



Research Article

# Evaluation of anti-inflammatory efficacy of *Lacticaseibacillus rhamnosus* L22-FR28 (KACC 92513P) isolated from infant feces and its *Oenanthe javanica* ferments

## 영아분변 유래 *Lacticaseibacillus rhamnosus* L22-FR28(KACC 92513P) 균주와 미나리 발효물의 항염증 효능 평가

Seoyeon Kwak, Hee-Min Gwon, Soo-Hwan Yeo, So-Young Kim\*

곽서연 · 권희민 · 여수환 · 김소영\*

Department of Agrofood Resources, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과

**Abstract** The purposes of this study were to isolate the potential *Lacticaseibacillus* spp. from the feces of infants before weaning, to investigate the safety of antibiotics resistance and beta-haemolysis, and to evaluate the anti-bacterial and anti-inflammatory effects between the selected strains and *Oenanthe javanica* (*Oj*) fermented by them. As a result of analyzing the intestinal microbial community among the stools of four infants, the genus *Bifidobacterium* was the most dominant, but *Lacticaseibacillus* (*L.*) *rhamnosus* was the most frequently isolated because of the easy culture. Nine test strains, including *Lactobacillus rhamnosus* LGG (ATCC 53103) as the positive control, were sensitive against 8 kinds of antibiotics without vancomycin in comparison with the cut-off values at the European Food Safety Authority (EFSA), and there was no hemolysis. In the antibacterial activity experiment, the *Lacticaseibacillus rhamnosus* L22-FR28 (L28, KACC 92513P) strain and *Oj*+L28 ferment showed significantly ( $p<0.05$ ) higher activities than LGG against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Additionally, these decreased the activity of the NF- $\kappa$ B/AP-1 transcription factor and inhibited the nitric oxide and cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) produced in macrophage RAW cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Consequently, the *L. rhamnosus* L28 strain and *Oenanthe javanica*+*L. rhamnosus* L28 (*Oj*+L28) ferment selected with the high anti-inflammatory effect will improve health functionality after more research, such as the verification of animal level and identification of mechanism on an anti-inflammatory.



OPEN ACCESS

**Citation:** Kwak S, Gwon HM, Yeo SH, Kim SY. Evaluation of anti-inflammatory efficacy of *Lacticaseibacillus rhamnosus* L22-FR28 (KACC 92513P) isolated from infant feces and its *Oenanthe javanica* ferments. Food Sci. Preserv., 31(3), 474-485 (2024)

**Received:** November 28, 2023

**Revised:** January 30, 2024

**Accepted:** February 07, 2024

**\*Corresponding author**

So-Young Kim

Tel: +82-63-238-3610

E-mail: foodksy@korea.kr

**Keywords** lactic acid bacteria, safety, immunity, *Oenanthe javanica*

Copyright © 2024 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

프로바이오틱스(probiotics)는 숙주의 장내미생물 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다(FAO/WHO, 2011). 일반적으로 프로바이오틱스는 유해세균의 억제, 항암, 면역활성 등의 기능을 가지고 있다고 알려져 있다(Alander 등, 1999). 또한, 혈중 콜레스테롤 수치 감소 효과와 더불어 장내 환경을 개선하여 음식물의 소화와 흡수를 도우며 건강을 증진시키는 역할로 인해 많은 관심을 받고 있다(Ann 등, 2011). 대부분의 유산균들은 GRAS(generally regarded as safe) 미생물로 분류되고 있어, 프로바이오틱스로서 이용가치가 높은 것으로 알려져 있다(Kang 등, 2019).

그 중 가장 많이 이용되고 있는 균주는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*속이며, 건강기능식품, 발효유제품 등에 프로바이오틱스 소재로 사용되고 있다(Vrese 등, 2001). 유산균은 세포성 면역을 활성화하거나 항체 생성을 조절하는 기능이 있고(Herich and Levkut, 2002), 최근에는 과민 면역반응인 알레르기를 개선하는데도 도움을 줄 수 있다는 연구결과도 보고된 바 있다(Ishida 등, 2005). 장내에서 유용한 역할을 하는 세균을 유산균이라 통칭하며 유산균은 성장하면서 유산을 생성하는 균으로 대표적인 유산균으로는 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*속에 해당하는 종들이 알려져 있다(Kim 등, 2019). 특히 *Lactobacillus*속에 해당하는 균은 장내 정상세균으로 항바이러스, 항균 효과, 면역증강을 나타내는 것으로 보고된 바 있으며(Fukushima 등, 1998), 이러한 미생물이 프로바이오틱스로 사용되기 위해서는 먼저, 섭취에 대한 안전성, 세포정착 능력과 항균활성에 대한 기능성, 소화기관 내에서의 안전성 부분에 대한 검증이 되어야 하며, 식품 제조과정 및 완제품 유통과정에서의 생존성이 충분히 유지되어야 한다(Fukushima 등, 1998).

미나리(*Oenanthe javanica*)는 습지에서 자라고, 논에서 재배되는 다년생 초본이며, 94%의 수분과 지질, 단백질, 당질 등이 1-2%의 함량을 차지하고, 나머지는 미량의 무기질과 비타민으로 이루어져 있는데(Park 등, 2007), 특히 비타민 A, B, C가 풍부한 것으로 알려져 있다(Park 등, 2007). 또한, 영양학적 측면에서 뿐만 아니라, 다양한 생리활성에는 항염증(Ai 등, 2016), 간 보호(Ahn 등, 2017), 알코올 대사 촉진(Kim 등, 2009), 항바이러스 효과(Han 등, 2018) 등이 있어 미나리는 식재료 이상으로 기능성 식품 소재로서의 이용성까지 기대되는 식품 중 하나이다. 일부에서는 미나리 발효농축액의 처리를 통해 인간 유래 간암 세포주인 HepG2의 증식을 억제하여 항암 효과가 있음을 보고한 바 있다(Kim 등, 2011). 그러나 이와 같은 특정 균주를 이용하여 발효시켜 제조한 미나리 발효물에 대한 효능 연구는 그다지 많지 않고, 대부분이 미나리 자체에서 열수 또는 에탄올 추출 등 과정을 거쳐 제조한 식물 자체에 함유된 고유 성분을 추출한 소재에 대한 기능성에 대해서만 높은 관심을 보이고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 영아 분변으로부터 분리한 유산균주 중 배양 용이성이 있는 균주를 대상으로 항생제 내성, 용혈성 등 안전성 시험을 통해 선발된 *Lactocaseibacillus rhamnosus*(일반명: *Lactobacillus rhamnosus*) 균주에 대한 유해균 생육억제, 항염증 등의 기능적 특성을 조사하고, 이 균주로 발효시켜 제조한 미나리 발효물의 항염증 효과를 확인하여 프로바이오틱스 소재로서 활용 가치를 평가하고자 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 대상 영아 선정 및 분변 시료 수집

본 연구 대상의 영아들은 이유식을 섭취하지 않고 모유 또는

분유 등 수유를 하고 있는 생후 6개월 된 영아 4명으로 IRB 승인(2023. 5. 8., IRB 관리2023-04-06/승인번호 BR-202304-04) 후 영아에게서 나온 당일 분변 시료를 수집하여 수행되었다. 시료는 채취한 즉시 transfer anaerobic medium(Kisanbio, Sparks, Seoul, MD, Korea)에 담아 운반하였으며, 보관하는 시간을 최소화하여 실험을 진행하였다.

### 2.2. 미나리 발효물 조제

본 연구에 사용된 미나리(*Oenanthe javanica*, Oj)는 2023년 순창지역에서 재배된 조생종을 구매하여 전북생물산업진흥원(JIF, Jeonju, Korean)에서 미나리를 세척 후 절단하여 -70°C 조건에서 4일간 건조하여 제작한 동결건조 분말을 사용하였다. 미나리 시료는 사용 전까지 -20°C 냉장 보관하였다. 미나리 발효물 제조를 위해 증류수 500 mL에 25 g의 미나리 동결건조분말을 0.5% 첨가하여 121°C에서 15분 동안 멸균하였다. 멸균된 미나리 시료에 분리균주( $OD_{600}=0.5$ )를 접종하여 48시간 동안 배양 후, No. 2 여과지(Whatman)를 이용하여 잔여불순물을 제거한 후 수집한 미나리 발효액은 멸균 용기에 옮겨 사용 전까지 -70°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### 2.3. 대상 영아 분변의 세균 군집 분석

분변 시료들로부터 5종 배양 배지를 사용하여 신규하게 분리된 유산균들만 분석한 값으로는 장내세균총 전체의 구성과 분포를 파악할 수 없기 때문에, Kim 등(2019)의 방법에 따라 cloning 단계를 거치지 않아서 빠르게 분석이 가능한 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing, NGS)을 이용해 세균 군집 분석을 진행하였다. 본 연구에서 이유식을 섭취하지 않고 생후 6개월 미만의 영아 4명으로부터 수집된 분변 시료들에 대하여 전체 유전체 정보인 메타게놈 분석법을 이용하여 장내 미생물 군집을 분석하고 어떠한 미생물들로 구성되어 있는지를 확인하기 위하여 외부 전문분석기관인 (주)마크로젠(Daejeon, Korea)에 NGS(16S rRNA V3-V4 sequencing) 분석을 의뢰하여 장내 미생물 군집을 분석하고 그 특성을 조사하였다.

### 2.4. 신규 균주 분리 및 동정

영아 분변에서 유용한 신규 미생물 자원을 발굴하기 위하여 먼저, 수송 배지에 담아 운반해 온 분변 시료의 일부에서 일정량을 취하여 blender로 마쇄하여 균질화 과정을 거친 후 transfer anaerobic medium로 단계별로 심진 희석한 후, 유산균 증식용 배지 5종(BL agar, lactobacilli MRS agar, Tryptic Soy Agar, Gifu Anaerobic Medium, Rogosa agar), (Difco, Sparks, MD, USA)을 사용하여 단계별 희석한 균액을 50 µL씩 접종, 도말한 다음 35°C에서 48시간 혐기 배양한 후, 생육 배지에 자란 집락

들을 구분하여 생균수를 산출하고 분리된 집락의 오염도를 확인하기 위하여 3회 이상 계대 배양하여 순수 분리하였다. 이후 유산균주들은 (주)마크로젠에 미생물 동정을 의뢰하여 분석을 진행 후, 이들 시험균주들은 MRS broth에 액체 배양한 후 50% 글리세롤을 증충하여 사용 전까지 -70°C에서 보존하였다.

## 2.5. 분리 균주의 안전성 조사

영아 분변에서 분리된 균주의 안전성 조사를 위해 먼저, 항생제 내성 평가를 수행하였다. 실험에 사용된 항생제는 ampicillin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline 및 vancomycin 등 9종이며, 항생제의 최소 생육저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위하여 ETEST® strip(BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 업체에서 제공해주는 분석 매뉴얼에 따라 수행하였다. 분리 균주는 MRS agar 배지에 탁도 0.5 McFarland(BioMerieux)로 조정된 현탁액을 멸균된 면봉으로 접종한 후 각각의 항생제 스트립을 올려놓은 후 37°C 배양기에서 48시간 동안 혐기상태에 둔 후 판정하였다. 본 실험에서 사용한 항생제 9종에 대한 cut-off value는 European Food Safety Authority(EFSA, 2012)를 참고하여 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 생육 저해 농도를 결정하였다.

또한, 영아 분변에서 분리된 균주가 적혈구를 분해하거나 파괴하는 현상인 용혈성을 보유하고 있는지 확인하기 위하여 Seo 등(2023)의 방법을 변형하여 실시하였다. 분리된 유산균을 7% sheep blood(Kisanbio)를 함유하는 MRS agar(Difco) 평판 배지에 희석 도말법으로 도말 후 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 육안을 통하여 베타용혈( $\beta$ -haemolysis, colony 주변 투명한 생성), 감마용혈( $\gamma$ -haemolysis, colony 주변 환 생성 없음), 그리고 알파용혈( $\alpha$ -haemolysis, colony 주변 녹색 환 생성)을 판단하였다(Kang 등, 2020).

## 2.6. 유산균과 미나리 발효물의 유해균 억제능 평가

영아 분변에서 분리한 신규 미생물들과 미나리 발효물의 항균활성 측정은 그람 양성균 2종(*Staphylococcus(St.) aureus* ATCC 6538와 *Bacillus(B.) cereus* KACC 10004)와 그람 음성균 2종(*Salmonella(Sal.) typhimurium* KCTC 41028와 *Escherichia(E.) coli* KCTC 1309)을 미국생물자원센터(ATCC), 한국농업미생물은행(KACC), 그리고 생물자원센터(KCTC) 등의 기관에서 각각 분양받아 사용하였고, 이들 미생물들은 tryptic soy agar (TSA) 배지에서 24시간 배양 후 병원성 미생물을 0.5 McFarland(BioMerieux)로 탁도를 맞춘 후, 균액을 0.6% agar를 포함한 semi-soluble TSA에 현탁하여 top agar plate를 제조하였다(Kim 등, 2015). 분리한 유산균주의 배양액을 0.5 McFarland

(BioMerieux)로 탁도를 맞춘 후, MRS 고체 평판 배지에 5  $\mu$ L 접종 후 37°C, 24시간 혐기 배양하였다. MRS agar 평판배지 위에 top agar plate를 분주 후 37°C에서 24시간 배양 후 형성된 clear zone의 지름(mm)을 측정하여 병원성 미생물에 대한 항균활성 보유 여부를 판단하였다.

미나리 발효물에 대한 항균활성 측정은 안전성 시험을 통해 선발된 균주를 접종한 미나리 발효물의 100과 200 ppm 시료를 앞서 언급한 방법과 동일하게 진행하여, 배양 후 형성된 clear zone의 지름(mm)을 측정하여 병원성 미생물에 대한 항균활성 보유 여부를 판단하였다.

## 2.7. 유산균과 미나리 발효물의 항염증 효능 평가

### 2.7.1. 세포 생존율 측정

영아분변에서 분리한 유산균주들과 제조한 미나리 발효물에 대한 항염증 효과를 평가하기에 앞서 먼저 RAW-Blue™ cell (이하 RAW cell, KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)을 이용하여 시험물질에 의한 세포독성 수준을 조사하였다. RAW-Blue cell의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)의 환원 방법을 이용하여 평가하였는데, 세포 안에 있는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 지질인 MTT tetrazolium이 비수용성의 청자색을 띠는 MTT formazan으로 환원되는 양을 측정하는 방법이다(Gil 등, 2018). 먼저, 96 well plate에 RAW cell을  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 분주하여 24시간 배양 후 분리 유산균과 양성대조군 LGG를 각각 OD<sub>600</sub>=0.5로 조정된 배양액의 생균수는  $2 \times 10^7$  CFU/mL로 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하고, 안전성 시험을 통해 선발된 균주를 접종한 미나리 발효물은 100과 200 ppm 농도로 처리하고, control은 배지를 동량으로 처리한 이후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 24시간 배양하여 MTT assay를 수행하였다. MTT 시약에 PBS(Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 제조한 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 첨가한 후 plate를 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차광시켜 37°C에서 4시간 배양하여 MTT formazan으로 환원되도록 하였다. 배양 후 유리 파스퇴르 피펫을 이용하여 배지를 제거하고, 유기용매 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., USA)를 각 well에 150  $\mu$ L 첨가하여 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 각각의 흡광도를 대조군의 흡광도 결정값에 대한 백분율(%)로 나타내었다. 우수 선발 균주를 처리한 미나리 배양물의 항염증 효능을 평가하기 위한 추출물 시료 제조는 다음과 같다. 미나리 분석시료는 외부기관 전북생물산업진흥원에서 동결건조 분말 상태로 제공받았으며, 증류수 1 L에 미나리 동결건조 분말을 0.5% 첨가하여 121°C에서 15분 동안

멸균하였다. 멸균 후 No. 2 여과지를 이용하여 잔여불순물을 제거하여 여과액을 수집하여 실험에 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

### 2.7.2. NF- $\kappa$ B 전사인자 활성화

선천성 면역반응의 중추적인 역할을 하는 NF- $\kappa$ B의 활성화는 대식세포에서 lipopolysaccharide(LPS) 같은 여러 자극인자들에 의해 자극을 받으면 I $\kappa$ B(inhibitor of NF- $\kappa$ B)의 인산화에 의하여 활성화되어 핵 내부로 이동됨으로써 유전자들의 transcriptional activator로 작용하게 되는데(Baeuerle 등, 1988), 본 연구에서는 그람 양성균에 해당되는 유산균 분리균주의 세포벽을 구성하고 있는 펩티도글라이칸(peptidoglycan)과 지단백질(lipoprotein) 등이 대식세포의 TLR2(Toll-like receptor 2)에 인식하여 활성화된 NF- $\kappa$ B 반응을 측정함으로써 선천면역 기능을 평가하였다(Chae 등, 2005). 이번 실험에 사용한 RAW cell은 NF- $\kappa$ B/AP-1 reporter cell line(RAW-Blue™ cells, InvivoGen, Waltham, MA, USA)으로 RAW 264.7 macrophages에서 유래된 세포로 NF- $\kappa$ B/AP-1-inducible SEAP reporter 유전자를 가지고 있기에 면역반응에 의해 자극을 받으면 활성화되어 quanti blue 지시약(InvivoGen)에 의해 색 변화가 일어나 활성화 여부를 판단할 수 있다(Xie 등, 2011). RAW cell은  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건으로 24시간 동안 배양 후, 분리한 유산균주와 양성대조구 LGG를 각각 OD<sub>600</sub>=0.5 조정한 배양액의 생균수는  $2 \times 10^7$  CFU/mL로 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL의 양과 선발균주 *L. rhamnosus* L28과 양성대조구 LGG를 0.1% 접종한 미나리 발효물을 농도별(100, 200 ppm)로 처리하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 quanti blue 시약 200  $\mu$ L와 상층액 20  $\mu$ L를 혼합하여 암실에서 10분 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax M2, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리 유산균주의 NF- $\kappa$ B 측정값은 LPS 처리군의 생성량과 비교하여 활성 억제 정도를 판단하였다.

### 2.7.3. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

Nitric oxide의 생성량은 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, sulfanilamide, 그리고 NO<sup>2</sup>가 반응하여 azo coupling을 이루는데, 이때 두 개의 링 형태가 540 nm의 흡광도에서 최대값을 가지는 것을 이용한 Gil 등(2019)의 방법을 변형하여 실시하였다. Griess 시약(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 발색 반응을 통해 NO 농도를 측정하였다. RAW cell은  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 16시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한 후, 분리한 유산균주와 양성대조구 LGG를 각각 OD<sub>600</sub>=0.5 조정한 배양액의 생균수는  $2 \times 10^7$  CFU/mL로 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL의 양으로, 선발균주 *L. rhamnosus* L28과 양성

대조구 LGG를 0.1% 접종한 미나리 발효물은 농도별(100, 200 ppm)로 처리하고, 4시간 배양 후 LPS를 1  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 다시 20시간 동안 배양하였다. 20시간 배양 후, cell 배양액 100  $\mu$ L를 96 well plate에 분주하고, Griess reagent 100  $\mu$ L를 혼합하여 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태에서 실온에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader(Libra S35, Biochrome Ltd., England)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분리 유산균주의 NO 생성량은 LPS 처리군의 생성량과 비교하여 활성 억제 정도를 판단하였다.

### 2.7.4. Cytokine 단백질 생성량 측정

대식세포에 LPS와 함께 처리하면 생성되는 세포활성물질 중 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 Gil 등(2018)의 방법을 변형하여 측정하였다. 앞에 언급된 NF- $\kappa$ B 시험 방법과 동일하게 세포배양 후 각각의 균주를 농도별로 처리하여 4시간 배양 후 LPS를 1  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 20시간 동안 배양한 후, 원심분리(1,300 rpm, 5분)하여 상등액을 취하여 효소결합면역흡착검사(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)를 이용하는 cytokine kit(IL-6와 TNF- $\alpha$  ELISA Ready-SET-Go, Bioscience Co., San Diego, CA, USA)로 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 발현 생성량을 측정하였다. IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 항체가 코팅이 되어 있는 96 well plate에 상층액 시료 100  $\mu$ L를 각 well에 넣은 후 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 상층액을 제거하고, PBS와 Tween 20(Sigma-Aldrich Co)을 혼합하여 제조한 washing buffer로 6회 세척하였다. Detection antibody solution을 넣고 항체와 반응시킨 후, avidin과 결합된 horseradish peroxidase(HRP) enzyme를 첨가하여 상온에서 15분 동안 반응시키고, tetramethylbenzidine (TMB) solution을 넣어 HRP 효소에 대한 기질로 반응시켜 색상의 변화가 관찰되면 Stop solution(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 넣어 TMB 기질과 HRP 효소의 반응을 종결시킨 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 양성대조군(LPS) 대비 감소량을 비율로 환산하여 나타내었다.

## 2.8. 통계처리

이번 실험을 통해 도출된 모든 연구결과들은 3회 반복 후 평균값을 산출하여 나타내었고, SPSS(version 27, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple range test로 각 실험구 간의 유의성(p<0.05)을 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 대상 영아 분변 균집 분석

이유식을 섭취하지 않은 생후 6개월 미만의 영아 4명을 대상으로 분변 시료를 수집하여 NGS 분석법을 통해 장내 미생물

군집을 살펴본 후, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대상자 4명의 모든 영아 분변들 내 세균 군집에서 *Bifidobacterium*속이 45-76%로 가장 높은 비중으로 우점하고 있었다. Kim 등 (2019)에 따르면 일반적으로 모유에는 다양한 올리고당이 존재하여 모유를 섭취하는 영아는 모유의 올리고당 때문에 장내 미생물 군집에서 *Bifidobacterium*속의 분포가 매우 높다고 보고하여 이번 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한, 동일한 연구 논문에서 보고한 영아 분변에서 가장 우점하여 분리가 용이한 유산균주로 알려진 *Lactobacillus*속은 본 연구에서는 7-12%로 낮은 분포도를 보였다. 또한, 일부 대상자에서 gram-negative 세균 중 *Citrobacter*와 *Escherichia*속 장내세균들이 25-30%, 9-23% 수준으로 검출되었는데, 이들 속에 해당하는 균종 중 *Citrobacter*(*C.*) *freundii*와 *Escherichia*(*E.*) *fergusonii* 등은 영아의 분변시료 또는 환부에서 분리된 사례가 보고되어 있다 (Kim 등, 2009). *C. freundii*균은 장내 세균과의 균 종류 중 하나로(Kim 등, 2018), 물, 토양, 동물이나 사람의 장관에서 흔히 발견될 수 있으며, 건강한 사람의 대변에서는 정상 세균으로 존재하지만, 면역력이 낮은 사람들에게는 병원 감염의 원인균이 되며, 항생제 내성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2018). *E. fergusonii*의 경우 Enterobacteriaceae의 한 종으로서 표현형적 및 유전학적으로 *E. coli*와 유사한 특성을 가지고 있다. 사람에서 *E. fergusonii*는 혈액, 복부 상처, 담낭액, 소변, 대변 등에서 분리되었다는 보고가 있다(Farmer 등, 1985). 이에 일부 면역력이 취약한 계층에서 빈도 있게 검출되는 병원성 장내균총들은 지속적인 모니터링과 질환과의 연계성을 위한 별도의 심화 연구가 필요하다고 생각된다.

### 3.2. 분변 시료 중 유산균의 분리 및 동정

프로바이오틱스 고시형 건강기능성 원료들 중 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*속 균주들은 건강식품, 유산균 정장제, 사료

보조제 등 산업적으로 가장 많이 사용되고 있는데(Vrese 등 2001), 본 연구에서는 수입 비중이 높은 이들 유산균 원료를 국산화하기 위하여 영아분변으로부터 신규한 균주들을 확보하고자 수행되었다. 다양한 생육배지를 사용하여 배양 후 형성된 전형적인 유산균 집락을 취해 총 71주를 분리하여 순수배양 후 16S rRNA 염기서열 분석하여 미생물을 동정하였다(data not shown). 71주 분리균주들은 모든 대상자에서 검출된 *Lactobacillus rhamnosus* 44주와 일부에서 검출된 *Escherichia fergusonii* 13주, 그리고 *Enterococcus faecalis* 14주 등이었다. 앞에서 언급한 세균군집 결과와는 상이하게 다양한 생육배지를 이용하여 분리 동정하였을 때는 *Bifidobacterium*속에 해당하는 균주는 거의 분리되지 않았는데, Song 등(2002)에 따르면 *Bifidobacterium*속은 영양요구성과 배양방법이 까다롭고, 절대 혐기성이라는 특성으로 인하여 분리가 쉽지 않다고 언급하여, 본 연구에서도 산소 스트레스에 취약한 혐기성 균주들이 낮은 빈도로 검출된 것으로 사료된다. 하지만, Kim 등(2019)의 보고에서처럼, 영아 분변에서 가장 우점하여 분리가 용이한 유산균주들인 *Lactobacillus*속이 본 연구결과에서도 다수 분리 . 동정되어 유사한 경향을 보였다.

### 3.3. 분리균주의 안전성 조사

2019년 이후 식품의약품안전처에서는 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에 제시된 바와 같이 프로바이오틱스 균주들에 대하여 항생제 내성 보유 여부, 용혈성, 대사학적 특성 등 안전성을 확인하도록 권고하고 있다(Eun 등, 2021). 이에 본 연구에서 분리한 유산균주들을 대상으로 EFSA(2012)의 ‘probiotics에 대한 항생제 평가 가이드라인’에 따라 ampicillin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, streptomycin, tetracycline, kanamycin, vancomycin 등 9종 항생제들에 대한 내성 보유 여부를 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 모든 항생제들에 민감성을 나타낸 *Lactocaseibacillus rhamnosus*종 L28, 1-1-1, 1-1-9, 1-1-14, 2-1-13, 2-1-17 및 4-1-19 등 7주와 *L. reuteri* 11-2 1주를 포함한 총 8주를 일차적으로 선발하였다. 일부 연구(Han, 2021)에서는 영아 분변으로부터 분리된 *Lactobacillus reuteri* 등 유산균주 중 gentamycin, kanamycin, chloramphenicol 등 항생제에 대한 내성이 있다고 보고하였는데, 본 연구에서 선발된 균주들 중 *L. rhamnosus* L28 균주와 *L. reuteri* 11-2 균주만 항생제 내성에 대한 민감성을 보여 안전성을 보유한 것을 확인하였다. 이와 같이 균주 단위에서 항생제에 대한 민감성 반응이 다르기 때문에, Kang 등(2020)이 언급한 바와 같이 대부분의 유산균들이 다양한 항생제에 대한 내재적인 내성을 가지고 있어 식품원료 또는 기능성 소재로서 활용성을 평가하기 전에 반드시 선행적으로 확인시험을 수행하여야 할 것이다.

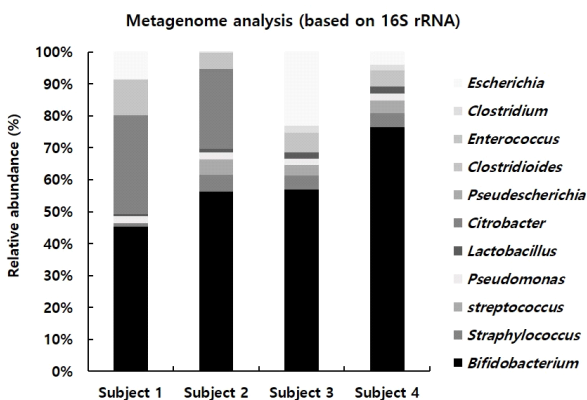


Fig. 1. Relative abundance profiles of individual subjects on each platform for species.

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) values against 8 antibiotics of *Lactobacillus* spp. used in this study

Strains	Minimum inhibitory concentration (MIC) values (mg/L) of lactic acid bacteria against antibiotics								
	EFSA guideline	Clindamycin	Chloramphenicol	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Ampicillin	Erythromycin	Tetracycline
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	4	16	64	32	4	1	8	n.r
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1	4	8	64	64	2	1	16	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	0.19±0.01 <sup>1)b</sup>	2.00±0.00 <sup>c</sup>	6.00±0.00 <sup>c</sup>	16.00±0.00 <sup>a</sup>	24.00±0.00 <sup>d</sup>	0.05±0.00 <sup>a</sup>	0.32±0.00 <sup>b</sup>	0.25±0.00 <sup>b</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L28	0.50±0.00 <sup>f</sup>	2.00±0.00 <sup>c</sup>	12.00±0.00 <sup>c</sup>	32.00±0.00 <sup>b</sup>	16.00±0.00 <sup>c</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	0.25±0.00 <sup>a</sup>	0.064±0.00 <sup>a</sup>	n.r
<i>Lactobacillus reuteri</i> 11-2	0.03±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.01 <sup>c</sup>	16.00±0.00 <sup>f</sup>	32.00±0.00 <sup>b</sup>	48.00±0.00 <sup>f</sup>	1.50±0.00 <sup>f</sup>	0.50±0.00 <sup>d</sup>	16.00±0.01 <sup>f</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-1	0.38±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	8.00±0.00 <sup>d</sup>	192.00±0.00 <sup>d</sup>	12.00±0.00 <sup>b</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	2.00±0.00 <sup>f</sup>	1.50±0.00 <sup>d</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-19	0.25±0.01 <sup>d</sup>	0.38±0.00 <sup>b</sup>	4.00±0.00 <sup>b</sup>	128.00±0.00 <sup>e</sup>	24.00±0.00 <sup>d</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	1.50±0.00 <sup>d</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-14	0.5±0.00 <sup>f</sup>	2.00±0.00 <sup>c</sup>	6.00±0.00 <sup>c</sup>	128.00±0.00 <sup>e</sup>	16.00±0.00 <sup>c</sup>	0.75±0.01 <sup>c</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	0.75±0.00 <sup>c</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-13	0.38±0.00 <sup>c</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	8.00±0.00 <sup>d</sup>	192.00±0.00 <sup>d</sup>	24.00±0.00 <sup>d</sup>	0.50±0.00 <sup>d</sup>	0.75±0.01 <sup>c</sup>	2.00±0.01 <sup>c</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-17	0.23±0.00 <sup>c</sup>	0.25±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	16.00±0.00 <sup>a</sup>	6.00±0.01 <sup>a</sup>	0.23±0.00 <sup>b</sup>	0.32±0.00 <sup>b</sup>	256.00±0.00 <sup>g</sup>	n.r
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> F2-6M-4-1-29	0.5±0.02 <sup>f</sup>	1.50±0.00 <sup>d</sup>	16.00±0.00 <sup>f</sup>	256.00±0.00 <sup>e</sup>	32.00±0.00 <sup>c</sup>	0.50±0.00 <sup>d</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	0.75±0.00 <sup>c</sup>	n.r

<sup>1)</sup>Values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (<sup>a-g</sup>) within the same column indicate significant differences (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Probiotics는 체내 환경 내에서 생존하여 장관 내 유용한 생리활성을 나타내야 하며, 용혈 현상이나 돌연변이 유발이 없어야 한다고 알려져 있다(Salminen 등, 1998). Table 2에 제시한 것처럼 유아분변에서 분리한 7주의 시험균주와 양성대조구로 사용된 LGG균은 모두 용혈능이 없는 감마 용혈 현상을 나타내는 것으로 확인되었다. Han 등(2021)의 보고에서도 유아의 분변에서 분리한 7종의 유산균 모두에서 감마 용혈, 즉, 비용혈성을 나타내어 모두 안전한 균주임을 확인하였다고 하여 이번 연구 결과와 유사한 경향을 보였다.

### 3.4. 유산균과 미나리 발효물의 유해균 억제능 평가

안전성 조사를 통해 선별된 8주의 분리균들과 이들 유산균 주들을 이용하여 제조한 미나리 발효물의 병원성 미생물 4종에

대한 항균활성 평가를 진행하고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 분리균주들 중 그람 양성균인 *B. cereus*와 *Sta. aureus*에 대하여 양성대조구인 LGG균(17.85±0.03과 18.90±0.04 mm)의 억제활성 대비 *L. rhamnosus* L28 균주의 경우 각각 35.79±0.00과 36.03±0.01 mm의 억제환을 나타내어 높은 항균 활성을 보였다. 또한, 그람 음성균인 *E. coli*와 *Sal. typhimurium*에 대해서도 *L. rhamnosus* L28 균주는 36.91±0.02와 33.10±0.00 mm의 억제환을 나타내었는데, 양성대조구인 LGG균이 22.07±0.01과 17.20±0.00 mm 값을 보여 그람 음성균들에 대해서도 유사한 수준의 항균 활성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과와 연계하여 Kang 등(2010)의 연구결과에 따르면 *Lactobacillus rhamnosus* GG-4 균주가 6종의 병원균에 대한 항균력을 가지고 있었고, 억제환의 크기가 18.00±0.02 mm 정

**Table 2. Prevalence of haemolytic activities of isolated LAB strains**

LAB strains	Haemolysis		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC53103	- <sup>1)</sup>	-	+ <sup>2)</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L28	-	-	+
<i>Lactobacillus reuteri</i> 11-2	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-1	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-19	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-14	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-13	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-17	-	-	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> F2-6M-4-1-29	-	-	+

<sup>1)</sup>-, negative haemolysis.

<sup>2)</sup>+, positive haemolysis.

**Table 3. Prevalence of anti-microbial activities of isolated LAB strains**

LAB strains	Anti-microbial effect (Inhibition zone, diameter (mm))			
	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1309	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 41028	<i>Bacillus cereus</i> KACC 10004	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC53103	22.07±0.01 <sup>e1)</sup>	17.02±0.00 <sup>c</sup>	17.85±0.03 <sup>i</sup>	18.90±0.01 <sup>l</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L28	36.91±0.02 <sup>a</sup>	33.10±0.00 <sup>a</sup>	35.79±0.00 <sup>a</sup>	36.03±0.01 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus reuteri</i> 11-2	25.72±0.00 <sup>b</sup>	26.38±0.00 <sup>b</sup>	33.30±0.01 <sup>b</sup>	35.18±0.00 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-1	9.13±0.00 <sup>h</sup>	18.94±0.01 <sup>d</sup>	30.47±0.00 <sup>c</sup>	29.11±0.00 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-19	11.04±0.00 <sup>f</sup>	8.67±0.00 <sup>i</sup>	28.89±0.00 <sup>d</sup>	28.68±0.00 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-1-1-14	15.94±0.01 <sup>d</sup>	19.73±0.00 <sup>c</sup>	26.86±0.00 <sup>f</sup>	30.14±0.00 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-13	10.11±0.00 <sup>g</sup>	14.89±0.00 <sup>f</sup>	19.12±0.00 <sup>h</sup>	25.81±0.01 <sup>f</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M1-6M-2-1-17	7.18±0.00 <sup>i</sup>	11.08±0.01 <sup>g</sup>	27.61±0.01 <sup>c</sup>	23.95±0.00 <sup>g</sup>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> F2-6M-4-1-29	13.10±0.00 <sup>e</sup>	10.72±0.00 <sup>h</sup>	20.18±0.00 <sup>g</sup>	20.15±0.00 <sup>h</sup>
Oj+LGG	17.94±0.01 <sup>b</sup>	19.22±0.00 <sup>b</sup>	18.75±0.01 <sup>b</sup>	18.34±0.00 <sup>b</sup>
Oj+L28	37.91±0.00 <sup>a</sup>	28.10±0.00 <sup>a</sup>	36.14±0.00 <sup>a</sup>	25.30±0.00 <sup>a</sup>
Oj+11-2	7.64±0.00 <sup>c</sup>	5.10±0.01 <sup>c</sup>	10.02±0.00 <sup>c</sup>	8.10±0.01 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (<sup>a-i</sup>) within the same column indicate significant differences (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

도로 항균활성이 가장 강하다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 또한, *L. reuteri* 11-2균주의 경우, 다른 분리균주들에 비해 그람 양성균인 병원균 2종에 대해서지만  $35.3 \pm 0.01$ 과  $35.2 \pm 0.00$  mm로 높은 억제 활성을 나타내었다.

따라서 항생제 내성, 용혈성 등에 대한 안전성이 확보되고 유해균 생육 억제능을 보유한 2주의 *L. rhamnosus* L28과 *L. reuteri* 11-2를 이용하여 미나리 발효물을 제조한 후 유해균 생육 억제능을 살펴보았다. 그 결과, *L. rhamnosus* L28로 배양한 미나리 발효물(*Oj*+L28)은 *B. cereus*와 *Sta. aureus*에 대하여 각각  $36.14 \pm 0.00$ 과  $25.03 \pm 0.00$  mm의 억제환을 나타내었는데, 이는  $18.75 \pm 0.01$ 과  $18.34 \pm 0.00$  mm의 억제환을 보인 양성대조구 LGG 미나리 발효물(*Oj*+LGG)에 비해 높아 해당 균주 단독으로 처리했을 때의 항균활성과 유사한 수준으로 항균 활성을 보였다. 또한, 그람 음성균인 *E. coli*와 *Sal. typhimurium*에 대해서도 *Oj*+L28 발효물은  $37.91 \pm 0.00$ 과  $28.10 \pm 0.00$  mm의 억제환을 나타내었는데, *Oj*+LGG 발효물이  $17.94 \pm 0.01$ 과  $19.22 \pm 0.00$  mm 값을 보여 그람 음성균들에 대해서도 유사한 수준의 항균활성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. *Lactobacillus* 속의 경우 Makras 등(2006)에 따르면 *Lactobacillus*속이 박테리오파지와 같은 항균물질을 생산하며 *Salmonella typhimurium*의 생육을 저해한다고 하였으며, Maragkoudakis 등(2006)은 유제품에서 분리한 lactobacilli가 박테리오파지와 같은 항균물질을 생산하지 않더라도 *Salmonella typhimurium*와 *Escherichia coli*가 Caco-2 cells에 부착되는 것을 경쟁적으로 억제하여 증식을 저해할 수 있다고 보고하여, 본 연구에서 발굴한 균주 또는 미나리 발효물 역시 유해균 억제 활성이 있어 보유 특성을 활용한 적합한 분야에 응용이 가능할 것으로 기대된다.

### 3.5. NF- $\kappa$ B 전사인자 활성 억제능

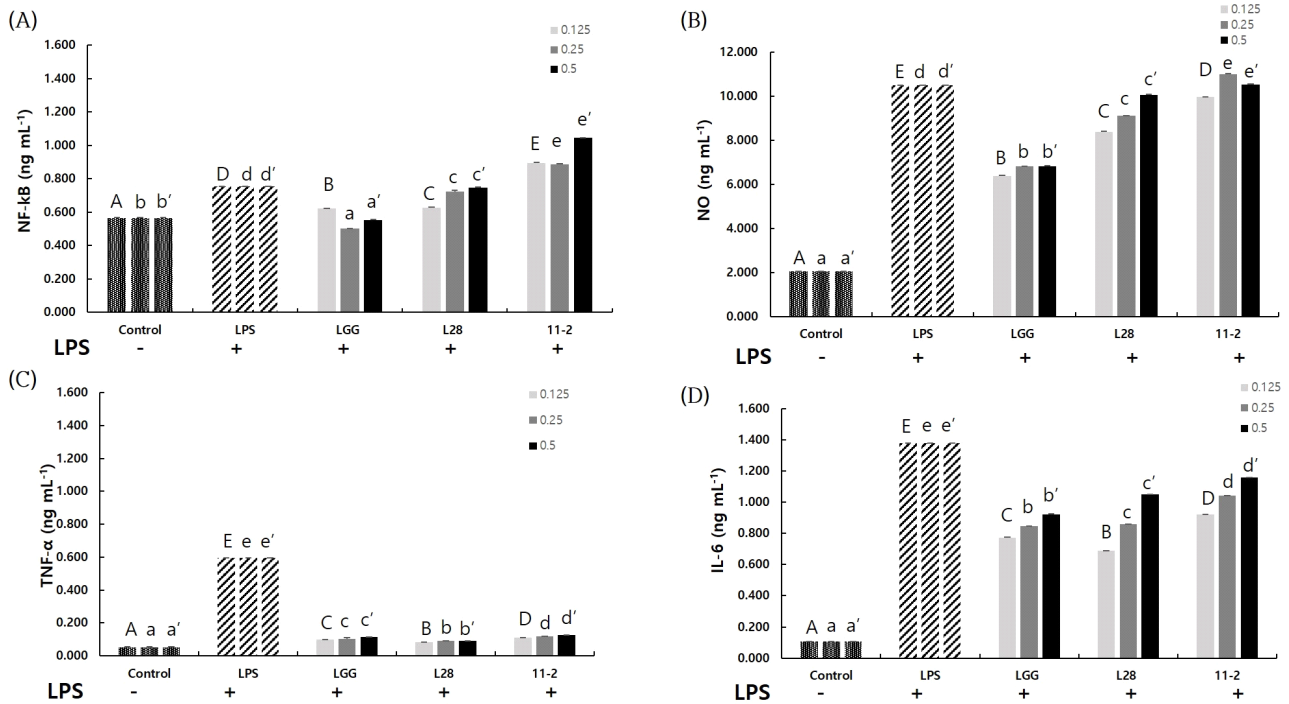
영아분변에서 분리한 유산균주와 미나리 발효물이 대식세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 세포 생존율을 평가한 결과, 모든 균주들은 흡광도 OD600 nm에서 0.5로 조정된 배양액(생균수:  $2 \times 10^7$  CFU/mL)을 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하였을 때와 안전성 평가를 통해 선발된 *L. rhamnosus* L28 균주, *L. reuteri* 11-2 균주와 양성대조구 LGG 균주를 미나리 여과액에 각각 0.1% 접종하여 100과 200 ppm의 농도로 하여 배양액을 각 plate에 처리하였을 때 무처리구(control) 대비 모든 처리구에서 90% 이상의 증식률을 나타내어 RAW-Blue cell에 대한 세포 독성은 나타나지 않았다(data not shown). 유산균은 프로바이오틱스로서 숙주의 면역시스템을 조절하며 유익한 작용을 하는 미생물로 알려져 있다(Gil 등, 2018). 대표적인 상업용 균주로 *L. rhamnosus* GG균은 NF- $\kappa$ B의 신호전달체계를 억제시켜 면역기능을 조절하는 것으로 알려져 있어(Zhang 등, 2005), 본 연구의 양성대조구로서 시험균

주와의 비교를 위해 사용하였다. Fig. 2A에 제시한 바와 같이 양성대조구 LGG와 선발 균주 *L. rhamnosus* L28과 *L. reuteri* 11-2 균주들을 LPS로 자극시킨 RAW-Blue cell에 각각 처리함으로써 활성화된 NF- $\kappa$ B/AP-1 전사인자의 억제 정도를 측정하였는데, 배양액을 각 plate에 0.125, 0.25, 0.5 mL로 처리하였을 때 LPS 처리구 대비 양성대조구(LGG)의 NF- $\kappa$ B 전사활성 측정값은 0.621, 0.502, 0.555 ng mL<sup>-1</sup>이었고, *L. rhamnosus* L28 균주는 0.628, 0.723, 0.746 ng mL<sup>-1</sup>, *L. reuteri* 11-2 균주는 0.894, 0.885, 1.045 ng mL<sup>-1</sup>로 시험균주 중 *L. rhamnosus* L28 균주가 가장 낮은 처리구에서 NF- $\kappa$ B 생성이 감소되는 효과를 보였다. 또한 *L. rhamnosus* L28 균주를 이용하여 만든 미나리 배양물의 항염증 효능을 평가한 결과, Fig. 3A에 제시한 바와 같이 *L. rhamnosus* L28 균주로 발효시킨 *Oj*+L28 배양물을 100과 200 ppm으로 처리하였을 때 LPS 자극에 의해 NF- $\kappa$ B가 활성화된 것을 각각 0.544와 0.441 ng mL<sup>-1</sup>로 높은 농도에서 보다 낮춘다는 것을 알 수 있었다. 이는 양성대조구인 LGG 균주를 이용하여 발효시킨 미나리 배양물(*Oj*+LGG)이 0.644와 0.605 ng mL<sup>-1</sup>의 활성을 보여 *L. rhamnosus* L28 균주를 처리한 미나리 발효물은 균주 단독처리구보다 높은 억제 효과를 보였다.

### 3.6. NO 생성량

영아 분변으로부터 발굴된 유산균주와 이를 이용하여 배양시켜 제조한 미나리 발효물이 LPS 자극으로 활성화된 대식세포가 배양액 중에 생성된 NO의 변화량을 측정하여 그 결과를 Fig. 2B와 3B에 나타내었다. Kim 등(2017)은 NO는 활성산소의 일종으로 염증을 유발하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는데, 특히 inducible NOS(iNOS)가 염증 반응에 관여하며, LPS와 TNF- $\alpha$  등의 염증성 cytokine의 자극이 있을 때 발현된다고 보고하여 본 연구에서는 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 RAW cell을 자극한 후 각각 시험균주를 처리한 세포배양액 중에 생성된 NO의 양을 측정하였다. Fig. 2B에 제시한 바와 같이 LPS 처리구 대비 각 균주들의 균액을 각 plate에 0.125, 0.25, 0.5 mL로 처리하였을 때 양성대조균은 6.386, 6.814, 6.814 ng mL<sup>-1</sup>의 측정 결과값과 달리, L28 균주는 각각 8.386, 9.100, 10.052 ng mL<sup>-1</sup>, 11-2 균주는 9.957, 11.005, 10.529 ng mL<sup>-1</sup>의 NO 활성 값을 보여 시험균주 중 L28 균주만이 저농도에서 처리하였을 때 약간의 억제효과를 나타내었다. 또한, 각각의 시험균주들을 이용하여 발효시킨 미나리 배양물들 중에 *Oj*+L28의 경우 100과 200 ppm 농도로 처리하였을 때 각각 6.005와 4.671 ng mL<sup>-1</sup>의 NO 활성 값을 보였고, *Oj*+LGG는 5.862와 5.195 ng mL<sup>-1</sup>, 미나리 원액(*Oj*)은 6.481과 6.290 ng mL<sup>-1</sup>의 값을 나타





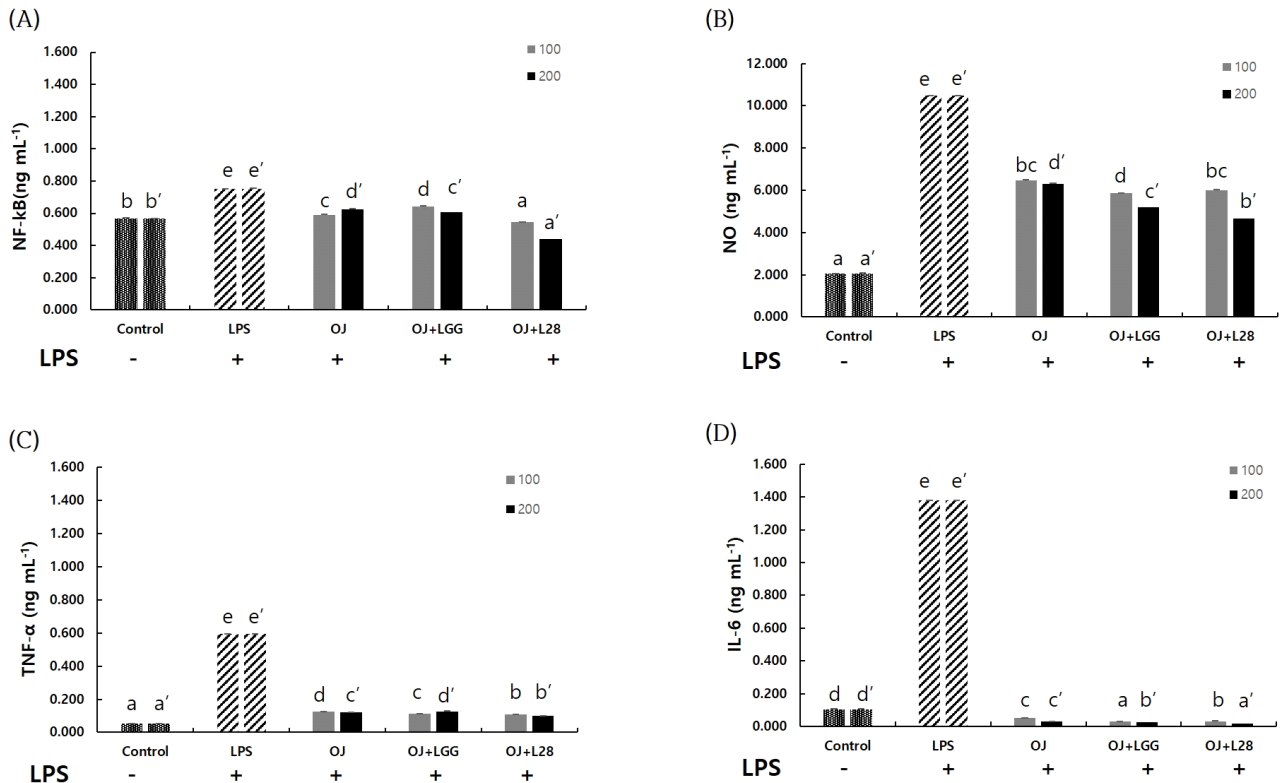
**Fig. 2.** Inhibitory effects of lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL)-induced NF-κB production (A), NO production (B), cytokines TNF-α (C) and IL-6 (D) production in RAW-Blue cell by the isolates. All values are mean±SD (n=3). The different superscript letters on the bar indicate significant differences (p<0.05) by Duncan’s multiple range test.

내었다. 이에 앞에서 언급한 NF-κB 활성 억제능과 유사하게 *L. rhamnosus* L28 균주를 처리한 미나리 발효물의 NO 생성량이 역시 낮다는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.7. 세포활성물질(Cytokine) 생성량

영아 분변으로부터 분리하여 선발한 유산균주와 이들로 발효시켜 제조한 미나리 배양물에 의한 TNF-α와 IL-6 등의 cytokine 생성량을 측정된 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 나타내었다. Lee 등(2013)의 보고에서 cytokine 중에서 TNF-α와 IL-6은 대표적인 염증성 cytokine으로 림프구나 대식세포 등 면역세포가 LPS로 자극되면 다양한 염증인자들이 증가하게 된다고 보고하여 본 연구에서도 동일하게 균주 단독처리군과 이들 유산균주들을 이용하여 제조한 미나리 발효물에 의한 TNF-α와 IL-6 등의 cytokine 생성량의 변화를 측정하여 Fig. 2C와 2D에 각각 나타내었다. 먼저, 시험균주들과 양성대조군의 처리에 의한 TNF-α 생성량은 처리농도에 무관하게 LPS 대비 모든 처리군에서 높은 생성 억제능을 보였다. 각 처리 농도별(0.125, 0.25, 0.5 mL)로 배양액의 효과를 살펴보았을 때, LPS 대비 양성대조군의 측정값은 0.099, 0.103, 0.113 ng mL<sup>-1</sup>이었고, L28 균주는 0.084, 0.091, 0.092 ng mL<sup>-1</sup>, 11-2 균주는 0.112, 0.117, 0.126 ng mL<sup>-1</sup>의 값을 보여 L28균 단독 처리가 시험군

주 중 양성대조군 대비 TNF-α 억제효과를 보였다. 또한 *L. rhamnosus* L28 균주를 이용하여 발효시켜 제조한 미나리 배양물(Oj+L28)은 TNF-α 결과에서 각각 0.110과 0.101 ng mL<sup>-1</sup>로 농도 의존적으로 낮은 생성량을 나타내었고, 양성대조군으로 제조한 Oj+LGG는 0.115와 0.125 ng mL<sup>-1</sup>, 미나리 원액 Oj은 0.126과 0.120 ng mL<sup>-1</sup>로 이들 시료들 역시 낮은 측정값을 나타내고 있었다. IL-6의 생성량 변화에서는 Oj+L28은 각각 0.030과 0.017 ng mL<sup>-1</sup>, Oj+LGG는 0.029와 0.024 ng mL<sup>-1</sup>이었고, Oj 원액은 0.051과 0.030 ng mL<sup>-1</sup>로 TNF-α와 마찬가지로 모든 시험군에서 감소하는 것을 보였고, 특히 Oj+L28 시료의 경우 통계적으로 가장 낮은 측정값을 보였다(p<0.05). 미나리는 본래 항염증 효능을 갖고 있으므로(Park 등, 2007), 균주 단독을 처리했을 때보다 선발균주로 발효시킨 미나리 배양액을 처리하였을 때 염증유발물질에 의해 분비된 cytokine 생성량을 낮추는데 효과를 보였다고 판단된다. Lim 등(2013)은 *Lactobacillus rhamnosus* GG가 장관에서 병원성 미생물들이 혈관이나 세포조직으로 침투하는 것을 억제하며, 시스템적인 또는 국소적인 면역반응을 증강시키고, 감염 억제와 감염으로부터의 회복을 빠르게 하는 등의 역할을 한다고 보고하였다. 본 연구에서 양성대조군과 동종인 *L. rhamnosus* L28 균주는 단독 또는 미나리발효액(Oj+L28)의 둘 다에서 높은 cytokine 높은



**Fig. 3.** Inhibitory effects of lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu\text{g/mL}$ )-induced NF- $\kappa\text{B}$  production (A), NO production (B), cytokines TNF- $\alpha$  (C) and IL-6 (D) production in RAW 264.7 macrophage cell by the *Oenanthe javanica* fermented from *Lactocaseibacillus rhamnosus* L28. All values are mean $\pm$ SD (n=3). The different superscript letters (a-e 100 ppm, a'-e' 200 ppm) on the bar indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

억제율을 보여 항염증을 갖는 후보 기능성 소재로서 향후 관련 분야에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 4. 요약

본 연구는 6개월 미만의 4명의 영아 분변에서 생육이 용이한 우점균을 분리하였고, 이들 중 *Lactobacillus*속의 유용한 균주를 발굴, 이를 이용하여 발효시켜 제조한 미나리 배양물에 대한 기능적 특성을 살펴보았다. 8주의 분리균주들 중 항생제 내성, 용혈성 등의 안전성을 확인한 후, *L. rhamnosus* L28과 *L. reuteri* 11-2 등 2주를 항염증 효능 평가를 위해 선발하였다.

선발한 시험균주 단독과 이들로 미나리를 발효시켜 제조한 미나리발효물 등의 시료들을 각각 처리하여 병원성 세균 4종에 대한 생육 억제능을 살펴본 결과, *L. rhamnosus* L28 균주 단독 처리만으로도 양성대조구인 *L. rhamnosus* LGG균에 비해 *B. cereus*와 *Sta. aureus* 등에 대한 높은 항균활성을 나타내었고, 이 균주를 이용하여 발효시킨 미나리배양물(Oj+L28) 역시도 동일한 병원균들에 대해 25.03 $\pm$ 0.00-36.14 $\pm$ 0.00 mm의 범위로

억제환을 나타내어 높은 유해균 생육 억제능을 보였다. 또한, LPS로 자극시켜 대식세포 RAW cell에서 분비된 NF- $\kappa\text{B}$ /AP-1 전사인자, 활성산소(NO) 및 염증성 매개물질(TNF- $\alpha$ 와 IL-6)의 활성 또는 생성량 억제 정도를 살펴본 결과, 양성대조구(LGG) 대비 시험균주 *L. rhamnosus* L28 단독 처리와 이 균으로 제조한 미나리 발효물(Oj+L28) 처리구는 항염증 효능을 나타내는 모든 지표에서 통계적 유의수준( $p < 0.05$ )으로 높은 억제 활성을 나타내었다. 특히, 사이토카인 IL-6 항목에서 *L. rhamnosus* L28 단독 처리의 억제율이 처리량별로 83, 96 및 99%로 *L. reuteri* 11-2균주보다 높은 억제 효과를 보였으며, Oj+L28 발효물 역시도 59-72%로 Oj 원액 및 Oj+LGG 배양물보다 낮은 생성량을 보였다. 또한 염증성 매개물질인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 생성량 역시도 *L. rhamnosus* L28 단독 처리 시 통계적 유의수준( $p < 0.05$ )으로 가장 낮은 값을 보여, LPS와 같은 항원 제시에 의해 자극된 면역세포의 기능조절에 도움을 줄 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구에서 처음으로 발굴한 *L. rhamnosus* L28 균주와 이 균주로 발효시켜 제조한 미나리발효물의 높은 항염증 효과를 확인하여, 향후 동물시험 수준의 효능검증 및 기전 구명 등 심

화연구를 통해 건강기능성 소재로서의 활용성을 높이고자 한다.

### Funding

This research was conducted with support from the Agricultural Science and Technology Research and Development Project of the National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration (Project Number: PJPJ01599303).

### Acknowledgements

None.

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

### Author contributions

Conceptualization: Kwak S. Data curation: Kwak S, Kim SY. Formal analysis: Kwak S, Gwon HM, Kim SY. Methodology: Gwon HM, Yeo SH, Kim SY. Validation: Kwak S, Kim SY. Writing - original draft: Kwak S, Kim SY. Writing - review & editing: Kwak S, Kim SY.

### Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

### ORCID

Seoyeon Kwak (First author)

<https://orcid.org/0009-0001-3160-8882>

Hee-Min Gwon

<https://orcid.org/0000-0002-8808-5875>

Soo-Hwan Yeo

<https://orcid.org/0000-0001-7722-7447>

So-Young Kim (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-9729-6869>

### References

Ahn H, Lee GS. Isorhamnetin and hyperoside derived from water dropwort inhibits inflammasome activation. *Phytomedicine*, 24, 77-86 (2017)

Ai G, Huang ZM, Liu QC, Han YQ, Chen X. The protective effect of total phenolics from *Oenanthe javanica* on acute liver failure induced by D-galactosamine. *J Ethnopharmacol*, 186, 53-60 (2016)

Ann YG. Probiotic lactic acid bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 24, 817-832 (2011)

Chae SW. Function and activation of NF- $\kappa$ B in immune system. *Korean J Otolaryngol*, 48, 284-288 (2005)

Dawood MA, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, El Basuini MF. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol*, 49, 275-285 (2016)

Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin a production in healthy children. *Int J Food Microbiol*, 30, 39-44 (1998)

Gil NY, Choi BY, Park SY, Cho YS, Kim SY. Physicochemical properties of *Doenjang* using grain type *Meju* fermented by *Aspergillus oryzae* and protease. *Korean J Food Preserv*, 24, 697-706 (2018)

Gil NY, Choi BY, Yeo SH, Kim SY. Anti-inflammatory effect of fermented *Doenjang* containing a halophytes *Suaeda asparagoides* (Miq.) powder on RAW 264.7 cells. *Korean J Food Nutr*, 32, 651-661 (2019)

Han YQ, Huang ZM, Yang XB, Liu HZ, Wu GX. *In vivo* and *in vitro* anti-hepatitis B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica*. *J. Ethnopharmacol* 118, 148-153 (2008)

Kang HY, Kim DH, Lee SW, Kim HC, Cho YV, Gal SW. Biological probiotic properties of *Lactobacillus rhamonosus* GG-4 isolated from infant feces. *J Life Sci*, 20, 1882-1888 (2010)

Kim EJ, Song BN, Jeong DS, Kim SY, Cho YS, Park SY. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of fermented turmeric (*Curcuma longa* L.) by *Rhizopus oryzae*. *J Life Sci* 27, 1315-1323 (2017)

Kim JY, Kim KH, Lee YJ, Lee SH, Park JC, Nam DH. *Oenanthe javanica* extract accelerates ethanol metabolism in ethanol-treated animals. *BMB Rep*, 42, 482-485. (2009)

Kim YJ, Ko SY, Yeon YE, Lim J, Han BK, Kim H, Ahn JK, Kim D. Draft genome sequence of lytic bacteriophage CF1 infecting *Citrobacter freundii* isolates. *Korean J Microbiology*, 54, 79-80 (2018)

Lee HY, Yoo MJ, Chung HJ. Antibacterial activities in watercress *Oenanthe javanica* D.C. Cultivated with different culture methods. *Kor J Food Culture*, 16, 243-249 (2001)

Lee MS, Shin KS. Macrophage activation by polysaccharides from Korean's commercial and traditional soy sauces. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 797-805 (2013)

Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Servin A, Devuy st L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar. *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other

- inhibitory compounds. *Res Microbiol*, 157, 241-247 (2006)
- Park SJ, Lee KS, An HL. Effects of dropwort powder on the quality of castella. *J East Asian Soc, Dietary Life*, 17, 834-839 (2007)
- Seo YS, Shin KS. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 95-102 (2012)
- Vrese M, Stegelmann A, Ritcher B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics: Compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*, 73, S421-S429 (2001)
- Zhou Q, Feng F, Yang Y, Zhao F, Du R, Zhou Z. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. *Int J Biol Macromol*, 107, 2234-2241 (2018)