대한예방한의학회지 제16권 제3호(2012년 12월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2012 ; 16(3) : 139-153

유산균을 이용한 대두 발효 추출물이 면역계 활성에 미치는 영향

박병두 · 김혜자*
경기대학교 대체의학대학원

Effects of soybean extracts fermented with *Lactic acid bacteria* on immune system activity

Byung-Doo Park & Hye-Ja Kim*
Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University

Abstract

Objectives : NK cells are spontaneously cytotoxic lymphocytes. These are not only important parts in the first line of defence against bacterial and viral infections of outside, but they may also play a critical role in chronic viral diseases. NK cells kill their targets spontaneously, without the need for prior sensitization and class I MHC restriction by the regulation of cytolytic functions and secretion of a variety of cytokines, such as interleukin-12(IL-12), MCP-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ. In addition, macrophage and NK cells cooperate through the production of cell mediates. These cooperation and modulation are one of major factors to prevent for evading immune surveillance of cancer. Hence, it could be assumed that if any candidate to enhance activities of macrophage and NK cell, it is considered as a potentially useful agents against cancer.

Methods : In our study, to investigate effect of fermented soybean extracts by *Lactic acid bacteria*(SFE, soybean fermented extracts) work on intestinal immune cell to maintain general immune modulating and anti-cancer activity. We analyzed NK cytotoxicity assay and gene expressions of cytokine related with macrophage and NK cell activity.

Results : In vitro experiment, SFE was verified as safety material for cell toxicicty to tumor cell strain without any toxicity of tumor growth inhibition and various cell strain. Effects of macrophage activity stimulating directly by SFE measured induced cytokine. The studies showed that IL-12 production by

· 접수 : 2012년 10월 30일 · 수정접수 : 2012년 12월 12일 · 채택 : 2012년 12월 14일
* 교신저자 : 김혜자, 서울시 서대문구 충정로 3가 3-84 경기대학교 대체의학대학원
전화 : 02-390-5012, 전자우편 : kimhj0517@hanmail.net

stimulation of SFE depended on concentration from 0.16mg/mL to 0.63mg/mL with non toxicity to cell, and it was the best activity at 0.63mg/mL. Besides, the effective concentration of SFE producing TNF-α is similar to IL-12, but it was the best activity at 1.25mg/mL. The level of MCP-1, IL-6 and IFN-γ depended on concentration from 0.16mg/mL to 10mg/mL, IFN-γ showed the best activity at the effective concentration of 0.63mg/mL. With the result of NK cell activity measurement, the spleen cell of mouse injected SFE had 1.5 times higher killing effect than non injected cell.

Conclusions : The result of this studies is that Soybean fermetated extracts(SFE) has possibility to immune aided material for the function not only inhibition of microbial infection to macrophage but also activity of adaption immune and cellular immune system.

Key words : NK cells, cytokines, macrophage, fermented soybean extracts, *Lactic acid bacteria*, SFE(soybean fermented extracts)

I. 서 론

대두(soybean, *Glycine max L*)에는 대두단백, 펩티드, 올리고당, 인지질, 이소플라본, 사포닌, 무기질과 비타민 등이 함유되어 있으며, 사포닌, 플라보노이드 등 생리활성성분이 다량 함유되어 있다.[1, 2)]

대두단백은 혈중 콜레스테롤, 혈중 지단백질(LDL) 농도를 감소시킴으로써 동맥경화증과 심장병 예방효과가 있고, 대두 올리고당은 장내 유용균의 번식을 촉진시키고, 대두 식이섬유소는 콜레스테 배설촉진, 장기능 개선효과, 식 후 혈당 상승과 인슐린 분비억제 등 효과가 있는 것으로 알려져 있다.[3)] 대두 식물성분인 phytochemical류의 다양한 생리활성기능으로 인해 대두제품이 각광받고 있는 데,[4)] 그 중 isoflavon류(genistein, daidzein, glycitein)는 항산화 효과를 지니며, estrogen 수용체를 blocking 함으로써 유방암과 난소암을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며,[5)] 대두 펩티드는 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 면역부활, 혈소판응집저해 등의 활성을 지니고, inositol과 phytate은 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다.[6)] 대두 saponin은 비만억제, 혈중 콜레스테롤의 감소, 항암, HIV 증식억제, 노화방지 등의 작용을 지니며, 그 외 대두성분은 피부암, 방광암, 폐암, 결장암, 췌장암, 식도암, 전립선암, 간암, 위암 등에도 유효함이 연구를 통해 밝혀졌다.[1, 7, 8)]

이러한 생리활성물질이 다량 함유되어 있음에도 불구하고 소화흡수율이 낮다는 문제점이 있어 두유 등의 가공형태나 발효공법 등을 접목시켜 유효성분의 흡수를 증강시키고 있다.[9)] 대두의 소화흡수율 증강을 위한 대두발효에 대한 연구로 대두 발효식품의 항암효과에 관한 연구[10)]와 페놀성분의 항산화 특성,[11)] melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이성에 관한 보고,[5, 12)] 대두 가수분해물과 발효식품의 기능성 펩타이드에 관한 연구[13)] 등이 보고되었다.

최근에는 생균제를 이용한 발효공법이 다양하게 시도되고 있는데, 가장 일반적으로 이용되고 있는 생균제는 유산균(*Lactic acid bacteria*)으로 일반적인 생리활성으로는 유해균의 증식억제효과,[14)] 혈중 콜레스테롤 저하효과,[15)] 설사 및 변비개선 효과,[16)] 장내세균총의 변화,[17, 18, 19)] 면역증진 및 항암효과,[20)] 항돌연변이 효과,[21)] 유당불내증의 완화[22)] 등이 보고되고 있다. 또한 대식세포(macrophage)의 증식을 촉진하여 장내 유해세균에 대한 인지능력, 살균능력 등을 강화시

키고, 면역관련 물질의 분비를 촉진하여 면역증강 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.[23]

유산균 발효를 통해 나온 유산균 생산물질에서 많은 종류의 박테리오신(bacteriocine)이 분리되었는데,[24, 25] 이 물질은 유해균을 억제하는 능력이 탁월하고 장내 면역세포를 활성화시켜 주고 장누수증후군 같은 장내 손상된 점막을 회복시켜 주는 작용과 디톡스 기능을 한다고 보고하였다.[26, 27]

최근에는 기존의 유산균 발효제품이 동물성 배지(medium)인 우유를 기질로 사용함으로써 알러지 유발과 고칼로리로 인한 생활습관병인 대사질환의 증가가 우려되고 있어 식물성 배지로 전환하려는 연구가 학계 및 산업계에서 이루어지고 있다. 이에 본 연구는 대두를 배지로 유산균 발효를 통해 단백질 아미노산의 비율이 높고 올리고당이 풍부하도록 대두 성분의 유효성분을 한층 극대화시키고, 유산균들이 경쟁을 통해 증식 속도와 생존능력을 강화하는 환경을 만들어 주어 생산되는 유효물질의 효율성을 증가시키고자 하였다.

단일균에 의한 단일배양은 본래 균의 작용이 제대로 발휘되지 못하고, 생균을 복용하여도 위산에 의해서 장까지 도달하지 못한다는 결점이 있는 반면,[28] 공서(혼합)배양법은 다종의 유산균을 이용하여 공서시키며 번식, 배양시킨 것으로 배양액 내에서 상대의 균이 강해지면 그 균에 대항적인 작용이 일어나 항생물질을 만듦과 동시에 자기 강화를 도모하는 작용이 일어남으로 균이 상호 강화된다. 강화된 균이 생산하는 물질에는 20종류 이상의 아미노산, 각종의 비타민, 각종의 미네랄, 그리고 미량이지만 핵산물질도 포함되어 있다. 유산균 및 효모의 공서배양에 의한 발효공정은 상호 상승효과를 보이며 더욱 다양한 기능이 있는 물질로 변환된다고 한다.[29]

일본의 경우 1940년대 후반부터 유산균 관련 연구기업들이 유산균 추출물 발효물질을 소개하고 이의 효능에 대한 평가 및 연구를 해오고 있으며, 이 물질에는 발효된 유산균의 균체물질들과 유산균 생산물질들로 이루어져 있다고 한다.[26]

이에 본 연구는 다종의 유산균을 이용한 대두 발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)의 면역계 조절 또는 자극활성을 조사함으로서 이를 면역조절 활성을 지닌 소재로의 응용 가능성을 탐색하고, 나아가 기능성 소재 개발을 위한 기초연구에 그 목적을 두고 있다. 이를 위하여 시료의 세포독성을 포함하여 주로 선천면역계를 구성하는 가장 중요한 세포인 대식세포의 cytokine 유도효과와 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)의 활성화에 미치는 효과를 검토하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 대두 발효 추출물의 제조

실험에 사용된 대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)의 제조공정은 Fig. 1에 제시한 바와 같다. 대두 100 g을 1000 mL 정제수에 수침하여 12시간 정도 불린 후 분쇄하여 110℃에서 30분간 삶는다. 이 후 명주천을 이용하여 압착하여 두유액을 걸러낸 후 배지를 준비한다. 30℃에서 다종의 유산균*(Lactobacillus sp.(L. acidophilus, casei, bulgaricus, paracasei, delbreuckii, gasseri, brevis), Bifidobacterium sp.(B. longum, bifidum, adolescentis), Lactococcuslactis sp.(L. lactis, cremoris, hordniae, garvieae)*을 첨가한 후 배양기에서 pH가 5.5~6.3으로 일정한 조건을 유지시켜 주며 7일간 배양시키는 데, 이 과정을 1차 발효라 칭한다. 7일 경과 후 본 배지에 1차 발효 공정이 거친 발효유를 30분간 골고루 섞어준다. 이 과정을 2차 발효공정이라고 칭한다. 일정 조건하에서 1년 동안 숙성시킨 후 부직포필터로 여과하여 엷은 황색의 투명한 액상을 최종 시료로 준비한다.

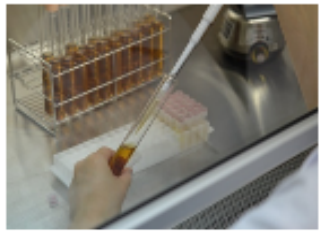
Step	Processing	Diagram
Preparation	Soybean selecting, washing, immersing for 12hrs, grinding, boiling at 110℃ for 30 min & separating Filtrating with silk cloth	
Primary Fermentation	Fermented each lactic acid in soybean-milk at 30℃ for 7days	
Secondary Fermentation	Main fermenting mix with the primary ferments at 30℃ for 30 min.	
Aging	Aging for one year	
Filtering Extracts	Extract with felt filter	

Fig. 1. Processing of soybean fermented extracts(SFE)

2. 실험동물

실험동물은 생후 6~8주령의 자성 Balb/c 마우스를 (주)오리엔트바이오(Sung-nam, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 구입 후 최소 1~2주의 순화기간을 두고 체중 22g ± 1g의 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 22 ± 2℃, 상대습도 50 ± 20%, 12시간 간격(명 ; 오전 7시~오후 7시)으로 명암이 조절되는 조건에 사육하였다. 사육실의 조도는 150-300 lux를 유지하였고, 사육 상자는 1주 당 2회 교환 및 세척하였다. 음수는 자외선 멸균 및 여과된 정제수를 250 mL polycarbonate 급수병을 이용하여 자유급여 하였고, 사료(실험동물용 쥐사료, 38057, 퓨리나코리아) 또한 자유섭취토록 하였다.

3. 시약 및 기기

대식세포(macrophage)의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium (EMEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA) 사에서 구입하였다.

세포배양을 위한 CO_2 Incubator는 Thermo Fisher Scientific사(Waltham, USA)의 제품을 이용하였고, 배양 및 기타 실험에 사용하는 culture plate, well plate 등은 SPL(Pochun, Korea), 원심분리기(Mega 17R)는 Hanil(Inchon, Korea)사의 제품을 각각 사용하였다.

세포독성 시험을 위한 cell counting kit은 EZ-Cytox(Daeil BF. Seoul, Korea)를 사용하였고, cytokine 측정을 위한 ELISA kit은 BD(SF, USA), Reader(Infinite F50)기는 TECAN(Austria)사의 제품을 사용하였다.

4. 시료의 세포독성 실험

본 연구에 사용한 mouse lymphoma인 YAC-1 lymphoma와 Colon 26-M3.1 carcinoma 암세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 시료의 세포독성 효과는 WST-1을 이용하는 cell counting kit(EZ-Cytox, Daeil Lab., Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Macrophage로부터 생산된 Cytokine의 측정

Balb/c 마우스에 3% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 3일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 mL을 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells, PEC)를 수집하였다. 수획한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10^6 cells/mL의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후 적정농도로 조정된 LBS를 첨가하고 24시간 동안 배양한 후, macrophage의 배양 상등액을 회수하였고, 배양 상등액에 유도 분비된 TNF-α, IL-6 및 IL-12 등의 cytokine을 측정하였다.

ELISA 측정은 96-well ELISA plate에 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)를 이용하여 각 cytokine에 대한 항체(250배 희석액)를 100 μL씩 분주 후 4℃에서 16시간 동안 coating을 시켰다. 각 well은 washing buffer (PBS-0.05% Tween 20, PBS-T)로 3회 세척 후 3% bovine serum albumin(BSA)으로 blocking (200 μL/well) 시켰다. Blocking 완료 후, ELISA plate를 washing buffer를 이용하여 2회 washing 후 macrophage 배양 상등액을 각각 100 μL씩 분주하고 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Washing

buffer를 이용하여 5회 washing 후, 각 cytokine에 대한 coating 항체와 항원결정기를 달리하는 antibody-biotin 및 enzyme horseradish peroxidase(HRP)-avidin 용액을 첨가하고 2시간 배양함으로서 항원-항체 반응을 유도하였다. 배양 완료 후 ELISA plate는 washing buffer를 이용하여 5회 세척하였다. Macrophage 배양 상등액의 생산된 각 cytokine의 양을 측정을 위하여 기질로서 3,3', 5,5'-tetramethyl-benzidine(TMB)을 넣고 30분 발색 유발한 후, 2M H_2SO_4로 반응을 정지시키고, ELISA Reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생산된 각 cytokine의 농도는 표준물질을 첨가하여 분석한 표준곡선에 각 시료의 optical density(OD) 측정치를 대입함으로서 조사하였다.

Cytokine 생산을 위한 양성대조군으로는 lipopolysaccharide(LPS, 1 ㎍/mL)를 이용하였다.

6. NK Cell의 활성화 실험

자연살해세포(natural killer cell, NK cell)의 세포독성능력을 보는 방법으로는 NK cell이 암세포의 일종인 YAC-1 세포(NK-Sensitive cell line)를 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 lactic dehydrogenase(LDH)를 측정하는 방법(modified LDH release assay)을 이용하였다.

Balb/c 마우스에 2 ㎍의 SFE를 정맥주사하고 1일 후에 마우스의 비장을 멸균적으로 취하여 비장세포(Effector cell, E)를 준비하였다. U-Bottomed 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포와 NK-Sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포(Target cell, T)를 effector-to-target(E/T) 비율이 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, 12.5 : 1이 되도록 조정하여 6시간 동안 공동 배양하였다. 배양종료 후에 원심분리를 통하여 배양 상등액을 취한 후 살해된 암세포가 유리한 LDH의 양을 LDH 분석 kit을 이용하였는데, 우선 LDH substrate mixture를 100 μL 첨가하고 빛을 차단한 상태의 실온에서 30분간 반응시킨 후, stoptralution인 1N HCl 50 μL로 반응을 중지시켜 450 nm의 흡광도에서 제조사의 지침에 따라 측정하였다. Spontaneous LDH 측정을 위한 well에는 배양액 만을 첨가하고 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH의 최대치를 알기 위한 maximum LDH well에는 trition X-100 용액을 첨가하여 세포가 완전히 lysis 되도록 배양하였다. 독성의 백분율(percent of cytotocity)은 각각의 배양액으로부터 유리된 LDH로 다음과 같은 공식에 의하여 구하였다. 시료처리군의 NK-Cell의 암세포 살해활성은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Percent of cytotoxicity (\%)} = \frac{LDH_{experimental} - LDH_{effector\ cells} - LDH_{spontaneous}}{LDH_{maximal} - LDH_{spontaneous}} \times 100$$

LDHexperimental : Resulting from co-culture of E and T
LDHeffector cells : Resulting from separately cultured E
LDHsponteneous : Resulting from separate cultures of YAC-1 cells(low control)
LDHmaximal : Resulting from total lysis of YAC-1 cells by triton X-100(high control)

7. 통계 처리

본 연구에서 얻어진 모든 측정치는 Mean ± SEM으로 나타내었고, 통계적 유의성이 필요한 경우 Graphpad Prism Ver. 4.03(Graphpad Software, Inc. CA, USA)을 이용하여 student's t-test로 평균차이에 대한 사후 검정을 하였으며, 통계적 유의성은 5% 수준에서 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 세포독성 측정

대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)의 종양 세포주에 대한 세포 독성효과를 in

vitro에서 조사한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 제시한 바와 같다. SFE의 암세포 증식을 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 값을 측정한 결과는 YAC-1 lymphoma의 경우는 약 11 mg/mL로 나타났고, Colon 26-M3.1 carcinoma의 경우는 약 8.9 mg/mL의 결과를 보여, 두 세포 모두 실제로 약 2 mg/mL 이하의 종양세포주의 증식에 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 SFE가 여러가지 세포주에 대하여 거의 세포독성이 없는 매우 안전한 물질로 사료된다.

기존 연구 논문들에서 면역강화(NK cell proliferation)와 항암작용(Yac-1 tumor cells death)을 연구한 자료들을 참고해보면 천연추출물들 중에 민간에서 항암효과가 높은 것으로 알려진 여러 추출물을 70%메탄올 추출하여 10 μg/mL 농도로 Yac-1 tumor cell에 배양하여 세포독성을 2day에 비교한 결과, 버섯추출물 48.3±1.6%, 스위트바질 58.8±2.0%, 겨우살이 70.4±1.6% 수치가 관찰된다.[30]

이상의 결과, 대두 발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)은 두개의 종양 세포주에서 세포독성을 과도히 유발시키지 않았으므

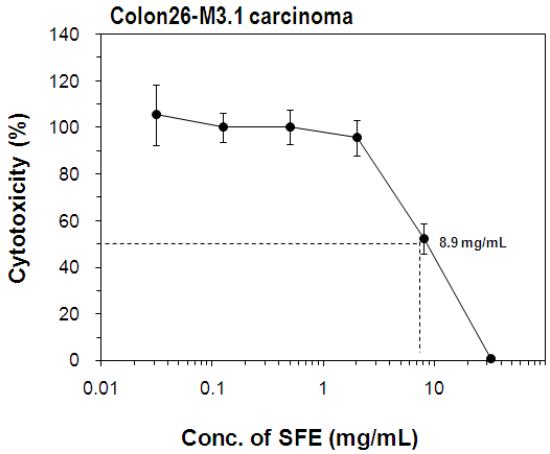


Fig 2. Cytotoxicity of SFE in YAC-1 lymphoma

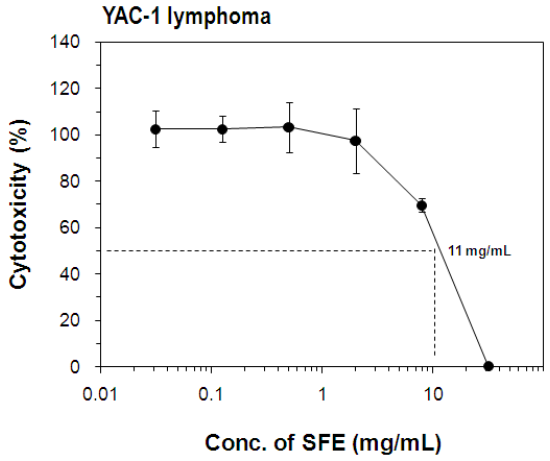


Fig 3. Cytotoxicity of SFE in Colon26-M3.1 carcinoma

로 향후 in vivo 독성효과와 나아가 그 작용기작을 규명하고 검토함으로서 대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)의 면역질환과 연관된 기능성 소재로 사용할 수 있는 유효농도를 연구할 필요가 있는 것으로 사료된다.

2. Macrophage로부터 Cytokine 유도 효과

대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)은 유산균의 세포벽 혹은 대두의 단백질 성분으로서 추출된 성분인데 이러한 성분은 일반적으로 세포독성 효과를 보여주지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 세포독성이 없는 농도에서 면역세포에 미치는 효과를 검증하였다.

활성화된 macrophage는 스스로 여러 가지 cytokine을 생산함으로서 이후의 면역반응을 유도한다는 것은 잘 알려진 사실이다.[31] 본 실험은 대두발효 추출물(SFE)이 macrophage를 직접 자극하여 활성화시키는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 실시하였으며, 그 지표로서 시료로 자극된 macrophage의 배양 상등액에 생산된 IL-12, TNF-α, MCP-1, IL-6 및 IFN-γ의 양을 측정하였다. 그 결과 Table 1과 Fig. 4~8에 제시한 바와 같이 SFE는 macrophage로부터 면역반응을 조절하는 여러 cytokine을 생산하는 활성이 있었다. SFE의 자극에 의한 IL-12의 생산은 세포독성이 없는 농도인 약 0.16 mg/mL부터 약 10.00 mg/mL까지의 유효농도 수준을 보였고, 최고 활성농도인 0.63 mg/mL의 농도까지 농도의존적인 활성을 보였다. Macrophage 혹은 수지상세포(dendritic cell, DC)가 생산하는 IL-12는 NK Cell 및 Th1 세포에 작용하여 IFN-γ의 생산을 유도하게 됨으로서 세포성 면역의 유도에서 선천적인 NK Cell 및 T-세포를 항원에 대항하게 하는 effector form으로 분화하게 하는 작용이 있음으로 주로 Th1 성향의 세포성 면역계를 활성화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있다.[32] 따라서 macrophage로부터 IL-12의 생산능력은 항원에 대항하는 선천 및 획득면역계의 활성화에 중요한 요소로 작용되는 cytokine으로 간주되고 있다. 따라서 대두발효 추출물(Soybean fermented extracts, SFE)는 항원제시기능이 있는 탐식세포를 직접 자극함으로서 NK Cell 세포증의 선천면역계를 구성하는 세포 및 항원제시세포의 성숙과 이후 항원 특이적인 면역증강효과를 유도할 수 있는 기능이 있을 것으로 사료된다.

한편, TNF-α의 유도양식의 결과는 TNF를 생산하는 SFE의 유효 범위는 IL-12와 유사하여 약 0.16 mg/mL~10 mg/mL의 농도 경향을 보였고, 최고활성을 유도하는 농도는 약 1.25 mg/mL을 보였다.

TNF-α는 염증의 반응 외에도 미성숙 DC(dendritic cell)의 표면에 MHC 혹은 보조자극인자(co-stimulatory molecule)의 발현을 촉진함으로 성숙된 형태의 DC로 전환시키는 작용이 있어 면역반응의 유도에 있어 필수적인 요소이다.

결국 대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)은 복강세포의 TNF-α의 생산성을 증진시킴으로서 미성숙 DC(dendritic cell)를 성숙시키게 하고, 결과적으로 항원에 대한 항원 제시능을 획득한 성숙 DC는 IL-12를 생산함으로서 항원특이적인 T-세포의 활성화가 유도되는 것으로 판단된다.

염증부위로 면역세포인 백혈구와 혈관내피세포의 반응성을 높여주어, 면역세포가 귀소하는데 도움을 주는 인자인 MCP-1 또한 0.16mg/mL~10mg/mL 농도에서 효과를 나타내었고, 최고활성을 유도하는 농도는 0.63 mg/mL을 보였다. 염증매개 인자인 IL-6와 IL-12의 자극에 의해 생산되는 IFN-γ 또한 유사 유효농도 범위인 0.63 mg/mL~1.25 mg/mL에서 유효 효과를 나타내었고, 0.63 mg/mL에서 최고 활성효과를 확인 하였다.

대두발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)에 대한 macrophage에서의 cytokine유도 효과확인 결과 SFE의 유효 최적 농도는 0.63 mg/

Table 1. Cytokines of SFE on the production from macrophages

Treat.	Conc. (mg/ml)	Cytokines (pg/mL)				
		IL-12	TNF-α	MCP-1	IL-6	IFN-γ
Media	-	4.0 ± 14.6	16.7 ± 6.7	164.9 ± 34.1	7.0 ± 6.7	23.7 ± 8.9
LPS[1)]	0.05	210.8 ± 35.1	1429.8 ± 48.7	4117.5 ± 421.5	936.2 ± 48.7	372.8 ± 65.6
SFE[2)]	0.16	118.7 ± 17.0	173.0 ± 9.4	547.1 ± 142.2	91.9 ± 9.4	52.7 ± 46.5
	0.31	281.1 ± 31.9	368.3 ± 34.2	1585.1 ± 187.7	593.1 ± 34.2	235.4 ± 28.4
	0.63	461.6 ± 42.5**	1061.4 ± 20.5	3154.0 ± 210.5	824.1 ± 20.5	762.8 ± 19.3**
	1.25	250.3 ± 20.2	1389.6 ± 22.2	2860.3 ± 250.3	784.2 ± 22.2	698.3 ± 24.8
	2.5	133.7 ± 21.3	1147.4 ± 44.5	1564.9 ± 273.1	308.9 ± 44.5	104.8 ± 88.8
	10.0	62.3 ± 33.0	421.9 ± 16.2	261.5 ± 56.9	91.9 ± 16.2	19.8 ± 1.2

[1)]LPS : lipopolysaccharide(1 μg/mL), [2)]SFE : soybean fermented extracts
Values are Mean ± SD
Significantly different from each group. t-test ; * *P<0.05*, ** *P<0.01*

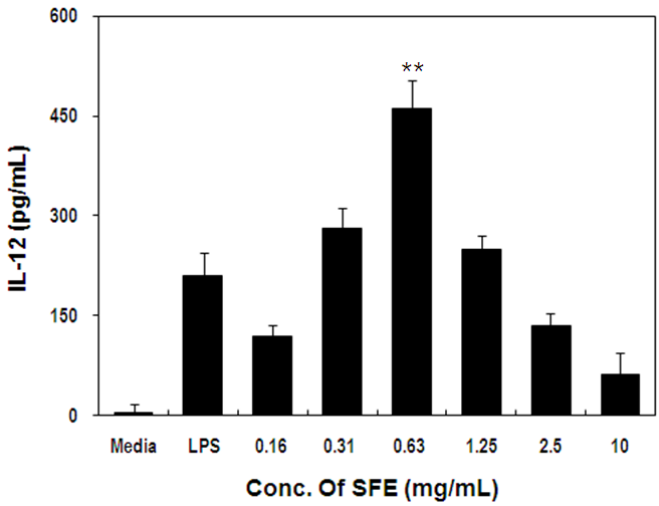


Fig. 4. IL-12 activity of SFE concentration

Values are Mean ± SD
Significantly different from each group. t-test ; * *P<0.05*, ** *P<0.01*

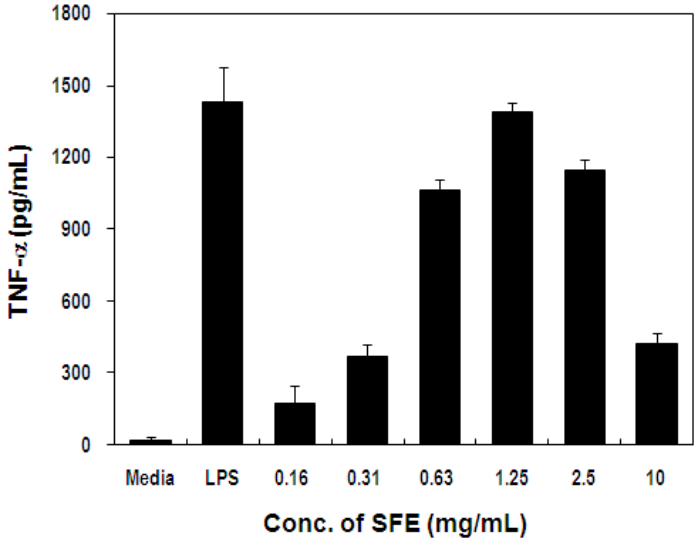


Fig. 5. TNF-α activity of SFE concentration

Values are Mean ± SD

Significantly different from each group. t-test ; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

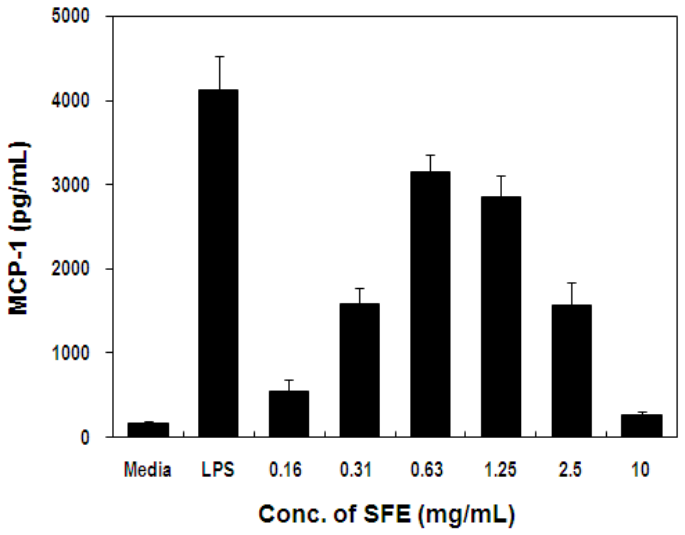


Fig. 6. MCP-1 activity of SFE concentration

Values are Mean ± SD

Significantly different from each group. t-test ; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

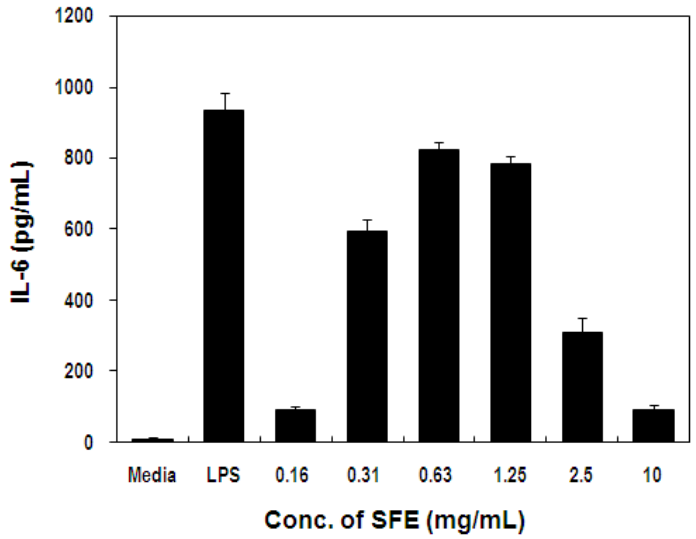


Fig. 7. IL-6 activity of SFE concentration

Values are Mean ± SD

Significantly different from each group. t-test ; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

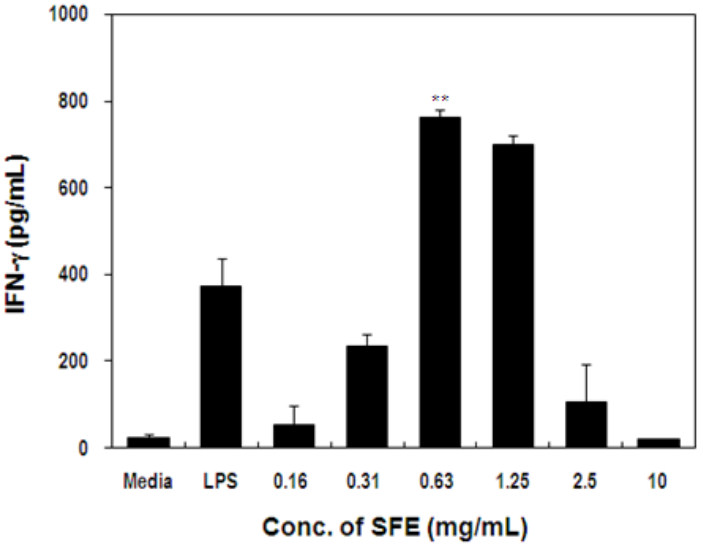


Fig. 8. IFN-γ activity of SFE concentration

Values are Mean ± SD

Significantly different from each group. t-test; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

mL~1.25 mg/mL 수준에서 확인 되었다.

3. NK Cell의 활성화

NK(natural killer cell)세포는 주로 혈액에 존재하는 세포로서 바이러스 감염세포 혹은 암세포 등의 비자기(non-self) 세포를 살해하는 세포성 면역활성을 가지고 있으며,[33, 34] macrophage가 생산하는 cytokine 중의 하나인 IL-12에 의하여 종양세포를 살해하는 능력을 획득하게 된다.[35] 동시에 활성화된 NK 세포는 IFN-γ를 생산함으로서 macrophage를 활성화시킴으로 종양에 대하여 대항하게 된다. 따라서 물질에 의한 NK 세포 활성화는 감염의 초기 뿐 아니라 후기의 반응에도 매우 중요한 역할을 하게 된다.[36] SFE 투여에 의한 NK 세포의 종양세포 독성은 시료를 투여한 마우스의 비장세포와 NK-Sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포를 동시에 배양한 후 YAC-1의 살해정도를 측정하였다. NK 세포의 독성 측정을 위한 SFE의 투여용량은 in vitro에서 macrophage를 자극하는 농도를 고려하여 2㎍으로 정맥주사하였다. Table 2와 Fig. 9의 결과에 나타낸 바와 같이, 대두 발효 추출물(soybean fermented extracts, SFE)을 정맥주사하고 1일이 경과된 마우스의 비장세포는 대조군의 정상 마우스 비장세포에 비하여 약 1.5배 정도 YAC-1의 살해효과를 증강시키는 결과를 보였다.

Ⅳ. 결 론

본 연구는 대두발효 추출물(Soybean fermented extracts, SFE)이 면역계 활성에 미치는 영향에 관한 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대두발효 추출물(Soybean fermented extracts, SFE)의 종양 세포주에 대한 세포 독성 효과를 in vitro에서 조사한 결과 SFE의 암세포 증식억제 및 여러 세포주에 대하여 독성이 없는 안전한 물질로 검증되었다.

2. 대두발효 추출물(Soybean fermented extracts, SFE)이 대식세포(macrophage)를 직접 자극하여 활성화시키는 효과를 각각의 cytokine 유도효과를 측정 확인한 결과, SFE 자극에 의한 IL-12의 생산은 세포독성이 없는 농도인 약 0.16 mg/mL부터 0.63 mg/mL까지 농도 의존적인 활성을 보였으며, 0.63 mg/mL의 유효농도에서 최고의 활성을 나타내었다. 한편, TNF-α의 유도양식 결과 TNF를 생산하는 SFE의 농도는 IL-12와 유사하나 1.25 mg/mL에서 최고활성을 나타내었다.

3. 또한 MCP-1, IL-6 및 IFN-γ에서도 0.16 mg/mL~10 mg/mL까지 농도 의존적인 활성을 보였으며, IFN-γ의 경우 0.63 mg/mL의 유효농도에서 최고활성을 보였다.

4. NK cell의 활성화를 측정한 결과 SFE를 투여한 마우스의 비장세포는 처리하지 않은 정상 마

Table 2. Effect of SFE on the enhancement of NK cell activity

E/T Ratio[1)]	Normal	SFE
100 : 1	5.64 ± 0.22	8.60 ± 0.27**
50 : 1	3.28 ± 0.43	5.36 ± 0.08
25 : 1	0.85 ± 0.44	2.04 ± 0.13

[1)]E/T Ratrio : Effector cell/Target cell(YAC-1) ratio
Values are Mean ± SD
Significantly different from each group. t-test ; * *P<0.05*, ** *P<0.01*

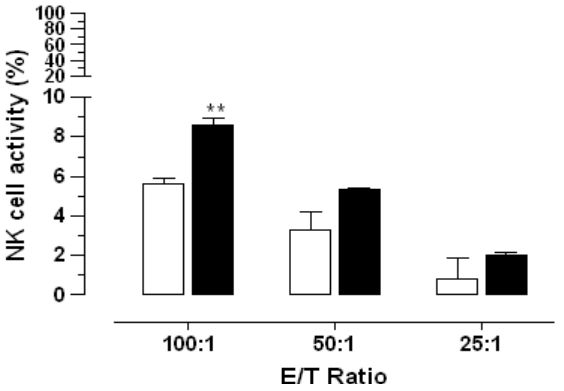


Fig. 9. Effect of SFE on the enhancement of NK cell activity(NK activity was determined by a 6 hr incubation assay using by LDH kit).
Values are Mean ± SD
Significantly different from each group. t-test ; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

우스의 비장세포에 비해 약 1.5배의 YAC-1 살해 효과를 증강시켰다.

본 연구 결과, 대두발효 추출물(Soybean fermented extracts, SFE)은 면역반응을 시작하는 대식세포의 미생물 감염을 억제하는 중요한 기능뿐 아니라 적응 면역계 및 세포성 면역계의 활성화 기능이 있어 면역강화 물질로의 활용가치가 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. 최영선. 대두유의 영양학적평가. 한국콩연구회지. 1996 ; 13(1) : 7-17
2. 김미경. 건강기능식품. 교문사. 2010
3. Lee MJ, Son CY, Kim JH. Relation between Health Examination Outcome and Intake of Soy Food and Isoflavon among Adult Male in Seoul. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 2008 ; 41 : 254-263
4. Caragy AB. Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technology*. 1992 ; 46(4) : 655.
5. Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Kim SI, Chung KS. Inhibition effect of soy bean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 1996 ; 24(4) : 525-528
6. Sung MK. The anticarcinogenic properties of soybeans. *Korean Soybean Soc.* 1996 ; 13 : 19-31
7. 김성은. 대두 saponin의 돌연변이 억제능 및 대장암 세포 성장저해에 관한 연구. 숙명여자대학교 석사학위논문. 1998.
8. 손동화. 두유와 우유의 영양 및 생리활성 성분. 한국콩연구회지. 1997 ; 14(1) : 66-77
9. 최소영, 김윤경, 윤선. 우유와 두유에서 *Bifidobcterium longum* ATCC 15707의 성장 촉진인자 및 α,β-Galactosidase의 활성에 관한 연구. 한국식품과학회지. 1996 ; 28(5) : 987-993.
10. Chung CK. Carcinogenic effect of korean traditional foods. *J. Kor. Food Cul.* Ins, 1995 ; 289-301
11. Lee JS, Cheigh HS. Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from

soybean fermented food. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 1997 ; 26(3) : 376-382
12. Cheigh HS, Lee CY. Antioxidative and antimutagenic charateristics of melanoidin related products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 1993 ; 22(2) : 246-252
13. Lee HJ. Health functional peptides from soybean hydrolysate and fermented food. Konkuk univ. anniversary international seminar of 50th opening a school : Functional and physical activity of traditional soybean paste. 1996. p.61-72
14. Silva M, Jacobus NV, Denke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antomicrob Agents Chemther*, 1987 ; 31 : 1231
15. 이용욱, 김종규, 노우섭. 유산균 발효유 장기 음용 시 혈중콜레스테롤에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지. 1999 ; 14(1) : 122-128
16. Lee YK, Kim DH, Han MJ. Antidiarrheal, Anticositive and Antimutagenic Effects of *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 and *B. infantis* K-525 from Korean in Experimental Animals. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 1999 ; 31 : 547-552
17. Havenaar R, Huis in't Veld J. H.J. Probiotics : a general view. In : The *lactic acid bacteria* in health and disease(Wood B., ed.), *Elsevier Applied Science, London, UK.* 2008. p.209-224
18. Hove H, Nordgaard-Andersen I, Mortensen PB. Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am J Nutr.* 1994 ; 59(1) : 74-79
19. Quigley EM, Vandeplassche L, Kerstens R, Ausma J. Clinical trial : the efficacy, impact on quality of life, and safety and tolerability of pricalopride in severe chronic constipation-a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 ; 29 : 315-28
20. Sekine KM, Yoida T, Saito M, Kuboyama M, kawashima T, Hashimoto Y. A new morpologically characterized cell wall preparation(whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infants* with a higher efficacy on the repression of an established tumor in mice ,Cancer Res. 1985 ; 4 : 1300
21. 이영경, 김동현, 한명주. 한국형유산균인 *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 및 B. infanctis K-525 균주의 완하, 항사하 및 항돌연변이효과. 한국식품과학회지. 1999 ; 31(2) : 547-552
22. Rial D. Rolfe. 조광근역. 유산균 Probiotics와 위장 건강(Probiotics and Gastrointestinal Health). *대한보건협회학술지* 2001 ; 27(3) : 181-192
23. 김혜자, 문기원. 발효식이요법이 장내세균총 조절 및 자가면역질환에 미치는 영향. *J. Complement. Altern. Med.* Sci. 2011 ; 1(1) : 25-40
24. Choi HJ. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis sub sp. lactis* A164 isolated from Kimchi. *Jounal of applied Microbiology.* 2000. 88 : 563-572
25. Hata T, Tanaka R, Ohmomo S. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int. J. Food Microbiol.* 2010 ; 137(1) : 94-99
26. Fujino T. Antitumor testing in mice with DMH-induced carcinogenesis of colon. *Greek medical journal oncology.* 2001 ; 8 : 1073-1078
27. Abo Toru. Immune response to LAB ex-

tract fementation in intestinal tract in mice. *European medical jounal*. 2006 ; 102 : 74-78

28. Boeryd B, Hallgren B. The fat composition of a mouse diet modifies the effects of levamisol on growth and spread of a murine tumor. *Acta Pathol Mircrobiol Immunol Scand* [A] 1985 ; 93 : 99-103
29. Sakagi R. Lactic acid bacteria extract fermentation research data and clinical data collection, GA book. 2009. 1 : 6-12
30. Kim JH. Stimulating effect of geraniol on the cytotixic activity of NK cells against Yac-1 tumor cells. *Sangmyung University*. 2003
31. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol*. 1989 ; 54 : 1-13
32. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 ; 13 : 816-25
33. Li HF, Waisman T, Maimon Y, Shakjar K, Rosenne L, Sueviell BF. The effects of chinese herb formula, anticancer number one(ACNO) on NK cell activity and tumor metastasis in rat. *Intern. Immunopham*. 2001; 29: 1157
34. Karin C, Maritha MS, Fabienne C, Jacques D. NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation. *Toxicology* 2003 ; 185 : 241
35. Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulator of allergic inflammation and innate immunity. *Clin. Exp. Med*. 2005 ; 5 : 39-43
36. Ishibashi KI, MIura NN, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-β-D-glucan and production of tumor necrosis factor by macrophage in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2001 ; 65 : 1993-2000