KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 36, No. 6, pp. 959~967 (2004)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

Colonic mucin-binding assay를 이용한 장내 우수 점착능 유산균주의 선별

김성영 · 신광순 · 이 호*
경기대학교 식품생물공학과

Screening of Lactic Acid Bacteria with Potent Adhesive Property in Human Colon using Colonic Mucin-binding Assay

Seong-Yeong Kim, Kwang-Soon Shin, and Ho Lee*
Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

To screen probiotic lactic acid bacteria with potent adhesive property on human colonic mucosa, colonic mucin-binding assay was introduced. This colonic mucin-binding assay actually measures the binding activity of surface lectin-like protein (SLP) on colonic mucin, and the optimal conditions were examined. The optimal pH for colonic mucin coating on plate wells was 4.8, and ×24,000 diluted solution of commercially available horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptoavidin yielded good results. For rapid screening, 5.0 μg/mL of biotinylated SLP from lactic acid bacteria was optimal, and optimal scintillation time of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) was 10 min. These conditions were useful for both rapid selection and quantitative analysis of lactic acid bacteria that have high adhesion property to human intestinal tract. Among 50 strains of lactic acid bacteria, including 32 type culture strains and 18 isolated strains from infant feces, *Lactobacillus* species FSB-1 isolated from kimchi showed the highest binding activity to colonic mucin. From taxonomical viewpoints based on morphological study, physico-biochemical study, partial 16S rDNA seguencing, and phylogenetic analysis, *L.* species FSB-1 was identified as *Lactobacillus brevis*.

Key words: colonic mucin-binding assay, adhesion, surface lectin-like protein (SLP), *Lactobacillus brevis*

서 론

유산균의 주류를 차지하고 있는 *Lactobacillus*속과 *Bifidobacterium*속은 오래 전부터 각종 발효 유제품과 된장 및 김치 등 전통 발효식품에 응용되어 왔으며, 최근에는 의약품 및 사료의 첨가제에까지 광범위하게 활용되고 있다(1,2). 또한 유산균은 인간의 유용한 장내 미생물로서, 유당 불내증의 완화, 정장작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 및 면역 활성화 작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다(1-9). 이러한 유산균의 유효한 생리효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다(9). 유산균의 장내 상재성을 위해선 장내 점착능(adhesion property)이 중요한 인자로써 알려져 있으며, probiotics로 사용되는 유산균을 선택하는데 있어 하나의 기준으로 여겨지고 있다(10,11).

*Corresponding author: Ho Lee, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, San 94-6 Ieui-dong, Youngtong-gu, Suwon, Kyonggi-do 442-760, Korea
Tel: 82-31-249-9653
Fax: 82-31-249-9650
E-mail: hlee@kyonggi.ac.kr

지금까지 유산균의 장내 점착능에 대한 연구는 대부분 인간의 대장내 상피세포 유래인 Caco-2 또는 HT-29 등과 유산균간의 결합력을 기초로 한 균주의 선별이 그 주를 이루어 왔다(9,12-15). 그러나 실질적으로 인간의 대장내 구조는 상피세포를 점막층(mucin)이 평균 400 μm 이상의 두께로 덮고 있기 때문에, 유산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 점막층물질에 결합하여 분열 및 증식하는 것으로 보고되고 있다(16). 따라서 유산균이 장내 상재성을 갖고, 유용한 제반효과들을 발휘하기 위해서는 점막층과의 결합력이 필수적으로 요구된다(12,17). 유산균과 인간의 대장내 점막층과의 결합은 유산균 표면에 존재하는 lectin상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 점막층을 구성하는 단백다당체인 mucin의 당쇄 구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되고 있으며, 이들간의 결합력은 유산균 표면의 lectin상 단백질의 특성과 점막층의 당쇄 구조의 차이에 기인한다고 알려져 있다(18,19).

대장내 존재하는 mucin의 당쇄 구조는 종에 따라 서로 상이한 것으로 알려져 있는데, 인간 대장내 mucin은 쥐의 mucin(rat colonic mucin, RCM)과 가장 유사한 당쇄 구조를 가지고 있다고 보고되고 있다(18,19). RCM의 경우 산성 및 중성당으로 구성된 당쇄가 단백질의 serine 및 threonine을 통하여 *O*-결합 형태를 하고 있으며, 약 8종류의 서로 다른 당 사슬 구조를 함유한다고 보고되고 있다(20). 최근 장내 점막층과 유산

균 표면의 lectin상 단백질간의 결합력을 이용한 유산균의 장내 점착능의 연구가 보고되고 있는데(18,19), Takahashi 등(19)은 RCM을 이용하여 polystyrene bead에 코팅하고, 유산균의 결합능을 측정하는 새로운 선별방법을 고안하여, *Lactobacillus acidophilus* group 유산균들과 RCM간의 결합능을 조사하였다. 그 결과, *L. acidophilus* YN 2062가 가장 높은 결합능을 보였다고 보고하였다. 한편 Matsumura 등(18)은 여러 *Lactobacillus acidophilus* 균종과 RCM간의 결합능을 조사한 결과, *L. acidophilus* JCM 1025, SBT 267, LA2, SBT 2062가 높은 결합능을 가졌으며, 이들 균주의 SLP와 colonic mucin의 내부 당쇄 구조간의 결합의 중요성을 강조한 바 있다. 그러나 이 연구들은 *L. acidophilus* group에만 국한되어 있어 그 외 유산균이 소유한 점착능과의 전반적 비교가 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인간의 대장에서 우수한 점착능을 갖는 균주를 선별할 목적으로, 점막층 당단백질인 rat colonic mucin과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합능을 측정하는 colonic mucin-binding assay의 분석 조건을 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3025를 이용하여 설정하였다. 또한 이 방법을 이용하여 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Lactococcus*속 등 공시 및 분리균주 총 32종과 생후 1주 및 3세의 유아 분변에서 분리한 *Bifidobacterium*속 균주로 추정되는 18종의 분리균주 등, 총 50종의 유산균주를 대상으로 결합능력을 측정하였다. 또한 가장 높은 활성을 보인 *Lactobacillus* species FSB-1에 대한 동정을 수행하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 실험동물

본 실험에 사용된 공시 및 분리 유산균주 32종은 각 기관에서 분양받거나 분리하여 경기대 대학원 식품생물공학과에서 보관 중인 균주로써, Table 2에 제시된 바와 같다. 한편 본 실험에서 colonic mucin-binding assay의 조건 확립에 사용된 균주는 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3025였다.

또한 본 실험에 사용된 실험동물은 인간의 대장내 mucin과 가장 비슷한 조성(18,19)을 가지고 있다고 알려진 Wister rat(웅성, 10주령, (주)샘타코, 경기)이였다. 24±1°C 및 55% 상대습도로 조절된 사육조내에서 24-48시간 동안 적응토록 하였으며, 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다.

유아의 분변으로부터 *Bifidobacterium*속 균주의 분리

경기도 수원지역에 거주하는 생후 1주 및 3세 미만의 유아 분변을 채취하여 시료로 사용하였다. MRS(Difco Co, USA) 액체배지에서 유아 분변을 혐기적으로 연속 희석하고, Mellissa 등(21)의 triple-layer diffusion 방법에 따라, 분변 시료 현탁액이 중간층에 위치하도록 한 다음, 완전 혐기적 조건이 유지되도록 anaerobic systems(Becton Dickinson Lab, USA)를 이용하여 배양하였다. 이때 *Bifidobacterium*속 균주가 우선적으로 성장할 수 있도록, BL 고체배지(Difco Co., USA)를 선택배지로 사용하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. BL 고체배지에서 성장한 colony 중 형태가 상이한 colony 100개를 1차적으로 분리(B1-B100)하여, lithium chloride 0.5 mg/mL, sodium lauryl sulfate 20 μg/mL, sodium propionate 5 mg/mL, neomycin sulfate 10 μg/mL가 함유된 modified VF-Bouillon agar (21)를 이용하여 재차 적층한 다음, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이때 사용된 시약들은 Sigma사의 제품이었으며, 본 배지에서 성장한 총 18종의 균주를 *Bifidobacterium*속 추정균주로 하였다(Table 2 참조).

유산균의 배양 및 surface lectin-like protein(SLP)의 조제

장내 점착능이 우수한 유산균주의 선별을 위해 사용된 공시 및 분리균주 50종 중, *Bifidobacterium*속 균주는 MRS 액체배지 300 mL에 전 배양액 1%를 각각 접종하고, 혐기적으로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. *Lactobacillus*속 등 타 유산균주들을 동일한 배지조건에서 동량 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 혐기 배양한 후 실험에 사용하였다.

위에서 배양한 각각의 배양액을 4°C, 650 g에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM phosphate buffered saline(pH 7.2, 이하 PBS)으로 3회 세척하였다. 균체를 2 M guanidine-HCl(Sigma Chemical Co., USA) 용액에 현탁한 후, 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 균체표면에 부착된 단백질을 추출하였다. 추출된 용액을 4°C, 1,600 g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 다음 그 상징액을 증류수로 4°C에서 48시간 동안 투석한 후, 동결건조하여 SLP를 조제하였다.

Biotinylated SLP의 조제

SLP 1 mg을 0.15 M NaCl를 함유한 0.1 M Na_2HPO_4 용액(pH 9.0)에 용해하고, 여기에 biotin화 시약, D-biotinyl-ε-aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester(Roche Diagnostics Co., USA) 1 mg을 40 μL의 DMSO(Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 첨가한 후, 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 반응용액을 10 mM PBS(pH 7.2)로 4°C에서 24시간 동안 투석을 수행하여 biotin-conjugated SLP를 조제하였다. Biotinylated SLP 용액 중의 단백질 함량은 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA)을 표준물질로 하여 Micro BCA protein assay kit(Bio-rad Lab., Canada)을 이용하여 측정하였다.

Rat colonic mucin(RCM)의 조제

RCM은 Perret 등(22)의 방법에 따라 Wister rat의 대장 내벽으로부터 조제되었다. 10주령의 웅성, Wister rat을 치사시켜 복부를 절개하고 대장을 적출한 후, 대장 내벽을 slide glass로 긁어내어 점막층을 회수하였다. 회수된 점막층을 Folch's 용액 ($CHCl_3$: CH_3OH = 2 : 1, V/V, 시약 1급)에 현탁하여 탈지시킨 후, 4°C, 1,600 g에서 20분간 원심분리를 수행하였다. 침전물을 Folch's 용액으로 2회 세척하고, diethyl ether(시약 1급)로 3회 재차 세척하여 탈지시켰다. 탈지된 회수 점막층에 6 M guanidine-HCl 용액을 가하여 37°C에서 2시간 동안 진탕하면서 반응시킨 다음 mucin을 추출하고, 상기 조건에서 원심분리하여 상징액을 분리하였다. 분리된 상징액을 증류수로 4°C에서 24시간 동안 투석한 후, 동결건조하여 RCM을 조제하였다.

Colonic mucin-binding assay

Microtiter plate(Maxisorp, Nunc, Denmark)의 well에 RCM 용액(50 μg/mL, 6 M guanidine-HCl) 75 μL를 각각 분주하고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 mucin을 well 표면에 부착시켰다. 다음날 plate를 PBST(PBS-0.05% Tween 20, 시약 1급)로 3회 세척한 후, blocking buffer(0.05% Tween 20과 1% BSA를 함유한 PBS, pH 7.2) 100 μL를 재 분주한 다음, 상온에서 2시간 동안 방치하여 RCM이 부착되지 않은 well 표면을 blocking 하였다. 이후 각 well은 PBST를 이용하여 4회 세척하고, biotinylated SLP 용액 50 μL를 재 분주하여 1시간 동안 상온에서

반응시켰다. 반응하지 않은 biotinylated SLP를 제거하기 위해 반응상징액을 제거한 후, PBST를 이용하여 각 well을 3회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 적절히 희석된 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated streptoavidin(Parmingen, Lab., USA) 50 μL를 분주하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 결합하지 않은 HRP-conjugated streptoavidin을 제거하기 위해, 상징액을 버리고 PBST로 7회 세척한 후, 3,3',5,5'-tetramethylbenzydine (TMB) liquid substrate system(Sigma Chemical Co., USA) 60 μL를 첨가하여 발색시킨 다음, 2 N H_2SO_4(시약 1급) 60 μL를 분주하여 반응을 정지시켰다. 발색 정도는 450 nm에서 Microtiter plate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

Colonic mucin-binding assay의 분석 조건 설정

Colonic mucin-binding assay의 결과에 영향을 미치는 각각의 결정인자를 최적화하기 위하여, 대표적 유산균주인 *L. acidophilus* IFO 3025의 SLP를 이용하여 아래의 실험을 수행하고 최종 분석 조건을 설정하였다.

각 pH에 따른 RCM의 부착 조건: Microtiter plate에 대한 RCM 부착 정도에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 6 M guanidine-HCl 용액에 0.1 N NaOH(시약 1급) 또는 0.1 N HCl (시약 1급)을 가함으로서, pH를 4.8, 7.0, 10.0으로 조정하였다. 각 pH의 6 M guanidine-HCl 용액에 RCM을 첨가하여 50 μg/mL의 농도가 되도록 조제하였다. 이들을 microtiter plate에 각각 75 μL씩 분주한 다음 4ºC에서 16시간 동안 정치하여 RCM을 부착시켰다. Microtiter plate에 부착된 colonic mucin의 함량을 mucin중 단백질 농도로 비교하고자, Micro BCA Protein assay kit을 이용하여 측정하였다.

HRP-conjugated streptoavidin의 처리농도 결정: Colonic mucin-binding assay에 있어서 HRP-conjugated streptoavidin의 처리농도가 미치는 영향을 측정하기 위하여, biotinylated SLP의 농도를 5.0 및 10.0 μg/mL로 고정하고, 시판 HRP-conjugated streptoavidin의 농도별 희석액을 이용하여 분석을 수행한 다음, 결과를 비교하였다. 이때 TMB 발색시간은 10분으로 하였다.

Biotinylated SLP의 처리농도 결정: 최적 biotinylated SLP의 처리농도를 결정하기 위하여, 농도를 각각 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 μg/mL로 조정한 다음, TMB 발색시간 10분에서 분석을 수행하고, 그 결과를 비교하였다.

TMB 발색시간 결정: Colonic mucin-binding assay에서 TMB의 처리시간에 따른 영향을 검토하기 위하여, TMB 처리 0, 5, 10, 20, 40분 후에 발색을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 비교하였다.

장내 점착능 우수 유산균주의 동정

본 실험에서 장내 점착능이 우수한 균주로 선별된 *Lactobacillus* species FSB-1의 동정을 위하여, S4700 SEM(Hitachi, Japan) 주사형 전자현미경에 의한 형태학적인 관찰(23)을 수행하였다. 그램염색, 산소 요구성, 운동성, 발효학적 특성 및 다양한 기질에 대한 효소가수분해 활성 등의 생화학적 특성을 Cowan과 Steel(24) 및 Macfaddin의 방법(25)에 따라 검사하고, Bergey's Mannual of Systemic Bacteriology(26)의 내용과 비교검토하였다. 한편 보다 정확한 동정을 위해 *L.* species FSB-1의 16S rDNA의 염기서열분석을 수행하였다. 16S rDNA는 2종류의 universal primer(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAA GGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭하고(27), QIA Quick PCR Product Purification kit(Qiagen, Germany)에 의해 정제한 다음, ABI PRISM Big Dye Terminator 및 Genetic Analyzer 377(Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 서열을 분석하였다. 선별된 균주 *L.* species FSB-1의 16S rDNA 서열은 CLUSTRAL W software(28)를 이용하여, 다른 *Lactobacillus*속 균주 및 EMBL/Gene Bank database로부터 얻은 유연균주의 서열과 정렬시키고, 상동성을 조사하였다.

결과 및 고찰

장내 점착성 우수 유산균주 선별을 위한 colonic mucin-binding assay의 분석 조건 최적화

RCM의 부착에 미치는 pH의 영향: 장내 점착능이 우수한 유산균주를 선별하기 위한 수단으로 colonic mucin-binding assay를 이용하기 위해, 본 분석방법의 결과에 영향을 미칠 수 있는 각종 조건을 최적화 하고자 하였다. Colonic mucin-binding assay에서 microtiter plate의 well에 대한 RCM의 부착은 본 분석법에 있어 결과와 직결되는 중요한 반응 중 하나로, RCM의 부착에 미치는 pH의 영향을 조사하였다(Table 1). RCM의 부착 정도를 well에 부착된 단백질함량으로 비교한 결과, 부착된 RCM은 pH 4.8, 7.0 및 10.0의 조건에서 각각 흡광도 0.36, 0.35 및 0.34를 나타냈다. 이러한 결과는 RCM의 microtiter plate에 대한 부착 정도가 pH의 변화에 따라 큰 차이가 없음을 나타내는 것으로, 이후의 실험에서는 RCM 조제시 사용된 용매인 6 M guanidine-HCl의 pH인 4.8에서 직접 부착시켜 분석에 이용하였다. 이와 유사한 실험결과로, Shi 등(29)은 4가지의 합성 고분자물질(polyurethane, polystyrene, silicone, methyl methacrylate)의 표면에 소의 이하선 mucin을 부착하는 실험에서, mucin의 부착이 가능한 이유가 mucin 중 단백질 중심사슬(naked protein backbone)의 소수적 성질이 강한 합성고분자 표면에 결합하기 때문이라고 하였으며, mucin은 단백질의 중심사슬 구조에 탄수화물이 곁사슬(carbohydrate cluster)로 결합되어 있는 구조로 되어있다고 보고하였다. 또한 Ohara 등(30)도 mucin의 microtiter plate에 대한 부착정도는 pH 2-9의 범위에서 큰 차이가 없다고 보고한 바도 있다(31). 이러한 결과는 본 실험과도 일치하는 결과이다.

Colonic mucin-binding assay에서 HRP-streptoavidin의 최적 처리농도 결정: Colonic mucin-binding assay의 최적 분석 조건을 설정하기 위해, pH 4.8의 조건에서 RCM을 microtiter plate 표면에 부착시킨 후, *L. acidophilus* IFO 3025로부터 얻은 bio-

Table 1. Effects of pH on mucin-coating onto wells of microtiter plates in colonic mucin-binding assay

Mucin-coating pH	4.8	7.0	10.0
Bound protein (O.D., mean ± SD)	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01

[1)]Protein contents were measured by Micro BCA protein assay kit and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests (Absorbance at 600 nm).

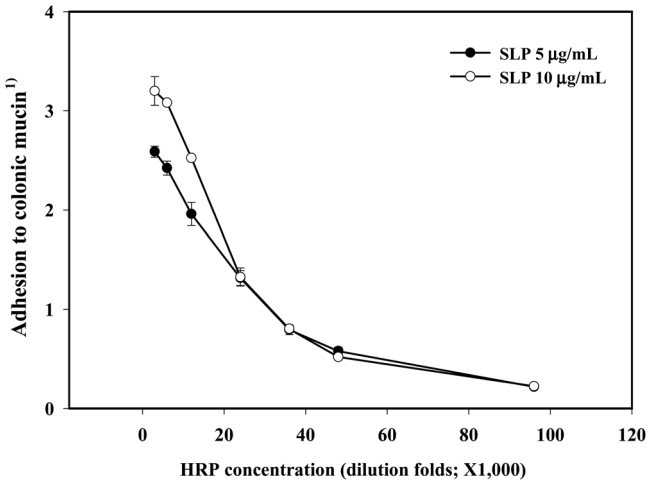

Fig. 1. Effects of horseradish peroxidase conjugated streptoavidin on adhesive property in colonic mucin-binding assay.
1)Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests.

tinylated SLP의 농도를 5.0 및 10.0 μg/mL로 각각 처리한 다음, 분석결과에 미치는 HRP-conjugated streptoavidin의 영향을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, HRP-conjugated streptoavidin 농도가 감소할수록 colonic mucin에 대한 결합이 낮게 측정되는 결과를 보였다. 특히 시판 HRP-conjugated streptoavidin 용액 3,000-36,000배 희석액의 조건에서 biotinylated SLP 5.0 및 10.0 μg/mL와 colonic mucin간의 결합은 거의 직선상으로 감소하는 결과를 보였다. 따라서 본 실험에서는 colonic mucin에 대한 biotinylated SLP의 결합이 직선상의 경향을 나타내고, 흡광도가 1.0-2.0을 나타내는 HRP-conjugated streptoavidin 24,000배 희석액을 최적 농도로 결정하고, 이후의 실험에 사용하였다.

Colonic mucin-binding assay에서 biotinylated SLP의 처리 농도 결정: Colonic mucin에 대해 적절한 결합정도를 나타내는 biotinylated SLP의 농도를 결정하기 위하여, 대표적 유산균인 *L. acidophilus* IFO 3025 기원의 SLP를 조제한 다음, biotinylated SLP의 농도에 따른 colonic mucin과의 결합능에 대한 영향을 비교 및 측정하였다(Fig. 2). Biotinylated SLP의 농도가 증가함에 따라 colonic mucin에 대한 결합정도도 증가하는 경향을 보였다. 특히 colonic mucin에 대한 biotinlyated SLP의 결합정도가 직선상으로 증가하고, 최종 흡광도가 1.0-2.0을 나타내는 농도인 biotinylated SLP 5.0 μg/mL가 본 분석방법을 위한 최적 조건이라고 판단되었다. 또한 biotinylated SLP의 농도에 따라 colonic mucin과의 결합이 유의성 있는 차이를 보여주는 본 실험결과는, 다양한 미생물의 장내 점착능 측정을 위해 본 측정방법이 유효하게 사용될 가능성이 있음을 확인시켜 주었다.

Colonic mucin-binding assay에서 TMB 발색시간 결정: 이상의 실험에서 얻어진 최적조건에서 colonic mucin-binding assay의 분석 결과에 미치는 TMB 발색시간의 영향을 조사한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같다. TMB 시약의 처리시간이 길어질수록 colonic mucin에 대한 *L. acidophilus* IFO 3025 기원의 biotinylated SLP 결합능도가 증가하는 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험도 상기한 결과에서와 동일하게, TMB 처리시간에 따른 colonic mucin에 대한 결합정도가 직선상의 경향을 보이고, 최종 흡광도가 1.0-2.0의 사이를 나타내는 10분 처리가 본 분석의 최적 조건이라고 판단되었다.

따라서 지금까지의 결과를 종합해 볼 때, 유산균의 장내 상재성을 평가하기 위해 유산균 표면의 lectin상 단백질과 당단백질인 colonic mucin간의 결합능을 측정하는 colonic mucin-binding assay를 사용할 경우, mucin의 부착조건은 pH 4.8, HRP의 농도는 시판제품의 24,000배 희석액, biotinylated SLP의 처리농도는 5.0 μg/mL, TMB의 발색시간은 10분이 최적의 분석조건임을 확인할 수 있었다.

Takahashi 등(19)은 RCM을 가지고 polystyrene bead를 코팅하여 유산균의 결합능을 측정하는 새로운 선별방법을 보고한 바 있으나, polystyrene bead와 균주의 SLP간의 비특이적 결합이 큰 경향을 보여, 장내 상재성을 평가하는 수단으로는 다소 부적절한 것으로 알려져 있다. 한편 Matsumura 등(18)은 RCM과 *Lactobacillus acidophilus* group간의 결합능을 비교 및 측정

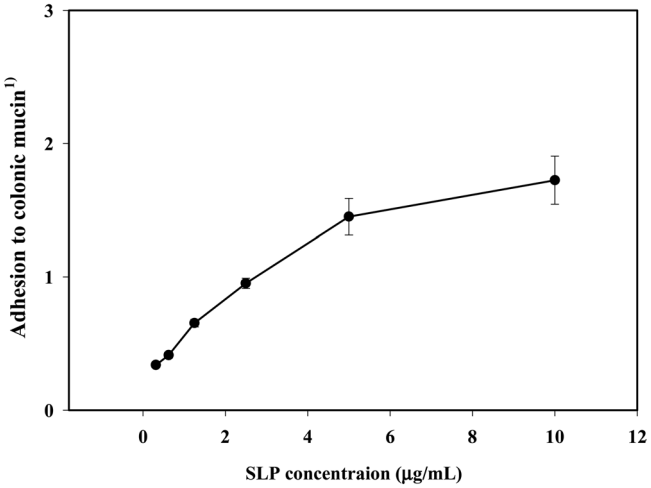

Fig. 2. Effects of biontinylated surface lectin-like protein on adhesive property in colonic mucin-binding assay.
1)Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests.

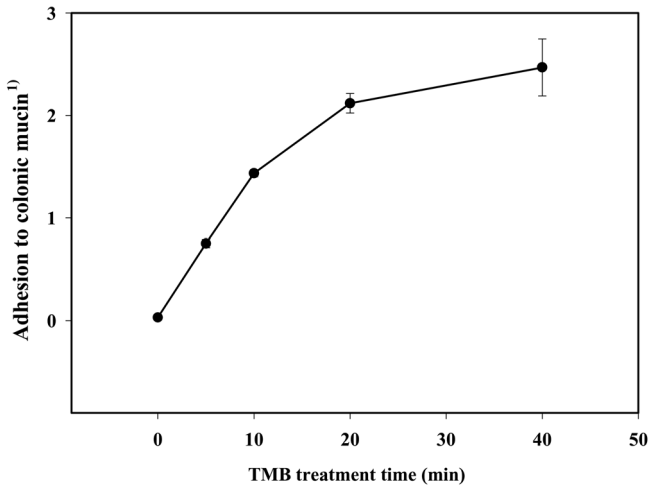

Fig. 3. Effects of TMB scintillation time on adhesive property in colonic mucin-binding assay.
1)Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests.

Table 2. Screening of lactic acid bacteria with highly adhesive property to colonic mucosa

Strain name of lactic acid bacteria	Protein (μg/mL)	Binding affinity[1)] (Means ± SD, O.D. at 450 nm)	Relative binding affinity[2)] (Means ± SD)
Lactobacillus acidophilus IFO 3025	44.08	1.35 ± 0.11	0.60 ± 0.05
Lactobacillus acidophilus	**243.43**	0.62 ± 0.18	1.52 ± 0.45
Lactobacillus amylophilus KFRI 238	55.49	1.31 ± 0.07	0.73 ± 0.04
Lactobacillus casei KCTC 3109	101.75	1.30 ± 0.18	1.32 ± 0.18
Lactobacillus confusus KFRI 227	20.73	1.40 ± 0.04	0.29 ± 0.01
Lactobacillus delbrueckii KCTC 1047	38.42	0.88 ± 0.12	0.34 ± 0.05
Lactobacillus fermentum ATCC 14931	42.00	1.38 ± 0.06	0.58 ± 0.03
Lactobacillus helveticus ATCC 8018	**234.11**	1.05 ± 0.22	**2.46 ± 0.51**
Lactobacillus helveticus	156.61	0.94 ± 0.06	1.47 ± 0.09
Lactobacillus hilgardii KFRI 229	19.65	**2.31 ± 0.11**	0.46 ± 0.02
Lactobacillus pentosus KCTC 3120	57.80	1.95 ± 0.07	1.13 ± 0.04
Lactobacillus pentosus KCCM 35472	104.59	1.13 ± 0.04	1.18 ± 0.04
Lactobacillus plantarum KCTC 3099	106.00	0.83 ± 0.03	0.88 ± 0.04
Lactobacillus plantarum KCTC 3104	51.09	0.87 ± 0.18	0.44 ± 0.09
Lactobacillus plantarum KCTC 3105	**282.55**	0.53 ± 0.03	1.50 ± 0.09
Lactobacillus plantarum KCTC 3108	16.80	0.68 ± 0.06	0.11 ± 0.01
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	27.60	0.82 ± 0.13	0.23 ± 0.04
Lactobacillus species FSB-1	143.57	**2.54 ± 0.08**	**3.64 ± 0.12**
Lactobacillus plantarum FSB-2	69.36	0.63 ± 0.10	0.43 ± 0.07
ML4	154.52	1.45 ± 0.05	2.25 ± 0.07
Streptococcus thermophilus	131.08	1.05 ± 0.04	1.38 ± 0.06
Streptococcus thermophilus ATCC 14485	22.54	0.99 ± 0.10	0.22 ± 0.02
Lactococcus garvieae KCTC 3772	**181.44**	1.55 ± 0.11	**2.82 ± 0.19**
Lactococcus lactis ssp. *lactis* ATCC 7962	40.26	0.93 ± 0.03	0.37 ± 0.01
Enterococcus casseliflavus KCTC 3079	66.35	1.29 ± 0.07	0.86 ± 0.05
Enterococcus faecalis KCTC 2011	46.07	1.33 ± 0.39	0.61 ± 0.18
Pediococcus pentosaceus KFRI 833	32.58	1.22 ± 0.12	0.40 ± 0.04
Bifidobacterium catenulatum KCTC 3358	69.17	0.74 ± 0.06	0.51 ± 0.04
Bifidobacterium infantis KCTC 3127	39.67	0.93 ± 0.07	0.37 ± 0.03
Bifidobacterium breve KCTC 3220	98.58	**1.69 ± 0.05**	1.66 ± 0.05
Bifidobacterium longum KCTC 3421	82.32	0.78 ± 0.10	0.64 ± 0.08
Bifidobacterium bifidum KCTC 3357	68.30	1.19 ± 0.30	0.81 ± 0.20
B1	122.83	0.68 ± 0.04	0.84 ± 0.05
B8	**208.30**	1.20 ± 0.04	**2.49 ± 0.09**
B18	65.20	1.17 ± 0.06	0.77 ± 0.04
B21	50.40	1.14 ± 0.01	0.58 ± 0.01
B35	**167.27**	1.24 ± 0.13	2.07 ± 0.21
B40	109.54	**1.53 ± 0.09**	1.68 ± 0.10
B49	**169.47**	**1.41 ± 0.05**	**2.39 ± 0.08**
B51	128.32	0.91 ± 0.04	1.17 ± 0.05
B52	123.19	1.09 ± 0.07	1.34 ± 0.09
B53	95.15	1.38 ± 0.05	1.32 ± 0.04
B54	113.01	0.96 ± 0.03	1.09 ± 0.03
B55	140.26	0.78 ± 0.05	1.10 ± 0.08
B58	75.00	**1.92 ± 0.07**	1.44 ± 0.05
B62	**190.86**	1.29 ± 0.04	**2.46 ± 0.08**
B64	135.47	0.80 ± 0.04	1.08 ± 0.05
B66	60.40	0.87 ± 0.03	0.53 ± 0.02
B67	74.80	0.87 ± 0.05	0.65 ± 0.04
B68	43.50	0.99 ± 0.04	0.43 ± 0.02

[1)]Binding affinity to mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests.
[2)]Relative binding affinity = Protein (μg/mL) × Binding affinity/100.

하기 위하여, 본 실험과 유사한 방법을 실시한 바 있는데, 본 실험의 결과와 상당히 유사한 경향을 보여주었다.

대장 mucin에 대한 각종 유산균주의 결합능 비교

*Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Lactococcus*속 등 32종의 공시균주와 생후 1주 및 3세의 유아 분변에서 분리한 *Bifidobacterium*속으로 추정되는 18종의 균주 등, 총 50종의 유산균주를 대상으로, colonic mucin-binding assay를 이용하여 대장 mucin에 대한 결합능을 측정함으로써, 장내 점착능을 비교 및 분석하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이, SLP 기준농도 5.0 μg/mL에서 mucin에 대하여 상대적으로 높은 결합능(binding affinity)을 나타낸 공시균주는 *Lactobacillus hilgaridii* KFRI 229, *Lactobacillus* species FSB-1, *Bifidobacterium breve* KCTC 3220가 각각 2.31, 2.54, 1.69로 높은 활성을 보여주었다. 유아 분변 분리균주 중에는 B40, B49 및 B58균주가 각각 1.53, 1.41, 1.92로 비교적 높은 활성을 나타냈다.

그러나 colonic mucin-binding assay에 의한 결합능 측정은 SLP 농도 5.0 μg/mL에서 mucin에 대한 결합능의 비교이므로, 균주에 따라 표면에 존재하는 lectin상 단백질의 실제 함량이 많을 경우, 결합능이 다소 낮더라도 전체적인 결합능은 상대적으로 우수할 수 있는 문제점을 갖고 있었다. 따라서 SLP 특정 농도에서 측정한 mucin 결합능의 단순비교보다는, 각 균주의 표면단백질의 함량을 고려한 실질적인 결합능을 평가하는 것이 더 적절할 것으로 사료되었다. 각 균주로부터 SLP 건조 시료 1 mg에 함유된 실제 단백질함량을 측정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이, 공시균주에서는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3105, *Lactococcus garvieae* KCTC 3772가 각각 243.43, 234.11, 282.55, 181.44 μg으로 높은 단백질 수율을 보였으며, 유아 분변 분리균주에서는 B8, B35, B49, B62균주가 상대적으로 높은 단백질 생산량을 보였다. 따라서 각 공시 및 분리균주의 실질적인 결합능(total binding affinity)의 비교는 각 유산균의 SLP 기준농도 5.0 μg/mL에서 mucin에 대한 결합능을 측정한 다음, 각 유산균의 lectin상 단백질 수율을 고려하여 비교 및 분석하였다. 그 결과 공시균주의 경우는 *L. helveticus* ATCC 8018, *L.* species FSB-1, *L. garvieae* KCTC 3772가 각각 2.46, 3.64, 2.82로 우수한 장내 점착능을 가진 것으로 평가되었다. 또한 유아 분변 분리균주의 경우는 B8, B49, B62균주가 각각 2.49, 2.39, 2.46으로 상대적으로 높은 장내 점착능을 보여주었다(Table 2). 이러한 결과는 유산균 표면에 존재하는 SLP와 mucin간의 결합능 뿐만 아니라 SLP 중 실제 단백질 수율도 장내 점착능 평가에 있어 중요한 요소임을 나타내는 결과였다.

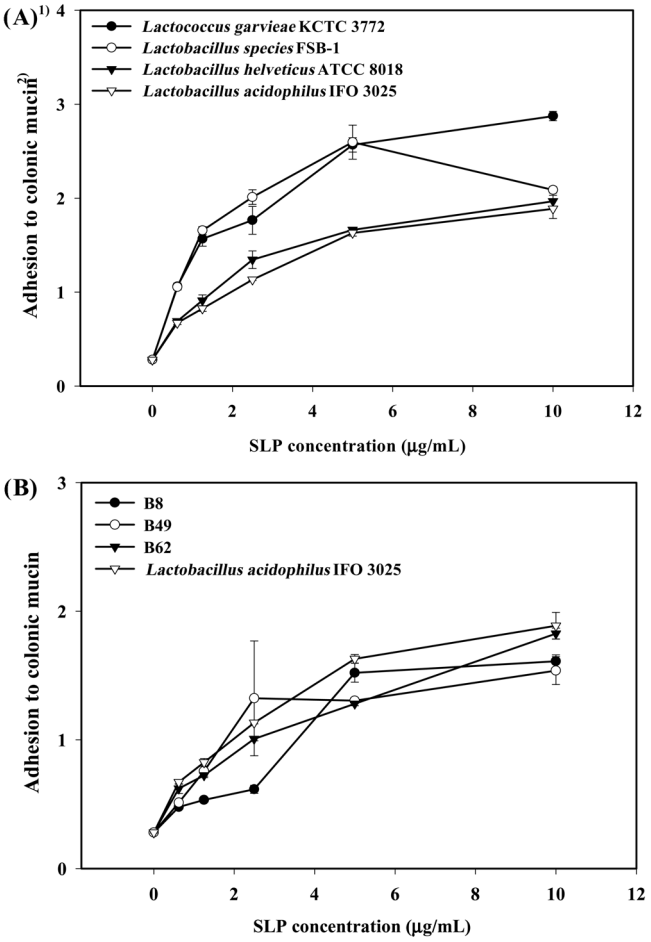

Fig. 4. A quantitative analysis of adhesive property to mucin by lactic acid bacteria selected in first screening procedure.
[1](A) Type culture strains, (B) Isolated strains from infant feces. [2]Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean ± SD of quadruplicate tests.

인간의 대장내 미생물의 균총은 태어난 지 일주일내에 형성된다고 보고되어 왔으며(1,9), 이 대장 미생물들 중 probiotics의 장내 점막에 대한 점착(adhesion)은 균총 형성을 위한 선행 조건으로 강조되어 왔다(1,9-11,13). 장내 점막에 대한 probiotics의 결합은 점막 중 특정성분 또는 부위와 균주표면에 존재하는 lectin상 단백질이 관여되어 있다고 보고되고 있다. 특히, 장내 점막을 구성하는 당쇄 성분이 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다(32). Kenji 등(33)은 *Lactobacillus casei* IFO 3425의 장내 결합능이 대장 점막 중 다양한 당쇄 구조에 따라 차이가 있음을 보고하고, mucin의 당쇄 구조가 장내 점착능에 영향을 준다는 사실을 보고하였다. 또한 Ouwehand 등(32)도 대부분의 장내 세균은 mucin 중 당쇄 부위에 따라 장내 점착능이 달라진다고 보고하였다. 이러한 장내 세균의 colonic mucin에 대한 결합능을 평가하는 방법은 주로 유산균 표면의 lectin상 단백질을 방사선 물질로 표지하여 실시하는 것이 대부분이었다(17,31,32,34). He 등(31)은 건강한 유아와 알레르기를 갖고 있

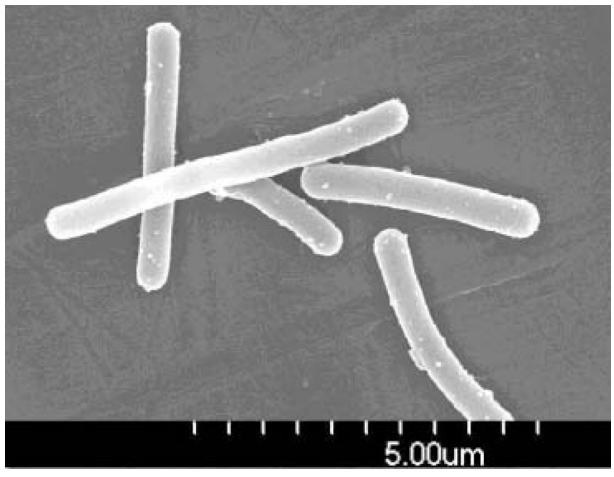

Fig. 5. Scanning electronic microphotograph (SEM) of the isolate, *Lactobacillus brevis* FSB-1.

는 유아로부터 각각 bifidobacteria를 분리하고 이들의 장내 점착능을 방사선 강도로 비교한 결과, 건강한 유아로부터 분리한 *Bifidobacterim bifidum* H-2-4와 *Bifidobacterium breve* H-1이 높은 점착능을 나타내었다고 보고하였다. Ouwehand 등(32)은 연령이 상이한 실험군(신생아, 생후 2개월, 생후 6개월, 25-52세, 74-93세)들의 분변으로부터 장 점막물질(mucin)을 분리하여, *Bifidobacterium* 균주 4종의 점착능을 비교한 결과, 유아군에서 분리한 mucin에 대해 실험에 사용된 균주들이 높은 점착능을 보였다고 보고한 바 있다. 한편 Ouwehand 등(34)은 *Bifidobacterium lactis* Bb 12가 *Lactobacillus* GG 또는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 함께 존재하였을 때, mucin과의 결합능이 상승했다고 보고하면서, 균주간의 상호작용에 의해 장내 점착능이 상승하거나 하락할 수 있다고 보고하였다.

이와 같은 실험결과를 종합해 볼 때, 장내 점막층의 mucin의 당쇄 구조와 유산균의 표면의 lectin상 단백질의 결합을 이용한 colonic mucin-binding assay는 장내 점착능 평가를 위한 재현성 있고 신뢰성 높은 실험방법이라고 할 수 있다.

SLP의 농도에 따른 선별균주의 장내 점착특성

선별과정에서 장내 점착능이 상대적으로 우수한 것으로 평가된 *L. helveticus* ATCC 8018, *L.* species FSB-1, *L. garvieae* KCTC 3772와 유아분변 분리균주 B8, B49, B62균주에 대하여 biotinylated SLP농도에 따른 결합능을 조사한 결과는 Fig. 4의 A) 및 B)에 나타난 바와 같다. 농도에 따른 장내 점착능은 *L.*

Table 3. Comparison of morphological, physiological, and biochemical characteristics between strain FSB-1 and *Lactobacillus brevis*

Taxonomical factors	*Lactobacillus* species FSB-1	*Lactobacillus brevis*
Cell morphology		
Shape	rods	rods
Cell size (μm)	0.5-0.6×3.0-5.0	0.7-1.0×2.0-4.0
Motility	-	-
Spore	-	-
Colony	irregular, white, rough, raised center	irregular, white, rough
Found in	kimchi	human feces
Gram staining	+	+
Culural characteristics		
Oxygen requirement	facultative anaerobes	facultative anaerobes
Growth at 5°C	-	-
15°C	+	+
45°C	+	+
Growth in 4.0 g/L NaCl	+	+
6.5 g/L NaCl	+	+
8.0 g/L NaCl	-	-
Physiological characteristics		
CO_2 from glucose	+	+
Catalase	-	-
Arginase	-	+
Sugar fementation		
Cellobiose	-	-
Trehalose	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Arabinose	-	+
Lactose	-	d
Melibiose	+	+
Raffinose	-	d
Xylose	+	d
Galactose	-	d
Mannose	-	-
Ribose	N.D.	+
Salicine	-	-
Saccharose	-	d
Rhamnose	-	-
Maltose	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Esculine	-	d

+: positive reaction, -: negative reaction, N.D.: not determined, d: 11-89% strains positive.

Table 4. Levels of 16S rDNA sequence similarity for strain FSB-1 and type strains of some *Lactobacillus* species

Strain	Accession No.	Similarity (%)	Nucleotide differences/compaired
Lactobacillus brevis ATCC 14869T	M58810	98.50	12/799
Lactobacillus collinoides JCM 1123T	AB005893	94.13	47/800
Lactobacillus pentosus JCM 1558T	D79211	92.52	60/802
Lactobacillus paraplantarum DSM 10667T	AJ306297	92.52	60/802
Lactobacillus plantarum JCM 1149T	D79210	92.38	61/801
Lactobacillus vermiforme ATCC 13133	M59295	91.97	63/785
Lactobacillus hilgardii ATCC 8290T	M58821	91.74	65/787
Lactobacillus buchneri ATCC 4005T	M58811	91.63	65/777
Lactobacillus fructivorans DSM 20203T	X76330	90.89	73/801
Lactobacillus mali ATCC 27053T	M58824	89.78	80/783
Lactobacillus arizonensis NRRL B-14768T	AF093757	89.67	82/794
Lactobacillus sanfranciscensis ATCC 27651T	X76327	89.64	83/801

garvieae KCTC 3772와 *L.* species FSB-1이 대조군으로 사용한 대표적 probiotics 유산균주인 *L. acidophilus* IFO 3025보다 훨씬 우수한 활성을 보여주었다. *L. helveticus* ATCC 8018의 경우는 이보다 다소 낮은 대조군과 유사한 정도의 장내 점착능을 나타내었으며, 모든 균주에서 SLP의 농도에 의존적으로 활성이 높아지는 경향을 보여주었다. 한편 유아 분변 분리균주에서는 B8, B49, B62균주 모두 대조균주와 유사한 정도의 장내 점착능을 보여주었다.

그러나 본 실험의 최종목표가 장내 상재성이 우수한 probiotics의 개발이라는 측면을 고려할 때, *L. garvieae* KCTC 3772는 그 발생 기원상 부적절할 것으로 판단되었으며, 유아 분변 분리균주들의 경우, 생장이 다소 늦은점 등 생리적 특성과 *Bifidobacterium*이 아닌 균으로 동정된 균주가 발견되는 등 문제점이 있었다. 따라서 안정적으로 높은 장내 점착능을 보이고, probiotics로의 이용가능성이 높은 *L.* species FSB-1을 최종적으로 선별하고, 이후의 실험을 수행하였다.

장내 점착능 우수 유산균주 *Lactobacillus* species FSB-1의 동정

장내 점착능이 우수한 균주로 최종 선별되었던 *L.* species FSB-1은 경기대 대학원 식품생물공학과에서 김치로부터 분리하여 보관 중인 균주로서, 형태학적 관찰, 생리 및 생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열분석을 통한 동정을 수행하였다. 주사형 전자현미경(SEM)을 이용하여 *L.* species FSB-1을 관찰한 결과(Fig. 5), 직경 약 0.5-0.6 μm, 길이 3.0-5.0 μm의 간균이었으며 colony는 MRS 배지상에서 중심부위가 약간 융기한 흰색의 불규칙한(irregular) 형태였다. 생리 및 생화학적 특성을 검토한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이, Gram 양성, catalase 음성 및 비운동성의 특성을 갖고 있었으며, hetero발효형의 arginine 음성을 나타내었다. 이러한 결과들로 판단해 볼 때, *L.* species FSB-1은 잠정적으로 *Lactobacillus*속에 속하는 세균으로 판단되었다. *L.* species FSB-1의 발효특성 등 대부분 생화학적 특성은 Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology(26)에서 Kandler와 Weiss가 묘사한 *Lactobacillus brevis*의 특성과도 상당부분 일치하였다.

한편 보다 정확한 동정을 위하여, 802 bp 길이의 16S rDNA 부분 염기서열 분석(data는 제시하지 않았음)을 수행하고, 관련 data base를 토대로 유사성을 비교하였다. *L.* species FSB-1의 16S rDNA의 염기서열은 Table 4에 나타난 바와 같이, *Lactobacillus*에 속하는 99개의 종 및 아종 중 특히 *Lactobacillus brevis* ATCC 14869T 표준균주와 98.5%의 높은 상동성을 보였다. 통상 16S rDNA gene의 염기서열 97%를 기준(16S rDNA full sequence: 약 1,500 bp)으로 종을 판단하는 최근 추세(36,37)로 볼 때, 본 균주는 *Lactobacillus brevis* 또는 그 유연균주로 사료되었다. 이상의 분류학적 특성을 고려할 때, 장내점착성이 우수한 균주로 최종 선별되었던 *L.* species FSB-1은 *Lactobacillus brevis*로 최종 동정되었다.

요 약

인간의 대장내 점막에 대하여 우수한 점착특성을 갖는 probiotic 유산균주를 선별할 목적으로, colonic mucin-binding assay를 고안하고 최적의 분석 조건을 검토한 결과, microtiter plate의 well에 대한 colonic mucin의 부착은 pH 4.8, biotinylated SLP의 농도는 5.0 μg/mL, 시판 HRP-conjugated streptoavidin은 24,000배 희석용액, TMB의 발색시간은 10분의 조건에서 측정시 최적의 결과를 나타냈다. 동 조건에서 본 assay system을 이용할 경우, 장내 점착능 측정 및 우수 유산균주의 선별에 있어 신속하고 재현성 있는 결과를 제공할 수 있으며, 인간의 대장에 대한 유산균의 점착특성을 정량적으로 분석할 수 있음을 보여주었다. 공시균주 32종 및 유아 분변 유래의 분리균주 18종을 포함한 총 50종의 유산균주에 대하여, colonic mucin-binding assay를 이용하여 대장 mucin에 대한 결합능을 비교한 결과, *L.* species FSB-1이 가장 높은 결합능을 보여주었다. 따라서 *L.* species FSB-1을 대상으로 형태학적 특성, 생리 및 생화학적 특성과 16S rDNA에 대한 부분 염기서열 분석을 포함한 동정실험을 수행한 결과, 장내 점착능 우수균주로 선별된 *L.* species FSB-1은 *Lactobacillus brevis*로 최종 동정되었다.

문 헌

1. Fernandes CF, Shahani KM. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary Lactobacilli. J. Food Prot. 53: 704-710 (1990)
2. Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29: 47-52 (2000)
3. Goldin BR. Health benefits of probiotics. Br. J. Nutr. 80: s203-s207 (1998)
4. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? Trends Food Sci. Technol. 10: 107-110 (1999)
5. Sherwood L, Gorbach MD. Probiotics and gastrointestinal health.

Am. J. Gastroenterol. 95: s2-s4 (2000)
6. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 9: 43-52 (1999)
7. Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol. 17: 755-773 (2003)
8. Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. Am. J. Clin. Nutr. 71: 821-872 (2000)
9. Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kerneis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2034-2039 (1992)
10. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Int. J. Food Microbiol. 64: 119-126 (2001)
11. Ouwehand AC, Niemi P, Salminen S. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria *in vitro.* FEMS Microbiol. Lett. 177: 35-38 (1999)
12. Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. Trends Food Sci. Tech. 10: 405-410 (1999)
13. Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. Int. J. Food Microbiol. 41: 45-51 (1998)
14. Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of Lactobacilli to human Caco-2 cells. Appl. Environ. Microbiol. 4487-4494 (1994)
15. Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. J. Gen. Microbiol. 138: 1689-1696 (1992)
16. Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H, Benno Y. Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. Curr. Microbiol. 44: 212-215 (2002)
17. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiol. Lett. 167: 185-189 (1998)
18. Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawau Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82: 2525-2529 (1999)
19. Takahashi N, Saito T, Ohwada S, Ota H, Hashiba H, Itoh T. A new screening method for the selection of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria with high adhesion to human colonic mucosa. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 1434-1438 (1996)
20. Slomiany BL, Murty VLN, Slomiany A. Isolation and characterization of oligosaccharides from rat colonic mucus glycoprotein. J. Biol. Chem. 255: 9719-9723 (1980)
21. Mellisa LC, Connie IE, Wang TN, Fumio Y, Daryl WO. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, and Streptomycin-resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. J. Food Prot. 56: 954-957 (1993)
22. Perret V, Lev R, Pigman W. Simple method for the preparation of single cell suspensions from normal and tumorous rat colonic mucosa. Gut 18: 382-385 (1977)
23. Shen P, Fan XR, Li GW. The SEM study. pp. 52-63. In: Laboratory Experiments in Microbiology. 3rd ed. High Education Press, Beijing, China (1999)
24. Cowan NR, Steel KJ. Manual of the Identification of Medical Bacteria. pp. 147, 161. 2nd ed. Wiliams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)
25. Macfaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical bacteria. pp. 36. 2nd ed. Wiliams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)
26. Kandler O, Weiss N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. Vol. 2, pp. 1208-1234. In: Sneath PHA, Maie NS, Sharpe ME, Holt JC. (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Wiliams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1986)
27. Yoon JH, Lee ST, Park YH. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 187-194 (1998)
28. Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acid Res. 22: 4673-4680 (1994)
29. Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P. Mucin coating on polymeric material surface to suppress bacterial adhesion. Coll. Surf. B: Biointerfaces 17: 229-239 (2000)
30. Ohara S, Watanabe T, Hotta K. Comparative study of carbohydrate portion of gastrointestinal mucins using enzyme-linked lectin-binding assay (ELLA). Comp. Biochem. Physiol. 116: 167-172 (1997)
31. He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 30: 43-47 (2001)
32. Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen SJ. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. FEMS Microbiol. Lett. 172: 61-64 (1999)
33. Kenji Y, Takuya M, Hiromu T, Tomokazu N, Kyoko S, Tetsuki T, Hidehiko K. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 228: 148-152 (1996)
34. Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkko S, Salminen SJ. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb 12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus.* Lett. Appl. Microbiol. 30: 10-13 (2000)
35. Goodfellow M, Manfio GP, Chun J. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. pp. 25-29. In: The Units of Biodiversity-Species in Practice. Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (ed). Chapman and Hall, London, UK (1997)
36. Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 217-221 (1999)

(2004년 8월 3일 접수; 2004년 9월 22일 채택)