

Kefir Grain의 Polysaccharide에 의한 HRV S-2의 MA-104 세포 감염억제

이종익¹ · 송광영* · 천정환 · 현지연 · 서건호

건국대학교 수의과대학 공중보건학전공, ¹건국대학교 동물생명과학대학 축산식품생물공학전공

Inhibitory Effect of Polysaccharide from Kefir Grain on the Infection of MA-104 Cell by Human Rotavirus

Jong-Ik Lee¹, Kwang-Young Song*, Jung-Whan Chon, Ji-Yeon Hyeon, and Kun-Ho Seo

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, College of Bioscience & Technology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The inhibitory effect of a polysaccharide from kefir on human rotavirus infection in MA-104 cells was investigated. The extracted polysaccharide was separated as fraction I in unbound materials and as fractions II, III, and IV in bound materials. Adding polysaccharide fractions II (4.8 mg/mL), III (5.3 mg/mL), and IV (1.4 mg/mL) inhibited the infection of MA-104 cells by human rotavirus. The 50% inhibitory concentrations (IC 50) were 0.075, 0.083, and 0.022 mg/mL, respectively. Based on these results, the kefir polysaccharide has anti-rotavirus activity. In conclusion, a polysaccharide from kefir had more than a 97% inhibition effect against human rotavirus infection in MA-104 cells.

Key words: kefir, polysaccharide, human rotavirus

서 론

발효유의 일종으로 유산균 이외에 효모의 알코올 발효로 유산이나 알코올을 비롯한 기타 독특한 취향을 가지고 있는 제품이 kefir이다(Ferreira *et al.*, 2010; Ismail *et al.*, 1983; Kemp, 1984). Kefir의 알코올 발효에 관여하는 효모는 대장균에 대하여 항균작용을 한다. 또한 kefir grain으로부터 분리된 polysaccharide는 kefir이라고 불리며(La Riviere *et al.*, 1967; Toba *et al.*, 1991), 쥐의 악성종양실험에서 종양의 억제와 면역성을 나타내었다(Murofushi *et al.*, 1983; Murofushi *et al.*, 1986; Quiros *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 1982). Kefir는 kefir grain을 접종 발효하기 때문에 유산균에 의한 발효유보다도 kefir grain중의 효모와 초산균에 의해 vitamin B군을 다량 생산하며 우유 성분 이외에 소화촉진 작용과 항암작용도 있다고 보고되었다(Kandler and Kunath, 1983; Shiomi *et al.*, 1982; Yokoi

et al., 1990). Caucasus 지방의 점질발효유로 알려진 kefir culture로부터 EPS를 생산하는 점질성 유산균주를 분리 선발하고(Lim and Lee, 2009), 선발된 유산균의 내산성, 내담즙성, 콜레스테롤 흡수활성 및 항균활성 등 각종 특성을 알아보고, 점질성 유산균이 생성하는 crude EPS를 분리하여 유아 바이러스성 설사병의 주요원인인 human rotavirus(HRV)의 작용에 억제효과를 나타내는지 확인함으로써, kefir에서 분리한 점질성 유산균을 기능성 발효유로 활용할 수 있다고 하였다(Kim, 2003). Rotavirus 감염 환자의 전형적인 임상증상은 구토, 미열, 그리고 2-8일 지속되는 물설사를 일으키며(Rodriguez *et al.*, 1977), 단백질-칼로리 부족이나 영양부족과 합병되면 RV성 위장염은 더 심하고 장기적인 임상질병이 될 수 있다(Riepenhoff-Talty 등, 1985). 따라서, 본 연구의 목적은 kefir polysaccharide가 human rotavirus의 MA-104세포 감염억제에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 Kefir grain

Kefir grain은 일본 공립 여자대학(Kyoritse Women's

*Corresponding author: Kwang-Young Song, Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-4121, Fax: 82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

Univ. Japan) 중핵연구실에서 분양 받아 23°C(Incubator, Sanyo, MIR-253, Japan)에서 48시간 계대배양하여, 활력이 좋은 kefir grain을 냉장 보관하면서 실험에 이용하였다.

Polysaccharide의 분리

Dasilva와 Goncalves(1990)방법에 따라 kefir grain 60 g을 증류수로 수세한 후, 두배의 증류수를 넣어 80°C에서 1시간 동안 가열 냉각한 다음 grain을 12,000 g에서 20분간 원심분리 하였으며, 상층액을 제거 후 2회 반복 실험하였다. 상층액에 동량의 ethanol을 첨가한 다음, 12,000 g에서 20분간 원심 분리하였다. 다시 정제한 침전물을 12-15시간 투석한 후, 15,000 g에서 10분간 원심분리 한 polysaccharide를 동결 건조하여 사용하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Kefir grain시료의 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 수정하여 다음과 같이 실행하였다. Mini-protein장치(Bio-Rad, USA)에 separating gel(acrylamide-bis 4.16 mL, 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8) 3.125 mL, SDS 10% 0.125 mL, ammonium persulfate(1%) 0.425 mL, TEMED 5 µL, distilled H₂O 4.65 mL)을 만든 후에 stacking gel(ammonium persulfate(1%) 0.5 mL, 1.25 M Tris-HCl(pH 6.8) 0.5 mL, SDS 10% 0.05 mL, TEMED 5 µL, distilled H₂O 2.5 mL)를 만들었다. 시료 0.1 g을 취하여 가용화용액 1 mL를 섞은 후에 100°C에서 2분간 가열후 냉각시킨 다음 150 mA로 1시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 coomassie brilliant염색액에 약 10분간 염색시킨 다음 10% acetic acid와 20% methanol로 된 탈색액으로 단백질을 선명하게 보일 때까지 탈색하였고 UVP Imagestore 7500(Vilber Lourmat, France)로 촬영하였다.

DEAE-sepharose에 의한 ion-exchange chromatography

Crude polysaccharide를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.7)로 미리 평형화한 DEAE-sepharose 이온교환칼럼(1.5×20 cm)에 주입한 후, 미결합 분획이 전부 용출되어 용출곡선이 base line에 되돌아 온 다음 0-1.0 M NaCl의 linear gradient를 실시하여 분리하였다. 당의 농도는 carbazole assay법으로 530 nm에서 측정하였으며, 단백질농도는 254 nm에서의 흡광도를 monitor하여 측정하였다. 또, 다당체의 구성성분을 조사하기 위하여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에 의한 분석을 실시하였다. 동결 건조한 polysaccharide를 0.2 µm filter에 여과한 후, 주입 전에 column을 H₂O로 평형화시키고, HPLC reodine injector에 주입하였다. Column을 통과하여 용출되는 peak를 시간별로 35분 까지 분획하였다. Oligosaccharide에 이용된 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

MA-104 세포배양

Rotavirus의 감염 또는 증식을 위한 배양세포로는 Macacuss

Table 1. Operating conditions of HPLC

Items	Condition
Instruments	Waters co. 510 solvent delivery system, 486 tunable absorbance detector
Column	MCL Gel CK08EC (8.0×300 mm)
Detector	RI
Mobile phase	Water
Flow rate	0.6 mL/min
Column temp.	75°C
Injection volume	20 µL

Rhesus monkey kidney cell(MA-104세포)로, 미국 Stanford University 의과대학의 Dr. Greenberg Lab으로부터 분양 받아 Medium 199 Ear's Salts(No. 9466: Irvine scientific. Santa Anna. CA.)에서 증식시킨 후 동결 해동하여 사용하였다. 세포의 증식과 유지는 M199에 7%의 Fetal Bovine Serum(FBS) (GIBCO, U.S.A.)과 1% L-glutamin penicillin streptomycin(L-GPS: Irvine scientific. Santa Anna. CA.)을 혼합하여 75 cm² 크기의 조직배양용 T-flask에서 매일 배지를 교환하면서 3-4일 후에 완전한 monolayer가 형성된 세포를 계대배양하여 사용하였다.

Kefir의 polysaccharide에 의한 HRV S-2의 MA-104 세포감염 억제효과 측정

Kefir의 polysaccharide에 의한 HRV S-2의 MA-104 세포감염 억제효과 측정은, Kaljot등(1988)의 방법에 따라 AEC staining을 실시하여 측정하였다. 먼저 MA-104 세포를 96-well plate에 단층이 형성되도록 배양하였고, trypsin이 첨가된 M199에 활성화된 바이러스를 10,000배 희석하여 다시 30분 동안 활성화시켜 사용하였다. 각각의 억제물질 50 µL를 2진 희석하고 여기에 virus 100 µL를 혼합한 것을 5% CO₂가 유지되는 37°C 배양기에서 13-15시간 동안 감염시켰다. 억제물질과 비특이적으로 결합한 바이러스를 제거한 다음, TNC(10 mM Trizma base, 100 mM NaCl, 15 mM CaCl₂, pH 7.4)로 2번 세척하였고, 10% formalin을 각 well에 60 µL씩 넣어 상온에서 30분 동안 세포를 고정하여 TNC로 2번 세척하였다. 1% Triton X-100을 각 well에 60 µL씩 넣고 상온에서 4분간 정치 후 TNC로 다시 2번 세척한 다음 1차로 rotavirus 단클론 항체인 1B2를 FBS가 1%첨가된 TNC에 15,000배가 되도록 희석하여 각 well에 125 µL씩 첨가한 후 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TNC로 2번 세척하여 2차 항체 HRP goat antimouse(IgG)(Kirkegard & Perry, USA)를 FBS가 1% 첨가된 TNC로 4,000배가 되도록 희석하여 75 µL씩 각 well에 넣어 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 감염여부를 파악하기 위하여 AEC용액을 각 well에 60 µL씩 첨가하였고, 상온에서 5-10분간 염색시킨 후 TNC로 2번 세척하였다. 감염된 세포의 개수를 count

Table 2. Chemical composition of kefir grain and the polysaccharide content extracted from kefir grain by centrifugal method and ethanol extract method

Separation Step	Chemical composition		
	Water (g)	Protein (g)	Polysaccharide (mg)
Kefir grain (500 g)	437.5	41.8	29200
Crude polysaccharide		0.47	21.6

하여 virus 대조구와 비교하여 그 억제 정도를 측정하였다.

Inhibition rate

$$= \frac{\text{Number of non-infected cells by virus}}{\text{Number of total cells}} \times 100$$

결과 및 고찰

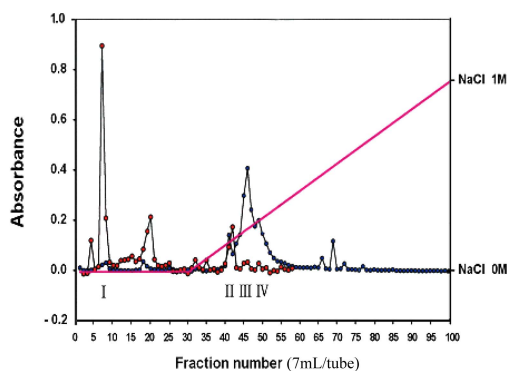
Kefir의 면역적인 효과 및 생리적 기능은 주로 polysaccharide에 있는 것으로 보고되고 있으므로(Shiomi *et al.*, 1982), 본 실험에서는 polysaccharide를 추출하여 HRV에 대한 억제력을 고찰하여 보았다.

Polysaccharide의 추출

500 g의 kefir grain을 사용하였을 때 수분이 437.5 g, 단백질이 41.8 g, 그리고 polysaccharide는 29.2 g으로 구성된 것으로 나타났다. 원심분리법과 ethanol 침전법에 의해 추출된 crude polysaccharide는 약 21.6 mg(0.07%)이 회수되었다(Table 2).

DEAE-sepharose에 의한 ion-exchange chromatography

Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 당은 이온교환 chromatography에서 fraction I(0.8 mg)의 미결합 분획과 결합한 분획으로 나



◆ 254 nm: protein	Fraction I : FN 6-9 (0.8 mg/1.8 mg)
◆ 530 nm: carbazole assay (160 μL tube)	Fraction II : FN 41-43 (4.8 mg/8.9 mg)
	Fraction III : FN 44-48 (5.3 mg/9.4 mg)
	Fraction IV : FN 49-51 (1.4 mg/3.1 mg)

Fig. 1. DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography for the polysaccharide separation.

뉘어졌다. 결합한 분획은 약 0.05에서 0.2 M까지의 NaCl에 의하여 3개의 peak로 용출되어 각각 fraction II(4.8 mg), III(5.3 mg), IV(1.4 mg)로 분리되었다.

Kefir의 polysaccharide에 의한 HRV S-2의 MA-104 세포 감염 억제효과

HRV S-2의 MA-104 세포 감염 시 kefir의 polysaccharide를 첨가하였을 때 미치는 결과를 Fig. 2에 나타내었다. AEC staining(Fig. 3, 4)을 이용하여 kefir의 polysaccharide에 의한 HRV S-2의 억제효과를 측정한 결과, DEAE-Sepharose 칼럼에 결합한 polysaccharide의 fraction 전부가 모두 HRV의 세포감염에 상당한 억제효과를 나타내었다. Kefir의 polysaccharide fraction II, III, IV가 각각 4.8, 5.4, 1.4 mg/mL의 농도에서 약 97, 99 및 100%의 억제효과를 나타냈으며, 50% 억제농도(IC₅₀)는 0.075, 0.083, 및 0.022 mg/mL로 나타났다. Fraction II, III, IV는 단백질도 포함된 것으로 고려되어 전기영동을 실시하였을 때 fraction IV는 단백질이 보였으나, fraction II와 III에는 단백질이 관찰되지 않았다. 따라서 fraction II와 III, IV에 있는 kefir의 polysaccharide가 HRV의 MA-104 세포감염에 97% 이

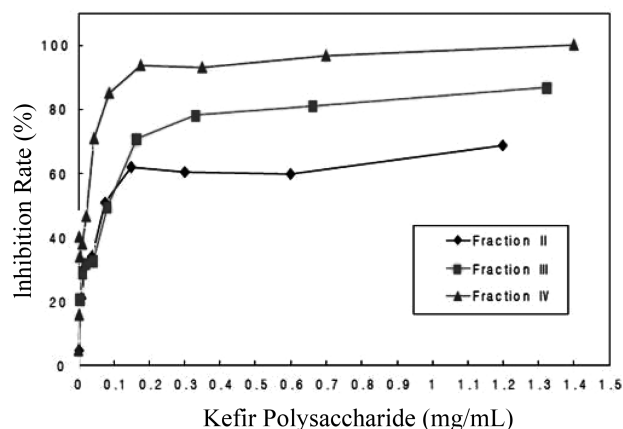


Fig. 2. Inhibitory effect of kefir polysaccharide against MA-104 cell infected by human rotavirus S-2.

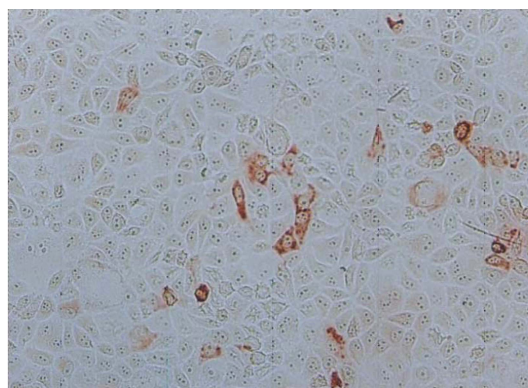


Fig. 3. AEC staining of the MA-104 cells infected by human rotavirus S-2.

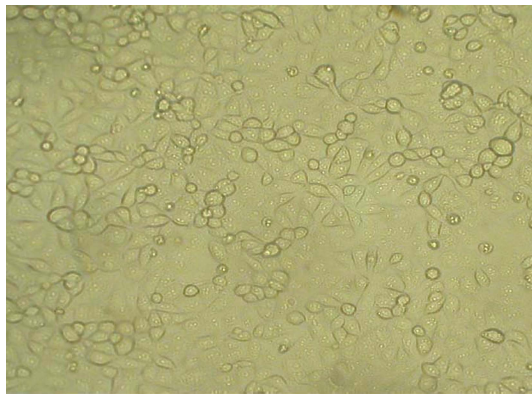


Fig. 4. AEC staining of the human rotavirus S-2 infected MA-104 cells inhibited by kefir polysaccharide treatment (Addition of fraction IV).

상 상당한 억제효과가 있는 것으로 판단된다.

Polysaccharide의 HPLC 분석

Kefir에 함유된 polysaccharide의 구성성분을 확인하기 위하여 polysaccharide를 다시 HPLC로 분석하였으며, 그 결과는 Table 3과 Fig. 5, 6, 7에 나타내었고, Fig. 8에 요약하여 정리하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 kefir grain에서 추출한 polysaccharide는 retention time이 11.3, 16.1, 17.7 및 19.3분 상에서 peak로 분리되어 용출되었다. 또한, 24, 36 및 48시간의 배양하여 생성된 polysaccharide를 각각 HPLC로 분리하였을 때 차별적으로 용출된 peak는 없었으며, 각 peak상의 비율은 대동소이한 것으로 고찰되었다. 즉 배양시간별로 새로 생성되는 polysaccharide는 HPLC 분석에서 관찰되지 않았다. 그리고 전체적인 용출 pattern은 Hosono등(1990)이 보고한 결과와 일치하는 경향을 나타냈다. Kefir grain을 이용하여 24시간 배양한 kefir로부터 추출한 polysaccharide를 HPLC로 분석한 경우는 retention time이 11분대이며 peak면적이 13,828,314 μV 로 출현한 반면, 동

Table 3. HPLC pattern analysis of polysaccharide extracted from kefir grain at each cultivation time

Peak	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V sec}$)	Height (μV)	
24 h	1st	11.312	13,828,314	327,991
	2nd	16.136	472,265	14,189
	3rd	17.707	4,541,570	144,765
	4th	19.311	5,584,489	124,295
36 h	1st	11.254	11,055,823	248,548
	2nd	16.353	78,718	4,467
	3rd	17.712	2,565,991	83,134
	4th	19.924	2,977,906	64,568
48 h	1st	11.269	11,645,007	262,824
	2nd	16.133	255,743	7,817
	3rd	17.714	3,217,074	87,377
	4th	19.327	3,711,273	8,112

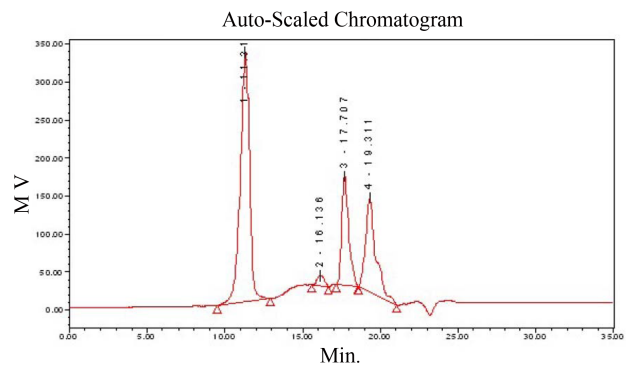


Fig. 5. HPLC pattern of polysaccharide produced by cultured kefir at 24 h after fermentation.

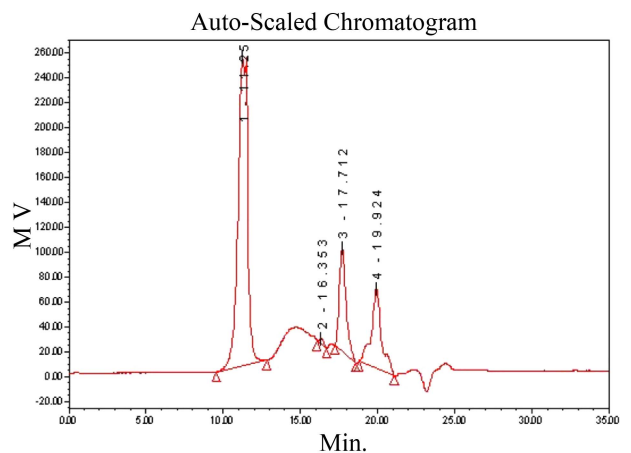


Fig. 6. HPLC pattern of polysaccharide produced by cultured kefir at 36 h after fermentation.

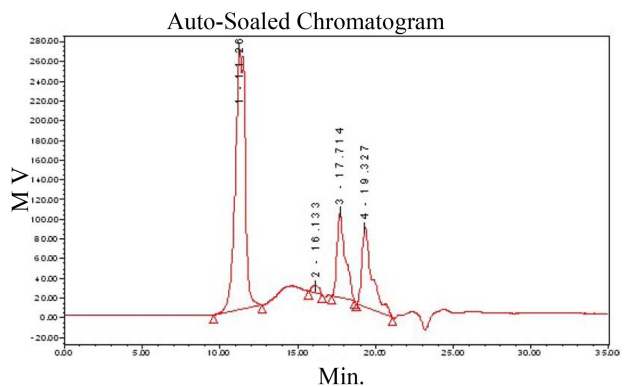


Fig. 7. HPLC pattern of polysaccharide produced by cultured kefir at 48 h after fermentation.

결 건조 kefir grain을 이용하여 추출한 polysaccharide의 경우는 retention time이 10분대이며 peak면적은 1,097,848 μV 인 peak가 용출되어 kefir grain의 상태에 따라 polysaccharide 분리에 많은 차이를 보였다(자료미제시). 전체적으로 kefir의 polysaccharide은 4개의 peak로 분리되었으며 이들은 분자량이 각각 다른 다당 및 올리고당으로 판단되었다.

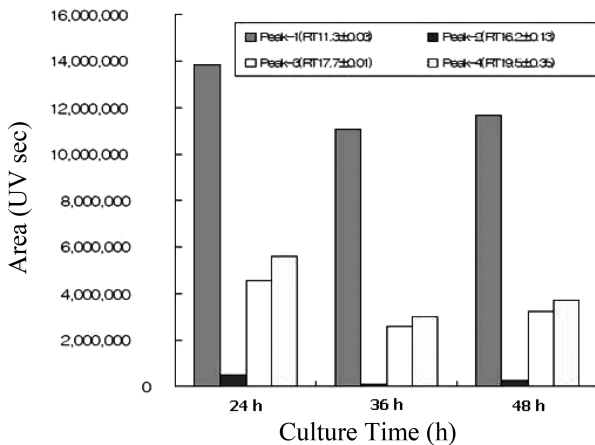


Fig. 8. Polysaccharide composition of kefir grain during fermentation.

요약

본 연구에서는 kefir 중의 polysaccharide 분획이 HRV의 MA-104 세포 감염에 미치는 억제효과를 조사하였다. (1) 추출된 polysaccharide는 DEAE 이온교환 chromatography에서 fraction I의 미결합 분획과 fraction II, III, IV의 결합 분획으로 나뉘어졌다. (2) Polysaccharide fraction II, III, IV는 각각 4.8, 5.3, 1.4 mg/mL의 농도로 첨가했을 때 HRV의 MA-104 세포감염에 대하여 약 97%, 99%, 100%의 억제효과를 나타냈다. 본 연구의 결과를 종합하면 kefir의 다당체가 유아설사변에서 분리한 rotavirus S-2가 MA-104 cell 감염에 97% 이상 억제효과가 있어 동절기 유아의 바이러스성 급성설사 예방에 kefir를 급식하는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007195) 지원에 의해 이루어졌으며, 천정환과 현지연은 2010년도 두뇌 한국 21사업의 지원을 받아 이에 감사를 드립니다

참고문헌

1. Dasilva, J. A. L. and Goncalves, M. P. (1990) Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloid* **4**, 277-287.
2. Ferreira, I. M., Pinho, O., Monteiro, D., Faria, S., Cruz, S., Perreira, A., Roque, A.C., and Tavares, P. (2010) Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *J. Dairy Sci.* **93**, 27-31.
3. Hosono, A., Tanabe, T., and Otani, H. (1990) Binding properties

of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft* **45**, 647-651.

4. Ismail, A. A., EL-Nockrashy, S. A., and Khorshid, M. A. (1983) A beverage from separated buffalo milk fermented with kefir grains. *J. Dairy Technol.* **36**, 117-118.
5. Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., and Greenberg, B. H. (1988) Infectious rotavirus enters cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**, 1136-1144.
6. Kandler, O. and Kunath, P. (1983) *Lactobacillus kefir* a component of the microflora of kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 286-294.
7. Kemp, N. (1984) Kefir, the champagne of cultured dairy products. *Cultured Dairy Prod. J.* **19**, 29-30.
8. Kim, J. H. (2003) Studies in the characteristics of roby lactic acid bacteria and exopolysaccharide isolated from kefir culture. M.S. thesis, Konkuk Univ., Seoul, Korea.
9. La Riviere, J. W. M., Kooiman, P., and Schmidt, K. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol.* **59**, 269-278.
10. Lim, Y. S. and Lee, S. K. (2009) Characteristics of exopolysaccharide produced in goat milk yogurt cultured with *Streptococcus thermophilus* LFG isolated from kefir. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 143-150.
11. Murofushi, M., Mizuguchi, J., Aibara, K., and Matuhasi, T. (1986) Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacol.* **12**, 29-35.
12. Murofushi, M., Shiomi, M., and Aibara, K. (1983) Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**, 49-53.
13. Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., and Recio, I. (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* **88**, 3480-3487.
14. Riepenhoff-Talty, M., Offor, E., Klossner, K., Kowalski, E., Carmody, P.J., and Ogra, P.L. (1985) Effect of malnutrition on rotavirus infection in mice. *Pediatr. Res.* **19**, 1250-1253.
15. Rodriguez, W. J., Kim, H. W., Arrobro, J. O., Brandt, C. D., and Chanock, R. M. (1977) Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.* **91**, 188-193.
16. Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., and Aibara, K. (1982) Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **35**, 75-80.
17. Toba, T., Uemura, H., Mukai, T., Itoh, T., and Adachi, S. (1991) A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranoferiens* isolated from kefir grains. *J. Dairy Res.* **58**, 497-502.
18. Yokoi, H., Watanabe, T., Fuji, Y., Toba, T., and Adachi, S. (1990) Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *J. Dairy Sci.* **73**, 1684-1689.

(Received 2010.8.25/Revised 1st 2010.12.13, 2nd 2010.12.29/
Accepted 2011.1.3)