

Original Article

Immunomodulatory effects of mixed *Weissella cibaria* JW15 with water extract of black soybean and burdock on *Listeria monocytogenes* infection in mice.

Ho-Eun Park, Wan-Kyu Lee*

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

The objective of this study is to assess immunomodulatory effects of mixed *Weissella (W.) cibaria* JW15 strain with water extract of black soybean (*Glycine max*) and burdock (*Arctium lappa*) on *Listeria (L.) monocytogenes* infection in mice. Female 7-9 week old BALB/c mice were given a daily dose of 1×10^9 CFU of viable JW15 and JW15 mixed with black soybean (BS) and burdock (BD) in 200 μ L PBS for 2 weeks. The normal control group (NC) and positive control group (PC) were given 200 μ L PBS. After 2 weeks, mice were infected with *L. monocytogenes* (1.0×10^5 CFU/mouse) via the tail vein. The NC was injected with 100 μ L PBS without *L. monocytogenes*. After 2 days, mice were euthanized and their body weights were determined. In addition, their livers and spleens were weighed, and serum were analyzed for cytokine (Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α)) production. The survival rate was monitored using 5 mice in each group in the same way above until the mice died. Two days after infection with *L. monocytogenes*, mean spleen weight per body weight (g/kg) of JW15 (5.4 ± 0.88 g/kg), JW15 + BS (6.0 ± 0.64 g/kg), and JW15 + BD (5.3 ± 0.38 g/kg) group were significantly lower than that of the PC (6.8 ± 0.57 g/kg). The level of IL-1 β in the serum of JW15 + BD (113.6 ± 31.03 pg/mL) was significantly higher than that of the JW15 (67.9 ± 15.15 pg/mL). Collectively, combination *W. cibaria* JW15 and water extract of BS and BD have ability to induce synergistic immunomodulative effects and are suitable for consideration as a functional food for humans and functional feed additives for companion animals.

Key words: *Weissella cibaria* JW15, immunomodulatory effect, *Listeria monocytogenes*, black soybean, burdock

Introduction

생균제 (probiotics)는 장내미생물총의 균형을 개선시키고 숙주동물에게 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물로 Fuller에 의해 정의되었다[1]. 많은 미생물들이 생균제로 이용되고 있지만, 사람과 동물의 생균제로는 유산균 (Lactic acid bacteria)이 일반적으로 가장 많이 사용되고 있다. 현재까지 유산균은 장내 병원성균 증식 억제[2], 혈중 콜레스테롤 저하[3], 소화기능 증진[4], 장내 면역기능 개선[5] 등 생체 내에서 유용한 많은 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 최근 유산균으로 포함된 *Weissella* 속 세균은 그람 양성 무포자 형성균으로 카탈라아제 음성이며 이상유산발효경로 (heterolactic fermentation)를 통해 포도당을 유산과 이산화탄소로 발효시킨다[6]. *Weissella* 속에 포함되는 *Weissella cibaria*는 김치와 같은 발효음식에서 우점종으로 분리되고, 2002년 Björkroth 등에 의해서 분류학 연구를 통해 처음 분류되었다 [7]. *Weissella cibaria*는 weissellicin과 같은 항균물질을 생성하고 항바이러스효과 및 면역효과를 지니는 것으로 보고되고 있으며[8], 김치에서 분리된 *Weissella cibaria* JW15 (JW15)는 대식세포에서의 Nitric Oxide (NO), Nuclear factor (NF)- κ B, Interleukin (IL)-1 β 및 Tumor necrosis factor (TNF)- α 생성을 증가시켜 면역력을 증진시키는 우수한 효과가 있는 것으로 확인되었다[9].

검은콩은 (*Glycine max* Merr) 한국의 다소비 식품소재로써 건강식품과 전통 한방 재료로 많이 사용되고 있다. 무기질, 비타민, 식이섬유, 안토시아닌, 이소플라본, 사포닌, 생리활성단백질 펩타이드 등이 다량으로 함유 되어있는 콩은 항콜레스테롤혈증, 항암, 항산화, 고지혈증 예방, 면역증강 등 여러 생리활성 효과가 보고되고 있다[10]. 우엉 (*Arctium lappa*)은 약용과 식용으로 재배되고 있는 야생초로 섬유질이 풍부하며 많은 약리효과를 지니며, 항암/항종양, 항당뇨, 항바이러스 및 항염증 효과와 같은 광대한 범위에서 임상적으로 사용이 가능하다고 알려져 있다[11].

그람 양성세균인 *Listeria (L.) monocytogenes*는 면역력이 저하된 임산부, 신생아, 노인에게 리스테리아증으로 알려진 심

*Corresponding author: Wan-kyu Lee,

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Tel: +82-43-261-2960, E-mail: wklee@cbnu.ac.kr

각한 패혈증, 뇌수막염, 식중독 등을 일으키며, 반추동물에서는 선회병, 뇌수막염, 패혈증, 유산 등을 일으키는 세포 내 병원성 균으로 세균 감염에 대한 숙주의 면역반응을 연구하는 동물 실험 모델 감염균으로 널리 사용되고 있다[12]. *L. monocytogenes* 는 Peyer's patch 경로를 통해 점막장벽을 걸쳐 통과하여 장관막 림프절을 통해 간장과 비장으로 전파될 수 있다고 보고된 바 있다[13].

IL-1 β 와 TNF- α 같은 Pro-inflammatory cytokine은 숙주의 면역체계에서 중요한 역할을 한다. IL-1 β 는 감염 및 염증에 대한 면역반응을 유도하여 초기 급성 반응에서 중요한 매개물질로 작용하며, TNF- α , IL-6와 같은 cytokine과 chemokine의 분비를 유도한다[14, 15]. TNF- α 는 세포 내에서 병원체를 억제하고 염증과정을 조절함으로써 숙주면역체계에서 감염에 대한 저항성을 갖는다[16]. 이와 같이 병원체들의 침입을 막고 숙주세포 면역에 기여하는 cytokine들의 조절로 암 환자나 바이러스 질환환자들이 치료되기도 한다[17].

본 연구는 아직까지 광범위하게 다루어지지 않은 식물추출물과 유산균을 혼합하였을 때 나타나는 면역조절효과를 평가하기 위해 실시하였다. 식물추출물로는 검은콩에 속하는 흑태와 우영 물 추출물을 사용하였으며, 유산균은 선형연구에서 내산성, 내담즙성, 내열성, 장내정착능 및 병원성억제능 등 probiotics로서의 특성을 지니며 면역조절능이 검증된 JW15균주를 사용하였다[9]. JW15 균주는 흑태 물 추출물과 혼합하여 Raw 264.7 cells에서의 NO, NF- κ B, IL-1 β 와 TNF- α 생성을 촉진을 시켜 면역증강 시너지 효과를 지니는 것으로 확인 되었으나 동물실험에서의 효과는 아직 검증되지 않은 상태이다[18]. 따라서, 본 실험에서는 마우스에 대한 *L. monocytogenes* 감염모델 실험을 통해 흑태 및 우영 물 추출물과 JW15 유산균 혼합의 면역조절효과를 검증할 목적으로 실험을 진행하였다.

Materials and Methods

유산균 배양

김치에서 분리한 *Weissella cibaria* JW15 (KACC 91811) 균주는 De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Difco, MI, USA) 에서 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 후, MRS plate를 이용하여 균수를 측정하였다. 또한 배양액 전체를 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고

균체만을 멸균된 1 \times phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) 으로 2회 세척 후 1.0 \times 10 9 CFU/mL이 되도록 희석하여 실험동물에 경구투여 하였다[9].

흑태 및 우영 물 추출물 준비

흑태 및 우영 물 추출물은 금산국제인삼약초연구소(International Ginseng & Herb Research Institute, Geumsan, Korea)에서 제공받아 본 실험에 사용하였다. 흑태 [*Glycine max*, Black soybean(BS)]와 우영 [*Arctium lappa*, Burdock(BD)]은 증류수 40 mL에 동결건조 분말 2 g을 가해 200 rpm으로 25 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 교반 추출을 하였고 Whatman No. 3로 여과 후 회전진공농축기(40 $^{\circ}$ C)를 이용하여 용매를 제거하였다. 건조된 분말은 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

실험동물

실험동물은 7주령의 female BALB/c 마우스를 나라바이오택(Nara Biotech, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물실험은 충북대학교 실험동물 윤리위원회로부터 승인을 받았으며(CBNUA-744-14-01), 충북대학교 실험동물지원센터의 사육 조건에 따라서 항온(21 \pm 2 $^{\circ}$ C), 항습(50 \pm 20%), 12시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정한 조건에서 사육을 진행하였다. 실험군은 무처치군인 음성대조군(Normal control; NC), 양성대조군(Positive control; PC), *Weissella cibaria* JW15 투여군(JW15), JW15와 흑태 물 추출물 혼합투여군(JW15 + BS), JW15와 우영 물 추출물 혼합투여군(JW15 + BD)의 총 5개군으로 나누어 군당 5마리씩 25마리를 사용하였다. NC와 PC군에는 PBS를 투여하고 JW15투여군에는 10% skim milk로 희석한 1.0 \times 10 9 CFU의 JW15균주 200 μ L를 투여하였다. 흑태와 우영은 성인(체중 60 kg)이 1일간 평균적으로 섭취하는 양의 2배를 동물(체중 20 g) 섭취량으로 환산하여 마우스 1마리당 검은콩 11.14 mg/20g, 우영 51.2 mg/20 g 농도로 경구투여 하였다. 2주간 각 물질들을 투여한 후 NC를 제외한 나머지 군에 마리당 *L. monocytogenes* BA00092 (National Veterinary Research and Quarantine Service of Korea, Seoul, Korea)를 1.0 \times 10 5 CFU 농도로 미정맥을 통해 감염시켰다[19].

마우스 체중 및 장기무게 측정

*L. monocytogenes*를 감염시킨 2일 후, 마우스를 안락사 시

Table 1. Effect on the body weight and relative liver and spleen weights of mice after oral administration of *Weissella cibaria* JW15 and water extracts of BS and BD

Group	Body weight (g)	Liver/BW (g/kg)	Spleen/BW (g/kg)
NC	19.1 \pm 0.88 ^b	41.5 \pm 2.08 ^a	3.3 \pm 0.45 ^a
PC	17.5 \pm 0.75 ^a	61.8 \pm 5.98 ^b	6.8 \pm 0.57 ^c
JW15	17.2 \pm 1.02 ^a	64.6 \pm 2.93 ^b	5.4 \pm 0.88 ^b
JW15 + BS	17.5 \pm 0.77 ^a	61.3 \pm 1.10 ^b	6.0 \pm 0.64 ^b
JW15 + BD	18.2 \pm 1.67 ^{ab}	62.8 \pm 5.62 ^b	5.3 \pm 0.38 ^b

켜 무균적으로 간장 및 비장을 적출하고 무게는 상대무게 (g/kg)로 산출하여 장기의 무게도 함께 측정하였다. 각 군별로 체중에 대한 장기의 상대무게 (g/kg)를 측정하였다[19]

마우스 간장에서의 *Listeria monocytogenes* 균수 측정

L. monocytogenes 감염 2일 후, 무균적으로 적출한 간장을 3000 rpm에서 5분동안 homogenizer (Tokken Inc., Chiba, Japan)를 이용하여 균질화시켜 간장 내에 *L. monocytogenes*의 균수를 BHI agar (BD, USA)에서 측정하였다[19].

마우스 혈청에서의 cytokine 측정

마우스 복대정맥의 혈액을 BD Microtainer SST tube (BD, USA)에 채취하고 3,000 rpm 10분간 원심분리를 통해 혈청을 수집하였다. 수집한 혈청의 IL-1 β 와 TNF- α 의 농도는 ELISA kits (eBioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. IL-1 β 와 TNF- α 의 capture antibodies 100 μ L를 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 코팅한 96-well plate에 비특이적인 단백질 결합을 막기 위해 1시간 동안 blocking 하였다. 0.05% (v/v)의 Tween 20 (Bioshop, Canada)을 포함하는 PBS (PBST)로 5번 세척 후, IL-1 β 와 TNF- α 의 standard와 혈청액 100 μ L를 넣고 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 모든 standard와 sample은 3반복씩 실시하였다. IL-1 β 와 TNF- α 의 detection antibodies 100 μ L를 1시간 동안 실온에서 방치시킨 후, Avidin-HRP를 30분간 실온에

서 반응시켰다. 마지막으로 Tetramethylbenzidine (TMB)로 암실에서 15분 발색시키고 50 μ L의 2N H₂SO₄로 반응을 멈추게 하였다. 반응이 끝난 plate를 450 nm에서 측정하고 흡광도값을 standard (0~1,000 pg/mL; IL-1 β , TNF- α) 표준곡선을 이용하여 계산하였다[9].

Listeria monocytogenes 감염 마우스에서의 생존율 측정

각 군의 마우스에 PBS, JW15 그리고 JW15와 흑대 및 우영 물 추출물의 혼합을 2주간 투여하고 *L. monocytogenes*를 정맥주사로 감염시킨 후, 모든 개체가 사망할 때까지 3시간 간격으로 동물의 생존율을 측정하였다[19].

통계분석 및 유의성 검정

통계처리는 SPSS (Window ver. 12.0; SPSS, USA)를 이용하였으며 그룹간의 유의성 검정은 ANOVA 후 Duncan's tests로 사후검정을 사용하였다 ($p < 0.05$).

Results

마우스 체중 및 장기상대무게변화

각 군의 마우스에 2주간 시료를 경구투여하고, *L. monocytogenes* 정맥 감염 후 2일 째에 측정된 체중에서 PC군의 마우스 체중은 17.5 ± 0.75 g로 NC군에 (19.1 ± 0.88 g) 비해 유의적으로 감소하였고, JW15 + BD를 투여한 마우스군

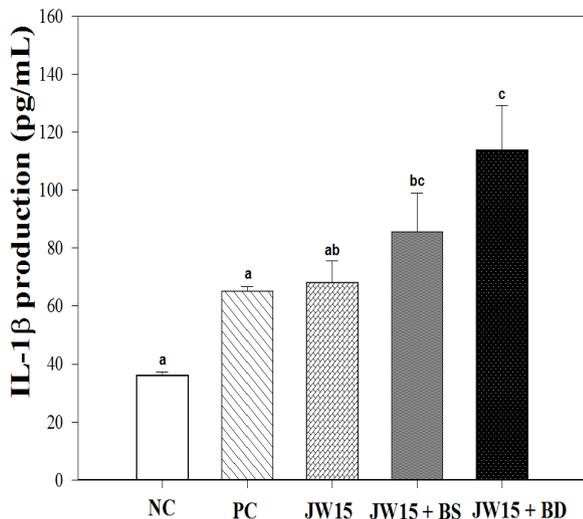


Fig. 1. Interleukin (IL)-1 β production in BALB/c mice sera in the *Listeria monocytogenes* challenge model. Data represent the mean \pm SD of five mice in each group. NC; normal control group (no probiotic-feeding and no *L. monocytogenes* infection), PC; positive control group (no probiotic-feeding and infected with *L. monocytogenes*), JW15; *Weissella cibaria* JW15-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BS; combination JW15 and black soybean-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BD; combination JW15 and burdock-fed and infected with *L. monocytogenes* group. Different superscript letters (a, b and c) indicate the statistical differences determined by ANOVA ($p < 0.05$).

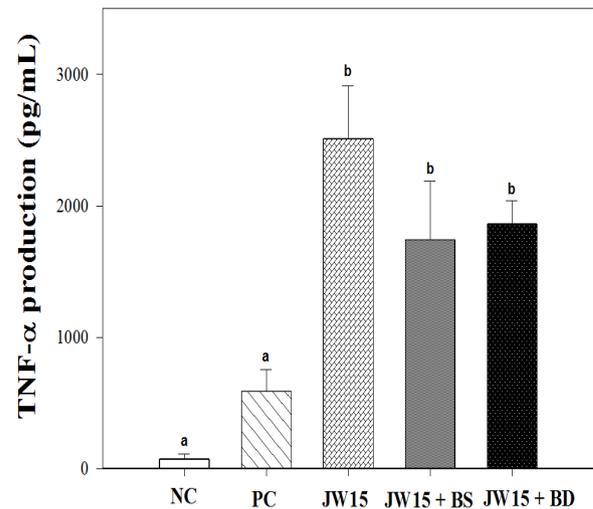


Fig. 2. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in BALB/c mice sera in the *Listeria monocytogenes* challenge model. Data represent the mean \pm SD of five mice in each group. NC; normal control group (no probiotic-feeding and no *L. monocytogenes* infection), PC; positive control group (no probiotic-feeding and infected with *L. monocytogenes*), JW15; *Weissella cibaria* JW15-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BS; combination JW15 and black soybean-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BD; combination JW15 and burdock-fed and infected with *L. monocytogenes* group. Different superscript letters (a, and b) indicate the statistical differences determined by ANOVA ($p < 0.05$).

의 체중이(18.2 ± 1.67 g) PC군보다 증가하였으나, 각 투여군간의 유의적인 체중변화는 관찰할 수 없었다(Table 1). 체중 당 간장의 상대적 무게측정 결과 NC군의 41.5 ± 2.08 g/kg 에 비해 PC군은 61.8 ± 5.98 g/kg로 유의적으로 증가하여 *L. monocytogenes* 감염이 장기무게에 영향을 미친 것을 확인할 수 있었다. 체중 당 비장의 상대적 무게 측정 결과에서도 PC군의 비장무게가 NC군보다 2배이상 유의적으로 증가하였고 JW15, JW15 + BS, JW15 + BD 투여군의 비장무게가 비대해진 PC군(6.8 ± 0.57 g/kg)의 비장무게보다 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

마우스 간장에서의 *L. monocytogenes* 감염 균수 측정 결과

L. monocytogenes 정맥주사 후 간장으로 이행한 생균수를 측정 한 결과, Table 2에서와 같이 NC 군에서는 *L. monocytogenes*가 검출되지 않았지만, PC군에서는 8.54 ± 0.45 (log cfu/g)의 균수가 검출되었다. 그러나 투여군 모두 PC군과의 유의적인 균수변화는 관찰되지 않았다.

마우스 혈청에서의 IL-1 β 및 TNF- α 측정결과

L. monocytogenes 정맥주사 후 마우스 혈청 내 IL-1 β 측정결과, PC군의 65.0 ± 3.57 pg/mL 생성량에 비해, JW15 + BS군과 JW15 + BD군에서 각각 85.6 ± 26.75 pg/mL, 113.6 ± 31.03 pg/mL로 유의적으로 IL-1 β 생성을 증가시켰다. 또한 JW15 + BD 투여군이 JW15 단독투여군의 67.9 ± 15.15 pg/mL 보다 유의적인 증가결과를 나타내 단독투여군보다 더 높은 IL-1 β 를 생성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

혈청 내 TNF- α 측정결과, JW15 (2200.0 ± 339.03 pg/mL), JW15 + BS (1741.3 ± 445.56 pg/mL), JW15 + BD (1860.6 ± 175.30 pg/mL) 투여군 모두 PC군 (589.4 ± 165.37 pg/mL)에 비해 유의적으로 TNF- α 생성을 증가시켰다 (Fig. 2).

L. monocytogenes 정맥주사감염에 의한 마우스의 생존율

2주간 각 물질들을 경구투여하고 *L. monocytogenes*를 미정맥 감염시킨 후 마우스의 생존율을 측정 한 결과, 감염되지 않은 NC군은 사망개체 없이 모두 생존하였고 JW15 군, JW15 + BS, JW15 + BD 군은 각각 76.80 ± 6.46 , 68.20 ± 9.01 그리고 72.80 ± 15.58 시간 동안 생존하여 PC군(66.60 ± 9.10) 보다 오래 생존하였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3.).

Table 2. Viable cell counts of *Listeria monocytogenes* in liver of mice after *Listeria monocytogenes* challenge

Group	<i>Listeria monocytogenes</i> in liver (log cfu/g)
NC	-
PC	8.54 ± 0.45^a
JW15	8.94 ± 0.46^a
JW15 + BS	8.32 ± 0.40^a
JW15 + BD	8.57 ± 0.39^a

Discussion

본 실험에서 사용된 흑태와 우영은 우리나라 다빈도식품 중 면역활성을 보유하고 있는 식품소재로써 이미 면역활성이 우수하다고 알려진 *Weissella cibaria* JW15와의 면역시너지효과를 확인하기 위하여 JW15와의 혼합물로 선정하였다. 흑태와 우영은 항산화능, 항바이러스 및 항염증과 같은 효과를 지니며 다양하게 임상적으로 사용이 가능하다고 보고되고 있지만[10, 11], 아직까지 면역조절에 관한 연구는 부족한 상황이다. 또한 JW15 균주와 검은콩과의 혼합이 in vitro 상에서는 NO, NF- κ B와 cytokine 생산을 증가시켜 면역반응을 증진시키는 것을 선행연구를 통해 확인하였지만[18], 동물실험을 통한 면역활성효과는 확인되지 않은 상황이다. 따라서 본 실험에서는 BALB/c 마우스 *Listeria monocytogenes* 감염 모델을 이용하여 유산균과 흑태와 우영 물 추출물의 혼합 투여 시 나타나는 면역증진효과를 확인하는 실험을 진행하였다.

동물감염 실험에 사용한 *Listeria monocytogenes* 균은 면역 결핍환자 및 임산부에 감염되어 심한 패혈증 및 수막염을 일으키기 때문에 숙주 면역반응을 연구하는 세균감염모델로서 사용되고 있다[12]. 또한 TNF- α , IFN- γ 와 같은 cytokine의 분비가 *Listeria monocytogenes* 감염에 저항하는 중요한 역할을 한다는 많은 연구결과가 발표된 바 있기 때문에[20, 21], in vitro 실험을 통해 TNF- α 와 IL-1 β 생성을 증가시키는 것으로 확인된 JW15균주가 *Listeria monocytogenes* 감염실험에서 방어효과를 보일 것으로 예상하고 *Listeria monocytogenes* 감염모델을 본 실험에서 사용하였다.

BALB/c 마우스는 *Listeria monocytogenes* 감염에 있어서 가장 민감한 것으로 알려져 있으며 본 연구에서 감염모델의 마우스로 사용하였고, Puertollano 등 여러 연구자들은 유산균의 면역반응을 평가하기 위하여 BALB/c 마우스를 사용하였다[22, 23]. 이번 연구에서 *Listeria monocytogenes*를 미

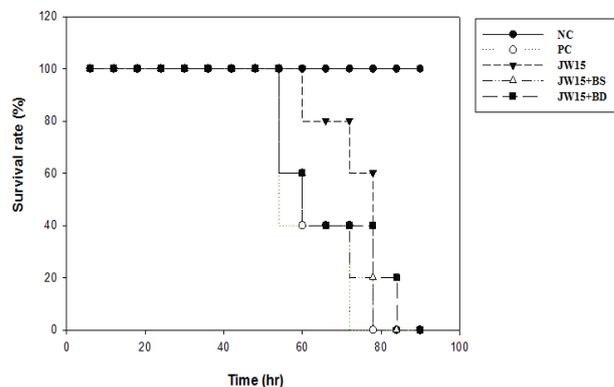


Fig. 3. Mean survival times of mice after being infected with *Listeria monocytogenes*. NC; normal control group (no probiotic-feeding and no *L. monocytogenes* infection), PC; positive control group (no probiotic-feeding and infected with *L. monocytogenes*), JW15; *Weissella cibaria* JW15-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BS; combination JW15 and black soybean-fed and infected with *L. monocytogenes*, JW15 + BD; combination JW15 and burdock-fed and infected with *L. monocytogenes* group.

정맥으로 감염시킨 결과, 감염 후 *Listeria monocytogenes*만을 접종한 PC군의 마우스 체중당 비장의 상대 무게가 증가하는 것을 알 수 있었다. JW15, JW15 + BS 그리고 JW15 + BD 군의 상대적인 spleen 무게는 PC 군에 비해 유의적으로 감소하였는데, 이 결과는 유산균과 흑태 및 우영 물 추출물의 혼합에 의한 숙주의 면역활성으로 인한 보호 효과로 추측된다. Puertollano 등은 *Lactobacillus plantarum* 투여로 *Listeria monocytogenes* 감염 마우스에서 비장의 무게가 정상 수준으로 회복하였으며, 생존율이 증가하였다는 연구 결과를 발표한 바가 있으며 [23], Choi 등 또한, *Enterococcus faecium* JWS 833을 경구투여 시 *Listeria monocytogenes* 감염에 의해 증가한 비장의 무게를 감소시켰다는 연구 결과를 발표하였다 [19].

JW15와 흑태 및 우영 물 추출물 혼합 투여군의 마우스에서 혈청 내 cytokine (IL-1 β , TNF- α)이 PC군에 비해 증가된 것을 볼 수 있었다. Nishikawa 등의 *L. monocytogenes* 감염 실험에서 TNF- α 및 IFN- γ 가 부족한 마우스의 경우 감염에 대한 감수성이 더 높은 것으로 확인이 되었고, *L. monocytogenes* 감염에 저항하기 위해서 필수적인 역할을 하는 cytokine이 발표된 바가 있기 때문에 JW15와 흑태 및 우영 물 추출물에 의한 pro-inflammatory cytokine의 증가가 *L. monocytogenes* 감염에 대한 저항성을 증가시킨 것으로 보인다 [24]. 또한 Liliane 등도 *Lactobacillus delbrueckii*를 투여하고 *L. monocytogenes*를 감염한 마우스 혈청에서 TNF- α 생성량이 유의적으로 증가하여 유산균이 *L. monocytogenes*에 대해 방어효과를 지닌다는 연구를 보고한 바가 있다 [25]. 이러한 염증 cytokine (IL-1 β , TNF- α)의 증가는 숙주의 면역 체계내의 균형을 유지시키며, 병원성세균에 감염된 숙주 면역 체계 내에서 감염에 대한 방어를 돕는 것으로 알려지고 있다 [26, 27]. 따라서 본 실험에서 확인된 JW15균주와 흑태 및 우영 물 추출물의 혼합투여가 면역활성 능력을 나타내는 기전은 이와 같은 cytokine 활성변화에 기인한 것으로도 추측할 수 있다. 그러나 이번 실험에 사용한 *L. monocytogenes* 감염모델은 급성패혈증을 유발하는 동물모델이었기 때문에 향후 병원성을 저하시킨 동물모델에서의 추가 확인 실험이 필요할 것으로 판단된다.

흑태에 높은 함량으로 존재하는 polysaccharides와 우영의 뿌리를 구성하는 Lignans, polyphenols, Fructose등과 같은 구성물질들이 면역체계를 개선시키는 것으로 보고 되고 있다 [28, 29]. 흑태와 우영에 존재하는 면역력을 강화시키는 구성성분들이 *L. monocytogenes* 감염모델에서 마우스의 면역력을 강화하는데 기여한 것으로 생각된다. 유산균(Lactic acid bacteria)은 면역계에서 병원균을 감지하는 대식세포를 활성화하여 세균이나 바이러스를 신속하게 감지하고 혈액 내 항체인 IgA 생성을 증가시키거나 Interferon (IFN)- γ , IL-1 β 그리고 TNF- α 와 같은 cytokine 생성량을 증가시켜 면역력을 증진하여 병원균과 같은 외부물질의 침입에 대응한다고 알려져 있다 [2]. 본 실험에서도 JW15 + BS, JW15 + BD 혼합물의 투여가 혈청에서의 IL-1 β 및 TNF- α 생성을 증가시켰기 때문에 JW15와 흑태 및 우영 추출물의 혼합이 *L. monocytogenes* 감염모델에서 면역증강효과를 나타낸 것으로 보인다.

*L. monocytogenes*를 미정맥으로 감염시키고 실시한 survival test에서 JW15, JW15와 검은콩 그리고 JW15와 우영의 혼

합물 투여군은 PC군보다 더 오랫동안 생존함을 확인할 수 있었다. 각 군간의 생존시간에 대한 통계적인 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 향후 *L. monocytogenes*의 접종 농도를 낮춰서 감염시험을 진행한다면 각 군간의 생존시간에 있어 유의적인 차이를 확인할 수 있을 것으로 예상된다.

이상의 결과를 종합해 보았을 때, JW15 흑태 및 우영 물 추출물을 혼합하여 투여한 마우스 동물실험에서 *L. monocytogenes* 감염에 대한 숙주의 면역 체계가 활성화되어 체내에 존재하는 *L. monocytogenes* 수를 감소시키는 등 면역 방어효과를 나타낸 것으로 판단된다. 따라서 이번 결과를 바탕으로 향후 면역활성이 뛰어난 *Weissella cibaria* JW15 균주와 흑태 및 우영의 혼합물을 면역력이 저하된 사람 및 동물의 건강기능성 식품소재로 활용한다면 산업적인 가치가 매우 높을 것으로 기대하며, 나아가 새로운 면역조절 기능성 생균제 개발에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgements

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음 (This work was supported by the research grant of Chungbuk National University in 2014).

ORCID

Wan-Kyu Lee, <http://orcid.org/0000-0001-5087-6359>

References

- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-378.
- Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 96: 853-862.
- Song M, Park S, Lee H, Min B, Jung S, Park S, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* NS1 on plasma cholesterol levels in diet-induced obese mice. *J Dairy Sci* 2015; 98: 1492-1501.
- Strowski MZ, Wiedenmann B. Probiotic carbohydrates reduce intestinal permeability and inflammation in metabolic diseases. *Gut* 2009; 58: 1044-1045.
- Rolf RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000; 130: 396-402.
- De Bruyne K, Camu N, De Vuyst L, Vandamme P. *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; 60: 1999-2005.
- Bjorkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, et al. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 141-148.

8. Kang MS, Lim HS, Kim SM, Lee HC, Oh JS. Effect of *Weissella cibaria* on *Fusobacterium nucleatum*-induced Interleukin-6 and Interleukin-8 Production in KB Cells. *J Bacteriol Virol* 2011; 41: 9-18.
9. Ahn SB, Park HE, Lee SM, Kim SY, Shon MY, Lee WK. Characteristics and immuno-modulatory effects of *Weissella cibaria* JW15 isolated from Kimchi, Korea traditional fermented food, for probiotic use. *J Biomed Res* 2013; 14: 206-211.
10. Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2806-2828
11. Chan YS, Cheng LN, Wu JH, Chan E, Kwan YW, Lee SM, et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology* 2011; 19: 245-254.
12. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent food-borne infection. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 16-23.
13. Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Sarnacki S, Monnet JP, Berche P, et al. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun* 1998; 66: 747-755.
14. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
15. Introna M, Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Dejana E, Mantovani A. IL-1 inducible genes in human umbilical vein endothelial cells. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl K: 78-81.
16. Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol* 2001; 31: 763-769.
17. Capuron L, Hauser P, Hinze-Selch D, Miller AH, Neveu PJ. Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 575-580.
18. Park HE, Jang YJ, Lee WK. Immunomodulatory effects mixed with *Weissella cibaria* JW15 and Black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Extract. *J Biomed Transl Res* 2016; 17: 20-25.
19. Choi HJ, Shin MS, Lee SM, Lee WK. Immuno-modulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 613-620.
20. Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 1991; 59: 2892-900.
21. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993; 364: 798-802.
22. Cheers C, McKenzie IF, Pavlov H, Waid C, York J. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect Immun* 1978; 19: 763-770.
23. 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.
24. Nishikawa S, Miura T, Sasaki S, Nakane A. The protective role of endogenous cytokines in host resistance against an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 16: 291-298.
25. dos Santos LM, Santos MM, de Souza Silva HP, Arantes RM, Nicoli JR, Vieira LQ. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200: 29-38.
26. 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.
27. Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 1995; 155: 4347-4354.
28. Wu MH, Lee YC, Tsai WJ, Yang WB, Chen YC, Chuang KA, et al. Characterized polysaccharides from black soybean induce granulocyte colony-stimulated factor gene expression in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Immunol Invest* 2011; 40: 39-61.
29. Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Chen IC, et al. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *J Biomed Sci* 2002; 9: 401-409.