

## 닭의 맹장으로부터 분리한 *Lactobacillus sakei* L2와 L8의 특성 및 면역활성

심인숙<sup>1</sup>, 박근태<sup>1,2</sup>, 임영희<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 보건과학대학 의생명융합학과

<sup>2</sup>(주)미래자원ML 신소재연구소

<sup>3</sup>고려대학교 보건과학대학 보건과학과(Brain Korea 21 PLUS program)

<sup>4</sup>고려대학교 구로병원 진단검사의학과

Received: December 29, 2015 / Revised: April 21, 2016 / Accepted: May 10, 2016

### Characterization and Immunomodulation Activity of *Lactobacillus sakei* L2 and L8 Isolated from Chicken Cecum

Insuk Sim<sup>1</sup>, Keun-Tae Park<sup>1,2</sup>, and Young-Hee Lim<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Biomedical and Life Sciences, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Research and Development Center, Milae Resources ML Co. Ltd., Seoul 05542, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Public Health Science (BK21 PLUS Program), Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine, Korea University Guro Hospital, Seoul 08308, Republic of Korea

The aim of this study was to investigate the potential of lactic acid bacteria (LAB) strains as probiotics. Two strains were isolated from healthy chicken cecum and their acid and bile tolerance, residual organic acids, antibacterial activity against pathogenic bacteria, and immunomodulation activity were measured. Identification of the isolated strains was performed using the API 50CHL system and phylogenetic analysis using 16S rDNA sequencing. The isolates were determined to be *Lactobacillus sakei* strains. The acid tolerance of strains L2 and L8 was high enough that 75% of the inoculum survived in pH 2 for 2 h. The bile tolerance of both strains was observed at a 1% Oxgall concentration in MRS broth. The production of organic acids (lactic acid and acetic acid) and pH changes during growth were monitored and the maximum concentrations were obtained after 48 h of incubation. Culture supernatants of the two LAB strains showed strong antibacterial activity against pathogenic bacteria. The heat-killed LAB cells also induced high levels of immune cell proliferation compared with the control, and stimulated IL-6 and TNF- $\alpha$  production in mouse macrophages. Therefore, *L. sakei* strains L2 and L8 can be considered suitable probiotic bacteria.

**Keywords:** Immunomodulation activity, *Lactobacillus sakei*, antibacterial activity

## 서 론

유산균(Lactic acid bacteria)은 사람과 동물의 장관, 토양, 각종 발효식품 등 자연계에 널리 분포하고 있으며 대사산물로 항균물질(bacteriocin)과 다량의 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid)을 생성하여 생균제로 이용 시 장내 미생물의 균형을 유지할 통해 대사성 질병을 예방하고, 건강에 도움을

주는 것으로 알려져 있다[6]. 또한, 유산균은 면역세포의 증식을 촉진하여 장내 유해세균이나 외부물질을 선택적으로 제거시키고, 각종 면역관련 단백질과 효소의 분비를 촉진하여 면역증강 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 사이토카인(Cytokine)의 분비를 촉진하여 체내면역현상을 조절하며, 염증반응, 조혈기구계 등에도 관여하여 인체의 면역계를 조절하는 중요한 역할을 한다[26].

*Lactobacillus*는 *Bifidobacterium*과 함께 가장 많이 이용되고 있는 생균제로서 장내미생물 균형에 도움을 주고 항균활성과 효소활성을 가지면서 숙주에 유용한 각종 대사산물을 생산함으로써 숙주의 건강증진을 증대시키는 효과를 보

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-916-5943, Fax: +82-2-3290-5635

E-mail: yhlim@korea.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

이는 미생물을 말하며[7], 생균제로서 효과가 있기 위해서는 경구로 섭취하여 장까지 도달하고, 숙주의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성을 지녀야 한다. 따라서 생균제제는 기본적으로 장내환경(산, 효소, 담즙)에 대한 내성과 우수한 기능성(항미생물제 생성능, 면역력 증진능, 병원성 세균증식 억제능, 정착성)을 지녀야 한다.

대식세포(macrophage)는 대표적인 자연면역세포로서, 체내에 침투한 바이러스나 외부물질에 대한 탐식작용을 하며, 여러 작용 인자를 발생시켜서 체내의 다른 면역기관들을 자극시키는 역할을 하는 중요한 1차 면역세포이다. 또한 대식세포는 항원을 가공하여 일부를 자신의 표면에 부착, 제시함으로써 T 림프구를 유도하고 후천성 면역계를 작동할 수 있도록 해주는 effector cell로서의 기능을 수행한다[17]. 이러한 대식세포의 활성능을 측정하면 면역활성의 지표로 삼을 수 있다. 사이토카인(Cytokine)은 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 당단백질로 선천적 면역(innate immunity) 및 후천적 면역(adaptive immunity) 모두에서 면역체계의 중심역할을 하고, 특정 사이토카인은 면역, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발현 및 성장, 항체의 생성을 유도하고 외부의 침입에 대해서 인체의 방어체계를 제어하고 자극한다. 대식세포에서 발생하는 항염증성 cytokine은 IL-1, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )가 있으며, 특히 IL-6과 TNF- $\alpha$ 는 면역기능의 중요한 척도가 된다. Renshaw는 대식세포로부터 분비되는 IL-6과 TNF- $\alpha$ 의 양이 감소되면 면역기능의 현격한 저하를 나타내는 것으로 보았다[20].

Kim [12]은 가금의 맹장에서 선발된 *Lactobacillus*는 다른 유산균과 *Bacillus*에 비하여 효소분비성과 amylase, lipase 활성이 우수하다고 보고하였으며, Chesson [24]과 Barrow [3]는 돼지의 소화기관에서 채취한 유산균만 돼지의 공장 상피세포에 부착하는 능력이 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 건강한 닭의 맹장에서 유래한 유산균(Lactic Acid Bacteria)을 분리하여 가금류 병원성의 주 원인균인 *Salmonella*를 비롯하여 병원성 내성균들(Antibiotic-Resistant Bacteria)에 대한 항균 효과를 측정하고 이를 생균제로 이용하기 위해 기본적인 장내환경에 대한 내성과 기능성에 대해 시험하였다.

## 재료 및 방법

### 세균의 분리

유산균의 분리를 위해 건강한 닭의 맹장에서 1g 정도의 내용물을 10g에 멸균수를 가한 후 섞어주고, 희석액 1ml를 취해  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  배율로 단계별 희석하였다. 각 희석액을 0.1 ml씩 취하여 MRS (Difco, USA) 한천고체배지에 도

말 후 혐기적 조건에서, 37°C에서 48시간 배양하여 각각의 배지에서 colony를 채취하였다.

### 분리세균의 동정

분리된 세균의 동정을 위해 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 형태학적인 특성은 그람염색 후 현미경으로 관찰하였으며, 생리적, 생화학적 특성 조사는 API 50 CHL 키트(biomereux, France)를 이용하여 37°C에서 48시간 배양 후 실시하였다. 분리된 균주의 염기서열분석을 위해 16S rDNA sequencing을 실시하였다. 균주의 genomic DNA는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 추출하였고, forward primer는 EGE1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), reverse primer는 EGE2 (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')를 이용하여 증폭하였다. PCR 수행조건은 denaturation (94°C, 60초), annealing (56°C, 60초), elongation (72°C, 60초) 단계를 40회 반복한 후, 72°C에서 10분간 유지하였다. PCR 결과물은 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA)와 PRISM 3730XL analyser (Applied Biosystems)를 통해 분석되었으며, Genbank의 database에 등록된 다른 균들과 상동성을 비교, 분석하였다.

### 내산성, 인공위액 내성과 내담즙성 시험

내산성 측정은 시험균주를 MRS 배지에서 37°C 48시간 배양한 후, 3M 염산으로 pH 2, 3으로 조정된 새로운 액체배지에  $1 \times 10^7$  CFU/ml가 되도록 희석하였다. 37°C에서 3시간 배양 후 소듐 인산염 완충액(sodium phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.2)으로 균체를 연속적으로 희석시키고 MRS 평판배지 상에서 생균수를 측정하였다. 인공위액 내성 검사는 1% (w/v) pepsin이 포함된 pH 2, 3으로 조정된 MRS 배지를 이용하여 시험하였다.

내담즙성 검사는 MRS 배지에서 37°C 48시간 배양한 시험 균주 1 ml을 0%, 0.3%와 1.0% (w/v)의 oxgall이 포함된 MRS 액체배지 9 ml에 접종하고, 24시간 후 생균수를 측정하였다. 생균수는 MRS 평판배지에서 48시간 동안 37°C에 배양하여 측정하였다.

### 항균력 측정

항균활성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS)의 디스크 확산법(NCCLS M2-A7, 2000)에 준하여 측정하였다. 분리된 유산균을 100 ml의 MRS 액체배지에 접종하여 37°C, 48시간 배양하고, 그 배양액을  $8,000 \times g$ 에서 원심분리한 후 균체를 제거하였다. 상등액은 0.5 N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절한 대조군과 pH

를 조절하지 않은 실험군으로 준비한 후 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 동결건조기를 이용하여 상층액을 10배로 농축하였다.

항균활성 측정은 Mueller Hinton 고체배지에 각 측정 대상 병원성균의 농도가  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml가 되도록 멸균 생리 식염수에 희석한 접종 균액을 만든 후 면봉을 이용하여 고체배지 표면에 균일하게 도포하였다. 그리고 항균활성 측정시료 60 µl씩을 배지 안에 흡을 만들어 넣고 37°C 항온기에서 18-24시간 배양하고 생육저해를 나타내는 증식억제대의 직경(mm)을 측정하였다.

대상 병원균으로는 Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 33592, *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, Vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE) ATCC 52199, *Bacillus cereus* clinical isolation, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella gallinarum* KVCC (Korean Veterinary Culture Collection) BA0700722, *Salmonella pullorum* KVCC BA0002509을 이용하였다.

#### 세균의 성장에 따른 pH 변화, 항균력과 유기산 분석

MRS 액체 배지에 유산균을 접종 후 세균의 성장에 따른 pH 변화, 항균력의 변화와 배양기간 중 생산되는 유기산의 변화를 0, 12, 24, 36, 48시간에 측정하였다.

pH 변화는 12시간 마다 배양액을 채취하여 균체 제거 후 pH meter (Horiba, Japan)를 이용하여 측정하였다.

배양 기간 중 생산되는 유기산을 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC system은 상등액 10 ml을 취하여 filter paper에 여과한 후, 0.45 µm membrane filter (Agela Technologies Inc., NY, USA)로 한번 더 여과하였다. 시료 중 유기산 함량 분석은 HPLC (Waters Co., MA, USA)로 분석하였으며, ODS column (Reversed-Phase C18 columns, Prevail Organic Acid, 4.6 × 150 nm, 3 µm, Alltech Grace Co., USA)을 사용하였다. 이동상으로 0.25 mM phosphate buffer를 사용하여 1 ml/min의 유속 조건에서 분석을 실시하였고, 210 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 면역 증진 효과

면역 증진 효과를 알아보기 위해 대식세포(macrophage)의 활성능과 대식세포(macrophage)로부터 분비되는 사이토카인 interleukin-6 (IL-6)과 tumor necrosis factor-α (TNF-α)의 생성을 측정하였다. 실험동물은 ICR mouse를 (주)코아텍에서 구입하여 1주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육장의 실내 온도는 20-24°C, 상대습도는 45.0-55.0%, 조도는

200-300 Lux로 12시간 명암주기가 되도록 조절하였다. 동물실험은 고려대학교 동물윤리위원회의 승인(Approval No. KUIACUC-2013-195)을 얻어 수행하였다.

유산균의 사균체는 100 ml의 MRS 액체배지에 접종하여 37°C, 48시간 배양하고, 그 배양액을 8,000 ×g에서 원심분리한 후 얻은 균체를 PBS (sodium phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세정한 후 균체만 회수하여 80°C, 15분간 가열하고 8,000 ×g에서 10분간 원심분리한 다음 PBS에 희석하여 얻었다.

대식세포 활성능 측정은 Conrad [5]의 방법을 변형하여 이용하였다. ICR mouse(6주령, female)에 3% thioglycollate 배지 2 ml를 복강에 주사하고, 2일 후 유도된 복강 내 대식세포를 RPMI 1640-FBS medium을 이용하여 회수하고 3회 세척하였다. 회수한 대식세포를  $1.0 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 동일 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후, flat-bottomed 96-well tissue culture plate에 200 µl를 분주하였다. 이를 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양(37°C, 2시간)하여 macrophage monolayer를 형성시키고, 상등액을 제거한 후 각 well에 RPMI 1640 medium을 180 µl를 분주하고, LAB8와 LAB8의 사균 샘플 20 µl를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1일간 배양하였다. 배양 후 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt reagent) assay를 시행하여 대식세포의 활성능을 측정하였다. 샘플의 활성 정도를 평가하기 위해 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Co., USA) 10 µg/ml를 양성 대조시료로 사용하였으며, PBS를 음성 대조시료(control)로 사용하였다.

유산균의 사균 샘플을 이용하여 자극시킨 대식세포에서 분비된 사이토카인 IL-6과 TNF-α의 양의 측정은 IL-6와 TNF-α ELISA kit (BD Opt EIA, BD Biosciences, USA)을 이용하였으며, 제공된 지시사항에 따라 실험을 진행하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 분리세균의 분리 및 동정

건강한 닭의 맹장에서 분리한 유산균을 선별하기 위해 MRS 한천배지에 혐기 조건으로 배양하여 단일 colony를 형성하는 3종의 균주를 1차 선별하였다. 분리된 세균의 동정을 위해 형태적, 생화학적 특성과 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 *Lactobacillus sakei* 2종, *Enterococcus faecium* 1종으로 나타났다.

##### 인공위액과 내담즙성 시험

본 선발 균주를 생균제로 활용할 수 있는지의 여부를 판단하기 위해 균주의 내산성, 펩신효소의 내성, 내담즙성을 알

아보았다.

낮은 pH에 대한 내성을 조사한 결과 LAB 2와 LAB 8은 pH 3 조건에서 95% 이상의 높은 생존율을 보였으며 pH 2 조건에서는 각각 81%와 75%의 생존율을 보였다. LAB 17의 경우 pH 2와 pH 3에서 71%, 53%로 좀 더 낮은 생존율을 보였다. 인공위액 내성을 보기 위해 펩신효소를 첨가하여 시험한 결과 LAB 2는 80% 이상 생존하여 가장 높은 생존율을 보였으며, LAB 17은 50% 이상의 생존율을 보였다. 0.3%와 1.0% (w/v)의 oxgall이 포함된 배지에서 내 담즙산을 측정할 결과 3균주 모두 90% 이상의 생존율을 보였다.

유용 균주를 생균제로 이용하기 위해서는 낮은 산성의 위를 통과해야 하고[9], 음식물이 위를 통과하는 2-3시간 동안 높은 생존율을 보여야 한다. 생균제의 내산성 기준은 pH 3에서 2시간 후 생존율로 간주할 수 있으며[18], 80% 이상이면 높은 생존율이라 할 수 있다[2]. Gilliland 등[8]은 생균활성이 있는 생균이 가져야할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이

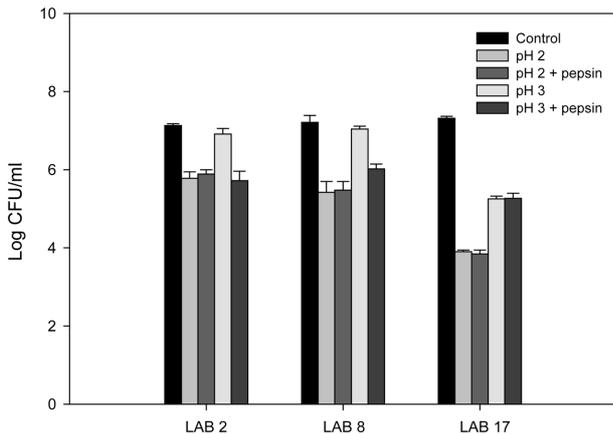


Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria isolated from chicken cecum.

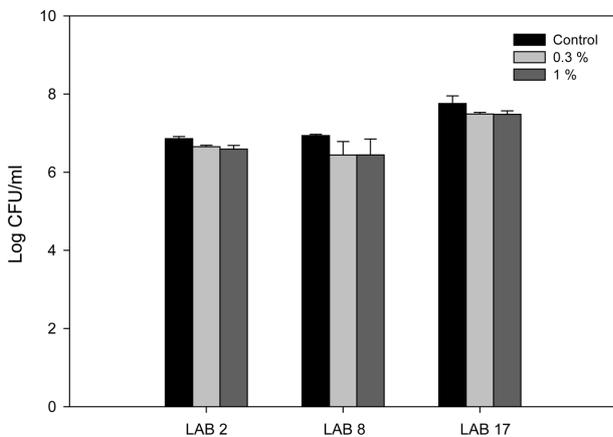


Fig. 2. Bile tolerance of lactic acid bacteria isolated from chicken cecum.

0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있다고 보고하였으나, 실제로는 더 높은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다. LAB 2와 LAB 8는 pH 3에서 3시간 후 95% 이상 생존율을 보였으며(Fig. 1), 1.0% (w/v)의 oxgall이 함유된 배지에서도 높은 생존율을 보여(Fig. 2) 생균제로 이용 가능성을 알 수 있었다. LAB 17은 높은 내 담즙성을 보였지만 내산성이 낮아 추가 실험을 진행하지 않았다.

항균력

분리세균의 항균활성 시험은 농축 배양상등액을 이용하여 그람양성 세균인 MRSA, *S. aureus*, VRE, *B. cereus* 그람 음성 세균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 을 대상으로 진행하였다. LAB 2와 LAB 8의 농축 상등액은 대상 병원균에 투명대를 형성하여 항균활성을 확인하였으며(Table 1), 이러한 유산균의 항균력은 유기산, 과산화수소, 디아세틸, 박테리옌 등의 물질에 기인한다[8]. LAB 2와 LAB 8의 상등액의 pH를 중성으로 조절하여 항균력을 측정할 결과 투명대가 형성되지 않아 LAB 2와 LAB 8의 항균활성 물질은 유기산임을 알 수 있었다. 다

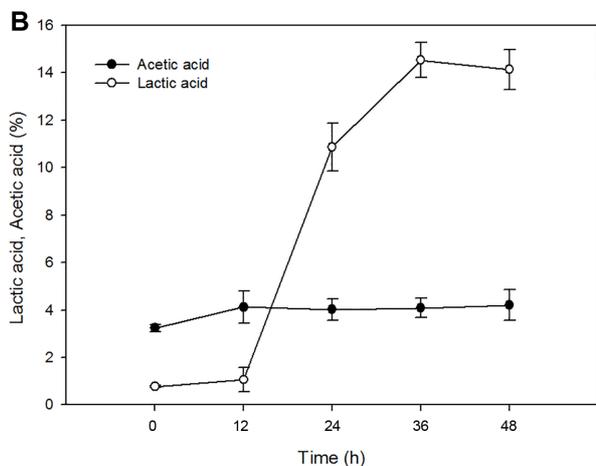
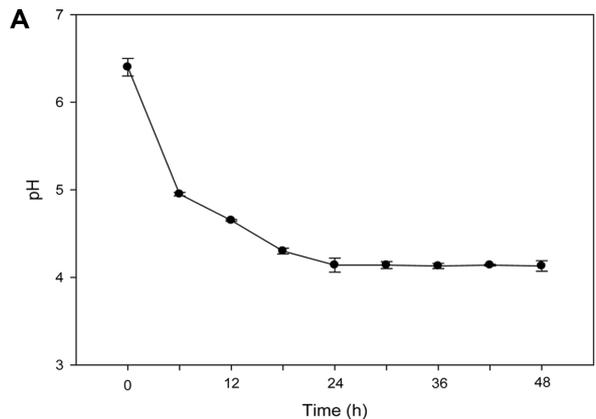
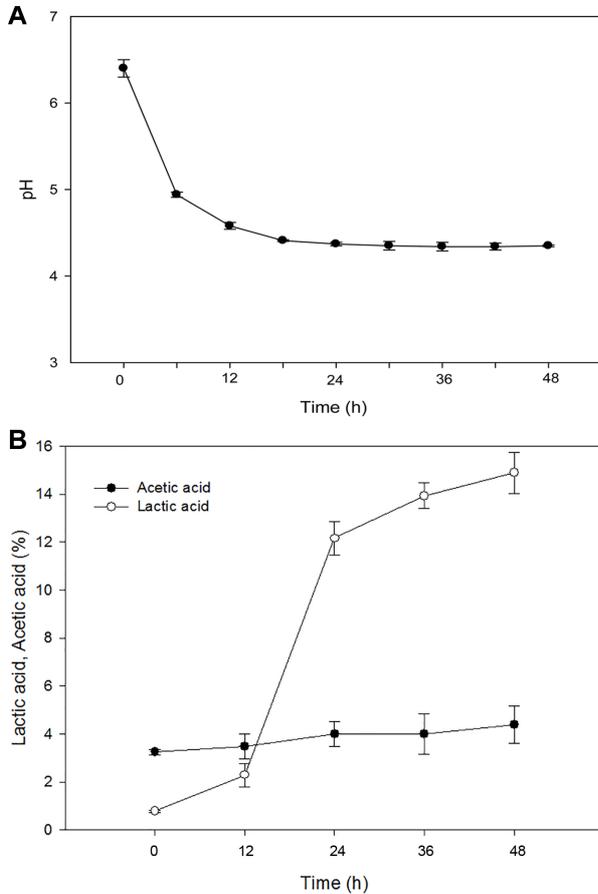


Fig. 3. Formation of lactic acid and acetic acid LAB2.



**Fig. 4. Formation of lactic acid and acetic acid LAB8.**

**Table 1. Antibacterial activity of LAB2 and 8.**

Indicator strain	Inhibition zone (mm, size of clear zone)	
	LAB 2	LAB 8
Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	19 ± 1.0	23 ± 1.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 ± 0.5	17 ± 0.5
Vancomycin-resistant <i>E. faecalis</i> (VRE)	23 ± 0.5	25 ± 0.25
<i>Bacillus cereus</i>	17.5 ± 0.75	18 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	16 ± 1.25	17 ± 1.5

**Table 2. Antibacterial activity of LAB2 and 8 against *Salmonella*.**

Test strain	Inhibition zone (mm)							
	LAB 2				LAB 8			
	12 h	24 h	36 h	48 h	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>Salmonella typhimurium</i>	11 ± 0.5	17.5 ± 0.5	21 ± 0.5	21 ± 1.25	11.5 ± 1.5	17 ± 0.75	20 ± 1.5	20 ± 0.5
<i>Salmonella enteritidis</i>	12 ± 1.0	14.5 ± 1.0	13.5 ± 0.5	19 ± 0.5	12.5 ± 1.0	17.5 ± 1.0	18 ± 0.25	19 ± 1.0
<i>Salmonella gallinarum</i>	11 ± 0.5	19 ± 0.25	20 ± 0.5	22 ± 0.25	11 ± 1.5	13 ± 1.5	19 ± 0.75	21 ± 0.5
<i>Salmonella pullorum</i>	15.5 ± 0.25	28 ± 0.5	30 ± 1.0	32.5 ± 0.5	18.5 ± 1.0	29 ± 0.5	29 ± 0.25	30 ± 0.25

양한 논문에서 유산균이 생성하는 젖산과 초산 등의 유기산에 기인한 항균력을 보고하고 있으며[10, 11], 유산균이 생성하는 *Lactobacillus* 종에서 생산하는 젖산은 항균력 외에도 그람음성 세균의 outer membrane의 막투과제로 작용하여 항균물질이 투과할 수 있게 하여 항균물질의 효과를 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다[1].

**세균의 성장에 따른 항균력, pH, 유기산 분석**

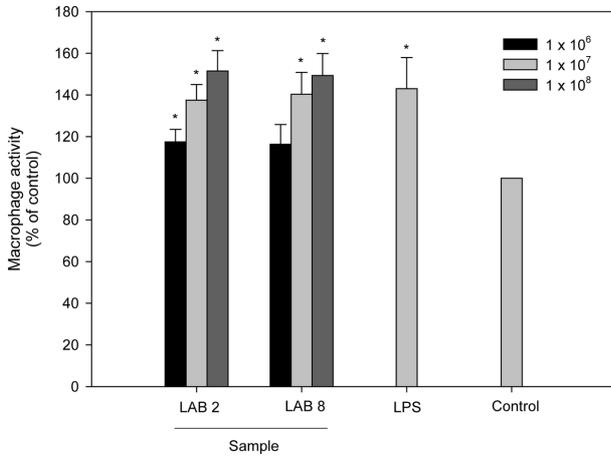
LAB2와 8의 성장에 따른 항균력을 측정하기 위해 12시간 간격으로 상등액을 채취하여 농축하여 이용하였다. 가금류 병원성의 주 원인균인 *Salmonella* 종을 병원성 균으로 이용하여 항균력을 시험한 결과 LAB2와 LAB8 모두 48시간 배양한 결과에서 가장 높은 항균력을 보였다(Table 2).

분리세균인 LAB 2와 8을 MRS 액체배지(pH 6.4)에 접종하고 pH의 변화를 6시간 간격으로 측정된 결과(Fig. 3A, 3A), 배양시간 동안 배양액의 pH는 지속적인 감소를 보였으며, 최종 pH는 각각 4.13과 4.35으로 측정되었다(Fig. 3A, 4A).

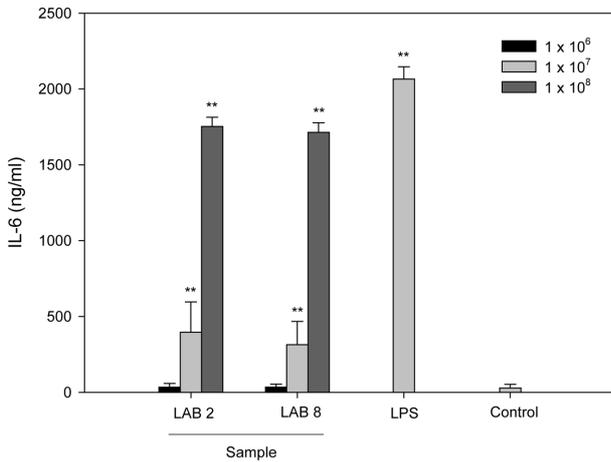
분리세균에 의해 배양시간에 따라 생산되는 유기산을 분석하기 위해 HPLC를 사용하여 측정된 결과, acetic acid 보다 lactic acid의 생산량이 높게 나타났다(Fig. 3B, 4B). Lactic acid의 결과는 LAB 2는 최고 14.53%, LAB 8은 14.89%까지 보였으며, 같은 종인 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917의 경우 이전 연구결과에서 11.79%를 보여[4] LAB 2와 8은 그 보다 높은 결과를 보였다. 유산균이 생성하는 유기산은 장내 pH를 낮춰 장내 미생물 균총의 변화를 줄 수 있으며[19], 장내 감염원에 대한 저항성을 증가시키고, 갈슘, 인, 마그네슘과 아연의 흡수 대사를 개선시켜[13], 사료 첨가제로 이용시 유용한 작용을 할 수 있다.

**면역 증진 효과**

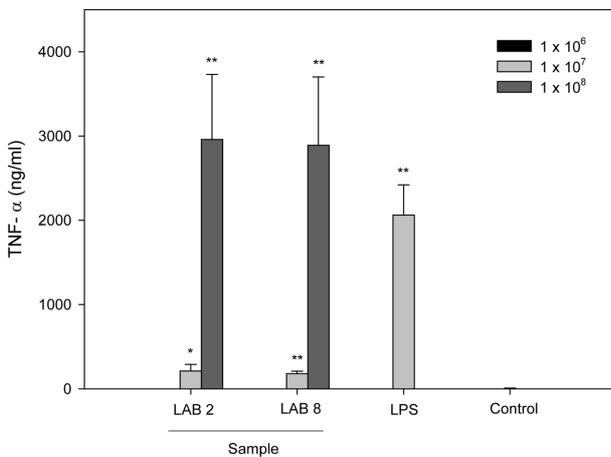
대식세포(macrophage)는 대표적인 자연면역세포로서, 체내에 침투한 외부물질에 대한 탐식작용을 하며, 세포 매개성 면역에 중요한 역할을 담당하는 면역세포로 알려져 있다[25]. 대식세포의 활성능은 LAB 2와 8의 사균체를 이용하여 측정하였으며, 음성대조군(PBS)과 비교하였다. 그 결과, 가장 높은 농도( $1 \times 10^8$  cells/ml)로 처리했을 때 각각 51%, 49% 증



**Fig. 5. Effects of heat-killed LAB 2 and 8 on the proliferation of macrophage.** \* $p < 0.05$ .



**Fig. 6. Effects of heat-killed LAB 2 and 8 on the production of IL-6 macrophages.** \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 7. Effects of heat-killed LAB 2 and 8 on the production of TNF-α macrophages.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

가 효과를 보여 가장 높은 증가효과를 보였으며, 이는 양성 대조군(LPS)이 43% 증가효과를 보인 것 보다 조금 더 높게 나타났다(Fig. 5).

대식세포(macrophage)에서 분비되는 항염증성 사이토카인은 IL-1, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12, TNF-α가 있다[22]. 이 중 대표적으로 IL-6과 TNF-α은 급성기 반응을 유발하는데 핵심적인 역할을 하며[23], 대식세포는 이들 사이토카인의 생성을 통해 숙주의 방어를 효과적으로 돕는다[15]. 본 연구에서는 대식세포에 LAB 2와 8의 사균체를 이용하여 대식세포에서 생성되어 분비된 사이토카인 IL-6과 TNF-α를 측정하였다. 그 결과, LAB 2와 8 모두 음성대조군(PBS)과 비교하여 사이토카인의 생성을 유도하였고(Fig. 6, Fig. 7), TNF-α의 경우 사균체를 1 × 10<sup>8</sup> cells/ml 농도로 처리했을 때 양성대조군(LPS)보다 높은 사이토카인 생성을 보였다.

Probiotics의 정의를 Fuller는 “장내미생물 균형에 도움을 주고 항균활성과 효소활성을 가지면서 숙주에 유용한 각종 대사산물을 생산함으로써 숙주의 건강증진과 사료효율을 증대시키는 효과를 보이는 살아있는 미생물”이라고 하였으나 [7], 추후 연구를 통해 미생물의 구성성분을 통해서도 숙주의 건강증진 효과를 보여 Salminen 등은 “숙주에 유익한 영향을 주는 미생물 또는 미생물의 구성성분”[21]으로 정의를 내려 생균과 사균 모두를 포함시켰다. 유산균의 사균체는 열처리 등으로 균의 성장이 일어나지 못하는 형태로 세포질 (cytoplasm), 세포벽(cell wall)과 대사산물(유기산, 박테리옌 등)이 포함된다. 유산균의 사균체는 살아있는 생균과 면역증진의 효과가 비슷하다는 여러 문헌이 있으며[14, 16], 면역력이 약한 사람에게는 더 안전하게 사용할 수 있는 장점이 있다. LAB 2와 LAB 8의 사균체는 대식세포를 이용한 활성능과 대식세포에서 생성되는 사이토카인의 증가를 통해 면역증진 효과를 보여 Probiotics의 가능성을 보였다.

**요 약**

건강한 닭의 맹장에서 분리한 *Lactobacillus sakei* LAB 2와 LAB 8의 생균제로 이용을 알아보기 위해 기본적인 특성과 면역활성을 시험하였다. LAB 2와 LAB 8은 높은 내산성과 내담즙성을 가지고 있으며, 1차 대사산물인 유기산에 기인한 항균활성을 보였다. *Salmonella* 종을 병원성균으로 이용하여 최대 항균력을 나타내는 시간을 시험한 결과 48시간으로 나타났으며, 생성된 유기산 중 젖산의 생산량은 다른 *Lactobacillus* 균주보다 높게 조사되었다. In vitro 모델로 알아본 면역증진효과는 면역관련 세포의 증식과 사이토카인의 생산량 증가로 확인하였다. 이에 *Lactobacillus sakei* LAB 2와 LAB 8은 유용한 생균제로 개발할 수 있는 균으로 생각된다.

## References

- Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila ST, Latva KK, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2001–2005.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, et al. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol.* **33**: 282–291.
- Barrow P, Brooker BE, Fuller R, Newport MJ. 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* **48**: 147–154.
- Chon H, Choi B. 2010. The effects of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response. *Microbiol. Immunol.* **54**: 228–236.
- Conrad R. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages, pp. 5–11. In Herscovitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A (ed.), *Manual of macrophage methodology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Fuller R. 1992. *Probiotics, The scientific basis*. Chapman and Hall, London.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365–378.
- Gilliland S, Staley T, Bush L. 1984. Importance of bile tolerance of lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**: 3045–3051.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis V, Jos HJ. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85–101.
- Kanmani P, Satish KR, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. 2013. Probiotics and its functionally valuable products—a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**: 641–658.
- Kim DS, Cho HW, Oh KH. 2013. Functional characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 Isolated from long-term fermented kimchi, Muk Eun Ji. *KSBBJ.* **28**: 18–23.
- Kim SH. 2002. The properties of lactic acid bacteria isolated from broiler and laying hens cecum. *Korean Society of Poultry Science 19 Proceedings* **11**: 64–84.
- Lee SB, Kim BK, Park CH, Park GH, Jin YC, Kang HS, et al. 2011. Effects of dietary pro-biotics and Immunomodulator as an alternative to antibiotics in Korean native chicken. *J. Anim. Sci. Technol.* **53**: 409–418.
- Li N, Russell WM, Douglas-escobar M, Hauser N, Lopez M, Neu J. 2009. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatr. Res.* **66**: 203–207.
- Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila, K. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* **64**: 5403–5405.
- Mottet C, Michetti P. 2005. Probiotics: wanted dead or alive. *Dig. Liver Dis.* **37**: 3–6.
- Parham P. 2014. *The immune system*. Garland Science Publishing, London.
- Pereira DI, Gibson GR. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4689–4693.
- Radecki S, Juhl M, Miller ER. 1988. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. *J. Anim. Sci.* **66**: 2598–2605.
- Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. 2002. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* **169**: 4697–4701.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Sci. Technol.* **10**: 107–110.
- Schepetkin IA, Faulkner CL, Nelson-Overton LK, Wiley JA, Quinn MT. 2005. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 1783–1799.
- Schepetkin IA, Xie G, Kirpotina LN, Klein RA, Jutila MA, Quinn MT. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *Int. Immunopharmacol.* **8**: 1455–1466.
- Spencer R, Chesson A. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 215–220.
- Turvey SE, Broide, DH. 2010. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: S24–S32.
- Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H. 1986. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 5233–5237.