

The Anti-inflammatory Effects of Probiotic-produced Exopolysaccharide

Seung Hoon Lee¹, Min-Jeong Kwon¹, Hyung-Taek Kang¹, Chung Wook Chung¹, Byung Oh Kim²
and Jong-Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²School of Food Science & Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received March 16, 2015 / Revised June 12, 2015 / Accepted June 15, 2015

The present study isolated seven different kinds of probiotics from various food sources and identified them with *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. by 16S rDNA sequencing. Their supernatants were prepared after a 24 hr culture, and their effects on nitric oxide (NO) production in mouse RAW 264.7 cells were investigated. Among the treated samples, the culture supernatants of two strains (*Bacillus* sp. FG-1 and *Lactobacillus* sp. FG-6) significantly decreased NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells. Moreover, they dramatically reduced the expression of pro-inflammatory genes such as COX-2, iNOS, and TNF- α . To examine whether exopolysaccharide (EPS) is responsible for the anti-inflammatory effects of probiotics, EPS was purified from the culture supernatants of *Bacillus* sp. FG-1 and *Lactobacillus* sp. FG-6 strains. The EPS treatment produced by FG-1 and FG-6 strains decreased NO production in a dose-dependent manner in LPS-stimulated RAW 264.7 cells without affecting cell viability, while also reducing pro-inflammatory gene expression. Overall, these results suggest that EPS might be one of the key molecules responsible for the anti-inflammatory effects of probiotics.

Key words : Anti-inflammation, exopolysaccharide, probiotics, RAW 264.7 cell, 16S rDNA

서 론

인간의 소화기관에는 약 100여종의 장내세균이 존재하며 일부 미생물은 장내에 유입되는 유해균의 생장을 억제하고 [12] 가수분해 효소 분비를 통해 음식물을 분해하는 등의 경장 효과가 있음이 알려져 있다. 하지만 숙주의 식습관과 환경조건에 따라 장내 미생물 분포의 균형이 붕괴되면 유해균의 침입 및 번식, 그에 따른 세균성 질환과 소화불량 등 생체에 다양한 악영향을 끼치게 된다[18, 19]. 이러한 균형 붕괴를 예방하기 위해 간편하게 건강유지에 도움이 될 수 있는 미생물제제로서 프로바이오틱스의 개념이 등장하게 되었다.

프로바이오틱스란 2001년 WHO에서 “살아있는 미생물로서 적정량을 섭취하였을 때, 숙주에게 유익한 영향을 미치는 것”으로 정의한 이래 현재까지 사용되고 있다. 프로바이오틱스의 활성에 대한 연구에 의하면 항균활성[11], 항암효과[5], 숙주의 영양흡수 증진[2], 면역력 강화[1], 활성산소 소거[14] 등 다양한 생리 활성을 가지고 있는 것으로 보고 되었다. 또한, 프로바이오틱스를 구성하는 다양한 성분에 의한 생리활성 연

구가 진행되고 있으며, 대표적으로 유산균의 세포벽을 구성하는 polysaccharide moiety 및 muramic acid와 배양물이 항암 효과를 가진다는 사실이 *in vivo* 모델을 통해 보고 되기도 하였다[13, 22].

미생물을 구성하는 3종류의 다당체는 세포 내 다당체(intracellular polysaccharide), 구조다당체(structural polysaccharide) 그리고 세포 외 다당체(extracellular polysaccharide)이다. 이 중 세포 외 다당체(extracellular polysaccharide)는 미생물의 대사산물로서[10] slime, capsular, microcapsular 등 3가지의 형태로 분류되며 exopolysaccharide (EPS)라고도 한다[20]. EPS는 인과 무기염류 등이 다당체와 결합한 형태를 가지며[4], 다양한 환경 스트레스로부터 미생물을 보호하는 것이 가장 주된 기능으로 알려져 있다[8]. 또한, 최근 연구에 의하면 EPS가 염증반응의 한 경로인 MAPK pathway에 관여하여 iNOS, COX-2 등 pro-inflammatory 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 보고되었다[4].

대식세포와 같은 면역세포에서 lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 발현되는 iNOS는 nitric oxide (NO)를 합성하며, 이러한 NO는 혈관계, 골격계 그리고 신경계 등에서 다양한 신호전달 및 방어물질로 알려져 있어 염증반응 정도를 측정하는 중요한 척도로 이용되고 있다[3, 6, 15].

본 연구에서는 다양한 식품원으로부터 프로바이오틱스를 분리 및 동정하고, 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포주에서 프로바이오틱스 배양액에 의한 항염증 활성을 확인하였다. 또한, 유용세균 배양액으로부터 EPS를 분리 및 정제하여 이들의

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705
E-mail : jsk@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항염증 활성 및 활성 기전을 연구하였다.

재료 및 방법

유용세균의 분리 및 동정

각 미생물은 막걸리, 김치 및 시중에 유통되고 있는 유산균 음료를 Bromo Cresol Purple 배지(Difco, USA)에 배양하여 특징적인 변색을 나타내는 7종을 선별하였다. 선별된 균주는 Lactobacilli MRS (Difco, USA) 배지에서 순수 배양한 후 MRS 액체 배지에서 48시간 동안 혼탁 배양 하였다. 배양된 균주로부터 G-spin kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 8F (F: 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (R: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') universal primer를 사용하여 16S rDNA 부분을 polymerase chain reaction을 통하여 증폭하였다. PCR product는 pGEM T-easy vector로 cloning 한 후 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST program을 이용하여 세균을 동정하였다.

RAW 264.7 세포의 배양

본 연구에 사용된 세포주는 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주를 사용하였고 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)을 첨가하여 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 실시하였다.

Nitric oxide assay

균주 배양액 및 exopolysaccharide (EPS)가 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 대식세포 RAW 264.7 세포주의 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 NO assay를 수행하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 96 well plate의 각 well에 1×10⁵개의 세포를 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다. 그 후 LPS (Sigma, USA)를 0.2 µg/ml 농도로 한 시간 처리하고, 균주 배양액 혹은 EPS를 처리하여 16시간 동안 배양하

였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약[1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid]을 이용해 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 100 µl를 1:1로 혼합하여 96 well plate에서 15분간 반응시키고 Nano-Quant PlateTM (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean±SD 값과 그래프로 나타내었다.

세포 생존율 측정

EPS가 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포주의 성장에 미치는 영향을 연구하기 위해 cell viability assay를 수행하였다. 먼저 96 well plate에 1×10⁵개의 RAW 264.7 세포를 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다. 그 후 EPS를 처리한 후 16시간 배양하여 MTS (3-(4,5-dimethylthi-azol-2-yl)5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 용액 (Promega, USA)을 각 well 당 20 µl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Nano-Queant PlateTM (Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean±SD 값과 그래프로 나타내었다.

Reverse transcription-PCR

RT-PCR을 수행하기 위해 RAW 264.7 세포로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하여 Total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA 2 µg을 주형으로 PrimeScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 유전자 특이적인 oligo primer를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction) 과정을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같고, primer는 Pioneer사 (Korea)에 주문 제작하였다. PCR은 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 수행하였다.

균주 배양액의 분리 및 배양액으로부터 EPS의 분리

각 균주의 배양액은 동일한 조건을 설정하기 위해 OD₆₆₀

Table 1. List of probiotics isolated from various food sources

Food source	Genus	Species	Strains
Makgeoli	Bacillus	amyloliquefaciens	Bacillus sp. strain FG1
Beverage	Lactobacillus	plantarum	Lactobacillus sp. strain FG2
Beverage	Bacillus	licheniformis	Bacillus sp. strain FG3
Makgeoli	Bacillus	subtilis	Bacillus sp. strain FG4
Makgeoli	Lactobacillus	paracasei	Lactobacillus sp. strain FG5
Makgeoli	Lactobacillus	rhamnosus	Lactobacillus sp. strain FG6
Kimchi	Lactobacillus	Sakei	Lactobacillus sp. strain FG7

값을 $0.6 \pm 2.5\%$ 범위에서 배양 한 후 2,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 0.2 μm micro filter (Sartorius Biotech, Germany)로 여과하였다. 배양액으로부터 EPS의 분리는 선별된 균주가 EPS를 충분히 생산하도록 MRS 액체 배지에 1% Lactose와 1% Sucrose를 추가 첨가하였으며, OD₆₆₀ 값 0.6으로 조정된 유산균 배양액을 1% 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양액은 2배 volume의 D.W를 이용해 3배 희석하고 NaOH를 투여하여 volume 대비 0.1 N 농도로 조정한 뒤 High Speed Tube (NalGene, USA)에 나누어 담아 12,000× g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 균체를 분리하였다. 분리한 배양액을 수거하여 배양액 2배 volume의 95% ethanol을 첨가한 후 24시간 동안 EPS를 결정화하였다. EPS가 충분히 결정화 된 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 70% ethanol을 이용해 세척하였다. 70% ethanol 용액에 0.1N 농도의 HCl을 이용하여 pH 7.0으로 보정하고 다시 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 5 ml의 70% ethanol 첨가하여 2차 세척 후 탈수 및 건조하여 최종적으로 EPS를 분리하였다.

통계처리

NO assay와 세포생존율 실험은 3회 반복실험을 실시 하였으며, 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험결과의 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 Student's *t*-test에 의해 판정하였으며 *p*값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

다양한 식품원으로부터 프로바이오틱스의 분리 및 동정

프로바이오틱스는 막걸리 4종, 유산균 음료 2종, 김치 1종으로부터 Bromo Cresol Purple 및 MRS 배지를 이용하여 최종적으로 7종의 균주를 분리하였다. 순수 분리된 균주는 16S rDNA sequencing을 통해 얻은 염기서열을 NCBI BLAST DB에서 검색한 결과 96±1%의 상동성을 보이는 *Lactobacillus* sp. 4종과 *Bacillus* sp. 3종으로 동정되었다. Table 1에서 보는 바와 같이 식품원과 동정된 균주명을 나타내었고, 임의적으로 7균

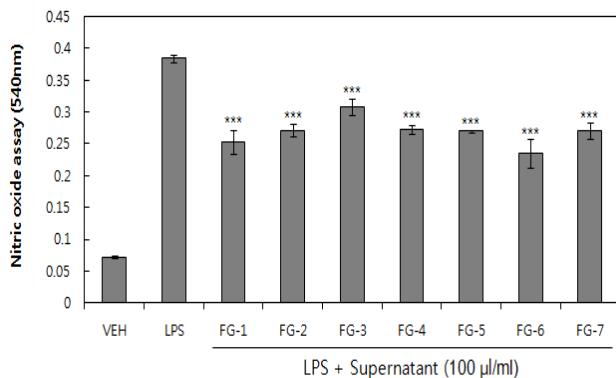


Fig. 1. Effects of culture supernatants of identified microbes on nitric oxide (NO) production and cell viabilities in mouse RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were plated at 1×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ of culture supernatants of seven microbes for 16 hr. After treatment, NO production was measured by NO assay. Values indicate means±SD ($n=4$). ****p*<0.001.

주에 대해 strain명을 FG1 ~FG7로 명명하였다.

균주 배양액이 RAW 264.7세포주에서 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

NO는 폐혈증 및 감염성 질환에서 중요한 매개 인자로서 [16], LPS에 의한 염증 유도 시 억제능을 나타내는 균주를 선별하는데 있어 중요한 지표물질로 이용될 수 있다. 따라서, 순수 분리한 균주 배양액의 항염증 활성을 측정하기 위하여 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포주에 각 유산균 배양액을 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 7종류의 균주 중 *Bacillus* sp. strain FG-1 배양 상층액과 *Lactobacillus* sp. strain FG-6의 배양 상층액에 의한 NO 생성량 감소가 가장 두드러지게 나타났으며, NO 생성 억제율은 LPS 만 처리한 대조군과 비교하여 FG-1과 FG-6처리군에서 각각 34.2%와 38.9%로 가장 높은 억제율을 보여주었다(Fig. 1). 최근 Kawahara *et al.*의 보고[10]에 의하면 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에서 3종류의 다른 유산균의 배양액의 처리에 의해 NO 생성이 억

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene name	GenBank Acc. No.	Sequences
COX-2	NM_011198.3	F: 5'-CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3' R: 5'-CCTCGCTCTGATCTGTCTT-3'
<i>iNOS</i>	NM_010927.3	F: 5'-CTGCAGCACTGGATCAGGAACCTG-3' R: 5'-GGGAGTAGCCTGTGCACCTGGAA-3'
TNF-Alpha	NM_013693.2	F: 5'-CGTCAGCCGATTGCTATCT-3' R: 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
GAPDH	NM_008084.2	F: 5'-GAACGTGAAGCCCATGAGG-3' R: 5'-CTCCTTGTAGATCTCCTGGAA-3'

제되었다. 이러한 연구결과는 균주는 다르지만 유산균 배양액에 의해 NO 생성이 저해된다는 점에서 본 연구결과와 유사하다고 판단된다.

균주 배양액에 의한 pro-inflammatory 유전자의 발현 감소

선별된 7종의 균주 가운데 NO 생성을 가장 높게 억제하는 균주 2종(*Bacillus* sp. strain FG-1, *Lactobacillus* sp. strain FG-6)의 배양 상층액을 100 µl/ml의 농도로 LPS로 활성화된 RAW 264.7세포주에 처리 한 후, pro-inflammatory 유전자인 COX-2, iNOS 그리고 TNF-alpha 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, LPS에 의해 염증이 유도된 대조군의 경우 pro-inflammatory 유전자들의 발현이 크게 증가한 반면 균주 배양액을 함께 처리한 실험군에서는 pro-inflammatory 유전자의 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 2). Pro-inflammatory 유전자인 COX-2, iNOS 그리고 TNF-alpha등은 MAPK pathway 및 NF-kappa B에 의해 조절되며 NO 및 PGE2 생성 등을 포함하는 염증반응을 매개하는 것으로 알려져 있다[7, 21]. 따라서, 이러한 결과는 프로바이오틱스 배양 상층액에 포함된 생리활성물질이 NO 생성을 억제하고 염증 반응의 신호전달 체계에 관여하고 있음을 시사한다.

균주 배양액으로부터 exopolysaccharide (EPS) 분리 및 EPS에 의한 항염증 활성

선별된 2종의 균주인 *Bacillus* sp. strain FG-1과 *Lactobacillus* sp. strain FG-6 배양 상층액 100 ml로부터 재료 및 방법에 명시한 방법에 따라 EPS를 분리하였다. 분리한 EPS를 광학현미경 하에서 100배, 400배 배율로 관찰한 결과 *Bacillus* sp. strain FG-1 균주의 EPS의 경우 비교적 성분이 heterogenous 한 형태로 구성되어 있었으며, *Lactobacillus* sp. strain FG-6 균주의 EPS는 비교적 homogenous 한 물질로 구성된 것으로 판단되었다(Fig. 3). LPS를 처리한 RAW 264.7 세포주에 EPS를

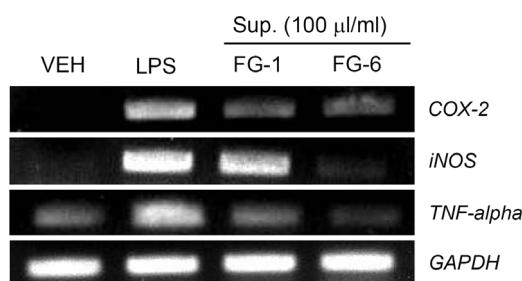


Fig. 2. Down-regulation of COX-2, iNOS and TNF- α genes by culture supernatants of FG-1 and FG-6 strains. Mouse macrophage RAW 264.7 cells were treated with 100 µl/ml of culture supernatants of FG-1 and FG-6 strains and then total RNA was prepared from treated cells. RT-PCR was performed with COX-2, iNOS and TNF- α genes specific primers.

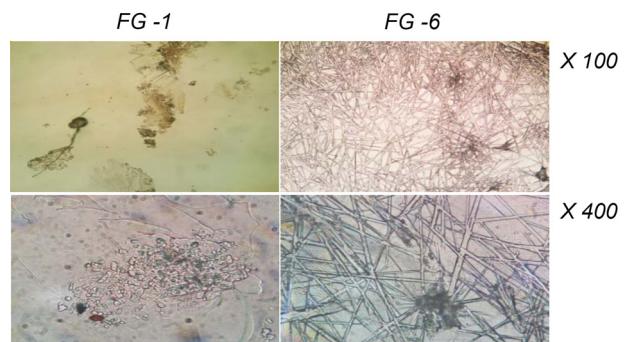


Fig. 3. Preparation of exopolysaccharide (EPS) from culture supernatant of probiotics. EPS was isolated and purified from culture supernatant of strain FG-1 and FG-6 by ethanol precipitation and pictured under optical microscope.

0.75, 1.0, 1.25, 1.5 mg/ml의 농도로 처리한 후, NO 생성 저해율 및 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 두 균주가 생산하는 EPS가 세포생존율에는 큰 영향 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 4). Fig. 4A에서 보는 바와 같이, 두 균주가 생산한 EPS의 처리 농도가 증가할 수록 NO 생성 억제 효과가 증가함을 확인하였다. 또한 두 균주가 생산하는 EPS는 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았으며(Fig. 4B), 이러한 연구 결과는 균주가 생산하는 EPS 및 EPS와 결합된 형태의 생리활성물질이 항염증 활성을 나타내는 것임을 알 수 있다. 최근 연구에 의하면 *Bacillus* sp. 가 분비하는 EPS 성분이 RAW 264.7과 같은 대식세포의 염증반응 초기 신호전달 단계에 관여하여 과도한 염증 반응을 억제한다는 연구결과가 보고되었다[4]. 이는 비록 균주는 다르지만 EPS가 항염증 활성의 유효성분이 될 수 있다는 것을 시사한다.

EPS에 의한 pro-inflammatory 유전자의 발현 감소

EPS에 의한 항염증 활성을 유전자 발현 수준에서 확인하기 위해 선별된 EPS 2종을 1 mg/ml의 농도로 처리한 후, pro-inflammatory 유전자인 COX-2, iNOS 그리고 TNF-alpha 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, 두 가지 EPS 처리군 모두 유의적인 pro-inflammatory 유전자의 발현 감소를 확인하였으며, 특히 *Lactobacillus* sp. strain FG-6 균주가 생산한 EPS를 처리한 경우 pro-inflammatory 유전자의 발현이 전반적으로 크게 감소되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 반면, *Bacillus* sp. strain FG-1 균주가 생산한 EPS를 처리한 경우 COX-2를 제외한 iNOS, TNF- α 유전자의 발현이 감소됨을 확인 할 수 있다. 이러한 연구결과는 두 균주가 생산하는 EPS는 다른 종류이며, 항염증 활성 기전도 조금 다를 것으로 생각된다. 또한, 이러한 결과는 균주가 생산하는 EPS 종류에 따라 다른 경로에 의해 면역 조절 기능에 관여할 수 있음을 보고[17]한 것과 유사한 것으로 판단된다.

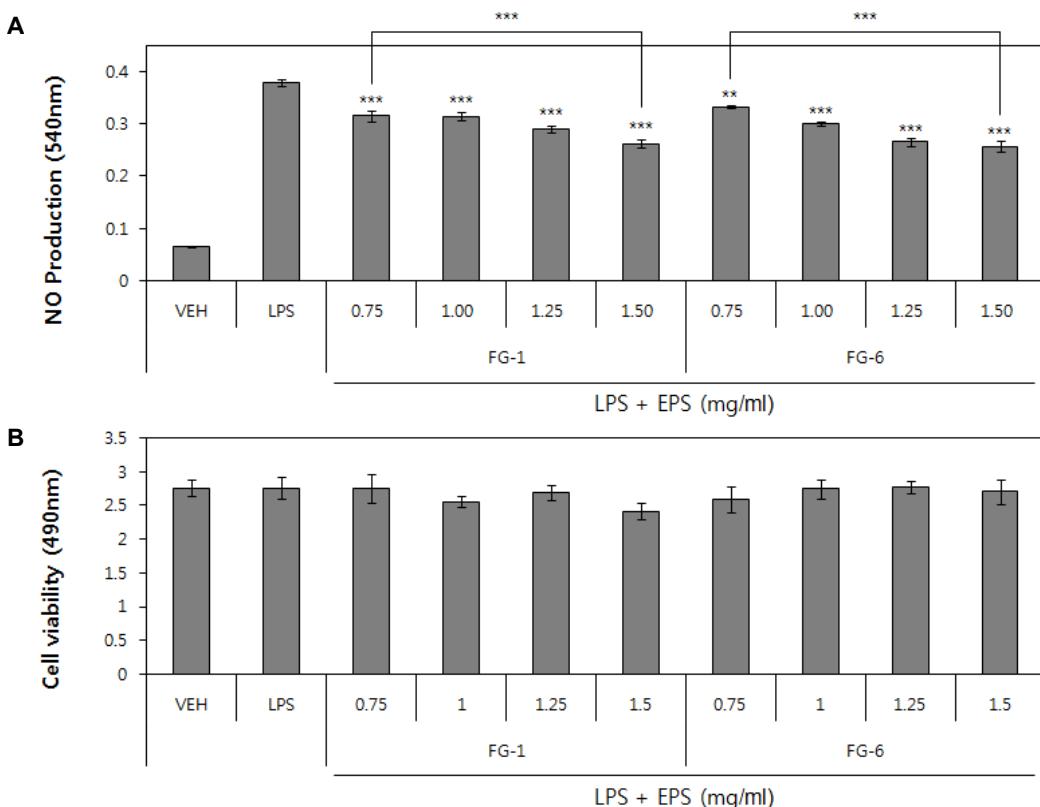


Fig. 4. Effects of EPS isolated from FG-1 and FG-6 strains on NO production and cell viabilities in mouse RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells were plated at 1×10^5 cells/well in a 96-well plate and incubated with 0.75, 1.0, 1.25 and 1.5 mg/ml of EPS from FG-1 and FG-6 strains for 16 hr. After treatment, (A) NO production was measured by NO assay and (B) cell viability was measured using MTS proliferation assay kit. Values indicate means \pm SD (n=4). **p<0.01 and ***p<0.001.

본 연구에서는 다양한 식품원으로부터 7종의 프로바이오틱스를 분리 및 동정하고 이들의 배양액 및 균주가 생산하는 EPS가 항염증 활성을 가지고 있음을 보여주었다. 프로바이오틱스는 균주마다 다양한 종류의 EPS를 생산하고, 이들의 구성이나 구조에 따라 다양한 생리활성을 보여준다. 따라서, 본 연구에서 분리한 EPS의 구성성분과 구조를 규명하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

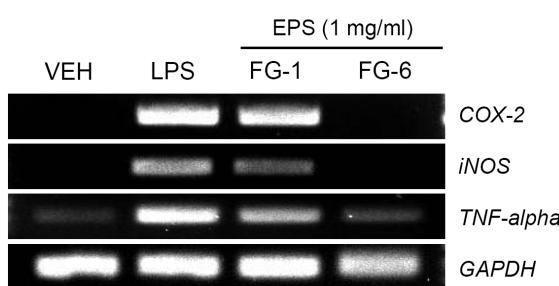


Fig. 5. Down-regulation of COX-2, iNOS and TNF- α genes by EPS. Mouse macrophage RAW 264.7 cells were treated with 1 mg/ml of EPS and total RNA was prepared from EPS treated cells. And then, RT-PCR was performed with COX-2, iNOS and TNF- α gene specific primers.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 안동대학교 산학연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Chae, O. W., Shin, K. S., Chung, H. K. and Choe, T. B. 1998. Immuneostimulation effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 424-430.
- Cho, Y. H. and Oh, S. J. 2010. Casein phosphopeptide (CPP)-producing activity and proteolytic ability by some lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **30**, 443-448.
- Chung, H. T., Pea, H. O., Choi, B. M., Billair, T. R. and Kim, Y. M. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Res.* **282**, 1075-1079.
- Diao, Y., Xin, Y., Zhou, Y., Li, N., Pan, X., Qi, S., Qi, Z., Xu, Y., Luo, L., Wan, H., Lan, L. and Yin, Z. 2014. Extracellular polysaccharide from *Bacillus* sp. strain LBP32 prevents LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF- κ B and MAPKs activation and ROS production. *Int. Immunopharmacol.* **18**, 12-19.

5. Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**, 263-265.
6. Guzik, T. J., Korbut, T. and Adamek-Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
7. Hellenbach, E., Vieth, M., Roessner, A., Neumann, M., Malfertheiner, P. and Naumann, M. 2005. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 14981-14988.
8. Kang, H. J., Baick, S. C. and Yu, J. H. 2005. Studies on the properties of the stirred yogurt manufactured by exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**, 84-91.
9. Kawahara, M., Nemoto, M., Nakata, T., Kondo, S., Takahashi, H., Kimura, B. and Kuda, T. 2015. Anti-inflammatory properties of fermented soy milk with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S-SU2 in murine macrophage RAW264.7 cells and DSS-induced IBD model mice. *Int. Immunopharmacol.* **26**, 295-303.
10. Kim, H. J. and Lee, S. Y. 2001. Isolation of exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 370-375.
11. Kim, S. Y., Kim, J. D., Son, J. S., Lee, S. K., Park, K. J. and Park, M. S. 2011. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **43**, 446-452.
12. Ko, K. H., Liu, W., Lee, H. H., Yin, J. and Kim, I. C. 2013. Biological and Functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **42**, 89-95.
13. Lee, H. S., Park, S. H., Chung, H. K. and Choe, T. B. 1993. Antitumor effect of cell wall component purified from *Lactobacillus plantarum*. *KK. J. Gen. Eng.* **5**, 22-28.
14. Lee, H., Yang, S. G., Park, S. N. and Jeon, D. Y. 1992. Effect of *Lactobacilli* on reactive oxygen scavenging and immune stimulation. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**, 290-295.
15. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
16. Marzinzig, M., Nussler, A. K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N. C., Beger, H. G., Morris, S. M. and Bruckner, U. B. 1997. Improved methods to measure end products and nitric oxide in biological fluids: Nitrite, Nitrate, and S-Nitrosothiols. *Nitric Oxide* **2**, 177-189.
17. Nuria, S., Patricia, L., Pablo, G., Javier, M., Esterfania, C., Miguel, G., Ana, S., Celestino, G., Reyes, G. and Patricia, R. M. 2014. Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains in a Wistar rat model. *Biomed. Res. Int.* **2014**, Article ID 106290.
18. Shahani, K. M. and Avebo, A. D. 1980. Role of dietary *Lactobacilli* in gastrointestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2448-2457.
19. Snoeyenbos, G. H. 1979. Role of native intestinal microflora in protection against pathogens. *Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc.* **1979**, 388-393.
20. Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.* **8**, 143-213.
21. Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S. and Schreiber, S. 2002. P38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* **168**, 5342-5351.
22. Yeo, M. H., Kim, D. M., Kim, Y. H., Kim, J. H., Baek, H. and Chung, M. J. 2008. Antitumor activity of CBT-AK5 purified from *Lactobacillus casei* against sarcoma-180 infected ICR Mice. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* **26**, 23-30.

초록 : 프로바이오틱스 생산 exopolysaccharide에 의한 항염증 활성

이승훈¹ · 권민정¹ · 강형택¹ · 정정욱¹ · 김병오² · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²경북대학교 농업생명과학대학 식품공학부)

본 연구에서는 다양한 식품원으로부터 7종류의 프로바이오틱스를 분리하여 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 동정하였으며, 그 결과 *Bacillus* sp.와 *Lactobacillus* sp.로 확인되었다. 먼저 LPS로 활성화 된 RAW 264.7 세포주에 7종의 균주 배양액을 처리한 후, nitric oxide (NO) 생성을 측정하였다. 처리한 균주의 배양액 중 *Bacillus* sp. FG-1 과 *Lactobacillus* sp. FG-6 균주의 배양액 처리군에서 현저하게 NO 생성이 저해되었다. 또한, 이들의 처리에 의해 COX-2, iNOS 그리고 TNF- α 와 같은 pro-inflammatory 유전자의 발현이 감소되었다. 균주가 생산하는 여러 물질 중 exopolysaccharide (EPS)가 항염증 활성과 관련이 있는지를 검증하기 위하여 두 균주로부터 EPS를 분리하여, 이들이 NO 생성에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과, 두 균주가 생산하는 EPS가 NO 생성을 농도의존적으로 저해하였고, pro-inflammatory 유전자의 발현도 현저하게 감소시켰다. 이러한 연구결과는 EPS가 프로바이오틱스가 생산하는 여러 물질 중 항염증 활성의 핵심물질 중의 하나가 될 수 있음을 시사한다.