

전통 밀누룩에서 분리한 유산균의 특성 및 마우스 대식세포에서의 Nitric Oxide 생성에 미치는 영향

김근섭¹, 최영호², 김홍국², 김병수^{1*}

Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Wheat *Nuruk* and their Effects on Nitric Oxide Production in Mouse Macrophage

Geun-Seop Kim¹, Yeong-Ho Choe², Hong-Kook Kim², and Byeong-Soo Kim^{1*}

Received: 2 July 2018 / Revised: 27 August 2018 / Accepted: 21 September 2018
© 2018 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The purpose of this study is to assess of efficacy about lactic acid bacteria isolated form traditional wheat *Nuruk*. 6 strains was isolated from traditional *Nuruk*. The Strains identified by 16s rRNA gene sequencing are *Lactobacillus Curvatus* (named SA-13, YS-2), *Pediococcus Acidilactici* (named SS-5, YS-3) and *Pediococcus Pentosaceus* (named SA-2, YS-1). *P. acidilactici* SS-5 has Acid and bile tolerance. The bacteria free - supernatant of *P. acidilactici* SS-5 showed antibacterial activity in gram negative bacteria (*Escherichia Coli*, *Salmonella Typhimurium*) and gram positive bacteria (*Staphylococcus Aureus*, *Listeria Monocytogenes*) in paper disk diffusion assay. The bacteria free - supernatant of *P. acidilactici* SS-5 showed effect in all of used pathogenic bacteria at concentration of 11.25 mg/mL. All strains isolated from traditional *Nuruk* showed more than 60 percents on the antioxidant activity. Raw 264.7 cell line was used as a macrophage model to assess the effects on cytotoxic test and the production of nitric oxide. The nitric oxide productions of the viable bacteria and

heat-inactivated bacteria of the *P. acidilactici* SS-5 were superior to other strains isolated *Nuruk*.

Keywords: wheat-*Nuruk*, probiotics, antimicrobial activity, antioxidative effect, nitric oxide

1. INTRODUCTION

Probiotics는 과거 생균제로서 숙주에 이로운 영향을 주는 살아있는 미생물로 정의되었으나 [1], 근래에 와서는 숙주에 이로운 영향을 주는 미생물 또는 미생물에서 유래되는 성분을 지칭한다 [2]. Probiotics 제제로서 사용되는 대표적인 미생물은 유산균 (Lactic acid bacteria; LAB)이 있다. 유산균의 기능은 항균성 단백질인 bacteriocin의 분비를 통한 병원균의 증식 억제, 유해균에 대한 길항작용, 숙주의 장내환경 개선, 콜레스테롤 함량감소, 면역기능 향진 [3-7] 등이 있다. 유산균이 이러한 기능을 목적을 가지는 probiotics 제제로서 사용되기 위해서는 기본적으로 장관의 위산과 담즙산에 대한 내성이 필요하고, 그 외에도 장관에서의 점착능과 증식능, 면역 활성화 등의 평가가 이루어진다 [8]. 최근에는 유산균의 생균체 뿐만 아닌 사균체와 대사산물의 *in vivo*, *in vitro* 면역조절기능에 대한 연구가 이루어지고 있으며 [9,10], 사균체가 생균체보다 안정성과 안정성이 높고 이용에 용이하다고 보고되었다 [11].

누룩은 한국뿐만 아니라 중국이나 일본에서 많은 식제품에

¹공주대학교 특수동물학과

¹Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Chungnam, 32439, Korea
Tel: +82-41-330-1534, Fax: +82-330-1529
e-mail: bskim@kongju.ac.kr

²공주대학교 바이오융복합학과

²Department of Integrated Life Science and Technology, Kongju National University, Chungnam, 32439, Korea

사용되고 있는 천연 발효제제이다 [12,13]. 누룩의 특성은 사용된 원료, 제조지의 기후, 제조 시기 등에 따라 다르며 미생물의 분포 또한 다르게 나타난다 [14]. 이러한 특성으로 인하여 누룩을 이용하여 제조하는 탁주의 유기당과 유기산의 함량, 필수 유리 아미노산의 증가에 영향을 미친다 [15]. 또한 누룩에서 추출한 성분은 항염증, 항암작용 등을 하는 것으로 보고되었으며, 누룩이 발효되면서 생성되는 알코올의 추출물은 산화스트레스, 피부의 노화 및 멜라닌 형성 억제에 효능이 있는 것으로 밝혀졌다 [16,17]. 누룩을 원료로 하여 제조되는 막걸리에 존재하는 유산균의 효능평가에 대해서는 활발히 이루어지고 있지만 [18], 누룩에서 분리한 유산균에 대해서는 주요적인 특징을 위주로 연구가 진행되고 있으며 probiotics 제제로 사용하기 위한 연구는 부족한 실정이다 [19]. 이에 본 연구에서는 전통방식으로 제조된 밀 누룩에서 유산균을 분리하여 내산성, 내담즙성, 항균활성과 항산성에서의 특징을 조사하여 probiotics 제제로서의 후보 균주를 선별하고, 선별된 유산균의 생균과 사균 그리고 대사산물이 마우스 대식세포에서의 nitric oxide 생성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. 유산균 분리 및 동정

유산균의 분리를 위하여 전라남도 광주 (SA), 경상남도 진주 (JJ), 부산 (SS), 충청남도 예산 (SS)에서 시판되는 밀누룩을 구입하여 사용하였다. 각 시료 10 g에 peptone water (Merck, Germany) 100 mL를 혼합 후 상등액을 Bromocresol purple (Difco, USA) 0.136 g, 0.005% (w/v)의 sodium azide (Sigma, USA)가 첨가된 Lactobacilli MRS agar (MRS, Difco, USA)에 접종한 후, 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 콜로니를 morphology, gram stain과 catalase test, hemolysis test를 통하여 6개의 콜로니를 선별하였으며 16s rRNA gene sequencing을 통하여 동정을 실시하였다. 선별된 유산균은 15% glycerol으로 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

2.2. 내산성 및 내담즙성 실험

선별된 유산균의 위산 및 담즙산에 대한 저항성을 확인하기 위한 내산성 실험과 내담즙성 실험은 Erkkila와 Petaja의 방법을 변형하여 실시하였다 [20]. 내산성 실험을 위하여 1 N HCl (Deajung, Korea)을 이용해 MRS Broth를 pH 3.0으로 제조한 뒤, 초기 1.0×10^6 CFU/mL이 되도록 접종한 후 37°C에서 3시간 배양하여 배양 전후의 생균수를 측정하였다. 배양 후의 생균수가 초기 생균수보다 높을 경우 내산성을 가진 것으로 보았다. 내담즙성 실험은 MRS broth에 0.3% (w/v) bile salt (Sigma, USA)가 포함된 MRS broth를 제조한 뒤, 1.0×10^6 CFU/mL가 되도록 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 전 후의 생균수를 측정하고 내산성과 동일한 방법으로 균의 내담즙성을 조사하였다.

2.3. 유산균 대사산물의 항균활성실험

누룩에서 분리한 유산균의 대사산물에 의한 항균활성 조사는 clinical laboratory standard institute document의 방법을 변형하여 진행하였으며 [21], 사용된 병원균은 그람 양성균인 *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* ATCC 19115, 그람 음성균인 *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 13311으로 총 4종을 사용하였다. mcfarland standard 0.5로 준비한 지시균 현탁액을 멸균된 면봉을 이용해 mueller hinton agar (MHA, Difco, USA)에 도말하였다. 그 후, MRS broth에서 48시간 배양된 배양액을 0.22 μ m Syringe filter를 이용해 필터링을 한 후 10배 감압 농축한 시료 50 μ L가 흡수된 paper disk를 올려 37°C에서 24시간 배양하여 생성된 clear zone을 확인하였다. 음성 대조군으로는 MRS broth를 사용하였으며, 양성 대조군으로는 10 μ g/disk의 streptomycin disk와 gentamycin disk를 사용하였다.

누룩에서 분리한 유산균 대사산물에 의한 병원성 균의 생장에 대한 최소저해농도를 확인하고자 MIC test를 진행하였다. paper disk diffusion assay와 동일한 방법으로 준비된 유산균 배양액을 filtering 후 감압농축한 농축물을 mueller hinton broth (MHB, Difco, USA)에 녹여 실험에 이용하였으며, 병원균은 paper disk diffusion assay와 동일한 병원균을 사용하였다. mcfarland standard 0.5로 현탁액을 제조한 뒤, MHB에 10배 희석시켜 준비하였다. 96-well plate에 90 mg/mL의 배양액 200 μ L를 2.81 mg/mL까지 2-fold dilution하였다. 그 뒤, 준비된 지시균 현탁액을 100 μ L를 접종하고 37°C, 24시간 배양하였다. 배양이 완료된 well-plate의 600 nm의 흡광도를 측정하여 균의 생장을 관찰하였으며, 양성 대조군으로는 MHB medium과 병원균을 접종한 growth control을 사용하였다.

2.4. DPPH radical scavenging activity

분리한 유산균의 대사산물에 의한 항산화 능력은 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay를 이용하여 수행하였다 [22]. 0.1 mM DPPH Reagent 1 mL에 0.22 μ m syringe filtering된 유산균 배양액 800 μ L를 혼합하고 10초간 강하게 섞어준 뒤, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 200 μ L를 96-well plate에 넣고 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로 sample과 같은 양의 MRS broth를, 양성 대조군으로는 0.1 mM ascorbic acid를 사용하였다.

2.5. 최종 선별된 유산균의 생균, 사균, 대사산물의 세포독성조사 및 nitric oxide 생성조사

2.5.1. 유산균 시료 준비

누룩에서 선별된 유산균은 MRS broth를 이용해 37°C에서 48시간 동안 배양하고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 상등액은 0.22 μ m syringe filter를 이용하여 필터링을 거친 후 spent culture supernatant (SCS)로 실험에 이용하였으며, 균체는 phosphate buffer saline (PBS, Gibco, USA)를 이용해 2회간 washing 후 3000 rpm 10분간 원심분리하여 분리하여 이를

viable bacteria (VB)로, washing한 균체를 95°C에서 30분간 노출시켜 heat-inactivated bacteria (HIB)로 실험에 사용하였다.

2.5.2. 세포배양

유산균의 생균체, 사균체, 대사산물에 의한 세포생존능과 NO assay는 한국세포주은행에서 분양받은 murine macrophage 세포인 Raw 264.7 cell을 사용하였다. Raw 264.7 cell을 1% anti-anti (Gibco, USA), 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA)이 첨가된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Hyclone, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 모든 실험에 사용된 세포는 10 passage를 넘기지 않은 세포를 사용하였다.

2.5.3. 세포독성실험

최종 선별된 유산균의 배양으로 얻은 SCS와 VB 그리고 HIB가 세포생존에 미치는 영향은 3-(4,5-dimethylthiazil-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 확인하였다 [23]. 96-well plate에 DMEM 배지를 100 µL를 넣은 후 Raw 264.7 cell을 5×10⁴ cells/well이 되게끔 96-well plate의 각 well에 넣고 37°C로 설정된 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 꺼내어 각 well의 배지를 제거한 다음 PBS를 이용해 2회 washing을 실시하고 새로운 DMEM 배지를 각 well에 100 µL를 넣고 SCS와 VB, HIB의 농도를 1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL가 처리하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 PBS를 이용해 2회 washing한 뒤, MTT를 처리하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 생성된 MTT formazan dye를 dimethyl sulfoxide (DMSO; Deajung, Korea)로 녹인 뒤, 흡광도 570 nm를 측정하였다.

2.5.4. NO assay

최종 선별된 유산균의 SCS와 VB, HIB에서 Raw 264.7 cell에 대한 NO 생성은 Stuehr와 Nathan의 방법을 변형하여 실시하였다 [24]. 96-well plate에 DMEM 배지를 200 µL를 넣은 후 Raw 264.7 cell을 5×10⁴ cells/well이 되게끔 96-well plate의 각 well에 넣고 37°C로 설정된 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 꺼내어 배지를 제거한 다음 PBS를 이용해 2회 washing한 뒤, SCS, VB, HIB가 1 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL이 첨가된 DMEM 200 µL를 처리하고 24시간 배양하였다. 음성 대조군으로는 DMEM 배지 200 µL를 사용하였고 양성 대조군에는 LPS 100 ng/mL가 첨가된 DMEM 200 µL를 사용하였다. 세포배양액의 NO의 농도는 배양이 완료된 상등액 180

µL를 3000 rpm에서 3분간 원심분리 후, 새 96-well plate에 상등액 100 µL를 옮긴 후 동량의 griess reagent (Sigma, USA)를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤, 흡광도 540 nm를 측정하여 계산하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 전통 밀누룩 유산균 분리 및 동정

전통 밀누룩에의 유산균의 분리는 BCP와 sodium azide를 첨가한 MRS agar 배지를 사용하여 실시하였으며, JJ 누룩을 제외한 SA, SS, YS의 누룩에서 총 19개의 콜로니를 분리하였다. BCP-MRS에서 주변이 노랗게 변한 콜로니를 1차적으로 분리하고 [25], 분리된 콜로니들을 morphology, gram stain과 catalase test, hemolysis test를 통하여 LAB의 특징인 gram positive, catalase negative, hemolysin negative를 보이는 최종 6개의 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니를 16s rRNA sequencing을 통하여 동정한 결과 *P. pentosaceus* (SA-2, YS-1), *L. curvatus* (SA-13, YS-2), *P. acidilactici* (SS-5, YS-3)으로 동정되었으며 JJ 누룩에서는 유산균이 검출되지 않았다 (Table 1).

3.2. 전통 밀누룩에서 분리된 유산균의 내산성 및 내담즙성

생균제로 사용되는 유산균은 산이 강한 위내 환경과 담즙이 있는 십이지장을 거쳐 장에 도달해야 기능을 발휘할 수 있다 [26]. 이러한 능력은 생균제로 사용되는데 있어서 가장 중요한 조건이며, 일반적으로 공복 시 위는 pH 1~2 정도의 수치를 유지하지만 사료와 침이 함께 섞여 들어가 희석된다 [27]. 1 N HCl을 이용하여 pH 3으로 조정된 MRS broth에서 SA-2, SS-5, YS-1은 3시간 경과 후, 초기 대비 유의적으로 CFU의 증가하였으며, YS-2, YS-3은 유의적인 차이를 보이지 않고 유지되었다. 특히 YS-1은 1.4×10⁶ CFU/mL에서 2.61×10⁷ CFU/mL으로 18배 증가하였다. SA-13은 3시간 후의 CFU가 유의적으로 10배 감소하였다 (Fig. 1).

Probiotics 제제로 이용되는 생균이 가져야할 담즙액에 대한 내성은 oxgall의 농도가 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고되었다 [28]. 0.3% bile salt가 첨가된 MRS broth에서의 내담즙성 실험을 실시하였다. 그 결과 모든 실험군에서 생균수가 초기대비 유의적으로 증가하였으며, 초기 생균수 대비 SA-2는 6.7×10⁶ CFU/mL에서 5.0×10⁷ CFU/mL으로 7배 증가하였고, SA-13은 1.6×10⁶ CFU/mL에서 2.5×10⁹ CFU/mL으로 1,500배 증가하였고, SS-5는 3.7×10⁶ CFU/mL에

Table 1. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional wheat-Nuruk

	Species-identification	Identity (%)	Genbank No.
SA-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	NR 075052.1
SA-13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99	NR 113334.1
SS-5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	NR 042057.1
YS-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	NR 075052.1
YS-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99	NR 113334.1
YS-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	NR 042057.1

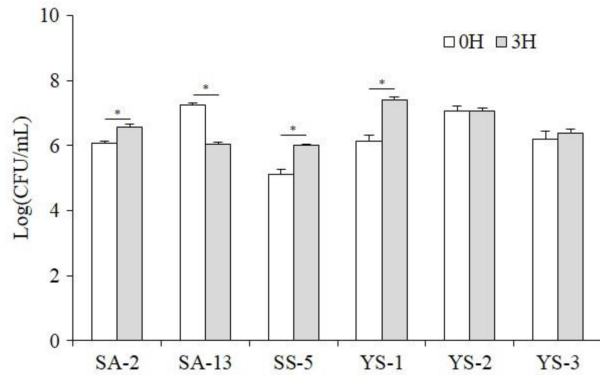


Fig. 1. Acid tolerance of lactic acid bacteria (LAB) from the traditional wheat *Nuruk*. LABs were incubated in MRS broth adjusted pH 3.0 for 3 h and plated on MRS agar. Data shown represent the mean±SD based on three independent experiments. **p*<0.05 when input colony forming unit compared to after incubation for 3 hours colony forming unit.

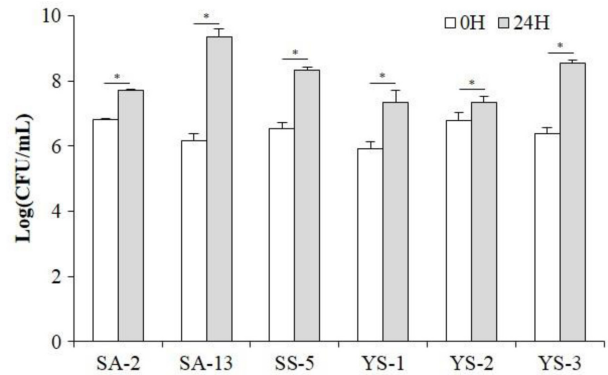


Fig. 2. Bile tolerance of lactic acid bacteria (LAB) from the traditional wheat *Nuruk*. LABs were incubated in MRS broth adjusted pH 3.0 for 3 h and plated on MRS agar. Data shown represent the mean±SD based on three independent experiments. **p*<0.05 when input colony forming unit compared to after incubation for 24 hours colony forming unit.

서 2.2×10^8 CFU/mL으로 59배, YS-1은 9.0×10^5 CFU/mL에서 2.7×10^7 CFU/mL으로 30배, YS-2은 6.8×10^6 CFU/mL에서 2.4×10^8 CFU/mL으로 35배 YS-3은 2.5×10^6 CFU/mL에서 3.6×10^8 CFU/mL로 144배 증가하였다. (Fig. 2). 담즙은 장관의 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며 [29], 많은 LAB 들은 이를 분해하는 담즙산염 가수분해효소를 가지고 있는 것으로 보고되었으며, *Lactobacillus* spp.와 *Pediococcus* spp. 역시 이 효소를 생성하는 것으로 보고되었다 [30,31]. 따라서 전통 밀누룩에서 분리한 6종의 유산균 모두 이 효소를 가지는 것으로 보이며, 이를 토대로 내담즙성을 보이는 것으로 판단된다.

3.3. 전통 밀누룩에서 분리된 유산균 대사산물의 항균활성

유산균은 다양한 유기산을 생성하여 pH를 낮춰 주변 환경을 산성화시키거나 bacteriocin으로 불리는 항균성 단백질을 분비하는 등 다양한 방법으로 항균력을 갖는다 [29,32,33]. 이러한 항균활성은 장내 병원성 균의 생육을 억제하여 질병을 예방하는데 도움이 된다 [4]. 전통 밀누룩에서 분리한 유산균의 대

사산물의 항균력을 확인하기 위해서 paper disk diffusion assay와 MIC test를 실시하여 확인하였다.

3.3.1. Paper disk diffusion assay

전통 밀누룩에서 분리한 유산균 대사산물의 항균활성을 확인하기 위해 병원균이 1.0×10^6 CFU/mL로 도말된 MHA plate에 paper disk를 얹고 filtering 후 10배로 농축한 배양액 50 µL를 흡수시켜 항균테스트를 시행한 결과, gram stain의 특성에 따라서 결과의 차이가 나타났다. Gram 음성인 *S. typhimurium*, *E. coli*에 대해서 SA-13과 SS-5, YS-2, YS-3에 항균활성을 나타내었다. *S. typhimurium*에 대해서 SA-13과 SS-5 그리고 YS-3이 gentamycin보다 높은 항균력을 보였으며 SA-2는 10 µg/disk의 gentamycin과 비슷한 항균활성을 보였다. *E. coli*에 대해서 분리된 유산균 중 SS-5와 YS-3가 높은 항균활성을 나타내었다. Gram 양성인 *S. aureus*, *L. monocytogenes*에서는 모든 균주가 항균활성을 나타내었지만 그 결과가 상이했다. *P. pentosaceus*인 SA-2가 같은 균종인 YS-1보다 더 뛰어난 항균활성을 보였으며 *L. curvatus*인 SA-13은 YS-2보다 더 뛰어난

Table 2. Antibacterial effect of external metabolite of lactic acid bacteria isolated from traditional wheat *Nuruk* (mm)

Strain	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
SA-2	14±0.6	11±0.6	13±1.2	11±0.6
SA-13	14±0.6	11±0.0	15±1.2	13±1.2
SS-5	15±0.0	13±0.8	16±1.0	13±0.6
YS-1	13±0.6	10±0.3	15±0.6	11±0.0
YS-2	12±0.6	9±0.6	12±0.8	10±0.6
YS-3	13±0.8	14±0.6	14±0.3	13±0.3
PC-G	23±0.7	22±0.9	24±1.3	22±0.7
PC-S	13±0.6	15±0.9	13±0.9	11±0.8
NC	0	0	0	0

All bacteria free-supernatants were concentrated 10-times and inoculated 50 µL each. . Data shown represent the mean ± SD based on three independent experiments. Positive controls (PC-G, PC-S) were 10 µg/disk gentamycin and 10 µg/disk streptomycin. Bacteria free-MRS broth was used for negative control (NC).

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of external metabolite of LAB on pathogenic bacteria

Group	Metabolite of LAB isolated from traditional wheat <i>Nuruk</i> Concentration (mg/mL)						GC
	SA-2	SA-13	SS-5	YS-1	YS-2	YS-3	
<i>S.aureus</i>	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	22.50±0.0	11.25±0.0	+
<i>L. monocytogens</i>	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	+
<i>E. coli</i>	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	22.50±0.0	11.25±0.0	+
<i>S. typhimurium</i>	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	11.25±0.0	+

The supernatant was concentrated and inoculated at 90 mg/mL end then diluted 2-fold to 1.41 mg/mL. Growth Control (GC) was growth media (MHB) and bacteria suspension with no treatment. Data shown represent the mean ± SD based on three independent experiments.

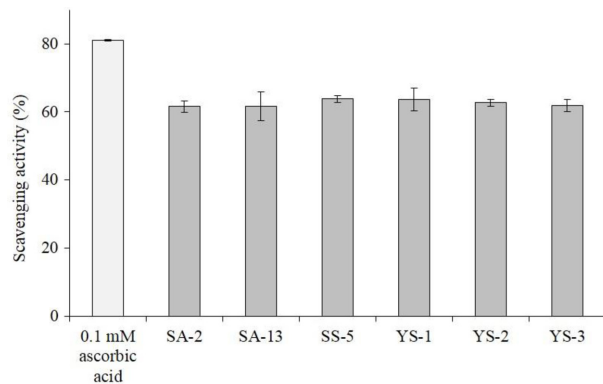


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of LAB isolated from traditional wheat *Nuruk*. Data shown represent the mean±SD based on three independent experiments. All experimental group were no significantly different with each other.

난 항균활성을 보이고 *P. acidilactici*인 SS-5가 YS-3보다 뛰어난 항균활성을 보였다 (Table 2).

3.3.2. Minimum inhibitory concentration (MIC)

전통 밀누룩에서 분리한 유산균의 병원균에 대한 최소저해 농도를 구하기 위하여 1.0×10^7 CFU/mL로 희석된 병원균을 100 μ L씩 각 well에 접종 후 filtering 후 감압농축한 뒤 배양액의 농도를 45 mg/mL에서부터 2-fold dilution하여 1.41 mg/mL 까지 처치한 후 MIC test를 실시한 결과, *E. coli*에 대해서는 SA-2, SA-13, SS-5, YS-1, YS-3이 모두 11.25 mg/mL의 저해능을 보였지만, YS-2는 SA-13과 같은 *L. curvatus*임에도 불구하고 22.50 mg/mL에서 저해능을 나타내었다. *L. monocytogenes*의 경우, 분리된 모든 유산균에서 11.25 mg/mL의 농도에서 최소저해능을 나타내었다. *S. aureus*의 경우, SA-2, SA-13, SS-5, YS-1, YS-3이 모두 11.25 mg/mL에서 저해능을 나타내었지만 YS-2는 같은 종인 SA-13보다 낮은 22.50 mg/mL에서 저해능을 나타내었다. *S. typhimurium*에서는 분리된 모든 유산균에서 11.25 mg/mL의 농도에서 저해능을 나타내었다. *L. curvatus* (SA-13, YS-2), *P. pentosaceus* (SA-2, YS-1), *P. acidilactici* (SS-5, YS-3) 모두 Gram Stain 특성에 구애받지 않고 항균활성을 나타내었다. 특히, SS-5와 YS-3가 분리한 유산균 중 가장 우수한 결과를 나타내었다 (Table 3). 하지만 유산균의 항균활성 원인이 다양하기 때문에 [29,32,33], 어떠한 기전이

작용하는지는 추가적인 연구를 실시할 필요성이 요구된다.

3.4. DPPH radical scavenging activity

암, 관절염 등의 만성 질환 및 노화현상은 체내의 활성산소의 불균형과 관련이 있으며, 이러한 활성산소가 축적되면 세포 단백질, 효소, 세포막의 지질과 DNA를 산화시켜 세포에 손상을 초래하게 되는데 [34], 이러한 활성산소에 대하여 유산균은 스스로를 보호하는 항산화 능력을 가지고 있다고 보고되었다 [35]. 유산균은 활성산소의 제거, 환원작용 등을 이용하여 복합적으로 항산화 능력을 나타내며, 이를 이용하여 활성산소의 축적으로 유발되는 여러 질병과 노화 현상을 예방하는데 도움이 된다 [36]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 free radical을 가지고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 반응을 하면 전자를 내어주면서 radical이 소멸되고 색의 변화를 일으킨다. 이를 통해 radical을 환원 시키는 능력은 radical scavenging의 활성이 클수록 항산화 활성이 높다고 말할 수 있다 [37]. 전통 밀누룩에서 분리한 유산균의 항산화 능력은 DPPH radical의 소거의 정도를 통하여 측정하였고, 그 결과는 Fig. 3와 같다. 전통 밀누룩에서 분리한 유산균은 62.62~64.43%까지의 항산화 능력을 나타내었다. *P. pentosaceus*인 SA-2와 YS-1은 각각 62.64%와 62.08%의 소거능을 보였으며, *P. acidilactici*인 SS-5와 YS-3은 각각 63.53%와 63.08%, *L. curvatus*인 SA-13과 YS-2는 64.43%와 62.41%의 소거능을 보였다. 전통 밀누룩에서 분리한 유산균의 항산화 능력은 SA-2가 YS-1보다 비교적 높았으며, SS-5가 YS-3보다 높았고, SA-13이 YS-2보다 높았다. 비슷한 항산화능을 가지는 전통 밀누룩에서 분리한 유산균 중 비교적 가장 우수한 유산균은 SA-13이며 비교적 가장 낮은 항산화능을 보이는 유산균은 YS-1이다. 대조군으로 사용한 0.1 mM ascorbic acid가 81.10%의 소거능을 보였다.

3.5. 최종 선별된 유산균의 세포독성실험 및 NO assay를 통한 면역활성

3.5.1. 세포독성실험

최종 선별된 유산균의 SCS, VB, HIB의 농도에 대한 세포독성은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. Raw 264.7 cell에 SCS, VB, HIB를 1 mg/mL, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도별로 처치하고 측정된 결과, 모든 실험군에서 대조군과의 유의적인 차이를 보이지 않고 세포생존율이 모두 96% 이상으로 Raw 264.7 cell에 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 4). Park 등과

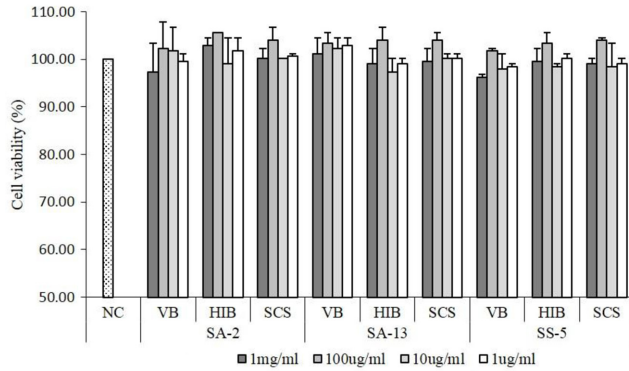


Fig. 4. The raw 264.7 cell viabilities of VB, HIB, SCS from SA-2, SA-13, SS5. The cells were stimulated with viable bacteria (VB), heat-inactivated bacteria (HIB) and spent culture supernatant (SCS) for 24 h in 5% CO₂ incubator. DMEM media was used for negative control (NC). Data shown represent the mean±SD based on three independent experiments. All experimental group was no significantly different with NC.

Er 등은 *Lactobacillus* spp.와 *Pediococcus* spp.가 암세포에 대하여 세포독성을 나타낸다고 보고하였지만 [38,39], 누룩에서 분리하고 선별한 3종의 LAB가 Raw cell line에서는 세포독성을 보이지 않아 probiotics 후보로서의 가능성이 있다고 판단된다.

3.5.2. NO assay

Macrophage는 선천면역반응과 적응면역을 개시하는 항원제시세포와 같은 기능에서의 주요 면역세포이며, 체내로 침입한 병원균이나 이물질을 제거하는 역할을 한다. 이 과정에서 macrophage는 reactive oxygen species인 Hydrogen peroxide와 nitric oxide와 interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor- α 와 같은 cytokine을 분비하여 체내의 염증반응을 조절한다 [40]. 유산균의 면역증강기능은 macrophage의 탐식기능을 향상시키고, hydrogen peroxide, nitric oxide, 그리고 cytokine 생성을 자극해 다양한 면역반응을 활성화하여 면역기능을 증진시킨다 [41]. Macrophage가 활성화되면서 생성되는 NO는 생성 후 6~8초가 지나면 산화되어 sodium nitrite ion과 sodium nitrate ion으로 산화되어 존재하기 때문에 정확한 reactive nitrogen intermediate (RNI)의 양은 sodium nitrate ion을 환원시켜 측정하는 것이 정확하지만 sodium nitrite ion이 대부분 존재하기 때문에 Stuehr and Nathan의 방법을 통해 간접적인 정량을 실시하였다 [24]. 이에 따라 최종 선별된 유산균의 SCS, VB, HIB의 농도에 따른 macrophage의 NO의 생성에 미치는 영향은 griess assay를 통해 확인하였으며 결과는 Fig. 5와 같다. 음성대조군인 DMEM만 처치한 경우 5.40 μ M이었으나, macrophage의 활성화 유도물질인 LPS를 100 ng/mL로 처치한 결과, 14.92 μ M, 200 ng/mL로 처치한 결과는 24.90 μ M의 NO가 생성되었다. 선별한 유산균의 SCS, VB, HIB의 농도를 1 mg/mL, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL로 처치한 결과, SA-

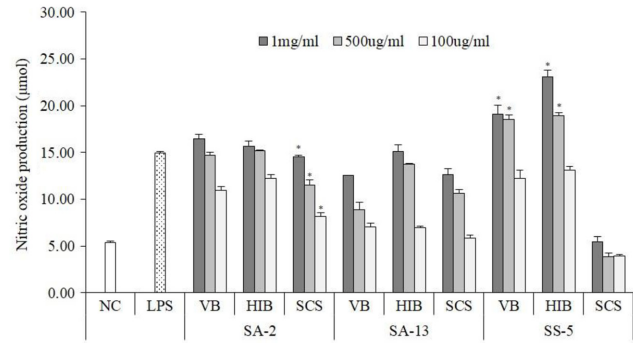


Fig. 5. Effect of VB, HIB and SCS on nitric oxide production by Raw 264.7 cells. The cells were stimulated with or without viable bacteria (VB), heat-inactivated bacteria (HIB) and spent culture supernatant (SCS) for 24 h in 5% CO₂ incubator. DMEM media was used for negative control (NC). LPS (100 ng/mL) was used for positive control (PC). Data shown represent the mean±SD based on three independent experiments. * p <0.05 were significantly higher than other results at the same concentration as the same sample.

2와 SA-13, SS-5의 SCS, VB, HIB의 농도 의존적으로 NO를 생성하였다. Raw 264.7의 활성화에 대해서 SCS를 1 mg/mL 처치하였을 때 NO 생성이 SA-2에서 14.55 μ M로 가장 높았으며, VB 1 mg/mL의 농도와 HIB 1 mg/mL의 농도에서는 모두 SS-5가 각각 18.51 μ M과 23.06 μ M로 NO 생성이 가장 높았다. 하지만 SCS의 항목에 대해서는 SS-5가 음성대조군과 비슷한 5.45 μ M을 생성하는 것으로 미루어 보아 SS-5의 SCS에는 Raw 264.7 cell을 활성화시키는 물질이 함유되지 않는 것으로 판단된다. 이 결과를 미루어 볼 때 선별된 유산균 중 SS-5의 VB, HIB가 macrophage의 활성이 뛰어난 것으로 판단된다.

4. CONCLUSION

전남 광주의 밀누룩 (SA), 경남 진주의 밀누룩 (JJ), 부산의 밀누룩 (SS), 충남 예산의 밀누룩 (YS)에서 분리한 유산균을 16S rRNA sequencing을 통해 동정한 결과, *P. pentosaceus* (SA-2, YS-1), *L. curvatus* (SA-13, YS-2), *P. acidilactici* (SS-5, YS-3)의 2개 속의 3개 종으로 동정되었다. 전통 밀누룩에서 분리한 유산균을 pH 3의 산성과 0.3%의 bile salt의 환경에서 내산성과 내담즙성을 측정된 결과 SA-2, SS-5, YS-1, YS-3이 pH 3의 환경에서 생존하였고, 그 중, SS-5와 YS-3이 순수한 내담즙성을 가진다. 하지만 더 낮은 pH와 더 높은 bile salt의 농도에서의 가혹실험을 통하여 다양한 범위에서의 결과가 필요한 것으로 판단된다. 항균실험에 대해서는 *P. acidilactici* SS-5의 bacteria free-배양액이 *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 13311에 대한 항균활성을 보였고 11.25 mg/mL의 최소생육저해농도를 확인하였다. 유산균의 항균활성은 유산균이 분비하는

특이적인 단백질인 bacteriocin, 세포 대사에 따른 유기산의 생성으로 인한 주변 환경의 pH 감소 등으로 나타난다고 알려져 있어 추가적인 실험을 통하여 확인이 필요한 것으로 판단된다. 누룩에서 분리한 유산균의 DPPH radical 소거능인 다른 전통발효식품에서 분리한 유산균 소거능에 비하여 뒤떨어지지 않고 *P. acidilactici* SS-5의 DPPH 소거능이 63.76%로 가장 높게 나타났다. 누룩에서 분리된 유산균의 spent culture supernatant (SCS), viable bacteria (VB), heat-inactivated bacteria (HIB) 모두 1 mg/mL의 농도에서 세포독성을 띄지 않았으며, *P. acidilactici* SS-5의 spent culture supernatant (SCS), viable bacteria (VB)가 Raw 264.7 cell을 이용한 nitric oxide production에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. 본 연구를 통하여 누룩에서 분리하여 선별된 *P. acidilactici* SS-5가 probiotics 제제로의 활용 가능성이 있는 것으로 사료되며, 추후 *in vivo*를 통하여 *P. acidilactici* SS-5의 활용 가능성에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 여겨진다.

REFERENCES

- AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.* 66: 365-378.
- Lee, Y. K., K. Nomoto, S. Salminen, and S. L. Gorbach (1999) *Handbook of Probiotics*. John Wiley & Sons, New York.
- Brashears, M. M., D. Jaroni, and J. Trimble (2003) Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Food. Prot.* 66: 355-363.
- Arqués, J. L., E. Rodríguez, S. Langa, J. M. Landete, and M. Landete (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed. Res. Int.* 2015: 584183.
- Quilodrán-Vega, S. R., J. Villena, J. Valdebenito, M. J. Salas, C. Parra, A. Ruiz, H. Kitazawa, and A. García (2016) Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can. J. Microbiol.* 62: 514-524.
- Ooi, L. G. and M. T. Liong (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Inter. J. Mol. Sci.* 11: 2499-2522.
- Borchers, A. T., C. Selmi, F. J. Meyers, C. L. Keen, and M. E. Gershwin (2009) Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44: 26-46.
- Seo, J. H. and H. Lee (2007) Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Food Sci. Biotechnol.* 39: 681-687.
- Li, N., W. M. Russell, M. Douglas-escobar, N. Hauser, M. Lopez, and J. Neu. (2009) Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: Effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomyfed infant rats. *Pediatr. Res.* 66: 203-207.
- Hirose, Y., S. Murosaki, Y. Yamamoto, K. Muroyama, Y. Miwa, A. Fujishima, and B. Lynch (2009) Safety studies of LP20 powder produced from heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54: 214-220.
- Seo, J. G., G. S. Lee, J. E. Kim, and M. J. Chung (2010) Development of probiotic products and challenges. *KSBB J.* 25: 303-310.
- Yang D., X. Luo, and X. Wang (2013) Effect of killer brewery yeast on the fermentation quality of Hainan shanlan rice wine. *China Brewing* 32: 59-63.
- Furuya T., K. Noguchi, K. Miyauchi, and K. Uchida (1985) Derivation of mutants with low α -amylase activity from *Aspergillus oryzae*. *Bilsci. Biotechnol. Biochem.* 59: 605-611.
- Nam, K., N. K. Lee, E. J. Yum, Y. S. Kim, D. H. Kim, S. H. Yeo, and Y. S. Jeong (2015) Change in the composition and enzyme activity of culturable lactic acid bacteria in Nuruk during fermentation at different temperatures. *Korean J. Food Preserv.* 22: 920-925.
- Lee, S. W., J. H. Kwon, S. R. Yoon, S. M. Woo, S. H. Yeo, and Y. J. Jeong (2011) Quality characteristics of brown rice vinegar prepared using varying amounts of Nuruk (an amylolytic enzyme preparation) and employing different fermentation conditions. *Korean J. Food Preserv.* 18: 26-32.
- Kim, J. E., S. K. Jung, S. J. Lee, K. W. Lee, G. W. Kim, and H. J. Lee (2008) Nuruk extract inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitrite and interleukin-6 in RAW 264.7 cells through blocking activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1423-1426.
- Lee, S. J., S. W. Cho, Y. Y. Kwon, H. S. Kwon, and W. C. Shin (2012) Inhibitory effects of ethanol extracts from Nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiol.* 40: 117-123.
- Jung, S. E. and S. H. Kim (2015) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 44-50.
- Park, C. S. and T. S. Lee (2002) Quality characteristics of takju prepared by wheat flour Nuruks. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 296-302.
- Erkkila, S. and E. Petaja (2000) Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55: 297-300.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. CLSI M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Kodali, V. P. and R. Sen (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 3: 245-251.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Stuehr, D. J. and C. F. Nathan (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169: 1543-1555.
- Badis, A., D. Guetarni, B. M. Boudjema, D. E. Henni, and M. Kihal (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21: 579-588.
- Tannock, G. W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5: 1059-1070.
- Park, H. S., J. H. Lee, and T. B. Uhm (1999) Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from piglet intestines. *J. Korean*

- Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 830-836.
28. Gilliland, S. E., T. E. Staley, and L. J. Bush (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67: 3045-3051.
 29. Seo, J. H. and H. Lee (2007) Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 681-687.
 30. Saarela, M., L. Lähteenmäki, R. Crittenden, S. Salminen, and T. Mattila-Sandholm (2002) Gut bacteria and health foods - the European perspective. *Int. J. Food microbial.* 78: 99-117.
 31. Tsai, C. C., P. P. Lin, Y. M. Hsieh, Z. Y. Zhang, H. C. Wu, and C. C. Huang (2014). Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. *The Scientific World Journal* 2014: 690752.
 32. Kim, E. A., S. C. Baick, and W. H. Chung (2002) A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by lactic acid bacteria. *J. Animal Sci. Technol.* 44: 491-498.
 33. Geis, A., J. Singh, and M. Teuber (1983) Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 205-211.
 34. Urso, M. L. and P. M. Clarkson (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189: 41-54.
 35. Sanders, J. W., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, G. Venema, and J. Kok (1995) Stress response in *Lactococcus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* 177: 5254-5260.
 36. Lin, M. Y. and Yen, C. L. (1999) Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agr. Food Chem.* 47: 1460-1466.
 37. Kim, S. S., M. H. Jeong, Y. C. Seo, J. S. Kim, N. S. Kim, W. B. Woon, et al. (2010) Comparison of antioxidant activities by high pressure extraction of *Codonopsis lanceolata* from different production areas. *Korean J. Med. Crop Sci.* 18: 248-254.
 38. Park, H., H. S. Kim, S. J. Eom, K. T. Kim, and H. D. Paik (2015) Antioxidative and anticanceric activities of Magnolia (*Magnolia denudata*) flower petal extract fermented by *Pediococcus acidilactici* KCCM 11614. *Molecules* 20: 12154-12165.
 39. Er, S., A. T. Kopal, and M. Kivanc (2015) Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turk J. Biol.* 39: 23-30.
 40. Kimoto, H., K. Mizumachi, T. Okamoto, and J. I. Kurisaki (2004) New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: Enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol. Immunol.* 48: 75-82.
 41. Laskin, D. L. (2009) Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chem. Res. Toxicol.* 22: 1376-1385.