

Anti-Allergic Inflammatory Effect of Bacteria Isolated from Fermented Soybean and Jeotgal on Human Mast Cell Line (HMC-1)

Yu-Jin Ko¹, Hui-Hun Kim¹, Eun-Jung Kim¹, Jin-Yong Kim¹, Sang-Dong Kang¹, Yong-Hwi Son¹, Sin-Yang Choi², Seong-Kwan Cha², Jong-Won Kim¹, Jeong-Ok Lee¹ and Chung-Ho Ryu^{1*}¹Division of Applied Life Science(BK21 program), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea²Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

Received November 19, 2010 /Accepted January 21, 2011

The mast cell is one of the major effector cells in inflammatory reactions and can be found in most tissues throughout the body. Activated mast cells can produce histamine, as well as a wide variety of other inflammatory mediators such as eicosanoids, proteoglycans, proteases, and several pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukins (IL-6), IL-8, IL-4, IL-13. In the present study, we isolated two bacterial strains (J80 and G147) from fermented soybean and *Jeotgal*, and investigated the inhibitory effects of their extracts which were prepared by several pre-treatment methods (sonication for 20 min, heating at 100°C for 30 min, autoclaving at 121°C for 15 min) on the mast cell-mediated inflammatory response. The pretreated bacterial extracts had no cytotoxicity against Human Mast Cell (HMC-1). Among various pretreatments, the extracts treated at 100°C showed highest inhibition of histamine release (J80, 28.46%; G147, 41.14%). The J80 and G147 extracts treated at 100°C resulted in the inhibition of IL-6 secretion by 38.46% and 56.45%, respectively. The J80 extract treated at 100°C resulted in the inhibition of TNF- α secretion by 66.67%, but G147 extract showed the highest inhibition effect by 41.1% when treated with sonication. These results suggest that bacterial extracts treated at 100°C have a higher level of anti-inflammatory effects than other treatments such as sonication or autoclaving.

Key words : Mast cell, cytokine, histamine, anti-inflammatory effect, fermented soybean, *Jeotgal*

서 론

알레르기는 피부나 점막, 호흡기 등을 통해 침입하는 외부물질에 대한 체내의 과민반응으로 인해 나타나는 질병이다. 이러한 과민반응은 신체의 기능에 여러 가지 이상증세를 일으키며 자주 재발하거나 만성화되는 것이 특징이다[1].

과민반응은 4가지로 분류할 수 있으며 이 중 1형 과민반응은 널리 알려져 있는 알레르기 반응으로 IgE항체와 비만세포에 의해 일어난다[1,25,30]. 비만세포는 아토피 피부염, 기관지 천식, 알레르기성 비염과 같은 염증반응에 관련되는 주요 세포 중 하나[3]로써 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있으며, Th2 type에 의존적인 면역과민성 반응과 알레르기성 질환 및 특정 선천성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[36]. 특히 외부자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 protease나 histamine과 같은 혈관확장물질들을 분비하며, 염증 유발물질인 다양한 TNF- α , IL-6, IL-8, IL-13과 같은 사이토카

인의 분비를 자극한다[31].

Histamine은 비만세포의 탈과립에 의해 분비되는 물질 중에서 가장 잘 알려져 있고, 즉시형 과민반응과 관련된 중요한 인자들 중의 하나이다[22,30]. Histamine은 2~5 pg/mast cell 정도로 비만세포 내에 존재하며 기관지 수축, 점액분비 증가, 혈관확장, 혈관투과성 증가 등을 일으킨다[15]. TNF- α 는 자가 분비할 뿐만 아니라 IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokine의 유도인자이다[2,4]. IL-6는 T cell, monocytes, macrophage 등에 의해 생성되는 다면발현 염증성 cytokine이며, B cell분화의 유도과 T cell의 성장과 분화 등의 기능을 가진다. IL-8은 류머티즘과 같은 염증질환에서 많이 발견되고[3], 호중구, T 림프구, B 림프구, 호산구와 같은 염증 관련 세포에 영향을 미친다[24].

염증반응의 치료에는 약물치료가 가장 많이 사용되고 있으나 약물치료 시 부작용이 커서 사용하는데 상당한 어려움이 있다. 최근 염증반응 억제에 관한 연구로는 발효식품[10], 한약재[11,17] 그리고 미생물[6-9,14,37] 등을 이용하여 다양하게 이루어지고 있다.

장류는 기본적으로 콩을 주로 사용하는 발효식품의 총칭으로, 장(醬)은 음식의 맛을 내기 위한 조미료로서 우리 음식문화에서 큰 비중을 차지하고 있다. 최근 식물성 콩 단백질의 건강

***Corresponding author**

Tel : +82-55-772-1905, Fax : +82-55-772-1909

E-mail : ryu@gnu.ac.kr

증진 효과 등에 관한 기능성 연구가 활발히 진행되고 있으며 서구인들조차 콩의 유용성에 상당한 관심을 집중하고 있는 실정이다. 자연계의 콩 단백질의 분해와 동시에 효소를 축적하여 생성된 메주를 이용하는 전통발효식품인 장류에는 간장, 된장, 혼합장 등이 있다[19].

젓갈은 예로부터 우리나라 사람들이 즐겨 먹는 대표적인 전통 수산발효식품 중의 하나로, 단백질, 지방, 무기질의 공급원으로서 영양학적으로 중요한 식품이다. 젓갈 제조 시 첨가되는 식염은 부패미생물의 생육을 억제하고 내염성의 발효미생물이 선택적으로 생장할 수 있도록 조절을 하여 젓갈의 저장성을 연장시켜주는 중요한 역할을 한다[27].

우리나라의 대표적인 발효식품인 김치 유산균은 균주 동정 및 효능에 대하여 다양하게 연구되고 있으며 특히 유산균의 건강증진 효과는 생균일 때뿐만 아니라 가열살균[13,26,32], 동결건조 형태[21,28], 유산균 파쇄액[12] 또는 동결건조한 유산균 파쇄액[5,33]의 형태로 공급을 하였을때도 건강증진 작용이 있어 사멸한 이후에도 이 균체 성분이 장으로 흡수되어 생리활성을 가질 것으로 생각되고 있다. 이러한 유산균의 상태에 따른 효능이 밝혀짐에 따라 유산균을 이용한 단순한 발효식품의 제조뿐만 아니라 이들 유산균을 편리한 형태로 제조하여 그 유용성을 여러 식품에 적용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 그러나 다른 발효식품인 장류나 젓갈에서 분리된 발효 균주의 기능성에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 처리방법(sonication, heating, autoclaving)에 따른 장류 및 젓갈 유래 균체의 비만세포 매개 항염증 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

분리균주의 동정

장류 및 젓갈에서 분리한 균주의 정보를 확인하기 위하여 각 균주의 16S rRNA sequencing을 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 실시하였다.

균주 및 전처리

본 연구에서 사용한 균주는 젓갈, 장류에서 분리한 균주(J80, G147)로 한국식품연구원에서 분양받아 실험에 사용하였다. 각 균주는 MRS배지에 24 hr 동안 배양하여 원심분리(8,000 rpm, 10 min)한 후 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 균체를 각각 sonication (20 min), heating (100°C, 30 min), autoclaving (121°C, 15 min)하여 원심분리(8,000 rpm, 10 min)한 다음 상정액을 0.45 µm membrane filter로 filtering한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

HMC-1 세포 배양

HMC-1세포(HMC-1, a kind gift from Dr. H.M. Kim at

Kyeonghee University, Seoul, Korea)는 10% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin과 100 ug/ml streptomycin이 함유된 Isocove's modified Dulbecco's medium (IMDM)를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

HMC-1세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay로 실험하였다[16]. HMC-1 세포(5×10⁵ cell/ml)에 균주 추출물을 1 mg/ml로 조절하여 500 ul 배양액에 5 ul를 처리하고 30 min간 incubator에서 반응 후 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 calcium ionophore A23187로 8시간 자극하였다. 자극 후 MTT solution (50 ul)를 첨가하여 37°C에서 overnight하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 결정을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 균체 추출물과 자극제를 처리하지 않은 무처리구의 흡광도를 100%로 하여 세포 생존율을 계산하였다.

Histamine 유리억제율 측정

세포 배양 상층액 중에 있는 히스타민의 정량은 Shore [34]의 방법에 따라 에펜돌프 튜브에 배양액 500 ul를 넣고 0.1 N-HCl 450 ul 60% 과염소산 용액 50 ml를 넣고 혼합 후 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 그 상층액 800 ul를 5 N-NaOH 용액 500 ul, 증류수 3 ml, n-butanol 10 ml 및 NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕(20 min 이상) 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하였다. Butanol 층 8 ml를 50 ml 시험관에 넣고 0.1 N-HCl 용액 3 ml, n-heptane 10 ml를 가하여 진탕(20 min 이상)후에 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하였다. 여기에서 얻어진 수층 2 ml에 1 N-NaOH 용액 400 ul와 1% *O*-phthalaldehyde (Sigma P-0657) 용액 100 ul를 넣고 수욕상(37°C)에서 3 min 동안 반응시킨 다음, 3 N-HCl 용액 200 ul를 넣고 혼합 후에 2 min 동안 방치하여 spectrofluorimeter (λ excitation=360 nm, λ emission=440 nm)로 형광도를 측정하였다. 히스타민 유리억제율(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

- A: 약물을 부가하지 않았을 때의 histamine 양
- B: 약물을 부가하였을 때의 histamine 양

Cytokine 분비량 측정

장류 및 젓갈 분리 균체의 항염증 효과를 알아보기 위해 HMC-1 세포에 균주 추출물을 처리한 후 PMA와 A23187로 자극하여 유도된 cytokine (IL-6, TNF-α와 IL-8) 분비량을 ELISA법으로 측정하였다. 96 well plate에 IL-6, TNF-α와 IL-8의 monoclonal antibody를 넣어 4°C에서 하룻밤 코팅하였다. 0.05% Tween20을 첨가한 phosphate buffer saline (PBST)로

세척한 후 standard로 사용되는 recombinant IL-6, TNF- α , IL-8과 시료를 각각 첨가하여 실온에서 2 hr 동안 반응시킨다. 세척 후 biotinylated anti-human IL-6, TNF- α 와 IL-8을 첨가하여 실온에서 2 hr 동안 반응시킨 다음 avidin peroxidase를 넣어 40 min간 반응시킨 후 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 첨가하여 405 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

장류 및 젓갈 분리 균주의 16S rRNA 동정

본 연구에서 장류 및 젓갈에서 분리되어 선별된 뒤 항알레르기 효과를 알아보기 위해 사용된 균주인 J80과 G147균주의 16S rRNA sequencing을 실시한 결과를 Table 1에 나타내었다. J80은 *Bacillus subtilis* strain LB-01의 16S rRNA, partial sequence와 99% 유사성을 나타내었으며 G147은 *Bacillus* sp. TPR06 16S rRNA partial sequence와 100% 유사성을 나타내었다. 이상의 실험결과로부터 장류 및 젓갈류에서 분리한 균주를 *Bacillus subtilis* J80 및 G147로 명명하여 실험에 사용하였다.

장류 및 젓갈 유래 균체의 전처리에 따른 세포생존율 측정

MTT 시약은 살아있는 세포에서 formazan을 형성하는데, 각기 다른 조건으로 전처리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 HMC-1 세포에 처리하고 MTT solution을 첨가하여 37°C에서 overnight한 후 HMC-1 세포에 MTT solution을 첨가하였을 때 보라색의 formazan을 형성하는 것이 관찰되었다.

추출 방법을 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 비만세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 전처리를 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 처리한 실험군의

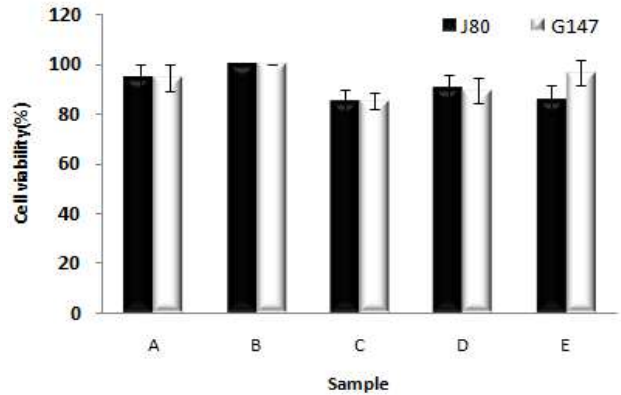


Fig. 2. Effects of bacterial extracts prepared by various methods on the viability of HMC-1 cells. A: Stimulation (PMA, A23187), B: Control (Not treated), C: Sonication (20 min+PMA, A23187), D: Heating (100°C, 30 min+PMA, A23187), E: Autoclaving (125°C, 15 min+PMA, A23187)

HMC-1의 생존율은 무처리군 B (Not treated)를 100%로 환산한 결과 약 86~97%로 유의적 차이를 보이지 않아 장류 및 젓갈 유래 균체에 의한 세포 독성은 나타나지 않았다.

김 등[16]은 생쥐 면역세포인 EL-4 세포와 사람 면역세포인 Jurkat 세포에 가열한 김치 유산균을 처리하였을 때 세포 성장에 영향을 주지 않는다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

장류 및 젓갈 유래 균체의 전처리에 따른 histamine 유리 억제효과

추출방법을 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 HMC-1에 처리한 후 histamine 유리 억제율을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Histamine 유리 억제율은 J80의 경우 sonication한 C구가 22.80%였으며, 100°C에서 30 min 동안 가열한 D구는 28.46%, 121°C에서 15 min간 autoclaving한 E구는 19.07%

Table 1. The sequences of 16S rRNA genes of bacteria (J80, G147) isolated from fermented soybean and *Jeotgal*

Query		Subject	Identities	
Name	Length	Gene	Match	Percentage (%)
J80	1414	<i>Bacillus</i> sp. TPR06 16S rRNA gene, partial sequence	1414	100
G147	1441	<i>Bacillus subtilis</i> 16S rRNA gene, partial sequence, strain: LB-01	1440	99

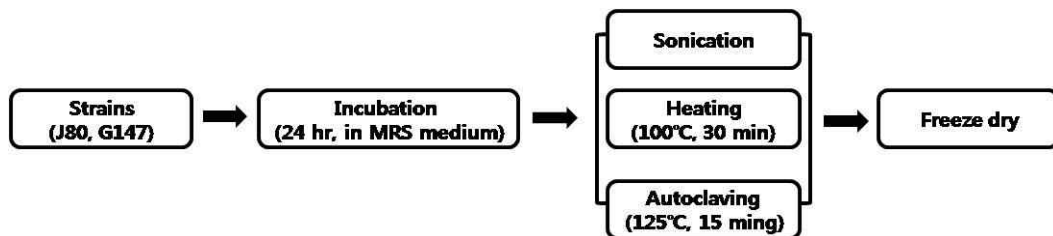


Fig. 1. Sample preparation for bacteria isolated from fermented soybean and *Jeotgal*.

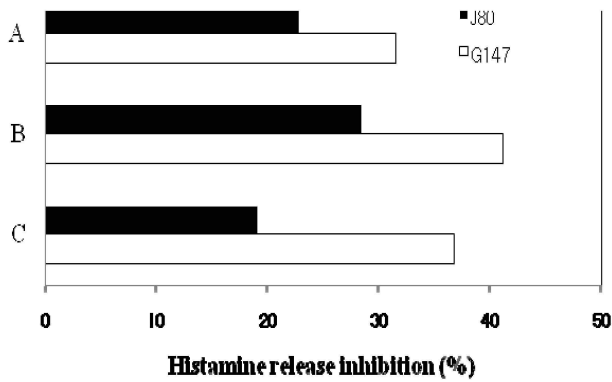


Fig. 3. Inhibitory effects of bacterial extracts on histamine release by HMC-1 cells. A: Sonication (20 min+PMA, A23187), B: Heating (100°C, 30 min+PMA, A23187), C: Autoclaving (125°C, 15min+PMA, A23187)

로 나타났다. G147는 sonication한 C구가 31.55%였으며 100°C에서 30 min간 가열한 D구는 41.14%, 121°C에서 15 min 동안 autoclaving한 E구는 36.69%의 억제효과를 보였다.

위 결과로 미루어보아 장류 및 젓갈 유래 균체는 100°C에서 30 min 동안 가열처리하는 것이 J80, G147 각각 28.46%, 41.14%로 histamine 유리 억제효과가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 윤[37]은 김치에서 분리한 유산균을 가열하여 흰쥐의 비만세포주인 RBL-2H3에 처리하였을 때 histamine 분비를 억제한다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

장류 및 젓갈 유래 균체의 전처리에 따른 IL-8 유리 억제효과 추출방법을 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 비만세포에 처리하여 PMA와 A23187로 자극하였을 때 IL-8 유리량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. J80의 경우, Sonication (C),

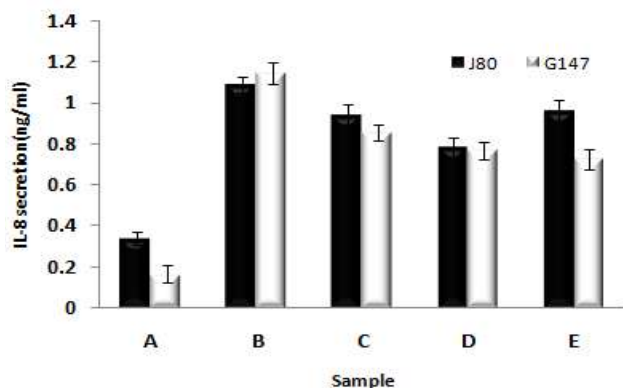


Fig. 4. Effects of bacterial extracts prepared by various methods on the PMA- and A23187-induced IL-8 secretion by HMC-1 cells. A: Control (Not treated), B: Stimulation (PMA, A23187), C: Sonication (20 min+PMA, A23187), D: Heating (100°C, 30 min+PMA, A23187), E: Autoclaving (125°C, 15 min+PMA, A23187)

heating (D), autoclaving (E)을 처리한 각각의 구에서 모두 IL-8유리억제 효과를 나타내었으며 100°C, 30min에서 처리한 구에서 분비량이 0.78 ng/ml로 약 28.45%의 억제효과로 가장 높게 나타내었다. G147에서도 역시 sonication (C), heating (D), autoclaving (E)을 처리한 각각의 구에서 모두 IL-8유리억제 효과를 나타내었으며 125°C, 15min에서 처리한 구에서 분비량이 0.73 ng/ml로 약 36.52%의 분비억제효과로 가장 높게 나타내었다. 왕 등[35]은 태아 내장과 발효우유에서 분리한 유산균들을 sonication 등으로 전처리해서 장내세포주(Caco-2, HT-29 and HCT116)에 처리하였을 때, IL-8의 분비를 억제시켜 염증반응을 억제한다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

장류 및 젓갈 유래 균체의 전처리에 따른 IL-6 분비 유리효과

처리방법을 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 비만세포에 처리하여 PMA와 A23187로 자극하였을 때 IL-6 분비량을 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. J80, G147의 장류 및 젓갈 유래 균체에서 무처리구(Not treated)인 대조구인 B의 분비량인 0.65 ng/ml (J80), 0.62 ng/ml (G147)보다 sonication (C), heating (D), autoclaving (E)을 처리한 각각의 구에서 낮은 분비량으로 IL-6 분비 억제효과가 나타났으며, J80에서는 100°C, 30 min한 D구의 분비량이 0.40 ng/ml으로 약 38.46%의 분비 억제효과로 가장 높게 나타났으며, G147 역시 100°C, 30 min한 D구의 분비량이 0.27 ng/ml으로 56.45%로 가장 높은 분비 억제효과 보였다.

이 등[20]은 대장염 쥐 실험에서 유산균이 IL-6 분비를 억제한다고 보고하였다. 또한 Miettinen 등[23]은 human peripheral blood mononuclear cells에서 10종의 유산균으로 cytokine 분비를 실험한 결과 glutaraldehyde로 fixing한 유산균이

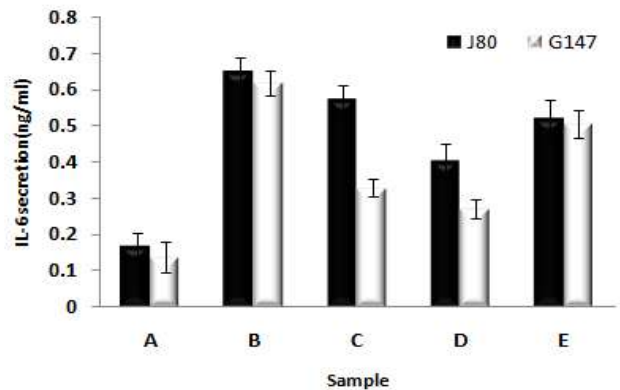


Fig. 5. Effects of bacterial extracts prepared by various methods on the PMA- and A23187-induced IL-6 secretion by HMC-1 cells. A: Control (Not treated), B: Stimulation (PMA, A23187), C: Sonication (20 min+PMA, A23187), D: Heating (100°C, 30 min+PMA, A23187), E: Autoclaving (125°C, 15 min+PMA, A23187)

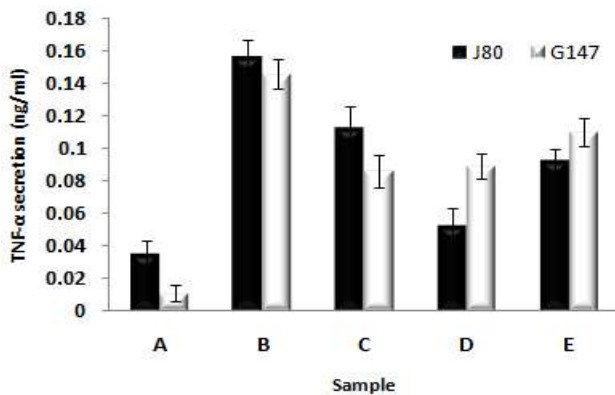


Fig. 6. Effects of bacterial extracts prepared by various methods on the PMA- and A23187-induced TNF- α secretion by HMC-1 cells. A: Control (Not treated), B: Stimulation (PMA, A23187), C: Sonication (20 min+PMA, A23187), D: Heating (100°C, 30 min+PMA, A23187), E: Autoclaving (125°C, 15 min+PMA, A23187)

IL-6 분비를 억제하는 것으로 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

장류 및 젓갈 유래 균체의 추출방법에 따른 TNF- α 유리 억제효과

추출방법을 달리한 장류 및 젓갈 유래 균체를 비만세포에 처리하여 PMA와 A23187로 자극하였을 때 TNF- α 분비량을 Fig. 6에 나타내었다.

IL-6와 마찬가지로 장류 및 젓갈 유래 균체 모두에서 대조구 B의 분비량인 0.156 ng/ml (J80), 0.146 ng/ml (G147)보다 낮은 분비량으로 TNF- α 분비 억제효과가 나타났다. 장류 유래 균주 J80의 경우 100°C, 30 min 처리한 D의 TNF- α 분비량이 0.052 ng/ml으로 66.67%의 분비억제효과로 가장 높았으며, G147의 경우 sonication을 처리한 C구의 TNF- α 분비량이 0.086 ng/ml으로 41.1%의 분비억제효과로 다른 구에 비해 높은 억제효과를 나타내었다.

김 등[18]은 김치에서 분리한 유산균을 대식세포 활성화에 관한 연구에서 김치에서 분리한 유산균을 가열하여 대식세포에 처리하였을 때 TNF- α 분비가 증가하는 것으로 보고하였고, Miettinen 등[23]은 유산균의 종류에 따라 TNF- α 분비량은 차이가 있지만 생균이 사균보다 TNF- α 분비량이 높다고 보고하였다. 이러한 결과들은 균체 추출물의 처리 방법에 따라 염증 억제효과에 차이가 있음을 일부 확인해 주고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업 위탁연구과제 연구비 지원(계약번호: 306002-05)과 BK21 program 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

References

- Ahn, Y. M., J. B. Kim, Y. A. Kim, and O. N. Kim. 1990. Pharmacotherapy in allergic disorders (I). *J. Korean Soc. Hosp. Pharm.* **7**, 112-120.
- Arend, W. P. and J. M. Dayer. 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 151-160.
- Baggiolini, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* **250**, 91-104.
- Butler, D. M., R. N. Maini, M. Feldmann, and F. M. Brennan. 1995. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 225-230.
- Chae, O., K. Shin, H. Chung, and T. Choe. 1998. Immunostimulation effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 424-430.
- Chang, J. H., Y. Y. Shin, S. H. Kim, K. M. Chee, and S. K. Cha. 2005. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus spp.* strains isolated from *Chungkuk-jang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 255-260.
- Hong, S. Y. 2006. Characterization of biological response modifier produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean paste. M.D. Thesis. *Yonsei University, Seoul, Korea.*
- Hur, H. J., K. W. Lee, and H. J. Lee. 2004. Production of nitric oxide, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by RAW264.7 macrophage cells treated with lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Biofactors* **21**, 123-125.
- Isolauri, E, P. Kirjavainen, E. Eerola, P. Kero, S. Salminen, and E. Isolauri. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **50**, 54-59.
- Kang, K. O. 2006. Assessment of allergenicity of fermented dairy products by immunoassay. *Korean J. Food Nutr.* **19**, 296-300.
- Kang, O. H., H. S. Chae, J. H. Choi, H. J. Choi, J. H. Park, P. S. Park, S. H. Cho, G. H. Lee, H. Y. So, Y. K. Choo, O. H. Kweon, and D. Y. Kwon. 2006. Effects of the *Schisandra fructus* water extract on cytokine release from a human mast cell line. *J. Med. Food* **9**, 480-486.
- Kaizu, H., M. Sasaki, H. Nakajima, and Y. Suzuki. 1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J. Dairy Sci.* **76**, 2493-2499.
- Kato, I., K. Endo, and T. Yokokura. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**, 29-36.
- Kim, H. J. 2004. Antitumor effects of immune activity by cell wall extract of lactic acid bacteria. M.D. Thesis. *Sungkyunkwan University, Seoul, Korea.*
- Kim, J. W. 2008. Inhibitory Effects of Lactic Acid Bacteria Extracts Isolated from *Kimchi* by Extraction Methods on the

- Mast Cell - Mediated Inflammatory Response. M.D. Thesis. *Gyeongsang University, Jinju, Korea*.
16. Kim, M. S., W. K. Lim, J. G. Cha, N. H. An, S. J. Yoo, J. H. Park, H. M. Kim, and Y. M. Lee. 2001. The activation of PI3-K and PKC ζ in PMA-induced differentiation of HL-60 cells. *Cancer Lett.* **171**, 79-85.
 17. Kim, M. S., J. M. Yi, S. H. Kim, S. H. Hong, and H. M. Kim. 2004. Madimadi, Korean folk medicine, blocks TNF- α , IL-1 β , and IL-8 production by activated human immune cells. *Cytokine* **25**, 179-186.
 18. Kim, S. K. 2008. Different modes of immunostimulation induced by lactic acid bacteria isolated from kimchi in the murine immune system. *Seoul National University Press*.
 19. Lee, C. Y. 1989. Korean soy seasonings and culture. *Food Sci. Ind.* **22**, 3-7.
 20. Lee, H. S., S. Y. Han, E. A. Bae, C. S. Huh, Y. T. Ahn, J. H. Lee, and D. H. Kim. 2008. Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 574-580.
 21. Lee, H. Y., Y. Lee, J. H. Park, S. H. Seok, S. A. Cho, M. W. Baek, D. J. Kim, and J. H. Park. 1993. Effect of probiotic lactic acid bacteria isolates in Korea in cutaneous hypersensitivity rats. *Korean J. Lab. Ani. Sci.* **19**, 117-119.
 22. Miescher, S. M. and M. Vogel. 2002. Molecular aspects of allergy. *Mol. Aspects Med.* **23**, 413-462.
 23. Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Vakila. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* **64**, 5403-5405.
 24. Mukaida, N. 2000. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Intern. J. Hematol.* **72**, 391-398.
 25. Nilsson, G., J. H. Butterfield, K. Nilsson, and A. Siegbahn. 1994. Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *J. Immunol.* **153**, 3717-3723.
 26. Nomoto, K., S. Miake, S. Hashimoto, T. Yokokura, M. Mutai, M. Yoshikai, and K. Nomoto. 1985. Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by *Lactobacillus casei*. *J. Clin. Lac. Immunol.* **17**, 91-97.
 27. Park, B. J., K. S. Jang, D. H. Kim, H. S. Yook, and M. W. Byun. 2002. Changes of microbiological and physicochemical characteristics of Doenjang prepared with low salt content and gamma irradiation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 79-84.
 28. Park, S. Y., Y. T. Ko, H. K. Jung, J. O. Yang, H. S. Chung, Y. B. Kim, and G. E. Ji. 1996. Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile, and antibiotics. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 304-310.
 29. Petersen, L. J., H. Mosbech, and P. S. Skov. 1996. Allergen-induced histamine release in intact human skin *in vivo* assessed by skin microdialysis technique: characterization of factors influencing histamine releasability. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 672-679.
 30. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 2001. Immunology 6th eds. *Mosby* 323-383.
 31. Seo, U. K., J. I. Lee, J. H. Park, and Y. K. Park. 2008. The Ethylacetate Extract of North Kangwhal (*Ostericum koreanum*) Attenuates the Inflammatory Responses in PMA/A23187-stimulated Mast Cells. *Korean J. Herbol.* **23**, 81-89.
 32. Shida, K., K. Makino, A. Morishita, K. Takamizawa, S. Hachimura, A. Ametani, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa. 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **115**, 278-287.
 33. Shin, K., O. Chae, I. Park, S. Hong, and T. Choe. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysate of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 357-363.
 34. Shore, P. A., A. Burkhalter, and V. H. Cohn. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182-186.
 35. Wang, S., W. L. Chow, and Y. K. Lee. 2008. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J. Gastroenterol.* **14**, 1067-1076.
 36. Wedemeyer J, M. Tsai, and S. J. Galli. 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 624-631.
 37. Youn, M. S. 2006. Effect of *Lactobacillus sakei* probio 65 Kimchi on immune function and atopic dermatitis. M.D. Thesis. *Dankook University, Seoul, Korea*.

초록 : 장류 및 젓갈 분리 균주 추출물의 비만세포 매개 항염증효과

고유진¹ · 김희훈¹ · 김은정¹ · 김진용¹ · 강상동¹ · 손용휘¹ · 최신양² · 차성관² · 김종원¹ · 이정옥¹ · 류충호^{1*}
 (¹경상대학교 응용생명과학부(BK 21 프로그램) · 농업생명과학연구원, ²한국식품개발연구원)

본 연구에서 장류 및 젓갈 유래 균체를 각각 sonication, 100°C에서 30 min, 125°C에서 15 min의 조건으로 추출하여 HMC-1에 처리하였을 때, 이 추출방법에 따른 HMC-1매개 염증반응 억제효과를 조사하였다. 추출방법을 달리하여 추출한 장류 및 젓갈 유래 균체 J80, G147이 HMC-1생존율에 미치는 영향은 대조구 B (Not treated)와 비교하였을 때 86~96%로 유의적 차이를 보이지 않아 장류 및 젓갈 유래 균체에 의한 세포 독성은 나타나지 않았다. 장류 및 젓갈 유래 균체의 모든 전처리구에서 histamine 유리 억제효과를 나타내었으며 특히, 100°C에서 30 min 동안 가열하였을 때 histamine 억제율이 J80에서 28.86%, G147에서 41.14%으로 가장 높게 나타났다. IL-8 분비량은 J80, G147의 모든 전처리구에서 IL-8 분비억제효과가 나타났으며, J80의 경우 100°C, 30 min에서 처리한 구에서 분비량이 0.78 ng/ml로 대조구 B (Not treated)에 비하여 약 28.45%의 분비억제효과로 가장 높게 나타내었다. G147의 경우 125°C, 15 min에서 처리한 구에서 분비량이 0.73 ng/ml로 약 36.52%의 분비억제효과로 가장 높게 나타내었다. IL-6 분비량을 측정한 결과 J80, G147의 모든 실험구에서 IL-6 분비억제효과가 나타났으며, J80에서는 100°C, 30 min한 D구의 분비량이 0.40 ng/ml으로 대조구 B (Not treated)에 비하여 약 38.46%의 분비억제효과로 가장 높았으며, G147 역시 100°C, 30 min 동안 처리한 D구의 분비량이 0.27 ng/ml으로 대조구 B (Not treated)에 비하여 56.45%의 분비억제효과로 가장 높게 나타났다. TNF- α 분비량 역시 IL-6와 마찬가지로 J80, G147에서 대조구 B보다 낮은 분비량으로 TNF- α 분비 억제효과가 나타났으며 J80의 경우 100°C, 30 min 처리한 D의 TNF- α 분비량이 0.052 ng/ml으로 66.67%의 분비억제효과로 가장 높았으며, G147의 경우 sonication을 처리한 C구의 TNF- α 분비량이 0.086 ng/ml으로 41.1%의 분비억제효과로 다른 구에 비해 높은 억제효과를 나타내었다. 위의 결과를 통해서 장류 및 젓갈 유래 균체의 3가지 전처리 방법 중 100°C, 30 min 처리 시 염증 반응 억제 효과가 가장 높을 것으로 예상된다. 결과를 미루어보아 장류를 섭취하는 대표적인 방법인 가열하여 찌개로 조리과정 중 장류 및 젓갈 속의 균체가 열에 가열되면서 염증억제효과 높일 수 있는 가장 좋은 조리 방법으로 사료되며, 이는 대중들이 가장 가깝게 염증반응 억제효과를 볼 수 있는 식품일 것이다. 또한 열장처리과정만을 거친 젓갈을 섭취하는 것보다 열처리과정을 거친 젓갈을 섭취할 경우 염증억제효과를 더 높일 수 있을 것으로 예상된다.