



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

Caco-2 세포에 부착능이 강한
Bifidobacterium 과 *Lactobacillus*
선발 균주의 부착 특성 및
유해균 부착 억제

Adhesion characteristics and suppression of
pathogen adhesion to Caco-2 cells by strongly
adhesive *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

Hui Fang

국문초록

본 연구의 목적은 부착능이 높은 유익균을 선발하여 선발균의 부착 특성 및 유해균 억제능을 확인하였다.

200 여 개의 유익균에서 Caco-2 세포에 부착능이 강한 세 가지 균을 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 방법을 통해 *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium bifidum* ATT, *Lactobacillus sakei* KOK 을 선발하였다. 선발균의 Caco-2 세포에 대한 처리 시간이 60 분일 때 부착능이 제일 우수하였다. 세포에 대한 처리 농도가 증가함에 따라 부착하는 균 수도 증가하였다. 열과 효소로 전 처리한 선발균을 세포에 처리한 결과, $p < 0.05$ 에서 유의하게 장 부착능이 감소하였다. 열 처리한 *L. sakei* KOK 의 부착능이 비교적 우수하였고 세 가지 균 모두 pepsin 의 영향을 비교적 많이 받았다. 선발균과 유해균을 경쟁시킨 세가지의 경쟁 모델에서 선발균을 먼저 세포에 처리하거나 유해균과 같이 처리했을 때 유해균의 세포에 대한 부착을 더 많이 억제하였다. *L. sakei* KOK 는 다른 선발균에 비해 *Escherichia coli* KCTC 1039 를 많이 감소시켰고 *B. bifidum* ATT 는 다른 선발균에 비해 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 을 많이 감소시켰다. 또한, 유익균의 항 염증 효과를 알아보기 위하여 interleukin (IL)- 1β , tumor necrosis factor

(TNF)- α , lipopolysaccharide (LPS)를 이용하여 HT-29 세포를 자극하여 IL-8의 발현을 분석한 결과, 세가지 선발균 모두 IL-1 β , TNF- α , LPS로 분비된 IL-8 생성을 의미 있게 감소시켰다.

본 연구를 통해서 부착성이 강한 유익균을 선발하였고 선발균의 부착 특성, 유해균 억제능 및 IL-8 생산에 미치는 영향을 확인함으로써 앞으로의 기능성 식품에서 선발균의 응용이 기대된다.

주요어: 유익균, 장 부착능, 부착 특성, 유해균 억제, IL-8

조절

학번: 2015-22375

목차

국문초록	i
그림목차.....	vi
표목차.....	vii
약어요약.....	ix
1. 서론.....	1
2. 재료 및 방법.....	5
2.1. 실험 재료 및 시약	5
2.2. 균주 배양 및 배양 조건	5
2.3. 대장 세포주 및 배양	7
2.4. 유익균의 부착능.....	8
2.5. 선발균의 부착 특성.....	9
2.5.1. 처리 시간에 따른 선발균 부착능	9
2.5.2. 선발균의 농도에 따른 부착능	9

2.5.3. 열 처리한 선발균의 부착능.....	9
2.5.4. 효소 처리한 선발균의 부착능	1 0
2.5.5. 선발균의 유해균 부착 억제.....	1 0
2.6. 균의 DNA 추출	1 1
2.7. qRT - PCR 방법에 의한 선발균의 정량분석	1 3
2.8. IL-8 정량.....	1 8
2.9. 통계처리	1 8
3. 실험 결과 및 고찰.....	1 9
3.1. Caco-2 세포에 부착능이 강한 유익균	1 9
3.2. 처리 시간이 균 부착능에 대한 영향.....	2 1
3.3. 선발균의 농도에 따른 부착능	2 3
3.4. 열 처리한 선발균의 부착능에 대한 영향	2 6
3.5. 효소 처리가 선발균 부착능에 대한 영향	2 8
3.6. 선발균의 유해균 부착 억제능	3 1

3.7. 선발균이 자극 처리된 HT-29 세포의 IL-8 생산에 미치는 영향	4 6
4. 요약 및 결론	4 9
참고문헌.....	5 2
Abstract	5 6

그림목차

Fig. 1. Standard curve for calculation of the number of target bacteria.....	15
Fig. 2. Adhesion of three probiotic strains to Caco-2 cell monolayer.....	19
Fig. 3. Adhesion of selected probiotics to Caco-2 cells during incubation time.....	21
Fig. 4. Adhesion of various concentration of selected probiotics to the Caco-2 cells	23
Fig. 5. Adhesion of heat-inactivated probiotics to Caco-2 cells.....	26
Fig. 6. Adhesion of various enzyme treated probiotics to Caco-2 cells.....	29
Fig. 7. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in protection assays.....	32

Fig. 8. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in competition assays.....	36
Fig. 9. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in displacement assays.....	40
Fig. 10. The effect of probiotics on the production of IL-8.....	45

표목차

Table 1. List of primers used in this study.....	13
--	----

약어 요약

BHI: brain heart infusion

B. bifidum BGN4: *Bifidobacterium bifidum* BGN4

B. bifidum ATT: *Bifidobacterium bifidum* ATT

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

E. coli: *Escherichia coli* KCTC 1039

IL-1 β : interleukin-1 β

L. sakei KOK: *Lactobacillus sakei* SJL802

LPS: lipopolysaccharide

MRS: deMan-Rogosa Sharpe

qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain
reaction

S. typhimurium (ST): *Salmonella typhimurium* ATCC
14028

TNF- α : tumor necrosis factor- α

1. 서론

위장관에 있는 미생물은 인체에서 가장 복잡한 생태계를 구성한다. 장내에는 내장 당 $10^{12} \sim 10^{14}$ CFU/g 의 생균이 존재하고 그 종류는 1,000 여 가지이다[1, 2].

건강에 대한 관심이 커지면서 미생물군(microbiota)으로 알려진 대장에 서식하는 미생물 군집이 인체의 건강을 유지하는 것에 관한 과학적 증거가 증가하고 있다. 선행연구에 의하면 나이, 식이 습관, 지리적 위치 또는 생활 양식이 장내 미생물의 구성에 중대한 영향을 미친다[3].

장내 미생물은 장내 항상성(homeostasis)에 중요한 역할을 한다. 건강한 장내에서 점막과 장내 미생물은 여러 가지 공생관계가 존재하여 장벽의 항상성을 유지하면서 식이 영양소의 소화 흡수를 가능하게 한다[4]. 장내 세균의 부조화는 다양한 균종의 수와 구성을 변화시킴으로써 숙주와 미생물간의 상호 작용을 방해 할 가능성이 있다. 이것은 유해균에 의해 유발되고 전체로서 장의 미생물에 대한 숙주 면역 반응에 의해 지속될 수 있는 만성 염증성 장 질환 등 다양한 장 관련 질병 발생과 연관성이 있다[5].

대장 질환에서 유익균(probiotics)은 다양한 효능을 가질 수 있는데, 이는 유익균이 인공적인 부산물이 아니라 천연물이고 직접,

간접적으로 많은 질환의 원인이 되는 장내에 서식하는 유해균들을 조절할 수 있는 점에 기인한다[6]. 장내에서 보고된 유익균의 작용기전으로는 직접 혹은 간접적으로 유해균의 성장을 방해하거나, 점막 장벽의 기능을 강화시켜서 유해균이 침투하지 못하게 하거나, 장 상피세포 혹은 점막 연관 림프 조직의 면역기능을 조절하는 것 등이 있다[7].

유익균의 장내 부착은 생존과 증식에 필수적인 과정이다[8]. 장 상피에 대한 부착은 또한 유익균이 면역계를 조절할 수 있게 하는 중요한 요소이다[9]. 유익균의 물리적, 화학적 및 효소 전 처리는 사람의 장 점막 당단백질에 대한 접착력을 변화시킨다[10]. 장 상피세포에서 유익균은 *Salmonella* ssp. 와 *E. coli* 으로부터 감염되는 것을 억제한다[11, 12]. 장을 병원균의 감염으로부터 보호하기 위해 최근에 유익균을 함유한 보충제의 사용이 고려되고 있다[2, 13].

또한 연구결과에 의하면 *Bifidobacterium* 와 *Lactobacillus* 는 장 상피세포와 상호 작용하여 균주 특이적으로 사이토카인(cytokine)을 조절하는 패턴을 가진다[14, 15].

B. bifidum 은 성인과 유아의 대소변에서 흔히 발견되는 종이다. *B. bifidum* 과 아울러 *Bifidobacterium* 의 다른 종인 *B. longum*, *B. adolescentis* 와 *B. animalis* subsp. *lactis* 에 대한 연구도 수행되었다[16].

B. bifidum 균주는 면역 조절, 유해균 활성화 억제, 박테리옌 생산, 생쥐의 장내 미생물 균형 개선 및 닭에서의 염증 감소와 같은 몇 가지 유익한 효과를 갖는다. 또한 Caco-2 세포에서 *B. bifidum* 의 강한 부착능은 균의 표면단백질의 영향을 받는다[17]. 연구에 의하면 *B. bifidum* BGN4는 높은 부착능을 가지고 있다[18]. 변에서 분리된 *Lactobacillus* 균주는 치즈에서 분리된 것보다 소수성과 장 부착능이 비교적 강하다[19].

본 연구에서는 qRT-PCR 방법을 이용하여 장 부착능이 우수한 균을 선발하였다. 전통적인 방법인 현미경 검경법과 생균수 측정법에 비해 qRT-PCR 방법은 신속하고 민감하며 또한 유해균과의 실험에서도 사용할 수 있다. 이미 Caco-2 세포에 대한 *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum* 와 유해균의 부착 경쟁을 분석한 연구에서 qRT-PCR 방법이 사용되었다[20].

균주의 존재는 Caco-2 세포에 의한 사이토카인 생성에는 영향을 미치지 않았지만 일부 균주는 HT-29 세포에 의한 생성을 조절했다[21].

병원균에 감염된 대장 세포가 장기간 IL-8 을 분비하였을 때 장벽 기능의 부전 및 염증을 초래한다. 특히 많은 유익균이 IL-1 β , TNF- α , LPS, 유해균의 자극에 의해 분비된 IL-8 을 감소시킨다고 소개되었다[9].

본 연구에서 200 여 개의 *Bifidobacterium* 과 *Lactobacillus* 에서 부착능이 강한 유익균을 선발하고 균의 특성 및 유해균에 대한 억제 작용을 확인하였다. 또한 IL-8 의 분비에 조절 작용이 있다는 것을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 시약

Bifidobacterium, *Lactobacillus* 은 MRS (Difico, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였다. *E. coli* 와 *Salmonella* 은 BHI (Difico, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였다. 균에 처리한 효소는 Sigma Aldrich (Sigma, ST. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. DNA 추출 Kit 는 MG Cell Genomic DNA Extraction SV kit (Doctor protein, Seoul, Korea)을 사용하였다. PCR 시약은 TAKARA 에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 균주 배양 및 배양 조건

실험에서 사용한 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli* 는 서울대학교 식품영양학과 식품 미생물 연구실에서 보유하고 있는 균주를 사용하였다. 또한 중국인 변과 한국인 변에서 분리한 균을 사용하였다. *S. typhimurium* ATCC 14028 은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 제공받았다. 부착능이 강한 균주로는 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 이다. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 는 0.05% (w/v) cysteine-HCL (Sigma, St, Louis, Mo, USA)을 첨가한 MRS 배지에 37℃에서

18 시간 동안 혐기 배양하였다. *S. typhimurum*, *E. coli* 는 BHI 배지에 37℃에서 4 시간동안 호기 배양하였다.

2.3. 대장 세포주 및 배양

장 상피세포 단층(monolayer)은 유익균의 선택에 사용되는 기준 중 하나로 종종 장 상피에 유익균의 부착능을 테스트하는 모델로 사용 되었다[22].

대장암 세포주인 Caco-2 (KCLB 30037. 1)와 HT-29 (KCLB 30038)은 한국 세포주 은행으로부터 구입하였다. Caco-2 세포는 10% (v/v)는 열에 의해 불활성화 된 Fetal Bovine Serum (FBS)와 1% (v/v)항생제를 함유한 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM)배지에서 37℃, 5% CO₂-95% O₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 부착능 실험을 위해 Caco-2 세포를 1×10⁵ cells/well 의 농도로 24 well plate (Nunclon, USA)에 도포한 후 14 일 뒤에 시행하였다. 세포 배양액은 2 일마다 교체하고 부착능 실험 24 시간 전에 항생제 없는 배지로 교체해주었다. 부착능 실험 전 Neubauer chamber 로 계수하면 well 당 약 10⁶ cells 이다.

2.4. 유익균의 부착능

Bifidobacterium 과 *Lactobacillus* 를 MRS 액체 배지에서 37°C에서 18 시간 동안 배양 한 후 600 nm 에서 균 수가 1×10^8 CFU/mL 이 되도록 조정하였다. 균을 $8000 \times g$ 에서 3 분간 원심 분리 하고 PBS 로 3 번 세척 후 항생제를 함유하지 않은 DMEM 배지에 넣어 Caco-2 세포에 처리하였다.

24 well 에 형성된 Caco-2 단층을 PBS (pH 7.4)로 3 회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거 하였다. 조직 배양 판의 각 well 에 유익균 현탁액 (1×10^8 CFU/mL) 1 mL 를 넣고 5% CO₂-95% O₂ 37°C에서 1 시간 처리하였다. 1 시간 후, 유익균 현탁액을 흡입하고 Caco-2 단층을 PBS 로 3 번 세척하여 부착하지 않은 균을 제거 하였다. 200 μ L trypsin/EDTA 을 Caco-2 세포 단층에 10 분간 처리한 후 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 200 μ L PBS 로 well 을 세척하여 1.5 mL 튜브에 옮긴다.

2.5. 선발균의 부착 특성

2.5.1. 처리 시간에 따른 선발균 부착능

Caco-2 세포 단층이 형성되면 10^8 CFU/mL 의 선발균 1 mL 를 처리하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 분 동안 선발균의 부착능을 평가하였다.

2.5.2. 선발균의 농도에 따른 부착능

앞서 설명한 바와 같이 Caco-2 세포 단층이 24-well 에서 형성되면 10^7 , 10^8 및 10^9 CFU/mL 농도의 선발균을 각각 1 시간 동안 Caco-2 세포 단층에 처리하여 선발균의 부착능을 평가하였다.

2.5.3. 열 처리한 선발균의 부착능

유산균을 70°C 30 분간 처리하여 활성을 잃게 한다. 앞서 설명한 바와 같이 24-well 의 Caco-2 세포 단층에 생균 또는 열 처리한 균 (1×10^8 CFU/mL)을 well 당 처리하여 선발균의 부착능을 평가하였다.

2.5.4. 효소 처리한 선발균의 부착능

선발균의 흡광도 (OD_{600})에 의해 1×10^8 CFU/mL 로 조절하였다. PBS 로 세척한 후에 준비한 효소로 37°C에서 1 시간동안 처리한 후 다시 PBS 로 세척 후에 세포에 처리하여 부착능을 평가하였다. 처리한 효소들로는: lysozyme (egg white, 0.1 mg/ml in PBS pH 6.24), pepsin (porcine stomach, 0.1 mg/ml in 0.2 M citrate-HCl buffer pH 3.0), amylase (bovine pancreas, 0.1 mg/ml in PBS pH 6.9), lipase (porcine pancreas, 0.1 mg/ml in PBS pH 7.7), trypsin (porcine pancreas, 0.1 mg/ml in PBS pH 7.6), α -chymotrypsin (bovine pancreas, 0.1 mg/ml in PBS pH 7.8), pancreatin (porcine pancreas, 0.1 mg/ml in PBS pH 7.5)이다[23].

2.5.5. 선발균의 유해균 부착 억제

경쟁에 의한 선발균의 유해균 부착 억제 실험은 이전에 보고된 방법에 약간의 수정을 한 후에 하였다[24].

Protection assays 에서 Caco-2 세포 단층은 먼저 1 mL 의 선발균 현탁액(1×10^8 CFU/mL)을 접종하고 5% CO_2 -95% O_2 조건에서 37°C 1 시간 배양 하였다. 현탁액을 제거하고 3 번 PBS 로

세척한 후, Caco-2 세포 단층에 유해균 현탁액(1×10^8 CFU/mL) 1 mL 를 접종하고 5% CO₂-95% O₂ 조건에서 37°C로 1 시간 처리하였다. 현탁액을 제거하고 3 번 PBS 로 세척하였다.

Competition assays 에서 Caco-2 세포 단층에 선발균 현탁액(1×10^8 CFU/mL)과 유해균 현탁액(1×10^8 CFU/mL)을 같이 2 mL 를 접종하고 5% CO₂-95% O₂ 조건에서 37°C로 1 시간 처리하였다. 현탁액을 제거하고 3 번 PBS 로 세척하였다.

Displacement assays 에서 Caco-2 세포 단층에 먼저 유해균 현탁액 (1×10^8 CFU/mL) 1 mL 를 접종하고 5% CO₂-95% O₂ 조건에서 37°C로 1 시간 동안 처리하였다. 3 번 PBS 로 세척한 후, Caco-2 세포 단층에 1 mL 의 선발균 현탁액(1×10^8 CFU/mL)을 접종하고 5% CO₂-95% O₂ 조건에서 37°C로 1 시간 처리하였다.

유해균만 처리한 well 이 대조군으로 사용되었다. 모든 실험은 독립적으로 3 번 반복하였다.

2.6. 균의 DNA 추출

MG Cell Genomic DNA Extraction SV kit (Doctor protein, Seoul, Korea)를 이용하여 균의 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. 모든 DNA 시료의 최종 용적은 200 μ L 이고 분석하기전까지 -20°C에서 보관 하였다.

2.7. qRT-PCR 방법에 의한 선발균의 정량분석

Caco-2 세포에 부착된 유익균은 qRT-PCR 방법에 의해 계산되었다. 유익균을 qRT-PCR 방법으로 정량 분석하기 위해 추출된 gDNA 를 qRT-PCR 반응의 시료로 사용하였다. 균을 증폭하는데 사용한 primer 는 Table. 1 에 보는 바와 같다. Gene copy number 와 C_t (Threshold cycle)의 상관관계를 알아보고자 표준 시료 농도 범위를 $10^3 \sim 10^9$ gene copy number/ $2 \mu\text{L}$ 까지 하였다(Fig. 1).

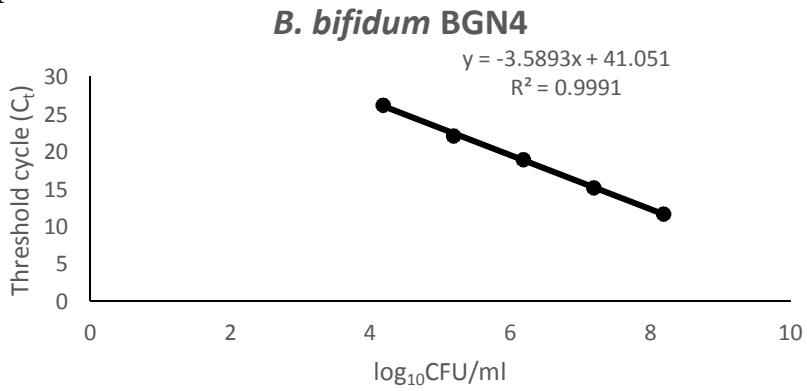
모든 균의 gDNA 을 primer 당 2 개씩 검사 하였다. qRT-PCR 은 StepOne Plus 시스템(Applied biosystems, USA)에서 수행되었다. PCR mixture 조성은 DNA template $2 \mu\text{L}$, $50 \times$ ROX dye $0.4 \mu\text{L}$, primer pair ($10 \mu\text{M}$) $0.4 \mu\text{L}$, 멸균 증류수 $6.8 \mu\text{L}$ 및 $2 \times$ SYBR Premix Ex Taq $10 \mu\text{L}$ (Takara, Japan)이다. qRT-PCR 조건은 95°C 에서 30 초, 95°C 에서 5 초와 Table. 1 에 나와 있는 조건으로 총 40 회의 증폭을 시행하였다.

Table 1. List of primers used in this study.

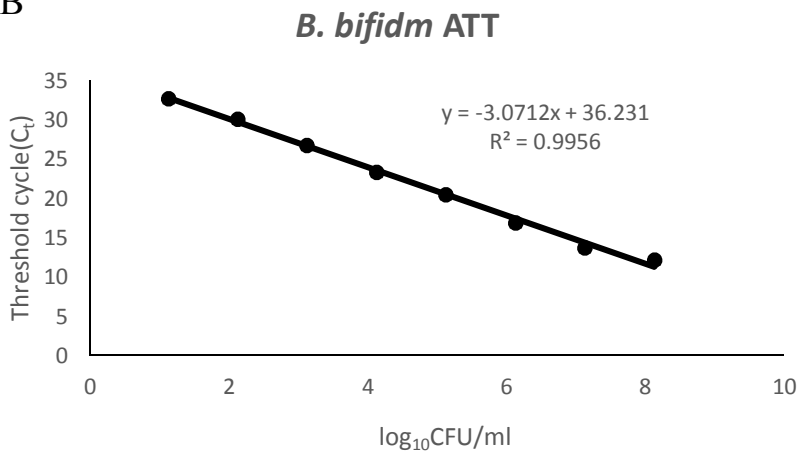
Primer	Sequence (5' –3')	Annealing temperature (°C)	Annealing time	Reference
<i>Bifidobacterium</i> spp.	F:TCGCGTCYGGTGTG AAAG R:GGTGTTCTCCCGAT ATCTACA	60	30 s	[25]
<i>Lactobacillus</i> spp.	F:AGCAGTAGGGAATC TTCCA R:CACCGCTACCATGG AG	60	1 min	[26]

<i>Salmonella typhimurium</i>	F:CGGTGTTGCCCAGG TTGGTAAT R:ACTGGTAAAGATGG CT	55	1 min	[27]
<i>Escherichia coli</i>	F:GACCTCGCGAGAGC A R:CCTACTTCTTTTGC AACCCA	63	30 s	[25]

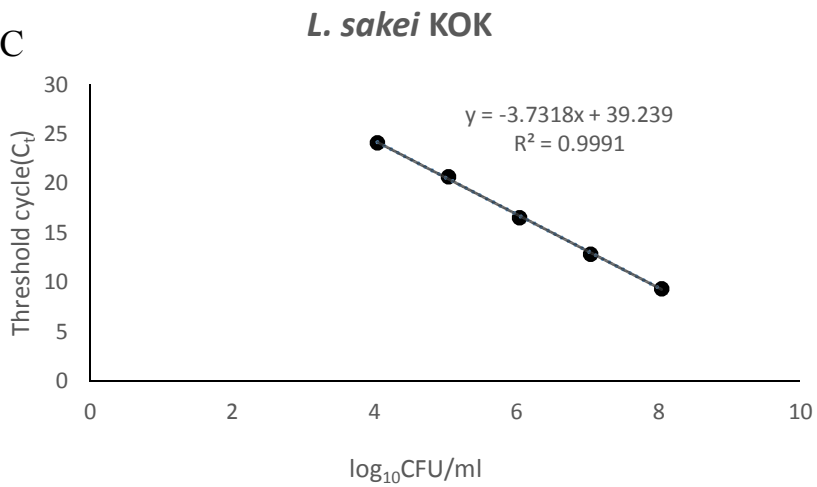
A



B



C



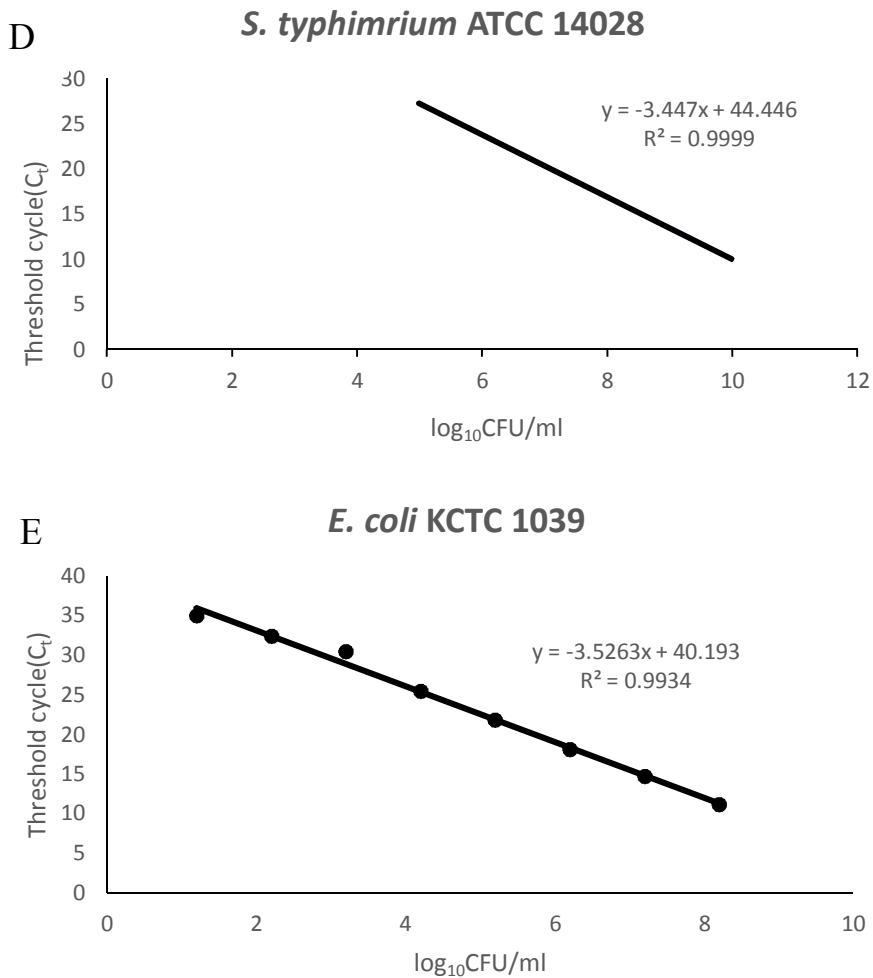


Fig. 1. Standard curve for calculation of the number of target bacteria.

(A) *B. bifidum* BGN4 (B) *B. bifidum* ATT (C) *L. sakei* KOK (D) *S. typhimurium* ATCC 14028 (E) *E. coli* KCTC 1039

2.8. IL-8 정량

HT-29 세포 단층을 PBS 로 세척하였다. IL-8 분비를 정량 하기 위해, 자극원과 유익균(1×10^8 CFU/mL)을 HT-29 세포 단층에 동시에 도포하고 6 시간 동안 처리하였다. 대조군으로 IL-1 β (Pepro Tech, USA), TNF- α , LPS (Sigma-Aldrich, Korea)를 각각 0.1 ng/mL, 0.5 ng/mL 및 1 μ g/mL 의 농도로 사용 하였다. 실험종료 시, 상층액을 모아 -20 $^{\circ}$ C에서 분석할 때까지 보관하였다.

세포에서 분비된 IL-8 을 정량 하기 위해서 Human IL-8 ELISA Set (BD, San Diego, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.9. 통계처리

통계 분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Ver. 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하고 Duncan 으로 검정하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 유의수준으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. Caco-2 세포에 부착능이 강한 유익균

실험실에 보유 중인 다양한 유익균과 중국인, 한국인 변에서 분리해낸 200 여 개의 *Bifidobacterium* 과 *Lactobacillus* 를 Caco-2 세포 단층에 처리하여 qRT-PCR 방법으로 부착된 균 수가 제일 많은 유익균 3 개를 선발하였다. 부착능이 강한 균들로는 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 이고 Caco-2 세포 100 개 당 각각 7.12×10^2 , 4.69×10^3 , 1.39×10^3 cells 가 부착되었다(Fig. 2).

같은 조건으로 실험한 Candela 은 세포 수 : 균 수 = 1 : 100 일때 Caco-2 세포 100 개 당 부착된 균 수가 5 개보다 적으면 부착능이 미약하다고 정의를 내렸다. Caco-2 세포 100 개 당 부착된 균 수가 5~40 개 일 때 균의 부착능이 있다고 하였다. Caco-2 세포 100 개 당 부착된 균 수가 40 개 보다 많을 때 균의 부착능이 강하다고 하였다[20]. 이 기준을 참고하면 *B. bifidum* BGN4 와 *L. sakei* KOK 는 세포에 대해 부착능이 강하였다. 특히 *B. bifidum* ATT 는 세포에 대한 부착능이 가장 우수하였다.

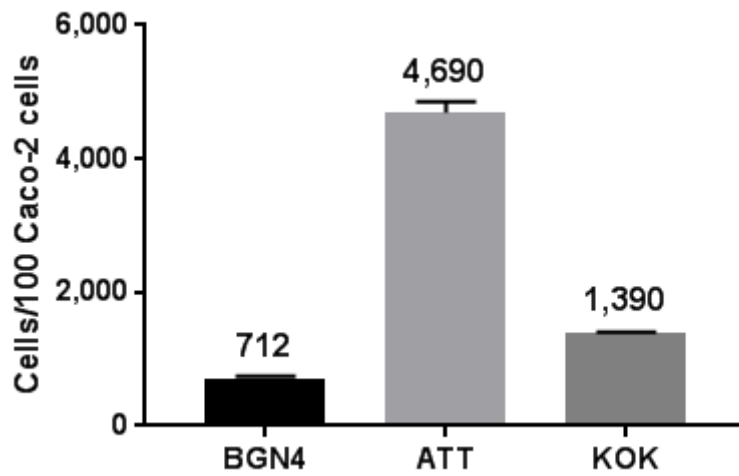


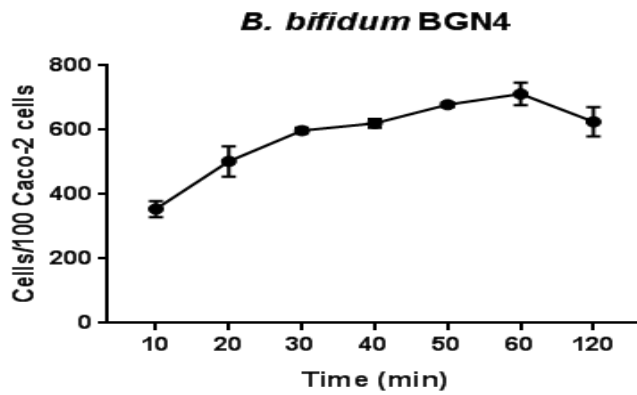
Fig. 2. Adhesion of three probiotic strains to Caco-2 cell monolayer. The numbers given on the top of the columns represent the means \pm standard deviation.

3.2. 처리 시간이 균 부착능에 대한 영향

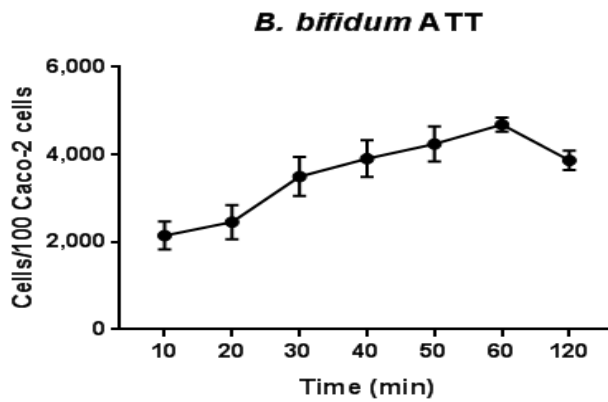
Caco-2 세포 단층에 유익균을 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 분 처리하여 시간이 균의 부착능에 미치는 영향을 보았다(Fig. 2).

실험 결과에 의하면 세가지 균은 60 분에서 부착된 균 수가 제일 많다는 것을 확인할 수 있다. 반면 120 분에서 부착된 균 수가 60 분에서 세포에 부착된 균 수에 비하여 다소 낮았다. 부착 시간이 늘어남에 따라 부착된 균 수가 증가하는 추세가 120 분에서 감소한 것은 *in vitro* 의 실험에서 부착한 균이 활성을 잃었을 가능성이 있다. 그러므로 세포 부착 능 실험에서 60 분이 적합하다는 것을 알 수 있다(Fig. 3).

A



B



C

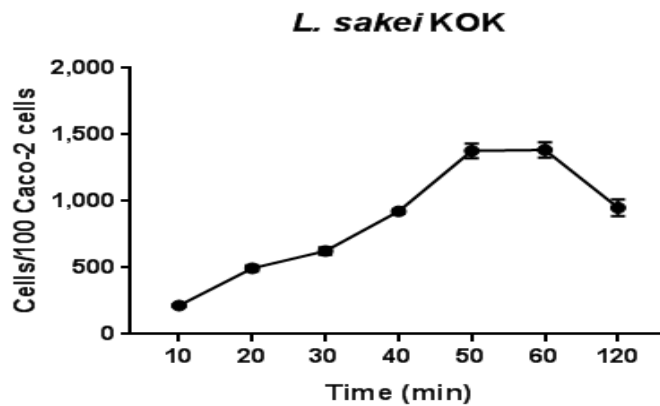
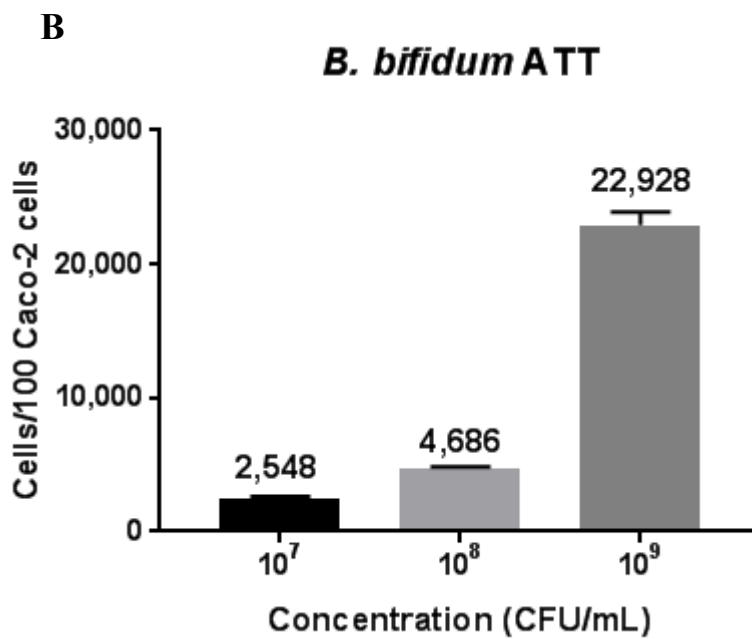
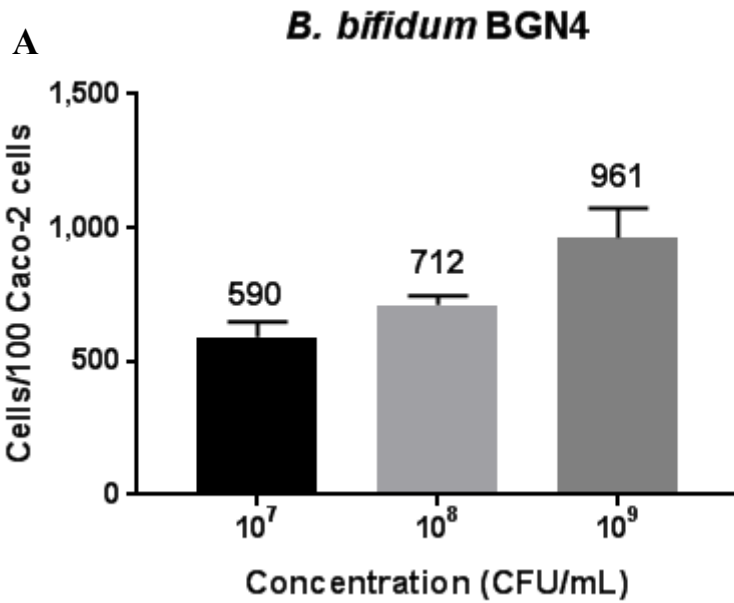


Fig. 3. Adhesion of selected probiotics to Caco-2 cells during incubation time.

3.3. 선발균의 농도에 따른 부착능

서로 다른 농도(10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL)의 유익균을 Caco-2 세포 단층에 처리하여 부착된 균 수를 확인하였다. 세포에 처리하는 농도가 증가할수록 부착된 균 수도 증가하는 경향을 나타내고 있다. *B. bifidum* BGN4 를 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL 농도로 세포에 처리하면 100 개 Caco-2 세포 당 각각 590, 712, 961 개의 균이 부착되었다. 10^7 , 10^9 CFU/mL 의 균을 처리할 때 처리한 균 수는 100 배 차이가 나지만 부착된 균 수는 약 2 배 차이가 났다. *B. bifidum* ATT 를 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL 농도로 세포에 처리하면 100 개 Caco-2 세포당 각각 2548, 4686, 22928 개의 균이 부착되었다. 10^7 , 10^9 CFU/mL 을 처리하였을 때 처리한 균 수는 100 배 차이가 나지만 부착된 균 수는 약 10 배 차이가 났다. *L. sakei* KOK 를 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL 농도로 세포에 처리하면 100 개 Caco-2 세포당 각각 645, 1386, 9653 개의 균이 부착되었다. 10^7 , 10^9 CFU/mL 을 처리하였을 때 처리한 균 수는 100 배 차이가 나지만 부착된 균 수는 약 15 배 차이가 났다. 그러므로 *B. bifidum* BGN4 의 장 부착능은 세포에 처리하는 균 농도의 영향을 적게 받고, *B. bifidum* ATT 와 *L. sakei* KOK 의 장 부착능은 세포에 처리하는 균 농도의 영향을 다소 많이 받았다(Fig. 4).



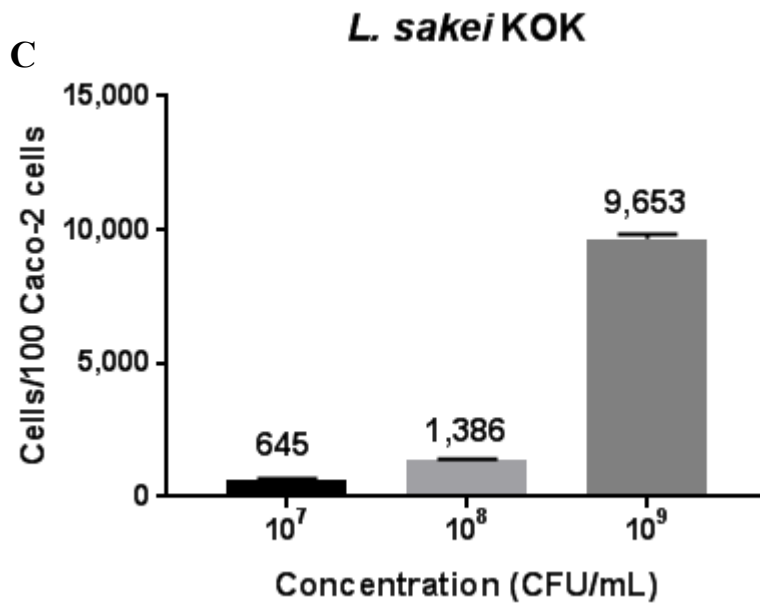


Fig. 4. Adhesion of various concentrations of selected probiotics to the Caco-2 cells. The numbers given on the top of the columns represent the means \pm standard deviation.

3.4. 열 처리한 선발균의 부착능에 대한 영향

실험결과에 의하면 열 처리한 균은 생균보다 Caco-2 세포에 대한 부착능이 약하였다. 생균에서 유익균의 부착능이 강한 것부터의 순서는 *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK, *B. bifidum* BGN4 이었다. 열 처리한 균의 부착능이 강한 것부터의 순서는 *L. sakei* KOK, *B. bifidum* ATT, *B. bifidum* BGN4 이었다. 열 처리한 균의 부착능은 생균의 부착능과 비슷한 경향을 나타내며 그중에서 *L. sakei* KOK 의 부착능이 우수하였다(Fig. 5).

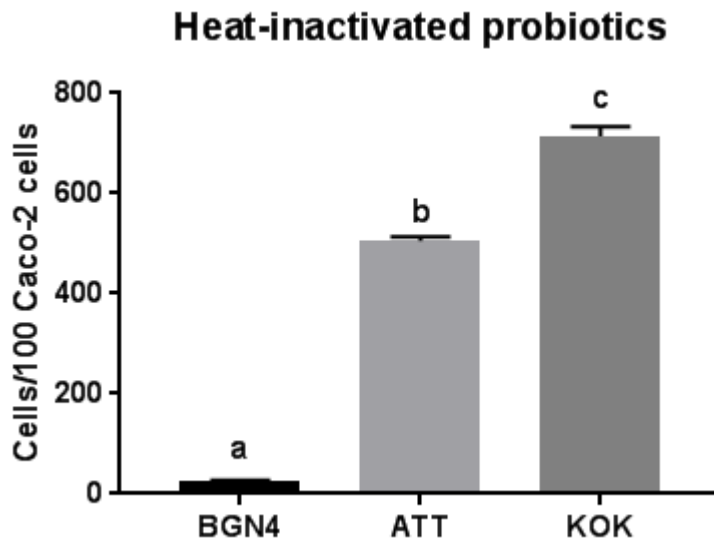


Fig. 5 Adhesion of heat-inactivated probiotics to Caco-2 cells.

($p < 0.05$)

3.5. 효소 처리가 선발균 부착능에 대한 영향

세가지 유익균에 효소를 처리한 후 Caco-2 세포에 대한 부착능을 조사하였다. *B. bifidum* BGN4의 세포 부착능은 pepsin의 영향을 제일 많이 받았고 pancreatin, lipase, chymotrypsin의 영향을 제일 적게 받았다. *B. bifidum* ATT의 세포 부착능은 pepsin, trypsin, α -amylase, pancreatin의 영향을 제일 많이 받고 lipase는 오히려 특정한 선발균의 부착능을 증가시켰다. *L. sakei* KOK의 세포 부착능은 pepsin의 영향을 제일 많이 받고 lysozyme의 영향을 제일 적게 받았다(Fig. 6).

Tuomola 등에 의하면 *L. acidophilus* LA1은 pepsin, trypsin로 처리를 하면 장 상피세포에 대한 부착능이 감소하는데, 이는 균의 단백질 구조가 부착능에 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 보고되었다. 또한 *L. acidophilus* BG2FO4는 pepsin, trypsin의 처리로 의해 생균보다 장 부착능이 감소하지만 chymotrypsin으로 처리했을 때 장 부착능이 거의 감소하지 않았다. 이는 추정되는 표층 단백질이 부착능에 관여하기 때문인 것으로 해석된다[10].

실험결과에 의하면 *B. bifidum* BGN4의 장 부착능은 pepsin과 trypsin의 영향을 많이 받지만 chymotrypsin의 영향을 적게 받았다. *B. bifidum* ATT와 *L. sakei* KOK의 장 부착능은 pepsin과 trypsin의 영향을 많이 받았다. 그러므로 *B. bifidum* BGN4, *B.*

bifidum ATT 와 *L. sakei* KOK 모두 단백질 구조가 부착능에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 추측할 수 있다.

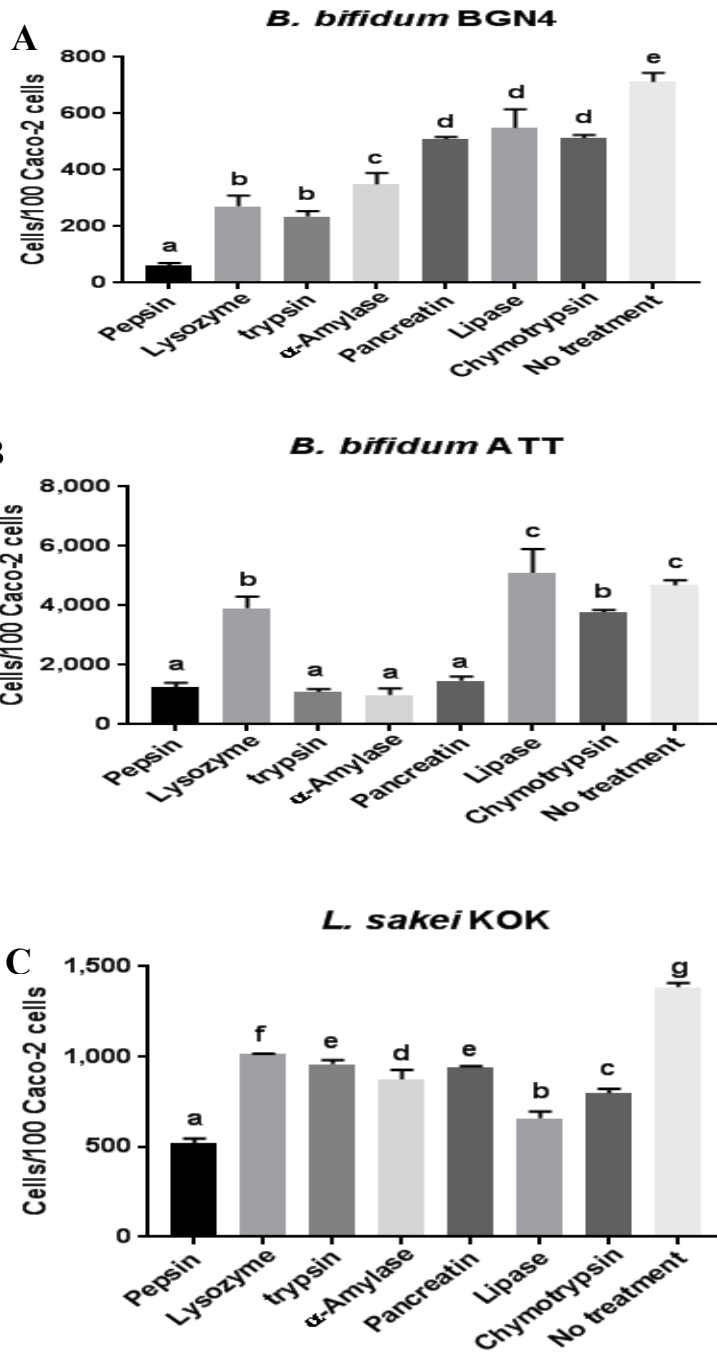


Fig. 6. Adhesion of the various enzyme-treated probiotics to Caco-2 cells. ($p < 0.0$)

3.6. 선발균의 유해균 부착 억제능

선발균이 유해균을 억제하는 작용을 protection assays, competition assays, displacement assays 세가지 실험으로 비교해 보았다.

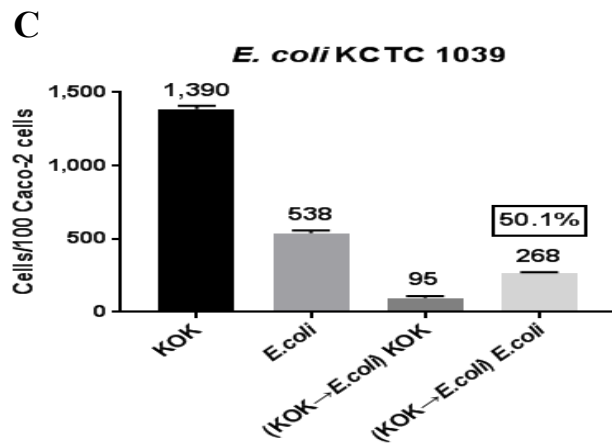
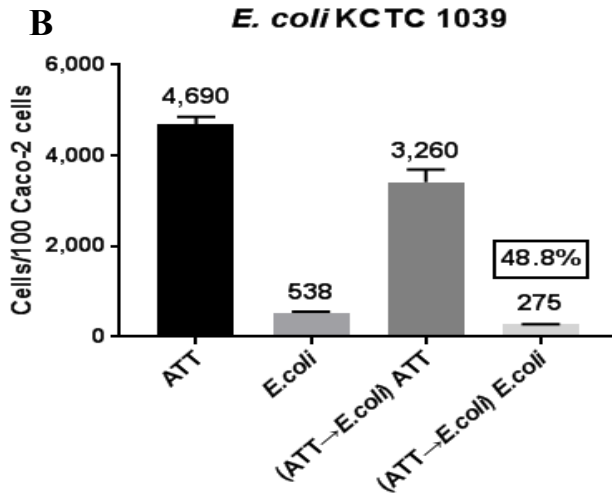
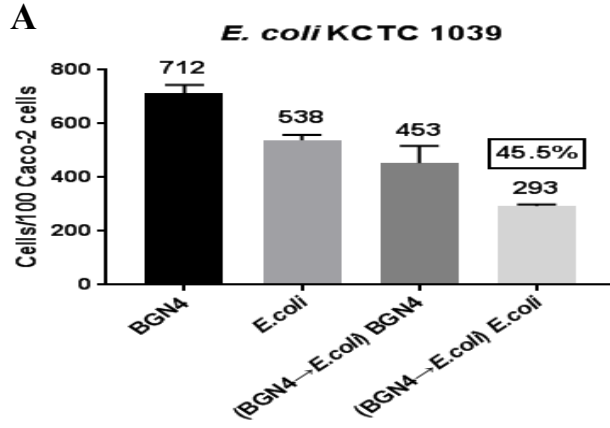
Protection assays 에서는 먼저 선발균을 부착한 후에 유해균을 부착하여 유해균이 얼마나 억제되는지를 조사하였다. *E. coli* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 45.5%, 48.8%, 50.1%이었다. *S. typhimurium* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 88.6%, 92.6%, 86.7%이었다. *L. sakei* KOK 는 *E. coli* 을 비교적 많이 억제하였다. *B. bifidum* ATT 가 *S. typhimurium* 을 비교적 많이 억제 하였다(Fig. 7).

Competition assays 에서는 선발균과 유해균을 동시에 부착하여 유해균이 얼마나 억제되는지를 조사하였다. *E. coli* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 63.6%, 51.4%, 75.1%이었다. *S. typhimurium* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 88.8%, 93.2%, 87.1%이었다. *L. sakei* KOK 는 *E. coli* 를 비교적 많이

억제하였고 *B. bifidum* ATT가 *S. typhimurium*을 억제 하였다(Fig. 8).

Displacement assays 에서 먼저 유해균을 부착한 후에 선발균을 첨가했을 때의 부착에 대한 정도를 평가하였다. *E. coli* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 38.5%, 16.5%, 41.7%이었다. *S. typhimurium* 을 대상으로 실험했을 때, *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 의 유해균 억제 능력은 각각 58.8%, 56.9%, 54.3%이었다(Fig. 9).

세가지 실험을 종합하여 보면 선발균을 먼저 부착하거나 선발균을 같이 부착하였을 때에 유해균을 억제하는 능력이 더 강하다는 것을 확인하였다. 또한 *S. typhimurium* 는 *E. coli* 에 비해 초기 부착능은 강하지만 유익균과의 경쟁에서 부착 정도가 더 많이 감소하는 것으로 나타났다. 전체적으로 보면 *L. sakei* KOK 는 다른 균에 비해 *E. coli* 을 비교적 많이 억제하고 *B. bifidum* ATT 는 다른 균에 비해 *S. typhimurium* 을 비교적 많이 억제하였다.



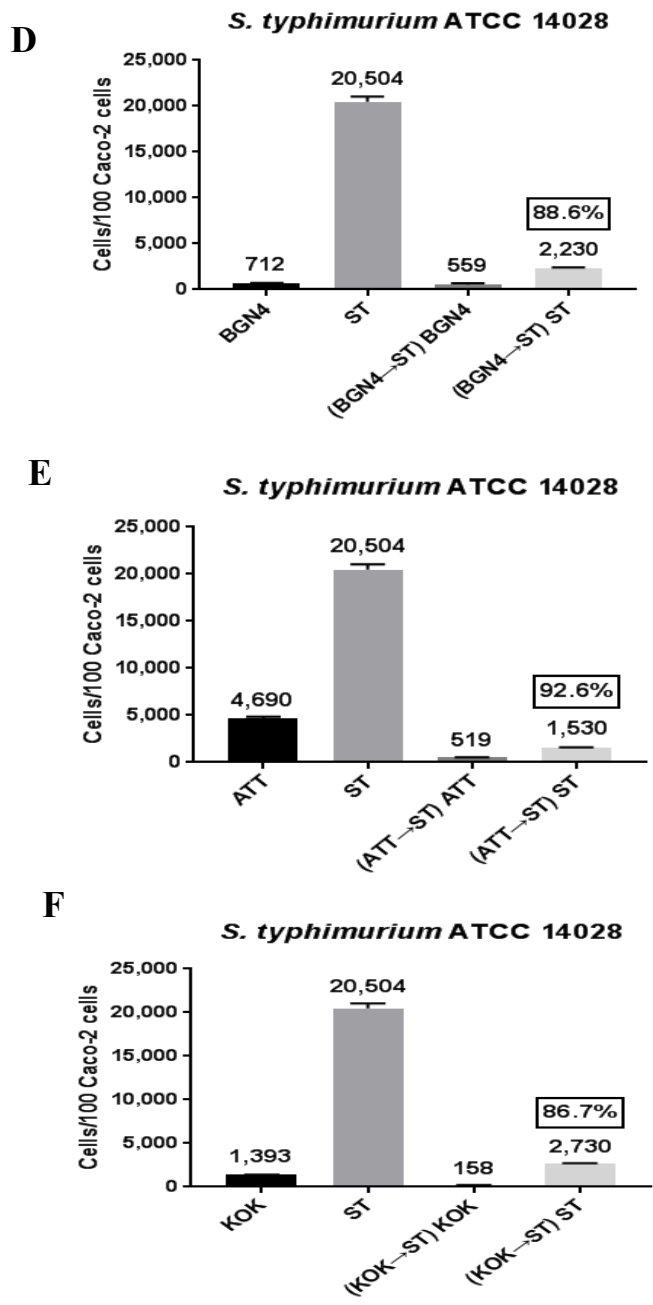


Fig. 7. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in protection assays.

(A) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with BGN4 followed by *E. coli*.

(B) The left two columns represented the numbers of single ATT or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with ATT followed by *E. coli*.

(C) The left two columns represented the numbers of single KOK or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with KOK followed by *E. coli*.

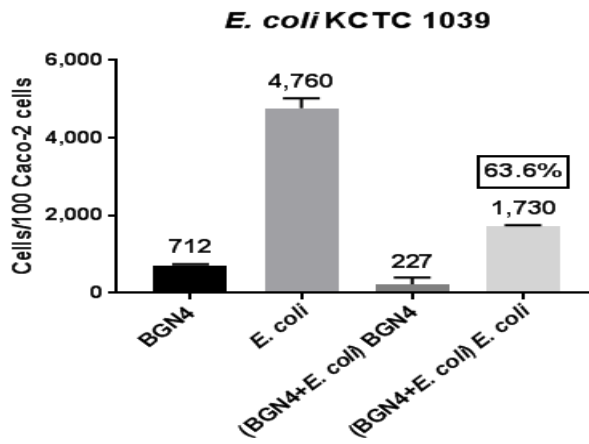
(D) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with BGN4 followed by *S. typhimurium*.

(E) The left two columns represented the numbers of single ATT or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with ATT followed by *S. typhimurium*.

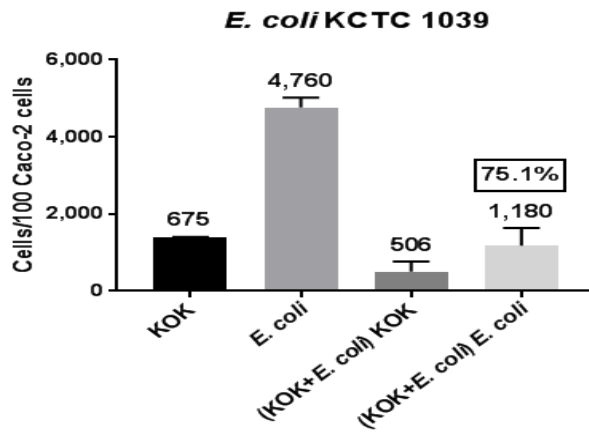
(F) The left two columns represented the numbers of single KOK or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with KOK followed by *S. typhimurium*.

Error bars represent \pm standard deviation of mean values.

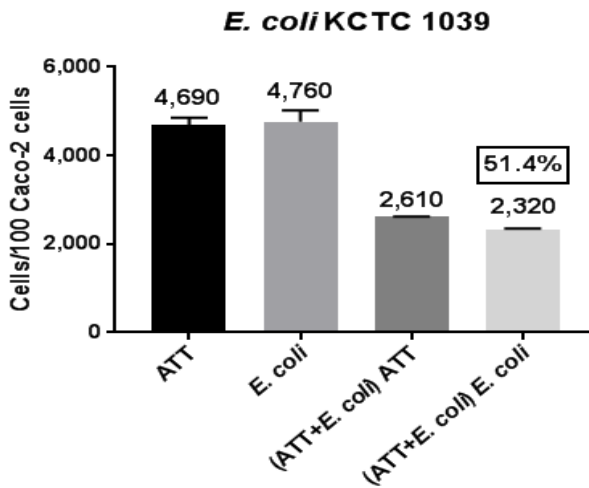
A



B



C



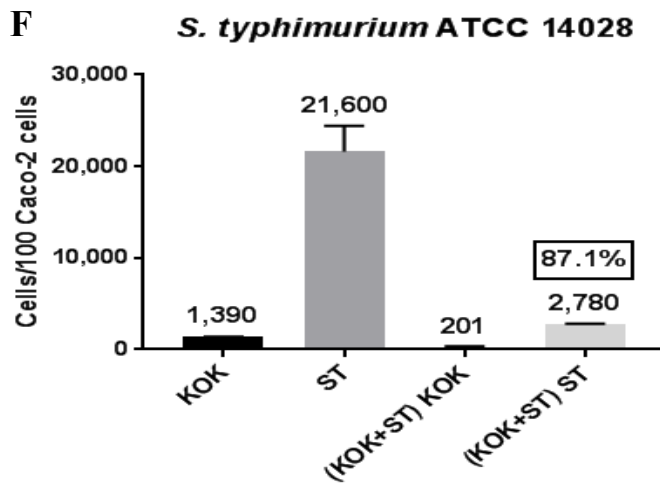
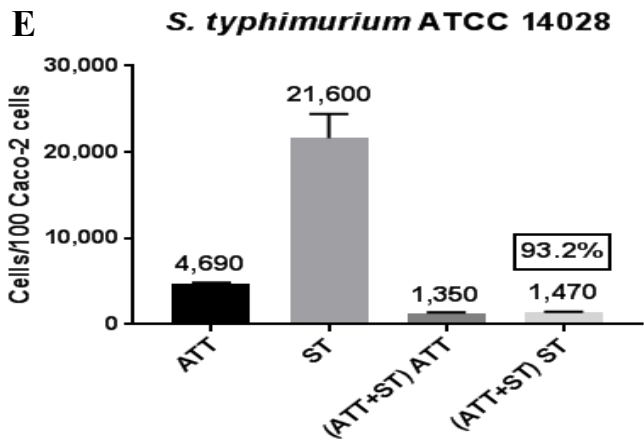
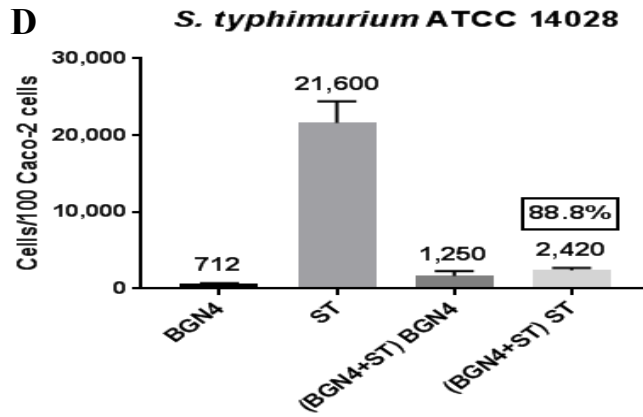


Fig. 8. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in competition assays.

(A) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of BGN4 and *E. coli*.

(B) The left two columns represented the numbers of single ATT or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of ATT and *E. coli*.

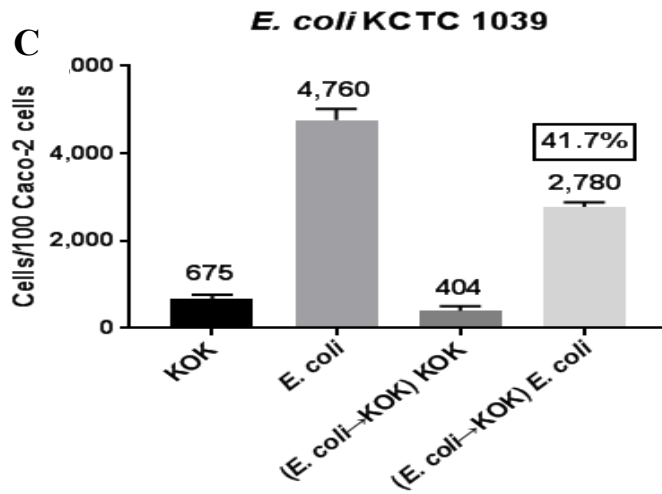
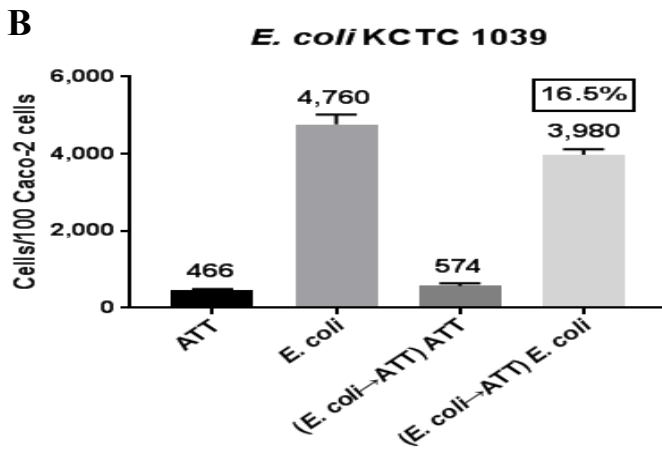
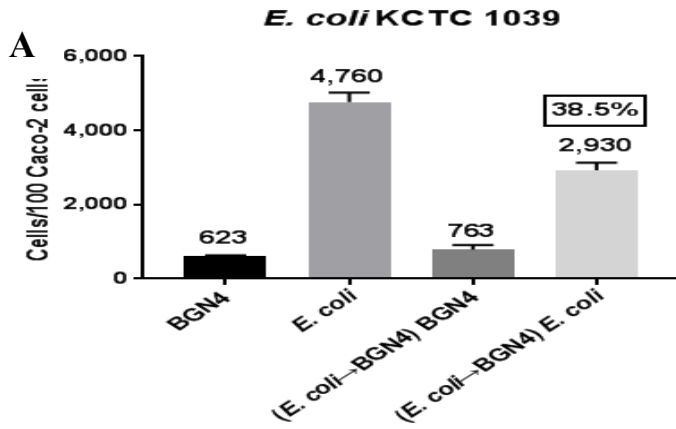
(C) The left two columns represented the numbers of single KOK or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of KOK and *E. coli*.

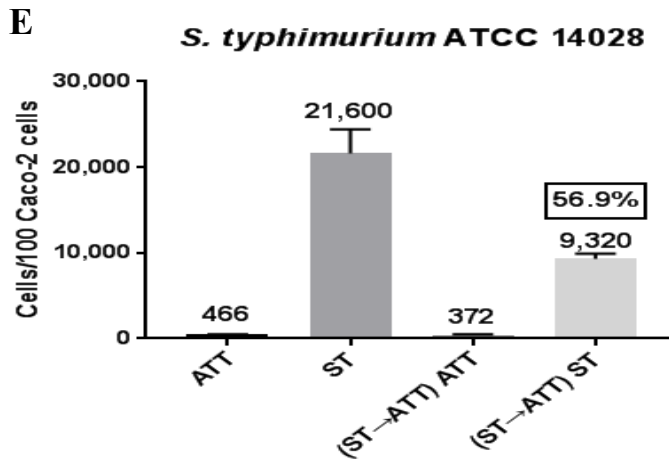
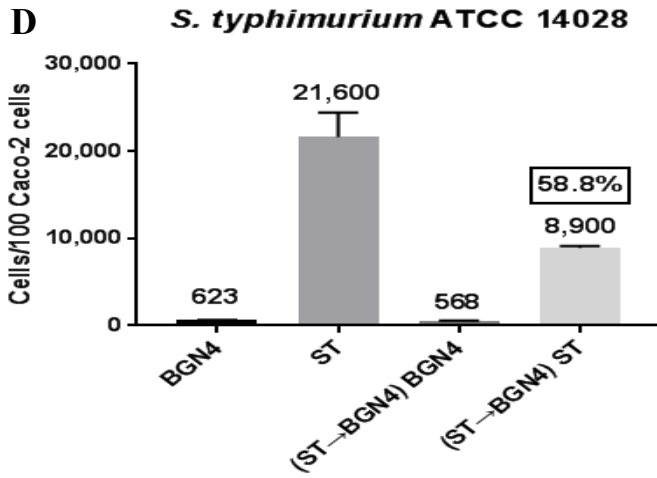
(D) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of BGN4 and *S. typhimurium*.

(E) The left two columns represented the numbers of single ATT or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of ATT and *S. typhimurium*.

(F) The left two columns represented the numbers of single KOK or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after co-incubation of KOK and *S. typhimurium*.

Error bars represent \pm standard deviation of mean values.





F

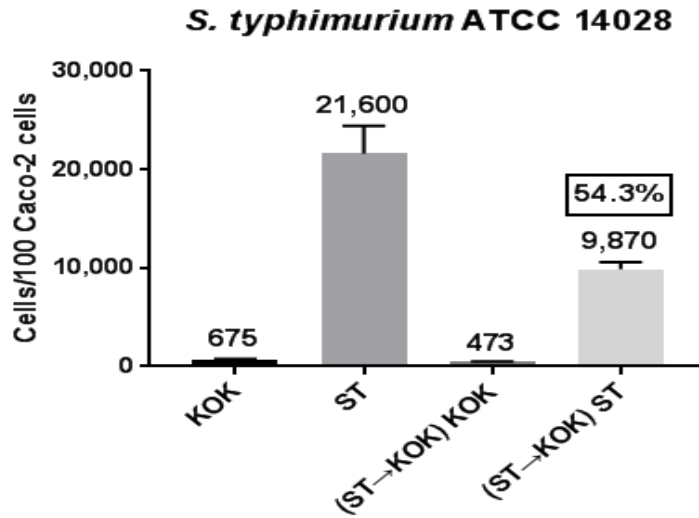


Fig. 9. Number of experimental bacteria and pathogens bound to 100 Caco-2 cells in displacement assays.

(A) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *E. coli* followed by BGN4.

(B) The left two columns represented the numbers of single ATT or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *E. coli* followed by ATT.

(C) The left two columns represented the numbers of single KOK or *E. coli* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *E. coli* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *E. coli* followed by KOK.

(D) The left two columns represented the numbers of single BGN4 or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of BGN4 or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *S. typhimurium* followed by BGN4.

(E) The left two columns represented the numbers of single ATT or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of ATT or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *S. typhimurium* followed by ATT.

(F) The left two columns represented the numbers of single KOK or *S. typhimurium* strains adhered to 100 Caco-2 cells. The right two columns represented the numbers of KOK or *S. typhimurium* adhered to 100 Caco-2 cells after sequential treatment with *S. typhimurium* followed by KOT.

Error bars represent \pm standard deviation of mean values.

3.7. 선발균이 자극 처리된 HT-29 세포의 IL-8 생산에 미치는 영향

IL-1 β , TNF- α , LPS 에 의한 IL-8 단백질 발현 변화에 선발균의 처리가 미치는 영향을 ELISA 를 이용하여 분석하였다. HT-29 세포에 IL-1 β (0.1 ng/mL), TNF- α (0.5 ng/mL), LPS (1 μ g/mL)를 각각 6 시간 동안 처리하였을 때 IL-8 단백질 발현이 증가하였다. 그러나 자극원에 유익균을 1×10^8 CFU/mL 의 농도로 같이 처리할 경우 IL-1 β , TNF- α , LPS 에 의한 IL-8 발현이 모두 감소하였다. IL-1 β 와 TNF- α 에 의한 IL-8 발현은 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 에 의해 무 처리군과 같은 유의수준으로 감소하였다. LPS 에 의한 IL-8 발현은 *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 에 의해 무 처리군과 같은 유의 수준으로 감소하였다. *B. bifidum* BGN4 의 LPS 에 의한 IL-8 발현의 감소는 다른 균들에 비해 다소 낮았다($p < 0.05$).

이 중에서 *B. bifidum* ATT 와 *L. sakei* KOK 는 자극원에 의한 IL-8 발현을 같은 수준으로 감소시켰다. TNF- α 에 의한 IL-8 발현 증가는 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 에 의해 통계적으로 같은 수준으로 감소하였다(Fig. 10).

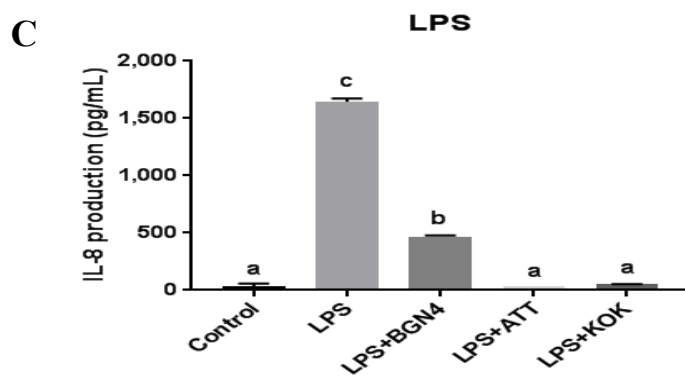
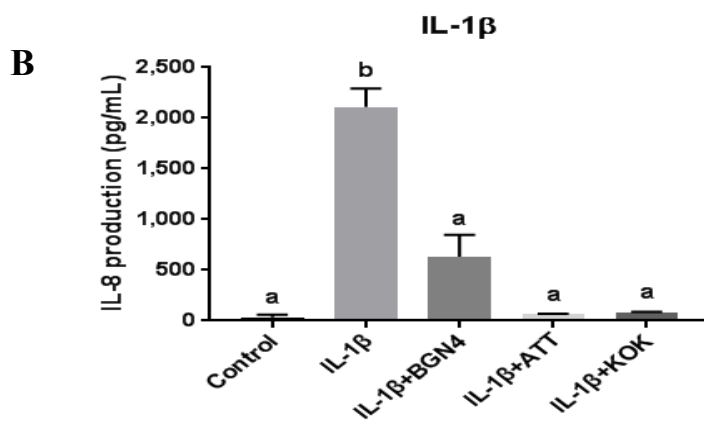
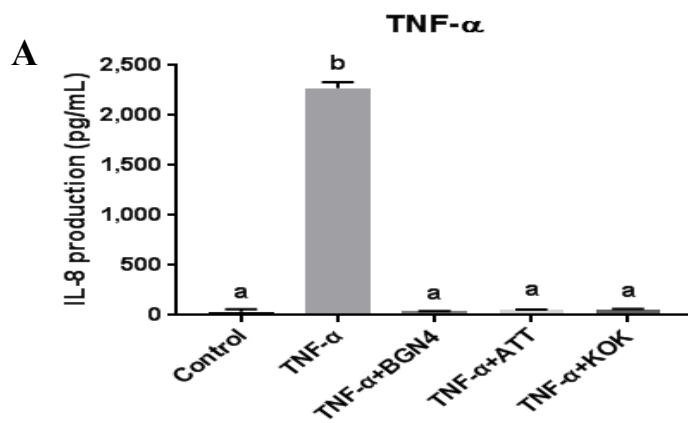


Fig. 10. The effect of probiotics on the production of IL-8.
($p < 0.05$)

4. 요약 및 결론

유익균은 예로부터 사용되어 왔고 안전하다고 인식되어 있기 때문에 여러 종류의 소화기질환에서 보조적 혹은 대체적인 요법으로 각광을 받고 있다. 최근 들어서 다양한 형태로 상용화가 되면서 사용이 늘어나고 있는 추세이다[28].

본 연구에서는 200 여 개의 균 중에서 Caco-2 세포에 부착능이 강한 유익균인 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT, *L. sakei* KOK 를 선발하였다.

이 세가지 균을 시간, 농도, 열, 효소 처리에 따른 세포의 부착능을 보았다. 실험결과에 의하면 선발균을 세포에 1 시간 동안 부착했을 때 부착된 균 수가 제일 많았다. 그러므로 다음 실험을 위한 조건으로는 1 시간의 균 처리가 적합하다는 것을 알 수 있다.

세가지 농도(10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL)로 선발균을 세포에 처리했을 때 세포에 처리하는 농도가 증가할수록 부착균 수도 증가하는 경향을 나타냈다. 처리한 균의 농도를 10^7 CFU/mL 에서 10^9 CFU/mL 로 100 배 증가시켰을 때 부착된 균 수는 2~15 배 증가하였다.

선발균을 열에 처리하여 불활성화를 시켜 생균과 비교했을 때 *B. bifidum* KOK 의 부착능이 우수하였다.

효소 처리한 균의 부착능을 보면 세가지 균 모두 pepsin 의 작용을 많이 받았다. 실험결과에 의하면 *B. bifidum* BGN4 의 장 부착능은 pepsin 과 trypsin 의 영향을 많이 받지만 chymotrypsin 의 영향을 거의 받지 않았다. *B. bifidum* ATT 와 *L. sakei* KOK 의 장 부착능은 pepsin 과 trypsin 의 영향을 많이 받았다. 그러므로 *B. bifidum* BGN4, *B. bifidum* ATT 와 *L. sakei* KOK 모두 단백질 구조가 부착능에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 추측할 수 있다.

강한 부착능의 선발균을 유해균과 세가지 경우에 경쟁하여 유해균 부착 억제 능력을 보았다. 결과적으로 볼 때 선발균을 먼저 세포에 처리하거나 유해균과 같이 처리했을 때 유해균의 세포에 대한 부착을 더 많이 억제하였다. 또한 *S. typhimurium* 는 *E. coli* 보다 세포에 대한 부착능이 강하지만 유익균과 경쟁을 하였을 때에는 세포에 대한 부착이 더 많이 억제된다는 것을 확인하였다.

또한 선발균의 항염증 효과를 알아보기 위하여 IL-1 β , TNF- α , LPS 를 이용하여 HT-29 대장암 세포주를 자극하고 염증반응 매개체인 IL-8 의 발현을 분석하였다. 연구 결과, 세가지 유산균 모두 IL-1 β , TNF- α , LPS 로 분비된 IL-8 생성을 의미 있게 감소시켰다.

본 연구에서 Caco-2 세포에 대해 부착능이 높은 세가지 균을 선발하여 균주의 여러가지 부착 특성 및 유해균 부착 억제 능력을

탐구함으로 인해 앞으로 기능성 식품에 활용되는 유익균의 소재로의 응용이 기대된다.

참고문헌

1. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, and Gordon JI. 2005. Host–bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. **307**: 1915–1920.
2. Zoetendal EG, Vaughan EE, and De Vos WM. 2006. A microbial world within us. *Molecular Microbiology*. **59**: 1639–1650.
3. Hehemann J–H, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, and Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate–active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*. **464**: 908–912.
4. Sugimura Y, Hagi T, and Hoshino T. 2011. Correlation between in vitro mucus adhesion and the in vivo colonization ability of lactic acid bacteria: screening of new candidate carp probiotics. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **75**: 511–515.
5. Chae A, Aitchison A, Day AS, and Keenan JI. 2017. Bovine colostrum demonstrates anti–inflammatory and antibacterial activity in in vitro models of intestinal inflammation and infection. *Journal of Functional Foods*. **28**: 293–298.
6. Sartor RB. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. **126**: 1620–1633.
7. Lee SK, Yang KM, Cheon JH, Kim TI, and Kim WH. 2012. Anti–inflammatory mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG in lipopolysaccharide–stimulated HT–29 cell. *The Korean Journal of Gastroenterology*. **60**: 86–93.
8. Kadlec RandJakubec M. 2014. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*. **97**: 1983–1990.
9. Maccaferri S, Klinder A, Brigidi P, Cavina P, and Costabile A. 2012. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399

modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**: 956–964.

10. Tuomola EM, Ouwehand AC, and Salminen SJ. 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International Journal of Food Microbiology*. **60**: 75–81.

11. Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, and Fang W. 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. **115**: 307–312.

12. Lim SM and Ahn DH. 2012. Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **22**: 1731–1739.

13. Gibson G, McCartney A, and Rastall R. 2005. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*. **93**: S31–S34.

14. Bahrami B, Macfarlane S, and Macfarlane G. 2011. Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *Journal of Applied Microbiology*. **110**: 353–363.

15. Boesten R, Schuren F, Willemsen L, Vriesema A, Knol J, and De Vos W. 2011. *Bifidobacterium breve*-HT-29 cell line interaction: modulation of TNF- α induced gene expression. *Beneficial Microbes*. **2**: 115–128.

16. Matsuki T, Watanabe K, and Tanaka R. 2002. Genus- and species-specific pcr primers for the detection. *Probiotics and Prebiotics: Where are We Going*. **85**.

17. Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, *et al.* 2008. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 4695–4702.
18. Kim IH, Park MS, and Ji GE. 2003. Characterization of adhesion of *Bifidobacterium* sp. BGN4 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **13**: 276–281.
19. Duary RK, Rajput YS, Batish VK, and Grover S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian Journal of Medical Research*. **134**: 664.
20. Candela M, Seibold G, Vitali B, Lachenmaier S, Eikmanns BJ, and Brigidi P. 2005. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Research in Microbiology*. **156**: 887–895.
21. Hidalgo-Cantabrana C, Kekkonen R, Clara G, Salminen S, Korpela R, Gueimonde M, and Ruas-Madiedo P. 2014. Effect of bacteria used in food industry on the proliferation and cytokine production of epithelial intestinal cellular lines. *Journal of Functional Foods*. **6**: 348–355.
22. Lopez P, Monteserin DC, Gueimonde M, Clara G, Margolles A, Suarez A, and Ruas-Madiedo P. 2012. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Research International*. **46**: 99–107.
23. Ouwehand A, Tölkö S, and Salminen S. 2001. The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *Journal of Food Science*. **66**: 856–859.
24. Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Li X, Tian M, *et al.* 2012. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe*. **18**: 508–515.

25. Thapa D, Louis P, Losa R, Zweifel B, and Wallace RJ. 2015. Essential oils have different effects on human pathogenic and commensal bacteria in mixed faecal fermentations compared with pure cultures. *Microbiology*. **161**: 441–449.
26. Malinen E, Rinttila T, Kajander K, Matto J, Kassinen A, Krogius L, *et al.* 2005. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *The American Journal of Gastroenterology*. **100**: 373–382
27. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, and Colin P. 1999. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*. **28**: 113–117.
28. AFRC RF. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*. **66**: 365–378.

Abstract

Adhesion characteristics and
suppression of pathogen
adhesion to Caco-2 cells by
strongly adhesive
Bifidobacterium and
Lactobacillus

Hui Fang

Department of Food & Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

The objective of this study was to select the probiotic strains with strong adhesion to the intestinal epithelial cell line (Caco-2) and to confirm their adhesion characteristics and inhibition ability

against the adhesion of *Escherichia coli* KCTC 1039 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 to Caco-2 cells. In this study, *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium bifidum* ATT, and *Lactobacillus sakei* KOK were selected among over 200 experimental probiotic strains with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), which showed strong adhesion to Caco-2 cells. The selected three probiotic strains showed the strongest adhesion to Caco-2 cells at 60 min incubation. As the concentration of the probiotics increased, the number of bacteria attached to the cells also increased. In addition, the adhesion abilities of three strains were significantly ($p < 0.05$) reduced after exposure to pepsin or 30 min-heating at 70°C. *L. sakei* KOK showed the strongest adhesion among the heat-inactivated strains. In the protection and competition experiment, *L. sakei* KOK exerted stronger inhibitory effects on the adhesion of *E. coli* than the other two strains. Meanwhile, the inhibition of *S. typhimurium* adhesion to Caco-2 cells by *B. bifidum* ATT was stronger than by the other two strains. Interestingly, all of the selected strains suppressed the production of IL-8 in HT-29 cells stimulated by IL-1 β , TNF- α , and LPS.

Keyword: probiotics, adhesion, suppression, pathogen,
immunomodulation

Student Number: 2015-22375