

## 산양유 발효유의 면역 활성화 및 체력증진 효과

오광훈<sup>1\*</sup> · 김아롱<sup>2\*</sup> · 배종환<sup>3</sup> · 이경복<sup>4</sup> · 유영춘<sup>2</sup>

<sup>1</sup>공주대학교 사범대학 체육교육과, <sup>2</sup>건양대학교 의과대학 미생물학교실  
<sup>3</sup>(주)바이오프로젠, <sup>4</sup>건양대학교 의과대학 생화학교실

### Effects of Fermented Goat Milk on Immunomodulatory Activity and Physical Strength in Mice

Kwang-Hoon Oh<sup>1\*</sup>, A Rong Kim<sup>2\*</sup>, Jong-Hwan Bae<sup>3</sup>, Kyung Bok Lee<sup>4</sup>, and Yung Choon Yoo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Education, College of Education, Kongju National University

<sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Medicine and

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, College of Medicine, Konyang University

<sup>3</sup>Research Institute, Bioprogen Co., Ltd.

**ABSTRACT** In this study, the effects of fermented goat milk (F-GM) on immunological activity and physical strength were examined. Splenocytes obtained from mice administered with F-GM showed increased responsiveness to mitogens, concanavalin-A (ConA), and lipopolysaccharide (LPS). Treatment with F-GM also significantly augmented production of interleukin (IL)-2 and interferon (IFN)- $\gamma$ , but not IL-4 or IL-10 from ConA-stimulated splenocytes. The activity of F-GM administration to enhance production of IL-2 and IFN- $\gamma$  was confirmed based on mRNA expression of these cytokines by reverse transcription polymerase chain reaction. After immunization with keyhole limpet hemocyanin (KLH, 20 mg/mouse), mice administered F-GM showed significantly higher antibody titers against KLH than those of phosphate-buffered saline-treated mice, and showed the highest titer 5 weeks after KLH immunization. Analysis for determining isotypes of antibodies revealed that administration of F-GM elicited KLH-specific antibody titers of IgG1, IgG2a, and IgM. In a delayed type hypersensitivity (DTH) test carried out 7 weeks after the primary immunization, F-GM-treated mice showed a higher DTH reaction than the control mice. Furthermore, the swimming test found that administration of F-GM significantly increased swimming time. These results suggest that administration of F-GM enhances not only immune responses against antigens but also physical strength.

**Key words:** fermented goat milk, immunity, antibody response, cellular immune response, physical strength

## 서 론

모유를 비롯한 포유동물의 유(milk)는 생명체에 있어 성장과 발달에 필요한 영양뿐만 아니라 외래의 병원체로부터 생체를 보호하는 데 필요한 생리물질들을 포함하고 있어 생체방어 작용에 기여한다. 유즙에는 단백질, 탄수화물, 지방 등 생리기능을 조절하는 많은 성분이 함유되어 있으나 유단백질 casein의 한 종류인  $\alpha$ s-casein은 소화 장애와 아토피성 피부염의 원인이 되는 것으로 알려졌다(1,2). 한편 이  $\alpha$ s-casein은 우유 중에는 높은 농도로 함유되어 있지만 모유와 산양유는 우유에 비하여 이 단백질의 함량이 적어 알레르기 반응을 거의 일으키지 않는 것으로 추정하고 있다. Casein

단백의 또 다른 성분인  $\beta$ -casein은 면역증강 효과를 나타낸다고 알려졌는데, 산양유와 모유는  $\beta$ -casein이 주 단백질원이어서 면역력 강화에 기여하는 것으로 보고되어 있다(3). 또한 산양유는 유즙과 다양한 체액 중에 존재하며 비면역형 생체방어 작용과 다양한 생체기능을 제어하는 것으로 알려진 락토페린의 함량이 높고(4), 유지방구가 작아(산양유 2  $\mu$ m, 우유 25  $\mu$ m) 소화용이한 것으로 알려졌다(1,5,6).

한편 산양유에는 인체에서는 생합성력이 낮아 외부로부터 공급받아야 하며 다양한 생물학적 기능성을 가진 유리아미노산의 일종인 타우린과, 높은 항산화 활성과 항암 효과 그리고 면역증강 등의 기능을 가진 셀레늄, 암 발생 억제 및 암세포 파괴 효과, 면역증진 효과, 체지방 감소 기능을 가진 CLA(conjugated linoleic acid) 등이 다량 포함되어 있다(5,7). 또한 산양유는 철분과 칼슘, 비타민 및 이온성 무기염류 등을 다량 함유하고 cholesterol의 함량이 낮은 특징을 가진다(1,5,7).

이처럼 산양유는 성분의 조성 및 생물학적 작용에서 우유

Received 20 October 2015; Accepted 9 December 2015

Corresponding author: Yung Choon Yoo, Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

E-mail: yc\_yoo@konyang.ac.kr, Phone: +82-42-600-6495

\*These authors contributed equally to this work.

와는 차별적인 특성을 보이고 있으나, 실제로 산양유와 산양유를 소재로 한 유가공품의 생리활성에 관한 연구 결과는 그다지 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 최근 영양학적인 측면은 물론 인체기능 조절 효과에서도 주목받고 있는 산양유의 생리활성을 조사하기 위하여, 산양유를 미생물로 발효한 산양유 발효유를 제조하여 마우스에 경구 투여한 후 면역세포의 활성화, 항원 특이적인 면역반응의 증강, 그리고 수영테스트를 통한 체력증강 효과 등을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

6주령의 Balb/c female mice를 라온바이오(Yongin, Korea)에서 구입하여 케이지당 4~5마리씩 분리 수용하여 사육하였으며, 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 동물의 사육과 동물실험은 건양대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았으며, 규정을 준수하며 수행하였다(승인번호 P-13-05-A-01).

### 산양유 발효유의 제조

산양유 발효유의 제조는 산양유((주)카프로바이오텍, 강원도, 한국)를 60~65°C에서 30분간 살균시킨 후, 68~72 cmHg 감압/70~75°C의 조건에서 30분간 처리하여 유청 단백질을 불활성화시키고 36~40°C로 냉각시켰다. 그 후 불활성화 산양유에 포도당, 과당, 설탕, 유당분해효소 및 정제수 등을 혼합하여 80~85°C/28~32초의 조건으로 살균하고 38~40°C에서 냉각하였다. 이 산양유에 *Streptococcus thermophilus*(KCTC 2185) 및 *Lactobacillus bulgaricus*(KCTC 3188) 균주를 0.2%(w/w)로 접종하여 pH가 4.4가 될 때까지 배양한 후(약 24시간), 상온으로 냉각하여 균질화함으로써 산양유 발효유(F-GM)를 완성하였다.

### 산양유 발효유 투여

비장세포를 이용하여 면역 활성을 측정하기 위한 실험에서 실험군과 대조군은 임의로 마우스 각각 7마리씩을 배정하였다. 실험군은 F-GM을 각 마우스당 1일 2회, 연속적으로 7일간 1회에 500 µL씩을 경구 투여하였으며, 대조군은 동일 조건으로 PBS를 투여하였다. 한편 항원을 투여하여 항체면역 유도능을 측정하기 위한 실험에서는 그룹당 마우스 수를 5마리로 하여 1차 항원면역 7일 전부터 항원을 2차 면역하는 시점까지 1일 2회 연속적으로 F-GM을 500 µL씩 경구 투여하였다.

### 비장세포 활성화와 cytokine의 정량

F-GM을 7일간 투여한 후 다음날 마우스의 비장을 적출하여 단일세포로 분리하고 RPMI 1640 medium(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 4°C에서 1회

원심세척 한 후, RPMI-1640 완전 배지(10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin)에 세포를 부유시켰다. 대조군과 실험군의 비장세포 증식을 비교하기 위해서 비장세포 부유액( $5 \times 10^6$  cells/well)을 96-well plate에 분주하고, mitogen인 ConA(concanavalin A, Vector, San Mateo, CA, USA) 혹은 LPS (055:B5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 각각 1 mg/mL의 농도가 되도록 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 용액(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 2시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 반응시킨 다음, microplate reader를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후 장세포의 증식 여부를 판정하였다. Cytokine 정량은 마우스의 비장세포에 0.5 mg/mL의 ConA를 처리하여 48시간 배양한 세포배양 상청액을 이용하여 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 통해 정량하였다.

### Cytokine RT-PCR

RT-PCR법에 의해 cytokine 유전자 발현을 조사하기 위하여 대조군과 F-GM 처리군 마우스의 비장세포( $2 \times 10^6$ /well in 6-well plate)를 ConA(0.5 mg/mL)와 함께 24시간 동안 배양하였다. RNA 분리는 TRIzol(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 상법에 따라 행하였다. 분리한 RNA는 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)가 첨가된 증류수에 녹이고 55~60°C에서 10분간 반응시켜 UV spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. cDNA의 합성은 RNA에 Oligo(dT) 16 primer 2.5 mU, reverse transcription buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 1 U/mL RNAase inhibitor, 2.5 U/mL MuLV reverse transcriptase(Perkin Elmer, Boston, MA, USA)를 가하여 총 20 µL가 되도록 혼합하고 PCR을 통해 실시하였다. 합성된 cDNA에 대한 각각의 cytokine primer를 사용하여 PCR을 통해 각 cytokine 유전자를 증폭하였다. PCR 반응에는 PCR Thermal Cycle Dice(Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용하였으며, 증폭된 PCR 유전자 산물은 1.0% agarose gel 상에서 전기영동한 후 관찰하였다. 각 band의 발현은 densitometry를 통해 actin 발현량 대비 각 cytokine 발현량의 비율로 계산하여 표시하였다. 사용한 oligonucleotide primer의 염기배열은 다음과 같다. Mouse β-actin(5'-TGG AAT CCA GTG GCA TCC ATG AAA C-3' and 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'), mouse IL-2(5'-TGA TGG ACC TAC AGG TCC TGA G-3' and 5'-GAG CCC TTG GGG CTT ACA AAA AGA A-3') and mouse IFN-γ(5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' and 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TTG TAT AGG G-3').

### 면역 및 항체가 측정

항원에 대한 특이 면역반응을 측정하기 위한 실험에서는

2주 간격으로 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 항원을 20 mg/mouse로 피하주사하고, 1차 면역 후부터 2주 간격으로 채혈하여 KLH에 대한 항체역가를 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의해 측정하였다(8). 요약하면 96-well ELISA plate에 KLH(2 mg/mL in carbonate-bicarbonate, pH 9.6 with 0.02%  $\text{NaN}_3$ )를 coating 하고, 3% bovine serum albumin(BSA)-PBS 용액으로 blocking 한 후 PBS-0.05% Tween-20으로 3회 세척하였다. 마우스 혈청을 1,000배 희석하여 각 well에 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. Plate를 3회 세척하고 1,000배 희석한 2차 항체(Goat anti-mouse IgG+A+M-HRP; R&D Systems)를 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척 후 ABTS 기질용액(2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, 0.2 mM)을 첨가하고 30분간 반응시킨 다음 발색 정도를 ELISA reader(Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 항체의 isotype은 면역개시 5주째의 혈청과 2차 항체(Goat mouse immunoglobulin-HRP, R&D Systems)를 이용하여, mouse IgG1, G2a, G2b 및 M 항체가를 ELISA법을 통해 분석하였다.

### 지연형 과민반응 측정

항원에 대한 지연성 과민반응(DTH)은 최초 면역 7주 후에 KLH(50 mg in 50 mL)를 마우스의 발바닥(footpad)에 주사하고 항원에 대하여 유도되는 footpad swelling 반응에 의해 판정하였다(8). DTH 증가반응은 대조군에 대한 주사 부위 footpad swelling의 백분율로 나타내었다.

### 수영 시험

F-GM을 5주간 경구 투여시킨 마우스(그룹당 7마리)를 이용하여 수영 시험을 통해 체력증진 효과를 측정하였다. 수영 시험은 워면이 개방된 아크릴 통에 25 cm의 높이로 수온  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 물을 채운 뒤, 실험동물을 욕조에 넣어 수영을 포기할 때까지의 시간을 측정하였다(9).

### 통계학적 분석

실험 결과의 통계분석은 Student's two-tailed t-test 혹은 Mann-Whitney U probability test에 의해 대조군에 대한 통계학적 유의차를 통해 수행하였다.

## 결 과

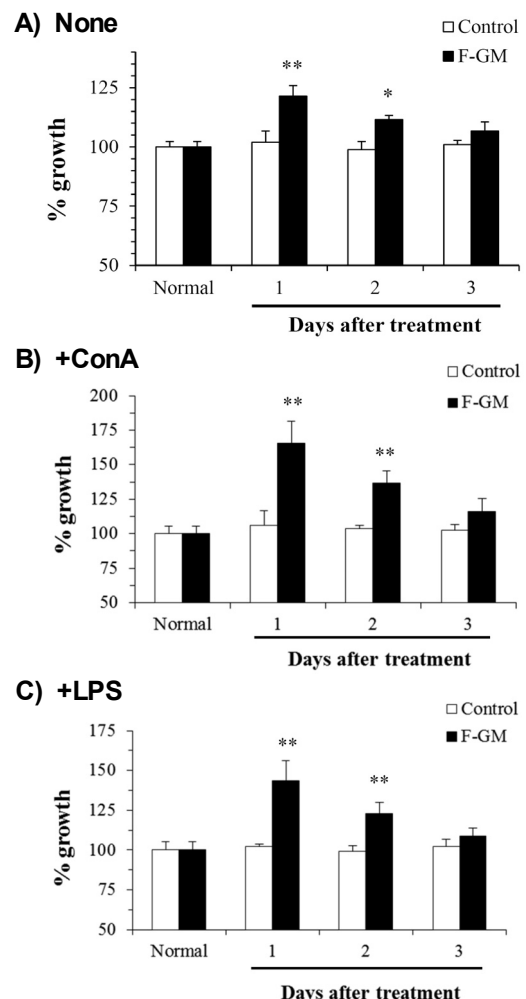
### 비장세포 증식유도 활성

대조군과 실험군의 비장세포 증식을 비교하기 위하여 7일간 PBS 혹은 F-GM을 500  $\mu\text{L}$ 씩 경구 투여하고 마지막 투여 다음날 마우스로부터 비장을 분리하였다. F-GM 경구 투여가 마우스 비장세포의 증식능에 미치는 영향은 ConA나 LPS 등 mitogen을 첨가한 경우와 mitogen 첨가 없이 배양

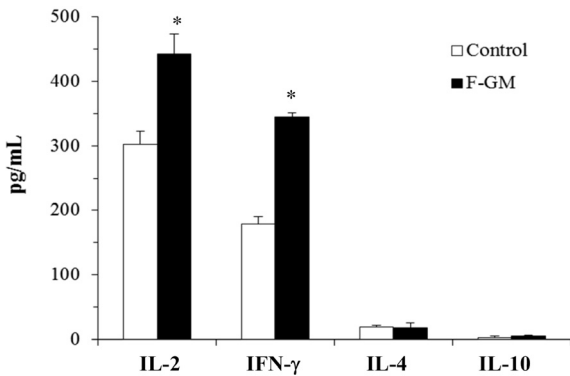
한 후 세포의 증식반응을 통해 조사하였다. 그 결과 F-GM을 급이시킨 마우스에 있어서 mitogen을 첨가하지 않은 비장세포에서는 물론 ConA 및 LPS 등의 mitogen을 처리한 비장세포에서도 유의하게 높은 증식반응을 나타내었다(Fig. 1). 한편 F-GM 투여군에 있어서 세포증식 증강 효과는 7회 투여 후 1일째가 가장 높았으며, 2일째까지도 그 효과가 유지되는 것으로 확인되었다. 또한 F-GM을 투여한 마우스 비장세포에서 ConA와 LPS 모두에 대한 반응성이 높아진 것으로 보아, F-GM 투여는 T림프구는 물론 B림프구의 활성화를 유도하는 것으로 추정되었다.

### 비장세포로부터 cytokine의 유도

F-GM 경구 투여에 의한 cytokine 유도 활성을 조사하기 위하여 F-GM을 투여한 마우스 비장세포에 ConA를 처리하



**Fig. 1.** Effect of oral administration of F-GM on responsiveness of splenocytes to mitogens. Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/well) were co-cultured with mitogen, ConA or LPS (1 mg/mL), for 48 h. The responsiveness of splenocytes to mitogens was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.



**Fig. 2.** Effect of oral administration of F-GM on cytokine production by splenocytes in mice. The culture supernatants obtained from the experiment of Fig. 1 were used for cytokine assay. The level of cytokines was determined by ELISA kits. \* $P < 0.05$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.

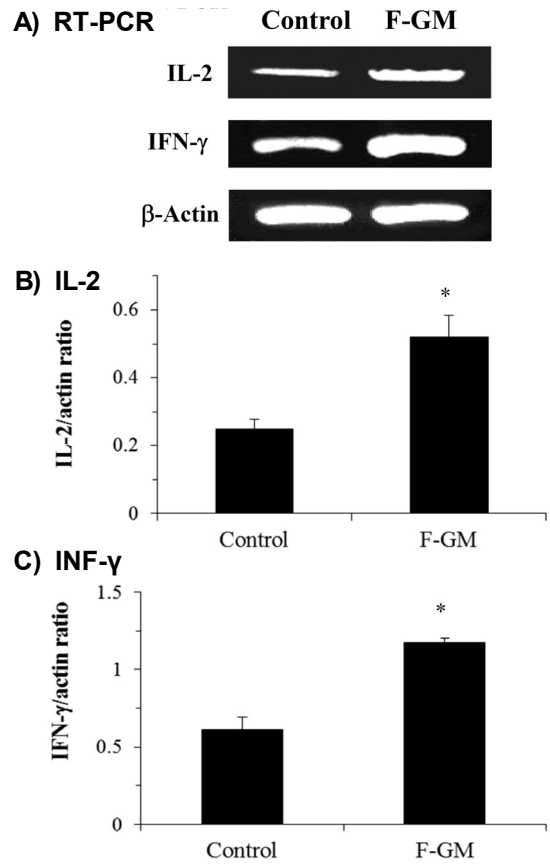
여 배양한 후, 배양 상청 중에 분비되어 있는 cytokine (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10)의 농도를 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. Fig. 2에 나타나듯이 F-GM을 투여한 마우스에서 대조군 마우스에 비해 Th1-type cytokine인 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 분비가 현저히 증가하였으나, Th2-type cytokine인 IL-4와 IL-10에서는 별다른 차이를 나타내지 않았다. 한편 RT-PCR을 통해 IL-2와 IFN- $\gamma$ 에 대해 유전자 (RNA) 수준에서의 분석을 행한 결과 ELISA에서 나타난 결과와 동일하게 이들 cytokine의 RNA 발현이 현저히 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

**KLH에 대한 항체반응 상승효과**

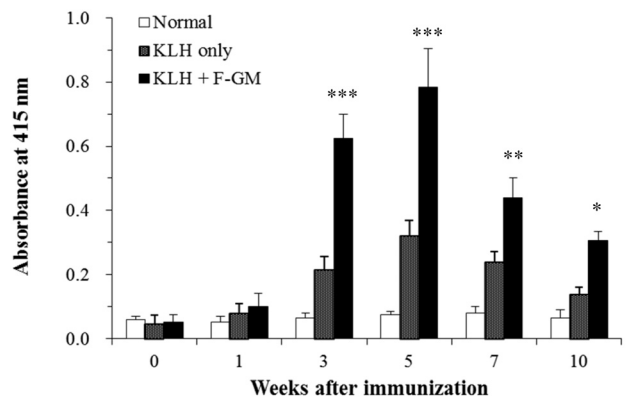
F-GM 투여가 항원에 대한 특이 면역반응에 미치는 영향은 마우스에 대해 이중 단백질 항원인 KLH의 면역에 의해 유도되는 KLH에 대한 특이항체를 비교하여 조사하였다. 그 결과 F-GM을 경구 투여하며 KLH 항원을 면역한 마우스에서 면역개시 3주째부터 KLH만을 면역한 마우스에 비해 유의하게 높은 항체를 나타내었으며, F-GM 투여에 의한 항체면역 증강 활성화는 면역개시 10주째까지도 지속되는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 또한 면역개시 5주째의 마우스 혈청을 이용하여 KLH에 대한 항체의 isotype을 조사한 결과 F-GM을 투여한 마우스에서 IgM, IgG1 그리고 IgG2a가 KLH 단독투여 마우스에 비해 증가하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 즉 F-GM을 경구 투여함으로써 이중항원에 대한 항체유도 활성이 증가하며, Th1 type 항체인 IgG2a와 Th2 type 항체인 IgG1의 분비가 모두 상승하는 것으로 관찰되었다.

**DTH 반응의 상승**

F-GM 투여에 의해 항체 생산과 관련된 체액성 면역을 높이는 효과가 확인되었으므로, 다음으로 세포성 면역에 미치는 효과를 측정하였다. KLH 면역개시 7주째의 마우스를

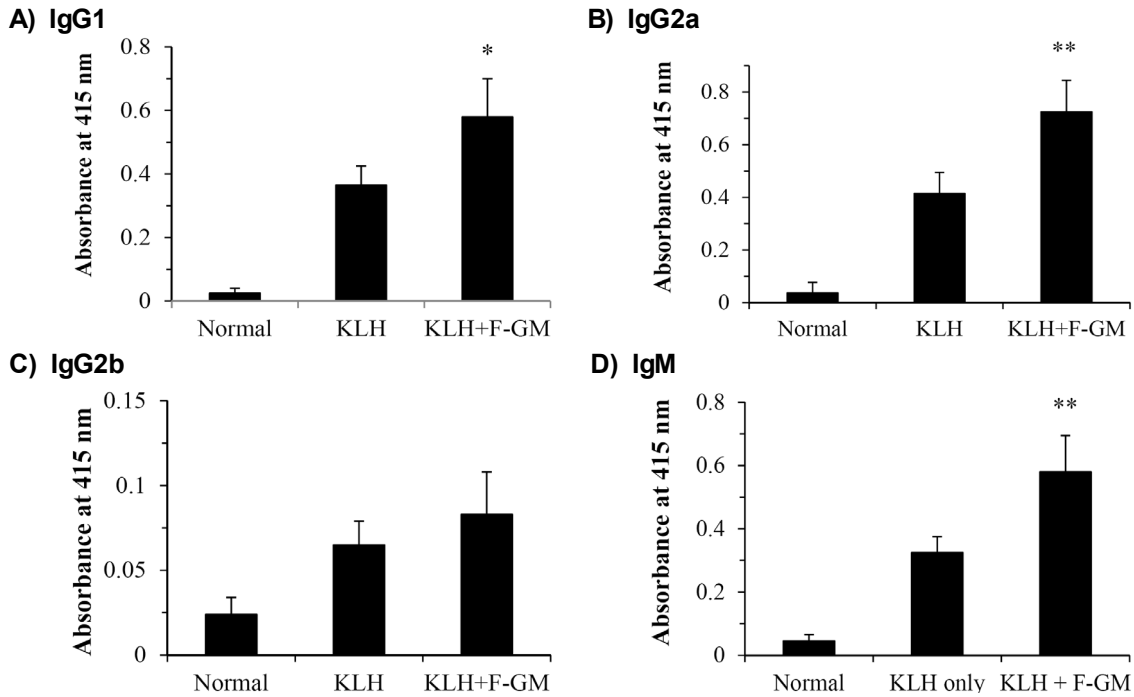


**Fig. 3.** Effect of oral administration of F-GM on the expression of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA in ConA-stimulated splenocytes. The splenocytes were co-incubated with mitogen, ConA (0.5 mg/mL) for 24 h. Subsequently, total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis for IL-2, IFN- $\gamma$ , and  $\beta$ -actin mRNA level. \* $P < 0.05$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.



**Fig. 4.** Effect of oral administration of F-GM on induction of KLH-specific antibody response. The antibody titers of serum specimens were measured by ELISA method. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.

이용하여 지연형 과민반응(DTH)을 통해 세포성 면역에 미치는 F-GM의 효과를 검토한 결과 F-GM을 경구 투여한



**Fig. 5.** Determination of sub-isotype of KLH-specific immunoglobulins. Antibody titers of each antibody isotype specific to KLH were assayed using the serum specimens used in Fig. 4 by ELISA method. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.

마우스에서 footpad swelling이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이상의 결과로부터 F-GM을 경구 투여함으로써 면역세포의 증식반응이 비특이적으로 증가하고, 또한 항원을 면역할 경우 항원에 대한 체액성 면역과 세포성 면역이 모두 상승하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

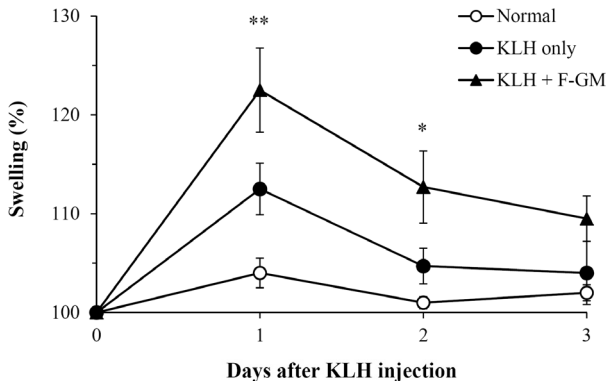
**수영능 시험**

동물이 물속에서 걷는 능력을 시험함으로써 운동 유지력, 체온 조절능력, 스트레스 저항성 등을 평가할 수 있다(8). 본 연구에서는 F-GM의 경구 투여가 운동 유지력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 물속에서 수영을 포기할 때까

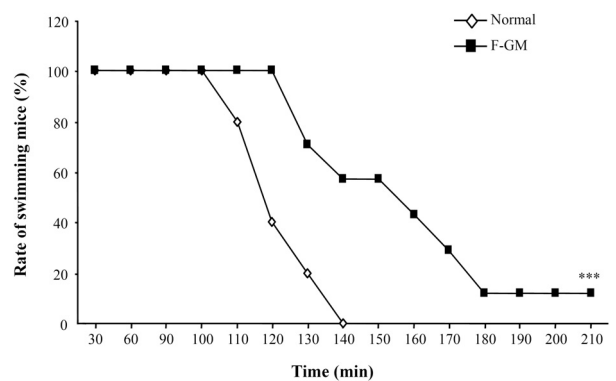
지의 시간을 측정, 비교하였다. 그 결과 F-GM을 5주간 투여한 마우스에서 대조군 마우스보다 수영시간이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이 결과로부터 F-GM의 경구 투여는 면역기능의 향상뿐 아니라 운동능력도 증가시키는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

**고 찰**

본 연구에서는 산양유를 발효하여 만든 F-GM의 생리활성을 조사하기 위하여 F-GM을 경구 투여한 마우스를 이용하여 면역학적 활성과 운동능력 증강 효과를 검토하였다. 면역



**Fig. 6.** Effect of oral administration of F-GM on induction of KLH-specific DTH reaction. DTH reaction was represented as the percentage increase of footpad swelling. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , compared with the control group by Student's two-tailed t-test.



**Fig. 7.** Effect of oral administration of F-GM on swimming activities in water. Each point represents the rate of swimming mice of each group in water. \*\*\* $P < 0.05$ , compared with the control group by Mann-Whitney U probability test.

증강 효과에서는 F-GM 급이에 따른 림프구의 비특이 면역과 항원에 대한 특이 면역의 관점에서 연구를 수행하였다. 비장세포를 이용한 면역세포 증식반응 실험에서 F-GM 투여군은 대조군과 비교하여 mitogen을 첨가하지 않았을 때는 약 20%의 세포증식 상승효과가 관찰되었으며, ConA를 첨가한 경우에는 약 40% 정도, 그리고 LPS를 첨가하여 배양한 경우에는 30% 정도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이 결과는 F-GM을 경구 투여함으로써 마우스의 면역담당세포(특히 T세포와 B세포 등의 림프구)의 활성화가 유도되어 ConA 및 LPS와 같은 mitogen에 대한 반응성이 높아지는 것을 의미한다. 다시 말하면 F-GM을 급이시킨 숙주에서는 면역세포가 활성화되어 mitogen뿐만 아니라 외부로부터 침입한 항원물질과 병원균에 대한 면역세포의 반응성이 증가하여 생체의 저항력을 향상할 수 있는 것으로 추정된다.

면역작용의 활성화를 판정하는 기준에 있어 면역세포들의 활성화와 면역작용의 조절에 기여하는 cytokine의 분비능이 중요한 요인이 된다(10). 특히 T세포는 여러 종류의 cytokine을 분비하여 면역기능을 조절하게 되며, 이 중 Th1형 T세포는 IL-2, IFN- $\gamma$  및 tumor necrosis factor(TNF) 등을 생산하여 세포성 면역을 촉진하며 대식세포나 단핵구 활성화에 관여한다. 한편 Th2형 T세포에 의해 조절되는 면역반응은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 분비하여 항체 생산으로 대표되는 체액성 면역을 촉진하게 된다(10-13). 또한 이들 두 종류의 cytokine은 서로 길항적으로 작용하여 면역기능의 억제와 제어를 통해 항상성 유지에 기여하기도 한다. Fig. 1의 실험 결과에서 F-GM 경구 투여 때문에 ConA의 자극에 의한 T세포의 증식작용 상승이 관찰되었으므로, F-GM에 의한 T세포의 활성화를 cytokine 분비 유도의 관점에서 검토를 하였다. 그 결과 F-GM을 경구 투여한 마우스의 T세포로부터 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 와 같은 Th1 type의 cytokine 분비는 비특이적으로 증가하지만, IL-4나 IL-10과 같은 Th2 type의 cytokine 분비에는 아무런 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

항원이 숙주에 들어오면 숙주는 항원에 대항하기 위하여 항원 특이적인 면역반응을 유도하며 이 면역반응은 크게 두 가지 즉, 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 작동하게 된다(14). 본 연구에서 F-GM이 항원 특이적인 체액성 면역과 세포성 면역반응에 미치는 효과를 조사하기 위하여 F-GM을 급이시킨 마우스에 항원(KLH)을 투여하고, 이 KLH에 대한 특이항체의 유도과 항원에 대한 DTH 반응의 증강 효과를 조사하였다. 그 결과 F-GM을 급이시킨 마우스에서 KLH에 대한 항체와 DTH 반응의 상승이 확인되었다(Fig. 4, Fig. 6). 즉 F-GM을 경구 투여함으로써 항원 특이적인 체액성 면역의 상승은 물론 세포성 면역의 증가도 유도할 수 있음을 의미한다. 단지 항체의 isotype 별로 분석한 결과에서는 F-GM 투여군에서 Th1 및 Th2 type 항체가 모두 증가하는 경향이 나타나, *in vitro* 실험계에서의 cytokine 분석에서 관찰된 Th1 type 반응의 증가(Fig. 2)와는 일치하

지 않는 결과를 보였다. 하지만 Fig. 2의 실험은 F-GM을 *in vivo*에서 투여한 마우스의 T세포를 *in vitro*에서 비특이적으로 자극하여 얻은 실험 결과이고, Fig. 5는 F-GM을 투여한 마우스에 항원인 KLH를 동시에 면역하여 항원 특이적인 항체의 상승을 측정된 것으로, 두 실험은 항원의 자극과 실험방법에서 서로 다르므로 결과도 일치하지 않은 것으로 추정된다. 또한 이러한 결과는 면역증강 물질을 항원과 함께 면역할 경우에도 간혹 나타나는 현상으로, *in vitro*와 *in vivo* 실험계에서의 차이일 수 있는 것으로 생각한다(15).

발효유는 milk 중의 성분과 발효균주의 생리활성이 합쳐져 여러 다양한 효능을 나타낼 수 있다(16,17). 본 연구에서는 이러한 부분에 주목하여 F-GM을 제조하여 면역조절 기능과 운동능력 향상의 관점에서 F-GM의 생리활성을 조사하였다. 산양유는 성분상에서 우유와는 다르며, 일부 유단백질의 조성에 있어서는 인유(human milk)와 유사한 것으로 알려져 있다(2,4,6). 하지만 산양유를 발효하여 만든 산양유 발효유의 생리활성에 대한 보고는 별로 없는 상태이다. 단지 Salva 등(18)은 *Lactobacillus rhamnosus*를 접종하여 만든 산양유 발효유의 생리활성에 관한 연구 결과에서 산양유 발효유를 투여함으로써 영양실조 상태가 회복되고 장과 호흡기 감염에 대해 저항력이 높아지는 것으로 보고하였다. 하지만 이러한 연구 결과는 산양유 발효유의 투여가 면역력 증강에 직접 기여한다는 것을 증명한 것은 아니므로, 본 연구 결과와는 다소 다른 관점에서 산양유 발효유의 유용성을 입증한 연구 결과이다.

본 연구에서 얻어진 결과는 산양유 발효유는 숙주의 면역기능을 향상시키는 유익한 효능을 지닌 식품이며, 면역기능과 운동능력을 향상시키는 기능성 식품으로서의 응용 가능성이 큰 유제품임을 제시하였다. 이 산양유 발효유에 의한 면역기능 증강 효과와 운동능력 향상에 관련하는 활성물질의 동정과 생리학적 작용기전 해석은 현재 연구 중이다.

## 요 약

본 연구에서는 산양유 발효유(F-GM)의 급이가 면역 활성화와 체력증진에 미치는 영향을 조사하였다. F-GM을 경구 투여한 마우스의 비장세포는 림프구 유사분열 촉진인자인 ConA와 LPS에 대한 증식반응의 상승을 나타내었다. ConA를 처리한 비장세포로부터 분비되는 cytokine을 ELISA법에 의해 정량한 결과 F-GM 투여에 의해 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성은 유의하게 증가하였으나, IL-4 및 IL-10의 생성은 별다른 변화를 보이지 않았다. 또한 RT-PCR을 이용한 이들 cytokine mRNA의 정량실험에서도 F-GM 투여로 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 mRNA가 증가하는 것을 확인하였다. 한편 KLH(20 mg/mouse)를 정상 대조군 마우스 혹은 F-GM을 급이한 마우스에 각각 면역하고 5주째에 KLH에 대한 항체를 측정된 결과 F-GM을 급이한 마우스에서 항체가 유의하게 상승하는 것으로 나타났다. KLH에 대한 항체의 isotype

을 조사한 실험에서는 KLH에 대한 IgG1, IgG2a 그리고 IgM 특이항체의 상승이 관찰되었다. F-GM 경구 투여가 세포성 면역에 미치는 영향을 측정하기 위하여 면역개시 7주째의 마우스를 이용하여 KLH에 대한 지연형 과민반응(DTH)을 측정하였다. 그 결과 F-GM을 경구 투여한 마우스에서 DTH의 유의한 상승효과가 확인되었다. 한편 수형시험을 통해 F-GM의 경구 투여가 체력증강에 미치는 영향을 측정한 결과 F-GM을 투여한 마우스에서 매우 유의한 수형시간의 연장 효과가 관찰되었다. 이들 결과로부터 F-GM은 면역세포의 활성화를 통한 면역력 강화는 물론 체력을 증가시키는 생리활성을 갖는 것으로 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 2012년도 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발(No. 112078-3)과 2015년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2015R1D1A1A01060440)에 의해 수행되었습니다.

### REFERENCES

1. Park YW. 2000. Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA. *Small Rumin Res* 37: 115-124.
2. Bramanti E, Sortino C, Onor M, Beni F, Raspi G. 2003. Separation and determination of denatured  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *J Chromatogr A* 994: 59-74.
3. Jandal JM. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin Res* 22: 177-185.
4. Nam MS, Shimazaki K, Kumura H, Lee KK, Yu DY. 1999. Characterization of Korean native goat lactoferrin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 123: 201-208.
5. Toral PG, Chilliard Y, Rouel J, Leskinen H, Shingfield KJ, Bernard L. 2015. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *J Dairy Sci* 398: 7277-7297.
6. Pierre A, Michel F, Zahoute L. 1999. Composition of casein micelles in relation to size in goat milks with A and null  $\alpha_{s1}$ -casein variants. *Int Dairy J* 9: 179-182.
7. Manzi P, Pizzoferrato L. 2013. Taurine in milk and yoghurt marketed in Italy. *Int J Food Sci Nutr* 64: 112-116.
8. Lee KB, Song KS, Moon EH, Lee J, Yoo YC. 2009. Adjuvant activity of *Cudrania tricuspidata* water extracts to enhance antigen specific humoral and cellular immune responses. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 234-240.
9. dela Pena IJI, de la Pena JB, Cheong JH. 2014. The ameliorating effect of Hoveniae Semen seu Fructus extract against ethanol-induced psychomotor alterations in rats. *Yakhak Hoeji* 58: 300-306.
10. Chae BS. 2002. Effects of chlorpyrifos on the production of splenic Th cytokines. *J Environ Toxicol* 17: 325-332.
11. Barlow JL, McKenzie AN. 2014. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 14: 397-403.
12. Adema GJ. 2008. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett* 122: 128-130.
13. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
14. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Doo MS, Kim JB. 1999. Immunoadjuvant activity of Korean mistletoe extract (*Viscum album coloratum*) to enhance humoral and cellular immune response. *Kor J Immunol* 21: 63-79.
15. Tamura M, Yoo YC, Yoshimatsu K, Yoshida R, Oka T, Ohkuma K, Arikawa J, Azuma I. 1995. Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Vaccine* 13: 77-82.
16. Ebringer L, Ferencik M, Krajcovic J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products—review. *Folia Microbiol* 53: 378-394.
17. Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?. *Int Immunopharmacol* 1: 891-901.
18. Salva S, Nuñez M, Villena J, Ramón A, Font G, Alvarez S. 2011. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. *J Sci Food Agric* 91: 2355-2362.