

<원 저>

오리로부터 분리한 *Lactobacillus salivarius* JWS 58과 *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 균주의 면역활성효과

최현종¹ · 김지예¹ · 신명수^{1,3} · 이상명² · 이완규^{1,*}

¹충북대학교 수의과대학, ²전북대학교 환경생명자원대학 생명공학부

³오비티 생명공학연구소

(접수: 2011년 10월 10일, 수정: 2011년 12월 01일, 게재승인: 2011년 12월 02일)

Immuno-enhancing Effects of *Lactobacillus salivarius* JWS 58 and *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 isolated from duck

Hyun Jong Choi¹, Ji Ye Kim¹, Myeong Su Shin^{1,3}, Sang Myeong Lee², Wan Kyu Lee^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Division of Biotechnology, College of Environmental & Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan 561-756, Korea

³Korea Bio Science Research Institute of Organic Bio Tech Co. Ltd., Jincheon 365-861, Korea

(Received: October 10, 2011; Revised: December 01, 2011; Accepted: December 02, 2011)

Abstract : *Lactobacillus salivarius* JWS 58 (JWS 58) and *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 (JWS 1354) are isolated from duck intestine and have ability to produce bacteriocin. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of JWS 58 and JWS 1354. The nitric oxide (NO) and cytokines (IL-1 β and TNF- α) were measured in C57BL/6 mouse peritoneal macrophages to determine immune enhancing effects of JWS 58 and JWS 1354. A *Listeria (L.) monocytogenes* challenge mice model was used to evaluate immune enhancement ability of JWS 58 and JWS 1354 *in vivo*. The results showed that JWS 58 and JWS 1354 increased the production of NO or cytokines by peritoneal macrophages and that oral administration of viable probiotic strains in mice elicited the immuno-modulatory effect upon *L. monocytogenes* challenge. JWS 1354 showed stronger immune enhancing effects than JWS 58. Collectively, this study demonstrated that *Lactobacillus* strain JWS 58 and JWS 1354 possess immune enhancing effect. Furthermore, two stains are expected to use feed supplement to prevent diseases by pathogenic bacteria through releasing bacteriocin and enhancing host immune responses in animal.

Keywords : bacteriocin(s), immune response, lactic acid bacteria, *Listeria*, macrophage(s)

서 론

*Lactobacillus*는 그람 양성 간균 형태의 비 병원성 유산균으로 사람이나 동물의 장내에 정상적으로 서식하고 있으며 숙주의 면역반응을 유도하여 macrophage와 같은 면역세포를 활성화시켜 숙주의 면역력을 증가시켜 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 *Lactobacillus*는 다양한 감염성 질병 예방목적으로 사람이나 가축의 식품이나 사

료첨가제 또는 치료제로 널리 사용 되고 있다 [5, 21, 25].

Macrophage는 monocyte로부터 분화된 세포로 숙주의 면역반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 미생물이나 lipopolysaccharide(LPS), lymphokines, interferon과 같은 다양한 물질에 의해 활성화되어, nitric oxide(NO)나 interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)같은 염증성 cytokine을 분비하여 숙주의 면역을 조절하는 역할을 한다 [11, 12, 22, 28]. NO는 L-arginine으로부터

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2960, Fax: +82-43-267-3150

E-mail: wklee@cju.ac.kr

nitric oxide synthetase 효소에 의해 생성되는 물질로서 단시간 존재하는 반응 중간산물이지만, 미생물이나 암 세포의 사멸 또는 성장을 저해하는 역할을 한다 [13, 24]. IL-1 β 는 염증을 유도하는 cytokine으로 알려져 있으며 숙주 세포의 증식, 분화, 소멸 등과 같은 다양한 세포 반응을 유도하며 다른 cytokine과 chemokine의 분비를 유도해 면역 연쇄반응을 촉발시키기도 한다 [3, 8]. TNF- α 는 숙주의 면역 체계 내에서 광범위한 영향을 미치는데, 염증과정을 조정하거나 intracellular pathogen을 억제하여 숙주가 감염성 질병에 대한 저항성을 갖도록 한다 [2].

박테리옌(Bacteriocin)은 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질 또는 펩타이드계 물질로써 표적 미생물의 세포막 합성을 저해하는 능력을 가지고 있다. 특히 유산균이 생산하는 박테리옌은 *Listeria(L.) monocytogenes*나 *Clostridium perfringens*와 같은 병원성 미생물에 효과가 있는 것으로 알려지면서 박테리옌 생성능을 가진 유산균은 항생제 대체물질로 많은 연구가 되고 있다 [1, 7, 16].

오리의 장관에서 분리된 유산균주 *Lactobacillus salivarius* JWS 58(JWS 58)과 *Lactobacillus plantarum* JWS 1354(JWS 1354)는 병원성 미생물에 대하여 항균 효과를 나타내는 박테리옌을 생성하는 것으로 보고되었다 [23]. 또한 유산균주에 의해 생성된 박테리옌이 병원성 미생물에 대해 항균능력을 가지고 있는 것 또한 확인 하였다 [23]. 두 균주가 생산하는 박테리옌은 공통적으로 *L. monocytogenes*에 강력한 항균효과를 가지고 있었으며, 그 외에도 JWS 58은 *Streptococcus mutans*에 항균력을, JWS 1354은 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*에 대해 항균효과를 나타내었다 [23].

본 연구에서는 박테리옌 생성능력이 검증된 JWS 58 균주와 JWS 1354균주가 가진 면역 조절 능력을 평가하기 위해 *in vitro* 상에서 C57BL/6 마우스 peritoneal macrophage의 유산균에 의한 활성 효과를 NO와 cytokine 측정을 통해 실시하였으며, *in vivo* 상에서는 마우스 *L. monocytogenes* 감염 실험을 통해 병원성 미생물에 대한 두 유산균주의 방어효과를 검증하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

미생물 배양

JWS 58균주와 JWS 1354균주는 MRS broth(BD, USA)에 37°C에서 24시간 배양한 후, MRS plate를 이용하여 균 수를 측정 하였다. 또한, 배양액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 간 원심 분리하여 상층액은 버리고 균체만을 0.01 M 멸균 phosphate buffered saline(PBS; pH 7.2)

에 두 번 세척한 후, 110°C에서 15분 간 열처리로 유산균을 사멸시킨 후 -20°C에 저장하였다. *In vitro* 실험 시, 유산균을 5×10^8 과 1×10^8 colony forming units(CFU)/mL로 희석하여 사용하였다. *In vivo* 실험의 경우에는 살아있는 유산균 1×10^9 CFU를 100 μ L의 10% skim milk가 함유된 PBS에 현탁하여 2주간 매일 경구투여 하였다.

L. monocytogenes BA00092는 농림수산물검역검사본부로부터 분양 받은 야생 균주로 BHI broth(BD, USA)에 37°C에서 12시간 배양한 후 BHI plate에서 균수를 측정 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분 간 원심 분리하여 균체만 PBS로 두 번 세척한 후 2×10^6 CFU/mL로 희석 하였다.

마우스로부터 peritoneal macrophage 분리

마우스 peritoneal macrophage는 Zhang 등 [29]의 방법에 따라 분리하였다. C57BL/6 마우스(Nara Biotech, Korea)의 복강에 3 mL의 Brewer thioglycollate medium (Sigma, USA)을 복강내로 주사하고 4-5일 경과 후, CO₂로 안락사한 마우스의 복강에 5 mL PBS를 주사하여 복강을 세척하여 복수를 채취하였다. 그 후 4°C, 1,500 rpm에서 8분 간 원심 분리하여 cell pellet을 모은 후, PBS로 2회 세척 하고, hemocytometer로 세포의 활력과 세포 수를 측정하였다. 10%(v/v) FBS(Invitrogen, USA)와 100 mg/mL streptomycin과 100 U/mL penicillin(Invitrogen, USA)이 첨가된 RPMI 1640(Sigma, USA)배지에 macrophage를 1×10^6 cells/mL으로 희석하였다.

Peritoneal macrophages 활성화

Peritoneal macrophages를 12-well tissue culture plate (BD, USA)에 5×10^5 cells/well씩 분주한 후, 유산균을 5×10^7 CFU/mL과 1×10^7 CFU/mL씩 첨가하여 macrophage 당 균체 수가 20 또는 100 CFU/macrophage가 되게 하였다. Control로 사용할 well에는 유산균 대신 PBS를 첨가하였다. Negative control well에는 유산균을 제외하고 PBS만을 첨가하였으며, positive control well에는 PBS와 함께 LPS(Sigma, USA)를 100 또는 500 ng/mL씩 첨가하였다. LPS는 TLR4(toll-like receptor 4)에 결합하여 macrophages를 활성화시키는 것으로 알려져 있어 유산균에 의한 macrophages 활성화 정도를 평가하기 위해 사용되었다 [15]. 모든 시험은 3반복씩 수행하였다. 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후, 상층액만을 모아 NO와 cytokine(IL-1 β , TNF- α)의 농도를 측정 하였다 [12, 25].

NO 측정

NO의 농도는 Griess reagent(Promega, USA)를 이용하

여 측정하였다. 50 μ L의 macrophage 배양액 또는 nitrite standard(0~100 μ M sodium nitrite)에 1% sulfanilamide가 함유된 5% phosphoric acid 50 μ L와 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 μ L를 섞고 실온의 암실에서 10분간 방치한 후, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도 값을 standard 표준곡선을 이용하여 NO의 농도를 계산하였다. 모든 샘플과 standard는 3반복씩 실시하였다 [19].

Cytokines 측정

IL-1 β 와 TNF- α 의 농도는 ELISA set(BD, USA)를 이용하여 측정하였다. 450 nm에서 측정한 흡광도 값을 standard (0~2,000 pg/mL, IL-1 β ; 0~1,000 pg/mL, TNF- α) 표준곡선을 이용하여 계산하였다. 모든 샘플과 standard는 3반복씩 실시하였다.

L. monocytogenes challenge 시험

마우스에 대한 *L. monocytogenes*의 감염 시험은 normal control(NC), positive control(PC), JWS 58투여군 그리고 JWS 1354투여군으로 총 4개의 군으로 나누어 실시하였으며, 각 군 별 7마리, 총 28마리의 마우스를 사용하였다. 7~9 주령의 암컷 BALB/c 마우스(Nara Biotech, Korea)에게 1×10^9 CFU의 JWS 58 또는 JWS 1354균주 100 μ L를 2주간 매일 경구투여 하였다. NC와 PC에는 10% skim milk가 함유된 PBS 100 μ L만을 경구투여 하였다. 2주 후에 JWS 58투여군, JWS 1354투여군 그리고 PC군의 마우스에 *L. monocytogenes* 치사량인 1.2×10^5 CFU를 100 μ L PBS에 현탁하여 미정맥을 통해 인공감염 시켰다. NC의 마우스에는 100 μ L PBS만을 주사하였다 [6, 17]. *L. monocytogenes* 감염 3일 후, 마우스의 체중을 측정하고 안락사 시킨 후, 복대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 수집하였다. 무균적으로 간과 비장을 적출하여 무게를 측정 후, 간은 70 μ m nylon mesh(Fisher Scientific Inc., USA)로 균질화하여 PBS로 단계 희석하고 BHI plate에 접종하여, 간 내 *L. monocytogenes*의 균수를 측정하였다. 결과는 log 지수로 나타내었다. 마우스 혈청으로는 NO와 cytokine(IL-1 β , TNF- α)을 측정하였다 [20]. 모든 동물실험은 충북대학교 동물실험 윤리위원회의 규정을 준수하며 실시하였다.

통계 처리

통계 처리는 SPSS(Windows ver. 12.0; SPSS, USA)를 이용하였으며 그룹간의 유의성 검정은 ANOVA와 Tukey's multiple range test로 실시하였다($p < 0.05$).

결 과

유산균의 *in vitro* 상에서의 peritoneal macrophages 활성 효과

열처리하여 사멸시킨 유산균에 의한 *in vitro* 상에서의 마우스 peritoneal macrophage의 NO 생성량의 경우 JWS 58균주를 5×10^7 CFU/mL과 1×10^7 CFU/mL의 농도로 처리한 macrophage는 두 농도 모두에서 PBS만을 첨가한 군($0.79 \pm 0.07 \mu$ M/mL)에 비해 NO 생성이 유의적으로 증가되지 않았다. 하지만 JWS 1354균주를 첨가한 macrophage의 NO 생성량은 $11.44 \pm 0.28 \mu$ M/mL (1×10^7 CFU/mL, 저농도 처리군)과 $13.49 \pm 0.34 \mu$ M/mL (5×10^7 CFU/mL, 고농도 처리군)로 두 농도 모두 LPS 500 ng/mL을 첨가한 control($7.21 \pm 2.76 \mu$ M/mL) 및 PBS만 처리한 control과 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 1A).

IL-1 β 의 생성량은 유산균 농도에 따른 증가를 보였는데, 두 균주 모두 PBS를 첨가한 macrophage 보다 증가하였으나 JWS 58균주를 첨가한 macrophage의 증가량이 훨씬 많았다. JWS 1354균주 저농도 처리군의 IL-1 β 322.55 ± 3.20 pg/mL로 PBS 처리군(15.00 ± 2.11 pg/mL) 보다는 증가했으며, JWS 1354균주 고농도 처리군과 JWS 58균주 저농도 및 고농도 처리군은 LPS 100 ng/mL 처리군(434.82 ± 14.03 pg/mL)보다 많은 양의 IL-1 β 를 생산하였다. 가장 높은 증가량을 보인 것은 JWS 58균주 고농도 처리군($1,525.91 \pm 10.00$ pg/mL)이었다(Fig. 1B).

TNF- α 는 IL-1 β 와 유사한 경향을 보였으나 유산균에 의한 생성량 증가 효과가 크지 않았다. 두 균주 모두 농도에 따른 증가를 보이기엔 하였지만 JWS 1354균주의 경우 두 농도 모두 PBS 처리군(140.33 ± 1.84 pg/mL)과 유의성을 보이지 않았고 JWS 58균주의 경우 저농도 처리군은 LPS 100 ng/mL 처리군과 유사한 TNF- α 생성량을 나타내었다. JWS 58균주 고농도 처리군(592.39 ± 75.17 pg/mL)이 가장 많은 TNF- α 생산량을 보였으나, 이 또한 LPS 500 ng/mL 처리군($2,767.11 \pm 67.12$ pg/mL) 보다는 적었다(Fig. 1C).

마우스 *L. monocytogenes* 감염 모델에서의 면역증강 효과

JWS 58균주와 JWS 1354균주가 *in vitro* 상에서 보여준 면역조절능력이 *in vivo* 상에서도 증명되는지 알아보기 위하여 마우스에 2주간 유산균을 투여한 뒤 *L. monocytogenes*를 감염시켜 유산균에 의한 숙주의 감염에 대한 저항성 증가 여부를 관찰하였다. 마우스의 체중의 경우, 2주간의 유산균 투여 후 *L. monocytogenes* 감염전 측정 결과, 모든 군간에 통계학적 유의성을 발견되

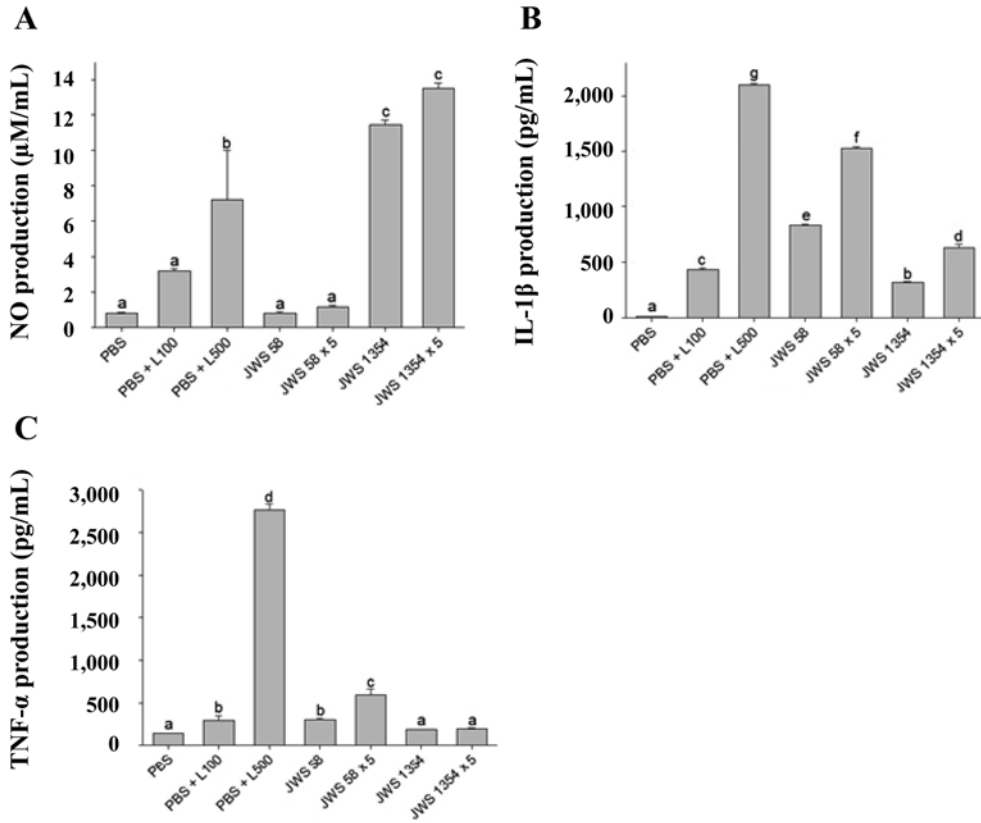


Fig. 1. Nitric oxide (NO) (A), IL-1β (B) and TNF-α (C) production by murine peritoneal macrophages induced by two concentrations of heat-killed *Lactobacillus salivarius* JWS 58 (JWS 58) and *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 (JWS 1354). Murine peritoneal macrophages (5×10^5 cells/mL) were stimulated with probiotics or PBS for 24 h. Density of JWS 58 and JWS 1354 were 1×10^7 colony forming units (CFU)/mL, respectively. JWS 58 and JWS 1354 $\times 5 = 5 \times 10^7$ CFU/mL. “L100” or “L500” mean LPS at 100 ng/mL or 500 ng/mL. Data are mean \pm SD of triplicate. Different superscript letters indicate the statistical differences as determined by ANOVA ($p < 0.05$).

Table 1. Effect of *Lactobacillus salivarius* JWS 58 and *Lactobacillus plantarum* JWS 1354 on the body weight and relative liver and spleen weights of mice 3 days after *Listeria (L.) monocytogenes* challenge

Group	Body weight (g)	Liver/BW (g/kg)	Spleen/BW (g/kg)
NC	18.38 \pm 0.27 ^a	46.99 \pm 1.53 ^a	5.47 \pm 0.08 ^a
PC	15.31 \pm 0.26 ^b	60.98 \pm 2.67 ^b	7.35 \pm 0.48 ^b
JWS 58	14.08 \pm 0.24 ^b	70.40 \pm 0.82 ^{bc}	6.22 \pm 0.37 ^{ab}
JWS 1354	14.63 \pm 0.46 ^b	76.01 \pm 0.67 ^c	6.08 \pm 0.28 ^{ab}

^{a,b,c}The statistical differences determined by ANOVA ($p < 0.05$). NC: normal control (no probiotics-feeding and no infection with *L. monocytogenes*), PC: positive control (no probiotics-feeding and infection with *L. monocytogenes*), JWS 58: *Lactobacillus salivarius* JWS 58-fed and infected with *L. monocytogenes* group, JWS 1354: *Lactobacillus plantarum* JWS 1354-fed and infected with *L. monocytogenes* group. All data represent the mean \pm SE of seven mice in each group.

지 않았으나, 감염 3일 후 측정된 체중에서 *L. monocytogenes* 감염 시킨 유산균 투여군과 PC군의 마우스 체중이 감염 시키지 않은 NC군에 비해 유의성 있게

감소된 것으로 나타났다(Table 1). 체중 당 간장의 무게 또한 감염으로 인해 증가되었는데, 유산균 투여군의 증가 폭이 PC군에 비해 더 컸다. 반면 체중 당 비장 무게

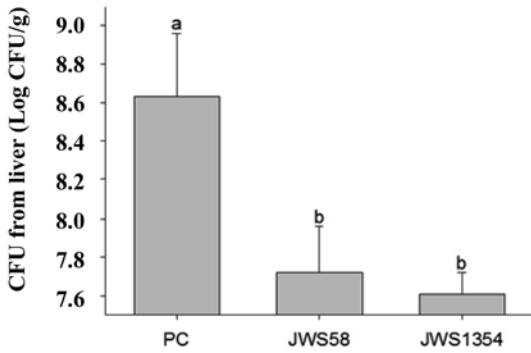


Fig. 2. Viable cells of *Listeria (L.) monocytogenes* in liver of BALB/c mice in the *L. monocytogenes* challenge model. Data represent the log data of mean \pm SE of seven mice in each group. PC: Positive Control group (no probiotics-feeding and infection with *L. monocytogenes*), JWS 58: *Lactobacillus salivarius* JWS 58-fed and infected with *L. monocytogenes* group, JWS 1354: *Lactobacillus plantarum* JWS 1354-fed and infected with *L. monocytogenes* group. ^{a,b}The statistical differences as determined by ANOVA ($p < 0.05$).

는 유산균 투여군의 증가 폭이 PC군에 비해 작아 PC군이 NC군에 비해 가장 무게가 유의적으로 증가 되는데 비해 유산균 투여군은 NC군과의 통계학적 유의성이 관찰 되지 않았다.

간장 내 *L. monocytogenes* 수에서도 유산균 투여군이 PC군에 비해 유의적으로 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 2). PC군의 간 내 평균 *L. monocytogenes* 수는 4.3×10^8 CFU/g 이었으나 JWS 58군주를 투여한 마우스의 간 내 *L. monocytogenes* 수는 평균 5.2×10^7 CFU/g, JWS 1354군주는 4.1×10^7 CFU/g로 각각 88% 와 90.5% 의 감소율을 보였다.

마우스 혈청 내 cytokine 수치 또한 유산균 투여군에서 증가되는 경향을 나타내었다(Figs. 3B and C). 특히 JWS 1354투여군의 cytokine 수치가 많이 증가된 것을 볼 수 있었다. IL-1 β 의 경우 JWS 1354투여군이 $1,123.34 \pm 397.19$ pg/mL로 다른 군과의 유의성을 보였으나 JWS 58투여군은 392.90 ± 134.81 pg/mL로 NC군 및 PC군과의 통계적 유의성이 없었다. TNF- α 의 경우 JWS 58투여군에서 NC군이나 PC군에 비해 증가되기는 하였지만, JWS 1354투여군처럼 통계적 유의성을 나타내지는 못하였다.

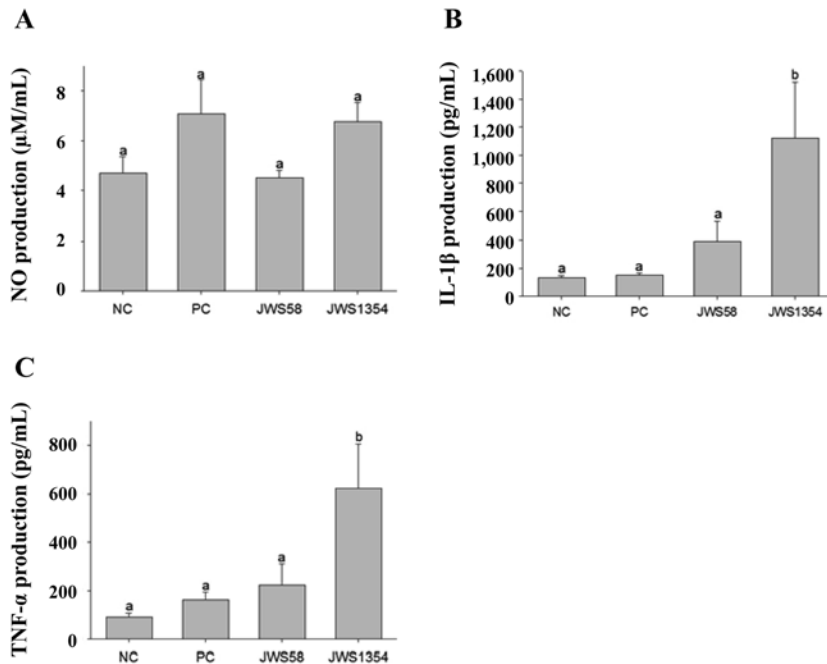


Fig. 3. Nitric oxide (A), IL-1 β (B) and TNF- α (C) production in BALB/c mice sera in the *L. monocytogenes* challenge model. NC: normal control group (no probiotics-feeding and no infection with *L. monocytogenes*), PC: positive control group (no probiotics-feeding and infection with *L. monocytogenes*), JWS 58: *Lactobacillus salivarius* JWS 58-fed and infected with *L. monocytogenes* group, JWS 1354: *Lactobacillus plantarum* JWS 1354-fed and infected with *L. monocytogenes* group. ^{a,b}The statistical differences as determined by ANOVA ($p < 0.05$).

Cytokine과는 다르게 혈청 내 NO양에 있어서는 4군 모두 유의성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 3A).

고 찰

오리로부터 분리한 유산균 JWS 58균주와 JWS 1354균주의 macrophage에 대한 활성화효과를 NO와 cytokine을 통해 측정해 본 결과, 두 균주 모두 macrophage를 활성화 시켰다. 특히, JWS 1354균주는 NO를, JWS 58균주는 cytokine의 생성을 자극하는 것으로 나타났다. Macrophage를 활성화시키는 실험에는 열처리로 사멸시킨 유산균을 이용하였는데, 그 이유는 유산균의 증식으로 인해 배지가 산성화되면서 macrophage가 죽는 현상을 방지하기 위해서였다. 열처리로 사멸시킨 유산균도 macrophage를 활성화시켜 cytokine의 생산을 증가시킨다는 연구 보고가 발표되었다 [10, 18].

이 결과를 토대로 *in vivo* 상에서 마우스의 *L. monocytogenes* 감염 모델로 유산균 투여 시 면역 활성을 통한 숙주의 저항성 증가 여부를 확인하여 보는 실험을 실시하였다. *L. monocytogenes*는 사람에게 식중독을 유발하는 병원성 균으로, 세균 감염에 대한 숙주의 면역반응을 연구하는 실험 모델에 널리 사용되고 있으며, 유산균의 경구 투여로 감염성 질병을 예방할 수 있다는 연구들이 다수 보고되고 있다 [4, 14]. 마우스에 *Lactobacillus rhamnosus* 또는 *Lactobacillus casei*의 경구 투여가 *Salmonella typhimurium* 또는 *L. monocytogenes*의 감염으로부터 숙주의 저항성을 증가시켜 준다는 보고가 있다 [6, 17].

In vivo 실험 결과, 혈청 내 cytokine(IL-1 β , TNF- α) 수치가 유산균 투여군의 마우스에서 비 투여군(PC군과 PC군)에 비해 월등하게 증가된 것을 볼 수 있었다. 특히 JWS 1354투여군의 cytokine 농도 증가가 현저하였다. 이러한 cytokine의 증가는 면역체계의 균형을 유지시켜 주고, 감염에 대한 저항성을 증가 시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [19]. 그 결과, 유산균 투여가 간 내의 *L. monocytogenes*의 수를 크게 감소시킨 것으로 판단되었다. 또한 유산균 투여군은 *L. monocytogenes* 감염으로 인한 마우스 체중당 비장의 무게 증가가 PC군에 비해 크지 않았는데, 이것은 아마도 유산균에 의한 숙주의 면역 활성화로 인한 보호 효과로 추측된다. Puertollano 등 [20] 또한 *Lactobacillus plantarum* 투여로 *L. monocytogenes* 감염 마우스에서 비장의 무게가 정상 수준으로 감소 되었으며, 생존율이 증가하였다는 연구 결과를 발표한 바가 있다. 반면에 유산균 투여군의 간장의 무게는 비투여군에 비해 증가되는 경향을 보였는데, 이것은 *L. monocytogenes* 감염으로 인한 영향이라기 보다는 유산

균 투여로 인한 영향으로 생각된다. Puertollano 등 [20]의 *L. monocytogenes* 감염 실험 결과, 비록 우리의 결과처럼 균간의 유의성을 보이지는 않았으나 감염 후 2-4일 사이에 유산균 투여군에서 간장의 무게가 비투여군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있었다. 또한 Tsai 등 [27]은 랫드에서 유산균을 경구 투여한 경우, 다른 장기에는 아무 이상이 없었으나, 오직 암컷의 간장 무게만이 증가된 것을 보고한 적이 있다. 우리의 실험결과 또한 이와 유사해 보인다. 감염 후 3일차에 측정된 체중에서는 비감염군에 비해 *L. monocytogenes* 감염군에서만 체중 손실을 보였는데, 이는 *L. monocytogenes* 감염으로 인한 패혈증 때문으로 보여진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, JWS 58균주와 JWS 1354균주는 마우스의 macrophage를 활성화 시켜 NO 및 cytokine의 분비를 증가 시키는 능력을 가지고 있다. 또한 이와 같은 효과로 macrophage 및 숙주의 면역 체계가 활성화 되어 체내에 존재하는 *L. monocytogenes* 수를 감소, 마우스를 감염으로부터 보호하는 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

동일 속의 다른 2종 이상의 미생물로 이루어진 복합 생균제가 단일 미생물로만 이루어진 생균제에 비해 숙주의 성장률과 폐사율을 감소시킨다는 보고가 발표되고 있다 [9, 26]. 또한 사료 내 박테리오신의 첨가는 해당 가축의 면역반응을 증가시켜 주는 효과가 있다는 보고도 있다 [7]. 이와 같은 학문적 배경에서 볼 때, JWS 58균주와 JWS 1354균주는 오리에서 분리한 비 병원성의 유산균주로서 박테리오신을 생산하는 능력과 면역 활성화효과를 동시에 가지고 있으므로 두 균주를 혼합하여 동물 사료첨가용 복합 생균제로 개발한다면 항생제 대체제로서 산업적 활용가치가 높을 것으로 기대된다. 이를 위해서는 JWS 58와 JWS 1354 두 균주의 마우스에서 나타난 면역 활성화효과가 생균제를 사용하고자 하는 동물에서의 재현성 여부와 사용 동물의 안전성 검증에 대한 연구가 추가로 행해져야 할 것이다.

결 론

박테리오신을 생산하는 JWS 58균주와 JWS 1354균주의 면역 활성화효과를 확인하기 위하여 마우스 macrophage에서 NO와 cytokine 생산량 측정을 통한 *in vitro* 실험을 실시하였다. 이를 토대로 마우스 *L. monocytogenes* challenge model의 혈청 내 NO와 cytokine 수치 측정, 체중 당 간장과 비장의 무게 측정, 간 내 *L. monocytogenes*균 수 측정 등을 이용한 *in vivo* 실험을 실시하였다. 그 결과 두 균주에 의한 우수한 면역 활성화 효과를 관찰할 수 있었으며 또한 *L. monocytogenes* 감염

에서 숙주를 보호하는 능력을 가진 것으로 확인되었다. 두 유산균주 중에서 JWS 1354균주의 면역 활성화효과가 더 높았지만 두 균주를 혼합하여 동물 사료 첨가용 복합 생균제로 개발할 경우, 산업적 활용가치가 더욱 높을 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 2010년 중소기업청의 기술혁신개발사업으로 수행된 연구 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. **Chanos P, Williams DR.** Anti-*Listeria* bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. *J Appl Microbiol* 2011, **110**, 757-768.
2. **Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H.** Tumour necrosis factor receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol* 2001, **31**, 763-769.
3. **Dinarello CA.** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, **87**, 2095-2147.
4. **Edelson BT, Unanue ER.** Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* 2000, **12**, 425-431.
5. **Fuller R.** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989, **66**, 365-378.
6. **Gill HS, Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, Cross ML.** Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med Microbiol Immunol* 2001, **190**, 97-104.
7. **Grilli E, Messina MR, Catelli E, Morlacchini M, Piva A.** Pediocin A improves growth performance of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *Poult Sci* 2009, **88**, 2152-2158.
8. **Introna M, Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Dejana E, Mantovani A.** IL-1 β inducible genes in human umbilical vein endothelial cells. *Eur Heart J* 1993, **14** (Suppl K), 78-81.
9. **Kosin B, Rakshit SK.** Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technol Biotechnol* 2006, **44**, 371-379.
10. **Lin WH, Yu B, Lin CK, Hwang WZ, Tsen HY.** Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion to mice. *J Appl Microbiol* 2007, **102**, 22-31.
11. **Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW.** Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1993, **268**, 1908-1913.
12. **Marin ML, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ.** Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with *bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 1997, **80**, 2713-2720.
13. **Marletta MA.** Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993, **268**, 12231-12234.
14. **Milon G.** *Listeria monocytogenes* in laboratory mice: a model of short-term infectious and pathogenic processes controllable by regulated protective immune responses. *Immunol Rev* 1997, **158**, 37-46.
15. **Moon EY, Lee YS, Choi WS, Lee MH.** Toll-like receptor 4-mediated cAMP production up-regulates B-cell activating factor expression in RAW264.7 macrophages. *Exp Cell Res* 2011, **317**, 2447-2455.
16. **Nes IF, Diep DB, Holo H.** Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* 2007, **189**, 1189-1198.
17. **Nomoto K, Miake S, Hashimoto S, Yokokura T, Mutai M, Yoshikai Y, Nomoto K.** Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by *Lactobacillus casei*. *J Clin Lab Immunol* 1985, **17**, 91-97.
18. **Nonaka Y, Izumo T, Izumi F, Maekawa T, Shibata H, Nakano A, Kishi A, Akatani K, Kiso Y.** Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int Arch Allergy Immunol* 2008, **145**, 249-257.
19. **Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ.** Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 1999, **46**, 231-241.
20. **Puertollano E, Puertollano MA, Cruz-Chamorro L, Alvarez de Cienfuegos G, Ruiz-Bravo A, de Pablo MA.** Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice. *Br J Nutr* 2008, **99**, 819-825.

21. **Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 2000, **84**, 197-215.
22. **Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA, Gray PW.** Monoclonal antibodies to murine γ -interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J Immunol* 1985, **134**, 1609-1618.
23. **Shin MS, Han SK, Ji AR, Ham MR, Kim KS, Lee WK.** Isolation and characteristics of bacteriocin-producing bacteria from the intestine of duck for probiotics. *J Anim Sci Technol* 2007, **49**, 621-632.
24. **Snyder SH, Brecht DS.** Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992, **266**, 68-71, 74-77.
25. **Tejada-Simon MV, Pestka JJ.** Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 1999, **62**, 1435-1444.
26. **Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC.** Monostrain, multistain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 2004, **96**, 219-233.
27. **Tsai CC, Liu TH, Chen MH, Tsai CC, Tsen HY.** Toxicity evaluation for an *Enterococcus faecium* strain TM39 in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 2004, **42**, 1601-1609.
28. **van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL.** The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972, **46**, 845-852.
29. **Zhang X, Goncalves R, Mosser DM.** The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2008, **Chapter 14**, Unit 14.1.