

# 비피더스균의 Caco-2 Cell 정착능과 유해세균 억제와의 관계

김응률, 정후길, 전석락, 유제현\*  
매일유업(주) 중앙연구소\*, 건국대학교 낙농학과

## I. 서론

지난 20여년 동안 건강에 대한 관심이 부각되면서 광범위하게 연구되고 있는 분야 중의 하나는 프로바이오틱 유산균이다. 이러한 프로바이오틱 유산균의 연구분야는 크게 종균 개발, 기능성 파악 및 기초적인 생리활성 기능에 대한 기작 파악으로 구분될 수 있다.

장내 고유의 미생물 군총을 구성하고 있는 미생물에 의해서 만들어지는 방어 기능의 중요성에 대해서 광범위하게 보고되어 있다. 또한 적절한 미생물 군총은 건강과 일치하며 장내 생태계의 변화는 면역학적 기능 장애나 면역 결핍과 관련되어 있다. 많은 장내세균 중에서도 유산균은 외래 병원균에 대하여 1차적 보호장벽이 되어 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 유용 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

현재까지 우리나라에서 개발 또는 도입되어 발효유제품에 이용되고 있는 프로바이오틱 유산균으로는 *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophilus* NCFM, *L. casei* Shirota, *Bif. longum* Bb-12 등이 있으며, 이외에도 특정 기능만을 보유한 프로바이오틱 유산균의 개발도 붐을 이루고 있는 실정이다.

프로바이오틱 유산균은 장내까지 생존하여 들어가 유기산 생성에 의한 정장작용, 다른 유해세균과의 영양성분에 대한 경쟁적 이용, 장내 생존성과 정착성, 신체의 비자기체 인식에 의한 면역 호르몬 증가와 특정한 면역단백질 생성증강, 프로바이오틱 유산균의 cell debris 성분에 의한 여러가지 기능적 효과 등이 대표적인 프로바이오틱 유산균의 장내 유용효과로 인정되고 있다

이와 같은 기능성은 프로바이오틱 균수와 균종에 따라 차이는 있지만, 근본적으로 장벽에 정착되어야 하는 선결조건이 필요하다. 또한 이러한 기능성에 관한 연구 중에서 대부분의 분야는 면역증강 효과의 규명에 치우쳐져 있으며, 일차적 장점막 방어 체계(Gut mucosal barrier system)인 정착능에 대한 연구는 그다지 많은 편이 아니다.

따라서 본고에서는 프로바이오틱 유산균의 유해세균 억제 기작, Caco-2 cell을 이용한 정착능과 그 영향 인자, 프로바이오틱 유산균과 유해세균의 장내 정착 경쟁성에 관해 서술하므로써 장내에서의 프로바이오틱 유산균에 의한 일차적 장점막 방어 체계인 장세포 정착능이 프로바이오틱 유산균을 선별하는 데 있어서 선결조건이 되어야 하는 타당성을 제시할 것이다. 또한 비피더스균의 *E. coli* O157:H7과 rotavirus의 억제에 대해 이러한 맥락에서 연구한 것을 거론하고자 한다.

## II. 본론

### 1. 프로바이오틱 유산균의 장내 유해세균 억제 기작

프로바이오틱 유산균의 기능성 중에서 가장 대표적이라 할 수 있는 것이 장내에서의 유해세균 감염 억제 및 설사증 개선 효과로서, 그 기작은 Table 1과 같다.

Table 2. Pathogens-related reference depending upon Caco-2 cell

| Pathogens                      | References                      |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>  | Mounier et al., 1990            |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> | Darfeuille-Michaud et al., 1990 |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | Finlay & Falkow, 1990           |
| <i>Vibrio cholerae</i>         | Panigrahi et al., 1990          |
| <i>Cryptosporidium parvum</i>  | Flanigan et al., 1991           |
| <i>Entamoeba histolytica</i>   | Rigothier et al., 1991          |
| Rotavirus                      | Svensson et al., 1991           |
| Reovirus                       | Ambler & Mackay, 1991           |

(1) 유기산 생성에 의한 억제

장내에서 유산균은 유산과 초산 및 기타 유기산을 생성하여 대장의 pH를 저하시키는 중요한 역할을 담당하며, 아울러 병원성 및 부패성 세균의 생육을 억제하여 세균성 독소 등의 물질 생성을 제한할 수 있다. 또한 장내에서의 영양성분에 대한 경쟁작용을 통하여 유해세균에 의해서 소화 과정 중에 여러가지 해로운 물질로 바뀌게 되는 것을 방지하는 효과가 있다.

(2) 면역증강에 의한 억제

장내에서의 면역증강효과는 외래 항원이 침입하면 다형성 다핵 백혈구와 macrophage로 공격하는 것이다. 정상적인 조건 하에서 macrophage는 외래 미생물이나 입자를 사멸시켜 소화시킨다. 이러한 비특이적인 방어 기작의 효율성을 증가시키기 위하여 숙주는 여러가지 방법을 통하여 macrophage를 활성화시킬 수 있다. 즉, 식균세포의 직접적인 자극을 통한 식균 작용의 증가가 이들 방법 중의 하나이다. 또한 특정 면역단백질 생성에 의한 외래 항원의 비활성화 과정도 있다.

(3) 장점막 정착에 의한 억제

장내 병원성균과 바이러스의 정착이나 감염을 막는 프로바이오틱 유산균주의 유용 효과를 나타내는 기작은 다음과 같다. 즉, 장 점막성 방어 기능의 강화, 장내 미생물 균총의 변화, 병독원의 정착과 활성화를 방지하기 위한 장 점막 정착성, 장내균총에 의한 식이성 단백질의 수식 및 변경, 세균성 효소 활성의 수식 및 변경, 국부적인 면역학적 기능 결핍에 대응하고 본연의 장 점막성 방어 기작의 안정화를 위한 면역 치료법, 그리고 장 점막 투과성에 대한 영향 등과 같은 기능 등을 들 수 있다. 이외에도 유산균의 cell debris 성분에 의한 기능성들이 계속하여 연구되고 있다.

Table 1. Inhibitory mechanisms of probiotics against pathogens at gastro intestinal tract

| Items   | Factors   | References  |
|---|---|---|
| Secretion of (General)                              | Organic acid<br>Anti-pathogen materials<br>Anti-rotavirus materials | Duffy et al., 1994<br>Lehto & Salminen, 1997a<br>Fukushima et al., 1997 |
| Stimulation of (Immune-potentiation)                | Cytokine secretion<br>Phagocytosis<br>Increase of specific IgA      | Miettinen et al., 1996<br>Hatcher & Lambrecht, 1993<br>Lee et al., 1993 |
| Inhibition of (1 <sup>st</sup> Gut mucosal barrier) | Adherence of pathogens<br>Penetration of macro-molecules            | Bernet et al., 1993<br>Kaila, 1993                                      |

## 2. Caco-2 세포의 이용과 정착인자

### (1) Caco-2 세포

최근에 장내세포의 구성 및 기능과 관련된 기초적인 사항을 연구하기 위하여 여러가지 세포 배양 방법이 사용되고 있다. 그중에서 인체 장내 상피세포 계열인 HT-29와 Caco-2 세포가 사람의 enterocyte 기능에 대한 연구에 광범위하게 사용되고 있다. 이들 세포 모델의 장점은 *in vitro* 조건에서 이들 세포가 형태적이고 기능적인 분화를 일으키며 또한 polarization, 기능성 췌자연(brush border), 그리고 장용모 침단에서 분비하는 hydrolase 등의 성숙한 enterocyte 특성을 나타낸다는 것이다. 세균이 점막세포와 결합하는 데에는 세균의 ligand와 특정 수용체와의 상호작용이 필요하기 때문에 인체 장내의 Caco-2와 HT-29 세포는 실제적으로 세균과 바이러스의 장내 정착을 연구하는데 있어서 가장 유용한 모델이며, Caco-2 세포를 이용한 병원균 미생물 관련 연구문헌은 Table 2와 같다.

### (2) 정착인자

Caco-2 세포를 유산균과 병원성 미생물의 정착능과 그 기초 기작을 연구하는데 이용하므로써 많은 연구가 가능하게 되었으며, 장벽에 대한 유산균의 정착능이 프로바이오틱 유산균으로서의 선결조건이라는 것이 보편적으로 되었다. 그러나 이러한 기능성 유산균의 장내 정착에 관여하는 인자는 수많은 학자에 의해서 연구되어 왔으며, 그 인자를 열거하면 Table 3와 같다.

이 중에서도 peptidoglycan은 대부분의 미생물 관련 감염증을 방지할 수 있다. 이러한 peptidoglycan의 면역 증강능에 대한 많은 효과가 알려져 있음에도 불구하고 숙주 세포에 대한 peptidoglycan의 생화학적 작용 기작에 대하여는 별로 알려진 바 없다. 그러나 peptidoglycan의 병원균에 대한 면역증강에 따른 항균 효과는 많은 학자들에 의해 밝혀졌다.

## 3. 프로바이오틱 유산균과 병원체와의 장내 정착 경쟁성

### (1) 장내 미생물

장내 미생물과 인체 건강과의 관계는 아주 밀접하며 그 관계를 Fig.1에 나타냈다. 대부분의 장내 우세균은 건강한 사람의 경우에 유익균들이 존재하지만, 여러 요인에 의해서 그 균형이 바뀌게 되면 병원균이 증가하게 되므로 인체에 많은 질병 원인을 제공하게 된다. Mucosal surfaces는 일반적으로 외부 항원과 미생물이 면역 시스템에 작

Table 3. Adherence factors of lactic acid bacteria to Caco-2 cell

| Sources    | Factors                     | Remarks                         | References  |
|------------|-----------------------------|---------------------------------|---|
| Enterocyte | Glycoprotein                | Mucin, collagen                 | Yamada et al., 1996   |
|            | Glycolipid                  | Lactocylamide                   | Aleljung et al., 1994   |
|            | Brush border                | Lipoteichoic acid               | Yamamoto, 1998  |
|            | Mucus                       | Microvilli                      | Op den Camp et al., 1985  |
|            | Tight junction              | Enterocyte membrane Penetration | Sarem et al., 1996<br>Mikelsaar et al., 1998<br>Hochman & Artrusson, 1994 |
| Bacteria   | Fermented supernatant       | Secreted protein                | Coconnier et al., 1992  |
|            | Cell surface hydrophobicity | Negative charge                 | Perez et al., 1998  |
|            | Cell membrane               | Glycoprotein, glycolipid        | Lankaputhra & Shah, 1998  |
|            | Inoculum size               | Capacity dependance             | Lehto & Salminen, 1997b   |
|            | Strain specificity          | Strain-specific                 | Lin & Savage, 1984  |
| The others | External pH                 | Acidic pH                       | Greene & Klaenhammer, 1994  |
|            | Enzyme                      | Chymosin, pepsin, trypsin       | Greene & Klaenhammer, 1994  |

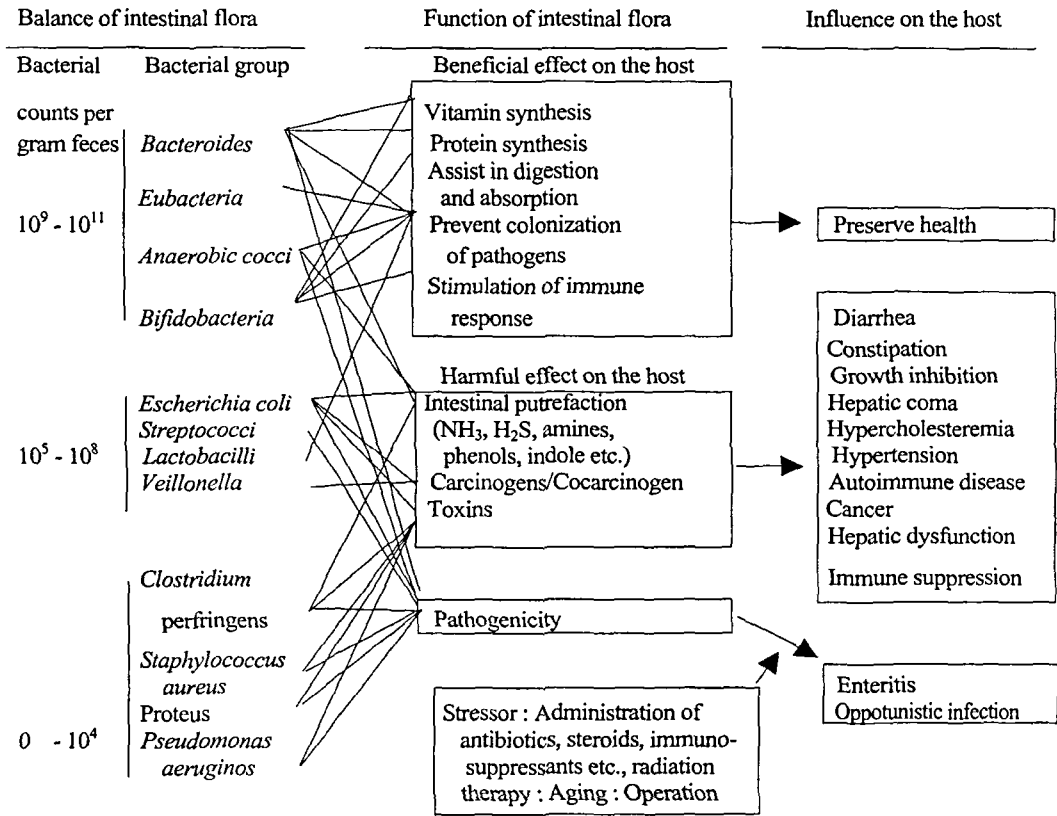


Fig.1. Relationships between the intestinal flora and the host(Mitsuoka, 1969)

용하는 가장 광범위한 지역으로 대표된다. 그러나 장점막은 항원, 독소, 미생물 등과 같은 다양한 외래 거대분자의 환경에 노출되어 있다.

이러한 광범위한 장내에서의 모든 미생물들은 일차적으로 장의 연동운동이나 식품의 흐름에 저항하여 장내에 머무른다는 것이 중요하며, 장벽에의 정착은 장내세균에게는 사활 문제이기도 하다. 그러나 많은 장내세균 중에서도 유산균은 외래 병원균에 대하여 장벽(barrier)이 되어 장관 감염과 유해균의 증식을 저지하고, 장관의 환경을 정화하는 기능을 갖고 있기 때문에 숙주에게는 상당히 유용한 유익균이다.

## (2) 정착 부위에 대한 경쟁 작용

장내 환경 내에서 병원성 세균은 프로바이오틱 유산균과 영양적인 경쟁 작용 및 정착 부위에 대한 상호 경쟁 작용을 하고 있으며, 이것은 지금까지 널리 연구된 주제 분야이다. 서로 다른 프로바이오틱 유산균을 혼합 사용하면 장내에서 정착성 부위에 대한 상호 경쟁 작용이 일어나게 된다.

### 1) Lehto and Salminen(1997b)

실험균주를 서로 다른 2가지 단계로 Caco-2 세포에 첨가하였다. 그후 처음에 첨가한 유산균이 나중에 첨가된 유산균의 정착성에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 L. rhamnosus LC-705 균주가 이미 Caco-2 세포의 단일층에 정착했을 때에는 Propionibacterium freundenreichii 균주의 정착성이 현저하게 감소하였다. 이러한 사실로부터 이

들 유산균 사이에는 정착 부위에 대한 상호 경쟁 작용이 일어남을 알 수 있다.

## 2) Bernet et al(1993)

인체 유래의 정착성이 우수한 비피더스균의 다양한 설사 유발성 세균에 의한 장내세포 서식을 억제하는 효과에 대해서 연구하였다. 그 결과 *Bif. breve* 4, *Bif. infantis* 1, 그리고 새로운 인체 분리 비피더스균이 병독성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 병원성 대장균(enteropathogenic *E. coli*, EPEC), diffusely adhering *E. coli*(DAEC)와 *Sal. typhimurium* 균주 등이 농도 의존형 형태로 Caco-2 세포에 정착하는 것을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 더욱이 *Bif. breve* 4와 *Bif. infantis* 1 균주는 투여량에 의존해서 enteropathogenic *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Sal. typhimurium* 균주의 Caco-2 세포 침입을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

## 4. 비피더스균의 *E. coli* O157:H7 생육 및 감염 억제

### (1) *E. coli* O157:H7

병원성 세균은 숙주 체내에 경구를 통해서 침입하여 장관에 도달하게 되는데, 장내세균도 장의 연동운동이나 식품의 이동에 저항하여 장내에 머무르는 것이 중요하며, 장벽에의 정착은 장내 침입 미생물에도 아주 중요한 문제가 된다. 장내 설사증에 연관된 감염원으로는 수많은 미생물과 바이러스 및 기생충이 있다.

병원성 대장균인 장관 출혈성 *E. coli* O157:H7 균주가 생성하는 verotoxin이 장관의 상피세포 표면의 막 위에 있는 탄수화물 사슬을 특이적으로 인식하여 이것에 결합한 후에 세포 안으로 들어간다는 사실은 별로 알려져 있지 않다. 즉, verotoxin은 비환원 말단에 galactose  $\alpha 1 \rightarrow 4$  galactose(galabiose)라는 구조를 가진 세포막 위의 탄수화물 사슬을 수용체로 하여 세포에 정착한 후에 세포 내로 들어간다. 이러한 verotoxin의 생성에 의하여 용혈성 요독증후군, 출혈성 장염 및 혈소판 감소성 자반증 등을 유발한다. 이러한 장 침입성 *E. coli*가 성인의 설사증을 유발시키기 위해서는  $10^5$ - $10^8$ 이 체내에 들어가야 한다.

### (2) 비피더스균의 *E. coli* O157:H7 억제 효과

*Lactobacilli*는 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*에 의해서 유래되는 설사증을 예방하고 치유하는데 효과가 있다. 유산균에 의한 병원균의 억제 기작 중의 하나는 병원균의 장 독소 중화와 장점막에 정착하는 것을 방해하는 것이다. 장점막 상피세포에 대한 프로바이오틱 균주의 정착은 상대적으로 더 많은 병원균들의 정착을 억제할 것이다. 이것은 프로바이오틱 균주가 치료 효과를 나타내는 중요한 기작으로 생각되어 진다.

비피더스균은 *Escherichia*, *Clostridium*, *Eubacterium* 등과 같은 유해 미생물의 생육억제 뿐만 아니라 암모니아와 같은 해로운 부산물의 생성 억제에 관여한다. 비피더스균의 *E. coli* 생육 억제 요인을 요약하면 유산과 초산 생성에 따른 낮은 pH, *E. coli*가 생성해 내는 ammonia의 분해 및 이용, 항균물질 생성 분야로 대별될 수 있다.

### 1) Namba et al(1981)

미생물 분해효소와 미생물 세포벽 분해물의 경구투여시 guinea pig의 면역증강에 대해서 연구한 결과, lysozyme과 pronase를 함께 경구투여한 처리군이 개별적으로 처리한 군에 비해서 세포 면역능이 증가되었으며, *Bif. longum* 유래 세포벽 분해물의 경구투여에 의해서 체액내 면역반응이 증가되었는데 이러한 결과는 미생물 세포벽 분해물 중의 peptidoglycan에 의한 것으로 판단되었다고 보고하였다.

### 2) Anand et al(1984)

*Bif. bifidum* 1452 균주가 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella*

typhosa에 대하여 항균작용이 있음을 보고하였다. 이들은 이러한 항균작용의 원인이 낮은 pH에 의한 것으로 간주하고 있다.

### 3) Meghrou et al(1990)

비피더스균이 다른 종의 Bifidobacterium, Clostridium, Lactobacillus에 대해서 항균작용을 하지만, Pseudomonas, Klebsiella, Serratia 및 E. coli와 같은 Gram 음성 미생물에는 항균작용을 하지 못한다고 발표하였다. 이후에 단순한 항균물질에 의한 항균작용 연구에서 발전하여 비피더스균에 의한 병원성균의 정착억제에 관한 연구가 활발히 진행되었다.

### 4) Namioka et al(1991)

Bif. thermophilum 유래의 peptidoglycan에 의한 포유 쥐의 소장 면역 증강 효과를 조사한 결과, E. coli와 비피더스균 등에 의해서 야기되는 포유 후 설사증의 치료에 peptidoglycan이 효과가 있는 것으로 보고하였다.

### 5) Sasaki et al(1994)

쥐에 Bif. thermophilum 유래의 peptidoglycan을 500 $\mu$ g 급여시에 E. coli에 대한 생존률이 저하되었으며, 이러한 결과는 E. coli 감염에 대한 쥐의 방어활성이 peptidoglycan 급여에 의해서 증강된다고 하였다.

### 6) Kojima et al(1995)

Bif. longum BB536 균주가 유해 미생물과 이들로부터 ammonia의 생성을 억제한다고 보고하였다.

비피더스균의 E. coli에 대한 정착 및 감염억제 효과의 원인을 살펴보면 장 상피세포에 정착하기 위한 경쟁작용, 생육억제 효과에 따른 장내에서의 활력 저하, 면역증강 등의 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 사료된다. 또한 in vitro 실험을 통하여 보면 프로바이오틱 균주는 E. coli O157:H7이 장점막에 정착하는 것을 억제한다. 그러나 프로바이오틱 균주와 그 생성물질이 부적절한 병원균의 증식을 조절하는 복잡한 기작은 앞으로 더욱 많은 연구를 통하여 밝혀져야 한다.

## (3) 실험 결과

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. Bif. infantis K9 균주와 E. coli O157:H7을 단독 또는 혼합배양하면서 배양시간에 따른 pH, 균수, 암모니아 함량을 측정하였다. 그 결과 배양시간이 경과되어 Bif. 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. Bif. infantis K9 균주와 E. coli O157:H7 P4 균주를 정착시기를 달리하여 Caco-2 세포에 혼합 정착시켰을 때, Bif. infantis K9 균주는 정착시기에 상관없이 유사한 정착율을 나타냈다. 반면에 Bif. 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 이하일 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(Table 4).

Table 4. Changes of adherence to Caco-2 cell depending upon reaction step during mixed inoculation with Bif. infantis K9 and E. coli O157:H7 P4

| Reaction methods | Strains tested                 | Initial count (cfu/well)                   | Adherence           |      |
|------------------|--------------------------------|--|---------------------|------|
|                  |                                |  | cfu/well            | %    |
| A                | Bif. infantis K9<br>E. coli P4 | 1.1×10 <sup>7</sup><br>3.7×10 <sup>7</sup> | 1.9×10 <sup>9</sup> | 1.73 |
|                  |                                |  | 9.8×10 <sup>5</sup> | 2.65 |
| B                | Bif. infantis K9<br>E. coli P4 | 1.1×10 <sup>7</sup><br>3.7×10 <sup>7</sup> | 1.8×10 <sup>9</sup> | 1.64 |
|                  |                                |  | 6.9×10 <sup>5</sup> | 1.86 |
| C                | Bif. infantis K9<br>E. coli P4 | 1.1×10 <sup>7</sup><br>3.7×10 <sup>7</sup> | 1.6×10 <sup>9</sup> | 1.45 |
|                  |                                |  | 1.7×10 <sup>5</sup> | 0.46 |

A: Injection to Caco-2 cell at the same time

B: E. coli O157:H7 after injection of bifidobacteria (before 2hrs)

C: Bifidobacteria after injection of E. coli O157:H7 (before 2hrs)

## 5. 비피더스균의 rotavirus 생육 및 감염 억제

### (1) Rotavirus

로타바이러스는 1973년 발견된 이후로 선진국, 개발도상국, 후진국을 가리지 않고 세계적으로 장염의 주된 바이러스임이 규명되면서 세계보건기구(WHO)는 로타바이러스 감염의 보다 효율적인 억제 및 예방을 최우선 연구과제로 삼고 있는 실정이다. 과거에는 여름철에 발생하는 설사 중 세균성 설사가 80% 정도로 매우 높았으나 오늘날에는 세균성 20-30%와 바이러스성 70-80%로 오히려 바이러스성에 의한 비율이 훨씬 높은 실정이다.

사람과 동물에 있어서 로타바이러스는 장 용모세포에 정착되어 감염된다. 그러나 receptor에 대하여는 알려진바 없지만 M cell, 장세포 brush border의 lactase 효소, Fc receptor가 여기에 관여하는 것으로 추측된다. 로타바이러스 감염에 의해서 장점막 장벽에 이상 기능이 발생되는데 로타바이러스는 소장 용모에 있는 성숙된 장세포에 침입하여 설사증을 유발시키며 또한 영양소의 이상 흡수 현상을 야기시킨다. 이러한 로타바이러스 감염은 장 침투성의 증가와 연관된다. 그러므로 유아의 로타바이러스 감염에 대한 중요한 예방책은 장점막 장벽(gut mucosal barrier)을 강화하는 것이다. 장내 정착이 가능한 유산균은 외래균의 장 침투성 증가를 억제시킬 수 있으며 그 결과로 급성 설사증 치료에 용이하다.

인체에서의 로타바이러스 감염 부위는 주로 소장 상단이며 감염 기작은 명확하게 증명되어 있지는 않은데, 식물 유래 바이러스인 phage가 host cell에 결합한 후 RNA만이 침투하는 반면에 동물성 바이러스의 일종인 로타바이러스는 VP4와 VP7에 의해서 host cell에 결합된 후 로타바이러스 전체가 침투하게 된다. 장내에서 감염된 세포의 전자현미경 연구에 의하면 rotavirus particles는 endocytosis와 direct cell membrane penetration에 의해서 세포에 들어가는 것으로 밝혀졌다.

로타바이러스의 감염을 막기 위해서 백신이 개발되어 왔지만, 유아의 장관에 다양한 serotype에 적합한 항체를 투여하는 데 어려움이 있으므로 백신 개발 성공에 의문이 남아 있다. 또한 다양한 serotype에 의해서 발병되는 질병을 충분히 광범위하게 방어하는데 어려움이 있다. 그러므로 비피더스균에 의한 로타바이러스 감염 치료에는 현재까지 어떠한 치료법도 명확히 제시된 바 없다. 전반적으로 이러한 로타바이러스의 감염을 억제하는 방법으로는 식품 성분에 의한 방법이 가장 현명한 방법인 것으로 사료된다. 초유, 난황, 녹차추출물, 락토펜 등 식품성분으로 로타바이러스의 감염을 방어하는 많은 연구가 보고되고 있다.

### (2) 비피더스균의 rotavirus 억제 효과

프로바이오틱 유산균은 바이러스성 설사 기간을 단축시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 로타바이러스성 설사

의 예방과 치료에 종종 이용되는 균종은 유산균과 비피더스균이다.

1) Yasui et al(1995)

쥐에 Bif. breve YIT4064를 경구투여시 antirotavirus-specific IgA의 분비량이 월등히 증가되므로서 로타바이러스 감염 방어효과가 있다고 보고하였다.

2) Saavedra et al(1994)

유아의 감염과 설사증은 비피더스균의 경구투여에 의해서 감소될 수 있다.

이러한 결과들은 주로 in vivo 실험을 통해서 이루어진 것으로서 급성 설사증 환자들에게 유산균 함유 물질을 경구 투여했을 때의 설사 지속기간 및 장내 면역반응에서의 혈중 항체농도, macrophage에 의해서 생성되는 cytokine에 의한 식균작용 증강, 장 상피세포에 대한 정착능에 의해서 이루어지는 장벽 보호효과 등에 의한 것들이다.

이외에도 어린이와 동물을 대상으로 한 연구에서 볼 때, 비피더스균 질병은 국부적인 장 면역력에 의해서 근본적으로 예방하는 것이 가능할 것으로 예상되어 진다. 그러나 프로바이오틱 균주가 바이러스성 설사를 예방하는 기작은 명확히 알려진 바 없다.

(3) 실험 결과

비피더스균 유래의 crude peptidoglycan이 비피더스균과 E. coli O157:H7의 정착과 로타바이러스의 생육 억제에 미치는 영향을 실험한 결과는 다음과 같다. Caco-2 세포를 이용한 정착능에서는 crude peptidoglycan의 첨가량이 높을수록 비피더스균의 정착능이 증가되는 것으로 나타났다. 반면에 정착능이 낮은 비피더스 균주에는 아무런 증강효과도 나타내지 못했다. 또한 E. coli O157:H7의 정착에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 볼 때, 비피더스균 유래의 crude peptidoglycan에 의한 비피더스균의 정착능 증강 효과는 결과적으로 E. coli O157:H7의 정착을 상대적으로 낮추는 것으로 판단되었다. 또한 MA-104 세포를 이용하여 로타바이러스에 대한 비피더스균 유래물질의 억제 효과를 알아보기 위해서 사균체와 crude peptidoglycan을 AEC 염색법을 통해서 실험하였다. 그결과 비피더스균 사균체와 crude peptidoglycan의 억제 효과가 인정되었으며, 특히 crude peptidoglycan의 억제 효과가 가장

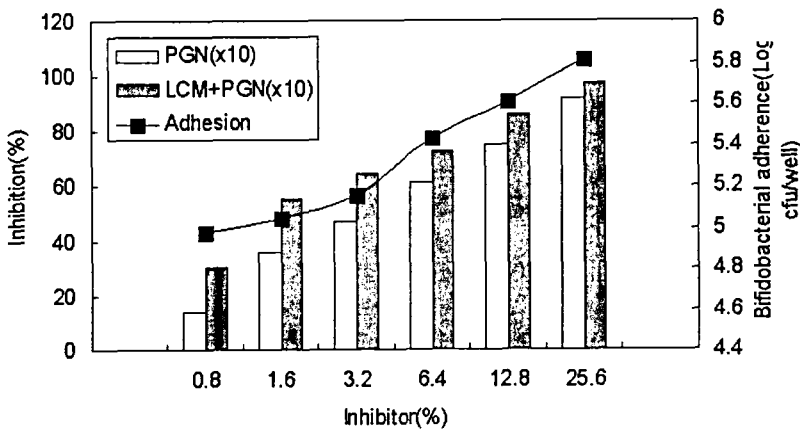


Fig.2. Effect of live bifidobacterial cell adherence and crude peptidoglycan on inhibition of human rotavirus S2 by AEC staining  
 AEC : 3-amino-9-ethylcarbazole  
 PGN : Non-washing  
 LCM PGN : PGN non-washing after pre-washed live bifidobacterial cell



우수한 것으로 나타났다. Bif. infantis K9 균주의 MA-104 세포 정착능과 로타바이러스 감염율과의 상관관계를 보면, 정착율이 높아질수록 로타바이러스의 감염율은 감소되는 것으로 밝혀졌다. Crude peptidoglycan과 Bif. infantis K9 균주가 동시에 MA-104 세포에 반응되었을 때, crude peptidoglycan에 의해서 Bif. infantis K9의 정착율이 높아지며, 그 결과 로타바이러스에 대한 억제 효과가 증강되는 것으로 나타났다. 결론적으로 비피더스균 유래 crude peptidoglycan의 E. coli O157:H7에 대한 생육억제 효과는 없었지만, 정착 증강 효과에 의해서 비피더스균의 정착율이 증가되면 정착 부위에 대한 경쟁 작용에 의해서 상대적으로 E. coli O157:H7의 정착이 억제되는 것으로 판단된다. 또한 비피더스균 유래 crude peptidoglycan과 비피더스균의 정착율이 로타바이러스의 감염 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig.2). 따라서 비피더스균의 정착능과 정착 증강 물질에 의해서 정착균수가 높아질수록 E. coli O157:H7과 로타바이러스의 억제에 효과가 높은 것으로 판단된다.

### III. 결론

전세계적인 기능성 유산균의 연구분야는 현재 우수한 종균개발과 같은 응용분야와 그 기능적 기작을 연구하는 기초분야로 크게 대별될 수 있다. 특히 그러한 기초분야에 대한 연구는 일반적인 기능적 생리활성 연구 분야, 실험용 세포 모델을 이용한 모의실험 분야 및 면역증강 확인 분야로 구분된다.

생리활성 연구분야는 내산성, 내담즙성, 내산소성, 콜레스테롤 저하능, 항돌연변이능 등과 같은 일반적인 연구 주제를 나타내며, 실험용 세포 모델을 이용한 모의실험은 유산균의 정착능 비교, 정착 site와 factor에 대한 연구에 주로 이용된다. 또한 면역증강 실험은 macrophage를 이용하여 면역호르몬을 측정하는 방법과, 실험동물이나 임상을 통하여 혈액 및 분변으로부터 면역물질을 측정하는 방법이 있다.

프로바이오틱 유산균의 이러한 다양한 방법에 의해 파악된 기능성은 균주 특이성과 농도 의존성이라고 할 수 있으나, 기능을 나타내는 기작을 중심으로 볼 때 유산균의 장벽 정착능과 사멸된 유산균체 성분에 의한 기능적 효과에 의한 것으로 파악된다.

위에서 서술한 내용은 어떻게 보면 한 분야에 치우쳐서 다른 연관된 기본적인 내용을 지나칠 수도 있었을 것이다. 하지만, 유산균의 장벽 정착능을 Caco-2 세포를 통하여 간접적으로 확인할 수 있으며, 이러한 장벽 정착은 장내에서의 다른 병원체와 상호 경쟁적 작용을 하여 장벽 보호역할을 하거나 사전에 장벽에 정착 서식하여 그 보호 역할을 한다.

따라서 프로바이오틱 유산균의 수많은 기능성 중에서 장내에서의 병원체 감염억제에 대한 과정에 최우선으로 관여하는 것은 장벽 정착능이라 판단되며, 앞으로 프로바이오틱 유산균 종균을 개발하는데 있어서 가장 먼저 검토되어야 할 분야라고 생각된다.

### IV. 참고문헌

1. Aleljung, P., W. Shen, B. Rozalska, U. Hellman, A. Ljungh, and T. Wadstrom. 1994. Purification of collagen-binding proteins of Lactobacillus reuteri NCIB 11951. Curr. Microbiol. 28 : 231-2362. Ambler, L. and M. Mackay. 1991. Reovirus 1 and 3 bind and internalise at the apical surface of intestinal epithelial cells. Virology. 184 : 162-169
3. Anand, S. K., R. A. Srinivasan, and L. K. Rao. 1984. Antibacterial activity associated with Bifidobacterium bifidum. Cult. Dairy Prod. J. 6 : 6-8
4. 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(12) : 4121-4128
5. Coconnier, M. H., T. R. Klaenhammer, S. Kerneis, M. F. Bernet, and A. L. Servin. 1992. Protein-mediated adhesion of

- Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6) : 2034-2039
6. Darfeuille-Michaud, A., D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourges, A. Servin, and B. Joly. 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect. Immun.* 58 : 893-902
  7. Duffy, L. C., M. Zielezny, M. Talty, D. Dryja, S. Altaie, E. Griffiths, D. Ruffin, H. Barrett, J. Rossman, and P. L. Orga. 1994. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr. Res.* 35(6) : 690-695
  8. Finlay, B. B. and S. Falkow. 1990. Salmonella interactions with polarized intestinal Caco-2 epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 162 : 1096-1106
  9. Flanigan, T. P., T. Aji, R. Marshall, R. Soave, M. Aikawa, and C. Kaetzel. 1991. A sexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infect. Immun.* 59 : 234-239
  10. Fukushima, Y., S. T. Li, H. Hara, A. Terada, and T. Mitsuoka. 1997. Effect of follow-up formula containing bifidobacteria(NANBF) on fecal flora and fecal metabolites in healthy children. *Bioscience Microflora.* 16(2) : 65-72
  11. Greene, J. D. and T. R. Klaenhammer. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12) : 4487-4494
  12. Hatcher, G. E. and R. S. Lambrecht. 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76 : 2485-2492
  13. Hochman, J. and P. Artursson. 1994. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Controlled Release.* 29 : 253-267
  14. Kaila, M. 1993. Immune responses evoked by cow milk products in health and during rotavirus diarrhea. *Univ. of Tampere. Acta uiversitatis Tamperensis ser A Vol 376*
  15. Kojima, T. A., T. Yaeshima, N. Ishibashi, S. Shimamura, and H. Hayasawa. 1995. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 14(2) : 59-66
  16. Lankaputhra, W. E. V. and N. P. Shah. 1998. Adherence of probiotic bacteria to human colonic cells. *Biosci. Microflora.* 17(2) : 105-113
  17. Lee, J., A. Ametani, Y. Sato, and S. Kaminogawa. 1993. Immunopotentiator from *Bifidobacterium adolescentis*. *Animal Cell Technology : Basic & Applied Aspects.* 5 : 155-164
  18. Lehto, E. M. and S. J. Salminen. 1997a. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate : Only a pH effect? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18 : 125-132
  19. Lehto, E. M. and S. Salminen. 1997b. Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Biosci. Microflora.* 16(1) : 13-17
  20. Lin, J. H. and D. C. Savage. 1984. Host specificity of the colonization of murine gastric epithelium by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 24 : 67-71
  21. Meghrou, J., P. Euloge, A. M. Junelles, J. Ballongue, and H. Petitdemange. 1990. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnol. Lett.* 12(8) : 575-580
  22. Miettinen, M., J. V. Varkila, and K. Varkila. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* 64(12) : 5403-5405
  23. Mikelsaar, M., R. Maender, and E. Sepp. 1998. Lactic acid microflora in the human microbial ecosystem and its development. In : *Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects.* Eds. Salminen, S. and A. von Wright. 2nd edn. pp.279-342. Marcel Dekker. New York 14.
  24. Mitsuoka, T. 1969. Intestinal flora and the host. *Pharmacia.* 5 : 608-609
  25. Mounier, J., A. Ryter, M. Coquis-Rondon, and P. J. Sansonetti. 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 58 : 1048-1058
  26. Namba, Y., Y. Hidaka, K. Taki, and T. Morimoto. 1981. Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial

- cell walls on immunostimulation in guinea pigs. *Infect. Immun.* 31(2) : 580-583
27. Namioka, S., T. Sasaki, and Y. Maede. 1991. Immunopotential of the small intestine of weaning piglets by peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Bifidobacteria Microflora.* 10(1) : 1-9
  28. Op Den Camp, H. J. M., P. A. M. Peeters, A. Oosterhof, and J. H. Veerkamp. 1985. Immunochemical studies on the lipoteichoic acids of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicus*. *J. Gen. Microbiol.* 131 : 661-668
  29. Panigrahi, P., B. D. Tall, R. G. Russel, L. J. Detolla, and J. G. Morris, Jr. 1990. Development of an in vitro model for study of non-O1 *Vibrio cholerae* virulence using Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 58 : 3415-3424
  30. Perez, P. F., Y. Minnard, E. A. Disalvo, and G. L. De Antoni. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1) : 21-26
  31. Rigotherier, M. C., M. H. Coconnier, A. L. Servin, and P. Gayral. 1991. Adhesion of *Entamoeba histolytica* to the human colon carcinoma cell line Caco-2. A new in vitro model-scanning electron microscopic study. *Infect. Immun.* 59 : 4142-4146
  32. Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Perman, and R. H. Yolken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet.* 344 : 1046-1049
  33. Sarem, F., L. O. Sarem-Damerджи, and J. P. Nicholas. 1996. Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Lett. Appl. Microbiol.* 22 : 439-442
  34. Sasaki, T., S. Fukami, and S. Namioka. 1994. Enhanced resistance of mice to *Escherichia coli* infection induced by administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *J. Vet. Med. Sci.* 56(3) : 433-437
  35. Svensson, L., B. B. Finlay, D. Buss, C. H. von Bonsdorff, and H. B. Greenberg. 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial(Caco-2) cells. *J. Virol.* 65 : 4190-4197
  36. Yamada, M., T. Saito, T. Toba, H. Kitazawa, J. Uemura, and T. Itoh. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 1434
  37. Yamamoto, K. 1998. Adhesion of lactic acid bacteria to cells mediated by sugar chains. *Agr. Biol. Chem.* 36(1) : 26-31
  38. Yasui, H., J. Kiyoshima, and H. Ushijima. 1995. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *J. Infect. Dis.* 172 : 403-409