

돼지에서 분리된 *Lactobacillus* Strains의 균체분해산물에 의한 RAW 264.7 Macrophage 활성화

김동운·조성백·정하연·문홍길·이현정·황보종·정완태·최창원·정일병
농촌진흥청 축산연구소

Activation of RAW 264.7 Macrophage by Digested Bacterial Cell of Pig-derived *Lactobacillus* Strains

D. W. Kim, S. B. Cho, H. Y. Jeong, H. G. Moon, H. J. Lee, J. Hwangbo,
W. T. Chung, C. W. Choi and I. B. Chung
National Livestock Research Institute, RDA

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of hydrolyzed *Lactobacillus* supplementation with digestive enzymes treatment on the macrophage activation, the induction of nitric oxide(NO), interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor(TNF)-α. The RAW 264.7 murine macrophage was exposed to porcine *Lactobacillus* strains which were digested with both pepsin and pancreatin. The production of NO, TNF-α and IL-6 in the macrophage were strain and dose-dependent, respectively. The induction of NO and cytokines were higher in both 3149 and 3146 strains compared with other *Lactobacillus* strains. Overall, the level of NO was observed at the lower range between 10 and 150 μg hydrolysates per ml, whereas IL-6 and TNF-α were observed at relatively higher concentration between 50 and 300 μg hydrolysates per ml. *Lactobacillus* strains which produced a high level of NO also showed a high induction of TNF-α and IL-6. Therefore, the present results suggest that hydrolysates of *Lactobacillus* strains are related to induction of several macrophage mediators, and then it could be beneficially used to modulate gastrointestinal immune function of the host. Also, the methodogly employed in this study might be useful to investigate the effects of lactic acid bacteria on gastrointestinal immunity.

(Key words : *Lactobacillus*, Macrophage, Nitric oxide, Cytokine)

I. 서 론

*Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*과 같은 유산균은 장내감염방지, 항암작용, 콜레스테롤 제거 능력, 면역 활성화능력 등과 같은 유익한 효과 때문에 생균제로 널리 이용되고 있다(Fuller, 1991 ; Gilliland, 1990 ; Sanders, 1993). 유산균에 의한 면역증강기능으로는 macrophage와 임파구활성

(Hatcher와 Lambrecht, 1993 ; Sekine 등, 1994 ; Kirjavainen 등, 1999), 항체생성(Link-Amster 등, 1994 ; Fukushima 등, 1999), 비장과 장관의 peyer's patch 증식(Takahashi 등, 1993 ; Kang 등, 1994) 등이 보고되었으며, 이들 연구의 대부분이 생균, 사균, peptidoglycan 및 cell free extract 등을 생체의 면역기구로서 제 1선을 담당하는

Corresponding author : D. W. Kim, National Livestock Research Institute, R. D. A. Suwon 441-350, Korea
Tel : 031-290-1645 E-mail : dwkim@rda.go.kr

macrophage는 골수에서 생산되는 탐식세포로서 체내에 들어온 이물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, hydrogen peroxide(H₂O₂)나 nitric oxide(NO)와 같은 각종 세포독성물질을 분비하여 이종세포나 암세포를 파괴하는 면역세포이다. 또한 세균이나 이물질을 탐식제거하는 과정에서 interleukin-1(IL-1), IL-6 그리고 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 phosphatase와 같은 효소를 분비하여 체내면역현상을 조절하며 염증반응, 조혈기구 등에도 관여하는 면역계의 주요 방어기구이다(Urban 등, 1986; Nathan, 1992, 1995). 특히 murine macrophage model을 이용한 *in vitro* 실험에서 유산균에 의해 macrophage에서 분비되는 hydrogen peroxide, nitric oxide 그리고 IL-1, IL-6, IL-10 및 TNF- α 등의 cytokine 생성에 대한 연구보고가 있다(Tejada-Simon과 Pestka, 1999; Kimoto 등, 2004; Kitazawa 등, 1999; Nishimura 등, 2003).

한편 *in vitro* 뿐만 아니라 여러 *in vivo* 연구에서도 유산균 급여에 의한 면역기능 향상이 알려져 있다(Sekine 등, 1994; Kirjavainen 등, 1999; Link-Amster 등, 1994; Fukushima 등, 1999; Sakai 등, 1996). 그러나 경구 투여된 대부분의 유산균은 일부만이 위와 십이지장을 통과하여 장내에 정착한다고 알려져 있다(Marteau 등, 1992; Clark and Martin, 1994). 이것은 위액의 낮은 pH와 체장에서 분비되는 담즙산과 소화관 효소 등에 의해 많은 수의 생균이 영향을 받기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 인위적으로 소화관의 작용을 받은 균체의 장관면역 관련 생리적 작용을 조사하기 위하여 돼지 유래의 lactobacilli를 위와 소장의 조건에서 소화효소인 pepsin과 pancreatin으로 처리한 균체 분해산물이 macrophage 활성화에 미치는 영향을 murine macrophage model을 이용하여 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균종 및 배양

Lactobacillus acidophilus KCTC 3146, *Lactobacillus amylovorus* KCTC 3149, *Lactobacillus acidophilus*

KCTC 3152, *Lactobacillus salivarius subsp. salicinius* KCTC 3156, *Lactobacillus agilis* KCTC 3158, *Lactobacillus amylovorus* KCTC 3177은 한국유전자은행으로부터 구입하여 사용하였다. 균주는 MRS배지(Merck)에서 37°C, 24시간 배양 후 균체를 회수하여 균체분해물 제조에 사용하였다.

2. 균체분해산물 제조

균체분해산물은 Boisen and Fernandez의 방법(1995)을 일부 수정하여 사용하였다. 각 균체 1 g을 sodium phosphate buffer (pH 6.4) 4 ml에 부유시킨 후 HCl을 이용하여 pH 2로 조정하였다. 여기에 pepsin 1 ml (10 mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 6시간동안 반응시킨다. Pepsin 반응이 끝난 후 sodium phosphate buffer (pH 6.8) 2 ml를 넣고 NaOH를 이용하여 pH 6.8로 조정된 후 pancreatin 1ml (25mg/ml)를 넣어 37°C에서 12시간동안 반응시킨다. 반응 후 72°C에서 10분간 열처리 하고 10,000 g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액(이하 균체분해산물이라 함)을 회수하여 동결건조 하였으며, 이것을 실험에 사용하였다.

3. Macrophage 세포배양

RAW 264.7 macrophage는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 세포를 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM medium에 계대배양 한 후 24-well plate에 5×10^5 cells/well의 농도로 넣은 다음, 균체분해산물을 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO₂ 배양기에서 37°C, 72시간동안 배양하여 NO, IL-6, TNF- α 측정에 사용하였다.

4. Nitric oxide 생성능

Macrophage에서 생산되는 nitric oxide의 양은 Griess 반응을 이용하여 안정된 산화물로 변환된 nitrite의 양을 정량함으로써 측정하였다(Ding 등, 1988). 먼저 72 시간 동안 세포를 배양한

후 상등액 100 μ l를 취하여 시험관에 넣고 증류수 2 ml와 Griess I 시약(1% sulfanil-amide in HCl) 200 μ l를 넣고 잘 섞어 준다. 신속하게 Griess II 시약(0.12% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride) 200 μ l를 넣어 섞어준 다음 10 ~ 20 분 후 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며, NO 생성능의 양성 대조구 물질로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다.

5. IL-6 측정

배양액의 IL-6는 Dong 등(1994)에 의한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.01 M phosphate buffer solution(pH 7.4)에 1 μ g/ml로 희석한 IL-6 항체(rat anti-mouse; Endogen)를 microtiter plate에 100 μ l/well 넣어 4°C에서 하룻밤 코팅시켰다. Plate를 0.2%(v/v) Tween 20을 함유한 0.01 M PBS(PBST)로 2회 세척하여 여분의 항체를 제거한 다음, 비 특이적 결합을 방지하기 위하여 3%(W/V) BSA 용액을 함유한 0.01 M PBS(PBSB) 200 μ l를 넣어 상온에서 60분간 반응시키고 PBST로 2회 세척하였다. 다음으로 배양 상등액 및 표준물질을 50 μ l/well 넣어 상온에서 1시간 반응시키고, 다시 PBST로 3회 세척한 후, PBSB 용액에 500 ng/ml의 농도로 희석한 biotinylated rat anti-mouse IL-6 항체를 50 μ l/well 넣어 상온에서 60 분간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 plate에 PBSB 용액에 40 ng/ml 농도로 희석한 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate(Pierce)를 50 μ l/well 넣어 상온에서 30 분간 반응시킨다. PBST로 4회 세척 후 0.1 M citric-phosphate buffer(pH 5.5)와 0.4 mM tetramethylbenzidine(Pierce)을 포함하는 기질용액 100 μ l/well를 넣어 30분간 반응시킨다. 최종적으로 동량의 1 M H₂SO₄를 넣어 반응을 정지 시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IL-6의 생산량은 표준 recombinant IL-6를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

6. TNF- α 측정

배양액의 TNF- α 는 Dong 등(1994)에 의한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.01 M phosphate buffer solution(pH 7.4)로 희석한 1 μ g/ml의 TNF- α 항체(rat anti-mouse; Endogen)를 microtiter plate에 100 μ l/well 넣어 4°C에서 하룻밤 코팅시켰다. Plate를 0.2%(v/v) Tween 20을 함유한 0.01 M PBS(PBST)로 2회 세척하여 여분의 항체를 제거한 다음, 비 특이적 결합을 방지하기 위하여 3%(W/V) BSA 용액을 함유한 0.01 M PBS(PBSB) 200 μ l를 넣어 상온에서 60분간 반응시키고 PBST로 2회 세척하였다. 다음으로 배양 상등액 및 표준물질을 50 μ l/well 넣고, 바로 PBSB 용액에 500 ng/mL의 농도로 희석한 biotinylated rat anti-mouse TNF- α 항체를 50 μ l/well 넣어 상온에서 120 분간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 plate에 PBSB 용액에 60 ng/mL 농도로 희석한 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate(Pierce)를 50 μ l/well 넣어 상온에서 30분간 반응시킨다. PBST로 4회 세척 후 0.1 M citric-phosphate buffer(pH 5.5)와 0.4 mM tetramethylbenzidine(Pierce)을 포함하는 기질용액 100 μ l를 넣어 30 분간 반응시킨다. 최종적으로 동량의 1 M H₂SO₄를 넣어 반응을 정지 시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. TNF- α 의 생산량은 표준 recombinant TNF- α 를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

7. 통계처리

통계처리는 SAS(2000) program의 ANOVA procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 평균값을 이용하여 Duncan's multiple range test로 처리간 유의성 검정을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. RAW 264.7 cell의 morphology

Resident macrophage는 DNA를 합성하며 증식할 수 있으나 활성화 된 macrophage는 이러한

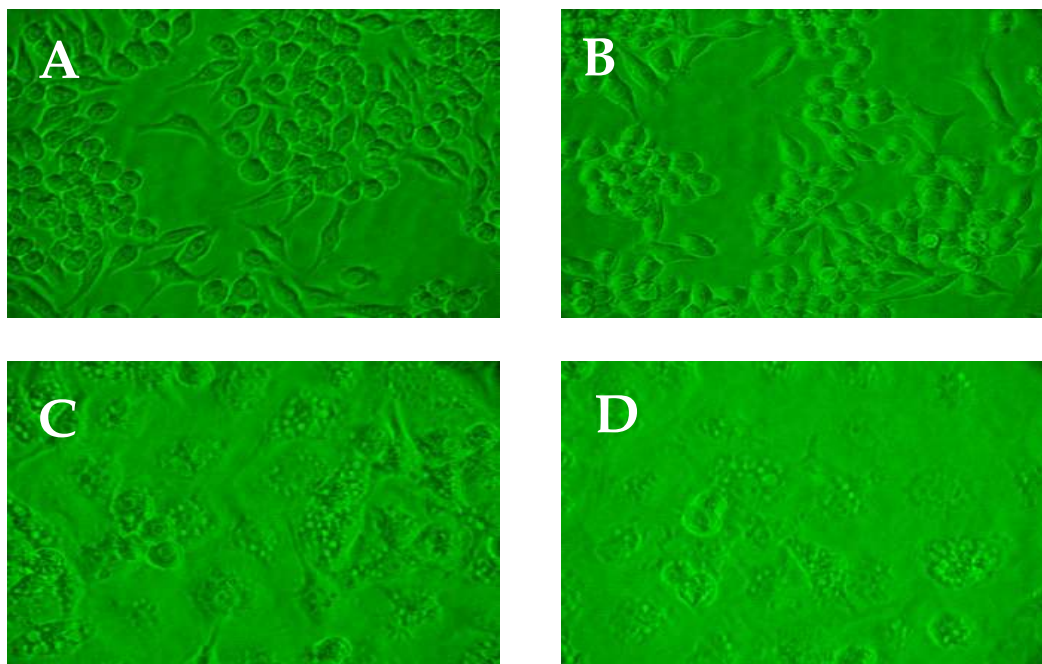


Fig. 1. Morphology of RAW 264.7 cells cultured for 72hr following addition of A) Dulbecco's modified Eagle's medium only, B) bacterial hydrolysate(10 µg/ml) of *Lactobacillus salivarius*(3156), C) bacterial hydrolysate(300 µg/ml) of *Lactobacillus salivarius*(3156) and D) lipopolysaccharide(1 µg/ml).

능력을 상실한다(Adams와 Hamilton, 1987). Fig. 1에서는 배양된 macrophage의 형태학적 특징을 보여준 것으로서 균체분해산물을 첨가하지 않았을 때는 대부분 구형이며 세포의 증식이 정상이었으나 macrophage의 activator인 LPS 첨가에 의해 활성화되면서 세포의 증식은 억제되고 세포의 형태가 변하였다. 3146 균체분해산물에서는 macrophage가 활성화되면서 세포의 형태 변화가 분명하였으며 세포형태는 균체분해산물의 종류 및 농도에 영향을 받았다.

2. Macrophage의 nitric oxide 유도

본 실험에서는 돼지의 장에서 분리된 장내 세균인 lactobacilli를 소화관 효소인 pepsin과 pancreatin으로 처리한 후 얻어진 균체분해산물을 murine macrophage RAW 264.7 cell에 함께 배양한 결과 유도되는 nitric oxide의 농도를 nitrite로 변환시켜 측정하였다. Macrophage가 생성하는 nitrite의 농도는 Fig. 2에서와 같이 negative

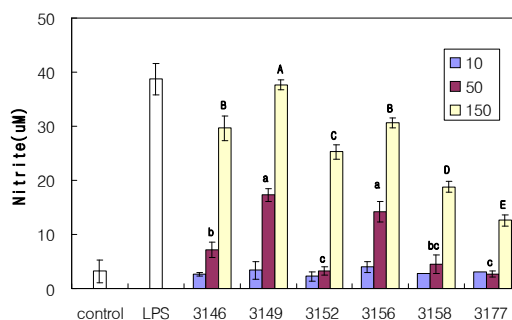


Fig. 2. Effect of bacterial hydrolysates on NO production in RAW264.7 murine macrophage cell.

The cells(5×10^5 /well) were cultured with or without bacterial hydrolysates. After 72 hr of culture, the level of NO production was measured by the Griess method. Results are mean \pm standard errors of four assays. Values with different letters are significantly different within level($P < 0.05$).

control인 세포단독에서는 3.2 uM 이었으나, macrophage의 활성화를 유도하는 물질로서 알려진 *E. coli*의 LPS를 positive control로 사용하였을 때 1 µg/ml의 LPS에서 38.7 uM의 높은 nitric oxide를 유도하였다. 한편 각종 균체분해산물을 10 ~ 150 µg/ml 농도로 첨가하였을 때 대부분의 경우 농도 의존적으로 nitric oxide 생산을 유도하였으며, 3149와 3156에서 비교적 높게 나타났다. 3149의 균체분해산물 150 µg/ml일 때 1 µg/ml LPS와 비슷한 nitric oxide값을 나타냈다.

3. Macrophage의 TNF-α 유도

균체분해산물이 macrophage의 TNF-α 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RAW264.7 cell을 균체분해산물과 함께 배양하여 배양액으로 분비되는 TNF-α를 ELISA로 측정하였다(Fig. 3). Positive control로서 LPS 1 µg/ml 첨가배양시 TNF-α를 18.1 ng/ml를 생산하였으나 세포만 배양한 negative control에서는 0.3 ng/ml으로 거의 측정되지 않았다. 50 µg/ml의 균체분해산물 첨가 시에는 macrophage 활성화 효과가 측정되지 않았으나 대부분 150, 300 µg/ml에서부터 TNF-α

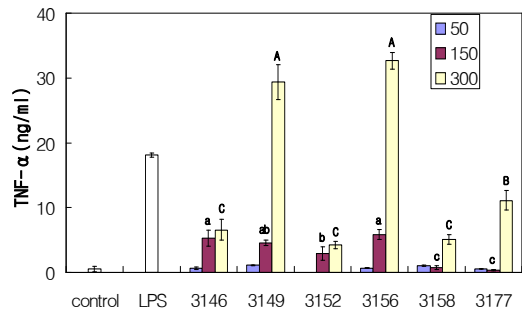


Fig. 3. Effect of bacterial hydrolysates on TNF-α production in RAW264.7 murine macrophage cell.

The cells(5×10^5 /well) were cultured with or without bacterial hydrolysates. After 72 hr of culture, TNF-α production of culture supernatant was monitored by ELISA. Results are mean ± standard errors of four assays. Values with different letters are significantly different within level($P < 0.05$).

가 측정되었다. 3149와 3156 균주에서는 300 µg/ml에서 각각 29.3, 32.6 ng/ml의 높은 값을 보여 강한 TNF-α 유도활성을 보였으나 3146, 3152, 3158 및 3177 균주는 아주 약한 값을 보였다. 따라서 TNF-α 유도활성은 균주에 따라 큰 차이가 있음을 보여주었다.

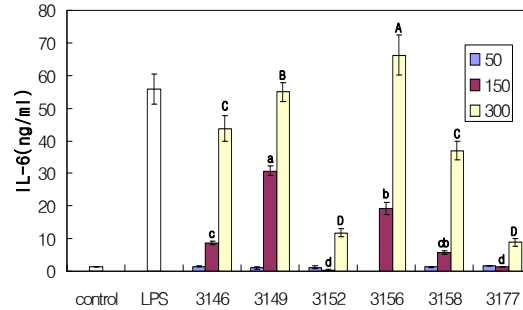


Fig. 4. Effect of bacterial hydrolysates on IL-6 production in RAW264.7 murine macrophage cell.

The cells(5×10^5 /well) were cultured with or without bacterial hydrolysates. After 72 hr of culture, IL-6 production of culture supernatant was monitored by ELISA. Results are mean ± standard errors of four assays. Values with different letters are significantly different within level($P < 0.05$).

4. Macrophage의 IL-6 유도

균체분해산물에 의해 macrophage에서 유도되는 IL-6 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RAW 264.7 cell을 배양하여 배양 상등액으로 분비되는 IL-6를 ELISA로 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 positive control에서는 LPS 1 µg/ml에서 IL-6를 약 55.8 ng/ml를 생산하였으나 negative control에서는 거의 측정되지 않았다. 50 µg/ml의 균체분해산물 첨가 시에는 효과가 없었고, 고농도인 150, 300 µg/ml에서 IL-6의 유도가 관찰되었다. 3146, 3149, 3156, 3158 균주에서는 균체분해산물을 각각 150 및 300 µg/ml를 첨가하여 배양하였을 때 농도에 따라 IL-6 유도활성을 보였으나, 3152 및 3177 균주는 아주 약한 유도활성을 보였다.

IV. 고 찰

유산균의 많은 유익한 생리적 역할 중에서 면역증강작용에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 유산균이 macrophage를 자극하여 탐식작용, 각종 cytokine 생산, 항원제시, 항종양활성 등의 기능으로 숙주의 방어와 감염에 중요한 역할을 한다는 다수의 보고가 있으며(Kaur 등, 2002; Ben-Efraim과 Bonta, 1994; Sekine 등, 1994) macrophage는 NO, H₂O₂를 생성하여 세균, 곰팡이 및 종양세포를 죽이거나 성장을 억제시키며 IL-6, TNF- α 와 같은 cytokine을 생성하여 면역반응을 조절한다(Marin 등, 1997; Snyder와 Bredt, 1992).

유산균에 의한 매크로파지 활성화에 대한 연구의 대부분은 열처리균 및 생균(Cross 등, 2004; Miettinen 등, 1996; Kimoto 등, 2004), 세포벽성분인 peptidoglycan (Tejada-Simon과 Pestka, 1999), teichoic acid(Nishimura 등, 2003), lysozyme과 actinase로 처리된 균체분해물(Sakai 등, 1996), 초음파분쇄액(송 등, 2003) 등에 의한 cytokine, NO, H₂O₂ 등의 생성에 대한 보고이다. 한편 일반적으로 경구 투여된 생균제의 장내 정착율은 그다지 높지 않다고 알려져 있다(Marteau 등, 1992; Clark and Martin, 1994). 이것은 위와 십이지장을 통과하면서 낮은 pH, 담즙 및 소화관 효소의 영향을 받기 때문이다. 따라서 lactobacilli를 위와 십이지장의 영향을 인위적으로 받게 함으로써 *in vivo*에서의 효과를 *in vitro*에서 좀더 정확히 추정할 수 있는데 도움이 될 것이다.

Sakai 등(1996)은 *Brevibacterium lactofermentum*을 lysozyme과 actinase로 분해한 균체분해물을 J774.1 macrophage와 함께 배양한 결과에서 nitric oxide의 생성이 농도에 따라 증가함을 보고하여 효소처리 균체분해물의 효과를 제시하였다. 본 연구의 결과로부터 소화효소로 처리된 lactobacilli 균체분해산물들을 RAW 264.7 macrophage와 함께 배양함으로써 NO, TNF- α 및 IL-6가 유도되었으며 이것은 균체분해산물이 직접 macrophage를 자극한 것으로 생각된다. 또한 이것은 균체분해산물이 장관내에서 M cell을 통과하여 peyer's

patch의 매크로파지와 반응 할 수 있을 가능성을 보여준다. 사용된 균체분해산물에 의한 NO, TNF- α 및 IL-6의 생산은 농도 의존적으로 상승작용을 나타내었다. 균체분해산물에 따라서 macrophage에서 TNF- α 와 IL-6의 분비량에 많은 차이가 있는 것으로 보아 유도활성은 균주 의존적임을 보여주었다. 특히 3146과 3152, 3149와 3177은 같은 species임에도 유도활성에 큰 차이를 나타냈다. Nitric oxide의 유도는 균체분해산물 10~150 ug/ml에서 관찰 되었으나 TNF- α 와 IL-6의 유도는 50~300 ug/ml의 고농도처리에서 측정 할 수 있었다. 이것은 macrophage가 NO 유도에 더욱 민감함을 보여주었다.

또한 pepsin과 pancreatin으로 처리된 균체분해산물에 함유된 여러 성분들이 장관면역계의 macrophage 활성화에 관여 할 것임이 시사되고, 세균분해산물에 함유되어 있는 어떤 성분이 이런 작용을 하는지 그리고 *in vivo*에서도 이런 활성을 보이는지에 대한 연구가 요구된다. 한편 경구섭취 생균제 뿐만 아니라 장내에 존재하는 장내세균은 살아있을 때는 물론 사멸되더라도 소화관 효소 및 장내미생물이 분비하는 효소에 의하여 분해되고, 이들 분해물이 소화관면역계의 활성화에 기여 할 것임이 추론된다.

V. 요 약

경구로 섭취된 생균제가 소화관 효소의 작용을 받은 경우 장관면역계의 macrophage에 미치는 영향을 조사하기 위하여 돼지의 장내에서 분리된 lactobacilli를 pepsin과 pancreatin과 같은 소화관 효소로 분해한 균체분해산물에 의해 RAW 264.7 murine macrophage에서 유도되는 NO, TNF- α 및 IL-6의 생성을 측정하였다. Macrophage에서 유도되는 NO, TNF- α 및 IL-6는 균종과 균체분해산물의 양에 따라 달랐다. NO의 생성수준은 10~150 ug/ml의 분해물에서 관찰 되었으나 TNF- α 와 IL-6는 50~300 ug/ml의 고농도처리에서 나타났다. 6개의 *Lactobacillus* strains 중에서 3149와 3156 균주는 다른 균주에 비해 TNF- α 와 IL-6 유도능이 높았다. 또한 소화관

효소에 의해 분해된 lactobacilli의 균체분해산물의 성분이 macrophage 활성 증가와 관련이 있으며 생체내에서 숙주면역계를 조절할 것으로 사료된다. 본 시험에서 사용한 방법은 소화관 면역계에 미치는 유산균의 효과를 규명하는데 유익할 것이다.

VI. 인 용 문 헌

- Adams, D. O. and Hamilton, T. A. 1987. Molecular transductional mechanisms by which IFN and other signals regulate macrophage development. *Immunol. Rev.* 97:5.
- Ben-Efraim, S. and Bonta, I. L. 1994. Modulation of antitumor activity of macrophages by regulation of eicosanoids and cytokine production. *Int. J. Immunol. Pharmacol.* 16:397-399.
- Boisen, S. and Fernandez, J. A. 1995. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses. *Animal Feed Science and Technology.* 51:29-43.
- Clark, P. A. and Martin, J. H. 1994. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III-Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 29:18-21.
- Cross, M. L., Ganner, A., Teilab, D. and Fray, L. M. 2004. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 42:173-180.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 141:2407- 2412.
- Dong, W., Azcona-Olivera, J. I., Brooks, K. H., Linz, J. E. and Pestka, J. J. 1994. Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, and 6 during exposure to vomitoxin(deoxynivalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicol. Appl. pharmacol.* 127:282-290.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Mizumachi, K., Kurisaki, J. and Mitsuoka, T. 1999. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int. J. Food Microbiology.* 46:193-197.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut.* 32:439-442.
- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Fed. Eur. Microbiol. Rev.* 87:175-188.
- Hatcher, G. E. and Lambrecht, R. S. 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76:2485-2492.
- Kang, K. Y., Park, S. H. and Choe, T. B. 1994. Immunostimulation effect of cell wall components isolated from *Lactobacillus plantarum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4:195-199.
- Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science.* 15:1-9.
- Kirjavainen, P. V., El-Nezami, H. S., Salminen, S. J., Ahokas, J. T. and Wright, P. F. 1999. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 26: 131-135.
- Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T. and Kurisaki, J. 2004. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol. Immunol.* 48:75-82.
- Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, H. and Yamaguchi, T. 1999. Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis ssp. cremoris*. *Int. J. Food Microbiology.* 31:99-106.
- Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O. and Aeschlimann, J. M., 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10:55-64.
- Marin, M. L., Lee, J. h., Murtha, J., Ustunol, Z. and Pestka, J. J. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and t-cell lines cultured with Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 80: 2713-2720.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Zidi, S., Goderel, I. and Rambaud, J. C. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* in

- the small intestine following ingestion in fermented milk. A rational basis for the use of probiotics in man. *Gastroenterol Clin. Biol.* 16:25-8.
20. Miettinen, M., Voupio-Varkila, J. and Varkila, K. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin 10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity.* 64:5403-5405.
 21. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-3064.
 22. Nathan, C. 1995. Natural resistance and nitric oxide. *Cell.* 82:873-876.
 23. Nishimura-Uemura, J., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., Oda, M. and Saito, T. 2003. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiology.* 20:267-273.
 24. Sakai, T., Hamakawa, M. and Shirai, K. 1996. Protective effects of digested bacterial cell powder on diarrhea in suckling piglets. *Agri-Practice.* 17: 23-27.
 25. Sanders, M. E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv. Food Nutr. Res.* 37:67-130.
 26. SAS. 2000. SAS/STAT User's guide(Release 8.1 ed.). Statistics, SAS Institute Inc., Cary., NC.
 27. Sekine, K., Kasashima, T. and Hashimoto, Y. 1994. Comparison of the TNF- α level induced by human-derived *Bifidobacterium longum* and rat-derived *Bifidobacterium animalis* in mouse peritoneal cells. *Bifidobact. Microfl.* 13:79-89.
 28. Snyder, S. H. and Brett, D. S. 1992. Biological roles of nitric oxide. *Sci. Amer.* 266:68-77.
 29. Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T. and Yamamoto, Y. 1993. Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1557-1560.
 30. Tejada-Simon, M. V. and Pestka, J. J. 1999. Pro-inflammatory Cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 62:1435-1444.
 31. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J. and Schreiber, H. 1986. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:5233-5237.
 32. 송미경, 우석규, 장정순, 김중학, 김화영, 홍성길, 이병욱, 박미현, 정건섭. 2003. 한국인으로부터 분리한 *Pediococcus pentosaceus* EROM101의 면역증강 및 항암활성. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 355-361.

(접수일자 : 2005. 9. 15. / 채택일자 : 2005. 12. 8.)