pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 5, pp. 383~388 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.5.383

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Salmonella Gallinarum 감염닭의 대식세포에서 표고버섯 균사체 발효 미강생물전환소재에 의한 면역조절효과

이형태 · 이상종[1] · 윤장원*
강원대학교 수의과대학 동물의학종합연구소, [1](주)에스티알바이오텍

Immunomodulation by Bioprocessed Polysaccharides from *Lentinus edodes* Mycelia Cultures with Rice Bran in the *Salmonella* Gallinarum-infected Chicken Macrophages

Hyung Tae Lee, Sang Jong Lee[1], and Jang Won Yoon*
College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon, Korea
[1]STR Biotech, Ltd., Chuncheon, Gangwon, Korea
(Received September 10, 2018/Revised September 15, 2018/Accepted September 17, 2018)

ABSTRACT - In this study, we investigated the effect of bioprocessed polysaccharides (BPPs) from liquid culture of *Lentinus edodes* fungal mycelia containing rice bran (BPP-RB) on a chicken-derived macrophage cell line, HD-11, when infected with *Salmonella* Gallinarum, an etiological agent of fowl typhoid. Experimental results demonstrated water extract of BPP-RB did not show growth inhibitory effects on *S.* Gallinarum 277. Protein expression profiles were also not altered by its treatment. Nonetheless, it could (i) enhance phagocytic activity of HD-11 cells, (ii) activate transcriptional expression of Th1-type cytokines such as tumor necrosis factor-α and interleukin (IL)-1β, iNOS, as well as an immunosuppressive cytokine IL-10, and (iii) negatively regulate Th2-type cytokines such as IL-4 and IL-6. Together results suggest that BPP-RB may be applicable for preventing fowl typhoid or other *Salmonella* infections in poultry farms as a potential feed additive.

Key words : Rice bran, *Salmonella* Gallinarum, Chicken macrophage, Immunomodulation

다양한 혈청형을 보유한 *Salmonella*는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)에 속하는 인수공통감염균으로서, 오염된 음식이나 물의 섭취, 또는 분변을 통한 직접 감염 등에 의해 사람과 동물 사이에 쉽게 전파 될 수 있기 때문에 공중보건학적으로 그 위험성이 강조되고 있다. *Salmonella* 감염을 예방하기 위한 지속적인 노력에도 불구하고, 한국, 북미, 그리고 유럽을 포함한 전세계 대부분의 국가에서 사람 및 가축에 대한 감염이 지속적으로 보고 되고 있으며[1-4], 특히 가축농장의 경우, *Salmonella* 감염의 예방 및 치료를 위한 사회 · 경제적 손실도 막대한 실정이다[5].

*Salmonella*의 혈청형은 2,500여종 이상 존재하는 것으로 알려져 있고[6], 혈청형 의존적인 숙주 감염 양상을 보이는 것이 특징이다[7]. 그 중, *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S.* Gallinarum)은 가금티푸스(fowl typhoid)를 유발하여 양계 산업에 막대한 피해를 유발하는 대표적인 병원균이다[8]. *S.* Gallinarum의 감염을 억제하기 위하여, 백신 접종 및 항생제가 사용되고 있으나[9,10], 생백신(live vaccine)의 경우 백신 균주의 병원성 회복은 물론, 항생제 내성균 출현 등의 문제가 대두되고 있다[11-13]. 따라서, 더 효과적인 *S.* Gallinarum 항감염 전략 개발을 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 prebiotics, probiotics, conbiotics 등을 포함하는 기능성 사료첨가제에 대한 관심이 증가되는 추세이다[14-16].

미강(rice bran)은 쌀을 주식으로 하는 나라에서 쉽게 구할 수 있는 물질로서, 쌀을 도정하고 남는 부산물이다. 미강은 다양한 생리활성 성분(i.e., polyphenols, fatty acids, peptides 등)들을 함유하고 있으며, 항산화 · 항염증 · 항암

*Correspondence to: Jang Won Yoon, College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-8791, Fax: 82-33-259-5625
E-mail: jwy706@kangwon.ac.kr.

효과 등을 발휘할 뿐만 아니라, 단순 섭취만으로도 *Salmonella* 감염을 방어하는데 효과적인 것으로 보고된 바 있다[17-19]. 선행연구를 통하여, 본 연구팀에 의해 개발된 생물전환공법(bioconversion process)으로 생산된 천연물(강황) 유래 생물전환소재가 선천면역반응 조절을 통해 *Salmonella* 감염을 억제할 수 있음을 확인하였다[16,20,21]. 따라서, 본 연구에서는 표고버섯 균사체 발효 생물전환공법으로 생산된 미강 생물전환소재(BPP-RB)가 *S.* Gallinarum에 감염된 닭 유래 대식 세포주로 알려진 HD-11에 미치는 면역조절 효과를 조사하고자 하였다.

Materials and Methods

Salmonella 균주 및 닭 대식세포주의 배양

S. Gallinarum 277은 국내 가금에서 분리된 가금티푸스 유발 병원성 *Salmonella*균주로서, 바이오포아(Yongin, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 사용된 균주는 Luria-Bertani (LB; BD Difco, Sparks, MD, USA) 배지에서 37°C, 230 rpm으로 진탕 배양하였다(Vision Scientific, Daejeon, Korea).

HD-11(가금 유래 대식세포주)[22]의 배양은 fetal bovine serum (8%; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)과 penicillin-streptomycin (1%; Gibco-BRL)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco-BRL)배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 수행하였다.

미강생물전환소재의 수용액추출물 준비

미강생물전환소재(STR Biotech, Chuncheon, Korea)는 기 보고된 방법에 의해 생산하였다[16]. 생산된 소재가 *S.* Gallinarum 277 및 HD-11에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 미강생물전환소재를 LB 또는 RPMI 1640 배지에 1% (w/v)가 되도록 혼합한 뒤, 37°C, 230 rpm에서 1시간 동안 진탕 배양 및 추출하였다. 배양수용액 추출물은 12,000 × g, 10분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 0.22 μm syringe filter (Sartorius, Bohemia, NY, USA)를 이용하여 여과 및 분주, 냉장(4°C) 보관하였다.

S. Gallinarum의 성장 및 단백질 발현 양상 분석

시험균은 LB 배지에서 37°C, 19시간 진탕 예비 배양되었다. 배양균은 두 가지 농도(1%와 10%, v/v)의 미강생물전환소재 추출물이 함유된 LB 배지에 동량 접종 후 (OD_{600} = 0.02), 동일한 조건으로 본 배양하였다. 균의 성장은 흡광도(OD_{600})와 direct plating에 의한 계수법(CFU; colony forming units)으로 측정되었다.

세균 단백질(총 단백질, 분비 단백질)의 발현 양상 분석을 위하여, 시험균을 위와 동일한 방법으로 예비 배양 후 본 배양(OD_{600} = 1)하였다. 배양균을 원심 분리(13,500 rpm, 5분; LaboGene, Lynge, Denmark)하였고, 획득된 pellet은 총 단백질 분석을 위해 사용되었다. 상층액은 Vivaspin-500 (Sartorius)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 농축한 뒤, 분비 단백질 분석을 위해 사용되었다. 총 단백질 및 분비 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 분리한 후, coomassie brilliant blue 염색(총 단백질) 혹은 silver 염색(분비 단백질)법으로 검출되었다[23].

탐식능력(phagocytosis) 평가

미강생물전환소재에 의한 HD-11의 탐식능 평가는 기존 문헌을 참고하여 수행하였다[16]. HD-11을 1×10^5 cells/well 농도로 24 well plate (SPL Life Science, Pochen, Korea)에 seeding하여 24시간 정치 배양하였다. 배양세포는 10% (v/v) 미강생물전환소재추출액이 포함된 신선 배지로 교환하였고, 16시간 추가 배양하였다. 최종 배양세포는 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척 후 무항생제 배지로 교환하였고, *S.* Gallinarum 277을 1×10^6 CFU/well (MOI = 10) 농도로 1시간 혹은 3시간 감염시켰다. 대식세포 외부에 존재하는 균을 제거하기 위하여, 감염된 HD-11세포를 gentamicin (20 μg/ml)이 포함된 배지로 1시간 처리하였다. 처리한 세포를 PBS로 2차 세척 후, 세포용해액(1% Triton X-100/0.9% NaCl)을 이용하여 감염세포 내 존재하는 병원균을 direct plating법으로 계수하였다.

Cytokine 발현 양상 분석

Cytokine 발현 양상 분석을 위하여, 감염세포는 6 well plate (SPL Life Science)를 이용하여 위에서와 동일한 방법으로 준비하였다. 2차 PBS세척 후, total RNAs는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출 및 정제하였다. PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa BIO, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성산물은 2 × SYBR Premix (Roche, Basel, Switzerland)와 LightCycler® 96 System (Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)방법으로 정량 분석하였다. 본 연구에서 사용한 primers염기서열은 기존 문헌을 참고하였다[16].

통계분석

실험 결과에 대한 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 Mann-Whitney test로 분석하였다. 본 연구에서는 결과값이 $p < 0.05$인 것들에 대하여 유의성이 있다고 판정하였다.

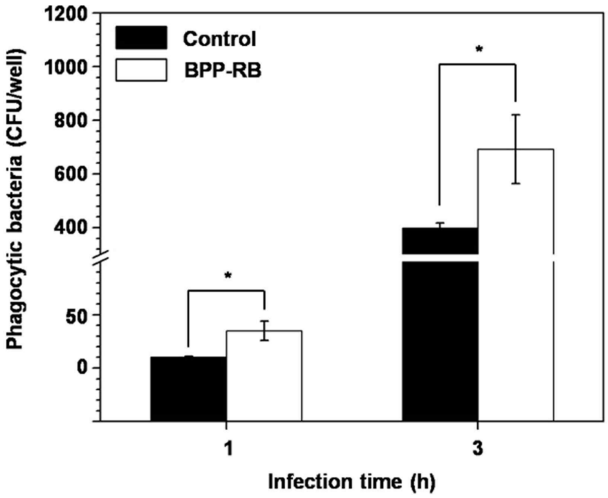

Fig. 1. BPP-RB induces the phagocytic activity in chicken macrophage HD-11 cells. Chicken macrophage HD-11 cells were pre-cultured with 10% (v/v) BPP-RB for 16 h. Cells were infected with *S.* Gallinarum 277 (MOI = 10) for 1 or 3 h, and their phagocytic activity was measured by the number of bacterial cells. All data are shown as the means ± standard deviations from at least three independent experiments (*, $p < 0.05$).

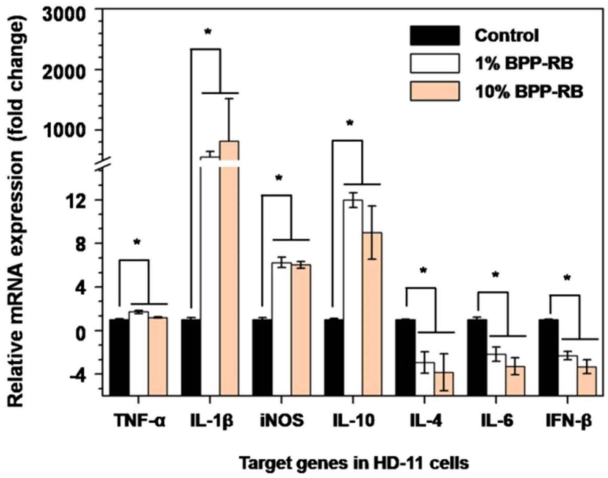

Fig. 2. BPP-RB regulates the expression of inflammation-related cytokines in chicken macrophage HD-11 cells. Chicken macrophage HD-11 cells were pre-cultured with BPP-RB (1%, 10%, v/v) for 16 h. The transcription expression of the pro- and anti-inflammatory cytokine genes was analyzed using the qRT-PCR (see Material and Methods). The relative expression levels of the cytokines are shown as the means ± standard deviations from at least three independent experiments (*, $p < 0.05$).

Results and Discussion

미강생물전환소재에 의한 *S.* Gallinarum 277의 성장 및 단백질 발현에 미치는 효과

미강생물전환소재가 *S.* Gallinarum 277의 성장에 미치는 효과를 조사한 결과, 두 가지 농도(1%, 10%, v/v) 모두에서 어떠한 성장억제 효과도 확인하지 못하였다(data not shown). 동일하게, 총 단백질 및 분비 단백질 발현에서도 유의미한 변화를 나타내지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 본 연구의 미강생물전환소재가 감염균에 직접적인 항균 및 대사 억제 효과를 발휘하지 못함을 암시한다.

미강생물전환소재에 의한 HD-11세포의 탐식 능력 활성화

미강의 섭취가 생체 내 *Salmonella*감염 확립을 효과적으로 방어할 수 있다는 기존 문헌 보고를 토대로[19,24], 표고버섯 발효미강생물전환소재가 대식세포에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 본 연구의 미강생물전환소재가 HD-11 대식세포의 탐식 능력을 활성화하는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 실제로 *S.* Gallinarum 277 감염 1시간 후, 무처치 대조군(Control)에 비해 처치군(BPP-RB)에서 약 3.5배 많은 감염균이 대식세포 내에 생존하는 것으로 나타났다(Fig. 1; Control = 10.3 ± 0.6, 10% BPP-RB = 35.0 ± 8.9). 유사하게 감염 3시간 후, 처치군(BPP-RB)에서 약 1.7배 많은 감염균이 관찰되었다(Fig. 1; Control = 398.0 ± 19.3, 10% BPP-RB = 691.7 ± 128.2).이러한 결과는 미강생물전환소재가 적어도 닭 대식세포에서 탐식능 활성화에 직・간접적으로 기여한다는 것을 암시한다.

기존 문헌보고에 의하면, 미강 유래 생리활성 물질인 MGN-3 (modified arabinoxylan rice bran)가 대식세포의 탐식 능력을 활성화 한다고 하였다[25]. 본 연구에서는, 관찰된 미강생물전환소재에 의한 대식세포 활성화 관련 인자가 무엇인지 규명하지 않았지만, MGN-3을 포함한 다양한 미강 유래 생리활성 인자들이 대식세포의 탐식능 활성화에 기여할 것으로 추정한다.

미강생물전환소재에 의한 cytokine의 발현 변화

대식세포의 탐식 능력이 미강생물전환소재에 의해 증가된다는 실험 결과(Fig. 1)를 토대로, HD-11에서 미강생물전환소재에 의한 cytokines의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, 두 가지 농도(1%, 10%, v/v) 모두에서 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin(IL)-1β, iNOS (inducible nitric oxide synthase), IL-10의 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다($p < 0.05$; Fig. 2). 이와 반대로, IL-4, IL-6, interferon (IFN)-β의 발현은 감소하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 본 연구의 미강생물전환소재가 HD-11 세포에 작용하여 다양한 cytokines의 발현 변화를 유도 할 수 있다는 것을 암시한다.

기존 문헌 보고에 의하면, 이들 cytokines 중, TNF-α와 IL-1β의 경우 Th1-type cytokines으로 분류되어, 대식세포의 M1 polarization을 유도함으로써 면역반응 활성화에 기여한다고 하였다[26]. 또한 iNOS효소에 의해 생산되는 nitric oxide (NO)는 세균, 바이러스, 기생충 등과 같은 병원성 미생물의 감염을 방어하기 위하여 대식세포에 의해 생산

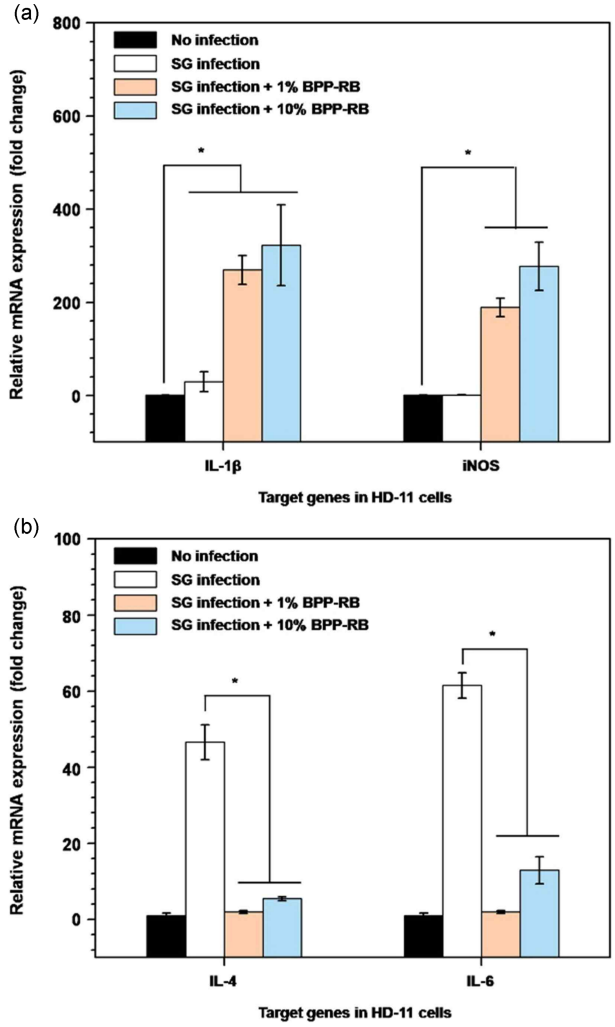

Fig. 3. Pre-treatment of BPP-RB induces Th1-type cytokine, but represses Th2-type cytokine expression in the *Salmonella*-infected chicken macrophageHD-11 cells. Chicken macrophage HD-11 cells were pre-cultured with BPP-RB (1%, 10%, v/v) for 16 h. Cells were infected with *S.* Gallinarum 277 (MOI = 10) for 1 h. The transcription expression of the indicated cytokine genes was analyzed using the qRT-PCR. (A) Th1-type cytokines (IL-1β, and iNOS). (B) Th2-type cytokines (IL-4 and IL-6). The relative expression levels of the cytokine are shown as the means ± standard deviations from at least three independent experiments (*, $p < 0.05$).

되는 선천 면역 물질로서, 면역세포의 증식이나 활성화를 촉진할 뿐만 아니라, 병원체를 직접 제거하는 기능을 가진다고 알려져 있다[27]. 반면, IL-4, IL-6의 경우 대식세포의 M2 polarization에 관여하는 Th2-type cytokines으로 분류되어, 항염증 활성을 발휘하는 것으로 알려져 있다[30]. 흥미롭게도, IL-6의 경우 친염증(pro-inflammatory) 및 항염증(anti-inflammatory) 활성 모두에 관여하는 반면[28,29], IL-10은 항염증 활성을 가지는 immunosuppressive cytokine으로 보고된 바 있다[30]. 본 연구에서 관찰된 다양한 cytokines의 발현 변화가 *Salmonella* 감염 개체(숙주)에 미치는 생물학적 중요성은 추후 연구를 통하여 규명할 필요가 있다고 판단된다.

*Salmonella*감염 HD-11세포에서 미강생물전환소재에 의한 cytokines의 발현 변화

흥미롭게도, intracellular pathogen으로 알려진 *Salmonella*는 SPI2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2)에 암호화되어 있는 병원성 인자들을 통하여 대식세포에 의한 탐식 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다[31]. 하지만, 숙주 대식세포는 NO 생성을 통하여 이들 병원성 인자의 발현을 억제할 수 있다고 하였다[32]. 따라서 미강생물전환소재가 HD-11 세포의 다양한 cytokines 발현을 조절한다는 사실로부터(Fig. 2), 이들 소재가 *S.* Gallinarum 277 감염 후 HD-11세포의 cytokines 발현 또한 조절할 수 있는지 여부를 조사하였다. 본실험에서는, 앞선 대식세포의 면역반응 활성화분석 결과(Fig. 2), 유의미한 결과를 보여주었던 IL-1β, iNOS, IL-4, IL-6에 대하여 그 발현 변화를 조사하였다. 그 결과, 두 가지 농도(1%, 10%, v/v) 모두에서, 무처치 대조군(No infection) 및 병원균 단독 감염군(SG infection)에 비하여 미강생물전환소재 처치 감염군(SG infection + BPP-RB)에서 IL-1β, iNOS의 발현이 유의성 있게 증가됨을 관찰하였다(Fig. 3A; $p < 0.05$). 이와 반대로, IL-4, IL-6의 발현은 현저히 억제되었다(Fig. 3B; $p < 0.05$). 이러한 결과는 미강생물전환소재의 전 처리가 *Salmonella* 감염 후 대식세포에서 일어나는 cytokines 발현 양상을 확연히 조절할 수 있음을 암시한다.

본 연구 결과와 유사하게, MGN-3가 대식세포의 TNF-α 및 NO의 생성을 유도할 수 있음이 증명되었고[25], 미강유(rice bran oil)가 함유된 사료를 섭취한 마우스 실험군에서 대조군에 비해 Th1-type cytokines (IL-2, TNF-α, 그리고 IFN-γ)의 발현 증가 역시 보고된 바 있다[33]. 따라서 이들 결과를 종합하면, 본 연구에서 사용된 미강생물전환소재가 적어도 *Salmonella* 감염 전후 닭 대식세포의 면역활성을 조절할 수 있음을 보여준다. 향후, 추가 연구를 통하여 이러한 면역활성 조절이 가금 *Salmonella* 감염을 억제 혹은 예방할 수 있는지 확인할 필요가 있을 것이다.

Acknowledgement

This study was supported by the Bio-Industry Technology Development Program (314019-3), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

국문요약

본 연구에서는, 표고버섯 균사체 발효 생물전환공법으로

생산된 미강생물전환소재(BPP-RB)가 가금티푸스의 주요 원인균인 *S.* Gallinarum에 감염된 닭 유래 대식세포주 HD-11에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과, 미강생물전환소재 추출액은 *S.* Gallinarum 277에 대한 직접적인 성장억제 효과를 보여주지 않았으며, 총단백질 및 분비단밸질 발현 양상에 어떠한 변화도 유도하지 못하였다. 하지만, 미강생물전환소재 추출액은 (i) HD-11 대식세포의 탐식 능력(phagocytic activity)을 활성화하였고, (ii) Th1-type cytokines (tumor necrosis factor-α, interleukin (IL)-1β, iNOS)과 immunosuppressive cytokine IL-10의 발현 증가를 유도하였으며, (iii) Th2-type cytokines (IL-4, IL-6)의 발현은 감소시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 종합하면, 미강생물전환소재는 가금 농장에서 가금티푸스 및 다른 *Salmonella*종의 감염을 예방하기 위한 사료첨가제로서의 가능성을 가지고 있다고 사료된다.

References

1. Lee J. K., Kwak N. S., Kim H. J.: Systemic analysis of foodborne disease outbreak in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.*, **13**, 101-107 (2016).
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National enteric disease surveillance: *Salmonella*annual report, 2013; 2013. p. 4-89.
3. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, **14**, 4634 (2016).
4. World Animal Health (OIE). Outbreaks of fowl typhoid in worldwide. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseasein formation/Diseasetimelines.
5. Eliana N., Tessari C., Kanashiro A. M. I., Stoppa G. F. Z., Luciano R. L., Castro A. G. M. D., Cardoso A. L. S. P.: Important aspects of *Salmonella* in the poultry industry and in public Health, *Salmonella* - A dangerous foodborne pathogen, In Tech, DOI: 10.5772/30812(2012).
6. Grimont P., Weill F.: Antigenic formulae of the *Salmonella*-serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, WHO, Geneva, Switzerland (2007).
7. Uzzau S., Brown D. J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesus J., Platt D. J., Olsen J. E.: Host adapted serotypes of *Salmonellaenterica*. *Epidemiol. Infect.*, **125**, 229-255 (2000).
8. Shivaprasad H. L.: Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech.*, **19**, 405-424 (2000).
9. Smith I. M.: Protection against experimental fowl typhoid by vaccination with strain 9R reconstituted from the freeze-dried state. *J. Comp. Pathol.*, **79**, 197-205 (1969).
10. Lee Y. J., Mo I. P., Kang M. S.: Safety and efficacy of *Salmonella*Gallinarum 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.*, **34**, 362-366 (2005).
11. Wigley P., Hulme S., Powers C., Beal R., Smith A., Barrow P.: Oral infection with the *Salmonella enterica*serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. *BMC Vet. Res.*, **1**, 2 (2005).
12. Parvej M. S., Nazir K. H., Rahman M. B., Jahan M., Khan M. F., Rahman M.: Prevalence and characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica*serovar Gallinarum biovarPullorum and Gallinarum from chicken. *Vet. World*, **9**, 65-70 (2016).
13. Lee Y. J., Kim K. S., Kim J. H., Tak R. B.: *Salmonella*Gallinarum *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Avian Pathol.*, **33**, 251-257 (2004).
14. Park S., Kim C. Y., Park B., Kim K., Park K., Han J. K., Hahn T.: Application of *Ecklonia cava Kjellman* by-product as a feed additive: enhancing weight gain, immunity and protection from *Salmonella* infection in chickens. *Korean J. Vet. Res.*, **56**, 255-260 (2016).
15. Kim J., Kim H., Kim B., Kim G.: Physiochemical treatment of feed and utilization of feed additives to control *Salmonella* in poultry. *Korean J. Poult. Sci.*, **45**, 1-15 (2018).
16. Han D., Lee H. T., Lee J. B., Kim Y., Lee S. J., Yoon J. W.: A bioprocessed polysaccharide from *Lentinus edodes* mycelia cultures with turmeric protects chicks from a lethal challenge of *Salmonella* Gallinarum. *J. Food Prot.*, **80**, 245-250 (2017).
17. Huang Y. P., Lai H. M.: Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran. *J. Food Drug Anal.*, **24**, 564-574 (2016).
18. Somintara S., Leardkamolkarn V., Suttiarporn P., Mahatheeranont S.: Anti-tumor and immune enhancing activities of rice bran gramisterol on acute myelogenousleukemia. *PLoS One*, **11**, e0146869 (2016).
19. Kumar A., Henderson A., Forster G. M., Goodyear A. W., Weir T. L., Leach J. E., Dow S. W., Ryan E. P.: Dietary rice bran promotes resistance to *Salmonella enterica*serovarTyphimurium colonization in mice. *BMC Microbiol.*, **12**, 71 (2012).
20. Kim S. P., Park S. O., Lee S. J., Nam S. H., Friedman M.: A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 2384-2391 (2014).
21. Kim S. K., Lee J. B., Han D., Lee H. T., Wi S. M., Yoon J. W.: Bioprocessed polysaccharide from *Lentinus edodes*-mycelia cultures with tumeric represses the proinflammatory cytokine expression of the porcine macrophage infected by *Salmonella*Choleraesuis. *J. Prev. Vet. Med.*, **41**, 150-155 (2017).
22. Yeo J. M., LEE H. J., Kim J. W., Lee J. B., Park S. Y., Choi I. S., Song C. S.: *Lactobacillus fermentum* CJL-112 protects mice against influenza virus infection by activating T-helper 1 and eliciting a protective immune response. *IntImmunopharmacol.*, **18**, 50-54 (2014).
23. Sambrook J., Russel D. W.: Molecular cloning: A laboratory

manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor, NY, USA (2001).
24. Goodyear A., Kumar A., Ehrhart E. J., Swanson K. S., Grusak M. A., Leach J. E., Dow S. W., McClung A., Ryan E. P.: Dietary rice bran supplementation prevents *Salmonella* colonization differentially across varieties and by priming intestinal immunity. *J. Funct. Foods*, **18**, 653-664 (2015).
25. Ghoneum M., Matsuura M.: Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran). *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **17**, 283-292 (2004).
26. Benoit M., Desnues B., Mege J. L.: Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.*, **181**, 3733-3739 (2008).
27. Schairer D. O., Chouake J. S., Nosanchuk J. D., Friedman A. J.: The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*, **3**, 271-279 (2012).
28. Mauer J., Chaurasia B., Goldau J., Vogt M. C., Ruud J., Nguyen K. D., Theurich S., Hausen A. C., Schmitz J., Bronneke H. S., Estevez E., Allen T. L., Mesaros A., Partridge L., Febbraio M. A., Chawla A., Wunderlich F. T., Bruning J. C.: Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat. Immunol.*, **15**, 423-430 (2014).
29. Casella G., Garzetti L., Gatta A. T., Finardi A., Maiorino C., Ruffini F., Martino G., Muzio L., Furlan, R.: IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation*in vitro* and *in vivo*. *J. Neuroinflammation*, **13**, 139 (2016).
30. Mittal S. K., Cho K. J., Ishido S., Roche P. A.: Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, **290**, 27158-27167 (2015).
31. Hensel M.: *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.*, **36**, 1015-1023 (2000).
32. McCollister B. D., Bourret T. J., Gill R., Jones-Carson J., Vazquez-Torres A.: Repression of SPI2 transcription by nitric oxide-producing, IFNγ-activated macrophages promotes maturation of *Salmonella* phagosomes. *J. Exp. Med.*, **202**, 625-635 (2005).
33. Sierra S., Lara-Villoslada F., Olivares M., Jimenez J., Boza J., Xaus J.: Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *Eur. J. Nutr.*, **44**, 509-516 (2005).