

전통발효유 타락의 면역세포 증식 및 멜라닌 생성에의 효과

- 연구노트 -

김소영¹ · 최유미¹ · 이희라¹ · 박지수¹ · 한영숙¹ · 고성희² · 장성식³ · 김수아³ · 심재현³ · 윤현근¹

¹성신여자대학교 식품영양학과

²성신여자대학교 문화산업대학원

³한국야쿠르트 중앙연구소

Effects of Tarak, Korean Traditional Fermented Milk, on Proliferation of Immune Cells and Melanin Biosynthesis

Soyoung Kim¹, Yumi Choi¹, Heera Lee¹, Jisoo Park¹, Young-Sook Han¹, Seong-Hee Ko², Sung-Sik Jang³, Soo-A Kim³, Jae-Hun Shim³, and Hyungeun Yoon¹

¹Department of Food and Nutrition and

²The Graduate School of Cultural Industry, Sungshin Women's University

³R&BD Center, Korea Yakult Ltd.

ABSTRACT Tarak is a Korean traditional fermented milk product that is fermented by adding rice wine to milk. Tarak was produced with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* M13-65-3 isolated from rice wine, and its effects on immune cell proliferation and melanin biosynthesis were investigated. Tarak extract significantly increased proliferation of T lymphocyte Jurkat clone E6-1 cells at concentrations from 10 to 100 µg/mL. Tarak inhibited activities of tyrosinase and α-melanocyte-stimulating hormone-induced melanin biosynthesis in mouse skin B16-F10 cells at a concentration of 100 µg/mL. These results suggest that tarak might have functionalities for enhancing the immune system by increasing immune cell proliferation and regulating melanin biosynthesis.

Key words: tarak, *Lactobacillus*, Jurkat, tyrosinase, melanin

서 론

발효유는 우유 등의 유즙을 유산균으로 발효한 식품으로서 영양소와 더불어 프로바이오틱스(probiotics) 및 생리활성 물질을 포함하고 있는 유제품이다. 프로바이오틱스는 숙주의 체내에서 건강을 증진시키는 효과를 나타내는 살아있는 균으로 정의할 수 있다. 발효유에 포함되어 있는 프로바이오틱스와 유기산, 펩티드 등의 생리활성 물질은 장내 균총 개선 기능, 면역계 활성 증진 기능, 혈중 지질 개선 효과 등의 건강 증진 가능성을 나타내는 것으로 알려져 있다(1-3). 발효유에 함유되어 있는 프로바이오틱스는 항균성을 보유한 lactic acid를 생산하여 발효유의 저장성을 높이고, acetaldehyde와 같은 풍미 성분들과 다당류, 아미노산, 비타민 등을 생산하여 발효유의 상품 가치를 높이는 역할을 한다. 또한 프로바이오틱스는 설사의 예방 및 치료, 유당불내증의 완화, 면역 증강, 혈압 강하, 혈중 콜레스테롤 저하, 골다공증 방지, 항암작용 등의 건강 증진 가능성을 나타낸다(3).

상업적으로는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* 등의 젖산균이 프로바이오틱스로 이용되고 있다(4).

타락은 막걸리나 청주를 종균으로 이용하여 우유를 발효시켜서 제조한 발효유이다(5). 타락은 조선 전기에 만들어진 조리서인 수운잡방에 그 제조법이 설명되어 있고 전통주를 사용한다는 점에서 우리나라 고유의 전통 발효유라고 할 수 있다. 전통적인 방법으로 제조한 타락은 발효유로서 알려져 있는 건강 기능성을 보유하고 있을 가능성이 크지만 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 시판되는 막걸리에서 분리한 종균을 사용하여 제조한 타락의 면역 증진 기능성과 멜라닌 색소 생성 억제 기능성 보유 여부를 확인하고 그 기전을 밝히고자 하는 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

균주 및 시약

인간 T cell leukemia 세포인 Jurkat clone E6-1 세포와 쥐 피부 세포인 B16-F10 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. Jurkat clone E6-1 세포는 RPMI 1640 배지(10% fetal bovine serum, 1% antibiotics 포함)

Received 14 July 2015; Accepted 3 October 2015

Corresponding author: Hyungeun Yoon, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Korea
E-mail: ywise@sungshin.ac.kr, Phone: +82-2-920-7682

를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고 B16-F10 세포는 DMEM 배지(10% fetal bovine serum, 1% antibiotics 포함)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 시판되는 막걸리로부터 유산균주를 분리하고 동정하여 타락을 제조하는 데 사용하였다(*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* M13-65-3). MTT, mushroom tyrosinase, L-DOPA, arbutin, α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

타락 및 타락 추출물 제조

시판 막걸리에서 분리한 균주(*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* M13-65-3)를 이용하여 다음의 방법으로 타락을 제조하였다. 원유(66.7%(w/w)), 탈지분유(3.3%(w/w)), 정제수(30%(w/w))를 혼합한 뒤 130°C에서 2초 동안 살균하고 냉각한 원료에 MRS 배지에서 현탁 배양한 균주를 1×10⁶ CFU/mL 농도로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 정지 배양해서 타락을 제조하였다. 제조된 타락을 동결 건조하여 타락 추출물을 획득하고 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 또한 시판되는 우유를 동결 건조하여 우유 추출물을 얻어서 -20°C에 보관하였다.

면역세포 증식도 측정

Jurkat clone E6-1 세포의 증식에 타락이 미치는 영향을 MTT 방법을 이용하여 분석하였다(6). Jurkat clone E6-1 세포를 96-well plate에서 1×10⁵ cell/mL의 농도로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 RPMI1640 배지로 희석한 타락 추출물을 농도별(10, 50, 100 µg/mL)로 96시간 동안 처리하였다. 이후 배지를 제거하고 MTT(0.5 mg/mL) 용액으로 4시간 동안 처리한 뒤 acid-isopropanol (0.04 N HCl 포함 isopropanol) 용액을 첨가하여 발색 결정을 용해하고 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(BIOLOG MicroStation plate reader, Biolog, Hayward, CA, USA). 우유 추출물이 면역세포 증식도에 미치는 영향을 측정하여 타락 추출물과 비교하였다.

Tyrosinase 역가 측정

기존의 방법을 변형하여 mushroom tyrosinase의 역가에 타락이 미치는 영향을 측정하였다(7). 5 mM L-DOPA 0.2 mL에 타락 추출물(100 µg/mL) 0.5 mL를 첨가하고 mushroom tyrosinase(200 unit/mL) 0.1 mL를 혼합한 후 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이후에 490 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하고 tyrosinase inhibition rate를 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S: 시험시료의 흡광도

B: 시험시료와 tyrosinase 대신 용매를 사용한 것의 흡광도

C: 시험시료 대신 용매를 사용한 것의 흡광도

타락 추출물과 비교하기 위하여 tyrosinase의 저해제인 arbutin(100 µg/mL)과 우유 추출물(100 µg/mL)이 tyrosinase 역가에 미치는 영향을 측정하였다.

멜라닌 생성 측정

B16-F10 세포를 96-well plate에서 6×10⁴ cell/mL의 농도로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후 배지를 제거하고 α -MSH(2 µM)와 타락 추출물(100 µg/mL)을 처리하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 96-well plate를 원심분리(130×g, 4°C, 5 min)하고 상등액인 배지를 제거한 후 1 N NaOH를 첨가하여 생성되어 있는 멜라닌을 용해하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(8). 타락 추출물 대신 우유 추출물을 첨가하여 멜라닌 생성에 미치는 영향을 측정해서 타락 추출물의 결과와 비교하였다.

통계분석

동일한 실험을 3회 반복하였고 결과는 평균±표준편차의 형태로 나타냈다. 처리군 간에 ANOVA를 실시하여 결과를 비교하였고 다중 비교는 Duncan's multiple range test를 이용하여 P<0.05 수준에서 실행하였다(SPSS ver. 19, IBM, Armonk, NY, USA).

결과 및 고찰

Jurkat clone E6-1 세포는 인간 T cell leukemia 세포로서 primary T 세포의 면역 증진 기능을 보유하고 있으며 면역 조절 기전의 모델 세포로 이용된다(9,10). *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* M13-65-3 균주를 이용하여 제조한 타락 추출물을 10, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 첨가하고 96시간 동안 배양한 Jurkat clone E6-1 세포는 대조군에 비하여 세포 증식도가 유의하게 증가하였다(P<0.05)(Fig. 1). 우유 추출물은 Jurkat clone E6-1 세포의 증식도에 영향을 주지 않았다. 프로바이오틱스나 프로바이오틱스가 포함되어 있는 유제품 중에는 면역력을 강화하는 기능성을 보유하고 있는 것이 있다(11,12). 이러한 면역력 강화 기능성은 프로바이오틱스에 의하여 대식세포 활성화, 사이토카인 생산 증가, 자연살해세포 활성 증가 등이 유도되기 때문이다. 또한 프로바이오틱스의 작용에 의하여 영양소의 흡수도가 증가하여 세포나 개체에 영양소 공급이 원활하게 이루어진 결과이다(3). 본 연구에서는 전통 발효유인 타락에 의하여 T lymphocyte인 Jurkat 세포의 증식도가 증대된 것을 확인하였다.

멜라닌은 자외선 등의 외부 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 하는 물질로 피부의 색소생성세포에서 합성된다. 색소생성세포가 색소세포자극호르몬(melanocyte stimulating hormone, MSH)의 영향으로 tyrosinase를 합성하고

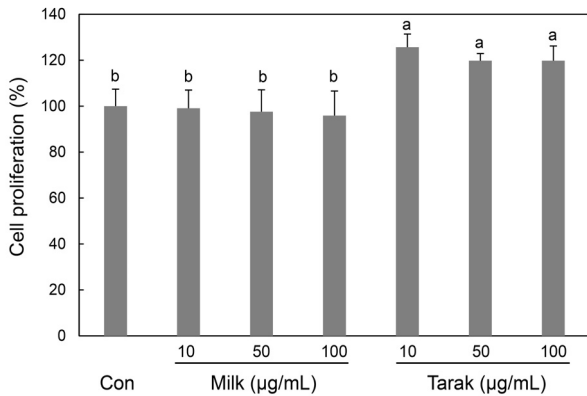


Fig. 1. Effects of tarak on Jurkat cell proliferation (mean±SD). Jurkat cells were incubated with tarak for 96 h and cell proliferations were measured with MTT assay. Cells were incubated with medium (con), milk extract (milk), or tarak extract (tarak). Bars with different letters (a,b) indicate significant differences ($P<0.05$).

tyrosinase는 tyrosine을 산화하여 최종적으로 멜라닌이 합성된다. 멜라닌이 과도하게 합성될 경우에는 기미, 주근깨, 피부암 등의 질환이 유발될 수 있다(13-15).

타락 추출물은 100 µg/mL의 농도에서 tyrosinase의 역가를 유의하게 저해하였고($P<0.05$) 우유 추출물은 tyrosinase 저해 효과가 없었다(Fig. 2). Tyrosinase 저해제인 arbutin은 100 µg/mL의 농도에서 tyrosinase의 역가를 타락 추출물보다 더 유의하게 저해하였다($P<0.05$)(Fig. 2).

타락 추출물과 우유 추출물은 각각 100 µg/mL의 농도에서 α-MSH에 의하여 촉진된 B16-F10 세포의 멜라닌 생성을 유의하게 억제하였다. 특히 타락 추출물을 처리한 B16-F10 세포는 기초 멜라닌 생성량보다 유의하게 낮은 수준의 멜라닌을 생성하였다($P<0.05$)(Fig. 3). 본 연구의 결과는 타락 추출물의 성분에 의하여 멜라닌 생성 과정이 억제되는 것을 보여주는 것으로 타락 추출물에 의한 tyrosinase 저해

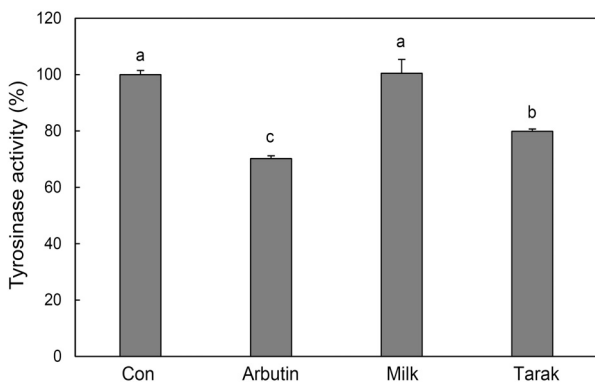


Fig. 2. Effects of tarak on tyrosinase activity (mean±SD). Mushroom tyrosinase were incubated with medium (con), tyrosinase inhibitor arbutin (arbutin, 100 µg/mL), milk extract (milk, 100 µg/mL), or tarak extract (tarak, 100 µg/mL) for 10 min at 37°C and tyrosinase activities were measured. Bars with different letters (a-c) indicate significant differences ($P<0.05$).

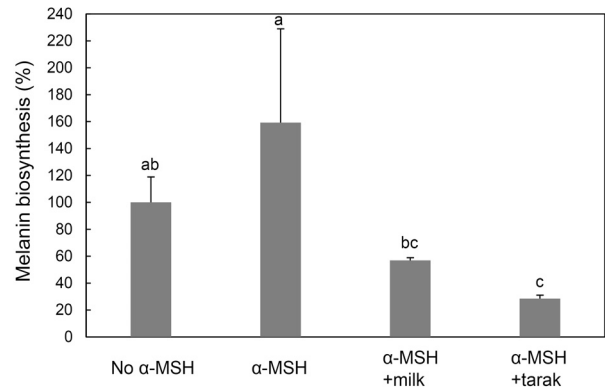


Fig. 3. Effects of tarak on melanin biosynthesis of B16-F10 cell (mean±SD). B16-F10 cells were incubated with medium (no α-MSH), 2 µM α-MSH (α-MSH), 2 µM α-MSH with 100 µg/mL milk extract (α-MSH+milk), or 2 µM α-MSH with 100 µg/mL tarak extract (α-MSH+tarak) for 48 h at 37°C and melanin biosynthesis was quantified by measuring absorbance at 450 nm. Bars with different letters (a-c) indicate significant differences ($P<0.05$).

를 멜라닌 생성 억제제의 한 기전으로 유추할 수 있다.

전통 발효유인 타락 추출물에 의하여 면역세포의 증식이 촉진되었고 피부세포에서의 멜라닌 생성이 저해되었다. 본 연구의 결과는 타락이 면역력 강화 기능성과 피부색소 조절 기능성을 보유하고 있음을 보여주는 것이고 전통 발효유 타락의 이용 가능성을 제시하고 있다. 추가 실험을 통하여 타락 기능성의 기전을 명확히 규명하고 *in vivo* 실험으로 효능 검증은 진행해야 할 것으로 판단된다.

요 약

시판 막걸리에서 분리한 균주(*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* M13-65-3)로 타락을 제조하였다. M13-65-3 균주를 이용하여 제조한 타락 추출물에 의하여 T lymphocyte인 Jurkat 세포의 증식이 촉진되었고 피부세포의 멜라닌 생성이 억제되었다. 본 연구의 결과는 타락이 면역 증강 기능성과 피부색소 조절 기능성을 보유할 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 고부가가치식품기술개발사업(2012~2014)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

- Adolfsson O, Meydani SN, Russel RM. 2004. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 80: 245-256.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73: 444S-450S.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. 2006. Probiotics

- and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 100: 1171-1185.
4. Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 39: 681-687.
 5. Lim GS, Lee KS, Jang HJ, Jung JK, Lim JY, Chun TH, Han YS, Oh SW. 2013. Microbial community analysis of *Tarak*, a fermented milk product. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1109-1114.
 6. Yoon H, Liu RH. 2007. Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF- κ B activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem* 55: 3167-3173.
 7. Yagi K. 1987. Lipid peroxide and human disease. *Chem Phys Lipids* 45: 337-351.
 8. Choi SY, Kim NN, Kim YE, Lee Y, Lim SJ, Kim JH. 2011. Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia on melanin biosynthesis. *Korean J Food Sci Technol* 43: 240-242.
 9. Takahashi K, Murakami M, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y. 2011. Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors promote mitogen-activated IL-2 production via AP-1 in Jurkat cells. *Life Sci* 88: 480-485.
 10. Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y. 2013. Jurkat cell proliferation is suppressed by *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology* 218: 527-532.
 11. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *PNAS* 102: 2880-2885.
 12. Forsythe P, Bienenstock J. 2010. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest* 39: 429-448.
 13. Jo YN, Jeong HR, Jeong JH, Heo HJ. 2012. The skin protecting effects of ethanolic extracts of eggplant peels. *Korean J Food Sci Technol* 44: 94-99.
 14. Seo H, Seo GY, Ko SZ, Park YH. 2011. Inhibitory effects of ethanol extracts from *Polygoni multiflori radix* and *Cynanchi wilfordii radix* on melanogenesis in melanoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1086-1091.
 15. Kim TH, You JK, Kim JM, Baek JM, Kim HS, Park JH, Choe M. 2010. Antioxidant and whitening effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1418-1424.