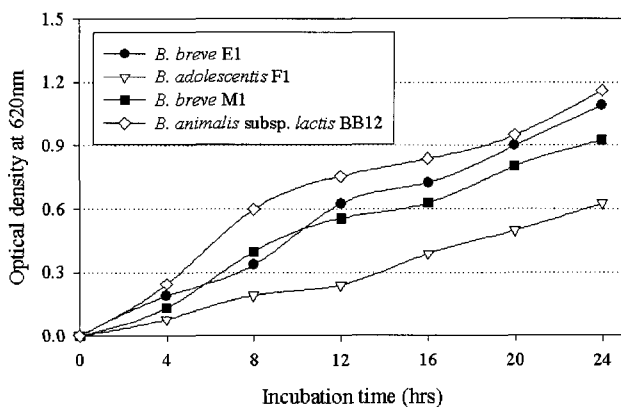


Fig. 13. Growth of *B. breve*, *B. adolescentis* and *B. animalis* subsp. lactis strains in MRS broth containing 0.2% thioglycolic acid and 0.2% oxgall.

과는 Madureira 등(2005)의 보고와도 유사한 경향을 나타내어 인공 위액과 담즙에 연속적으로 노출시킨 균주 중에서 내

산성이 높은 균주가 담즙에 노출이 되더라도 생존율이 높다고 보고하였다. 또한 상업용 종균인 *B. infantis* 877, *B. longum* 2 및 *B. animalis* subsp. lactis BB12의 담즙산 내성도 높게 나타났다. Gilliland와 Speck(1977)은 0.15% oxgall이 첨가된 LBS 배지에서 담즙산 내성이 있는 젖산균을 선별할 수 있으며, 이 담즙산 농도에서 성장 가능한 균주만이 장내에서 정착할 수 있다고 하였다. Clark과 Martin(1994)은 *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*와 *B. adolescentis*를 2%와 4%의 oxgall이 함유된 증류수에 접종하여 37°C에서 12시간 배양 후에 생존율을 비교한 결과, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*는 생존하지 못했지만 *B. longum*은 배양 12시간 후에 초기 생균수의 80% 이상의 높은 생존율을 보였다고 보고하였으며, Ahn 등(1999)은 1%와 2%의 oxgall이 함유된 0.05 N phosphate buffer에서 담즙산 내성을 측정할 결과, 발효유 제품에서 분리한 *B. longum* 균주들이 다른 균주에 비하여 다소 높은 담즙산 내성을 나타낸다고 하였다.

산소 내성

Bifidobacteria 균주의 산소에 대한 내성을 측정하기 위하여 호기적 조건에서 48시간까지 노출시킨 후에 다시 혐기적으로 48시간 배양하여 생균수의 변화를 측정할 결과는 Fig. 14~16에서 보는 바와 같이 실험 균주마다 다른 결과를 나타내었다. *B. bifidum*과 *B. longum* 균주가 *B. adolescentis*나 *B. breve*보다 상대적으로 산소에 대한 내성이 강한 경향을 나타

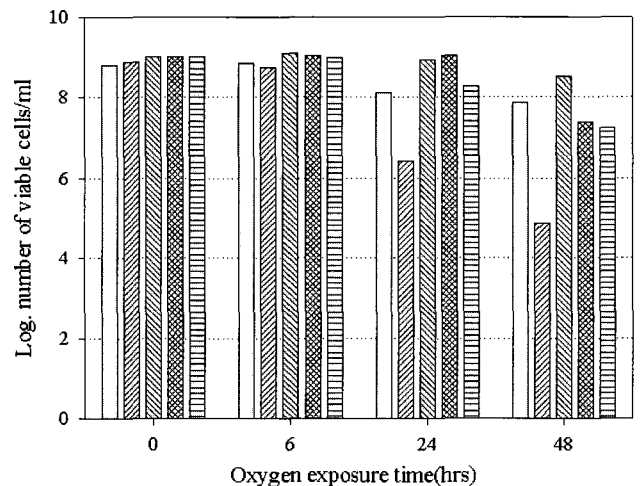


Fig. 14. Oxygen susceptibility of *B. bifidum* and *B. infantis* strains.

Each strain was pre-incubated for 6, 24, and 48 hours under aerobic condition at 37°C. They were then transferred to anaerobic jar and incubated under anaerobic condition. They number of viable cells were counted after 48 hours incubation.

□ *B. bifidum* A1 ▨ *B. infantis* B1 ▩ *B. bifidum* B3
 ▤ *B. infantis* 877 ▧ *B. infantis* ATCC 15697

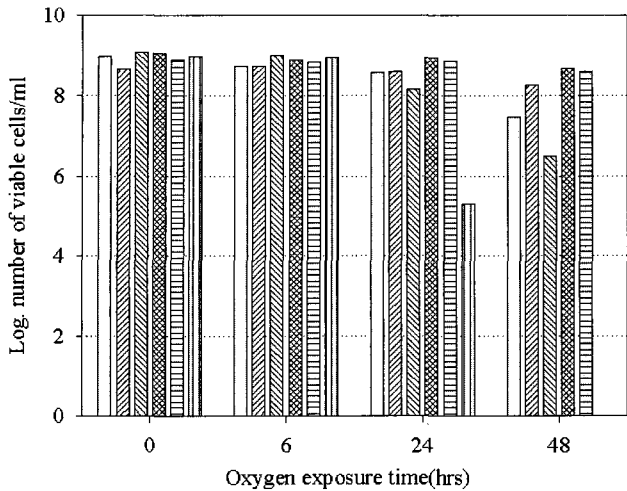


Fig. 15. Oxygen susceptibility of *B. longum* strains. Each strain was pre-incubated for 6, 24, and 48 hours under aerobic condition at 37°C. They were then transferred to anaerobic jar and incubated under anerobic condition. They number of viable cells were counted after 48 hours incubation.

□ *B. longum* D2 ▨ *B. longum* D6 ▩ *B. longum* N4
 ▤ *B. longum* 2 ▥ *B. longum* BB46 ▦ *B. longum* ATCC 15707

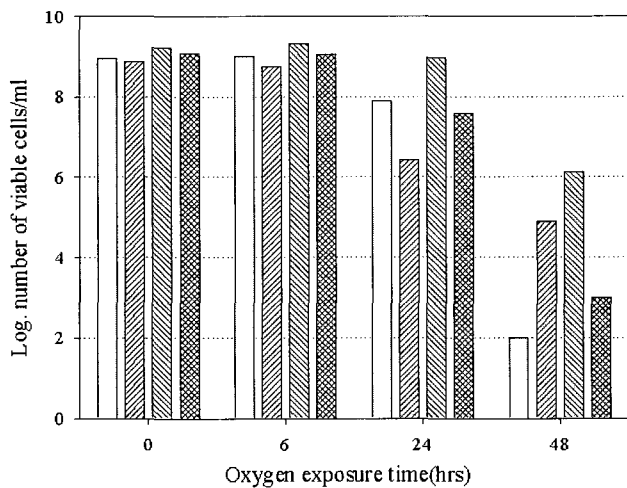


Fig. 16. Oxygen susceptibility of *B. breve*, *B. adolescentis* and *B. animalis subsp. lactis* strains.

Each strain was pre-incubated for 6, 24, and 48 hours under aerobic condition at 37°C. They were then transferred to anaerobic jar and incubated under anerobic condition. They number of viable cells were counted after 48 hours incubation.

□ *B. breve* E1 ▨ *B. breve* M1
 ▩ *B. adolescentis* F1 ▤ *B. animalis subsp. lactis* BB12

내어 호기적인 조건에서 48시간 노출시켜도 초기 생균수의 80% 이상을 유지하였다.

Bifidobacteria는 절대 혐기성 젖산균이기 때문에 배지나 제품에 함유된 용존 산소에 의해 성장 속도나 생존율이 영향을 받게 되므로 발효유 제조시에 사용되는 원료유에 용존 산

소의 양을 줄이는 것이 매우 중요하며, 특히 배양 초기의 용존 산소량은 bifidobacteria의 성장에 매우 큰 영향을 준다고 보고되었다(Klaver 등, 1993). Bolduc 등(2006)은 bifidobacteria 8균주를 대상으로 용존 산소에 대한 감수성을 실험하였는데, 실험균주가 10⁷ cfu/mL 수준으로 함유된 일반 우유와 탈기 과정을 거쳐서 용존 산소 농도가 기존의 1/10 수준으로 낮아진 우유를 냉장 보관하면서 생균수 변화를 측정된 결과, 용존 산소에 농도에 따른 생균수의 차이는 관찰되지 않고, 실험균주에 따라 매우 상이한 결과를 나타내었다고 보고하였다. 이러한 저항성은 비록 bifidobacteria가 혐기성 균주이기 는 하지만, 일부 균주에서는 산소에 대한 독성을 완화시킬 수 있는 효소 반응 체계를 보유하고 있기 때문이라고 보고하였다(Ahn 등, 2001, Talwalkar와 Kailasapathy, 2003). Shin과 Park(1997)은 6종의 bifidobacteria를 이용하여 20시간까지 호기적으로 배양한 후에 생균수의 변화를 측정된 결과, *B. adolescentis* ATCC 15703을 제외한 나머지 5종은 거의 사멸하지 않았으며, 이 균주가 다른 균주들에 비해서 NADH oxidase와 NADH peroxidase의 활성이 매우 낮았다고 보고하였다. Ahn 등(2001)은 사람의 분변에서 산소에 내성이 있는 *B. longum* 5 균주를 분리하여 각 균주의 탄수화물 이용성과 세포벽의 지방산을 분석한 결과, 산소에 노출된 경우에 산소에 대한 방어 기작으로 세포벽 구성 지방산의 탄소 사슬이 짧아지고, cyclopropane fatty acid인 9,10-methyleneoctadecanoic acid의 양이 증가하며, oxygen stress protein이 발현된다고 보고하였다.

상기의 결과를 종합해 볼 때 한국인 유아에서 분리한 13개의 실험균주 중에서 *B. bifidum* B3과 *B. longum* D6 균주가 산, 담즙, 산소 노출 등의 조건에서 모두 우수한 생존율을 나타내어 제품의 제조·유통 과정이나 섭취시 인체 소화 기관에서의 생존율이 높을 것으로 판단되었다. 또한 이들 균주는 현재 제품 제조에 사용되고 있는 상업용 종균과 비교해서도 동등한 성적을 나타내어 상업용 종균으로서의 사용 가능성을 시사하였다.

요 약

한국인 유아에서 분리한 13개 균주를 포함한 19개 bifidobacteria 균주를 대상으로 산, 담즙산 및 산소 노출시의 생균수의 변화를 측정하였다. 내산성은 pH 4.0, 3.0, 2.0에서 2시간까지 측정하였는데, 실험 균주마다 매우 상이한 결과를 나타내었으며, 실험 균주 중에서 *B. bifidum* B3, *B. longum* D6, *B. adolescentis* F1이 우수한 생존력을 나타내었다. 실험 균주를 0.2% thioglycolic acid와 0.2% oxgall이 함유된 MRS 배지에서 성장을 측정된 결과, *B. bifidum* B3과 *B. longum* D6이

담즙산에 우수한 저항성을 나타냈으며, 균종간의 경향은 관찰되지 않았다. 호기 상태에서 48시간 노출시킨 후에 생균수의 변화를 측정된 결과, 실험 균주마다 상이한 결과를 나타내었으며 상대적으로 *B. bifidum*과 *B. longum* 균주들의 생존력이 우수하였다. 산, 담즙, 산소 노출에 대한 생존력은 균종간의 경향을 나타내지 않고 균주마다 상이한 결과를 나타내었는데, 실험 균주 중에는 *B. bifidum* B3과 *B. longum* D6 균주가 모두 우수한 생존율을 나타내었다. 이들 균주는 현재 시판되는 상업용 종균과 비교해서도 동등한 성적을 나타내어 상업용 종균으로서의 사용 가능성을 시사하였다.

참고문헌

- Ahn, J. B., Hwang, H. J., and Park, J. H. (2001) Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 443-451.
- Ahn, Y. T., Kim, Y. H., Jung, E. J., Lim, J. H., Kamg, H. J., and Kim, H. U. (1999) Resistance of lactobacilli and bifidobacteria isolated from fermented milk products to low pH and bile acid. *Kor. J. Anim. Sci.* **41**, 335-342.
- Arunachalam, K. D. (1999) Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* **19**, 1559-1597.
- Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P., and Piaia, M. (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74**, 409-413.
- Bolduc, M. P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P., and Vuilleumard, J. C. (2006) Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Intl. Dairy J.* **16**, 1038-1048.
- Buchenhüskes, H. J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 253-272.
- Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. (1993) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cultured Dairy Products. J.* **28**, 11-14.
- Clark, P. A. and Martin, J. H. (1994) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cultured Dairy Products. J.* **29**, 18-21.
- Collins, J. K., Thorton, G., and Sullivan, G. O. (1998) Selection of probiotics for human application. *Int. Dairy J.* **8**, 487-490.
- Gilliland, G. E., and Speck, M. L. (1977) Enumeration and identification of lactobacilli in dietary products. *J. Food Prot.* **40**, 760-762.
- Gomes, A. M. P. and Malcata, F. X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 139-157.
- Huis in't Veld, J. H. J., Havenaar, R., and Marteau, P. (1994) Establishing a scientific basis for probiotics R & D. *Tibtech.* **12**, 6-8.
- Klaver, F. A. M., Kingma, F., and Weerkamp, A. H. (1993) Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk Dairy J.* **47**, 151-164.
- Lankaputhra, W. E. V., and Shah, N. P. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy. Products J.* **30**, 2-7.
- Lourens-Hattingh, A., and Viljoen, B. C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **11**, 1-17.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. (2005) Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *Intl. Dairy J.* **15**, 921-927.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., and Benno, Y. (2004) H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Intl. J. Food Microbiol.* **93**, 109-113.
- Ochi, Y., Mitsuoka, T., and Segal, T. (1964) Studies on the intestine flora of chickens. III. The development of the flora from the chicks till hens. *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.* **193**, 80-95.
- Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. (1983) Bifidobacteria and their role. Microbiological, Nutritional, Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. Birkhause Verlag, Basel, Switzerland.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandjholm, T., and de Vos, W. M. (2005) Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Curr. Opinion Biotechnol.* **16**, 204-211.
- Scheinbach, S. (1998) Probiotics: Functionality and commercial status. *Biotechnol. Advances.* **16**, 581-608.

22. Shin, S. Y. and Park, J. H. (1997) Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in *Bifidobacterium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 2869-2874.
23. Talwalker, A. and Kailaspathy, K. (2003) Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *J. Dairy Science* **86**, 2537-2546.
24. Teraguchi, S., Uehara, M., Ogasa, K., and Mitsuoka, T. (1978) Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jpn. J. Bacteriol.* **33**, 753-761.
-
- (2006. 9. 29. 접수 ; 2006. 11. 28. 채택)