

双歧杆菌体外对 Caco-2 的黏附及其表面性质分析

王丽群, 张佰荣, 王彦, 尚玉琳, 孟祥晨*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】体外测定双歧杆菌的黏附能力并对其表面性质进行分析。【方法】利用 Caco-2 细胞作为黏附模型体外测定七株菌的黏附能力,同时分析其自动聚集能力和表面疏水性,通过采用不同酶及化学物质处理双歧杆菌菌体细胞表面初步确定双歧杆菌细胞表面黏附相关化合物的类型,并对双歧杆菌表面蛋白进行电泳分析。【结果】自动聚集能力和表面疏水性均高的双歧杆菌菌株,其黏附能力高于自动聚集能力和表面疏水性均低的菌株,表现出明显的正相关。此外,受试菌株的黏附能力对蛋白酶和高碘酸钠敏感,利用 LiCl 对菌体表面蛋白进行提取后,其黏附能力明显下降,SDS-PAGE 结果表明 LiCl 提取物中含有分子量大小不等的多个蛋白。【结论】双歧杆菌体外对 Caco-2 细胞的黏附具有菌株特异性,其黏附能力与表面疏水性质和自动聚集能力相关,此外,推测双歧杆菌表面可能含有能调节其黏附的糖蛋白类物质。

关键词: 双歧杆菌; 黏附; 疏水性; 自动聚集

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0606-08

双歧杆菌是人肠道天然存在的一类厌氧微生物,具有拮抗病原微生物^[1-2]、调节免疫^[3]等益生功能,常以益生菌形式添加于食品、药品以及保健品中。双歧杆菌对机体产生益生作用与其能在消化道内黏附和定植有关,其中黏附是先决条件^[3]。益生菌黏附过程包括菌体与不同接触表面之间的非特异性物理作用和黏附素与其特定受体间的特异性结合^[4]。以乳杆菌为例,已经克隆和测序了21种与黏附相关的蛋白编码基因,并发现乳杆菌表面蛋白与其自动聚集和黏附能力存在相关性^[5]。

体外细胞培养方法是体外研究益生菌黏附最常用的方法。人结肠腺癌细胞系,如 Caco-2 细胞株,由于在体外生长所表现出的形态和功能特征能够模拟成熟肠道上皮细胞^[6-7],经常作为体外模型用于评价益生菌的黏附和定植能力,如用于动物双歧杆

菌 BB-12^[8] 和嗜酸乳杆菌 NCFM^[9] 黏附能力的研究。除此之外,自动聚集能力也可间接地反映黏附能力,Del 等研究证实 13 株长双歧杆菌的自动聚集能力与黏附性之间具有很强的相关性^[7]。而且,研究表明双歧杆菌的黏附能力与细菌表面组成及结构直接相关^[10],菌体细胞表面的物理化学特征主要取决于其表面疏水性^[10],而双歧杆菌的表面疏水性与其黏附能力和自动聚集能力之间都存在较好的相关性^[11]。但是,到目前为止,关于双歧杆菌黏附能力、自动聚集能力以及表面疏水性三者之间关系的研究并不多。

本研究以七株不同来源的双歧杆菌为研究对象,通过 Caco-2 细胞模型研究其黏附能力,通过测定其自动聚集能力和表面疏水性来分析三者之间的关系;通过研究不同处理条件对受试菌株黏附能力

基金项目:国家 863 项目(2008AA10Z335);东北农业大学创新团队项目(CXT007-2-2)

* 通讯作者:Tel: +86-451-55191813; E-mail: xchmeng@163.com

作者简介:王丽群(1982-),女,山东聊城人,博士研究生,研究方向为乳品微生物与生物技术。E-mail: lotoswang@yahoo.cn

收稿日期:2009-11-25;修回日期:2010-02-18

的影响,初步确定双歧杆菌菌体表面黏附相关化合物的性质,最后通过 SDS-PAGE 分析双歧杆菌表面蛋白的存在情况。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株及细胞:供试双歧杆菌主要分离于成人粪便、婴儿粪便及市售乳制品(见表1),由乳品科学教育部重点实验室工业微生物菌种保藏中心(KLDS-DICC)冻干保藏。对照菌株动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)BB-12,鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)GG及嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)NCFM均分离自市售乳制品。人结肠腺癌细胞系Caco-2株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

表1 试验菌株及来源

Table 1 Bacterial strains and resource

Species	Strain number	Resource
<i>B. bifidum</i>	KLDS2.0602	Adult feces
	KLDS2.0502	Adult feces
<i>B. infantis</i>	KLDS2.0604	Infant feces
	KLDS2.0611	Infant feces
<i>B. adolescentis</i>	KLDS2.0505	Dairy natural starter
	KLDS2.0506	Dairy natural starter
<i>B. lactis</i>	KLDS2.0501	Dairy natural starter
<i>B. animalis</i>	BB-12	Commercial fermented milk
<i>Lb. rhamnosus</i>	GG	Commercial fermented milk
<i>Lb. acidophilus</i>	NCFM	Commercial fermented milk

1.1.2 培养基和化学试剂:MRS培养基,英国Oxoid公司;改良MRS培养基(mMRS):添加0.05% L-半胱氨酸盐酸盐的MRS,调pH至7.0;高糖型DMEM培养基购自美国Gibco公司;优级胎牛血清购自天津灏洋生物制品有限责任公司;胰酶、青霉素素购自美国Invitrogen公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试验仪器与设备:厌氧培养箱(Thermo electron corporation,美国);二氧化碳培养箱(力康发展有限公司);倒置显微镜BA300(Motic公司,德国);紫外分光光度计DU800(Beckman coulter,美国);冷冻离心机(上海市离心机械研究所)。

1.2 细菌的培养和保存

双歧杆菌接种于mMRS培养基,37℃厌氧培养48h;分离自市售乳制品的乳杆菌菌株,通过形态观察和生化鉴定后,接种于MRS培养基中,37℃过夜

培养。上述菌种均在30%(v/v)甘油中于-80℃下冻存。

1.3 细胞培养

从液氮罐中取出Caco-2细胞,将冻存管迅速置于37℃水浴中复苏细胞,离心收集细胞后,加入4mL含10%胎牛血清(使用前56℃,30min灭活)的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂-95%空气的条件下培养,每隔一天更换培养液;当细胞在培养瓶底长至80%满时,需进行传代。用于黏附测定的Caco-2细胞,单层细胞培养于预先放有玻璃盖玻片的六孔培养皿,接种量为1×10⁵CFU/mL,每隔48h以及进行黏附试验前24h更换一次培养基,维持细胞生长。单层细胞培养15-17d,后期融合后,即可用于黏附试验。

1.4 菌株对Caco-2细胞黏附能力的测定(直接镜检法)

将生长至对数生长期后期的细菌培养物调整至浓度为1×10⁸/mL^[12]。菌体经清洗后重悬于DMEM培养基,用于黏附测定。Caco-2细胞用无钙镁离子磷酸盐缓冲液(PBS:140mmol/L NaCl,3mmol/L KCl,8mmol/L Na₂HPO₄,2mmol/L KH₂PO₄,pH7.2)清洗后,添加2mL含有1×10⁸/mL双歧杆菌的DMEM培养物,于37℃、5%CO₂-95%空气条件下孵育1h。单层细胞用无菌PBS缓冲液清洗4次,甲醇固定10min,革兰氏染色,在显微镜油镜下观察细菌与细胞的黏附状态。黏附能力以随机选取的20个显微视野进行评价,并以100个Caco-2细胞黏附的细菌数表示。

1.5 菌株自动聚集能力的测定

菌株的自动聚集能力以自动聚集百分比表示^[4,13-14]。具体测定方法如下:细菌培养物经漩涡振荡2min后,取1mL测定细菌悬浮液在600nm处的吸光值作为整个细菌悬浮液的吸光值,而后25℃静止放置,分别在振荡后的不同时刻(30min,60min,90min,120min,150min)取1mL上层清液至另一试管中,在600nm处测其吸光值,通过以下公式计算自动聚集百分比:1-(上层清液吸光值/整个细菌悬浮液吸光值)×100。

1.6 菌株表面疏水性的测定

通过试验菌株对碳氢化合物的亲和力反映菌株表面疏水性,具体参考Rosenberg等(1980)的方法,

并略加修改^[15-16]。试验菌株培养物于 6703 r/min, 10 min 离心收集菌体, 菌体经过 PBS 清洗 2 次后, 重新悬于该缓冲液中, 在 600 nm 处调节吸光值为 0.8-0.9 (准确读取其吸光度值, 记作 A_0), 取 3 mL 该菌液, 然后加入 0.6 mL 十六烷或二甲苯。该两相体系通过涡旋彻底混合 2 min, 37°C 共孵育 1 h 后去除上清液, 于 600 nm 处测定水相的吸光值 (记作 A)。按如下公式计算试验菌株的疏水性 (H%): $H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$, 这里 A_0 和 A 分别表示有机溶剂萃取前后的吸光值。进行 3 次独立的试验。

1.7 试验菌株菌体表面化合物性质的确定

将双歧杆菌 KLDS2.0501 接种于 mMRS 培养基在 37°C 厌氧培养 24 h, 6703 r/min, 10 min 离心收集菌体, 调整菌数为 10^8 CFU/mL, 菌体经 PBS 清洗两遍后, 在 37°C 条件下分别进行如下处理: 胰蛋白酶 (2.5 mg/mL), 1 h; 蛋白酶 K (0.5 mg/mL), 30 min; 胃蛋白酶 (0.5 mg/mL), 30 min; 高碘酸钠 (10 g/L), 30 min 以及氯化锂 (5 mol/L), 30 min。处理后的菌体用 PBS 清洗两遍后, 重悬于 DMEM 培养基, 再进行黏附分析^[4]。具体如下: Caco-2 细胞用 PBS 清洗两遍后, 加入 2 mL 上述经过处理并重悬于 DMEM 培养基的双歧杆菌, 于 37°C、5% CO_2 - 95% 空气条件下孵育 1 h, 用 PBS 清洗 5 遍, 以除去未黏附的细菌细胞, 加入 0.25% 的胰酶 250 μ L, 再于 37°C 下孵育 15 min, 释放细胞上已黏附的细菌。然后向培养板每个孔中添加 250 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 以终止胰酶活力, 用吸管将 Caco-2 细胞层吹打下来。黏附细菌经 10 倍梯度稀释后涂布于 mMRS 固体平板培养基进行平板菌落计数, 菌株的黏附能力以 \log_{10} CFU/孔表示。进行 3 次独立的试验。

1.8 乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白的提取及电泳分析

将乳双歧杆菌 KLDS2.0501 接种于液体 mMRS 培养基, 37°C 厌氧培养至稳定期, 离心收集菌体, 用冷 PBS 缓冲液 (4°C) 洗涤菌体两次, 最后用 20 mL PBS 重悬菌体, 在重悬液中加入溶菌酶 (2 mg/mL), 37°C 温育 1 h。离心 (6703 r/min, 15 min) 上述重悬液, 沉淀菌体用 1 mol/L 氯化锂重悬, 20°C 温育 20 h, 离心收集上清 (6703 r/min, 30 min), 上清液在 0.01 mol/L PBS 中 4°C 透析过夜, 收集样品, 冻干后

-20°C 保存备用^[17]。提取的乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白经 5% 浓缩胶 (w/v) 和 12% 分离胶 (w/v) 进行分离。乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白与含有 SDS 和巯基乙醇的上样缓冲液共同煮沸 5 min, 离心后上样, 浓缩胶电压 80 V, 分离胶电压 120 V 进行电泳, 电泳结束后凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.9 数据分析

运用 SAS 8.1 软件, 采用独立样本 t 检验进行数据分析 ($p < 0.01$), 试验结果用平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果和分析

2.1 双歧杆菌对 Caco-2 细胞黏附的观察及黏附能力分析

通过双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附作用 (图 1) 可以看出, 双歧杆菌菌体形态完整, 并且能够黏附在 Caco-2 单层细胞的刷状边缘, 同时发现 *B. lactis* KLDS2.0501 对 Caco-2 细胞的黏附能力明显强于 *B. infantis* KLDS2.0611。

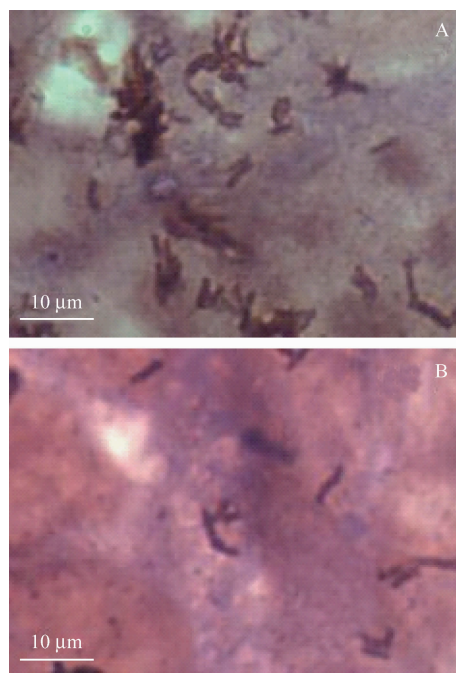


图 1 双歧杆菌对 Caco-2 细胞黏附的显微观察 (1000 \times)

Fig. 1 Adhesion ability of *Bifidobacterium* spp. to Caco-2 cells observed by light microscopy. A; *B. lactis* KLDS2.0501; B; *B. infantis* KLDS2.0611.

采用直接镜检法分析了 7 株双歧杆菌和 3 株对

照菌株(1株双歧杆菌,2株乳杆菌)的黏附能力,结果见图2。结果表明,所试验的双歧杆菌菌株的黏附能力均显著高于对照菌株 *Lb. rhamnosus* GG 和 *Lb. acidophilus* NCFM($p < 0.01$);而 *B. animalis* BB-12 的黏附能力则高于大多数受试双歧杆菌菌株的黏附能力,仅低于 *B. lactis* KLDS 2.0501。研究发现,7株双

歧杆菌的黏附能力具有菌株差异性,其中 *B. lactis* KLDS 2.0501 的黏附能力最强,每100个Caco-2细胞平均黏附 425.74 ± 108.50 个菌体细胞,而 *B. infantis* KLDS2.0611 的黏附能力最弱,每100个Caco-2细胞平均黏附 208.52 ± 22.52 个菌体细胞。

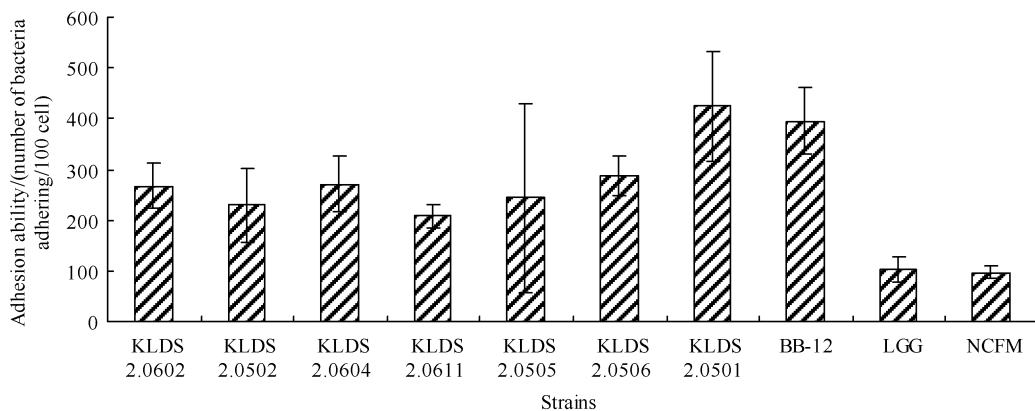


图2 七株双歧杆菌黏附能力的比较分析

Fig. 2 Comparison of adhesion ability of 7 bifidobacterial strains. *B. bifidum*: KLDS2.0602, KLDS2.0502; *B. infantis*: KLDS 2.0604, KLDS 2.0611; *B. adolescentis*: KLDS 2.0505, KLDS2.0506; *B. lactis*: KLDS 2.0501; *B. animalis* BB-12; *Lb. rhamnosus* GG; *Lb. acidophilus* NCFM.

2.2 双歧杆菌自动聚集能力的测定

图3给出的是七株受试双歧杆菌菌株与3株对照菌株在5个不同时间点处的自动聚集能力,可以看出:在任一时间点处,受试双歧杆菌菌株的自动聚集能力均高于3株对照菌株。双歧杆菌 KLDS2.0501、

KLDS2.0502、KLDS2.0505 和 KLDS2.0506 在振荡后迅速沉降,到150 min时,细菌悬浮液上层溶液呈澄清状态,而3株对照菌株和双歧杆菌 KLDS2.0611 则沉降缓慢,至试验结束时,这些自动聚集能力较差的细菌悬浮液仍整体表现浑浊。

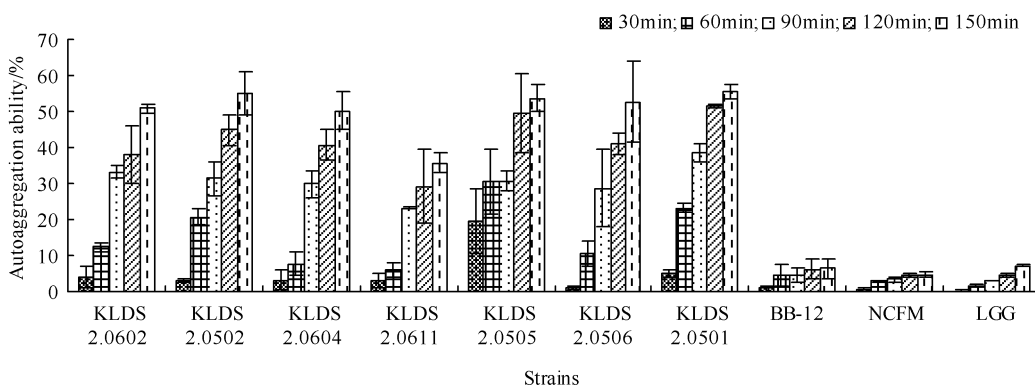


图3 双歧杆菌在不同时间点的自动聚集能力

Fig. 3 Autoaggregation of bifidobacterial strains at different time. *B. bifidum*: KLDS2.0602, KLDS2.0502; *B. infantis*: KLDS 2.0604, KLDS 2.0611; *B. adolescentis*: KLDS 2.0505, KLDS2.0506; *B. lactis*: KLDS 2.0501; *B. animalis* BB-12; *Lb. rhamnosus* GG; *Lb. acidophilus* NCFM.

2.3 双歧杆菌疏水性的测定

双歧杆菌在不同碳氢化合物中的表面疏水性如图4所示,可以发现:双歧杆菌在两种碳氢化合物中的表面疏水性均高于对照菌株 *Lb. rhamnosus* GG 和

Lb. acidophilus NCFM,而对照菌株 BB-12 却表现出较强的表面疏水性。所有测试菌株在二甲苯中的疏水性均高于其在十六烷中的疏水性,其中, KLDS 2.0502、KLDS 2.0505、KLDS 2.0505、KLDS 2.0501

在二甲苯中的表面疏水性均大于 98%。除 KLDS2.0604, KLDS2.0611 及 KLDS2.0502 外,其他所测试双歧杆菌在十六烷中的表面疏水性均大于 65%。

2.4 乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面化合物性质的确定

以 *B. lactis* KLDS2.0501 为例,进一步分析双歧

杆菌表面化合物的性质。胰酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶、氯化锂及高碘酸钠处理对 *B. lactis* KLDS2.0501 黏附能力的影响见图 5。由该图发现:与未经处理的菌体细胞相比,经胰酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶、氯化锂和高碘酸钠作用后的菌体细胞,其黏附能力均发生极显著的降低($p < 0.01$)。

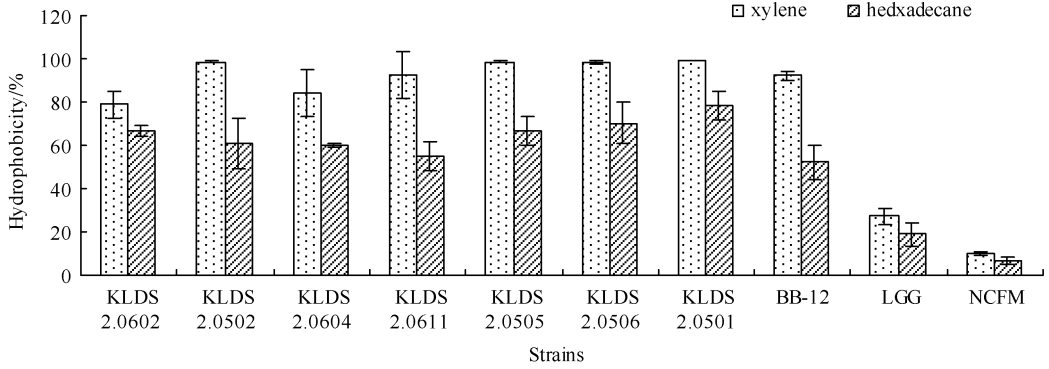


图 4 双歧杆菌在二甲苯和十六烷中的表面疏水性

Fig. 4 Surface hydrophobicity of bifidobacterial strains in xylene and hexadecane. *B. bifidum*: KLDS2.0602, KLDS2.0502; *B. infantis*: KLDS 2.0604, KLDS 2.0611; *B. adolescentis*: KLDS 2.0505, KLDS2.0506; *B. lactis*: KLDS 2.0501; *B. animalis* BB-12; *Lb. rhamnosus* GG; *Lb. acidophilus* NCFM.

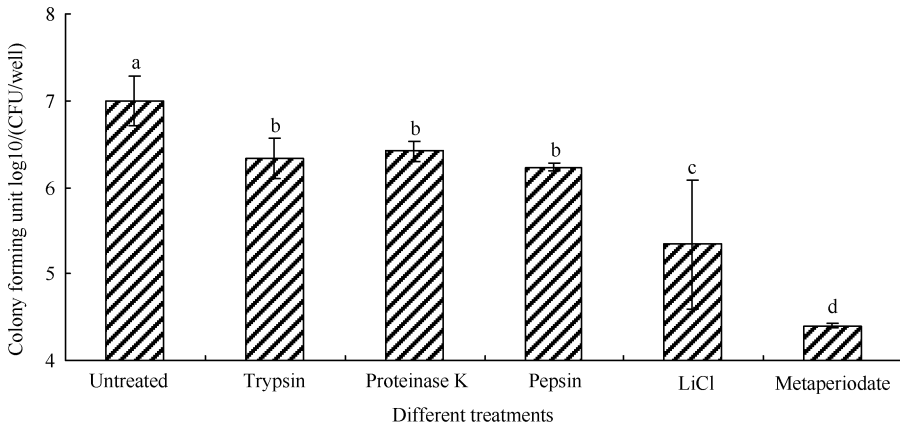


图 5 不同处理条件对 *B. lactis* KLDS2.0501 黏附能力的影响

Fig. 5 Influence of different treatments on adhesion ability of *B. lactis* KLDS2.0501. a, b, c and d indicated as significantly different at $p < 0.01$ level.

2.5 乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白的电泳分析

乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 6 所示。从图中可以看出,乳双歧杆菌 KLDS2.0501 经 1 mol/L LiCl 提取后,通过 SDS-PAGE 电泳能够检测到多条蛋白带,其分子量大小主要分布在 26 kDa 到 94 kDa 之间,其中 2 个主要蛋白带大小约为 40 kDa 左右(分别命名为 Pro

A 和 Pro B),而且在 95 kDa、60 kDa、35 kDa 和 26 kDa 大小附近分别能够检测到 4 条较弱的蛋白带(依次命名为 Pro C、Pro D、Pro E 和 Pro F)。

3 讨论

由于直接在体内研究双歧杆菌对人肠道上皮细胞的黏附作用具有一定的困难,因此来自于人结肠腺癌的 Caco-2 细胞经常用于高黏附能力乳杆菌和

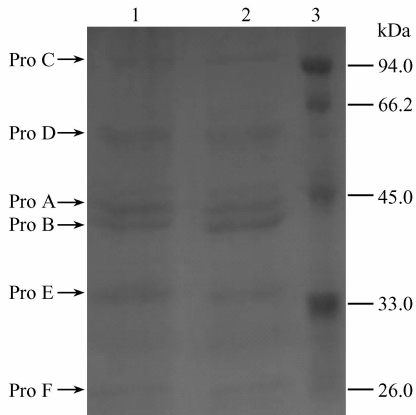


图6 乳双歧杆菌 KLDS2.0501 表面蛋白的电泳分析

Fig. 6 Analysis of surface proteins extracted from *B. lactis* KLDS2.0501 by SDS-PAGE. lane 1 and 2, surface proteins extracted from *B. lactis* KLDS2.0501; and lane 3, low molecular weight protein standards.

双歧杆菌菌株的筛选。在 Caco-2 模型的基础上,对细菌(包括双歧杆菌)黏附能力进行检测的方法又可分为直接镜检法^[6]、ELISA 法、平板菌落计数法和放射性标记法等^[18],本研究采用应用较多的直接镜检法对七株不同来源双歧杆菌的黏附能力进行比较分析,研究结果表明在相同菌体浓度条件下,双歧杆菌的黏附能力存在菌株差异性,其中分离自益生面粉的乳双歧杆菌 KLDS2.0501 的黏附能力最高。与

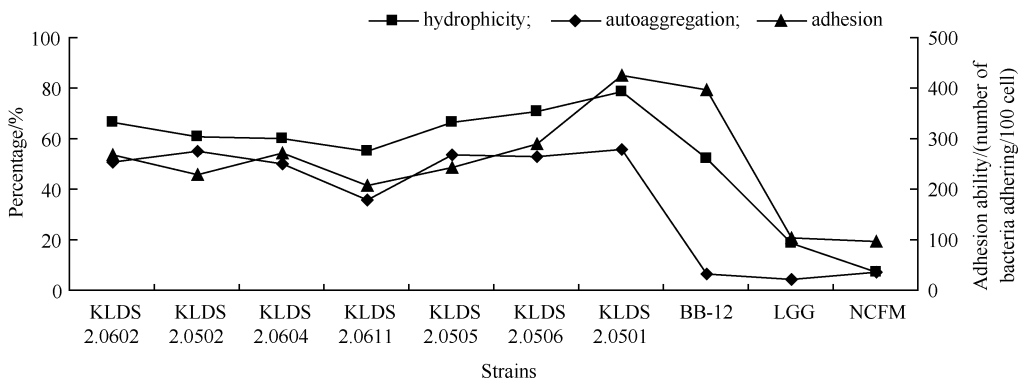


图7 双歧杆菌黏附性、疏水性及自动聚集能力间的比较分析

Fig. 7 Comparison analysis of adhesion, hydrophobicity and autoaggregation of bifidobacteria. *B. bifidum*: KLDS2.0602, KLDS2.0502; *B. infantis*: KLDS 2.0604, KLDS 2.0611; *B. adolescentis*: KLDS 2.0505, KLDS2.0506; *B. lactis*: KLDS 2.0501; *B. animalis* BB-12; *Lb. rhamnosus* GG; *Lb. acidophilus* NCFM.

为进一步分析黏附性、自动聚集能力及疏水性均高的 *B. lactis* KLDS2.0501 细胞表面化合物的性质,根据已报道的乳杆菌黏附素组成(大多数为蛋白类物质)^[4, 21],选择3种不同的消化系统酶类,分别对该菌株的菌体细胞进行处理,所获得结果与乳

其他种相比,两株婴儿双歧杆菌的黏附能力相对较低。Del 等(2000)对13株长双歧杆菌的黏附能力进行评价时,发现在同种双歧杆菌间,不同株的双歧杆菌同样存在黏附差异性,由此说明,双歧杆菌的黏附能力与其自身的性质存在着必然的联系^[7, 19]。

许多报道指出,黏附是一个复杂的多步的过程^[13],黏附过程可能是某个非特异机制起作用^[14],也可能是某个特异的连接受体在起作用^[10]。双歧杆菌表面疏水性和自动聚集能力通常被认为是两个独立的、能够反映双歧杆菌黏附能力的特征^[20]。Pan 等(2006)通过对23株双歧杆菌疏水性和黏附能力进行比较分析,建立了能够反映双歧杆菌表面疏水性与黏附性之间关系的回归方程,此外,双歧杆菌自动聚集能力与黏附之间的正相关关系也已经报道^[7, 11]。本研究同时对双歧杆菌表面疏水性和自动聚集能力两方面特征进行测定和分析,观察双歧杆菌表面性质对其黏附能力的影响。结果表明,受试7株双歧杆菌的黏附能力、自动聚集能力及表面疏水性具有一定的相关性,即自动聚集能力和表面疏水性均高的菌株,其黏附能力高于自动聚集和表面疏水性均低的菌株(图7);而自动聚集能力和表面疏水性有一者较低的菌株,其黏附性大小则处于中等水平。

杆菌 LGG 相似^[22],不同酶处理能够显著降低 *B. lactis* KLDS2.0501 对 Caco-2 细胞的黏附能力。此外,乳双歧杆菌 KLDS 2.0501 细胞表面蛋白经 5 mol/L LiCl 提取后,菌体细胞的黏附能力迅速下降,进一步说明了蛋白类物质在该株菌的黏附过程

中起了重要的作用。此外,利用 SDS-PAGE 电泳技术检测了提取自 *B. lactis* KLDS2.0501 的表面蛋白。根据 Kos 等报道^[4],高碘酸钠具有氧化菌体细胞表面碳水化合物化合物的作用,研究发现, *B. lactis* KLDS2.0501 经高碘酸钠作用后,其在 Caco-2 细胞上的黏附数量减少了近 4 个数量级,这表明碳水化合物类物质同样可能参与调节双歧杆菌的黏附作用,因此推断:*B. lactis* KLDS2.0501 菌体细胞表面参与黏附作用的相关物质可能是一种糖蛋白。

4 结论

双歧杆菌体外对 Caco-2 细胞的黏附具有菌株特异性,通过对它们表面疏水性和自动聚集能力的分析,确定双歧杆菌的黏附能力、表面疏水性和自动聚集能力三者之间存在着相关性,表面疏水性和自动聚集能力均高的菌株一般具有较高的黏附能力;此外,通过观察不同化学物质及酶类处理后双歧杆菌黏附能力的变化,推测出能够介导某些双歧杆菌黏附的物质可能是一种糖蛋白。在今后的研究中,将对提取自乳双歧杆菌 KLDS2.0501 的表面黏附相关蛋白进行鉴定及分析,从而进一步揭示双歧杆菌表面蛋白类物质在双歧杆菌黏附过程中发挥作用的具体机制。

参考文献

- [1] Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 2007, 40: 629-636.
- [2] Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4121-4128.
- [3] Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello, Campieri, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125: 286-292.
- [4] Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(6): 981-987.
- [5] Mobili P, Serradell MÁ, Trejo SA, Puigvert FA, Abraham AG, Antoni GL. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(4): 363-372.
- [6] Crociani J, Grill JP, Huppert M, Ballongue J. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 21(3): 146-148.
- [7] Del RB, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(6): 438-442.
- [8] Palencia PF, López P, Corbí AL, Peláez C, Requena T. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research Technology*, 2008, 227: 1475-1484.
- [9] Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer R. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8344-8351.
- [10] Pan WH, Li PL, Liu Z. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 2006, 12(3): 148-152.
- [11] Rahman M, Kim WS, Kumura H, Shimazaki K. Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 24(8): 1593-1598.
- [12] Gopal, PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 67(3): 207-216.
- [13] Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research Technology*, 2008, 226(5): 1065-1073.
- [14] Del RB, Busetto A, Vignola G, Palenzona DL. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 27(5): 307-310.
- [15] Canzi E, Guglielmetti S, Mora D, Tamagnini I, Parini C. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 88(3-4): 207-219.

- [16] Rosenberg, M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, 9(1): 29-33.
- [17] Wang B, Wei H, Yuan J, Li Q, Li Y, Li N, Li J. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Current Microbiology*, 2008, 57: 33-38.
- [18] Le BG, Fliss I, Lacroix C. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiology Methods*, 2004, 59(2): 211-221.
- [19] 刘国荣, 潘伟好, 畅晓渊, 林枫翔, 李平兰. 双歧杆菌的粘附特性及其对肠道致病菌的体外拮抗作用. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(5): 716-721.
- [20] Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J. Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica (Praha)*, 2008, 53(3): 263-269.
- [21] Frece J, Kos B, Svetec LK, Zgaga Z, Mrša V, Šušková I. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(2): 285-292.
- [22] Ouwehand AC, Tölkö S, Salminen S. The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *Journal of Food Science*, 2001, 66(6): 856-859.

Adhesion of bifidobacteria to Caco-2 *in vitro* and analysis of surface traits of bifidobacteria

Liqun Wang, Bairong Zhang, Yan Wang, Yulin Shang, Xiangchen Meng*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University & Food college, Harbin 150030, China)

Abstract: [**Objective**] We evaluated the adhesion of bifidobacteria *in vitro* and analyzed its surface properties. [**Methods**] We selected Caco-2 cell as the adhesion model to determine the adhesion ability of 7 bifidobacterial strains *in vitro*. The autoaggregation ability and surface hydrophobicity were also assayed. Moreover, the substance on the surface of bifidobacteria related to adhesion was characterized by treatments of different enzymes and chemicals. Surface proteins of bifidobacteria were analyzed by electrophoresis. [**Results**] The strain with high surface hydrophobicity and strong autoaggregation ability also showed higher adhesion ability than those with low surface hydrophobicity and weak autoaggregation. The correlation among the three properties was obvious. The adhesion of bifidobacteria was sensitive to proteinase and metaperiodate, and the adhesion ability of bifidobacteria decreased significantly after the surface protein extracted with LiCl. The result of SDS-PAGE showed that many proteins with different molecule weights were extracted from bifidobacteria by LiCl. [**Conclusion**] Bifidobacteria adhering to Caco-2 cell were strain-specific; surface hydrophobicity and autoaggregation ability of bifidobacteria exhibited positive correlation to the adhesion ability. Glycoprotein might exist on the surface of bifidobacterial cells which could mediate the adhesion ability of bifidobacteria.

Keywords: bifidobacteria; adhesion; hydrophobicity; autoaggregation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2008AA10Z335) and the Innovation Group Program from Northeast Agricultural University (CXT007-2-2)

* Corresponding author. Tel: +86-451-55191813; E-mail: xchmeng@163.com

Received: 25 November 2009/ Revised: 18 February 2010