

Bifidobacteria의 Caco-2 Cell 정착성에 미치는 영향 인자

김응률 · 정후길 · 전석락 · 유제현*

매일유업(주) 중앙연구소, *건국대학교 낙농학과

Factors Affecting the Adherence of Bifidobacteria to Caco-2 Cell

E. R. Kim, H. K. Jung, S. L. Juhn and J. H. Yu*

R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd

*Department of Dairy Science, Konkuk University

Abstract

Adherence of probiotic bacteria to intestinal epithelium is found to be the most principal characteristics among the various physiological functionality. This study was conducted to investigate the effect of bifidobacterial growth properties and condition on the Caco-2 cell adherence and to construct a basic data on adherence-related research. Among 20 strains of bifidobacteria tested, when measured by cell surface hydrophobicity(CSH) and cell agglutination(CA), *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521, *Bif. adolescentis* K8, and *Bif. infantis* K9 were selected. Using these strains, variations of Caco-2 cell adherence depending upon experimental condition were analyzed. The results obtained are as follows : Even though *Bif. bifidum* ATCC29521, *Bif. adolescentis* K8, and *Bif. infantis* K9 reached more 85% cell surface hydrophobicity there was no significant difference in cell agglutination, when reached 31.54 ± 0.54 mg/ml. By direct count method for adherence, viable cell count of M3, K1, K2, K8, K9, and K10 reached more 100 counts per 100 Caco-2 cells. When *Bif. bifidum* ATCC29521, *Bif. adolescentis* K8, and *Bif. infantis* K9 were used to compare the adherence depending upon viable cell counts, reaction time, and growth phase, the more viable cell count, and the more adhered cell counts, the less adherence percentage. In addition, there was no difference in adherence percentage of bifidobacteria when bifidobacteria was incubated from 1 to 8 hrs after Caco-2 cells already formed monolayer. Considering of the effect of growth phase of bifidobacteria on adherence variation, all strains showed the highest adherence during the early stage of stationary phase. In conclusion, adherence of bifidobacteria was affected by strain specificity, viable cell count, and growth activity.

Key words : bifidobacteria, Caco-2 cell, adherence, factors.

서 론

Bifidobacteria를 포함한 모든 probiotics가 장내에서 생리활성을 발휘하기 위해서는 장내에 정착하여 증식 및 서식할 수 있어야 한다⁽¹⁾. 이러한 장내 세포벽에의 정착성은 인체 장관에 서식하기 위한 중요한 선결 조건으로써, probiotics는 장내세포 표면에 정착하므로써 장내에 서식하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 유산균이 장내세포에 정착하는 능력은 probio-

tics를 선발하는 기준의 하나로 설정되어 있다^(3~5).

현재까지 널리 알려져 이용되는 probiotics로서는 *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* LA1, *Lb. acidophilus* NCFB 1748, *Lb. casei* Shirota 등의 lactobacilli 유산균을 들 수 있다. 이외에 bifidobacteria 균주들도 프로바이오틱 활성을 나타내고 있다⁽⁶⁾. 그러나 단지 몇몇 lactobacilli, 예를 들면 *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. gasseri* ADH, *Lb. acidophilus* BG2FO4 균주만이 장내 정착성에 대해서 연구되어 왔다. 또한 *Bif. lactis* Bb-12의 점막 결합력은 *Lb. rhamnosus* GG와 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*가 존재할 때 더욱 높아지는 것으로 밝혀졌다⁽⁷⁾. 이러한 유산균의 장내 정착에 관여하는 인

Corresponding author : E. R. Kim, R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd. 480, Gagok-ri, Jinwi-myun, Pyungtaek-si, Kyungki-do, #451-860, Korea.

Table 1. Adherence factors of lactic acid bacteria to Caco-2 cell

Sources	Factors	Remarks	References
Enterocyte	Glycoprotein	Mucin, collagen	Alejung et al. ⁽⁸⁾
	Glycolipid	Lactocylamide	Yamamoto ⁽⁹⁾
		Lipoteichoic acid	Op den Camp et al. ⁽¹⁰⁾
	Brush border	Microvilli	Sarem et al. ⁽¹¹⁾
	Mucus	Enterocyte membrane	Mikelsaar et al. ⁽¹²⁾
	Tight junction	Penetration	Hochman & Artursson ⁽¹³⁾
Bacteria	Fermented supernatant	Secreted protein	Coconnier et al. ⁽¹⁴⁾
	Cell surface hydrophobicity	Negative charge(-)	Perez et al. ⁽¹⁵⁾
	Cell membrane	Glycoprotein, glycolipid	Lankaputhra & Shah ⁽¹⁶⁾
	Inoculum size	Capacity dependance	Lehto & Salminen ⁽¹⁷⁾
	Strain specificity	Strain-specific	Lin & Savage ⁽¹⁸⁾
The others	External pH	Acidic pH	Greene & Klaenhammer ⁽¹⁹⁾
	Enzyme	Chymosin, pepsin, trypsin	Greene & Klaenhammer ⁽¹⁹⁾

자를 열거하면 Table 1과 같다.

이와 같이 수많은 연구자에 의해서 탐색되어 온 장 상피세포에 대한 미생물의 정착에는 수많은 인자가 관여하는 것으로 판단되지만, *in vivo* 실험은 어려운 실정이다.

Caco-2 세포는 사람의 enterocyte 기능에 대한 연구에 광범위하게 사용되고 있는데, Caco-2 세포의 장점은 *in vitro* 조건에서 이들 세포가 형태적이고 기능적인 분화를 일으키며, 또한 polarization, 기능성 췌자연(brush border), 그리고 장용모 침단에서 분비하는 hydrolase 등의 성숙한 enterocyte 특성을 나타낸다는 것이다. 세균이 점막세포와 결합하는 데에는 세균의 ligand와 특정 수용체와의 상호작용이 필요하기 때문에 인체 장내의 Caco-2와 HT-29 세포는 실제적으로 세균과 바이러스의 장내 부착을 연구하는데 있어서 가장 유용한 모델이다⁽¹⁴⁾. 그러나 Caco-2 세포를 이용한 정착성 실험 조건과 실험 방법상에서 연구자간에 다소의 차이를 보이기 때문에 정착성 변화를 파악하는데 있어서 객관성이 떨어지는 것이 현실이다.

따라서 본 연구는 *Bifidobacterium*의 Caco-2 세포 정착성에 미치는 영향인자 중에서 bifidobacteriaria 균주의 상태에 따른 정착성 변화를 파악함으로써 정착성과 관련된 연구의 기초자료를 마련하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험균주

Bifidobacteria 균주들은 ATCC 표준균주 8종, 상용균주 1종, 한국인으로부터 분리하여 매일유업(주) 중앙연구소에서 보관중인 11종을 실험에 사용하였다. Bifidobacteria 균주들의 배양은 modified MRS broth(Difco, USA : mMRS broth; 0.05% L-cysteine · HCl, 0.01% calcium chloride, 0.02% sodium carbonate 함유)에 3회 계대배양하여 활력을 높인 균주를 실험에 사용하였으며, 배양조건은 혐기배양장치(Forma Scientific, USA)를 이용하여 37°C, 15 hrs 혐기배양하였다.

세포 표면 소수성과 세포 응집반응

Bifidobacteria의 세포 표면 소수성(cell surface hydrophobicity, CSH)은 Perez 등⁽¹⁵⁾의 방법에 준하여 실험하였다. Bifidobacteria 현탁액 3ml에 동량의 hexadecane(Sigma, USA)을 첨가하여 60초간 잘 혼합한 후, 20분간 방치하여 층이 분리되도록 하였다. 분리된 층 중에서 하층 수용액의 흡광도를 600nm에서 측정하여 세포 표면 소수성을 다음과 같이 계산하였다.

$$CSH(\%) = (A_i - A_f) \times 100 / A_i$$

(A_i =초기 흡광도, $OD\ 1.0 \pm 0.05$; A_f =최종 흡광도).

Bifidobacteria의 세포 응집반응(cell agglutination, CA)은 Fontaine 등⁽²⁰⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. Bifidobacteria 현탁액(OD 1.0)을 10ml 취하여 원심분리(3,000 rpm / 30 min)하여 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 2회 수세 반복한 후 균체를 100°C에서 증량이 일정할 때까지 건조시킨 후, 정량하여 건물 mg/ml를 세포 응집성으로 나타냈다.

Caco-2 세포배양

Caco-2 세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium)에 10% 불활성화된 FCS(fetal calf serum, JRH, USA), 1% non-essential amino acid(GibcoBRL, USA), 1% streptomycin/penicillin (10,000IU/ml, GibcoBRL, USA)이 함유된 배지를 이용하여 배양하였다. 모든 배양은 37°C, CO₂ incubator, Forma Scientific, USA)에서 5% CO₂/95% air 조건으로 배양하였다. 완전한 monolayer가 형성될 때까지 매일 배지를 교환하면서 현미경 관찰을 실시하였다.

직접검경법과 평판배양법에 의한 정착능 측정

직접검경법(direct counting)에 이용되는 Caco-2 세포는 24-well plate에 plastic coverslip (Nalge Nunc International, USA, 13mm, circle)이 장착된 것에 Caco-2 세포를 접종 배양하여 monolayer가 형성된 것을 Tuomola와 Salminen⁽²¹⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. Caco-2 세포는 glass coverslip이 들어 있는 24-well plate에 monolayer가 형성된 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 후, bifidobacteria 현탁액(OD 1.0 at 610nm) 200 μ l에 FCS와 streptomycin/penicillin이 함유되지 않은 incomplete DMEM 1.8 ml를 혼합 첨가하였다. 접종된 well plate는 CO₂ incubator에서 2시간동안 배양하였다. 배양 종료후 PBS로 5회 세척하고 methyl alcohol로 5분간 고정화시킨 다음, Gram 염색을 하여 현미경으로 bifidobacteria의 정착능을 확인하였다. 현미경 하에서 무작위로 20시야를 선정하여 100개의 Caco-2 세포에 정착되어 있는 비피더스 균수를 측정하고 평균치를 구하여 정착능을 계산하였다.

평판배양법(plating)에 이용되는 Caco-2 세

포는 plastic coverslip을 장착하지 않은 24-well plate에 Caco-2 세포를 접종 배양하여 monolayer가 형성된 것을 Konishi 등⁽²²⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. Bifidobacteria 현탁액의 준비는 직접법과 동일하게 하였다. 24-well plate에 monolayer가 형성된 Caco-2 세포를 PBS로 2회 세척한 후, bifidobacteria 현탁액 100 μ l에 FCS와 streptomycin/penicillin이 함유되지 않은 incomplete DMEM 0.4 ml를 혼합 첨가하였다. 접종된 well plate는 CO₂ incubator에서 2시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 PBS로 4회 세척하고 1% Triton X-100(Sigma,USA) 용액을 200 μ l 첨가하여 10분간 교반한 후 다시 800 μ l의 PBS를 첨가하였다. 전체 1ml의 용액을 이용하여 0.85% saline 용액으로 십진희석하여 비피더스 균수를 측정하였다. Caco-2 세포에 대한 bifidobacteria의 정착율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Bifidobacteria 정착율(\%)} = (\text{viable cell count}/\text{초기 비피더스 균수}) \times 100.$$

Bifidobacteria의 정착 조건

Bifidobacteria 균주들과 Caco-2 세포의 정착 조건이 정착능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 bifidobacteria 반응 균수, bifidobacteria의 Caco-2 세포 정착 반응시간, bifidobacteria의 성장단계에 따른 정착능 변화를 측정하였다. 이때 정착능 실험은 평판법으로 실시하였다. 정착 조건 실험에는 *Bif. bifidum* M3, *Bif. longum* M8, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 등을 사용하였다. Bifidobacteria의 첨가 균수에 따른 정착성 변화는 균 현탁액(OD 1.0)을 희석 또는 농축하여 10³~10⁹ cfu/well 범위에서 반응 균수를 조정하였을 때의 정착능을 측정하였다. Bifidobacteria의 Caco-2 세포 정착 반응시간에 따른 정착능 변화는 10⁷ cfu/ml의 균수를 첨가하여 30분부터 24시간까지 CO₂ incubator에 배양하면서 시간대별로 정착능을 측정하였다. Bifidobacteria의 성장단계에 따른 정착능 변화는 mMRS broth에 2% 접종하여 혐기배양 장치에서 배양하면서 시간대별로 균수를 측정하여 성장곡선을 측정하였다. 이때의 각 단계별 시료를 610nm에서 OD 1.0으로 균 현탁액을 제조하여 반응균수를 10⁷ cfu/ml, 정착 반응시간을 2시간으로 하여 정착능을 측정하였다.

결과 및 고찰

Bifidobacteria의 세포 표면 특성과 정착능이 우수한 균주의 선발

1) 세포 표면 소수성과 세포 응집반응

Bifidobacteria의 세포 표면 소수성은 Fig. 1에 나타냈으며, 20개 비피더스 균주 중에서 *Bif. bifidum* ATCC29521(M3), *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 균주가 85% 이상의 세포 표면 소수성을 나타냈다. 또한 이러한 세포 표면 소수성은 subspecies에 따르기보다는 균주 특이성에 더욱 의존되는 것으로 보고되고 있다⁽³⁾. 모든 미생물의 장 상피세포 정착능은 유산균과 상피세포 사이의 흡인력(attractive force) 및 반발력(repulsive force)과의 상호작용의 결과라고 할 수 있다⁽¹⁹⁾. Perez 등⁽¹⁵⁾에 의하면 일부 예외는 있으나, 세포 표면 소수성이 85% 이상인 대부분의 균주들이 정착능과 기타 생리활성 기능이 있다고 하였다.

세포 응집반응은 세포 표면 소수성과 유사한 세포 표면 특성을 측정하는 방법으로 알려져 있다. 모든 실험 균주의 세포 응집반응이 평균 31.45 ± 0.54 dry weight mg/ml로서 균주간에 커다란 차이를 나타내지 않았다. 따라서 세포 응집반응으로 bifidobacteria의 세포 표면 특성

에 따른 균주 간의 특이성을 구분하기는 힘든 것으로 사료되었다. 또한 이러한 세포 응집반응이 세균의 세포 표면에 정착하는 것을 규명하는데 용이한 방법으로 널리 사용되고 있다는 Fontaine 등⁽²⁰⁾의 주장과는 불일치하는 것으로 나타났다.

Bifidobacteria의 Caco-2 세포 정착능

직접검경법을 이용하여 Caco-2 세포에 대한 bifidobacteria 20균주의 장 상피세포 정착능을 측정하였다. 그 결과, Caco-2 세포 100개당 100개 이상의 균수가 측정된 bifidobacteria 균주들은 M3, M10, K1, K2, K8, K9, K10 균주이었다(Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 bifidobacteria의 Caco-2 세포 정착능이 서로 상이하게 나타나는 것은 단백질 성분, 다당류, 이온 전하, lipoteichoic acid 등의 정착인자의 농도와 균주 자체의 생리활성 특성 차이에 기인하는 것으로 생각된다⁽²³⁾. 또한 균종에 따른 정착능의 차이는 일관성이 없는 것으로 나타났기 때문에, 이러한 정착능의 차이는 균주 자체의 차이인 것으로 사료된다.

세포 표면 소수성과 세포 응집반응 및 정착능의 결과를 비교할 때 M3, K8, K9 균주가 모든 조건에서 우수한 결과를 나타냈다. 반면에 선발 과정에서 M10 균주의 경우에 정착능은 우수하였지만 세포 표면 소수성이 매우 낮기 때문에 선발에서 제외하였다. 또한 K1 균주는

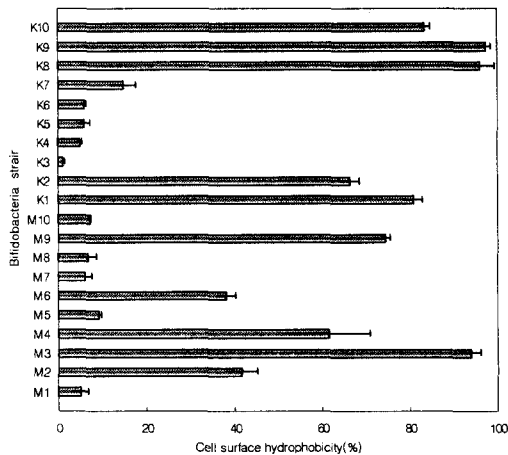


Fig. 1. Comparison of cell surface hydrophobicity(CSH) of bifidobacteria by hexadecane method.

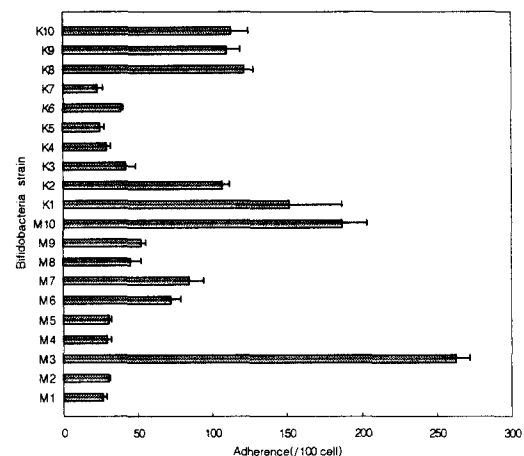


Fig. 2. Adherence activity of bifidobacteria to Caco-2 cell by direct counting method.

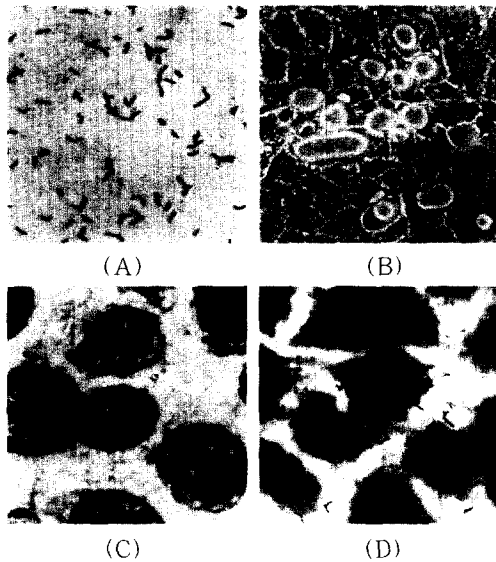


Fig. 3. Photographs of bifidobacteria, intact Caco-2 cell, and adherent bifidobacteria to Caco-2 cell. (A) Morphology of *Bif. infantis* K9 ($\times 1,500$), (B) Morphology of intact Caco-2 cell ($\times 200$), (C) Morphology of Caco-2 cell after Gram staining ($\times 1,500$), (D) Morphology of bifidobacteria adhered to Caco-2 cell ($\times 1,500$).

세포 표면 특성과 정착능이 우수하였지만, 균주 자체의 활력이 매우 낮기 때문에 선발에서 제외하였다.

Fig. 3은 *Bif. infantis* K9 균주, intact Caco-2 cell, stained Caco-2 cell, *Bif. infantis* K9 균주가 정착된 Caco-2 cell의 모습을 광학현미경으로 촬영한 것이다. Bifidobacteria의 Caco-2 세포 정착부위는 매우 다양하지만, 세포 상단의 brush border(microvilli) 및 세포와 세포 사

이의 tight junction에 비피더스 균주가 정착하는 것을 확인할 수 있었다.

정착능이 우수한 bifidobacteria의 선발

미생물의 세포 표면 특성인 세포 표면 소수성과 세포 응집성 및 direct counting법에 의한 Caco-2 세포 정착능을 기준으로 하여 선발한 균주는 *Bif. bifidum* ATCC29521(M3), *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9이며, 대조균으로는 *Bif. longum* M8을 사용하였다. 4개 균주 현탁액(OD 1.0 at 610nm)의 균수는 $1.2 \sim 2.3 \times 10^8$ cfu/ml로서 거의 유사한 숫치를 나타냈으며, 세포 표면 소수성은 *Bif. longum* M8 균주를 제외하고는 90% 이상의 높은 숫치를 나타냈다. 정착능에서도 *Bif. longum* M8 균주를 제외하고는 모두 100개 이상의 높은 숫치를 나타냈지만, 세포 응집성은 유의성을 보이지 않았다(Table 2).

이러한 결과는 세포 표면 특성을 조사하여 정착능을 예비적으로 판단하는 과정에서, autoagglutination과 hemagglutination이 측정되지 않았을 때에는 세포 표면 소수성이 높은 균주라 할지라도 Caco-2 세포에 대한 정착능이 항상 우수한 것은 아니라는 Perez 등⁽¹⁵⁾의 결과와 일치하였다. 그러나 장 세포에 대한 lactobacilli의 정착은 다양한 미생물 세포 표면 특성에 의존한다⁽²¹⁾.

Bifidobacteria의 균수, 반응시간, 성장단계가 정착능에 미치는 영향

1) Bifidobacteria 첨가 균수와 반응시간에 따른 정착능 변화

Table 2. Adherence characteristics of selected bifidobacteria strains

Strains tested	Viable count* (cfu/ml)	CSH** (%)	Agglutination (mg/ml)	Adherence (per 100cell)
M3	1.2×10^8	93.87 ± 1.87	30.98 ± 1.00	263 ± 9
M8	2.3×10^8	6.73 ± 1.59	31.09 ± 0.71	45 ± 8
K8	1.5×10^8	96.10 ± 2.69	32.11 ± 0.48	121 ± 5
K9	1.9×10^8	97.30 ± 1.04	30.76 ± 0.85	110 ± 14

Values are means \pm SD for bifidobacteria strains, respectively

* Viable count at OD 1.0/610nm

** Cell surface hydrophobicity

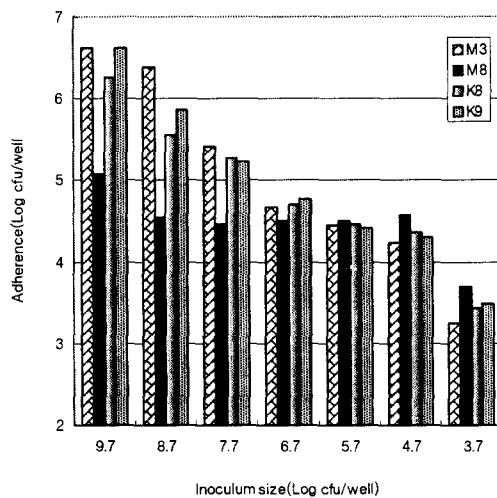


Fig. 4. Changes of bifidobacterial adherence to Caco-2 cell depending upon inoculum size.

비피더스 균주 *Bif. bifidum* M3, *Bif. longum* M8, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9을 이용하여 접종 균수에 따른 정착능 변화를 비교한 결과는 Fig. 4에 나타났다. 각 균주마다 접종되는 균수가 많을수록 정착되는 균수가 높아지기 때문에 농도 의존성인 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 유산균의 정착능이 각각의 균수에 의존한다는 Tuomola와 Salminen⁽²¹⁾의 결과와 일치하였다. 또한 접종균수에 따라서 정착된 비피더스 균수 차이는 접종균수가 5×10^6 cfu/well 이상일 때에는 정착능이 높은 균주와 낮은 균주와의 차이가 현저하게 구분되었

으나, 그 이하일 때에는 정착능의 구분 비교가 어려운 것으로 나타났다.

정착되는 비율은 접종균수가 높아질수록 감소되다가 10^7 cfu/well 이상으로 접종균수가 높아지면서부터 변화폭이 좁아지는 것으로 밝혀졌다. 또한 정착능이 높은 *Bif. bifidum* M3, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 균주와 정착능이 낮은 *Bif. longum* M8 균주와의 정착능에 관계없이 5×10^6 cfu/well에서는 정착율이 0.46~1.18%이었고, 5×10^5 cfu/well에서는 5.2~6.4%로 거의 유사한 숫치를 나타냈다.

따라서 Caco-2 세포에 결합된 유산균수는 첨가된 유산균수와 직접적인 연관성은 있지만, Caco-2 세포에 결합된 유산균수는 첨가된 유산균수의 함수로서 직선적으로 증가한다는 Lehto와 Salminen⁽¹⁷⁾의 결과와는 상이한 것으로 나타났다. 그러나 정착능은 농도 의존성이라고 보고한 Tuomola 등⁽²⁴⁾의 결과와는 일치하는 것으로 사료된다. 또한 Saxelin 등⁽²⁵⁾에 의하면, 유산균의 균체 농도 의존형 정착능을 비교할 때 *in vivo* 상태에서의 서식성은 최적 투여량의 중요성이 지적되고 있다.

비피더스 균주 *Bif. bifidum* M3, *Bif. longum* M8, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9을 이용한 Caco-2 세포와 bifidobacteria의 반응시간에 따른 정착능 변화는 Table 3에 나타났다. Caco-2 세포를 이용한 유산균의 정착능은 많은 연구자들에 의해서 진행되고 있지만 반응시간은 연구자간에 많은 차이를 보이고 있다. 본 실험에서는 0.5시간 반응에서 정착능이 높은

Table 3. Changes of bifidobacterial adherence percentage to Caco-2 cell depending upon the reaction time

Time(hrs)	Adherence percentage(%)			
	Bifidobacteria strains			
	<i>Bif. bifidum</i> M3	<i>Bif. longum</i> M8	<i>Bif. adolescentis</i> K8	<i>Bif. infantis</i> K9
0.5	0.01	0.00	0.00	0.02
1.0	0.20	0.04	0.08	0.20
1.5	0.33	0.04	0.11	0.16
2.0	0.76	0.05	0.26	0.23
4.0	0.69	0.06	0.71	0.43
8.0	0.73	0.06	0.39	0.40
24.0	0.02	0.01	0.16	0.81

그룹의 균주와 낮은 *Bif. longum* M8 균주와의 정착능 차이를 비교할 수 없지만, 정착능이 낮은 *Bif. longum* M8 균주의 경우에는 반응시간에 따른 차이가 거의 없는 것으로 나타났다.

정착능이 우수한 *Bif. bifidum* M3, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 균주에서는 반응 1시간에서 1시간 30분까지는 균주간에 차이를 보이지만, 반응시간에 따른 차이는 보이지 않았다. 반응 2시간대에서 8시간대까지는 정착균수에 대한 차이는 보이지만, 균주간의 우위는 변하지 않는 것으로 나타났다. 정착되는 비율에서도 이러한 경향이 유사하게 나타났다. 그러나 반응 24시간대에는 균주에 따라서 차이는 있지만, 8시간대와 많은 정착균수의 차이를 보이는 것은 Caco-2 세포의 monolayer에 bifidobacteria를 접종하여 5% CO₂ incubator에 반응시키는 과정에서 세포배양 배지인 DMEM 조건과 배양기 내의 대기 조건에서 bifidobacteria의 생존력이 저하되어 일어나는 현상인 것으로 판단되며, 이 때의 균주간의 차이는 생존력에 의한 것으로 사료된다. 따라서 *Bif. infantis* K9 균주가 *Bif. bifidum* M3와 *Bif. adolescentis* K8 균주에 비해서 생존력이 우수하기 때문인 것으로 사료되었다.

결론적으로 반응시간에 따른 정착균수의 차이는 있지만, 반응시간을 2시간으로 하는 것이 가장 합리적인 것으로 나타났으며, 반응시간 1.5시간은 bifidobacteria의 정착 반응시간으로 약간 짧은 것으로 판단되었다.

2) Bifidobacteria의 성장단계에 따른 정착능 변화

비피더스 균주 *Bif. longum* M8과 *Bif. infantis* K9을 이용한 bifidobacteria의 성장단계에 따른 정착능 변화는 Fig. 5에 나타났다. 정착능이 우수한 *Bif. bifidum* M3, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 균주는 유산균의 성장단계와 정착능의 변화 곡선이 유사하게 나타났지만, 정착능이 낮은 *Bif. longum* M8 균주는 유산균의 성장단계별 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 이러한 *Bif. longum* M8 균주의 정착균수가 모든 성장단계에서 낮은 수치로 유사하게 나타난 것은 세척 등의 과정에서 균수가 잔존하기 때문인 것으로 사료되었다.

실험 균주의 성장곡선에서 stationary phase

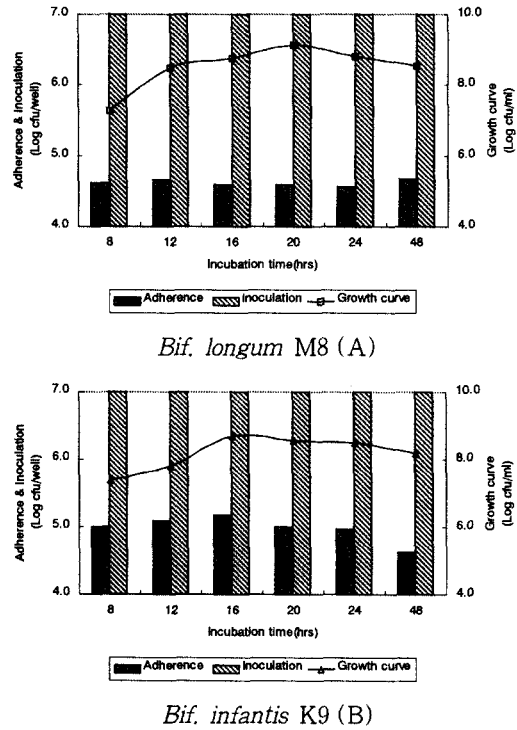


Fig. 5. Changes of bifidobacterial adherence to Caco-2 cell at different growth phase of *Bif. longum* M8(A) and *Bif. infantis* K9(B).

는 배양 12시간에서 20시간까지로서 대부분이 이 시기에서 정착능이 가장 높은 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 lactobacilli 유산균의 정착능이 균주와 생육배지에 따라서 크게 좌우되지만, log phase 초기에 가장 낮고 stationary phase에서 가장 높다고 보고한 Cook 등⁽²⁶⁾의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 lactobacilli 유산균의 정착능과 생존성 사이에는 아무런 상관 관계가 없다는 Tuomola와 Salminen⁽²¹⁾의 보고와는 일치하지 않았다.

또한 정착능에서 가장 우수한 결과를 보인 *Bif. bifidum* M3 균주가 배양 16시간 이전까지 *Bif. adolescentis* K8과 *Bif. infantis* K9 균주에 비해서 정착균수가 낮은 이유는 성장배지에서의 성장이 지연되었기 때문인 것으로 사료된다. 즉, *Bif. bifidum* M3 균주의 stationary phase 초기단계는 다른 균주에 비해서 4시간정도 늦기 때문이다. 따라서 bifidobacteria의 정착인자로서 균의 활력이 관여하는 것으로 사료

되며 가장 높은 정착능을 나타낸 시기는 stationary phase 초기단계인 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 *in vivo*상에서 추론해 보면, 경구를 통해서 bifidobacteria가 섭취되어 위산과 담즙산의 피해 요인을 통한 후 장내로 들어가기 때문에 그 균주의 활력은 더욱 저하될 것이고 따라서 장 상피세포에의 정착을 또한 저하될 것으로 판단된다.

요 약

프로바이오틱 균주의 장내 세포에 대한 정착능은 여러가지 생리활성 기능성 중에서 가장 기본이 되는 것으로 밝혀지고 있다. 본 연구는 bifidobacteria의 특성과 조건이 Caco-2 세포의 정착능에 미치는 영향을 파악함으로써 정착과 관련된 연구의 기초자료를 마련하고자 수행하였다. 20여종의 bifidobacteria의 세포 표면 소수성(CSH)과 세포 응집성(CA)을 측정하여 4종의 균주를 선발하였으며, 선발된 M3, M8, K8, K9 균주를 이용하여 실험 조건에 따른 Caco-2 세포에 대한 정착능 변화를 비교 분석하였다. 실험균주 중에서 M3, K8, K9 균주가 세포 표면 소수성이 85% 이상을 나타냈지만, 세포 응집성에서는 모든 균주가 31.54 ± 0.54 mg/ml로서 유의차가 인정되지 않았다. Direct counting법에 의한 정착능에서는 M3, K1, K2, K8, K9, K10 균주가 세포 100개당 100개 이상의 균수가 측정되었다. *Bif. bifidum* M3, *Bif. adolescentis* K8, *Bif. infantis* K9 균주를 이용하여 정착 실험시의 균주 첨가 균수와 배양시간, 균주 성장단계에 따른 정착능을 비교한 결과, 균주 첨가 균수가 증가할수록 정착되는 균수는 증가하지만 정착율은 매우 낮아지는 것을 알 수 있었다. 또한 monolayer가 형성된 Caco-2 세포에 bifidobacteria를 접종한 후의 배양시간은 1시간대에서 8시간대까지는 변화가 없는 것으로 밝혀졌다. Bifidobacteria의 성장단계에 따른 정착능 변화에서는 모든 균주에서 stationary phase 초기단계에서 균주의 정착능이 가장 우수한 것으로 밝혀졌다. 결론적으로 Bifidobacteria의 정착능에는 균주 특이성과 첨가량, 균의 활성이 중요한 요인으로 작용하였다.

참고문헌

1. Fuller, R. : A review-Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365 (1989).
2. Simon, G. L. and Gorbach, S. L. : The human intestinal microflora. *Dig. Dis. Sci.* 31, 1475(1986).
3. Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R. and Servin, A. L. : Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12), 4121(1993).
4. Brassart, D., Neeser, J. R., Michetti, P. and Servin, A. L. : The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal epithelial cells. In : Proceedings of Lactic '94. pp.201-212. Caen, France(1994).
5. Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E. : Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 5, 53(1996).
6. Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, L., Perman, J. A. and Yolken, R. H. : Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet.* 344, 1046(1994).
7. Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Tikka, S. and Salminen, S. J. : The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 10(2000).
8. Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A. and Wadstrom, T. : Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr. Microbiol.* 28, 231(1994).
9. Yamamoto, K. : Adhesion of lactic acid

- bacteria to cells mediated by sugar chains. *化學と生物*. 36(1), 26(1998).
10. Op den Camp, H. J. M., Peeters, P. A. M., Oosterhof, A. and Veerkamp, J. H. : Immunochemical studies on the lipoteichoic acids of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicus*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 661(1985).
 11. Sarem, F., Sarem-Damerdj, L. O. and Nicholas, J. P. : Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 439(1996).
 12. Mikelsaar, M., Maender, R. and Sepp, E. : Lactic acid microflora in the human microbial ecosystem and its development. In : *Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects*. Eds. Salminen, S. and A. von Wright. 2nd Edn. Marcel Dekker. New York. pp.279(1998).
 13. Hochman, J. and Artursson, P. : Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Controlled Release*. 29, 253(1994).
 14. Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kerneis, S., Bernet, M. F. and Servin, A. L. : Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (6), 2034(1992).
 15. Perez, P. F., Minnard, Y., Disalvo, E. A. and Antoni, G. L. D. : Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1), 21(1998).
 16. Lankaputhra, W. E. V. and Shah, N. P. : Adherence of probiotic bacteria to human colonic cells. *Biosci. Microflora*. 17(2), 105 (1998).
 17. Lehto, E. M. and Salminen, S. : Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus*, and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora*. 16(1), 13(1997).
 18. Lin, J. H. and Savage, D. C. : Host specificity of the colonization of murine gastric epithelium by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 24, 67(1984).
 19. Greene, J. D. and Klaenhammer, T. R. : Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12), 4487(1994).
 20. Fontaine, I. F., Aissi, E. A. and Bouquelet, S. J. L. : *In vitro* binding of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to mucosal glycoproteins and hemagglutinating activity. *Curr. Microbiol.* 28, 325(1994).
 21. Tuomola, E. M. and Salminen, S. J. : Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 45(1998).
 22. Konishi, Y. S., Shibata, K., Yun, S. S., Kudo, Y. H., Yamaguchi, K. and Kumagai, S. : Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(5), 886(1996).
 23. Crociani, J., Grill, J. P., Huppert, M. and Ballongue, J. : Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 146 (1995).
 24. Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J. : Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 159(1999).
 25. Saxelin, M., Ahokas, M. and Salminen, S. : Dose response of the faecal colonisation of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. *Microb. Ecol. Health Dis.* 6, 119(1993).
 26. Cook, R. L., Harris, R. J. and Reid, G. : Effect of culture media and growth phase on the morphology of lactobacilli and on their ability to adhere to epithelial cells. *Curr. Microbiol.* 17, 159(1988).

(2001년 3월 21일 접수)