

Bifidobacteria가 *E. coli* O157:H7의 생육 및 Caco-2 세포 정착에 미치는 영향

김응률* · 정후길 · 전석락 · 유제현¹
매일유업(주) 종양연구소, ¹건국대학교 낙농학과

Effects of Bifidobacteria on the Growth and Caco-2 Cell Adherence of *E. coli* O157:H7. Kim, Eung-Ryool*, Hoo-Kil Jung, Suk-Lak Juhn, and Jae-Hyeun Yu¹. R & D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd., Pyeongtaek 451-861, ¹Department of Dairy Science, Kon-Kuk University, Seoul 143-701 – This study was conducted to investigate the effects of bifidobacteria on the growth and Caco-2 cell-adherence of *Escherichia coli* O157:H7. During momo-culture of *E. coli* O157:H7 and mixed culture with *Bifidobacterium infantis* K9, pH, viable cell count, and ammonia concentration were measured. Co-cultivation of *E. coli* O157:H7 with bifidobacteria, producing acidic metabolites rapidly decreased the viable cell count of *E. coli* O157:H7. In addition, rapid decrease of ammonia concentration was observed during mixed culture after 8 hrs incubation, compared to single culture of *E. coli* O157:H7. Therefore, it is likely that bifidobacteria assimilate ammonia produced by *E. coli* O157:H7. When *B. infantis* K9 were applied onto the Caco-2 cell before or after adherence of *E. coli* O157:H7 P4, *B. infantis* K9 showed quite similar adherence on the Caco-2 cells in either case. On the other hand, adherence of *E. coli* O157:H7 decreased from 2.6% to 1.86%, when *B. infantis* K9 was adhered to Caco-2 cell 2 hrs prior to the application of *E. coli* O157:H7. In conclusion, the adherence of *E. coli* O157:H7 to Caco-2 cell was inhibited by competition of its binding to the adherence site with bifidobacteria. In addition, inhibitory effects of bifidobacteria on *E. coli* O157:H7 appeared to be much higher with increase of the number of bifidobacteria and its ability of adherence to Caco-2 cells.

Key words: Bifidobacteria, *E. coli* O157:H7, growth inhibition, Caco-2 cell adherence

장내에서 유익균으로 대표되는 비피더스균은 그 균수 변동이 스트레스나 질병, 암, 노화 등과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라서, 숙주에 대한 비피더스균의 건강기여 효과가 각광을 받고 있다[6,7,9,13,15,18]. 장내세균 중에서도 유산균은 외래 병원균에 대한 방어자로서 장관 감염과 유해균의 증식을 저지하고, 장관의 환경을 정화하는 기능을 가지고 있다. 이러한 유산균을 함유한 발효유 제품과 유산균 제제는 여러가지 감염에 대한 숙주의 저항성 증강 등의 유용한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 비피더스균의 *E. coli* 생육억제 요인을 요약하면 유산과 초산 생성에 따른 배양액의 낮은 pH[11], *E. coli*가 생성해내는 암모니아의 분해 및 이용[20], 항균물질의 생성[16] 등으로 대별할 수 있다.

이러한 비피더스균이 유익한 효과를 나타내기 위해서는 인체내 장관벽 표면에 정착하여 서식할 수 있어야 하는데 [3], 비피더스균이 세포벽에 정착하는 기작은 연구자에 따라서 다소의 차이는 있지만, 일반적으로 단백질, 다당류, 이

온전화, lipoteichoic acid 등의 정착인자의 농도와 생리활성의 차이에 기인하는 것으로 생각된다[5]. 즉, 유산균의 정착 능은 Caco-2 세포의 brush border와 HT-29MTX 점질물 분비 세포에 의해서 분비되는 점액질에 의해서 나타난다. 비피더스균은 Caco-2 세포에 아무런 손상도 미치지 않으면서 첨단의 미세융모(apical microvilli)와 상호 작용한다. 비피더스균이 Caco-2 세포에 정착하는 과정은 칼슘을 필요로 하지 않으며, 비피더스균 전체 세포와 배양 상등액에 존재하는 단백질성 정착능 중간인자에 의해서 매개된다. 이러한 정착능 중간 인자는 lactobacilli 유산균의 정착능 촉진인자와 마찬가지로 균주 특이성(strain specificity)을 나타낸다[1].

E. coli O157:H7은 식품과 물에 의해서 전염되는 식중독 균으로서, 미국과 일본에서 대량 식중독 사태를 일으킨 바 있으며, 감염시 출혈성 신증후군 및 출혈성 장염 등의 증상을 나타내고 특히 유아나 노약자의 경우에는 치명적인 병원성 세균으로 알려져 있다[21]. 또한 이러한 세계적인 심각성에 힘입어서 국내에서도 수많은 관심이 모아지고 있다. 이러한 *E. coli* O157:H7 감염에 의한 중세는 피가 섞인 대변과 복통, 설사 등이 유발되며, 악화되면 약 5%는 뇌 장애로 사망하고 10%는 신장이나 뇌에 후유증이 남는다[17]. 병원성 대장균인 장관 출혈성 *E. coli* O157:H7이 생성하는

*Corresponding author
Tel. 031-660-9144, Fax. 031-668-0247
E-mail: eungryool@maeil.com

독성 물질인 vero toxin은 장관의 상피세포 표면의 막 위에 있는 탄수화물 사슬을 특이적으로 인식하여 이것에 결합한 후 세포 안으로 들어가게 된다. 또한 유산균과 마찬가지로 병원성 세균도 숙주의 세포막 표면에 존재하는 당단백질이나 당지질의 탄수화물 사슬을 수용체로 하여 세포에 정착한다는 사실이 알려지게 되었다[19].

비피더스균의 *E. coli*에 대한 정착 및 감염억제 효과를 나타내는 기작을 살펴보면, 장 상피세포에 정착하기 위한 정착부위의 경쟁 작용[4], 생육억제 효과에 따른 장내에서의 활력 저하, 면역증강 등의 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 사료된다. 예를 들면, Bernet 등[1]은 인체 유래의 정착성 비피더스균이 다양한 설사 유발성 세균에 의한 장내 세포 서식을 억제하는 효과에 대해서 연구하여 *B. breve* 4 균주가 투여량에 의존하여 enteropathogenic *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium* 균주의 Caco-2 세포 침입을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 비피더스균이 *E. coli* O157:H7의 생육 및 정착에 대해서 억제효과가 있는지를 파악하기 위해서, 비피더스균과 *E. coli* O157:H7을 혼합 배양했을 때의 억제 효과 및 비피더스균의 Caco-2 세포 정착에 따른 억제 효과 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험균주

비피더스균은 modified MRS broth (mMRS broth, 0.05% L-cysteine-HCl, 0.01% calcium chloride, 0.02% sodium carbonate 함유; Difco, USA)에 3회 계대배양하여 활력을 높인 균주를 실험에 사용하였으며, 혐기배양장치(Forma Scientific, USA)를 이용하여 37°C에서 15시간동안 혐기배양하였다. 한편 *E. coli* O157:H7 균주는 1.7% glucose가 함유된 GAM broth(Nissui, Japan)에 3회 계대배양하여 활력을 높인 균주를 사용하였으며, 혐기배양장치를 이용하여 37°C에서 15시간동안 혐기배양하였다. 실험에 사용된 비피더스균과 *E. coli* O157:H7는 Table 1과 같다.

Table 1. List of bifidobacteria and *E. coli* O157:H7 tested

Code No.	Strains tested	Source
M3	<i>B. bifidum</i> KCTC3202 (ATCC29521)	KCTC ^a
M8	<i>B. longum</i>	Korean male, 20 years old
K8	<i>B. adolescentis</i>	Korean female, 20 years old
K9	<i>B. infantis</i>	Korean breast-fed infant, 2 months old
P1	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC43894	ATCC ^b
P2	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC43888	ATCC
P3	<i>E. coli</i> O157:H7 932	Georgia University, USA
P4	<i>E. coli</i> O157:H7 0019	Georgia University, USA
P5	<i>E. coli</i> O157:H7 933	Georgia University, USA

^aKorean Collection for Type Culture, ^bAmerican Type Culture Collection

동시배양

동시배양법은 Kojima 등[10,11]의 방법을 응용하여 실시하였다. 비피더스균과 *E. coli* O157:H7의 단독 또는 혼합 배양 배지로는 1.7% glucose가 함유된 GAM broth를 사용하였다. 활력을 최대로 높인 비피더스균과 *E. coli* O157:H7을 각각 1,710×g에서 10분동안 원심분리하여 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 후, 준비된 혼탁액을 OD_{610nm} 가 1.0이 되게 조정하였다. 균 혼탁액을 GAM broth에 0.1% 단독, 또는 혼합 접종하여 37°C의 혐기배양장치에서 배양하면서, 배양시간별 pH, 균수, 암모니아 농도를 측정하였다. 이때 균수의 측정은 horse blood 5%를 함유한 BL agar medium(Difco, USA)를 이용하여 측정하였다.

암모니아 정량

생육 배지 중의 암모니아 함량은 Ammonia Test Wako Kit (Wako Pure Chemical, Japan)를 이용하여 정량하였으며, 그 방법은 다음과 같다. Deproteinizing reagent solution 4 ml를 15 ml tube에 넣고 blank test용은 2 ml를 넣는다. 그 다음에 시료 또는 표준용액 1 ml를 첨가한 후 교반하여 혼합한다. 1,190×g에서 10분동안 원심분리하여 상동액 2 ml를 새로운 tube에 옮긴 다음, color reagent solution A 2 ml, color reagent solution B 1 ml, color reagent solution C 2 ml를 첨가한 후 잘 혼합하고, 37°C에서 20분동안 배양시킨 후 3분동안 tap water로 냉각시킨다. 냉각후 교반하여 630 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 계산식으로 암모니아 함량을 산출하였다. Ammonia concentration($\mu\text{g}/\text{dl}$) = (Absorbance of sample/Absorbance of standard) × 400.

비피더스균에 의한 *E. coli* O157:H7의 정착 억제 효과

Caco-2 세포를 배양하여 monolayer가 형성된 24-well plate에 균 혼탁액(OD_{610nm} 1.0)을 100 μl (1×10^7 cfu/well) 접종하여 5% CO₂ incubator에서 1시간 30분동안 반응시킨 후, Konishi 등[12]의 방법에 따라서 정착능 실험방법 중의 평판법으로 정착능을 측정하였다. 비피더스균과 *E. coli*

O157:H7은 활력을 최대로 한 군주를 PBS로 혼탁하여 OD_{610nm} 1.0으로 보정한 군 혼탁액을 이용하였으며, 군수의 측정은 BLHB agar medium(5% horse blood 함유 BL agar medium)를 사용하였다. 또한 비피더스균과 *E. coli* O157:H7 군주의 정착시기에 따른 변화를 보기 위하여 동시접종, 비피더스균 정착 1시간 30분 후에 *E. coli* O157:H7 정착시의 반응, *E. coli* O157:H7 정착 1시간 30분 후에 비피더스균 정착시 반응을 보았다.

결과 및 고찰

비피더스균의 *E. coli* O157:H7 생육 억제 효과

B. infantis K9과 *E. coli* O157:H7 P1의 혼합배양시 접종비율에 따른 차이점은 거의 없었으며 그 결과는 Table 2에 나타났다. *B. infantis* K9과 *E. coli* O157:H7의 비율에 상관없이 비피더스균 단독으로 배양된 시료보다는 *E. coli* O157:H7과 혼합 배양된 시료에서 pH의 변화가 큰 것으로 밝혀졌다. 이것은 *B. bifidum*이 *E. coli*의 배양상동액을 성장인자로 이용한다는 Jao 등[8]의 보고와 일치하였다. 그러나 혼합 접종시의 비피더스 군수가 1 × 10⁵ cfu/ml 이하일 때에는 생육억제 효과가 떨어졌으며, 접종군수가 1 × 10⁷과 1 × 10⁶ cfu/ml의 경우에는 생육억제 효과에 대한 시료간의 차이는 없었다. 즉, 최종 pH가 4.4 이하일 때의 *E. coli* O157:H7의 군수는 단독배양 군수에 비해서 약 3 log cycle 이상 감소되었지만, 반면에 pH 4.41-4.46일 때에는 1.5-2 log cycle의 감소된 것으로 볼 때, *E. coli* O157:H7의 성장억제 pH는 4.46에서 4.41 이하인 것으로 판단되었다.

Table 2. Changes of pH and viable cell count during co-cultivation of *B. infantis* K9 with *E. coli* O157:H7 P1

Mixed culture with bifidobacteria and <i>E. coli</i>	pH	Viable cell count (cfu/ml)	
		Bifidobacteria	<i>E. coli</i>
10 ⁷ : 0	4.62	7.9 × 10 ⁸	-
10 ⁶ : 0	4.85	8.3 × 10 ⁸	-
10 ⁵ : 0	4.63	7.2 × 10 ⁸	-
0 : 10 ⁷	4.99	-	3.2 × 10 ⁸
0 : 10 ⁶	5.01	-	3.4 × 10 ⁸
0 : 10 ⁵	5.05	-	4.5 × 10 ⁸
10 ⁷ : 10 ⁷	4.36	1.3 × 10 ⁹	<10 ⁶
10 ⁷ : 10 ⁶	4.35	1.7 × 10 ⁹	<10 ⁶
10 ⁷ : 10 ⁵	4.35	1.1 × 10 ⁹	<10 ⁶
10 ⁶ : 10 ⁷	4.39	1.2 × 10 ⁹	<10 ⁶
10 ⁶ : 10 ⁶	4.37	9.8 × 10 ⁸	<10 ⁶
10 ⁶ : 10 ⁵	4.37	7.3 × 10 ⁸	<10 ⁶
10 ⁵ : 10 ⁷	4.46	7.9 × 10 ⁸	1.3 × 10 ⁷
10 ⁵ : 10 ⁶	4.44	6.8 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁶
0 ⁵ : 10 ⁵	4.41	7.1 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁶

B. infantis K9의 *E. coli* O157:H7 P1 생육 억제 효과

B. infantis K9과 *E. coli* O157:H7 P1을 각각 10⁷ cfu/ml로 접종하여 단독 또는 혼합 배양한 결과는 다음과 같다. 단독 또는 혼합 배양시의 pH의 변화는 *E. coli* O157:H7 군주의 단독시료 및 *E. coli* O157:H7과 비피더스균의 혼합시료가 배양 8시간에 pH 5.5 이하를 나타낸 반면에, 비피더스균 단독시료는 pH 6.1 전후를 나타냈다. 이것은 *E. coli* O157:H7의 lag phase가 짧기 때문에 혼합시료의 경우에도 빨리 변화하는 것으로 생각된다. 또한 비피더스균 단독시료와 *E. coli* O157:H7의 혼합시료의 경우에 배양 12시간 이후에는 pH의 변화 속도 차이를 볼 수 없다(Fig. 1). 이것은 혼합시료의 경우에 비피더스균에 의해 생성된 산성물질에 의해 pH가 떨어지면서 배양 12시간 이후부터 *E. coli* O157:H7을 억제할 수 있을 수준에 도달되었기 때문인 것으로 판단된다. 반면에 *E. coli* O157:H7 단독시료의 경우에는 pH 5.0 이하로 떨어지지 않았다.

또한 배양 시료내의 암모니아 함량은 약 100 µg/dl로 측정되었으며, *E. coli* O157:H7 단독시료의 암모니아 함량은 배양 8시간 이후에 약 500 µg/dl를 유지하였다. 그러나 혼합시료의 경우에는 배양 8시간, 16시간, 24시간대의 암모니아 함량이 각각 521, 496, 408 µg/dl로서 배양이 진행될수록 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이것은 비피더스균이 *E. coli* O157:H7의 암모니아 생성 효소인 L-asparagine deaminase의 활성을 억제시키며, 암모니아를 분해하는 효소인 glutamine synthetase의 활성이 높다고 보고한 Kojima 등[11]의 결과와 일치하였다. 또한 생성된 암모니아는 이러한 분해효소의 활동에 의해서 비피더스균의 성장 촉진 인자로 이용되는 것으로 생각된다. 이것은 대장균의 대사산물인 암모니아와 histamine이 비피더스균의 성장촉진 인자로 이용된다고 보고한 Yamashita 등[20]의 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

단독시료와 혼합시료의 군수를 측정한 결과에서 *E. coli* O157:H7 군수는 배양 8-12시간에 최고에 달하였지만, 비피더스균과의 혼합시료의 경우에는 배양 16시간 이후에 *E. coli* O157:H7의 군수가 급격히 감소되는 현상을 보였다.

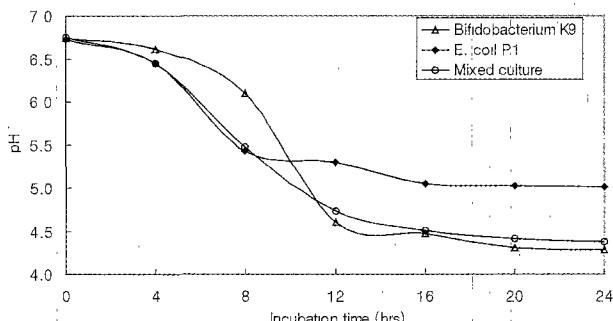


Fig. 1. Change of pH in the media during co-cultivation of *B. infantis* K9 with *E. coli* O157:H7 P1.

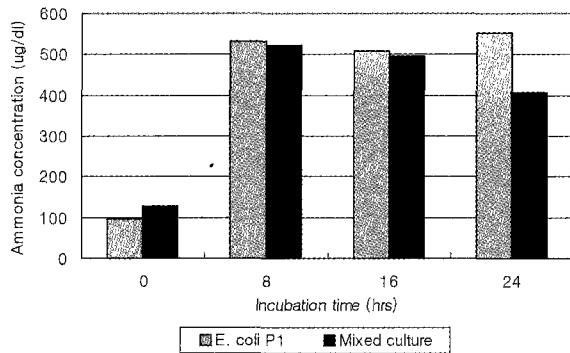


Fig. 2. Changes of ammonia concentration (g/dl) during co-cultivation of *B. infantis* K9 with *E. coli* O157:H7 P1.

이때의 pH는 4.5 이하인 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한 혼합시료의 경우에는 배양 8시간대까지 *E. coli* O157:H7의 군수가 높았지만, 8시간 이후에는 비피더스균의 군수가 높게 나타났고 *E. coli* O157:H7의 군수는 감소된 것으로 나타났다. 반면에 비피더스균 단독시료와 *E. coli* O157:H7 단독시료의 군수는 차이가 있지만, 비피더스균 단독시료의 군수는 배양 12시간 이후부터, *E. coli* O157:H7 단독시료의 군수는 배양 8시간 이후부터 유사한 군수를 나타냈다.

비피더스균의 *E. coli* O157:H7 정착 억제 효과

정착능이 우수한 *B. adolescentis* K8과 *B. infantis* K9, 그리고 정착능이 낮은 *B. longum* M8 군주에 *E. coli* O157:H7을 Caco-2 세포에 단독 또는 혼합으로 정착반응 시켰을 때의 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 비피더스균과 *E. coli* O157:H7의 단독 정착반응에서 *B. infantis* K9 군주의 정착율이 5.82%로 월등히 높게 나타났고, *E. coli* O157:H7에서는 P4 군주가 가장 높은 정착율을 나타냈다. 나머지 *E. coli* O157:H7 군주의 정착율은 0.23-0.26%로 낮게 나타났다.

비피더스균과 *E. coli* O157:H7을 혼합 정착반응시킨 결과, 전반적으로 단독 정착반응시와 유사한 정착율을 나타냈지만, 비피더스균의 정착율은 단독 정착에 비해서 혼합 정착에서 그 정착율이 약간 떨어지는 현상을 보였다. 이것은 *E. coli* O157:H7과 비피더스균이 상호 경쟁적으로 정착 부위를 이용하기 때문인 것으로 판단되며, 이러한 결과는 Lehto와 Salminen[14]의 실험 결과와 일치하는 것으로 사료된다.

이러한 비피더스균과 *E. coli* O157:H7의 단독 또는 혼합 정착반응의 결과를 토대로 하여 정착율이 가장 우수한 *B. infantis* K9과 *E. coli* O157:H7 P4를 선발하였으며, 혼합 정착반응시의 혼합 비율에 따른 정착율을 비교하여 Table 3에 나타냈다. *B. infantis* K9과 *E. coli* O157:H7 군주를 혼합하여 농도에 따라서 정착시켰을 때, 각각의 모든 농도에서 단독 정착반응에 비해서 혼합 정착반응시에 그 정착율이 감소되는 동일한 현상을 보였다. 또한 *B. infantis*

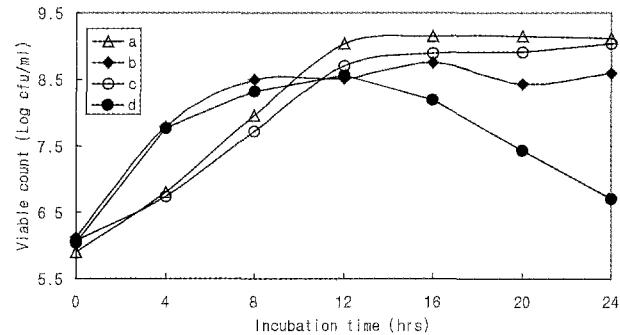


Fig. 3. Change of viable cell count of bifidobacteria and *E. coli* O157:H7 during co- and mono-cultivations.

a, single-culture of *B. infantis* K9; b, single-culture of *E. coli* O157:H7 P1; c, *B. infantis* K9 during co-cultivation; d, *E. coli* O157:H7 P1 during co-cultivation.

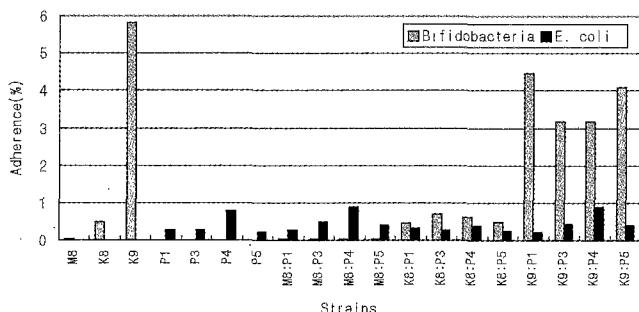


Fig. 4. Change of adherence of bifidobacteria and *E. coli* O157:H7 to Caco-2 cell during single and mixed inoculation. M8-K9, bifidobacteria; P1-P5, *E. coli* O157:H7; Others, mixed culture with bifidobacteria and *E. coli* O157:H7.

K9 군주의 정착율은 10^7 , 10^6 , 10^5 cfu/well 농도에서 거의 유사한 숫자를 나타냈다. 이러한 결과로 볼 때 비피더스균과 *E. coli* O157:H7의 군농도 변화에 따른 연관성이 인정되지 않았기 때문에 *B. breve* 4와 *B. infantis* 1 군주의 투여량에 의존해서 *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium* 군주의 Caco-2 세포 침입을 억제한다는 Bernet 등[1]의 결과와는 일치하지 않았다.

정착시기와 시간에 따른 비피더스균의 *E. coli* O157:H7 저해 효과

B. infantis K9과 *E. coli* O157:H7 P4의 정착 반응시간에 따른 정착군수를 비교한 결과는 Table 4와 같다. *B. infantis* K9 군주의 단독 정착반응에서는 시간이 경과함에 따라서 정착군수의 차이가 없는 것으로 나타났으며, *E. coli* O157:H7 P4는 1.5시간에서 3시간으로 반응시간을 늘렸을 때 정착군수가 증가되는 현상을 보였다. 또한 혼합 정착반응에서도 단독 정착 반응했을 때와 동일한 경향을 나타냈으며, 혼합 정착반응시의 정착군수는 *B. infantis* K9과 *E. coli* O157:H7 P4 군수 모두가 단독 정착 반응시에 비해서

Table 3. Change of adherence of *B. infantis* K9 and *E. coli* O157:H7 P4 when co-inoculated with different inoculum size

Mixed culture with bifidobacteria and <i>E. coli</i>	<i>B. infantis</i> K9	<i>E. coli</i> O157:H7 P4		
	Viable count (cfu/ml)	Adherent percentage (%)	Viable count (cfu/ml)	Adherent percentage (%)
10 ⁷ : 0	2.6 × 10 ⁵	2.17	-	-
10 ⁶ : 0	3.6 × 10 ⁴	3.00	-	-
10 ⁵ : 0	6.0 × 10 ³	5.00	-	-
0 : 10 ⁷	-	-	6.2 × 10 ⁴	0.62
0 : 10 ⁶	-	-	9.9 × 10 ³	0.99
0 : 10 ⁵	-	-	1.71 × 10 ³	1.70
10 ⁷ : 10 ⁷	1.6 × 10 ⁵	1.33	8.0 × 10 ⁴	0.80
10 ⁷ : 10 ⁶	3.1 × 10 ⁵	2.58	5.4 × 10 ³	0.54
10 ⁷ : 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵	2.42	7.0 × 10 ²	0.70
10 ⁶ : 10 ⁷	4.4 × 10 ⁴	3.67	7.5 × 10 ⁴	0.75
10 ⁶ : 10 ⁶	3.3 × 10 ⁴	2.75	6.0 × 10 ³	0.60
10 ⁶ : 10 ⁵	3.5 × 10 ⁴	2.92	5.5 × 10 ²	0.55
10 ⁵ : 10 ⁷	4.1 × 10 ³	3.42	6.8 × 10 ⁴	0.68
10 ⁵ : 10 ⁶	3.4 × 10 ³	2.83	2.1 × 10 ⁴	2.10
10 ⁵ : 10 ⁵	2.1 × 10 ³	1.75	4.5 × 10 ²	0.45

Table 4. Effect of incubation time on the adherence of *B. infantis* K9 and *E. coli* O157:H7 P4 in a mono- or co-culture

Strains tested	Initial count (cfu/well)	Adherence(cfu/well)		
		Reaction time		
		1.5 hrs	2 hrs	3 hrs
A	1.1 × 10 ⁷	2.2 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁵
B	1.1 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁵	1.7 × 10 ⁵	2.6 × 10 ⁵
C	1.1 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	1.9 × 10 ⁵
D	1.1 × 10 ⁷	8.9 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵

A, single-culture of *B. infantis* K9; B, single-culture of *E. coli* O157:H7 P4; C, *B. infantis* K9 in mixed culture; D, *E. coli* O157:H7 P4 in mixed culture

낮은 것으로 나타났다. 이것은 비피더스균과 *E. coli* ETEC 가 장상피세포에 정착하기 위해 정착부위를 경쟁적으로 이용한다는 Chauvire 등[4]의 결과와 일치하였다.

또한 *B. infantis* K9과 *E. coli* O157:H7 P4의 정착 반응시기에 따른 정착균수를 비교한 결과는 Table 5와 같다. *B. infantis* K9 균주를 2시간 전에 정착시킨 후 *E. coli* O157:H7 P4를 정착반응시켰을 때, *B. infantis* K9 균주의 정착능은 동시 정착 반응시와 유사하게 나타났지만, *E. coli* O157:H7 P4 균주의 정착능은 동시 정착 반응시에 비해서 떨어지는 것으로 나타났다. 이렇듯 *E. coli* O157:H7 P4 균주의 정착능이 낮아지는 이유는 *B. infantis* K9 균주가 정착 부위를 미리 점유하고 있기 때문인 것으로 판단된다.

한편 *E. coli* O157:H7 P4 균주를 2시간 전에 정착시킨 후 *B. infantis* K9을 정착 반응시켰을 때, *B. infantis* K9 균주

Table 5. Competition of binding of *B. infantis* K9 and *E. coli* O157:H7 P4 to Caco-2 cells

Inoculation method	Strains tested	Initial count (cfu/well)	Adherence	
			cfu/well	%
A	<i>B. infantis</i> K9	1.1 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁵	1.73
	<i>E. coli</i> P4	3.7 × 10 ⁷	9.8 × 10 ⁵	2.65
B	<i>B. infantis</i> K9	1.1 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁵	1.64
	<i>E. coli</i> P4	3.7 × 10 ⁷	6.9 × 10 ⁵	1.86
C	<i>B. infantis</i> K9	1.1 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁵	1.45
	<i>E. coli</i> P4	3.7 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁵	0.46

A, co-inoculation of *B. infantis* K9 and *E. coli* O157:H7 P4 to Caco-2 cell; B, inoculation of *E. coli* O157:H7 2 hrs after bifidobacteria adherence; C, Inoculation of bifidobacteria 2 hrs after *E. coli* O157:H7 adherence

의 정착능은 동시 정착 반응시와 유사하게 나타났지만, *E. coli* O157:H7 P4 균주의 정착능은 떨어지는 것으로 나타났다. 결론적으로 비피더스균과 *E. coli* O157:H7을 Caco-2 세포에 혼합 반응시켰을 때, 비피더스균은 어떠한 조건에서도 동일한 정착율을 나타냈지만, *E. coli* O157:H7의 정착율은 비피더스균이 2시간 전에 정착되어 있을 때 2.65%에서 1.86%로 감소되는 경향을 보였다. 이것은 *Lactobacillus acidophilus* LA1과 *E. coli*를 혼합 정착반응시킬 때, *L. acidophilus* LA1 균주를 동시에 또는 먼저 정착반응시킨 것이 *L. acidophilus* LA1을 *E. coli* 정착반응 후 나중에 정착시킨 것에 비해서 *E. coli* 정착 억제효과가 더욱 효율적이라고 보고한 Bernet 등[2]의 결과와 일

치하였다. 또한 *E. coli* O157:H7이 미리 정착되었을 때에 정착율이 2.65%에서 0.46%로 감소되는 현상은 경쟁적인 정착반응에 의해 미리 정착된 *E. coli* O157:H7가 비피더스균에 의해 정착 저해되기 때문인 것으로 사료되지만, 비피더스균이 미리 정착되어 있는 *E. coli* O157:H7의 정착 조절에 관한 기작은 앞으로 더욱 많은 연구를 통하여 밝혀져야 한다.

요 약

E. coli O157:H7은 식품과 물에 의해서 전염되는 식중독균으로서 이들이 생성하는 vero toxin이 장관의 상피세포내로 침입되어 질병을 유발시키게 된다. 또한 *E. coli* O157:H7이 체내에 감염되기 위해서는 유산균과 마찬가지로 장상피세포에 정착하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 비피더스균이 *E. coli* O157:H7의 생육 및 정착에 대해서 억제효과가 있는지를 파악하기 위해서, 비피더스균과 *E. coli* O157:H7을 혼합 배양했을 때의 억제 효과, 비피더스균의 Caco-2 세포 정착에 따른 억제 효과 등을 조사하였다. *B. infantis* K9 균주와 *E. coli* O157:H7을 단독 또는 혼합배양하면서 배양시간에 따른 pH, 균수, 암모니아 함량을 측정하였다. 그 결과 배양시간이 경과되어 *B. infantis* K9 균주에 의해서 산성 물질이 생성되면서 *E. coli* O157:H7의 균수는 급격히 감소되는 것으로 나타났다. 한편 암모니아 함량은 *E. coli* O157:H7 단독배양 시료에 비해서 혼합배양 시료에서 8시간 이후부터 감소되는 것으로 볼 때, 비피더스균이 *E. coli* O157:H7이 생성하는 암모니아를 이용하는 것으로 확인되었다. *B. infantis* K9 균주와 *E. coli* O157:H7 P4 균주를 정착시기를 달리하여 Caco-2 세포에 혼합정착시켰을 때, *B. infantis* K9 균주는 정착시기에 상관없이 유사한 정착율을 나타냈다. 반면에 *B. infantis* K9 균주가 2시간 전에 미리 정착되어 있을 때에는 *E. coli* O157:H7 P4 균주의 정착율이 2.6%에서 1.86%로 감소되는 경향을 보였다. 결론적으로 비피더스균의 *E. coli* O157:H7에 대한 생육 및 정착 억제를 검토한 결과, 생육 억제효과는 비피더스균에 의해서 생성된 산성물질에 의해서 pH 4.40 이 하일 때 저해 효과를 보였으며, 비피더스균과 *E. coli* O157:H7이 정착 부위를 동일하게 이용하지만 비피더스균이 우선적으로 정착이 되었을 때 *E. coli* O157:H7의 정착율이 저하되는 결과를 나타냈다.

REFERENCES

- Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4121–4128.
- Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35**: 483–489.
- Bol, J. 1984. The function of *Lactobacillus* as dietary adjuncts. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 193.
- Chauviere, G., M. H. Coconnier, S. Kerneis, A. Darfeuille-Michaud, B. Joly, and A. L. Servin. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 213–218.
- Crociani, J., J. P. Grill, M. Huppert, and J. Ballongue. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 146–148.
- Driessens, F. M. and R. De Boer. 1989. Fermented milks with selected intestinal bacteria : A healthy trend in new products. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 367–382.
- Hoover, D. G. and D. B. Hughes. 1991. Current status and future trends of bifidobacteria related research and products in the USA. *Bifido. Microflora* **10**: 113–121.
- Jao, Y. C., E. M. Mikolajcik, and P. M. T. Hansen. 1978. Growth of *Bifidobacterium* var. *pennsylvanicus* in laboratory media supplemented with amino sugars and spent broth from *Escherichia coli*. *J. Food Sci.* **43**: 1257–1260.
- Kim, H. S. 1988. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Dairy. Prod. J.* **23**: 6–8.
- Kojima, T. A., T. Yaeshima, N. Ishibashi, S. Shimamura, and H. Hayasawa. 1995. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifido. Microflora* **14**: 59–66.
- Kojima, T. A., T. Yaeshima, N. Ishibashi, S. Shimamura, and H. Hayasawa. 1996. Inhibitory effects of human-derived *Bifidobacterium* on pathogenic *Escherichia coli* serotype O-111. *Biosci. Microflora* **15**: 17–22.
- Konishi, Y. S., K. Shibata, S. S. Yun, Y. H. Kudo, K. Yamaguchi, and S. Kumagai. 1996. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 886–888.
- Laroia, S. and J. H. Martin. 1990. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products - A review. *Cult. Dairy. Prod. J.* **25**: 18–22.
- Lehto, E. M. and S. Salminen. 1997. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus*, and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora* **16**: 13–17.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifido. Microflora* **1**: 3–24.
- Siegers, K. and K. D. Entian. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1082–1089.
- Snyder, O. P. 1992. HACCP - An industry food safety self-control program, part III. *Dairy Food Environ. Sanit.* **12**:

- 164–167.
18. Suzuki, V., Y. Kodama, and T. Mitsuoka. 1989. Stress and intestinal flora. *Bifido. Microflora* **8**: 23–38.
19. Yamamoto, K. 1998. Adhesion of lactic acid bacteria to cells mediated by sugar chains. *Agr. Biol. Chem.* **36**: 26–31.
20. Yamashita, M., M. Sasaki, K. Hamada, and H. Ueno. 1976. Studies on growth promoting substances for *L. bifidus* found in cultured medium of *E. coli*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 481–487.
21. Yang, S. J., J. W. Yoon, K. S. Seo, H. C. Koo, S. H. Kim, H. S. Bae, Y. J. Baek, and Y. H. Park. 1999. Effects of *Bifidobacterium longum* HY8001 against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 enteric infection and evaluation of vero cytotoxin neutralizing effects. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 419–425.

(Received May 25, 2001/Accepted Aug. 17, 2001)