

Probiotic 미생물 검사에 사용되는 다양한 방법들에 대한 현황과 향후 전망

†김동현¹ · †김홍석¹ · †정다나¹ · †천정환^{1,2} · †김현숙³ · 김영지¹ · 강일병¹ ·
이수경^{1,4} · *송광영¹ · 박진형¹ · 장호석¹ · †서건호¹

¹건국대학교 수의과대학 식품안전건강연구소, ²미국 식품의약품안전청 국립독성연구센터,
³한양대학교 생활과학대학 식품영양학과, ⁴농림축산검역본부 동식물위생연구부 해외전염병과

Current Status and Prospects of Various Methods used for Screening Probiotic Microorganisms

†Dong-Hyeon Kim¹, †Hong-Seok Kim¹, †Dana Jeong¹,
†Jung-Whan Chon^{1,2}, †Hyunsook Kim³, Young-Ji Kim¹, Il-Byung Kang¹,
Soo-Kyung Lee^{1,4}, *Kwang-Young Song¹, Jin-Hyeong Park¹,
Ho-Seok Chang¹ and †Kun-Ho Seo¹

¹Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

²National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA

³Dept. of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea

⁴Branch of Foreign Animal Disease, Dept. of Animal and Plant Health Research, Animal and Plant
Quarantine Agency, Gyeongsangbukdo, Korea

Abstract

Probiotic microorganisms are thought to provide health benefits when consumed. In 2001, the World Health Organization defined probiotics as "live microorganisms which confer a health benefit on the host, when administered in adequate amounts." Three methods for screening potential probiotics have currently widely available. (1) *In vitro* assays of potential probiotics are preferred because of their simplicity and low cost. (2) The use of *in vivo* approaches for exploring various potential probiotics reflects the enormous diversity in biological models with various complex mechanisms. (3) Potential probiotics have been analyzed using several genetic and omics technologies to identify gene expression or protein production patterns under various conditions. However, there is no ideal procedure for selecting potential probiotics than testing candidate strains on the target population. Hence, in this review, we provide an overview of the different methodologies used to identify new probiotic strains. Furthermore, we describe future perspectives for the use of *in vitro*, *in vivo* and omics in probiotic research.

Keywords

human health, probiotic, *in vitro*, *in vivo*, omics

서론

현재 Probiotic 연구는 새로운 도전에 직면하고 있는데, 이것은 미국과 유럽에서 이전보다 강화된 관련 법규의 적용으로 probiotic의 건강에 대한 연구를 엄격히 제한하고 있기 때문이다(Papadimitriou *et*

Received: October 18, 2016

Revised: October 30, 2016

Accepted: November 1, 2016

†These authors contributed
equally to this study.

*Corresponding author :

Kwang-Young Song, Center for
One Health, College of Veterinary
Medicine, Konkuk University,
Seoul, Korea.

Tel : +82-2-450-4121,

Fax : +82-2-3436-4128,

E-mail : drkysong@gmail.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

al., 2015). 물론 이와 같은 엄격한 규제가 주요 문제는 아닐 수 있지만, 하지만 이것은 새로운 probiotic 균주 및 응용에 상당히 방해하는 요소로 작용할 수 있을 것이다. 왜냐하면, 현재 건강을 유지하고 복원하는 능력 연구에 있어서 미생물의 조작방법으로 많은 새롭고 흥미로운 작용가설이론을 만들 수 있는 metagenomics 연구와 노력이 활발하게 진행되고 있기 때문이다. 우선, 이 metagenomics 연구 결과는 수많은 균주들을 검사하는데 기존의 방식보다 매우 효율적으로 진행할 수 있으며, 또한 다양한 건강 상태를 가진 사람들(예를 들면, 저체중 과비만, 알레르기와 비알레르기 등)과 비교하여 가능성이 있는 새로운 건강증진 세균들을 식별할 수 있다. 여러 가지 새로운 응용 프로그램은 보충 음식물 또는 약품을 통해서 이미 제안되어지고 있다. 또한 *Faecalibacterium prausnitzii* 수준의 향상은 염증성 장질환(IBD)의 환자에 유익으로 제안되어 있으며, *Akkermansia muciniphila*의 사용은 대사장애를 치료할 수 있다고 최근에 특허로 등록되었으며, 자폐증범주성장애(autism spectrum disorders)에 있어서 식이 생리활성 단백질과 펩타이드의 역할은 새로운 probiotic 균주로서 가능성을 가지고 있다(Miquel et al., 2013; Siniscalco and Antonucci, 2013; Cani et al., 2014; Papadimitriou et al., 2015). 오늘날 법규 체계는 이러한 새로운 것들을 적용하는데 능동적으로 대처할 준비가 되지 않는 것이다. 일반적으로 승인을 얻기 위해서는 작용 기전의 완벽한 분석을 요구한다. 즉, 위험의 모든 요소들은 다양한 집단에서, 다양한 용량으로 그리고 다양한 운반형식과 다양한 매트릭스를 사용하여 때 결정될 것이다. 본 총설논문에서 제시된 연구 방법들은 이러한 과정 등을 자세하게 소개하는 것도 목적의 일부분이기도 하다. 여기에 설명된 많은 *in vitro* 방법은 비록 구식으로 생각될지라도, 여전히 비용면에서 저렴하고 윤리적으로 안전하기 때문에 아직도 사용되고 있는 방법들이다. 그리고 새로운 분자 omics 기반 기술의 사용은 빠르게 널리 이용되고 있는데, 이것은 머지않아 전통적인 기존의 검사 방법을 대체할 수 있을 것으로 예상된다(Papadimitriou et al., 2015). 또한 Omics 기술은 현재의 방법인 *in vitro* 또는 *in vivo* 검사 결과로부터 얻어진 probiotic 후보 균주들의 후속 분석에서도 매우 효과적으로 역할을 할 것이다. 예를 들어, 유전체 서열은 항생제 내성 또는 병원성 유전자의 존재를 파악하여 잠재적인 위험을 일으킬 수 있는 균주를 신속하게 발견하고 제거할 수 있기 때문이다. 또한 새로운 연구 방법은 건강 기능성 강조표시(health claim) 또는 약품관련 서류의 작성을 용이하게 하며, 또한 기능성 작용기전의 분석과 설명을 가능하게 할 수 있다. 무엇보다 중요한 것은 이 기술을 사용하면 더 이상 살아있는 미생물이 필요하지 않다는 것인데, 이것은 그들은 활성 화합물로 확인된 활성성분 또는 대사산물에 의해서 대체될 수 있기 때문이다. 이것은 식품에서 약

품제조 영역까지 특정 분야에 응용할 수 있게 될 것이다. 하지만 현재의 probiotic 연구에서 예상되는 것처럼, 어떠한 부작용이 없는 활성 성분으로 변화되는 것이 먼저 밝혀져야 한다는 것이다. 따라서 본 총설논문에서 probiotic 연구에 이용되는 다양한 모델과 연구방법들이 설명되고, 각 방법들의 장점과 한계점 그리고 해결책과 향후 전망이 자세하게 서술되어 있다. 또한 본 총설논문의 모든 자료들은 이미 발표된 다양한 문헌 등을 재정리하여 서술하였다.

Probiotic 연구에 현재 이용되고 있는 *In Vitro*, *In Vivo*, Omics의 이용에 대한 연구 현황

1. Probiotic 연구에 현재 이용되고 있는 *in vitro*에 대한 현황

Probiotic 연구의 초기부터 *in vitro* 검사는 매우 단순하지만 비용면에서 비교적 저렴하기 때문에 가장 선호하는 방법이다. 비록 이러한 검사방법들 가운데 일부는 시대에 뒤떨어진 것처럼 보일 수도 있지만, 이것들은 여전히 사용되고 있으며, 심지어 최근의 연구보고서에도 자주 이용되고 있는 것은 사실이다(Papadimitriou et al., 2015). 무엇보다 *in vitro* 검사의 가장 중요한 장점은 여러 균주들을 동시에 선별할 수 있는 능력일 것이다. 더 자세한 연구내용은 Table 1에 자세하게 정리되어 있다.

2. Probiotic 연구에 현재 이용되고 있는 *in vivo*에 대한 현황

잠재력을 가지고 있는 Probiotic을 탐구하기 위해서 *in vivo* 방법의 이용은 다양하게 복잡한 거대한 생물학적 모델로 설명되어질 수 있을 것이다(Fig. 1). 여기에는 매우 간단한 다세포 생물에서 시작하여 벌레, 무척추동물, 정교하게 knock-out 모델을 적용할 설치류 그리고 최종적으로 다양한 인종별 인간 임상실험까지 넓은 범위가 속한다(Papadimitriou et al., 2015). 여기에 속한 모델들은 귀중한 정보를 제공하기도 하지만, 한 가지 단점으로는 다른 모델의 결과를 통합하는 것은 매우 어려운 숙제로 남아 있다는 것이다. 따라서, probiotic 기능의 최종 평가는 목표대상에서 직접 수행되는 것이 가장 이상적이지만, 하지만 균주들의 예비선택은 가장 적합한 *in vivo* 모델을 사용하여 고가의 임상 실험이 포함되어야 한다는 것이다(Papadimitriou et al., 2015). 더 자세한 연구내용은 Table 2에 자세하게 정리되어 있다.

3. Probiotic 연구에 현재 이용되고 있는 omics에 대한 현황

지난 20년 동안 분자표지인자를 식별하기 위해서 다양한 시도들이 진행되었으며, 특히 probiotic 균주들의 선별에 적용되어서 신속

Table 1. The screening of probiotic strains using by *in vitro* assays

The most recently published articles	The test for screening	The property of probiotics	
Hughes and Hoover (1995)	<i>B</i> -Galactosidase activity	Additional health benefits	
Pompei <i>et al.</i> (2007)	Production of vitamins		
Kullisaar <i>et al.</i> (2002)	Linolenic acid test		
Campieri <i>et al.</i> (2001)	Oxalate-degradation		
Burns and Rowland (2004)	Ames test	Anticancer	
Pool-Zobel <i>et al.</i> (1996)	Comet assay		
Duangjitcharoen <i>et al.</i> (2014)	Nitrosamine degrading assay		
Choi <i>et al.</i> (2006)	Preventing colon cancer cell invasion		
Castro <i>et al.</i> (2010)	Induction of apoptosis of cancer cells		
Faridnial <i>et al.</i> (2010)	Binding to mutagenic compounds		
Nybom <i>et al.</i> (2009)	Removal of toxins and toxic metals		
Cousin <i>et al.</i> (2012)	Bacterial fermentation and production of SCFAs		
Coman <i>et al.</i> (2014)	Production of antimicrobial metabolism such as organic acids and bacteriocins		Antimicrobial assays
Bao <i>et al.</i> (2010)	Co-aggregation with pathogens		
Ewaschuk <i>et al.</i> (2008)	Enhancement of intestinal barrier function		
Zheng <i>et al.</i> (2013)	Deconjugation of bile salts	Cardiovascular diseases	
Lye <i>et al.</i> (2010)	Conversion of cholesterol to coprostanol		
Papadimitriou <i>et al.</i> (2007)	Peptides from bacterial metabolism with ACE inhibitory activity		
Garcia-Cayuela <i>et al.</i> (2014)	Cell surface hydrophobicity	Colonization of the host	
Kinoshita <i>et al.</i> (2013)	Adhesion to mucus		
Botta <i>et al.</i> (2014)	Auto-aggregation screening		
Tassell and Miller (2011)	Adhesion to intestinal epithelium		
Corthesy <i>et al.</i> (2007)	Bacterial translocation in the GT	Immunomodulation	
Cencic and Langerholc (2010)	Co-culture models mimicking <i>in vivo</i> situation		
Steinberg <i>et al.</i> (2014)	Interaction of host immune system with bacterial compounds		
McKay <i>et al.</i> (1997)	Regulation of epithelial tight junctions		
Foligne <i>et al.</i> (2007)	Anti-inflammatory immune-stimulating properties		
Kim <i>et al.</i> (2013)	β -hexosaminidase release assay		
Pisano <i>et al.</i> (2014)	Antibiotic resistance		Safety assays
Pisano <i>et al.</i> (2014)	Hemolytic activity		
Harty <i>et al.</i> (1994)	Adhesion to mammalian cells		
Bernardeau <i>et al.</i> (2006)	Production of enzymes		
Tan <i>et al.</i> (2013)	Production of toxins	Survival stress within the host	
Bover-Cid and Holzapfel (1999)	Production of biogenic amines		
Van den Abbeele <i>et al.</i> (2012)	Low pH and bile		

Source: Papadimitriou *et al.*, 2015

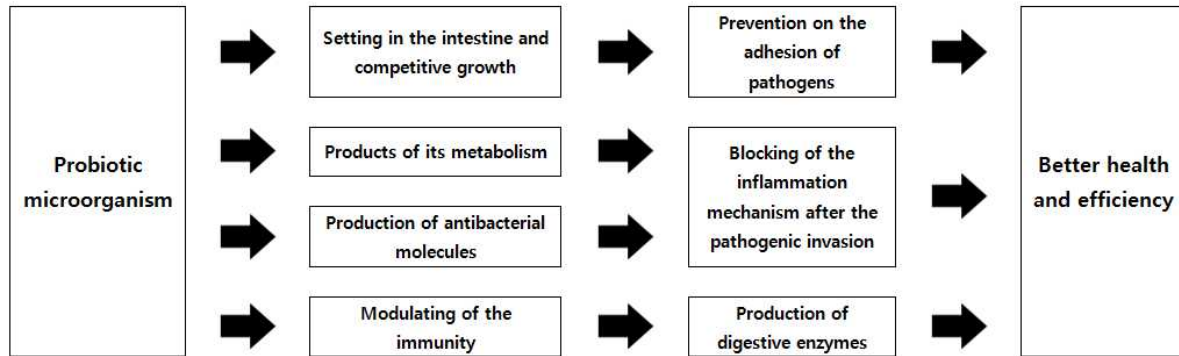


Fig. 1. Mechanism simplified in the positive effects of probiotics on the animal's growth and health.
Source: Papadimitriou *et al.*, 2015

Table 2. The screening of probiotic strains using by *in vitro* assays such as small animals or rodent models

The most recently published articles	The screening of intervention	The functionality of probiotics
Sodhi <i>et al.</i> (2012)	Tissue-specific knock-out	Closely related innate and adaptive immunity
Martin <i>et al.</i> (2008)	Humanized mice	
Verdu and Collins (2004)	Axenic mice	
Eaton <i>et al.</i> (2011)	Monocolonized mice	Hosting complex microbiota
Le Roy <i>et al.</i> (2013)	Microbiota transplantation	
Henao-Mejia <i>et al.</i> (2012)	Co-housing	
Viaud <i>et al.</i> (2013)	Selective antibiotic treatment	
Helm and Burks (2002)	Transgenic mice	Physiological relevance for humans
Kim <i>et al.</i> (2014)	Allergy, inflammation	
Kikuchi <i>et al.</i> (2014)	Bacteria, virus, fungi and parasites pathogens	Responsiveness to many infectious, immune and other disorders
Kwon <i>et al.</i> (2013)	Neurologic disorders	
Hsiao <i>et al.</i> (2013)	Stress, cognitive functions	
Sodhi <i>et al.</i> (2013)	Conditional knock-out	Sharing of similar immune response types

Source: Papadimitriou *et al.*, 2015

Table 3. The screening of probiotic strains using by genetic and omics technologies such as potential gene/protein markers

The most recently published articles	The screening of gene/protein	The function of probiotics
Turpin <i>et al.</i> (2012)	Mub	Cell-surface proteins with cell wall
Turpin <i>et al.</i> (2012)	slpA	S-layer protein
Turpin <i>et al.</i> (2012)	Apf	Aggregation promoting factor
Munoz-Provencio <i>et al.</i> (2012)	srtA	Sortase-dependent surface protein
Turrone <i>et al.</i> (2013)	spaCBA, spaFED, pil2, pil3, fim1, fim2, fim3	Sortase-dependent biosynthesis of pili
Vastano <i>et al.</i> (2014)	FbpA, E1 β -subunit of the pyruvate dehydrogenase complex	Fibronectin binding protein
Westermann <i>et al.</i> (2012)	tad	Assembly of tide adherence pilus

Table 3. Continued

The most recently published articles		The screening of gene/protein	The function of probiotics
Sela <i>et al.</i> (2008)		43 kbp gene cluster	Catabolism of HMOs
Sela <i>et al.</i> (2008)		F1SBPs	Import of oligosaccharides
Yoshida <i>et al.</i> (2012)		β -Galactosidases	Degradations of type-1 and type-2 HMOs
Kim <i>et al.</i> (2009)	Degradation of HMOs and Mucus	Glycosylases	Degradation of HMOs
Shimada <i>et al.</i> (2015)		Glycosyl hydrolases, <i>exo-α</i> -sialidases, fucosidases, PTS systems, ABC-type carriers, specific permeases, <i>engBF</i> , <i>afcA</i> , <i>NagBb</i> , <i>agnB</i>	Mucin degradation
Mack <i>et al.</i> (2003)		<i>adh</i>	Adhesion and stimulation of mucin secretion
Wang <i>et al.</i> (2014)		Soluble protein p40	Stimulation of mucin production
Bauerl <i>et al.</i> (2010)		P40 and p75 proteins and homologues	Activation Akt, promotion of cell growth, inhibition of TNF- α
Gilad <i>et al.</i> (2011)	Modulation of the immune system	<i>ClpB</i> , <i>Rpf</i>	Potential immunogenic proteins
Le Marechal <i>et al.</i> (2014)		SLPs, additional disperse genetic loci	Regulation of anti- or pro-inflammatory immune responses
Turroni <i>et al.</i> (2010b)		<i>ser</i>	Inhibition of elastases
Fanning <i>et al.</i> (2012)		Cell surface-associated EPS	Adaptive immune response and protection against the gut pathogen <i>Citrobacter rodentium</i>
Schlee <i>et al.</i> (2007)		Flagellin	Induction of human β -defensin 2
Corr <i>et al.</i> (2007)	Production of antimicrobial compounds	Bacteriocins	Induction against enterophogens
Meijerink <i>et al.</i> (2010)		Genes involved in plantaricin biosynthesis and secretion	Regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines of DCs
Saulnier <i>et al.</i> (2011)	Production of nutrients and other beneficial processes	Vitamins, essential amino acids, SCFAs	<i>In situ</i> production of important nutrients
Kim <i>et al.</i> (2009)		<i>fos</i>	Processing of health-promoting fructooligosaccharides
Fukuda <i>et al.</i> (2012)		ABC carbohydrate transporters	High production of acetate and protection from enteropathogenic infection
Lee <i>et al.</i> (2010)		<i>ccpA</i>	Influencing blood cholesterol
Jacobi <i>et al.</i> (2012)	Quorum sensing	<i>luxS</i>	Induction of anti-inflammatory cytokines
Moslehi-Jenabian <i>et al.</i> (2011)		<i>luxS</i>	Adhesion and competitive exclusion of pathogens
Fujii <i>et al.</i> (2008)		<i>lamBDCA</i> operon, <i>lamKR</i> operon	<i>agr</i> -like quorum sensing systems
Mitsuma <i>et al.</i> (2008)		Quorum sensing system related peptide	Induction of <i>c-myc</i> and <i>IL-6</i> genes in somatic cells
Hamon <i>et al.</i> (2014)	Stress responses (acid and bile)	Heat shock proteins	Repair of damaged proteins
Hamon <i>et al.</i> (2014)		<i>Clp</i> proteases	Refolding or degrading denatured proteins
An <i>et al.</i> (2014)		<i>uvrB</i> , <i>uvrD1</i> , <i>vsr</i> , helicases	DNA repair
Koponen <i>et al.</i> (2012)		F1F0-ATPase	Decreases of intracellular pH
Jin <i>et al.</i> (2012)		<i>manB</i> , <i>glum</i> , <i>dapA</i> , glycosyltransferases	Peptidoglycan biosynthesis
Koskenniemi <i>et al.</i> (2011)		<i>dit</i> operon	D-alanylation of lipoteichoic acids
An <i>et al.</i> (2014)		<i>fab</i> genes	Fatty acid biosynthesis
Jin <i>et al.</i> (2012)		Etk-like tyrosine kinase, <i>welG</i>	Exopolysaccharide biosynthesis
Hamon <i>et al.</i> (2014)		<i>FabF</i> , <i>RfbB</i> , <i>RfbC</i>	Cell envelope biogenesis
Koponen <i>et al.</i> (2012)		<i>luxS</i>	Cell-to-cell communication
An <i>et al.</i> (2014)		<i>bsh</i>	Deconjugation of bile salts
An <i>et al.</i> (2014)		Transporters	Bile efflux

Source: Papadimitriou *et al.*, 2015

하면서도 정확하게 확인할 수 있게 되었다. 예를 들면, 스트레스와 같은 악조건에서 probiotic 미생물들의 복잡한 적응 메커니즘을 설명하기 위해서, 여러 가지 유전자 및 omics 연구들은 스트레스와 관련된 유전자 발현 및 단백질 생산 형태를 식별하기 위해서 시도가 진행되었다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 더 자세한 연구내용은 Table 3에 자세하게 정리되어 있다.

Probiotic 연구에 있어서 *In Vitro*, *In Vivo*, Omics의 이용에 대한 향후 전망

1. Probiotic 연구에 있어서 *in vitro* 검사의 이용에 대한 향후 전망

건강 기능성 강조표시(health claim)와 연관되어 probiotic 성질을 미리 결정하거나 또는 문서화에 이용될 수 있는 다양한 *in vitro* 방법들이 존재한다. 비록 이와 같은 분석은 probiotic 후보균들을 선별하는데 매우 유용하지만, 그들은 매우 다양한 효과를 나타내고 있다는 것이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 따라서 관련 기관들은 상세한 실험방법과 지침을 문서화하여 *in vitro* 검사의 표준화를 시도하고 있다. 하지만, 현실적으로 *in vitro* 검사가 다분히 임의의 방식으로 수행되고 있음이 관련 문헌조사에서 밝혀졌다. 따라서 이런 것들이 다른 연구자들에 의해서 진행된 연구결과를 상호 비교하는 것을 어렵게 만드는 것이다. 더 나아가서 probiotic 균주의 선별을 위한 *in vitro* 검사의 결과를 전적으로 의존하는 것을 어렵게 만드는 것은 바로 재현성 문제 때문이라고 보고되었다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 물론, *in vivo* 분석이 매우 적합하지만, 대부분의 경우에서 비용과 윤리적인 문제 때문에 고속처리 탐색기술(high throughput screening)을 사용할 수가 없기 때문이다. 따라서, *in vitro* 검사는 새로운 probiotic 균주의 발견에 있어서 매우 중요하며, 필요한 부분으로 여전히 인식되고 있다. 향후 추가 연구에서는 반드시 2가지의 것이 고려되어야 하는데, 첫째는 probiotic 잠재능력을 가진 균주들의 재현성 향상이며, 둘째는 의양성(false positive) 또는 위음성(false negative)의 비율을 낮추는 것이다. 이러한 목적으로 가능하게 이용될 수 있는 실험 방법을 개발하고 표준화시켜야 할 것이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 또한 현재의 *in vitro* 시험의 평가로도 건강증진 특성을 확대할 수 있는 새로운 방법이 반드시 개선되거나 또는 개발되어야 할 것이다.

2. Probiotic 연구에 있어서 *in vivo* 검사의 이용에 대한 향후 전망

동물 모델에 있어서 정확성을 증가시키기 위해서는 인간 유전자의 기능을 가진 세포, 조직 또는 기관 등을 가지고 있는 마우스(multi-

humanized mice)가 고려되어질 수 있다. 인간 세포 또는 조직의 수용체로서 면역결핍 마우스(immune-deficient mice)가 종종 사용되고 있는데, 왜냐하면 그들은 숙주 면역의 결핍 때문에 이종 세포를 수용하는 것이 상대적으로 쉽게 때문이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 전통적으로는 이러한 목적을 위해서는 누드 마우스(nude mice) 및 중증 합병 면역 결핍증(SCID) 마우스가 주로 사용되었는데, 하지만 더 효율적으로 인간의 세포와 조직을 생착할 수 있는 다른 많은 모델들도 존재하고 있다(Ito *et al.*, 2008). 이러한 인간화된 마우스 모델은 인간의 건강과 질환에 있어서 다양한 시나리오에 있어서 인간의 면역 시스템을 모델링하는데 도움을 줄 수 있으며, 또한 인간의 생리에 더 가깝게 설정된 *in vivo*에서 치료용으로 사용된 다양한 후보들의 평가를 가능하게 할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 이렇게 특수하게 인간화된 마우스는 인간 치료를 위해서 생물학적 그리고 의약적인 연구에 있어서 일반적으로 사용되고 있지만, 아직까지는 probiotic 연구에 있어서 자주 이용되고 있는 것은 아니다(Papadimitriou *et al.*, 2015).

숙주의 많은 면역 및 대사 기능을 위한 미생물 균총의 중요성을 감안하여, 인공적으로 만들어진 미생물 균총을 가진 마우스 모델의 개발 및 사용(예를 들면, 인간 미생물균총)은 더 나은 인간 조건을 만들어서 연구하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다. 무균(axenic) 또는 한정성(monoxenic) 마우스의 사용은 위에서 언급한 것처럼 “계란 또는 닭”에 질문을 해명하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 미생물 균총의 유무에 관계없이 식이 개입의 영향은 간접적인 대사 또는 미생물학적인 효과와 대비하여 섭취된 probiotic의 직접적인 영향에 대한 흥미로운 것들을 알 수 있으며, 또는 어떤 계획된 식이개입의 면역체계에 있어서도 직접적으로 영향을 나타낼 수도 있다.

물론 동물 모델을 사용할 경우, 윤리적 문제가 논란이 되고 있는 것은 사실이다. 하지만 최근 네덜란드의 Wageningen 대학에서 이 문제에 대한 해결책으로 흥미로운 결과를 보고하였는데, 이것이 향후 대안으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 이것은 바로 컴퓨터 시뮬레이션과 같은 가상 환경에서의 방법(*in silico* solution)으로서 존재하는 미생물과 상피세포와 돼지 창자, 영양소, 다양한 식품(또는 사료)과의 상호 작용을 설명하는데 사용될 수 있다는 것이다. 수학적 모형에서는 모든 요소들은 상호 양적 종속성을 가진 노드(node)로 간주되어진다. 이러한 모델의 상호작용을 이용하여서 장내 면역, 저항력과 장벽 기능과 연관되어서 높은 수준의 처리공정은 시뮬레이션되어질 수 있으며, 장 항상성(homeostasis)과 같은 조건들도 더 잘 이해될 수 있을 것이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 장기적인 관점에서 이러한 모델은 가설을 검증할 수 있을 정도로까지 역동적이고 예측 가

능한 모델로 발전될 수 있을 것이다.

3. Probiotic 연구에 있어서 omics의 이용에 대한 향후 전망

Probiotic의 특성을 뒷받침하는 분자 메커니즘의 여러 가지 측면들이 밝혀지고 있는 실정이다. 기존의 연구들은 단일 유전자와 단백질의 분자 분석에 의존하는 형식이었다. 하지만 지난 10년 전부터 새롭게 선보인 omics 기술의 출현으로 probiotic 미생물의 연구가 전체 게놈 수준에서 가능하게 되었다(Gueimonde and Collado, 2012). 오늘날, metagenomics 방법은 복잡한 생태계 및 그들의 생물의 구성을 밝히는데 또한 사용되고 있다(Qin *et al.*, 2010; Upadrashta *et al.*, 2011). 인체의 모든 부분들은 특정 구획, 연령과 개인의 식습관 그리고 기타 여러 요인에 따라서 다양하게 나누어진 미생물군집을 가지게 된다(Ravel *et al.*, 2014).

미생물 배양액이 순수하거나 또는 적은 양이 포함된 조건들을 시뮬레이션한 것과 비교하여서 Meta-Omics는 probiotics의 *in vivo* 작용을 이해하기 위한 가장 적절한 첫 번째 방법이다. Omics 기술은 미생물의 유전체 서열보다 저렴하기에 때문에 일반적인 방법으로 널리 이용되어지고 있다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 데이터 베이스에 대용량처리 transcriptomics 및 proteomics을 통해서 새로운 기능 데이터의 통합은 궁극적으로 후보 미생물들의 probiotic으로서의 잠재력을 컴퓨터 시뮬레이션과 같은 가상 환경에서의(*in silico*) 평가를 용이하게 할 수 있을 것이다. 하지만, *in silico* 분석만으로 실험적인 방법을 대체할 수 있다는 전망은 아직은 너무 성급한 예측으로 사료된다. 왜냐하면 probiotic 성질의 분장생물학적 이해가 증가될수록 더 효율적이고 더 정교하게 설계된 *in vivo* 와 *in vitro* 검사를 설계할 수 있기 때문이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 마지막으로, 인간 미생물군집의 목록표 만드는 작업은 이미 잘 알려진 유산균과 bifidobacteria뿐만 아니라, probiotic으로서의 잠재력을 가진 미생물들까지 새로운 목록으로 고려되어서 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

본 총설 논문에서는 새로운 probiotic 균주의 발견과 검출을 위해서 현재 사용되고 있거나, 앞으로 사용될 수 있는 다양한 방법들을 자세하게 소개하였다. 물론 여기에 적용할 수 있는 검사방법은 매우 다양하며 많은 것은 사실이지만, 이것들의 능력 면에서는 많은 차이를 보인다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 어떤 일부의 분석방법들은 균주의 수가 매우 많을 때 매우 적합한 검사방법이며, 반대로 어떤 분석방법들은 균수가 극히 적은 probiotic 성질을 검증하는데 더 적합하기도 하다. 후보 균주들을 직접 검사하는 방법 외에

는 probiotics을 선택하기 위한 완벽한 절차나 순서는 없다(Rijkers *et al.*, 2010). 그러나, 인체 시험의 한계를 고려한다면, 새로운 omics 접근방식과 함께 *in vitro*와 *in vivo*는 중요한 부분이 될 것이다. 인간의 건강을 위해 probiotics를 최대한 활용하기 위해서는 방법론적인 진보(발전)이 반드시 필요하며 진행되어야 하는 부분이다. 예를 들면, 새로운 인간화된 동물 모델은 숙주-미생물간의 상호작용을 연구하는데 반드시 필요할 것이다. 만약 probiotic 연구에서 기술적이고 과학적인 해결을 충족할 수 있기 위해서는, 이러한 기술적인 발전은 반드시 관련 법규와 윤리문제 등을 함께 해결하도록 상호 협력하여 진행되어야 할 것이다(Papadimitriou *et al.*, 2015).

오늘날 대부분의 서구 국가에서는 건강 기능성 강조표시(health claim)를 전부 인정하는 것은 현실적으로 매우 어렵다. 특히 유럽에서는 소비자들에게 광고할 때 “probiotic”이란 용어를 사용할 수 없도록 법으로 금지하고 있다. 식품영역에 있어서도 요구르트의 유당불내증에 대한 건강 기능성 강조표시(health claim)를 제외하고 300개 이상의 건강 기능성 강조표시(health claim)를 전혀 승인을 받지 못한 상태이다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 숙주와 미생물군집과의 더 자세한 반응 메커니즘과 더 심도 깊은 기능과 역학관계를 이해한 후에 관련 필요한 자료 등을 건강 기능성 강조표시(health claim) 평가 위원들에게 제공하였을 때 건강 기능성 강조표시(health claim)를 법적으로 승인받는데 문제가 없을 것으로 기대된다. 특히, 본 총설논문에서 언급된 다양한 기술적인 진보(발전) 등이 향후 이런 것들을 담당하는데 크게 기여할 것으로 사료된다. 현재 상업적으로 아직 이용되고 있지 않은 *F. prausnitzii* 또는 *A. muciniphila*와 같은 것들이 새로운 형태의 probiotics로 고려되어지는 것은 매우 중요하다(Papadimitriou *et al.*, 2015). 본 총설논문에서는 생산공정의 중요성에 관해서는 거의 다루어지지 않았다. 향후에 극도의 혐기적 미생물들인 *F. prausnitzii* 또는 *A. muciniphila*을 고려한다면, 소비자 또는 환자들에게 다양한 활력 균주의 전달을 확신할 수 있는 새로운 생산공정, 개량된 저장기술 그리고 관리 전략 등을 충족시킬 수 있는 probiotic 생산은 매우 중요한 부분이 될 것이다. 여러 논문들에서도 probiotic을 준비할 때 산업적 처리공정은 숙주의 기능성에 근본적인 영향을 준다는 것들이 이미 밝혀졌다(Lebeer *et al.*, 2011; 2012; Bron *et al.*, 2012). 왜냐하면 생존 능력, 섬모의 유무, 세포벽 조건, probiotic의 매트릭스 또는 성장단계 등의 여러 가지 요인들은 숙주와 상호작용과 역할에 중요한 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 따라서 probiotic의 작용 메커니즘이라 함은 생산공정에서 결정적인 매개변수들을 포함하고 있음을 의미하는 것이다(Papadimitriou *et al.*, 2015).

의심할 여지도 없이, omics 기술의 지속적인 개발은 전통적인 *in vitro*와 *in vivo* 모델이 현재 직면하고 있는 한계성을 완화하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 비록 게놈 및 metagenomic 정보로부터 직접 probiotic 기능성을 예측할 수 있기 전에는 시간이 많이 소요될 수도 있겠지만, 관심 있는 *in vitro* 또는 *in vivo* 연구에서 omics 방식의 연속 사용은 향후 probiotics 분야에서 연구 진행속도를 급속하게 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요약

지난 수십 년 동안 행복과 건강에 있어서 식품의 긍정적인 역할에 대한 소비자들의 관심과 인식의 증가 등의 이유로 기능성 식품의 생산 방향으로 식품산업이 변화되어가고 있다. Probiotic 식품의 정의에 의하면, 소비자들의 건강에 도움을 줄 수 있는 충분한 양의 살아있는 미생물을 반드시 포함해야 된다고 규정하고 있다. 오늘날 많은 probiotic 식품들이 판매되고 있으며, 또한 다양한 probiotic 균주들은 상업적으로 이용되고 있다. 하지만, 미생물들의 실제적으로 잠재적인 능력을 어떻게 평가하는 것은 매우 관심을 가지는 부분이다. 왜냐하면 최근 관련 문헌의 검사에서도 알 수 있듯이, probiotic 관련 연구가 급속하게 증가하고 있기에 더욱더 이 부분은 중요하게 인식되어지고 있다. 비록 대부분의 probiotic 미생물들은 식품 또는 공생세균으로서 일반적으로 안전하다고 여겨지고 있지만, 그 외의 재료들에서 얻은 probiotics는 법적인 규제와 안전문제에 대한 우려가 더욱더 증가되고 있는 것은 사실이다. Probiotic으로서 잠재력을 가진 균주들은 *in vitro* 또는 *in vivo* 검사를 통해서 선별되어질 수 있다. 예를 들면, 위장 또는 담즙과 같은 산성의 조건에서도 생존능력은 간단한 실험을 통해서 평가될 수 있으며, 또는 면역 활성화, 신진대사 기능 또는 장-뇌 상호작용과 같은 복잡한 숙주 기능에서도 영향력의 평가가 가능하게 이루어질 수 있다. 인간의 건강 증진을 위해서는 반드시 고려되어야 하는 것은 궁극적으로 인간을 대상으로 진행되는 임상시험이지만, 지금까지 긍정적인 결과를 나타내는 연구를 통해서 밝혀진 소수의 균주들만이 법적으로 건강 기능성 강조표시(health claim)를 획득할 수 있었다. 따라서 현재 probiotics라고 규정하는데 이용되는 검사방법들의 유효성에 대한 관심이 증가하고 있는 것이 사실이다. 따라서 본 총설논문에서 probiotics의 선별에 이용되는 가장 일반적인 방법과 이들 방법들의 장점 및 한계성에 관해서 자세하게 설명하였다. 더 나아가서, 최근에 omics 기술의 출현은 probiotics의 생물현상을 새롭게 이해하는데 큰 도움으로 주고 있으며, 결국 omics 기술은 probiotics와 같은 다양한 미생물들을 연구하고 선별하는데 새

로운 방법으로 이용될 수 있을 것이다. 하지만 여기에 대한 추가적인 연구들은 반드시 진행되어야 할 것이다.

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIP)(No. 2015R1A2A2A01005017).

Disclaimer: The views expressed herein do not necessarily reflect those of the US Food and Drug Administration or the US Department of Health and Human Services.

References

1. An, H., Douillard, F. P., Wang, G., Zhai, Z., Yang, J., Song, S., Cui, J., Ren, F., Luo, Y., Zhang, B. and Hao, Y. 2014. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in a centenarian-originated probiotic *Bifidobacterium longum* BBMN68. *Mol. Cell Proteomics*. 13:2558-2572.
2. Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y. and Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21:695-701.
3. Bauerl, C., Perez-Martinez, G., Yan, F., Polk, D. B. and Monedero, V. 2010. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 19:231-241.
4. Bernardeau, M., Guguen, M. and Vernoux, J. P. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:487-513.
5. Botta, C., Langerholc, T., Cencic, A. and Cocolin, L. 2014. *In vitro* selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. *PLoS ONE* 9: e94457.
6. Bover-Cid, S. and Holzapfel, W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 53:33-41.

7. Bron, P., Van Bokhorst-Van De Veen, H., Wels, M. and Kleerebezem, M. 2011. "Engineering robust lactic acid bacteria," in Stress Responses of Lactic Acid Bacteria, eds E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (New York: Springer), 369-394.
8. Burns, A. J. and Rowland, I. R. 2004. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* 551:233-243.
9. Campieri, C., Campieri, M., Bertuzzi, V., Swennen, E., Matteuzzi, D., Stefoni, S., Pirovano, F., Centi, C., Ulisse, S., Famularo, G. and De Simone, C. 2001. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. *Kidney Int.* 60:1097-1105.
10. Cani, P., Everard, A., Belzer, C. and De, V. W. 2014. Use of Akkermansia for Treating Metabolic Disorders. Patent no. WO2014075745A1.
11. Castro, M. S., Molina, M. A., Di Sciullo, P., Azpiroz, M. B., Leocata Nieto, F., SterinSpeziale, N. B., Mongini, C. and Manghi, M.A. 2010. Beneficial activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121 in the anti-lymphoma protective response. *J. Appl. Microbiol.* 109:1234-1243.
12. Cencic, A. and Langerholc, T. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 141 (Suppl. 1):S4-S14.
13. Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. and Kim, S. H. 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Let. Appl. Microbiol.* 42:452-458.
14. Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N. and Cresci, A. 2014. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 117: 518-527
15. Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'toole, P. W., Hill, C. and Gahan, C. G. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 7617-7621.
16. Corthesy, B., Gaskins, H. R. and Mercenier, A. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.* 137:781S-790S.
17. Cousin, F. J., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M.-T., Corcos, L. and Jan, G. 2012. Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS ONE* 7: e31892.
18. Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Prasitpuripreecha, C., Peerajan, S. and Chaiyasut, C. 2014. Selection and characterisation of probiotic lactic acid bacteria with heterocyclic amine binding and nitrosamine degradation properties. *J. Appl. Pharm. Sci.* 4:014-023.
19. Eaton, K. A., Honkala, A., Auchtung, T. A. and Britton, R. A. 2011. Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. *Infect. Immun.* 79:185-191.
20. Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen, M. and Madsen, K.L. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295:G1025-G1034.
21. Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., Macsharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. and van Sinderen, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:2108-2113.
22. Faridnia, F., Hussin, A. S., Saari, N., Mustafa, S., Yee, L. Y. and Manap, M. Y. 2010. *In vitro* binding of mutagenic heterocyclic aromatic amines by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4. *Benef. Microbes* 1:149-154.
23. Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A. and Pot, B. 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 13:236-243.

24. Fujii, T., Ingham, C., Nakayama, J., Beerthuyzen, M., Kunuki, R., Molenaar, D., Sturme, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M. and de Vos, W. 2008. Two homologous Agr-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J. Bacteriol.* 190:7655-7665.
25. Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H. and Hattori, M. 2012. Acetate producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes* 3:449-454.
26. García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., Gómez De Cadiñanos, L. P., Requena, T., Peláez, C. and Martínez-Cuesta, M.C. 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res. Int.* 57:44-50.
27. Gilad, O., Svensson, B., Viborg, A. H., Stuer-Lauridsen, B. and Jacobsen, S. 2011. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics* 11: 2503-2514.
28. Gueimonde, M. and Collado, M. C. 2012. Metagenomics and probiotics. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(Suppl. 4):32-34.
29. Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoude-Werner, D. and Ennahar, S. 2011. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol.* 11:63.
30. Harty, D. W., Oakey, H. J., Patrikakis, M., Hume, E. B. and Knox, K. W. 1994. Pathogenic potential of lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* 24:179-189.
31. Helm, R. M. and Burks, A. W. 2002. Animal models of food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2:541-546.
32. Heno-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C. and Jurczak, M.J. 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482:179-185.
33. Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., Mccue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H. and Mazmanian, S.K. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155: 1451-1463.
34. Hughes, D. B. and Hoover, D. G. 1995. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 78:268-276.
35. Ito, M., Kobayashi, K. and Nakahata, T. 2008. "NOD/Shi-*scid* *IL2r γ* null (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models," in *Humanized Mice*, eds T. Nomura, T. Watanabe, and S. Habu (Berlin: Springer), 53-76.
36. Jacobi, C. A., Grundler, S., Hsieh, C. J., Frick, J. S., Adam, P., Lamprecht, G., Autenrieth, I., Gregor, M. and Malfertheiner, P. 2012. Quorum sensing in the probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor) - evidence that furanosyl borate diester (AI-2) is influencing the cytokine expression in the DSS colitis mouse model. *Gut Pathog.* 4:8.
37. Jin, J., Zhang, B., Guo, H., Cui, J., Jiang, L., Song, S., Sun, M. and Ren, F. 2012. Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by gene expression profile using RNA-sequencing. *PLoS ONE* 7:e50777.
38. Kikuchi, Y., Kunitoh-Asari, A., Hayakawa, K., Imai, S., Kasuya, K., Abe, K., Adachi, Y., Fukudome, S., Takahashi, Y. and Hachimura, S. 2014. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain AYA enhances IgA secretion and provides survival protection against influenza virus infection in mice. *PLoS ONE* 9:e86416.
39. Kim, J. F., Jeong, H., Yu, D. S., Choi, S. H., Hur, C. G., Park, M. S., Yoon, S.H., Kim, D.W., Ji, G.E., Park, H.S. and Oh, T.K. 2009. Genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *J. Bacteriol.* 191:678-679.
40. Kim, J. Y., Park, B. K., Park, H. J., Park, Y. H., Kim, B. O. and Pyo, S. 2013. Atopic dermatitis-mitigating effects of new *Lactobacillus* strain, *Lactobacillus sakei* probio65 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 115:517-526.

41. Kinoshita, H., Imoto, S., Suda, Y., Ishida, M., Watanabe, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Miura, K., Horii, A. and Saito, T. 2013. Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *Anim. Sci. J.* 84:150-158.
42. Koponen, J., Laakso, K., Koskenniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T. A., de Vos W.M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N. and Varmanen, P. 2012. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Proteomics* 75:1357-1374.
43. Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., Savijoki, K., Nyman, T.A., Surakka, A., Salusjarvi, T., de Vos, W.M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N. and Varmanen, P. 2011. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stressresponse in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.002741.
44. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C. and Kilk, A. 2002. Two anti-oxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. FoodMicrobiol.* 72:215-224.
45. Kwon, H. K., Kim, G. C., Kim, Y., Hwang, W., Jash, A., Sahoo, A., Kim, J.E., Nam, J.H. and Im, S.H. 2013. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by probiotic mixture is mediated by a shift in T helper cell immune response. *Clin. Immunol.* 146:217-227.
46. Le Marechal, C., Peton, V., Ple, C., Vroland, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Durant, G., Chuat, V., Loux, V., Foligne, B., Deutsch, S.M., Falentin, H. and Jan, G. 2014. Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J. Proteomics.* 113:447-461.
47. Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., Perlemuter, G., Cassard-Doulier, A.M. and Gerard, P. 2013. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 62:1787-1794.
48. Lebeer, S., Claes, I. J. J., Verhoeven, T. L. A., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. J. 2011. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microb. Biotechnol.* 4:368-374.
49. Lee, J., Kim, Y., Yun, H. S., Kim, J. G., Oh, S. and Kim, S. H. 2010. Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4829-4835.
50. Lye, H. S., Rusul, G. and Liong, M. T. 2010. Removal of cholesterol by lactobacillia incorporation and conversion to coprostanol. *J. Dairy Sci.* 93:1383-1392.
51. Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. and Hollingsworth, M. A. 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52:827-833.
52. Martin, F. P., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I. K., Rezzi, S., Ramadan, Z., van Bladeren, P., Fay, L.B., Kochhar, S., Lindon, J.C., Holmes, E. and Nicholson, J.K. 2008. Top-down systems biology integration of conditional prebiotic modulated transgenomic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 4:205.
53. McKay, D. M., Philpott, D. J. and Perdue, M. H. 1997. Review article: *In vitro* models in inflammatory bowel disease research—a critical review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11(Suppl. 3):70-80.
54. Meijerink, M., Van Hemert, S., Taverne, N., Wels, M., De Vos, P., Bron, P. A., Savelkoul, H.F., van Bilsen, J., Kleerebezem, M. and Wells, J.M. 2010. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS ONE* 5:e10632.
55. Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., Thomas, M., Well, J.M. and Langella, P. 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 255-261.
56. Mitsuma, T., Odajima, H., Momiyama, Z., Watanabe, K., Masuguchi, M., Sekine, T., Shidara, S. and Hirano,

- S. 2008. Enhancement of gene expression by a peptide p(CHWPR) produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12. *Microbiol. Immunol.* 52:144-155.
57. Moslehi-Jenabian, S., Vogensen, F. K. and Jespersen, L. 2011. The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 149:269-273.
58. Munoz-Provencio, D., Rodriguez-Diaz, J., Collado, M. C., Langella, P., Bermudez-Humaran, L. G. and Monedero, V. 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8684-8693.
59. Nybom, S. M., Salminen, S. J. and Meriluoto, J. A. 2008. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. *Toxicon* 52:214-220.
60. Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Voula Alexandraki, Kazou M., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2015. Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* 6:58.
61. Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A.-M., Malcata, F. X. and Alichanidis, E. 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem.* 105:647-656.
62. Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., Deiana, M. and Cosentino, S. 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. *Biomed. Res. Int.* 2014:286390.
63. Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. and Rossi, M. 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:179-185.
64. Pool-Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scassellati-Sforzolini, R. and Rowland, I. 1996. *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr. Cancer* 26:365-380.
65. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. and Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65.
66. Ravel, J., Blaser, M., Braun, J., Brown, E., Bushman, F., Chang, E., Davies, J., Dewey, K. G., Dinan, T., Dominguez-Bello, M., Erdman, S. E., Finlay, B., Garrett, W., Huffnagle, G., Huttenhower, C., Jansson, J., Jeffery, I., Jobin, C., Khoruts, A., Kong, H., Lampe, J., Ley, R., Littman, D., Mazmanian, S., Mills, D., Neish, A., Petrof, E., Relman, D., Rhodes, R., Turnbaugh, P., Young, V., Knight, R. and White, O. 2014. Human microbiome science: vision for the future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013. *Microbiome* 2:16.
67. Rijkers, G. T., Bengtmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E., Rabot, S., Rafters, J., Szajewska, H., Watzl, B., Wells, J., Wolvers, D. and Antoine, J. 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Current status and recommendations for future research. *J. Nutr.* 140:671S-676S.
68. Saulnier, D. M., Santos, F., Roos, S., Mistretta, T. A., Spinler, J. K., Molenaar, D., Teusink, B., and Versalovic, J. 2011. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS ONE* 6:e18783.
69. Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F. and Fellermann, K. 2007. Induction of human β -defensin 2 by the probiotic

- Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* 75:2399-2407.
70. Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M. and Mills, D.A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 18964-18969.
 71. Shimada, Y., Watanabe, Y., Wakinaka, T., Funeno, Y., Kubota, M., Chaiwangsri, T., Kurihara, S., Yamamoto, K., Katayama, T. and Ashida, H. 2015. α -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked N-acetylglucosamine at non-reducing terminus of O-glycan on gastric mucin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:3941-3948.
 72. Siniscalco, D. and Antonucci, N. 2013. Involvement of dietary bioactive proteins and peptides in autism spectrum disorders. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14:674-679.
 73. Sodhi, C. P., Neal, M. D., Siggers, R., Sho, S., Ma, C., Branca, M. F., Prindle, T., Jr., Russo, A. M., Afrazi, A., Good, M., Brower-Sinning, R., Firek, B., Morowitz, M.J., Ozolek, J. A., Gittes, G. K., Billiar, T. R. and Hackam, D. J. 2012. Intestinal epithelial toll-like receptor 4 regulates goblet cell development and is required for necrotizing enterocolitis in mice. *Gastroenterology* 143:708-718, e701-e705.
 74. Steinberg, R. S., Silva, L. C., Souza, T. C., Lima, M. T., De Oliveira, N. L., Vieira, L. Q., Aranes, R., Miyoshi, A., Ricoli, J., Neumann, E. and Nunes, A. 2014. Safety and protective effectiveness of two strains of *Lactobacillus* with probiotic features in an experimental model of salmonellosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11:8755-8776.
 75. Tan, Q., Xu, H., Aguilar, Z. P., Peng, S., Dong, S., Wang, B., Li, P., Chen, T., Yu, F. and Wei, H. 2013. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough. *J. Food Sci.* 78:M587-M593.
 76. Tassell, M. L. V., and Miller, M. J. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 3:613-636.
 77. Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M. L., Thomas, M. and Guyot, J. P. 2012. Lactobacillaceae and cell adhesion: Genomic and functional screening. *PLoS ONE* 7:e38034.
 78. Turrone, F., Foroni, E., O'connellMotherway, M., Bottacini, F., Giubellini, V., Zomer, A., Ferrarini, A., Delledonne, M., Zhang, Z., van Sinderen, D. and Ventura, M. 2010. Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3206-3219.
 79. Turrone, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'connellMotherway, M., Taverniti, V., Mangifesta, M., Milani, C., Viappiani, A., Roversi, T., Sánchez, B., Santoni, A., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Delledonne, M., Margolles, A., Piazza, L., Palanza, P., Bolchi, A., Guglielmetti, S., van Sinderen, D. and Ventura, M. 2013. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:11151-11156.
 80. Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. and Ross, R. P. 2011. "Improving the stress tolerance of probiotic cultures: recent trends and future directions," in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, eds E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (New York: Springer), 395-438.
 81. Van den Abbeele, P., Roos, S., Eeckhaut, V., Mackenzie, D. A., Derde, M., Verstraete, W., Marzorati, M., Possemiers, S., Vanhoecke, B., Van Immerseel, F. and Van de Wiele, T. 2012. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microb. Biotechnol.* 5:106-115.
 82. Vastano, V., Salzillo, M., Siciliano, R. A., Muscariello, L., Sacco, M. and Marasco, R. 2014. The E1 beta-subunit of pyruvate dehydrogenase is surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and binds fibronectin. *Microbiol. Res.* 169: 121-127.
 83. Verdu, E. F. and Collins, S. M. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Irritable bowel syndrome. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:315-321.

84. Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillere, R., Hannani, D., Enot, D., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Apetoh, L., Chachaty, E., Woerther, P., Eberl, G., Bérard, M., Ecobichon, C., Clermont, D., Bizet, C., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., Opolon, P., Yessaad, N., Vivier, E., Ryffel, B., Elson, C., Doré, J., Kroemer, G., Lepage, P., Boneca, I., Ghiringhelli, F. and Zitvogel, L. 2013. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342:971-976.
85. Wang, L., Cao, H., Liu, L., Wang, B., Walker, W. A., Acra, S.A. and Yan, F. 2014. Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived protein. *J. Biol. Chem.* 289:20234-20244.
86. Westermann, C., Zhurina, D., Baur, A., Shang, W., Yuan, J. and Riedel, C. 2012. Exploring the genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17 for potential players in host-microbe interactions. *Symbiosis* 58: 191-200.
87. Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H., Hirose, J., Katayama, T., Yamamoto, K. and Kumagai, H. 2012. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different β -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 22: 361-368.
88. Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C. and Huang, Y. 2013. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PLoS ONE* 8: e69868.