

김치 유산균 발효 혼합생약재 추출물의 강화된 대식세포 활성

김가을에 · 신현영* · 정세빈 · 하은지 · 정은진* · 신지영** · †유광원***

한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템융합전공 석사과정,
(주)코시스바이오 연구소장, *한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Enhanced Macrophage Stimulatory Activities of Extracts from Kimchi Lactic Acid Bacteria-Fermented Mixed Herbal Medicines

Gaeuleh Kim, Hyun Young Shin*, Se Bin Jeong, Eun Ji Ha,
Eun-Jin Jeong*, Ji-Young Shin** and †Kwang-Won Yu***

Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

**R&D Director, Cosis-Bio Co., Ltd., Jincheon 27867, Korea

***Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To enhance the bioavailability and bioactivities of mixed herbal medicines (RW), they were fermented with lactic-acid bacteria isolated from kimchi into postbiotics (FRW). Then, from the results of the 16s rRNA sequencing analysis, lactic acid bacteria isolated from kimchi were identified to be of two species, namely *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides*. The FRW prepared from the RW were extracted using hot water (HW) and 70% EtOH (EtOH) for comparison of their macrophage-stimulating activities. Based on a comparison of the activities of the FRW extracts, nitric oxide (NO) production of HW was significantly higher than that in EtOH. An analysis of the chemical properties of the extracts showed that HW had higher contents of neutral sugar and uronic acid than EtOH as well as contained a large amount of glucose. In addition, crude polysaccharide (CP) was prepared to enhance the macrophage-stimulating activity. The FRW-CP not only secreted immunostimulatory mediators but also increased the expression of immunostimulatory genes (iNOS, TNF- α , MCP-1, and IL-6). The fractionated FRW-CP contained about 90% neutral sugars, and these sugars were mainly composed of glucose, galacturonic acid, and arabinose. Thus, FRW prepared by fermentation of RW with kimchi lactic acid bacteria were found to be immunostimulatory modulators.

Key words: herbal medicine, lactic acid bacteria, postbiotics, macrophage stimulating activity, crude polysaccharide

서론

COVID-19를 비롯한 각종 전염병과 평균수명의 증가로 인해 환경 및 사회적 요인에 관한 관심과 중요성이 강조되어, 예방 차원의 기능성 식품에 대한 관심이 증가하는 추세이다 (Hsieh & Ofori 2007). 국내 기능성 시장에서 프로바이오틱스 (probiotics)를 고시형 원료로 활용하고 있으나, 프로바이오틱

스는 산에 취약하다는 단점이 있어 위산에 의해 90% 이상 사멸하고 이후 담즙산에 의해 사멸하여 장에 도달하는 건은 5% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다(Chang 등 2015). 이러한 한계점을 뛰어넘은 포스트바이오틱스(postbiotics)가 기능적인 측면에서 우수하다고 보고되고 있으며, 최근 국내에서도 포스트바이오틱스를 기능성 소재로 활용하기 위한 많은 연구가 진행 중이다(Hong SW 2020). 포스트바이오틱스란,

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

건강에 유익한 작용을 주는 프로바이오틱스와 먹이가 되는 프리바이오틱스(prebiotics)가 미생물의 대사과정 중 생성 및 분비되는 인체에 유익한 효과를 내는 대사산물을 의미한다(Kim & Park 2021). 포스트바이오틱스는 최근 항균, 항암, 정장, 염증 및 면역조절, 유해균 억제와 유익균 활성화 등의 다양한 효과가 보고되어 널리 활용되고 있는 것으로 알려져 있다(Cuevas-González 등 2020).

포스트바이오틱스 생산과정에 관여하는 발효는 미생물의 생물 현상으로 원료로부터 유산균과 함께 배양하여 인간에게 유용한 물질을 생산하는 수단이다. 발효에 의한 여러 대사작용은 다양한 유기물 및 2차 대사산물을 포함하고 독특한 풍미를 생산하는 것으로 알려져 있다(Mo 등 2013). 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되어 온 유산균은 인체에 안전하다고 알려진 GRAS(generally recognized as safe) 균주로(Yoon 등 2021), 콜레스테롤 저하(Kang 등 2021), 항암(Han 등 2015), 면역증진(Jeon WM 2011) 등의 효과를 가지고 있어 유산균을 통한 포스트바이오틱스의 소재로 널리 이용되고 있다. 김치 유래 유산균 중 대표적인 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Weissella* 속 등 100여 종 이상의 유산균들이 발효에 관여한다고 알려져 있으며(Kim 등 2013), 이들은 항비만(Park 등 2015), 항돌연변이(Son 등 1998) 및 종양 억제 및 면역증강(Yoon 등 2013) 등 인체에 유익한 효과를 부여하는 것으로 알려져 있다.

최근, 유산균 발효를 통해 천연물에 함유된 활성 성분 및 생리활성의 증가를 목적으로 다양한 연구가 활발하게 진행되고 있으며(Jeon 등 2011), 본 연구에서는 대식세포 활성을 통한 면역활성이 보고된 혼합생약재를 이용하여 유산균-발효 포스트바이오틱스로 개발하고자 하였다(Shin 등 2021). 따라서 혼합생약재의 대식세포 활성을 증진하기 위하여 김치 유래 유산균을 이용하여 발효를 진행하고, 김치 유산균-발효 혼합생약재 추출물을 조제한 후 대식세포 활성을 통한 면역활성을 평가함으로써 생약 소재를 이용한 포스트바이오틱스 기능성 소재로서의 산업적 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 김치 유산균의 분리 및 동정

유산균의 분리는 2021년 가정에서 제조한 김장 김치를 여과하여 사용하였으며, 여과액을 멸균 생리식염수(0.85% NaCl 용액)에 10^5 으로 희석하고 균질화한 후 MRS agar 배지에 접종하여 35°C의 배양기(Vision Science, Daejeon, Korea)에 배양하였다. 배양기에서 48시간 배양 후 배지에서 4개의 단일 콜로니 형성을 확인하였다. 위 4개의 콜로니의 미생물을

동정하기 위해 (주)마크로젠에 의뢰해 16s rRNA 유전자 염기서열 분석을 진행하였으며, 선별된 균주는 25% glycerol stock을 이용하여 -70°C에서 보관하였다.

2. 김치 유산균-발효 혼합생약재의 제조

본 연구에서 사용된 혼합생약재(RW)는 Table 1과 같이 일정 비율로 혼합한 것을 (주)코시스바이오(Chungbuk, Korea)로부터 제공받았다. 위 생약은 grinder(Bazzatra, Gyeonggi, Korea)로 파쇄하여 혼합한 뒤 품질 유지를 위해 -70°C의 급속 냉동기에 보관하여 사용하였다. 선행연구(Shin 등 2021) 결과, 혼합생약재는 대식세포 자극 활성이 우수하였으며, 활성을 강화시키고자 김치로부터 분리된 균주를 이용하여 발효를 진행하였다. 위 선별한 균주를 10^2 배로 희석하고 이를 1 L의 MRS broth 100 mL에 첨가하여 48시간 동안 배양을 진행하였다. 배양된 배양액을 이용하여 혼합생약재 분말 500 g에 배양액 100 mL를 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 건조한 것을 김치 유산균-발효 혼합생약재 포스트바이오틱스(FRW)로 이용하였으며 활성을 비교하기 위하여 발효되지 않은 비발효-혼합생약재(RW)를 대조군으로 이용하였다.

3. 용매추출물 및 조다당 획분 조제

열수추출물(hot water extract; HW)은 포스트바이오틱스 및 비발효-혼합생약재에 20배(w/v)의 증류수를 넣고 decoction 방법으로 처리(90-95°C)한 후 필터를 통해 여과하였다. 여과액을 모아 농축 및 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 20 min)로 얻은 상등액을 동결건조하여 조제하였다. 또한, 주정추출물(70% ethanol extract; EtOH)은 원물의 20배에 해당하는 70%(w/v) 주정을 첨가한 후 2일간 교반하여 여과액을 모아 동일한 방

Table 1. Composition herb of the mixed herbal medicine (RW)

Mixed herbal medicine (RW)	
Composition herb	%
<i>Angelica gigas</i>	25
<i>Cnidium officinale</i>	15
<i>Fallopia multiflora</i>	10
<i>Pueraria montana</i>	10
<i>Atractylodes macrocephala</i>	10
<i>Discorea polystachya</i>	10
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	5
<i>Wolfiporia extensa</i>	5
<i>Sorbus commixta</i>	5
<i>Zingiber officinale</i>	5

법으로 조제되었다. 한편, 대식세포 자극 활성을 증진시키기 위해 조다당 획분을 분획하였는데, 열수추출물을 증류수에 용해하고 5배(w/v)의 주정을 넣어 충분히 교반한 후 원심분리로 침전물을 회수하여 증류수에 용해하였다. 이후 투석(MWCO 12-14 kDa, Spectra/PorTM, Spectrum Lab. Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)하여 투석액을 농축한 후 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide; CP)으로 분획하였다.

4. 화학적 성분 분석

비발효-혼합생약재와 혼합생약재 포스트바이오틱스 추출물의 구성성분을 분석하기 위해 중성당(phenol-sulfuric acid법; DuBois 등 1956), 산성당(*m*-hydroxybiphenyl법; Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973) 및 단백질(Bradford법; Bradford MM 1976) 함량을 각각 glucose, glucuronic acid 및 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 이용하여 분석하고, μg /추출물 mg으로 나타냈다. 또한, 추출물 및 조다당 획분의 구성당은 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2022a)의 PMP 유도체법을 참고하여 HPLC-UV system을 이용하여 분석하고, 그 결과는 response factor를 이용하여 단당류의 mol%로 나타냈다.

5. 대식세포 활성

RAW 264.7 대식세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul)에서 입수하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA) 및 1% penicillin-streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 계대배양하여 사용되었다. 대식세포 자극 활성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 2×10^4 cells/well로 96 well plate에 분주하여 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 세포를 안정화시킨 후 배양 상등액을 모두 제거하고 FBS가 함유되지 않은 serum-free DMEM과 일정 농도로 희석한 시료를 첨가하여 24 시간 동안 재배양하였다. 이후 배양 상등액을 수집하고 대식세포 활성과 관련된 산화질소(nitric oxide, NO) 및 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1; BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 griess assay(Tursun 등 2016) 및 sandwich ELISA로 측정된 후 각각의 reference standard 및 sodium nitrate로 표준 곡선을 그려 함량을 계산하였다. 시료 처리에 대한 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen) 시약을 이용하여 550 nm의 흡광도에서 측정하였으며, 시료 무처리군(negative control; NC) 대비 세포생존율(cell viability, %)로 나타냈다.

6. qRT-PCR을 이용한 유전자 발현량 분석

RAW 264.7 세포주를 2×10^4 cells/dish로 60 mm dish에 분주하여 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 세포를 안정화시킨 후 배양 상등액을 모두 제거하고 serum-free DMEM과 일정 농도로 희석한 시료를 첨가하여 24시간 동안 재배양하였다. 이후 배양 상등액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)을 이용하여 세척한 후 total RNA는 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하였으며, 분리한 RNA는 Nanoquant Infinite M200 Pro(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 이후 ReverTraAce qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. mRNA 발현은 SYBR green PCR kit(Toyobo Co., Ltd.)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 real-time PCR을 진행하였다. PCR은 QuantStudio 3 real-time PCR system(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용해 수행하였으며 각각의 유전자 발현은 동일한 시료를 처리한 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 발현량을 이용하여 보정하였다. Primer sequence는 Table 2에 나타냈다.

7. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하여 진행하였으며 결과는 평균 \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 대식세포 자극 활성 및 유전자 발현량의 경우, SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 대조군과의 유의성을 검정하였으며, 구성성분 분석은 유의성 평가를 위해 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 유산균의 분리 및 동정

균주의 동정 방법은 PCR이나 16s rRNA sequencing 등을 이용한 분자생물학적 방법들이 주로 이용되며, 기술이 발전함에 따라 신속하고 정확한 결과가 확인된다(Choi 등 1998). 또한, 16s rRNA sequencing은 여러 종간의 유전자가 잘 보존되어 있어, 현재 미생물 동정에서 주로 이용되고 있다(Clarridge JE III 2004). 김치 여과액을 MRS agar에 분주하여 4개의 콜로니를 확인하였으며, 이를 16s rRNA sequencing으로 분석한 결과(Table 3, Fig. 1), *Lactobacillus sakei* 2종 및 *Leuconostoc mesenteroides* 2종으로 확인되었다. 국내에는 여

Table 2. Primer sequence of macrophage stimulator for qRT-PCR

Genes	Primer	Primer sequence (5'→3')	Accession number
<i>iNOS</i>	Forward	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	NM_010927.4
	Reverse	ACGTTCTCCGTTCTCTTGACG	
<i>TNF-α</i>	Forward	CCCACGTCGTAGCAAACCA	NM_013693.3
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTGG	
<i>MCP-1</i>	Forward	CAGGTCCTGTCATGCTTCT	NM_011333.3
	Reverse	AGTGGGGCGTTAACTGCAT	
<i>IL-6</i>	Forward	TCACAGAGGATAACCACTCCC	NM_031168.2
	Reverse	GAATTGCCATTGCACAACCTCTT	
<i>GAPDH</i>	Forward	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	NM_001289726.1
	Reverse	CCAATACGGCCAAATCCGTTTC	

Table 3. 16s rRNA sequencing dataset description of lactic acid bacteria isolated from kimchi

Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-value	Match/Total	Pct. (%)
LC064899.1	<i>Lactobacillus sakei</i>	1,521	17	1,521	98	2,763	0	1,502/1,505	99
LC064899.1	<i>Lactobacillus sakei</i>	1,521	20	1,521	98	2,750	0	1,498/1,502	99
CP012009.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,818,633	377,343	375,856	0	2,743	0	1,489/1,493	99
CP012009.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,818,633	377,343	375,856	0	2,724	0	1,484/1,488	99

러 다양한 발효식품이 있으며, 이를 통해 분리된 균주는 매우 다양한 것으로 보고되고 있다(Rhee YK 2018). 김치 발효에는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속의 유산균이 주로 관여한다는 사실이 밝혀졌으며, 이중 *Lactobacillus*는 적숙기 이후에 우점종으로 검출되고 *Leuconostoc*은 발효 초기와 적숙기에 주로 나타나는 것으로 보고되고 있다(Lee 등 1992). 최근, Lee 등(2022) 및 Jung 등(2021a)의 연구에서 분리된 유산균을 통해 발효를 진행하여 생리활성을 증진시키고자 하는 노력이 끊이지 않고 있으며, 본 연구에서도 김치 유래 혼합 균주 2종을 이용하여 혼합생약재의 발효를 진행하고 추출물의 대식세포 활성을 평가하였다.

2. 김치 유산균-발효 혼합생약재 추출물의 화학적 분석

추출물의 구성분 및 구성당 분석결과는 Table 4에 나타났다. 비발효 혼합생약재의 경우, 중성당(RW-HW; 675.3 µg/mg 및 RW-EtOH; 567.3 µg/mg)이 가장 높은 함량을 나타냈으며 산성당(RW-HW; 139.5 µg/mg 및 RW-EtOH 60.2 µg/mg)과 단백질(RW-HW; 1.9 µg/mg 및 RW-EtOH; 3.7 µg/mg)이 소량 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 김치 유산균-발효 혼합생약재의 경우에도 중성당(FRW-HW; 680.8 µg/mg, FRW-EtOH; 617.0 µg/mg), 산성당(FRW-HW; 133.8 µg/mg, FRW-EtOH; 74.2 µg/mg) 및 단백질(FRW-HW; 1.3 µg/mg, FRW-EtOH; 5.0

µg/mg)의 구성에서 비발효-혼합생약재와 유사한 것으로 확인되었다. 그러나 추출물간 구성분에서는 유의적인 차이를 나타내어 가장 높은 비율을 보인 중성당뿐만 아니라, 산성당에서도 열수추출물이 주정추출물보다 높은 함량을 나타내었다. 한편, 구성당 분석에서는 모든 추출물에서 glucose가 가장 높은 함량을 나타내었으나 RW(HW 74.2와 EtOH 75.4%)보다 FRW에서 다소 증가하였고(80.2와 87.4%), galactose는 FRW에서 현저히 감소(RW 11.9와 17.0%; FRW 4.5와 3.9%)되어 발효과정을 통한 전환과정을 확인할 수 있었다. 또한, HW에서는 galacturonic acid가 RW 4.5% 및 FRW 6.2%를 보인 반면, 주정추출물에서는 확인되지 않아 추출물간의 차이를 확인할 수 있었으며, arabinose(4.1~6.9%)와 mannose, rhamnose 및 xylose 등은 비발효와 포스트바이오틱스 및 추출물간 큰 차이없이 소량 함유됨을 알 수 있었다. 따라서 비발효-혼합생약재 및 김치 유산균-발효 혼합생약재 추출물간의 몇 가지 중요한 구성분과 구성당의 차이를 확인할 수 있었으며, 발효의 여부에 따라 대식세포 자극 활성의 증진 여부를 평가하기 위해 RAW 264.7 세포주를 이용하여 자극 활성을 비교하였다.

3. 김치 유산균-발효 혼합생약재 추출물의 대식세포 활성

마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 추출물의 대식세포 활성을 평가하였다. 대식세포 활성 인자를 확인하기 전 MTT법을 통해 시료 처리에 따른 RAW 264.7

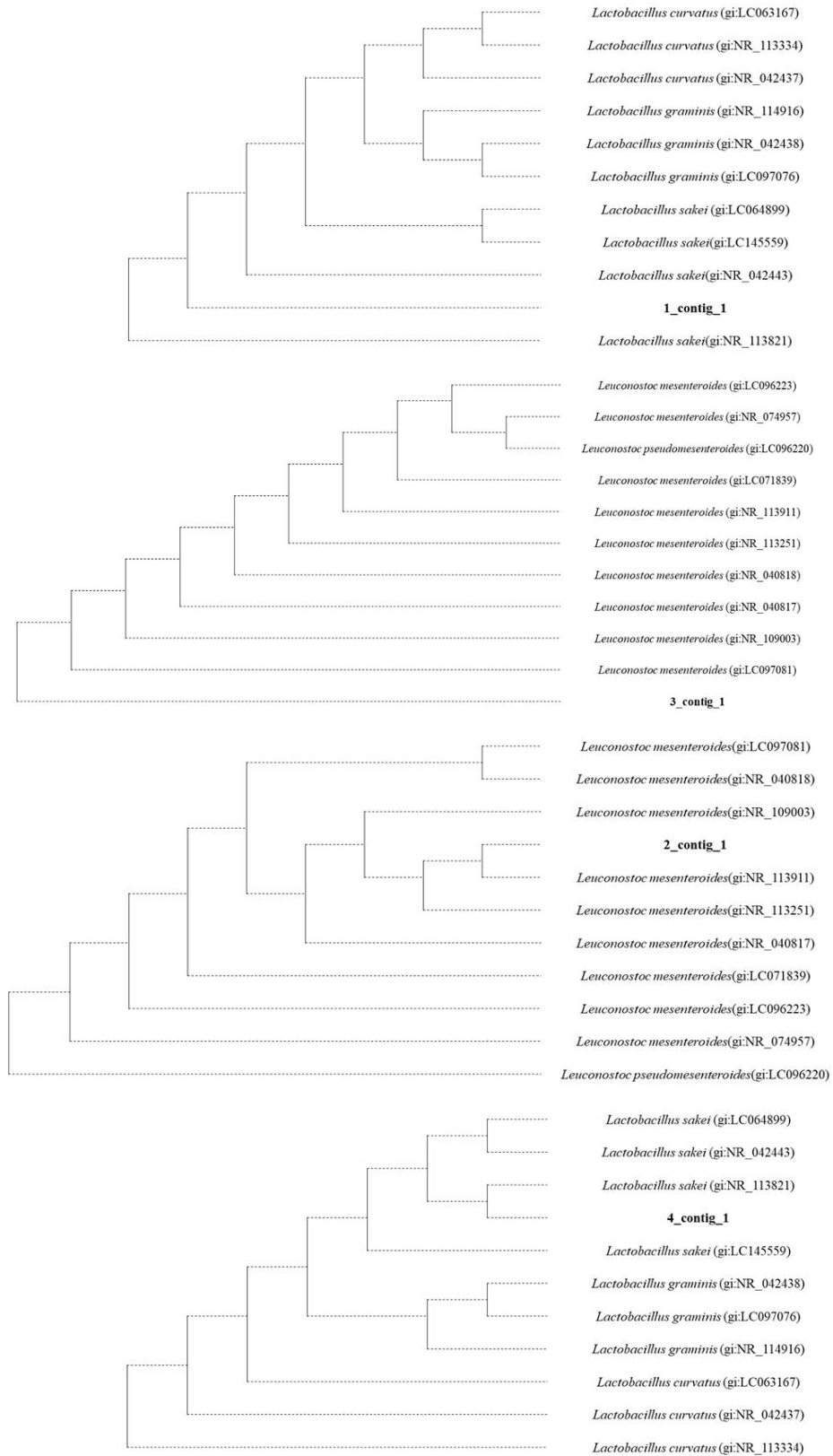


Fig. 1. 16s rRNA gene sequencing analysis of lactic acid bacteria isolated from kimchi.

Table 4. Chemical properties of extracts from RW and FRW

Sample	RW		FRW	
	HW	EtOH	HW	EtOH
Neutral sugar ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	675.3 \pm 14.0 ^{aA1)}	567.3 \pm 32.5 ^{aC}	680.8 \pm 14.9 ^{aA}	617.0 \pm 16.3 ^{aB}
Uronic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	139.5 \pm 9.5 ^{ba}	60.2 \pm 3.7 ^{bc}	133.8 \pm 4.4 ^{ba}	74.2 \pm 5.2 ^{bb}
Protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	1.9 \pm 0.3 ^{cC}	3.7 \pm 0.4 ^{cB}	1.3 \pm 0.4 ^{cC}	5.0 \pm 0.1 ^{ca}
Monosaccharide	Sugar composition (mol%)			
Mannose	1.8 \pm 0.5	2.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.0	2.2 \pm 0.0
Rhamnose	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	-
Glucuronic acid	-	-	-	-
Galacturonic acid	4.5 \pm 0.4	-	6.2 \pm 0.7	-
Glucose	74.2 \pm 0.3	75.4 \pm 0.9	80.2 \pm 0.5	87.4 \pm 0.0
Galactose	11.9 \pm 0.1	17.0 \pm 0.2	4.5 \pm 0.0	3.9 \pm 0.1
Xylose	0.2 \pm 0.1	-	-	-
Arabinose	6.5 \pm 0.2	4.1 \pm 0.9	6.9 \pm 0.2	6.5 \pm 0.1
Fucose	-	-	-	-

¹⁾ Mean \pm SD (n=3). Means with different capital letters in the same row and small letters in the same column are significantly different between groups at $p < 0.05$ level through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

세포 생존율을 확인한 결과(Fig. 2A), 추출물 4종 모두 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 시료 무처리군 대비 80% 이상 세포 생존율을 확인하였다. López-García 등(2014)의 연구에서 세포 생존율이 80% 이상으로 확인되면 시료에 대한 세포 독성은 나타나지 않는다고 판단하기 때문에 이후 대식세포 활성화 관련 인자인 NO, TNF- α 및 MCP-1 생성능을 평가하였다. 먼저, NO 생성 평가 결과(Fig. 2B), 양성 대조군으로 이용된 LPS는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC 대조군(8.5 μM) 대비 59.5 μM (7.0배 증진)의 생성능을 나타내었으나, 열수추출물인 RW-HW와 FRW-HW는 11.7 μM 수준으로 NC 대조군 대비 통계적으로 유의한 1.4배의 생성 증진능을 확인하였으나 비발효물보다 포스트바이오틱스의 증진능은 보이지 않았고, 주정추출물인 RW-EtOH 및 FRW-EtOH는 통계적으로 유의한 NO 생성을 확인할 수 없었다. 또한, TNF- α 및 MCP-1 생성능의 경우에서도 NC 대조군 대비 통계적으로 유의한 생성은 확인되지 않았다. 이는 Shin 등(2021)의 선행연구에서 생약혼합제의 용매추출물의 대식세포 자극 활성화 결과, 주정 추출물에 비해 열수추출물만이 대식세포 자극 활성을 나타내는 것과 유사한 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로, 주정추출물인 EtOH는 통계적으로 유의한 대식세포 활성이 확인되지 않았으나, 열수추출물인 HW에서는 미량의 NO 생성이 확인되어 대식세포 활성을 증진시키기 위해 열수추출물의 에탄올 침전을 이용하여 조다당 획분을 분획한 후 대식세포 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.

4. 조다당 획분의 대식세포 활성화

열수추출물의 주정 침전으로 분획되는 조다당 획분은 일반적으로 단백다당이나 다당류로 구성된 고분자 획분을 포함하는 것으로 알려져 있다(Kim 등 2010). 또한, Shin 등(2022b)은 대식세포 활성화에서 추출물로 분리된 고분자 조다당 획분이 대식세포 활성화와 함께 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 및 NF- κ B 관련 기전을 자극한다고 보고하였으므로, 본 연구에서도 혼합생약재 포스트바이오틱스의 열수추출물로부터 조다당 획분을 분획하여 대식세포 활성의 증진여부를 평가하였다. 조다당 획분의 대식세포 활성화는 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 평가하였고, 세포독성 평가(Fig. 3A)에서는 NC 대조군 대비 세포 생존율이 80% 이상으로 확인되었다. 일반적으로 대식세포 활성화는 NO와 같은 인자 이외에 면역반응에서 필수적으로 사이토카인 및 케모카인 등이 동반되는데, 대표적인 사이토카인으로 TNF- α 및 IL-6 등이 있다(Jung 등 2021b). 먼저, NO 생성능 평가 결과는 Fig. 3B에 나타내었는데, 양성 대조군으로 이용된 LPS는 NC 대조군(2.1 μM) 대비 61.5 μM (28.6배 증진)의 생성능을 보였으나, 열수추출물에서는 RW와 FRW간에 통계적으로 유의한 NO 생성 증진능을 보이지는 않았다. 그러나 조다당 획분에서는 NC 대조군 대비 RW-CP는 22.5~33.2 μM (10.5~15.4배 증진)의 생성능을 보인 반면, 김치 유산균-발효 혼합생약재의 조다당 획분(FRW-CP)은 31.6~40.6 μM (14.7~18.9배 증진)으로 유의적으로 증진된 NO 생성능을 나타냈다. 또한, TNF- α

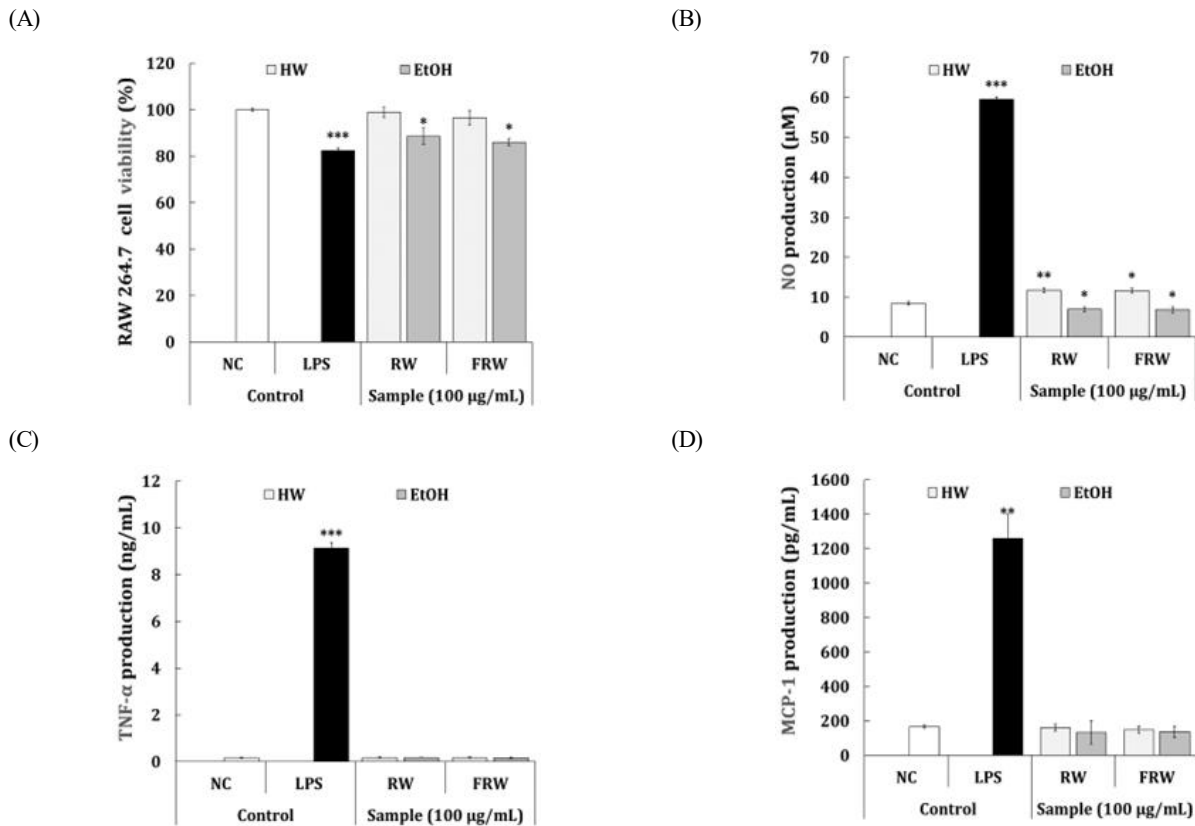


Fig. 2. Macrophage stimulating activity of extract from kimchi-lactic acid bacteria-fermented mixed herbal medicines. Macrophage stimulating activity evaluates RAW 264.7 cell line as macrophage stimulating related factors produced after cultivating 24 hr with each extract. RAW 264.7 cell cytotoxicity (A), production of NO (B), TNF- α (C), and MCP-1 (D). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant difference between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; only medium was used as negative control, LPS (lipopolysaccharide, 1 μ g/mL); positive control, HW or EtOH; hot-water extract or 70% ethanol extract.

의 생성능(Fig. 3C)에서도 양성 대조군으로 이용된 LPS는 NC 대조군(0.4 ng/mL) 대비 57.0 ng/mL(131.2배 증진)의 생성능을 나타내고, 열수추출물에서는 미비한 활성을 나타낸 반면, FRW-CP에서는 NC 대조군 대비 RW-CP에 비해 우수한 TNF- α (8.3~16.3 ng/mL; 19.1~37.6배 증진) 생성능을 나타냈다. 마지막으로, MCP-1의 생성능 평가 결과(Fig. 3D)에서도 FRW-CP는 동일한 농도 범위에서 NC 대조군(29.8 pg/mL) 대비 115.5~201.0 pg/mL(3.9~6.8배 증진)의 MCP-1 생성을 나타내었다. 결론적으로 조다당 획분의 경우에는 모든 바이오 마커에서 열수추출물과는 달리 대식세포 활성이 증진된 것을 보임으로써, 비발효 혼합생약재(RW)보다 포스트바이오틱스인 FRW가 대식세포 활성에서 우수한 소재임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등(2011)이 미강에 유산균종을 이용하여 발효한 결과, 비장세포 증식능이 증진된 것과 보리를 효소,

효모 및 유산균을 통해 발효한 조다당 획분이 우수한 대식세포 활성을 나타내는 결과(Kim 등 2018)와 유사한 경향을 나타내었다. 하지만, Jang & Kim(2013)의 연구에서 김치 발효에 관여하는 유산균이 면역조절 기능이 있음을 보고하고 있으며, 본 결과에서 포스트바이오틱스인 FRW 조다당 획분의 대식세포 자극 활성이 유산균 사균 추출에 의한 것인지 발효 혼합 생약재 유래 다당류의 증진인지는 추후 분석이 필요할 것으로 판단된다. 또한, Jeon 등(2011)의 연구에서 비발효균에 비해 유산균 발효에 따라 생리활성이 증진된 점, 발효에 의해 특정 성분의 조성이 변한 점들을 비롯해볼 때, 유산균의 발효에 의해 성분의 변화 및 활성을 나타내는 것으로 추정된다. 따라서 혼합생약재 RW는 김치 유래 유산균으로 발효한 포스트바이오틱스의 열수추출물을 조다당 획분으로 분획할 때 대식세포 활성이 증진되어 면역활성을 증진시키고

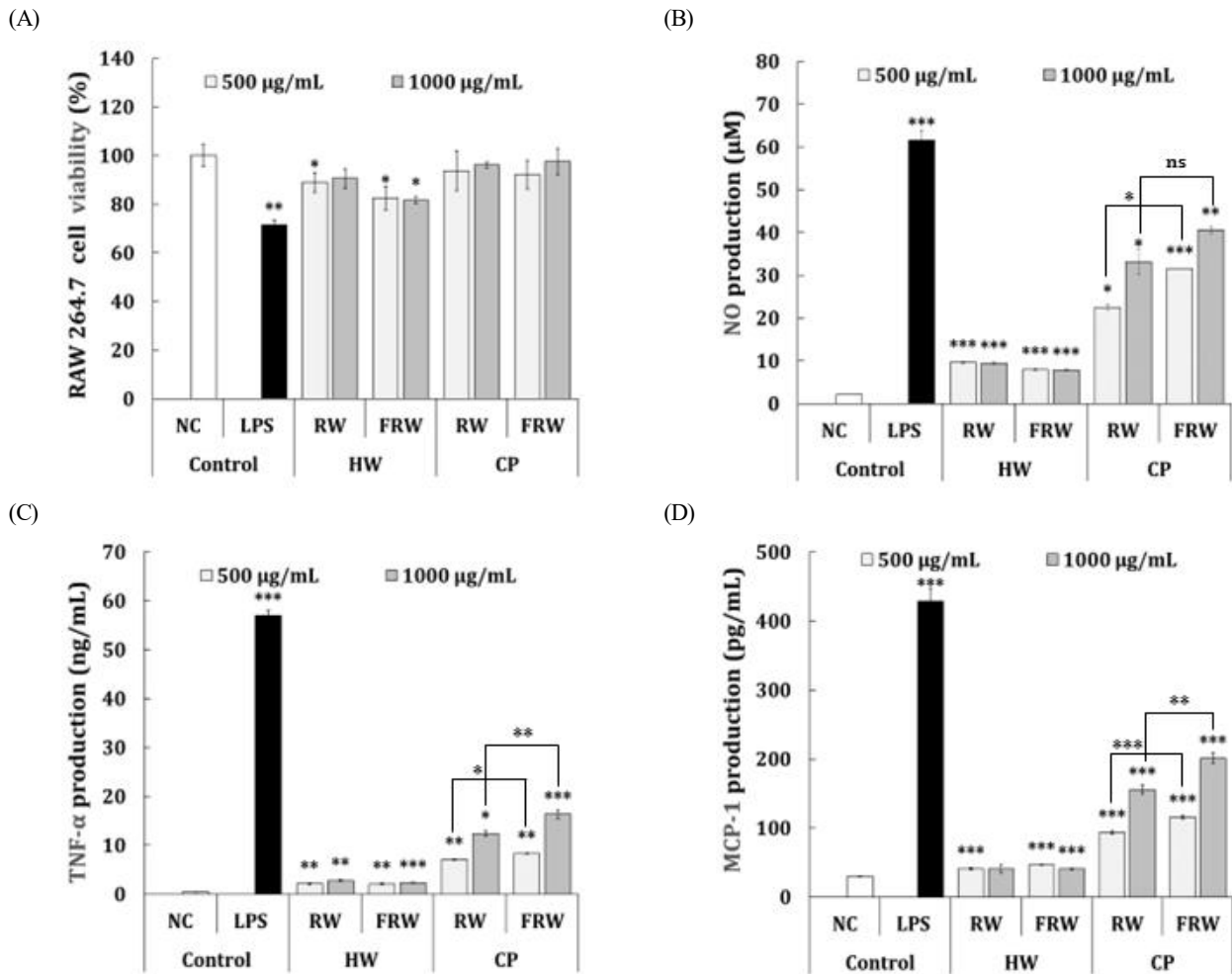


Fig. 3. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide from kimchi-lactic acid bacteria-fermented mixed herbal medicines. Macrophage stimulating activity evaluates RAW 264.7 cell line as macrophage stimulating related factors produced after cultivating 24 hr with each crude polysaccharide. RAW 264.7 cell cytotoxicity (A), production of NO (B), TNF- α (C), and MCP-1 (D). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant difference between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; only medium was used as negative control, LPS (lipopolysaccharide, 1 µg/mL); positive control, HW or CP; hot-water extract or crude polysaccharide.

있음을 나타냄으로써 면역 관련 포스트바이오틱스의 기능성 소재로서의 높은 활용 가능성을 기대하게 해주었다.

5. 조다당 획분의 대식세포 활성화인자 관련 유전자 발현량

대식세포 활성측정을 통해 김치 유산균-발효 혼합생약재 포스트바이오틱스의 조다당 획분이 대식세포 활성화인자인 TNF- α , MCP-1 및 NO의 생성을 비발효물의 조다당 획분보다 증진시킨 결과를 나타냈다. 따라서, 관련 유전자인 iNOS(inducible nitric oxide synthase), TNF- α , MCP-1 및 IL-6의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 분석하였다(Fig. 4). iNOS는 신경과 내피

에서 지속적으로 발현되는 eNOS나 nNOS와는 달리 사이토카인, 산화스트레스 및 염증반응에 의해 유도되어 NO를 생산하여 활성화된 면역세포에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다(Lee 등 2008). iNOS의 mRNA 유전자 발현량 결과는 Fig. 4A에 나타내었는데, FRW-CP는 125~1,000 µg/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 13.4~32.7배의 농도- 의존적인 발현량 증가를 확인할 수 있었다. 또한, TNF- α 도 FRW-CP 시료 처리 시 동일 농도 범위에서 NC 대조군 대비 1.8~3.6배의 농도- 의존적인 mRNA 발현량을 증가시켰다(Fig. 4B). 한편, MCP-1은 NC 대조군 대비 125 µg/mL의 농도에서는 통계적으

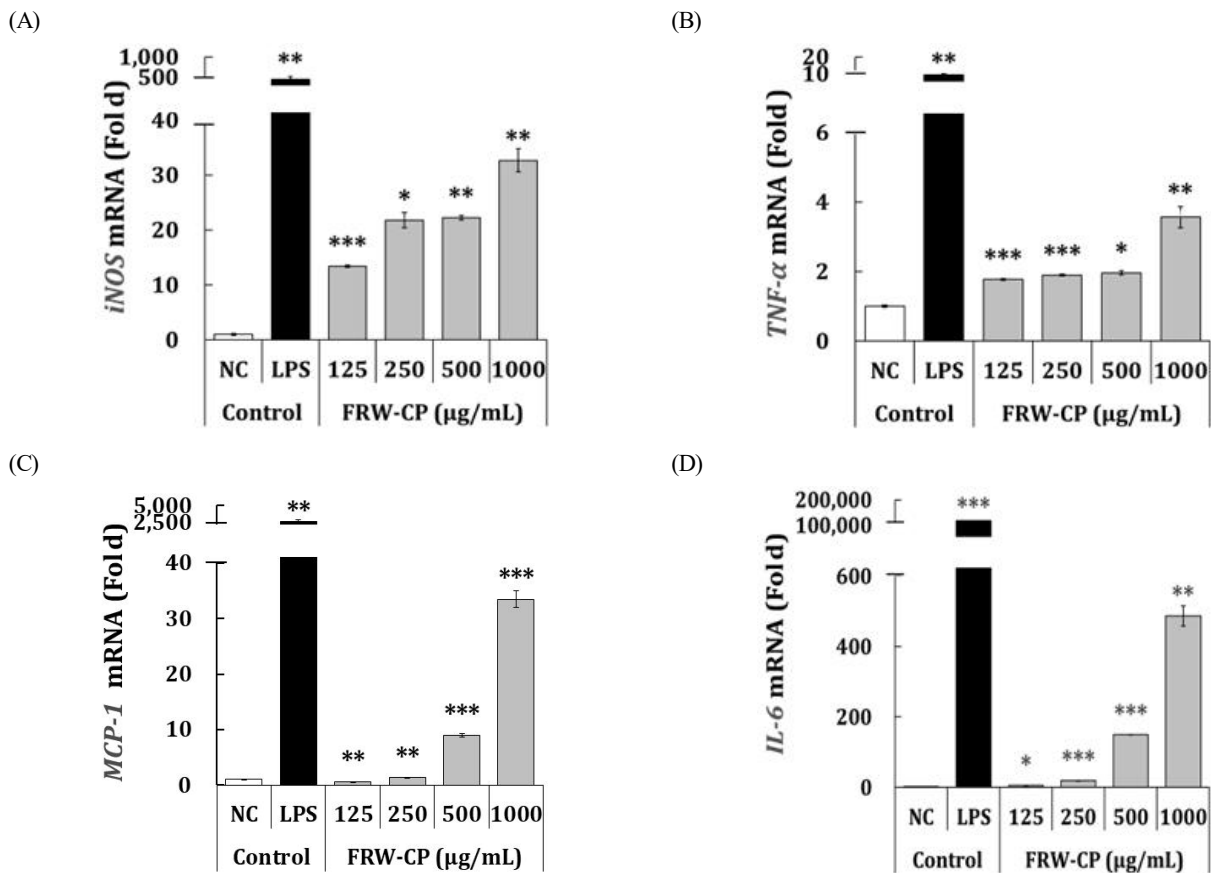


Fig. 4. Effect of FRW-CP on the iNOS (A), TNF- α (B), MCP-1 (C), and IL-6 (D) mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with FRW-CP at doses of 125~1,000 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h, and mRNA expression was quantified using qRT-PCR. Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent test in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant difference between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; only medium was used as negative control, LPS (lipopolysaccharide, 1 $\mu\text{g/mL}$); positive control.

로 유의한 mRNA 발현량의 증가는 없었으나, 250~1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서는 농도-의존적으로 1.3~33.5배의 mRNA 발현량이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 4C). 마지막으로, IL-6는 ELISA를 통한 배양 상등액에서 유의적인 차이를 확인하지 못했으나(data not shown), IL-6 mRNA 발현량은 동일한 농도 범위에서 NC 대조군 대비 4.9~486.9배의 통계적으로 유의한 유전자 발현량을 나타냈다(Fig. 4D). 따라서, 혼합생약재 포스트바이오틱스의 조다당 획분인 FRW-CP는 대식세포 활성화인자의 유전자 발현량이 농도-의존적으로 증가하는 것을 확인하였으므로 향후 Son 등(2022)의 연구에서 제시된 대식세포 자극 활성 기작인 MAPK 및 NF- κ B와 관련된 분자 기전 분석을 진행하고자 한다.

6. 조다당 획분의 구성성분 및 구성당

대식세포 활성이 비발효물보다 우수하였던 김치 유산균-

발효 혼합생약재 조다당 획분(FRW-CP)의 구성분 분석결과 (Table 5), 중성당은 898.6 $\mu\text{g/mg}$ 을 나타냈으며, 산성당 131.3 $\mu\text{g/mg}$ 및 단백질 3.3 $\mu\text{g/mg}$ 으로 확인되었다. 또한, 비 발효 조다당 획분의 수율은 이전 선행결과(Shin 등 2021)와 비교하였을 때, 4.2%로 보고되었으나, 발효를 진행한 FRW-CP는 원물 대비 약 1.5배 우수한 6.7%의 수율을 나타냈다. 이와 같은 결과는 비발효 혼합생약재보다 대식세포 자극 활성 증진 및 수율의 증가를 통해 산업적으로 활용 가능성이 높은 소재임을 확인할 수 있었다. 앞선, 열수추출물과 비교하여 상대적으로 조다당 획분의 중성당 함량은 증가(680.8→898.6 $\mu\text{g/mg}$)하였으며, 산성당(133.8→131.3 $\mu\text{g/mg}$) 및 단백질(1.3→3.3 $\mu\text{g/mg}$)은 유사한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 구성당 분석을 통해 glucose가 80.4%로 대부분을 차지하였으며, galacturonic acid (10.2%), arabinose(4.4%) 및 galactose(3.9%)로 확인되었으며 mannose, rhamnose 및 xylose가 소량 분포하는 것으로 확인되

Table 5. Yield and chemical properties of FRW-CP

Sample	FRW-CP
Yield ¹⁾ (%)	6.7
Neutral sugar (µg/mg)	898.6±45.5 ^{a2)}
Uronic acid (µg/mg)	131.3±3.9 ^b
Protein (µg/mg)	3.3±0.6 ^c
Sugar composition (mol %)	
Mannose	0.2±0.0
Rhamnose	0.8±0.1
Glucuronic acid	-
Galacturonic acid	10.2±0.1
Glucose	80.4±0.3
Galactose	3.9±0.0
Xylose	0.2±0.0
Arabinose	4.4±0.1
Fucose	-

¹⁾ Yield (%) was calculated against raw materials.

²⁾ Mean±SD (n=3). Means with different letters in the same column are significantly different between groups at $p<0.05$ level through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

었다. 열수추출물과 glucose(80.2→80.4%)는 유사하였으나, galacturonic acid(6.2→10.2%)는 소량 증가하였고 arabinose(6.9→4.4%), galactose(4.5→3.9%) 및 mannose(1.5→0.2%)의 감소를 확인하였다. 또한, 선행연구(Shin 등 2021)에서 비발효 혼합생약재인 RW-CP가 glucose 59.2% 및 galacturonic acid 29.5%와 함께 arabinose 5.0%와 galactose가 4.5% 함유된 결과와 비교할 때, FRW-CP는 glucose가 현저히 증가하면서 galacturonic acid는 감소하여 발효과정으로 대식세포 활성화 다당류가 생성 또는 전환된 것으로 추정할 수 있었다. 이전 연구에서, 유산균을 포함한 다양한 미생물의 발효를 통한 생물학적 전환기법을 통해 새로운 다당류를 보고하고 있으며(van den Berg 등 1995), 향후 ion-exchange column chromatography와 size-exclusion을 통해 분리·정제한 후 비발효 혼합생약재와 발효-생약혼합재의 구성당과 methylation analysis를 통해 결합양식을 밝히고자 한다.

요약 및 결론

혼합생약재의 이용 가능성과 대식세포 활성을 증진시키기 위해 김치에서 분리된 유산균을 이용하여 김치 유산균-발효 혼합생약재를 조제하였다. 16s rRNA 염기서열 분석결과, 김치에서 분리된 유산균은 *Lactobacillus sakei* 및 *Leuconostoc mesenteroides*로 확인되었으며, 혼합 균주 2종을 이용하여 혼

합생약재에 배양하였다. 혼합 균주를 통한 배양 후 각각 열수추출 및 주정추출을 진행하고 구성성분 및 대식세포 자극 활성을 평가하였다. 대식세포 활성을 비교한 결과, 열수 추출물이 통계적으로 유의한 NO 생성을 나타냈으나, TNF- α 및 MCP-1은 유의한 차이를 나타내지 않았다. 구성성분 분석결과, 추출물 4종은 중성당을 가장 높은 비율로 함유했으며 열수추출의 경우 주정추출에 비해 높은 산성당 함량을 가지고 있었다. 또한, 모든 추출물의 주요 구성당은 glucose로 확인되었으나, 발효 후 glucose의 증가와 galactose의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 또한, 대식세포 활성을 증진시키고자 조다당 희분을 조제한 후 조다당 희분의 대식세포 활성 분석결과, 혼합생약재 포스트바이오틱스가 비발효 혼합생약재에 비해 우수한 대식세포 자극 활성을 나타냈다. 대식세포 활성 인자를 mRNA 수준에서 분석한 결과, 125~1,000 µg/mL의 농도 범위에서 iNOS, TNF- α , MCP-1 및 IL-6의 mRNA 유전자 발현량이 농도-의존적으로 증가하였다. 한편, 우수한 대식세포 활성을 나타낸 FRW-CP는 비발효 혼합생약재의 RW-CP보다 glucose가 현저히 증가하면서 galacturonic acid는 감소하여, 발효과정을 통해 대식세포 활성화 다당류가 생성되어 기능성소재로서의 김치 유산균-발효 혼합생약재 포스트바이오틱스의 산업적인 활용가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 논문은 2021년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업(2021RIS-001; 프로젝트랩)의 결과입니다.

References

- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Chang BY, Han JH, Cha BS, Ann SH, Kim SY. 2015. Optimization of culture condition for enhancing the probiotics functions. *J Food Hyg Saf* 30:295-301
- Choi SH, Kwon WH, Goh JS, Lee BJ, Kim PH. 1998. Comparative study on biochemical and molecular genetical methods for identification of species and strains of bifidobacteria. *Korean J Dairy Sci* 20:261-272
- Clarridge JE III. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence

- analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840-862
- Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res Int* 136:109502
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Han HN, Eom SH, Kim JH, Kim DH, Kim SH, Kim Y, Yeom SM, Kim YM. 2015. Effects of lactic acid bacterial fermentation on the antioxidant and anti-inflammatory activity of brown algae *Eisenia bicyclis* extract. *Korean J Fish Aquat Sci* 48:151-157
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Hong SW. 2020. Postbiotics: Next-generation of lactic acid bacteria. *Livest Food Sci Ind* 9:11-19
- Hsieh YHP, Ofori JA. 2007. Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr* 1:65-73
- Jang JY, Kim TW. 2013. Lactic acid bacteria in kimchi and their immunomodulatory activities. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics* 1:28-37
- Jeon JM, Choi SK, Kim YJ, Jang SJ, Cheo JW, Lee HS. 2011. Antioxidant and antiaging effect of ginseng berry extract fermented by lactic acid bacteria. *J Soc Cosmet Sci Korea* 37:75-81
- Jeon WM. 2011. The functions of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *J Dairy Sci Biotechnol* 29:55-58
- Jung DB, Choi HJ, Yun MY. 2021a. Study on efficacy evaluation of deramal bioactive properties of the *Prunus tomentosa* fruits fermented with *Lactobacillus acidophilus*. *J Korean Soc Cosmetol* 27:949-956
- Jung J, Shin M, Jeong N, Hwang D. 2021b. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *Clematis trichotoma* Nakai. *Korean J Clin Lab Sci* 53:165-173
- Kang MG, Jo DM, Oh DK, Song YJ, Kim YM, Park SK. 2021. Functional characteristics of lactic acid bacteria isolated from Jeju island traditional fermented food. *Korean J Fish Aquat Sci* 54:733-741
- Kim BY, Park SS. 2021. The concepts and applications of postbiotics for the development of health functional food product. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics* 7:14-22
- Kim DJ, Ryu SN, Han SJ, Kim HY, Kim JH, Hong SG. 2011. *In vivo* immunological activity in fermentation with black rice bran. *Korean J Food Nutr* 24:273-281
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. *Korean J Food Sci Technol* 42:223-232
- Kim HW, Jee HS, Shin KS. 2018. Polysaccharide isolated from fermented barley extract activates macrophages via the MAPK and NF- κ B pathways. *Korean J Food Sci Technol* 50:555-563
- Kim J, Kim JY, Kim MS, Roh SW, Bae JW. 2013. *Lactobacillus kimchiensis* sp. nov., isolated from a fermented food. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1355-1359
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 20:102-109
- Lee HJ, Park SE, Choi JH, Kim KM. 2022. Biological activity of *Brassica oleracea* var. *capitata* fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Preserv* 29:241-253
- Lee K, Kim H, Jung H, Lee H. 2008. Effect of *Chungsangbohatang* on LPS induced anti-inflammatory in THP-1 cells. *J Intern Korean Med* 29:12-24
- López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater* 5:43-57
- Mo HW, Jung YH, Jeong JS, Choi KH, Choi SW, Park CS, Choi MA, Kim ML, Kim MS. 2013. Quality characteristics of vinegar fermented using Omija (*Schizandra chinensis* Baillon). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:441-449
- Park KB, Jeon JI, Cha YS. 2015. Quality characteristics of kimchi storage conditions and adipocyte differentiation inhibitory effects of lactic acid bacteria. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics* 3:8-13
- Rhee YK. 2018. Postbiotics: Development of novel probiotic product. *Food Ind Nutr* 23:7-12
- Shin HY, Hwang KC, Mi XJ, Moon SK, Kim YJ, Kim H. 2022b. Rhamnogalacturonan I-rich polysaccharide isolated from fermented persimmon fruit increases macrophage-stimulatory activity by activating MAPK and NF- κ B signaling.

- J Sci Food Agric* 102:2846-2854
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Shin JC, Choi SY, Suh HJ, Moon SK, Yu KW. 2022a. Immunostimulatory polysaccharide fractionated from a liquid culture by *Phellinus linteus* mycelium. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:19-27
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Son SU, Lee SJ, Shin KS. 2022. Immunostimulating and intracellular signaling pathways mechanism on macrophage of rhamnogalacturonan-I type polysaccharide purified from radish leaves. *Int J Biol Macromol* 217:506-514
- Son TJ, Kim SH, Park KY. 1998. Antimutagenic activities of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Korean Assoc Cancer Prev* 3:65-74
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- van den Berg D, Robijn GW, Janssen AC, Giuseppin M, Vreeker R, Kamerling JP, Vliegenthart J, Ledebor AM, Verrips CT. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl Environ Microbiol* 61:2840-2844
- Yoon JA, Lee YJ, Park EH, Chung BH, Kim MD. 2021. Health-promoting properties of lactic acid bacteria isolated from kimchi: A review. *J Agric Life Environ Sci* 33:237-249
- Yoon SS, Park YS, Choi HJ. 2013. Genetics and research revolutions in the lactic acid bacteria: Focused on probiotics and immunomodulation. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics* 1:9-19
-

Received 26 August, 2022

Revised 30 September, 2022

Accepted 11 October, 2022