

비피더스 연구동향

박명수^{1,2} · 지근억^{2,3*}

¹안양과학대학 호텔조리과, ²(주)비피도 기술연구소, ³서울대학교 식품영양학과 및 생활과학연구소

Research Trends in *Bifidobacterium*

Park, Myeong Soo^{1,2} and Ji, Geun Eog^{2,3*}

¹Department of Hotel Culinary Arts, Anyang Science University, Anyang 430-749, Korea

²Research Center, BIFIDO Co., Ltd, Gangwon 250-804, Korea

³Department of Food and Nutrition, Reseach Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract Bifidobacteria comprises up to 25% of the cultivable fecal bacteria in adults and 80% in infants. Many in vivo and clinical research results supporting its efficacy in the prevention and improvement of gastrointestinal health have been accumulated. As a consequence, expert committee WHO/FAO expert committee recommended *Bifidobacterium* as representative probiotics together with *Lactobacillus acidophilus*. In this review, research trends in bifidobacteria concerning the classification and identification of the genus *Bifidobacterium*, modulation of intestinal microflora, improvement of constipation, prevention of diarrhea, alleviation of atopy and allergy, barrier function through antimicrobial activity and immune enhancement of the host will be introduced. Several gene expression systems based on bifidobacterial plasmids have been developed and successfully used to express several heterologous genes including anticancer proteins in *Bifidobacterium*. In animal test, bifidobacteria was proven to be a promising candidate for safe gene delivery system which can specifically colonize in the solid tumor.

Keywords: *Bifidobacterium*, probiotics, functionality, gene therapy

서 론

새로이 태어나는 유아는 자궁내의 무균적 환경에서 다양한 미생물이 서식하고 있는 외부 세계로 출생한다. 이때, 환경에 존재하는 병원성미생물에 대한 면역적 방어가 필요할 뿐만 아니라 생후 아기의 장내에 서식하기 시작하는 많은 수의 미생물 자체는 유아의 장내 환경을 조성하는 주요 신체 기관에 해당한다. 특히, 세균은 장내 고형분의 약 반을 차지하게 되며 매일 배설하는 분변의 30-40%가 세균 덩어리이다. 장내의 세균은 그 자체로서 유아에게 감염 등의 위협 요인이 될과 아울러 한편으로는 유아의 장 점막 및 면역 조직을 발달시키고 면역 세포의 균형을 유지하는데 가장 중요한 영향을 미친다. 장 내에 있는 세균은 유해균과 유익균의 평형 상태를 유지하는데 이들 중 특히 *Bifidobacterium*은 가장 유익한 균이다. 장내에 *Bifidobacterium* 등의 유익균이 감소

하면 알레르기, 설사 및 기타 질병이 증가하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 *Bifidobacterium* 등의 유익균을 생균제로 섭취하였을 때 인체의 건강을 증진시키는 균을 프로바이오틱스라고 한다. 최근 프로바이오틱스 균주는 유아를 비롯한 인체의 알레르기 발생, 감염성 설사 및 염증 증상을 경감시키는 임상적 효과들이 많이 보고되고 있다. 따라서, 기존의 정장제로 활용되던 프로바이오틱스 균들은 앞으로 건강 기능 식품 및 의학 보조제로서의 역할이 증대될 것으로 예상된다. 본 글에서는 프로바이오틱스 중에서 *Bifidobacterium*을 중심으로 분류, 동정, 임상적인 효과와 유전자 수준에서의 균주의 개량과 제품화에 관련된 연구동향을 소개하고자 한다.

비피더스의 분류 및 동정

비피더스균은 완전 혐기성균으로 무포자, 비운동성의 그람 양성 간균으로 중, 속 및 배양환경 등에 따라 다양한 형태학적 특성을 보여준다. Tissier [1]에 의해 처음 유아의 장에서 관찰된 이래 초기에는 Lactobacillaceae로 분류되

*Corresponding author

Tel: +82-2-880-6282, Fax: +82-2-884-0305

e-mail: geji@snu.ac.kr

었으나 (*Lactobacillus bifidum*) 1924년에 Orla Jensen이 *Bifidobacterium*으로 재 분류 하였고 1974년 the 8th Edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에서부터 독립된 속으로 표기되었다. 현재 *Bifidobacterium*의 분류학 상 위치는 Actinobacteria phylum (문), Actinobacteria class (강), Bifidobacteriales order (목), Bifidobacteria family (과), *Bifidobacterium* genus (속)로 분류되고 있다. 비피더스균의 분류에는 세포의 형태학적인 모습이나, 집락의 모양 및 당 발효 특징, 영양요구 특성 발효대사산물 등에 의한 전통적인 분류와 16S rRNA 염기 조성, RAPD, FISH, pulsed field gel electrophoresis 등 유전자의 특성을 이용하는 분류 동정 방법이 많이 이용되고 있다 [2,3]. 최근의 연구에 의하면 16S rRNA 서열분석에서 *Bifidobacterium* 내에서는 93% 이상의 상동성을 보이는 것으로 나타났다 [4]. 현재까지 분리되어 분류된 *Bifidobacterium*에는 29종이 있으며 이들 중 *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. dentium* 등이 인체의 장관 및 분변에서 분리되고 있다.

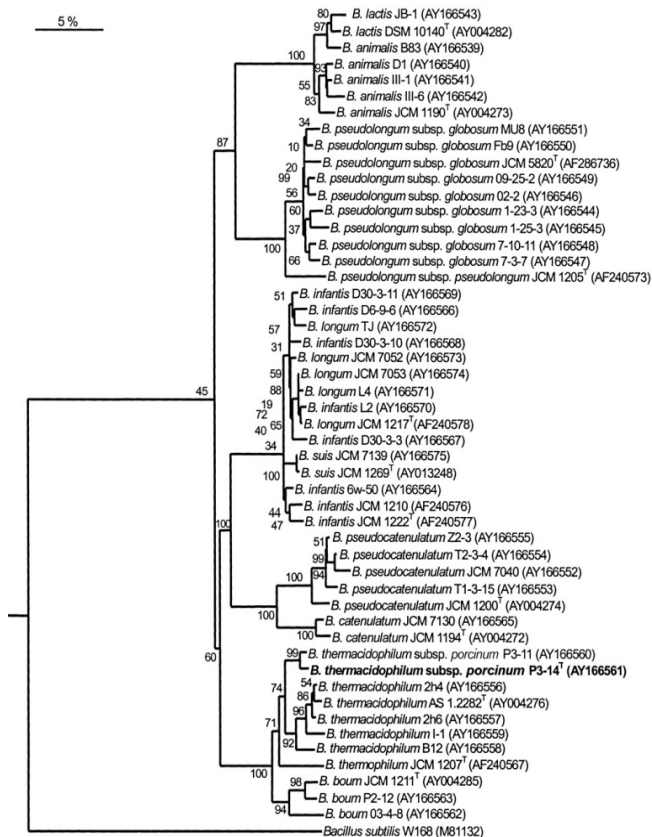


Fig. 1. Phylogenetic tree of the genus *Bifidobacterium*. Adapted from Jian et al. [2].

비피더스를 포함한 신규한 프로바이오틱스 균주를 식품에 사용하기 위해서는 안전성이 확보가 되어야 하며 이를 뒷받침하기 위한 가장 중요한 방법이 정확한 동정이다.

상품화되어 유통되고 있는 프로바이오틱스 제품의 경우에도 표기된 균주와 실제 동정과는 다른 결과들을 보이는 경우가 보고되고 있어 [5] 더욱이 정확한 동정방법이 필요한 실정이다. 비피더스의 genus (속) 수준에서의 동정에는 F6PPK (fructose-6-phosphate phosphoketolase)의 활성을 평가하는 것이 가장 일반적인 방법이다. 하지만 이 효소활성을 이용하여 species (종) 수준까지 동정하기에는 부족하여 현재에는 rRNA 서열 분석을 기초로 한 방법을 가장 많이 이용하고 있다.

장내균총과 비피더스균

사람의 장에는 500종 이상의 장내 세균이 살고 있다. 이들은 소화 과정의 유지에 중요한 역할을 하고 있으며 장의 운동을 돕기도 하고 병원성 균의 서식으로부터 장을 보호하는 역할도 한다. 인체의 장내에 음식물의 양과 세균의 양이 반반씩 존재하고 매일 배설하는 분변 내용물도 수분을 제외하면 약 40%가 세균이다 [6]. 사람의 변을 현미경으로 관찰하면 변은 거의 세균 덩어리로 이루어져 있음을 알 수 있다. 이들의 99%가 편성 혐기성 세균으로 인체의 건강에 지대한 영향을 미치고 있다.

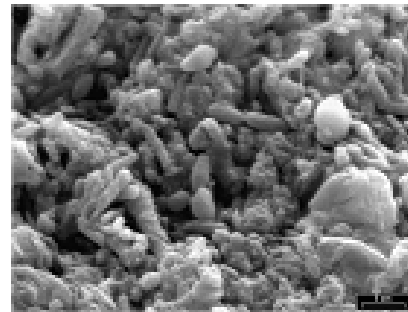


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the fecal sample.

사람은 출생하자마자 약 4시간 후부터 장에 세균이 자라기 시작한다. 세균의 균총은 산모의 균총, 분만 방법, 분만 환경 등에 영향을 받고 특히 모유 수유에 의한 영향을 많이 받는다. 초기에는 대장균, *Streptococcus* 등이 우세하다가 약 3주 후부터는 세균들이 안정되어 *Bifidobacterium*이 우세하게 되는데 *Bifidobacterium*은 유아와 성인에게 모두 가장 유익한 균이다. 유아가 모유 또는 분유를 섭취하느냐에 따라 장내에 섭취하는 균의 종류가 달라지고 장내 환경 및 병의 이환율에 영향을 미친다. 특히, 모유를 먹는 아기는 *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* 등의 *Bifidobacterium*이 전체 장내 세균의 90% 이상을 차지하게 되어 대장균 등 유해균으로부터 보호받고 면역 능력도 향상된다. 분유를 섭취하면 상대적으로 *Clostridia*, *Enterococci*나 *Enterobacteria*와 같은 유해성 세균들이 증가한다. 이유식 이후에 장의 균총은 복잡해지며 *Bifidobacterium*은 줄고 *Bacteroides*라는 다소 유해한 균이 가장 많은 상태가 된다 [7]. 나이가 들어가며 *Bifidobacterium*

의 종류도 바뀌어 *B. adolescentis*가 많은 상태로 변하게 되며 노인이 되면 *Bifidobacterium*은 더욱 줄게 되고 유해균의 대표인 *Clostridium perfringens*라는 세균이 증가한다. 이와 같이 노인의 장내 균총이 유해하게 변하는 것은 장의 운동력이 줄어들고 장내 세균에 의한 유해 물질 생산이 늘어나기 때문이다.

비피더스균을 이용한 장내균총의 조절

비피더스균 및 프로바이오틱스의 섭취시 장관내에서의 생존율은 생리활성을 나타내는데 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 섭취시 위산 및 담즙산에 대한 저항성과 생존율에 대한 연구가 진행되어 왔다. 이러한 특성은 균주 특이적으로 같은 종이라도 균주마다 서로 다른 활성을 보이는 것으로 나타났다 [8]. *B. animalis*를 3.8×10^9 cfu/mL 함유한 발효유를 섭취한 후 위 및 회장에 intestinal tubing으로 시료를 채취하여 생존율을 분석한 결과 위에서는 10^7 이상이 살아남았으며 회장에서는 10^8 이상이 검출되었다 [9]. Kim 등 [10]은 10^9 cfu/g의 *B. bifidum* BGN4를 함유한 대두 발효물을 10일 간격으로 섭취와 비섭취를 반복하면서 각각의 분변의 균총을 조사한 결과 비피더스 섭취시에는 비피더스균의 숫자가 급격히 증가하고 반면에 최우세 균총인 *Bacteroides*의 숫자가 감소하는 결과를 보여주었다. *B. bifidum*을 섭취한 또 다른 실험에서도 섭취한 비피더스의 약 30%가 장내에서 검출되며 섭취를 중지하면 외부에서 투여한 비피더스는 점차 숫자가 감소하여 사라지는 결과를 보였다 [11]. 즉 구강을 통하여 섭취한 비피더스균은 위산과 담즙산을 통과하여 상당량이 장내에 도달하며 이들은 섭취기간에는 주된 장내균총을 섭취할 수 있을 정도로 영향을 미치지만 섭취를 중지하면 정착하지 못하고 washout 되는 것으로 보인다.

비피더스와 변비

변비는 건강할 때에 비하여 변이 굳고 건조하며, 배변의

횟수와 변의 양이 감소되어 불편감이나 생리적 장애를 수반하는 증상이 있는 경우를 말하는데 probiotics의 섭취 목적에서 이러한 증상을 개선하고자하는 부분이 크게 작용한다. 몇몇 연구에서 probiotics의 섭취는 장 내용물의 통과속도를 높이는 것으로 나타났다. *B. animalis*를 10^9 cfu/ml 이상 함유하는 발효유를 375 g/d 섭취한 결과 대조구에 비하여 20% 이상의 통과속도 향상을 보였으며 특히 여성에게 효과가 우수하였다 [12,13]. 열처리한 사균에서는 효과가 나타나지 않아 비피더스의 장내 대사가 이러한 효과에 영향을 미치는 것으로 보인다. 노인을 대상으로 수행한 변비개선효과는 섭취하는 균수와 비례관계가 있었으며 증상이 심한 경우에 개선효과도 더 큰 것으로 나타났다 [14].

비피더스의 항균활성

음식물의 섭취와 함께 장관으로 유입되는 많은 세균들은 잠재적인 감염균을 포함하게 된다. 장내균총은 외래 균들과 서식처 및 영양소 등에 대하여 경쟁하게 되며 이러한 과정을 통하여 host를 보호하는 작용을 수행하게 된다. 비피더스균은 당의 대사를 통하여 lactic acid와 acetic acid의 유기산을 생산하여 항균활성을 나타내게 되지만 이 외에도 다양한 항균활성을 보이는 비피더스균이 보고되었다 [15]. Fujiwara 등 [16]은 *B. longum*에서 분자량 100,000이상인 단백질로 장독소형 *E. coli*의 부착을 방해하는 항균물질을 밝혀내었다. 또한 다른 비피더스에서는 분자량 3,500미만의 항균활성을 보이는 소수성 인자가 보고되기도 하였다 [15]. Gagnon 등 [17]은 비피더스균이 *E. coli* O157 : H7이 Caco-2 혹은 HT-29 cell에 대한 부착을 저해한다고 보고하였으며 그 효과는 균주 및 초기 처리 농도에 따라 달라진다고 하였다. Moroni 등 [18]은 *in vitro* 실험을 통하여 항균활성물질을 생산하는 비피더스균이 *L. monocytogenes*의 Caco-2 혹은 HT-29 세포주에 대한 부착과 침투를 억제한다고 하였으며 그 이유는 경쟁적인 부착능에 있다고 하였다. Lee 등 [19]은 장내에서 분리한 *B. longum*을 실험실적으로 순수

Table 1. Effect of BFSH intake on the composition of human feces

	Non-intake/Intake cycle				
	Before intake	First intake	First non-intake	Second intake	Second non-intake
Microorganism	(Log of CFU per gram wet feces)				
<i>Bifidobacterium</i>	9.0 ± 0.5	9.5 ± 0.5	9.0 ± 0.8	10.0 ± 0.4	9.1 ± 0.8
<i>Bacteroides</i>	9.6 ± 0.4	8.7 ± 1.5	10.1 ± 0.4	9.7 ± 0.3	9.9 ± 0.6
<i>Lactobacillus</i>	ND	7.2 ± 1.4	7.5 ± 1.3	8.0 ± 1.4	7.5 ± 1.2
<i>Clostridium</i>	4.5 ± 0.7	4.8 ± 1.3	5.0 ± 0.6	4.7 ± 0.9	5.3 ± 1.1
<i>E. coli</i>	8.6 ± 0.5	7.6 ± 1.0	7.8 ± 1.0	7.9 ± 2.3	7.6 ± 0.8
Total aerobic bacteria	8.8 ± 0.4	7.5 ± 1.0	8.1 ± 0.8	8.4 ± 0.6	8.4 ± 0.5
Water content (%)	73.6 ± 8.6	70.2 ± 9.1	70.2 ± 8.5	71.7 ± 9.2	73.2 ± 8.9
pH	6.9 ± 0.6	6.8 ± 0.8	6.8 ± 0.9	6.9 ± 1.0	6.5 ± 0.6

All numbers in Mean ± S.D. ND means not determined. Adapted from Kim et al. [11].

배양할 경우 박테리오파지 유전자 등 장내 균총에서의 생존 경쟁에 필요한 유전자 부분이 소실되는 현상을 보고하여 박테리오파지 생산 비피더스균의 분리 및 보관시에 이에 대한 고려도 필요함을 시사하였다.

장내세균과 장점막면역

장내 세균은 대사 물질을 내어 장 점막계에 영향을 주기도 하지만 직접적으로 장 상피세포, Peyer's patches, dendritic 세포 등과 반응하며 숙주의 장내 세포 및 조직에 신호를 주는 것으로 알려져 있다. 장 상피 세포막의 Toll-like receptors (TLRs)는 장내에 존재하는 세균을 인식한다. TLRs [1,7-9] 등은 각각 lipopolysaccharide, peptidoglycan, flagellin, GC oligomer, RNA 등을 인식하는데 반응의 강도 및 지속 시간에 따라 관용 면역 또는 과민성 면역으로 나타날 수 있다 [20]. TLR 반응의 신호가 세포내로 전달되어 nuclear factor(NF)- κ B 등의 염증성 신호가 촉발된 경우에도 일부의 장내 세균은 세포내에서 Toll-interacting protein (Tollip)를 활성화하여 면역 관용을 유도할 가능성이 제기되었다 [20]. 장내 세균이 없는 무균 동물은 면역 관용이 미약하고 아토피 성향을 나타내지만 어린 무균 동물에 *Bifidobacterium* 등의 장내 세균을 도입하면 면역 관용이 회복된다 [21]. 그러나, 일단 성숙한 무균 쥐에서는 *Bifidobacterium*을 도입하여도 면역 관용이 유도되지 않았다 [22].

장내 세균은 면역계에 있어서 중요한 조절 신호를 제공한다는 것이 알려졌고 [23,24], 이러한 효과가 개체의 면역 반응의 양상에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [25]. 예를 들면, 장내 lactobacilli나 bifidobacteria의 수가 적고 clostridia가 많은 어린이들에게서는 아토피피부나 호흡기 과민증 같은 알레르기 증상이 더 많은 것으로 보고 되었다 [26-28]. 일본에서 30명의 알레르기 환자의 분변 균총을 조사한 결과 환자에서 *Bifidobacterium*의 수는 상대적으로 적고 *Staphylococcus*의 수는 많았다 [29]. He 등 [30]은 알레르기를 가진 신생아는 성인의 장 내에서 주요 균으로 서식하는 성인 타입의 *B. adolescentis*가 많이 검출되나, 건강한 신생아에서 *B. bifidum* 및 *B. infantis*가 주로 검출되는 것으로 보고하였다. 특정 장내 세균은 전사 조절 요소인 NF- κ B를 억제하고 조절 T 세포와 T helper cell에 의해 만들어지는 성장 요소인 TGF- β 의 발현을 유도하여 장 면역 시스템의 항염증 반응에 기여한다.

미숙아에 대한 프로바이오틱스의 효과

1.0 kg 이하의 미숙아의 경우 다양한 질병 발생 위험에 노출될 가능성이 높다. 이들 미숙아는 주로 경장 영양에 의존하게 되는데, 이는 종종 항생제 내성 미생물에 의한 패혈증감염 또는 폐와 뇌의 만성적 감염을 일으킨다. 정상 분만아의 경우에 비하여 조산으로 태어난 미숙아의 장내에는 *Bifidobacterium*의 정착이 늦어진다 [31]. 미숙아 장내 세균

의 이상 증식을 억제하는 방법의 하나로서 *B. breve*를 투여하였을 때 장내의 가스 생산을 유의적으로 감소시켰으며 체중 증가의 증진 효과가 나타났다 [32]. Lin 등 [33]은 경장 영양을 받고 있는 미숙아를 대상으로 prospective, masked, randomized control법에 의하여 *Lb. acidophilus*와 *B. infantis*를 모유와 함께 섭취시켰다. 프로바이오틱스 섭취군 (180명)은 모유 섭취 대조군 (187명)에 비하여 과사성 장염과 사망율이 유의적으로 낮았다. 또 다른 연구에서도 비슷한 결과가 얻어졌다. 즉, 약 1.1 Kg의 미숙아를 나누어 72명에게는 *B. infantis*, *St. thermophilus*, *B. bifidum* 등의 프로바이오틱스 혼합제제를 투여하였을 때 과사성 장염이 4% 발생하였고 대조군에서는 16.4%의 과사성 장염이 나타났다. 과사성 장염에 의한 사망한 3명 모두 대조군에서 일어났다 [34].

조산아 장내에서의 프로바이오틱스의 효과는 병원성 균의 억제 이외에도 장 투과성의 감소, 점막 IgA 생산의 증가, 면역 조절 작용에 의한 염증 억제, 영양 상태의 개선 등을 포함할 수 있다. 미숙아에게 가장 적합한 프로바이오틱스의 특징은 아직 밝혀져 있지 않다. 유해 세균 및 로타 바이러스 등의 유해 미생물 증식 억제 물질 생산, 알레르기 및 염증성 장 질환 억제능이 우수하고 장내 정착성이 좋은 프로바이오틱스 균주가 미숙아의 과사성 장염에도 효과가 좋은지는 아직 새로이 연구되어야 한다. 예를 들어, *L. rhamnosus*의 경우 미숙아에 대한 효과는 나타나지 않았다 [35].

비피더스의 유아 설사예방 및 치료효과

WHO에 따르면 세계적으로 약 300만명의 5세 이하 어린이들이 매년 로타바이러스 감염에 의한 설사로 사망하는 것으로 나타나고 있다. 로타바이러스 감염에 의한 설사 발생시 대책으로는 수분과 전해질 공급이 중요하며 최근에는 항로타바이러스 백신이 개발되어 보급되고 있다. 이외에도, 설사를 감소시켜 주는 프로바이오틱스의 작용을 활용하는 연구가 진행되었다. 후진국의 일반 가정에서 활용할 수 있는 경제적이고 손쉬운 프로바이오틱스 활용법 개발이 필요하고 선진국에서는 건강기능식품 또는 처방제로서 활용이 가능한 분야이다. 프로바이오틱스는 병원성 미생물과 경쟁하여 장내의 영양분을 선점할 수 있고, 장 점막 부위에 병원성 균과 경쟁적으로 먼저 부착할 수 있다. 또한 다양한 종류의 항균성 물질을 생산하거나 인체의 면역 증진을 통하여 병원균의 증식을 억제할 수 있다. 이스라엘에서 수행된 이중 맹검법 연구에서 *B. lactis*와 *Lb. reuteri*를 4-10개월 섭취한 군은 대조군에 비하여 발열 발생이 줄어들었고 설사의 빈도와 기간도 단축 되었다. 반면에 호흡기 증상은 차이가 없었다 [36]. 프랑스에서는 생 후 4-6개월의 971명 유아들을 이중 맹검법으로 나누어 5개월 동안 *B. breve*와 *St. thermophilus*로 발효시킨 분유를 섭취한 군은 일반 분유 섭취군에 비하여 성장 정도, 설사 횟수 및 기간은 비슷하였지만 설사의 증상 및 탈수 횟수 등이 줄어들었다 [37]. Saavedre 등은 프로바이오틱스 사용군의 어린이에 대한 안전성을 검사하였다. 이

중 맹검 실험법으로 3-24개월의 건강한 어린이 118명을 대상으로 *B. lactis*와 *St. thermophilus*를 주었을 때 프로바이오틱스 섭취군은 대조군에 비하여 장의 통증, 과민성 증상이 적게 나타났으며 항생제 처방도 줄어들었다. 또한 대상 어린이들은 정상적으로 성장하였으며 안전성 문제는 나타나지 않았다 [38].

Allen 등 [39]은 어린이를 포함한 전 연령층을 대상으로 한 감염성 설사에 대한 프로바이오틱스의 연구를 종합적으로 분석하였다. 분석에 사용한 자료는 적어도 특정한 프로바이오틱스를 대상 placebo와 대조하여 무작위 randomized controlled 연구를 한 경우를 대상으로 하였다. 이와 같이 추출한 21개의 연구를 통하여 1917명의 연구 대상자 결과를 분석한 결과 프로바이오틱스 섭취는 어린이와 어른 모두에서 설사의 증상을 경감시켰다. 분석 대상 중 로타바이러스 설사를 대상으로 하였던 4개의 연구에서는 프로바이오틱스의 효과가 모두 나타났다. 다른 2개의 연구에서는 세균성 설사에 대한 LGG의 효과는 나타나지 않았다. 위 분석에서 사용된 다양한 연구에서 사용한 균주, 사용 균수, 프로바이오틱스의 섭취 방법, 실험 대상자의 상태 및 배경 등에서 연구에 따라 차이가 있었으므로 각 원인별 효과와 특정 균주의 효과는 추가적인 연구가 필요할 것으로 제시하였다. *In vitro* 연구에서 로타바이러스 감염을 억제하는 활성이 우수한 것으로 나타난 *B. longum* BORI를 10⁹ cfu/g 함유한 제품을 로타바이러스에 감염되어 입원 치료중인 유아들에게 경구섭취한 결과 로타바이러스 설사 기간이 유의적으로 줄어들었으며 발연기간, 구토횟수, 설사횟수 등도 줄어드는 것으로 나타났다 [40]. 하지만 프로바이오틱스에 의한 로타바이러스성 설사의 치료 및 예방에 대한 메커니즘을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

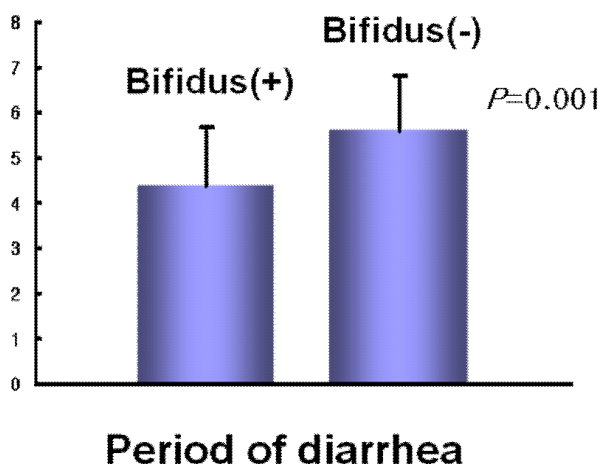


Fig. 3. Reduction of diarrheal period caused by rotavirus infection using *B. longum* BORI [40].

비피더스를 이용한 알레르기 예방

사회가 점차 발달해 가면서 이전에 나타나지 않은 많은

질병들이 생겨나고 있다. 그 중의 하나로 알레르기는 선진국들은 물론 우리나라에서도 가장 급속히 증가하는 질병으로서 우리나라의 경우도 알레르기의 증가가 심화되고 있다 [41-43]. 이러한 원인에 대한 설명으로 위생 가설이 제기되었다. 위생 가설에 의하면 백신, 항생제, 위생 환경의 발전 등은 유년기의 감염성 질환을 감소시켰고 이러한 면역적 자극의 감소는 유아기에 T_H2에서 T_H1 우세로의 전환을 억제하며 T_H2 반응이 강화된 상태로 유지되어 알레르기 발생률이 증가하는 것으로 제안하였다. 그러나, 알레르기 발생에 관한 실제적인 면역은 보다 복잡하여 Th1이 강하게 나타나더라도 알레르기를 악화시킬 수 있고 Tr1 등의 조절 세포 기능이 약하면 염증성 또는 알레르기 성 질환 발생이 높아질 수 있다. 장의 상피 세포 또는 점막 면역 세포들의 세균 인식 분자인 toll-like receptor 들의 면역 반응도 알레르기 조절에 관여할 가능성이 있다. 지금까지 이루어진 역학 조사 및 인체 실험 연구를 분석한 Flohr 등 [44]에 의하면 유아 및 어린이들이 간염, 헬리코박터, 기생충, 결핵, *Herpes simplex* 등에 감염되었을 때 대부분의 경우는 아토피 발생률이 증가하는 것으로 나타났다. 이들 감염은 T_H1을 증가시키는 면역 반응을 유발함에도 불구하고 아토피가 증가하였고 그동안 제시되었던 유아시절의 감염이 알레르기발생을 줄일 것이라는 예상과는 상반되는 결과가 얻어졌다. 반면에 감염을 수반하지 않는 정도의 세균성 endotoxin (lipopolysaccharide)에 노출된 어린이들에게서 아토피의 발생이 낮은 것으로 조사되었다 [45]. 산모의 배속에서는 태아를 보호하기 위하여 태아 면역을 T_H2 우세한 상황으로 유지한다. 태아는 출생과 동시에 여러 가지 박테리아에 접하게 되면서 면역시스템이 전환되어 T_H1 우세형으로 변한다 [46-47]. 이 때 면역적 자극이 너무 약하여 T_H2 우세한 상태로 남아 있거나 과도한 T_H1 면역이 유도되지 않도록 조절하는 것이 필요하다. 조절 작용에 관여하는 세포들 중 T_H3 세포는 transforming growth factor (TGF)-β, Tr1 세포는 IL-10을 통하여 면역 과잉이 일어나지 않도록 한다. TGF-β 생산 장 점막세포도 식품알레르기 억제 작용에 관련하는 것으로 보고되었다 [48]. 이상과 같이 그 동안의 연구 결과를 종합하여 비병원성 미생물들이 장 점막에서 dendritic cell과 반응하여 T_H3, Tr1와 같은 조절 T세포의 활성을 조절함으로써 면역 관용과 알레르기 발생 억제를 유도한다는 가설이 제기되고 있다.

성인의 경우에는 아토피 면역 체계를 바꾸는 것이 한결 어려운 것으로 생각하고 있다. 최근에 발표되고 있는 유아 대상의 임상 연구들은 프로바이오틱스를 이용한 알레르기 면역의 조절로 알레르기 발생을 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다 [49]. 실제로 유산균이 풍부한 전통 발효 식품을 많이 섭취하는 가정에서 자란 아이들은 살균한 식품을 주로 먹는 집안의 아이들에 비해 알레르기를 일으킬 확률이 더 적은 것으로 보고되었다. Hattori 등 [50]은 *Bifidobacterium* 수준이 적고 아토피 피부염을 가진 유아에게 1개월 동안 *Bifidobacterium*을 투여한 결과 알레르기 증상이 상당히 개선됨을 보고하였다. 프로바이오틱 *Lactobacillus*와

*Bifidobacterium*을 투여한 아이들은 아토피가 감소하였고 혈중의 CD4 농도와 혈중 또는 요중의 염증성 지표 물질인 eosinophil cationic 단백질을 감소시켰다 [51,52]. *B. bifidum* BGN4는 동물실험을 통하여 경구섭취시 ovalbumin으로 유도된 알레르기를 감소시키는 것으로 나타났으며 [53] 그 효과는 비피더스의 섭취시기와 매우 밀접한 것으로 보고되었다 [54]. 또한 아토피 가족력이 있는 산모와 그로부터 출산한 신생아에게 BGN4를 포함한 프로바이오틱스 제품을 투여하고 6개월간 추적연구 (a double-blind, randomized, placebo-controlled trial)를 실시한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 아토피 발병률이 절반으로 줄어드는 결과를 보여주었다 [55]. Kim 등은 *B. lactis* AD011과 *Lb. acidophilus* AD031을 ovalbumin으로 유도된 식품알레르기 mouse에 경구 투여한 결과 ovalbumin에 특이적인 IgE, IgG1, IgA의 생산이 억제되고 IL-4의 수준도 유의적으로 낮게 조절되었으며 INF-gamma와 IL-10의 수준은 대조군에 비하여 유의적으로 높게 조절됨을 보여주었다 [56].

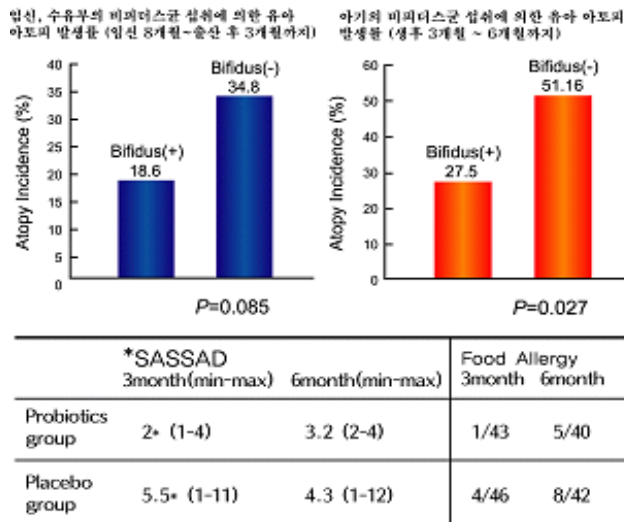


Fig. 4. Reduction of atopic incidence by oral administration of *B. bifidum* BGN4 [56].

비피더스의 유전자 연구

1982년에 이탈리아의 Sgorbati 등 [57]이 bifidobacteria에서 최초로 plasmid를 분리하여 보고한 이래로 비피더스에서 다양한 plasmid의 분리와 이를 이용한 균주개발을 목적으로 다양한 벡터시스템의 개발이 시도되었다. 약 20여종의 plasmid가 비피더스에서 분리되어 염기서열 분석이 되었으며 대개 1.8-10 kb정도의 크기를 보였다 [58-66]. 비피더스 유래의 plasmid는 대부분이 rolling circle mechanism에 의하여 복제되는 것으로 나타났으나 최근에는 theta-type의 복제를 하는 plasmid가 보고되었다 [67]. 이들 중 몇몇은 *E. coli-Bifidobacterium* shuttle vector로 개발 되었으며 외래유전자의 도입이 이용되었다 [65,68-71]. *Bifidobacterium*의 형질

전환에는 electroporation방법을 이용하게 되는데 일반적으로 형질전환 효율이 $10^1 \sim 10^3$ cfu/ugDNA수준으로 매우 낮은 실정이며 이를 개선하기 위한 연구들이 진행 중에 있으며 흥미로운 진전이 이루어지고 있다 [72]. 비피더스균은 매우 안전하며 완전혐기성균인 점을 이용하여 고형암의 hypoxic region으로 항암 유전자를 전달하는 연구가 진행되고 있다. 일본의 Fujimori 등은 cytosine deaminase (CD) 유전자를 도입한 비피더스 형질전환체를 제조하여 혈관주사를 통하여 mouse에 투여하고 prodrug인 5-fluorocytosine (5FC)를 주입하여 고형암세포에서만 선택적으로 CD에 의하여 5-FC를 5-fluorouracil (5FU)로 전환하는 연구를 수행하였다 [73]. 먼저 꼬리 혈관을 통하여 투여된 *Bifidobacterium*은 선택적으로 고형암에서만 발견되었고 기타의 장기에서는 발견되지 않아 암세포 특이적으로 전달됨을 확인하였다. 이들은 *B. longum*, *B. adolescentis* 그리고 *B. breve*에 CD 유전자를 도입하였고 *in vitro* 실험에서 CD 유전자가 발현되는 것을 확인하고 이들 중 *B. longum*에서 실험동물을 통한 *in vivo* 연구에서 이 유전자가 발현되어 암세포의 성장을 억제하는 결과를 보여주어 *Bifidobacterium*을 이용한 고형암 치료법의 가능성을 제시하였다 [74]. 또한 Yi 등은 *B. infantis*에서 다른 발현 시스템을 이용하여 CD/5-FC 요법을 활용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 melanoma 세포의 증식억제 효과가 있음을 확인하였다 [75]. Xu 등은 *Bifidobacterium* 벡터에 endostatin gene을 cloning하여 *B. adolescentis*와 *B. longum*에서 발현하였고 이를 쥐에 주사 (*B. adolescentis*의 경우) 혹은 경구투여 (*B. longum*의 경우)한 결과 liver solid tumor의 성장을 강하게 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 효과는 selenium을 함께 처리하였을 때 더 강하였다고 보고하였는

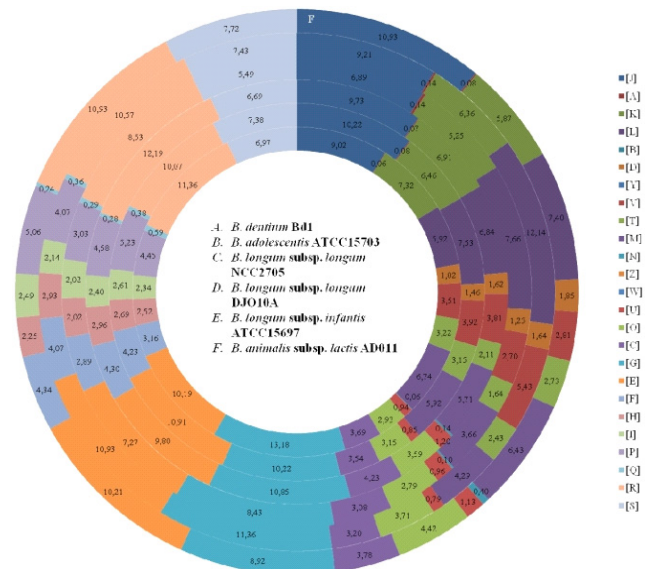


Fig. 5. Comparison of COG functional categories between completely sequenced bifidobacterial genomes. Adapted from PLoS Genet. 2009 Dec; 5 (12) : e1000785. Epub 2009 Dec 24.

데 이는 selenium과 형질전환 비피더스의 처리가 실험쥐의 NK와 T-cell의 활성화와 IL-2와 TNF-알파의 활성을 강화함으로써 나타난다고 하였다 [76,77]. 최근에는 항비만유전자 (oxyntomodulin)를 비피더스에 도입하여 장내로 달리버리 하는 연구가 보고되어 [78] 생명공학을 통한 비피더스의 이용가능성을 유전자치료에 까지 확대하고 있다. 이러한 연구는 최근에 급속도로 진행되고 있는 비피더스 게놈분석과 더불어 기술의 발전에 더욱 가속도를 붙일 것으로 기대된다.

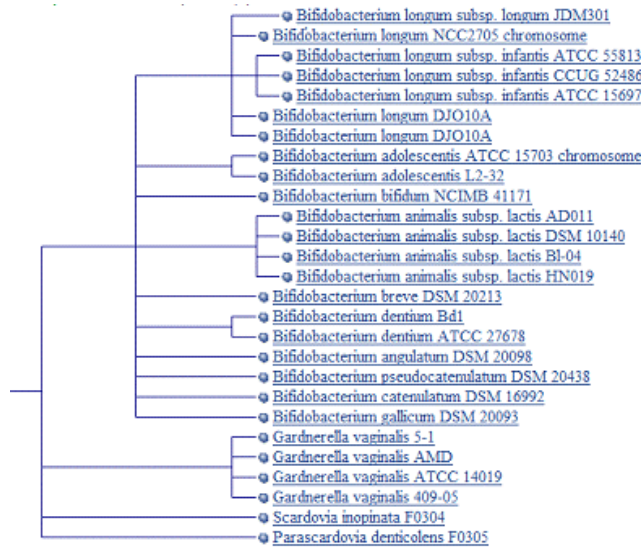


Fig. 6. *Bifidobacterium* strains of which the Genome sequence are determined and being determined (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html).

비피더스와 프로바이오틱스 제품

인간의 장내에 혼재하는 1 kg의 균총의 균형을 바람직한 방향으로 바꾸어줄 수 있는 식품으로는 올리고당을 주성분으로 하는 프리바이오틱스와 *Bifidobacterium*을 포함한 유산균을 이용한 프로바이오틱스가 있다. 프로바이오틱스는 포유류의 장 내에 서식하며 잡균에 의한 이상 발효를 방지하고 장내 환경을 개선하여 음식물의 소화와 흡수를 돕고 대장의 기능을 증진 시키는 유익균으로 역할을 한다. 메치니코프에 의하여 발효유의 유산균들이 정장 작용을 한다는 것이 소개된 이후로 발효유 산업이 지속적으로 성장하여 현재 우리나라에서 연 1조원 이상의 시장을 형성하고 있다. 프로바이오틱스 균들은 일반적으로 유용성을 나타내지만 균의 종류에 따라 정장 능력에 차이가 있다. 예를 들어, 요쿠르트 의 제조에 전통적으로 사용되어 왔던 *St. thermophilus*와 *L. bulgaricus*는 인간의 장 내에서는 생존력이 약하여 정장효과가 미약한 것으로 조사되었다. 따라서, 가장 우수한 균을 선발하여 산업적으로 활용하는 것이 산업적 측면과 소비자 측면에서 모두 중요하다. 우수한 균의 능력으로서는, 우선적으로 장내 정착성이 좋은 것이 필요하며 또한 각각의 생리활성에 대한 특별한 기능성을 발휘하는 것이 바람직하다.

FAO/WHO (세계농업기구/세계보건기구) 합동 프로바이오틱스 전문가 위원회 보고서 [79,80]와 캐나다 보건복지부의 Natural Health Products Directorate [81]에서는 기능성과 안전성을 고려하여 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를 사용하고 *Enterococcus*는 프로바이오틱스 균주로 사용하지 말 것을 권장하였다. 유산균의 성질을 보유하고 있지만 오히려 질병을 일으키는 균들 중에도 유산을 왕성히 생산하는 균들도 있다. 포도상 구균, 병원성 *Enterococcus* 등도 젖산을 왕성히 생산하는 균들이다. *E. faecalis*와 *E. faeicum*은 각각 *Streptococcus faecalis*와 *S. faeicum*과 같은 균으로 이들은 항생제 내성을 쉽게 습득할 수 있고 매우 많은 감염성 질환을 일으키는 병원성 *Enterococcus*와 구별이 쉽지 않다. 정장제로 사용하는 균들 중에 포자 형성균들이 있는데, 이들은 사람의 장 속에서는 정장 작용이 약하다. 또한 일부 정장제로 사용하는 *Clostridium*에 대하여도 UN의 FAO/WHO에서는 프로바이오틱스로 인정하지는 않고 있다. *Bifidobacterium* 또는 *Lactobacillus* 속이라고 하더라도 모두 프로바이오틱스로 인정하는 것은 아니다. *L. rhamnosus*와 *Saccharomyces*의 일부 균주는 임상적 유용성 보고와 아울러 감염 사례가 제기되고 있어 앞으로 유산균의 안전성에 대한 연구도 꾸준히 이루어져야 한다 [82-87]. 제품의 제조 및 유통과 관련하여 유산균의 생균수를 유지할 수 있는 방법이 발전하여야 한다. 따라서, 앞으로 많은 임상적 연구 결과에 입각하여 안전하고 활성이 좋은 프로바이오틱스의 활용이 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 21세기 프론티어 미생물유전체 연구지원사업단의 지원 (MG 08-0303-4-0)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

접수 : 2010년 7월 27일, 게재승인 : 2010년 8월 25일

REFERENCES

1. Tissier, H. (1900) Recherchers sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson. University of Paris, Paris.
2. Jian, W., L. Zhu, and X. Dong (2001) New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1633-1638.
3. Ward, P. and D. Roy (2005) Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait.* 85: 23-32.
4. Satokari, R. M., E. E. Vaughan, H. Smidt, M. Saarela,

- J. Matto, and W. M. de Vos (2003) Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 572-584.
5. Coeuret, V., M. Gueguen, and J. P. Vernoux (2004) Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 147-156.
 6. Berg, R. D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430-435.
 7. Homma, N. (1998) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobact. Microfl.* 7: 35-43.
 8. 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.
 9. Bezkorovainy, A. (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 399S-405S.
 10. Kim, N. J., S. J. Park, E. M. Yum, H. Y. Kim, S. H. Lee, J. H. Min, M. S. Park, and G. E. Ji (2003) Effect of *Bifidobacterium*-fermented soy hypocotyls intake on the composition of human large intestinal bacteria in the elderly. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 178-179.
 11. Kullen, M. J., M. M. Amann, M. J. O'Shaughnessy, D. J. O'Sullivan, F. F. Busta, and L. J. Brady (1997) Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J. Nutr.* 127: 89-94.
 12. Bouvier, M., S. Meance, C. Bouley, J. L. Berta, and J. C. Grimaud (2001) Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic strain *bifidobacterium animalis* DN-173010 on colonic transit times in healthy humans. *Biosci. Microflora.* 20: 43-48.
 13. Marteau, P., E. Cuillerier, S. Meance, M. F. Gerhardt, A. Myara, M. Bouvier, C. Bouley, F. Tondou, G. Bommelaer, and J. C. Grimaud (2002) *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 587-593.
 14. Meance, S., C. Cayuela, A. Raimondi, P. Turchet, C. Lucas, and A. J. M. (2003) Recent advances in the use of functional foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. *Microbiol. Ecol. Health Disease* 15: 15-22.
 15. Lievin, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47: 646-652.
 16. Fujiwara, S., H. Hashiba, T. Hirota, and J. F. Forstner (1997) Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 506-512.
 17. Gagnon, M., E. E. Kheadr, G. Le Blay, and I. Fliss (2004) *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 69-78.
 18. Moroni, O., E. Kheadr, Y. Boutin, C. Lacroix, and I. Fliss (2006) Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6894-6901.
 19. Lee, J. H., V. N. Karamychev, S. A. Kozyavkin, D. Mills, A. R. Pavlov, N. V. Pavlova, N. N. Polouchine, P. M. Richardson, V. V. Shakhova, A. I. Slesarev, B. Weimer, and D. J. O'Sullivan (2008) Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* 9: 247.
 20. Otte, J. M., E. Cario, and D. K. Podolsky (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1054-1070.
 21. Tanaka, K. and H. Ishikawa (2004) Role of intestinal bacterial flora in oral tolerance induction. *Histol. Histopathol.* 19: 907-914.
 22. Sudo, N., S. Sawamura, K. Tanaka, Y. Aiba, C. Kubo, and Y. Koga (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* 159: 1739-1745.
 23. Delneste, Y., A. Donnet-Hughes, and E. J. Schiffrin (1998) Functional foods: mechanisms of action on immunocompetent cells. *Nutr. Rev.* 56: S93-98.
 24. Blum, S., S. Alvarez, D. Haller, P. Perez, and E. J. Schiffrin (1999) Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells. *Anton. Leeuw.* 76: 199-205.
 25. MacDonald, T. T., and S. Pettersson (2000) Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Inflamm. Bowel Dis.* 6: 116-122.
 26. Bjorksten, B., P. Naaber, E. Sepp, and M. Mikelsaar (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy* 29: 342-346.
 27. Bjorksten, B., E. Sepp, K. Julge, T. Voor, and M. Mikelsaar (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 516-520.
 28. Kalliomaki, M., P. Kirjavainen, E. Eorola, P. Kero, S. Salminen, and E. Isolauri (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 129-134.
 29. Watanabe, S., Y. Narisawa, S. Arase, H. Okamatsu,

- T. Ikenaga, and Y. Tagira (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 587-591.
30. He, F., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, H. Hashimoto, Y. Benno, and S. Salminen (2001) Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30: 43-47.
 31. Sakata, H., H. Yoshioka, and K. Fujita (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur. J. Pediatr.* 144: 186-190.
 32. Kitajima, H., Y. Sumida, R. Tanaka, N. Yuki, H. Takayama, and M. Fujimura (1997) Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 76: F101-107.
 33. Lin, H. C., B. H. Su, A. C. Chen, T. W. Lin, C. H. Tsai, T. F. Yeh, and W. Oh (2005) Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 115: 1-4.
 34. Bin-Nun, A., R. Bromiker, M. Wilschanski, M. Kaplan, B. Rudensky, M. Caplan, and C. Hammerman (2005) Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J. Pediatr.* 147: 192-196.
 35. Dani, C., R. Biadaoli, G. Bertini, E. Martelli, and F. F. Rubaltelli (2002) Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol. Neonate.* 82: 103-108.
 36. Weizman, Z., G. Asli, and A. Alsheikh (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 115: 5-9.
 37. Thibault, H., C. Aubert-Jacquelin, and O. Goulet (2004) Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39: 147-152.
 38. Saavedra, J. M., A. Abi-Hanna, N. Moore, and R. H. Yolken (2004) Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 261-267.
 39. Allen, S. J., B. Okoko, E. G. Martinez, G. V. Gregorio, and L. F. Dans (2004) Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Art. No. CD003048.
 40. Shin, K. M., J. Y. Byun, M. S. Park, G. E. Ji, and D. S. Kim (2003) Effect of Lactic acid bacteria on rotaviral enteritis. *Proceedings of the annual meeting of The Korean Society of Food Service Sanitation*. November 08, Seoul, Korea.
 41. Sampson, H. A., L. Mendelson, and J. P. Rosen (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* 327: 380-384.
 42. Ogura, Y., H. Ogura, and N. Zusi (2001) The incidence of food allergy in atopic dermatitis. *Arerugi.* 50: 621-628.
 43. Lee, S. I., M. H. Shin, H. B. Lee, J. S. Lee, B. K. Son, Y. Y. Koh, K. E. Kim, and Y. O. Ahn (2001) Prevalences of symptoms of asthma and other allergic diseases in Korean children: a nationwide questionnaire survey. *J. Korean Med. Sci.* 16: 155-164.
 44. Flohr, C., D. Pascoe, and H. C. Williams (2005) Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? *Br. J. Dermatol.* 152: 202-216.
 45. Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, and E. von Mutius (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347: 869-877.
 46. Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu (2000) CD4 (+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J. Clin. Invest.* 105: 61-70.
 47. Prescott, S. L. (2003) Allergy: the price we pay for cleaner living? *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 90: 64-70.
 48. Perez-Machado, M. A., P. Ashwood, M. A. Thomson, F. Latcham, R. Sim, J. A. Walker-Smith, and S. H. Murch (2003) Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur. J. Immunol.* 33: 2307-2315.
 49. Teitelbaum, J. E. and W. A. Walker (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 107-138.
 50. Hattori, K., A. Yamamoto, M. Sasai, S. Taniuchi, T. Kojima, Y. Kobayashi, H. Iwamoto, K. Namba, and T. Yaeshima (2003) Effects of administration of bifidobacteria on fecal microflora and clinical symptoms in infants with atopic dermatitis. *Arerugi.* 52: 20-30.
 51. Isolauri, E., T. Arvola, Y. Sutas, E. Moilanen, and S. Salminen (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1604-1610.
 52. Rosenfeldt, V., E. Benfeldt, S. D. Nielsen, K. F. Michaelsen, D. L. Jeppesen, N. H. Valerius, and A. Paerregaard (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 389-395.
 53. Kim, H., K. Kwack, D. Y. Kim, and G. E. Ji (2005) Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model.

- FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45: 259-267.
54. Kim, H., S. Y. Lee, and G. E. Ji (2005) Timing of *Bifidobacterium* administration influences the development of allergy to ovalbumin in mice. *Biotechnol. Lett.* 27: 1361-1367.
 55. Kim, J. Y., J. H. Kwon, S. H. Ahn, S. I. Lee, Y. S. Han, Y. O. Choi, S. Y. Lee, K. M. Ahn, and G. E. Ji (2010) Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr. Allergy Immunol.* 21: e386-393.
 56. Kim, J. Y., Y. O. Choi, and G. E. Ji (2008) Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1393-1400.
 57. Sgorbati, B., V. Scardovi, and D. J. Leblanc (1982) Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2121-2131.
 58. Comeau, N., E. Emond, and G. LaPointe (2004) Molecular characterization of three plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Plasmid* 51: 87-100.
 59. Guglielmetti, S., M. Karp, D. Mora, I. Tamagnini, and C. Parini (2007) Molecular characterization of *Bifidobacterium longum* biovar *longum* NAL8 plasmids and construction of a novel replicon screening system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1053-1061.
 60. Lee, J. H. and D. J. O'Sullivan (2006) Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 527-535.
 61. O'Riordan, K. and G. F. Fitzgerald (1999) Molecular characterisation of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 285-294.
 62. Park, M. S., D. W. Shin, K. H. Lee, and G. E. Ji (1999) Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology* 145: 585-592.
 63. Park, M. S., D. W. Shin, K. H. Lee, and G. E. Ji (2000) Characterization of plasmid pKJ36 from *Bifidobacterium longum* and construction of an *E. coli*-*Bifidobacterium* shuttle vector. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 312-320.
 64. Park, M. S., H. W. Moon, and G. E. Ji (2003) Molecular characterization of plasmid from *Bifidobacterium longum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 457-462.
 65. Sangrador-Vegas, A., C. Stanton, D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross (2007) Characterization of plasmid pASV479 from *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* and its use for expression vector construction. *Plasmid* 58: 140-147.
 66. Tanaka, K., K. Samura, and Y. Kano (2005) Structural and functional analysis of pTB6 from *Bifidobacterium longum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 422-425.
 67. Moon, G. S., U. Wegmann, A. P. Gunning, M. J. Gasson, and A. Narbad (2009) Isolation and characterization of a theta-type cryptic plasmid from *Bifidobacterium longum* FI10564. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 403-408.
 68. Moon, G. S., Y. R. Pyun, M. S. Park, G. E. Ji, and W. J. Kim (2005) Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial alpha-amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5630-5632.
 69. Park, M. S., J. M. Seo, J. Y. Kim, and G. E. Ji (2005) Heterologous gene expression and secretion in *Bifidobacterium longum*. *Lait* 85: 1-8.
 70. Rossi, M., P. Brigidi, and D. Matteuzzi (1998) Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. *Let. Appl. Microbiol.* 26: 101-104.
 71. Park, M. S., B. Kwon, J. J. Shim, C. S. Huh, and G. E. Ji (2008) Heterologous expression of cholesterol oxidase in *Bifidobacterium longum* under the control of 16S rRNA gene promoter of bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* 30: 165-172.
 72. Kim, J. Y., Y. Wang, M. S. Park, and G. E. Ji (2010) Improvement of transformation efficiency through *in vitro* methylation and *SacII* site mutation of plasmid vector in *Bifidobacterium longum* MG1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1022-1026.
 73. Yazawa, K., M. Fujimori, J. Amano, Y. Kano, and S. Taniguchi (2000) *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* 7: 269-274.
 74. Fujimori, M. (2006) Genetically engineered bifidobacterium as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer* 13: 27-31.
 75. Yi, C., Y. Huang, Z. Y. Guo, and S. R. Wang (2005) Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 629-634.
 76. Fu, G. F., X. Li, Y. Y. Hou, Y. R. Fan, W. H. Liu, and G. X. Xu (2005) *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid liver cancer. *Cancer Gene Ther.* 12: 133-140.
 77. Xu, Y. F., L. P. Zhu, B. Hu, G. F. Fu, H. Y. Zhang, J. J. Wang, and G. X. Xu (2007) A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 14: 151-157.
 78. Long, R. T., W. S. Zeng, L. Y. Chen, J. Guo, Y. Z. Lin, Q. S. Huang, and S. Q. Luo (2010) *Bifidobacterium* as an oral delivery carrier of oxyntomodulin for obesity therapy: inhibitory effects on food intake and body weight in overweight mice. *Int. J. Obes (Lond)*. 34: 712-719.
 79. Joint FAO/WHO (2001) Expert Consultation on

- “Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria”. pp. 1-32
80. Report of Joint FAO/WHO (2002) Working Group on “Drafting guide lines for the evaluation of probiotics in food”.
 81. Natural Health Products Directorate (2003) “Evidence for safety and efficacy of finished natural health products”.
 82. Notario, R., N. Leardini, N. Borda, T. Gambande, and H. Cerutti (2003) Hepatic abscess and bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus*. *Rev. Argent. Microbiol.* 35: 100-101.
 83. Rautio, M., H. Jousimies-Somer, H. Kauma, I. Pietarinen, M. Saxelin, S. Tynkkynen, and M. Koskela (1999) Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1159-1160.
 84. Mackay, A. D., M. B. Taylor, C. C. Kibbler, and J. M. Hamilton-Miller (1999) *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect* 5: 290-292.
 85. Munoz, P., E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J. M. Eiros, M. J. Perez, M. Sanchez-Somolinos, C. Rincon, J. Hortal, and T. Pelaez (2005) *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis.* 40: 1625-1634.
 86. Presterl, E., W. Kneifel, H. K. Mayer, M. Zehetgruber, A. Makristathis, and W. Graninger (2001) Endocarditis by *Lactobacillus rhamnosus* due to yogurt ingestion? *Scand. J. Infect. Dis.* 33: 710-714.
 87. Burkhardt, O., T. Kohnlein, M. Pletz, and T. Welte (2005) *Saccharomyces boulardii* induced sepsis: successful therapy with voriconazole after treatment failure with fluconazole. *Scand. J. Infect Dis.* 37: 69-72.