ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2016 Vol. 26. No. 6. 689~697
DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.6.689

Characterizations of Kefir Grains in Fermented Whey and Their Effects on Inflammatory Cytokine Modulation in Human Mast Cell-1 (HMC-1)

Ji Yoon Son[1], Young W. Park[2], Gereltuya Renchinkhand[1], Jung Pil Han[1], Jin Woo Bum[1], Seung-Hee Paik[3], Jo Yoon Lee[4] and Myoung Soo Nam[1*]

[1]*Laboratory of Milk Food Biochemistry and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea*
[2]*Agricultural Research Station, Fort Valley State University, Fort Valley, GA 31030, USA*
[3]*Division of Food Service Industry, Yonam College, Cheonan 31005, Korea*
[4]*College of Tourism & Health, Joongbu University, Geumsan Chungnam 32713, Korea*

Received March 2, 2016 / Revised April 8, 2016 / Accepted April 11, 2016

Kefir is an acidic-alcoholic fermented milk product originating from the Caucasian mountains. Kefir has long been known for its probiotic health benefits, including its immunomodulatory effects. The objectives of this study were to investigate the properties of a fermented whey product and to examine the effects of kefir grains on the *in vitro* immune-modulation of human mast cell-1 (HMC-1). The results showed that the whey fermented by kefir grains contained the maximum lactic acid bacteria and yeast for 16 hr by 1.83×10^8 and 6.5×10^5 CFU/ml, respectively, and lactose and whey proteins were partially hydrolyzed. The experimental whey fermented by kefir grains exhibited an *in vitro* anti-inflammatory effect on the HMC-1 line for 8, 16, and 24 hr, and this effect induced the expression of interleukin (IL)-4 as a pro-inflammatory cytokine, but not for 48 hr by RT-PCR in HMC-1 cells. In addition, the same phenomenon was observed for the expression of IL-8 as a pro-inflammatory cytokine by the kefir-fermented whey during the same periods of 8-48 hr under the same conditions. These cytokines resulted in the production of IL-4 at 20-25 ng in HMC-1 cells for 8, 16, and 24 hr, whereas 5 ng was produced for 48 hr by the fermented whey. In contrast, IL-8 was produced at 15-20 ng in HMC-1 cells during 4, 8, 16, and 24 hr, while 7 ng was produced at 48 hr. It was concluded that the whey fermented by kefir grains possesses a potential anti-inflammatory function, which could be used for an industrial application as an ingredient of functional foods and pharmaceutical products.

Key words : Anti-inflammatory, IL-4, IL-8, kefir, whey

서 론

유청(whey)은 치즈 제조 후 얻을 수 있기에 치즈 부산물이라 하는데 다양한 영양학적, 생리적 기능을 가지고 있다. 일반적으로 우유 100 kg으로 치즈를 제조 할 경우 얻을 수 있는 유청의 양은 90 kg 정도로 2014년에 전세계적으로 생산된 치즈의 양은 17,919,000톤이다[7]. 우리나라는 2014년에 자연치즈의 생산량이 8,582톤[7]으로 낙농선진국에 비해 생산량이 적어 얻을 수 있는 유청의 양도 적다. 유청의 조성은 유청단백질 약 0.60~0.65%, 유당 4.5~5.0%, 수분 93~94%, 미네랄 0.5~0.7%로 되어있다[19]. 유청은 다양한 기능의 우수성으로 인해 최근에는 기능성 식품과 유아용 조제분유용 단백질 급원으로 이용되고 있고 앞으로도 계속 유청의 이용이 증가할 것으로 예상하고 있다[5].

Kefir는 약한 신맛과 크림 같은 점조성을 가지는 산성의 유산-알코올 발효유로 Balkans, 동유럽, Caucasus 지역에서 유래되었다[11, 18]. Kefir는 상업용 동결건조 kefir starter cultures, 전통적인 kefir grains, 그리고 kefir grain 제거 후 남아있는 미생물을 이용하여 생산할 수 있다[1]. Kefir grain은 발효유 starter의 한 종류로 황백색으로 끈적끈적한 점착성의 다양한 크기로 유산균(10^8 CFU/g), 효모(10^6-10^7 CFU/g), 초산균(10^5 CFU/g)의 혼합미생물들이 공생으로 자라고 점질성 다당류로 구성되어있다[3, 12].

한편 유청은 kefir 배양 생산물을 위한 실질적인 토대이며, 발효유청은 동결 건조 동안 동결방지용 배지 역할에 적당하다. 동결 건조된 미생물은 높은 생존율을 유지하고 우수한 대사활동과 발효효율을 나타내며, starter로서 우수한 능력을 나타내기 때문에 starter 미생물로써 유가공산업에 이용되고 있다[1, 4]. 역사적으로 보면 kefir는 건강과 관련되어 있는데, 소비에트 연방국가에서는 몇몇 질병의 위험을 억제하기 위해 건강한 사람들에게 섭취를 하도록 권장되어져 왔다[10, 20].

***Corresponding author**
Tel : +82-42-821-5782, Fax : +82-42-823-2766
E-mail : namsoo@cnu.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kefir grain의 주된 성분인 다당체는 kefiran으로 항암, 항곰팡이, 항균작용[2, 21], 면역조절 작용 또는 상피세포 방어[18], 항염증[16], 항산화 활성[3] 특성과 같은 뛰어난 기능을 가지고 있다. 최근에 probiotic 미생물과 기능성 유기성분을 가진 건강에 유익한 식품들에 관심이 높은 가운데, 건강증진 미생물인 kefir을 이용한 천연음용제품의 판매가 증가되고 있다[15]. 본 연구는 치즈 제조 후 얻은 유청을 kefir grain으로 발효시켜 kefir의 발효 특성을 조사하고, 발효액을 human mast cell-1 (HMC-1)에 처리하여 염증관련 cytokine의 발현에 미치는 영향을 조사하여 kefir 유청발효제품의 개발에 대한 기초자료를 제공하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

유청 제조

유청은 충남대학교 동물자원연구센터(Cheungyang, Korea)에서 신선한 원유로 고다치즈를 제조한 후 부산물로 얻은 유청을 사용하였다.

Kefir grain

농촌진흥청 축산과학원(Wansan, Korea)에서 분양받은 kefir grain을 우유배지에 배양하여 starter를 제조한 후 유청에 3%(v/v)를 접종하여 27℃에서 48시간까지 배양하였다.

유산균수와 효모수 측정

유산균수는 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 발효액을 10진 희석법으로 BCP (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 고체 배지에 접종한 후 37℃에서 48시간 배양하고 colony counter (Gallenkamp Co. Ltd., London, England)를 사용하여 생균수를 조사하고 log 지수로 표시하였다. 효모수는 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 발효액을 10진 희석법으로 Potato Dextrose agar (Becton, Dickinson Company, Sparks, MD, USA) 고체 배지에 접종한 후 30℃에서 72시간 동안 배양하고 colony counter (Gallenkamp Co. Ltd., London, England)를 사용하여 생균수를 조사하고 log 지수로 표시하였다

pH와 적정산도 측정

유청을 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 배양 후 발효액의 pH 변화와 적정산도를 측정하였다. pH 측정은 pH 측정기(S20 Seven Easy^{TM} pH meter, Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였다. 적정산도는 시료 9 g에 증류수 9 ml와 phenolphtalein 지시약 0.5 ml을 첨가 한 후, 0.1 N NaOH로 적정하여 계산하였다[8].

점도 측정

유청발효액의 점도는 점도계(BM type, Tokimec Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 배양 후 측정하였으며, spindle No. 3, 6을 이용하여 60 rpm으로 1분 동안 측정하여 Centi Poise (cP)값으로 나타내었다.

유당 분해

유청발효액의 유당 분해를 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 배양 후 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)를 사용하여 5,000× g에서 5 min 동안 원심분리하고 분리된 상등액을 채취하여 0.2 μm membrane filter를 사용하여 여과한 후 high preformance liquid chromatography (HPLC) system (600E Multisolvent Delivery System, Waters Associates, Milford, MA, USA)을 사용하여 유당을 분석하였다. 시료는 7725 injector (Rheodyne, USA)를 사용하여 20 μl를 주입하였고, Detector는 Waters model 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters Associates, MA, USA)를 사용하였고, Absorbance을 210 nm에 맞춰서 실시하였다. Column은 SUPELCOGEL C-610H (38 cm×7.8 mm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, column의 온도는 Waters Column Heater Module (serial #F98CHM095M)을 사용하여 40℃를 유지하였고, 이동상은 HPLC용 0.1% phosphoric acid를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 30분 분석하였다. 분석프로그램은 Autochro-WIN 2.0 plus (Young Lin Instrument Co., Ltd., Anyang, Korea)를 사용하여 정량하였다.

유청단백질의 전기영동

0, 24, 48, 72시간 배양한 유청발효액을 3,000× g으로 10분간 원심분리하여 상층액을 100 μl 취해 스피드백으로 건조 후 전기영동을 수행하였다[17]. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)는 12% acrylamide gel, 10% SDS를 함유한 1.5 M Tris (pH 8.8)와 0.5 M Tris (pH 6.8), 10% ammonium persulfate (APS)를 조제하여 사용하였다. Gel은 0.2% (w/v) commassie brilliant blue R-250 (Sigma Co., Louis, MO, USA)을 함유한 acetic acid/methanol/water (1:3:6, v/v/v) 용액을 사용하였다.

Human mast cell (HMC-1)의 배양

사람유래 세포주인 HMC-1 세포(allergy 관련세포)는 한국생명공학연구원(Daejeon, Korea)에서 분양을 받았고 생장 및 유지를 위하여 기본 배양액은 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Rockville, MD, USA)과 1% (100 U/mg) penicillin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고, 37℃, 5% CO_2와 대기습도가 유지되는 배양조건에서 배양하였다.

WST assay에 의한 세포 생존율 조사

유청발효액이 HMC-1세포에 미치는 세포독성 여부를 측정하기 위해 96 well에 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양한 후에 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효한 유청발효액을 1, 50, 100 µg/well를 처리하여 37℃, 5% CO_2의 상태에서 24시간 배양 후 WST (Water soluble tetrazolium) assay를 실시하였다. EZ-Cytox WST assay reagent (Daeil Lab Service Co., LTD, Seoul, Korea)을 10 µl 첨가하고 2시간 후에 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다

Cytokine 발현

24-well (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 4×10^5 cells/ml로 조정하여 24시간 배양 후 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 유청발효액을 HMC-1에 1, 50, 100 µg/ml로 처리한 뒤 0, 6, 12, 24시간 동안 배양 후 allergy 및 pro-, anti-inflammatory cytokine인 IL-4, IL-8의 mRNA의 발현은 PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 수행하였다. Positive control은 phorbol myristate acetate (PMA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 µg/ml을 처리하였다. 배양한 세포를 회수하여 1 ml의 TRizol (Invitrogen Corporator, Carlsbad, CA, USA)을 넣고 10분 동안 방치한 후 chloroform을 넣고 10초 동안 격렬하게 흔든 다음 15,000× g에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들어주었다. 15,000× g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 diethyl pyrocarbonate (DEPC) - DW 60 µl에 녹여 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR kits (Madison, WI, USA; Oligo dT, dNTP mix, Ribonuclease inhibitor, M-MLV Reverse Transcriptase, M-MLV RT 5×buffer)를 사용하여 45℃에서 30분, 94℃에서 5분 동안 반응시킨 후 94℃에서 30초 동안 denaturation 시키고, 55~62℃에서 30초 동안 annealing 시킨 다음, 72℃에서 1분 동안 extension시키는 cycle을 24~27회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72℃에서 5분 동안 PCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에 주입하고 100 V 조건에서 15분 동안 전기영동을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 glutaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): R:CCATCACCATCTTCCAGGAG F:ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT; Human IL-4: R:TCTCACCTCCCAACTGCTTCC F:CGTTTCAGGAATCGGATCAGC, IL-8: F:ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT R:TCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTCTC이다.

Cytokine 정량 분석

Kefir로 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효한 유청발효액을 세포에 처리 후 분비된 IL-4, IL-8의 정량은 enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) kit (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다. ELISA kit에 IL-4, IL-8의 표준 농도를 조정하고, 측정하고자 하는 시료를 처리한 세포배양액 50 µl를 well에 넣고 상온에서 2시간 반응시킨다. 반응이 완료되면 세척 후 100 µl의 detection antibody 용액을 넣고 상온에서 1시간 반응시킨다. 반응이 완료되면 세척 후 Avidin-HRP 용액을 상온에서 30분 반응시킨다. 반응이 완료되면 세척 후 기질용액을 100 µl 넣고 상온에서 15분 반응시킨다. 반응이 끝나면 정지용액을 100 µl 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준 그래프를 이용하여 IL-4, IL-8을 정량했다.

통계처리

통계분석은 MYSTAT statistical analysis program (ver 2.0, Korea)과 IBM SPSS Statistics 21 (version 21.0, IBM Co., USA)을 사용하여 평균, 표준편차 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균수 및 효모수

Kefir로 37℃에서 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효시킨 유청발효액의 유산균수를 조사한 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같다. 배양 시작 시간에는 6.5×10^5 CFU/ml, 16시간에는 1.83×10^8 CFU/ml로 최대로 성장하였고, 48시간에는 1.72×10^8 CFU/ml로 유지되었는데 유청에 포함된 유당이 유산균의 증식에 영향을 미친 것으로 판단된다. 또한 효모수는 Fig. 1B에 나타난 바와 같은데 배양 8시간에 효모수가 6.5×10^5 CFU/ml로 최대로 성장하였고 그 이후에는 약간 감소하면서 48시간까지 그대로 유지되었다. 이와 같이 유청에 kefir를 배양시키면 유산균은 유당을 이용하고 효모는 유당발효성 효모가 유당을 이용하기 때문에 성장을 잘 하는 것으로 나타났다.

pH와 적정산도 변화

Kefir로 배양한 유청발효액의 pH는 Fig. 1C에 나타내었다. pH는 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 배양 시간이 지남에 따라 유산균과 효모의 숫자가 증가하여 유산 생산 양이 증가하면서 pH가 급속히 낮아져 배양 16시간에는 5.3, 배양 48시간에는 4.7로 감소하였다. 적정산도는 Fig. 1D에 나타난 바와 같다. 유산균과 효모가 증식하면서 유산의 생산이 증가하여 적정산도는 배양 48시간에는 0.8%로 증가되어, 요구르트의 적정산도 0.8-1.0%와 유사한 수준으로 유청발효액도 적정산도를 유지할 수 있음을 알 수 있다.

점도

Kefir로 배양한 유청발효액의 점도는 Fig. 1E에 나타난 바와 같다. 유청에 고형분 함량이 낮아 배양시간에 상관없이 점도는 낮은 수준으로 변화가 없었다.

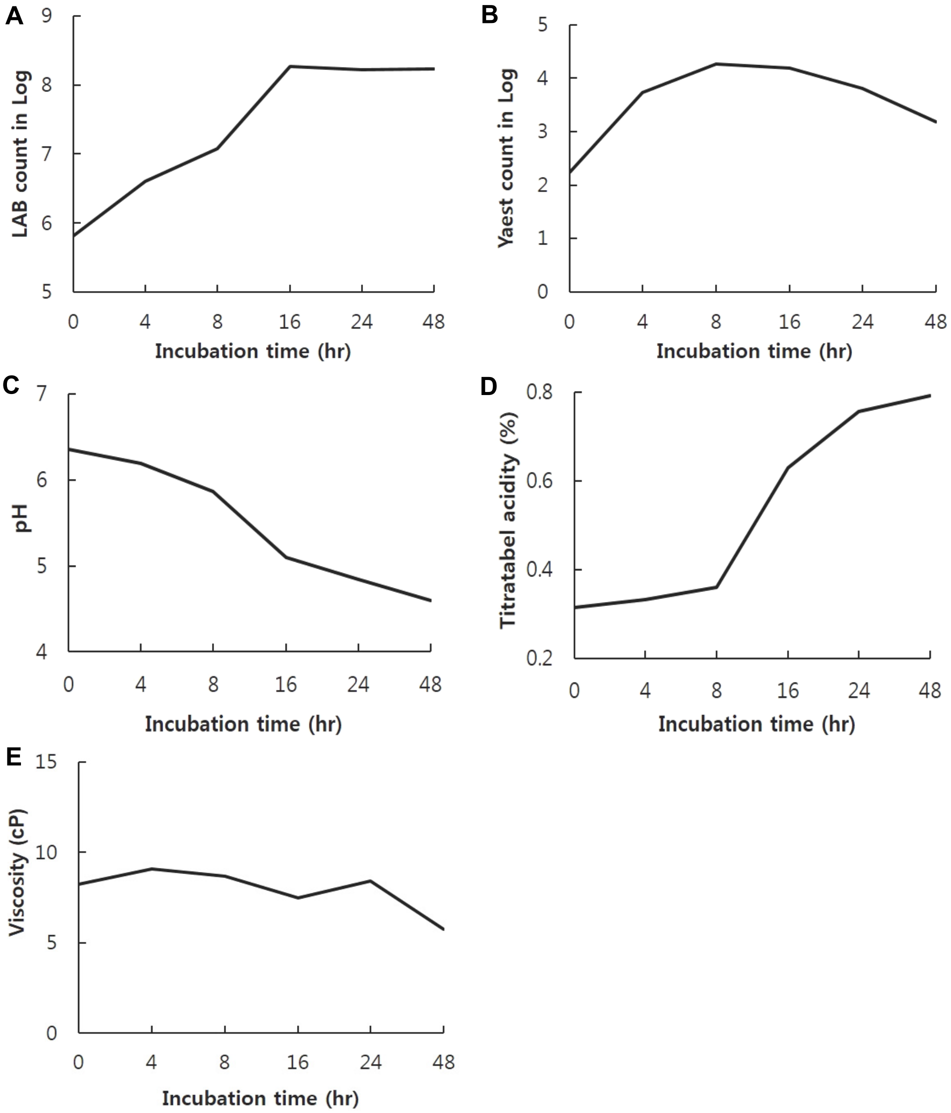

Fig. 1. Properties of fermented whey by Kefir grain for 48 hr at 27℃. (A) viable cell count of lactic acid bacteria, (B) yeast cell count, (C) pH, (D) titratable acidity, (E) viscosity

유당의 변화

Kefir로 배양한 유청발효액의 유당변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 배양시간이 경과하면서 유당은 분해되어 단당류인 glucose와 galactose로 분해되어 glucose는 유산균과 효모가 이용하고 galactose는 조금씩 증가됨을 알 수 있다. 유청에는 유당이 약 4.5-5.0% 정도 높게 함유되어 있어 배양 48시간이 경과되어도 분해되지 않은 유당이 존재하였다.

유청단백질의 변화

Kefir로 발효한 유청발효액의 유청단백질 양상은 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 0, 24, 48, 72시간 동안 발효하는 과정에서 유청단백질의 변화가 있는 것으로 나타났다. BSA (bovine serum albumin, 69 kDa), β-LG (ß-lactoglobulin, 18.3 kDa), 그리고 α-LA (α-lactalbumin, 14 kDa)[14] 중 BSA와 α-LA는 분자량이 작은 peptide들로 분해되어 전기영동상에서 나타나지 않았고, β-LG는 분해되지 않았는데 이는 kefir 대사물질들 중 β-LG를 분해시키는 효소가 없는 것으로 추론한다. Kefir로 발효하는 과정 중 대사물질에 의해 유청단백질들이 분해되어 다양한 peptide들이 생성되고, 이러한 peptide들은 여러 가지 생리활성 기능을 나타내는 것으로 사료된다.

HMC-1 세포 생존율

HMC-1 세포주에 kefir로 발효시킨 유청발효액을 처리하여 WST assay를 통하여 세포 독성을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. WST는 수용성의 tetrazolium salt가 살아있는 세포와 반응하여 fomazan을 생성하여 세포내의 모든 dehydrogenase와 반응하여 세포의 상태를 명확하게 파악하는 것이 가능하다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 유청발효액은 HMC-

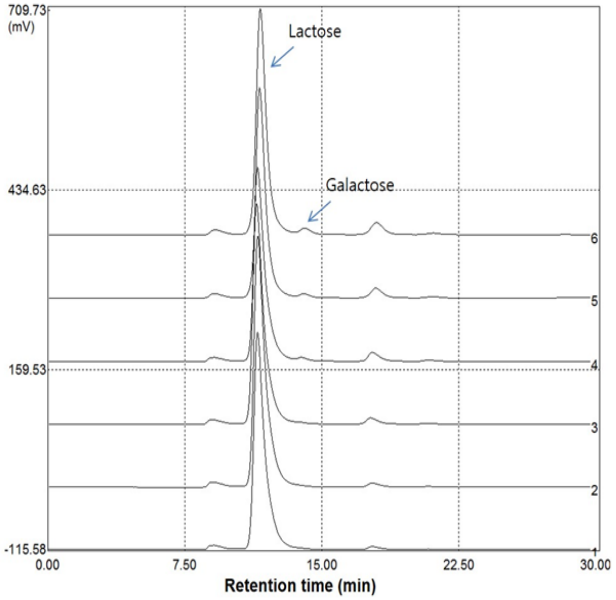

Fig. 2. HPLC analysis of lactose hydrolysis on fermented whey by Kefir grain for 48 hr at 27℃. Incubation time : 1; 0 hr, 2; 4 hr, 3; 8 hr, 4; 16 hr, 5; 24 hr, 6; 48 hr

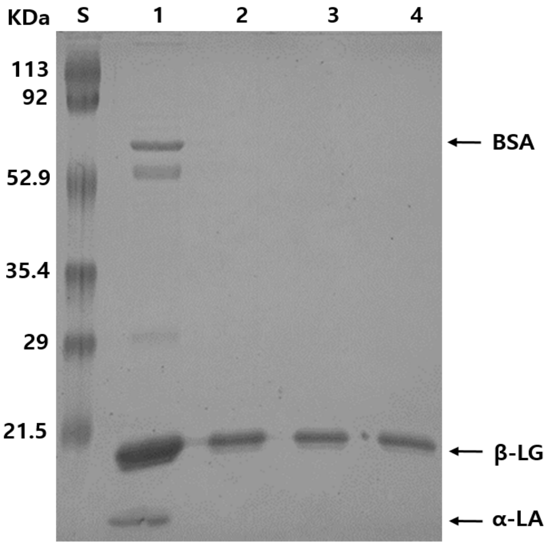

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of whey protein on fermented whey by Kefir grain for 72 hr at 27℃. S : Standard molecular marker, Lane 1 : fermentation for 0 hr, Line 2 : fermentation for 24 hr, Line 3 : fermentation for 48 hr, Line 4 : fermentation for 72 hr. BAS : bovine serum albumin, β-LG (β-lactoglobulin), α-LA (α-lactalbumin).

1 세포의 성장을 저해하는 독성이 없는 것으로 나타났다. 대조군을 100% 기준으로 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 유청발효액은 대조군보다 높은 생존율을 보임으로서 유청발효액이 세포성장에 어떠한 독성효과도 나타나지 않았다.

Cytokine 발현

Kefir로 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 배양한 유청 발효액을 각각 HMC-1 세포에 1, 50, 100 μg/ml로 처리한 다음 IL-4와 IL-8의 발현을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. IL-4는 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효시킨 발효액을 각각 HMC-1 세포에 처리한 결과 발효 0 시간에는 발현이 일어나지 않았고, 4, 8, 16, 24시간 발효액에서 IL-4의 발현은 positive control인 PMA 처리에 비해서는 약하게 일어났지만, 48시간 배양액에서는 발현이 일어나지 않음을 확인하였다. IL-8은 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 발효시킨 발효액을 HMC-1 세포에 처리한 결과 IL-4의 발현양상과 비슷하게 발현이 되었지만, 4, 8시간에 강하게 발현이 일어났고 48시간 배양한 배양액에서는 발현이 일어나지 않음을 알 수 있다. 이와 같이 kefir 발효액의 배양 초기에 비해 배양 시간이 길어짐에 따라 IL-4와 IL-8의 발현이 저해됨은 kefir 발효물의 발효 초기 보다는 48시간 배양액의 다양한 대사산물들에 의해 저해되기 때문으로 사료된다.

Cytokine 생산

HMC-1세포에서 IL-4와 IL-8의 발현을 조사 후 세포배양액

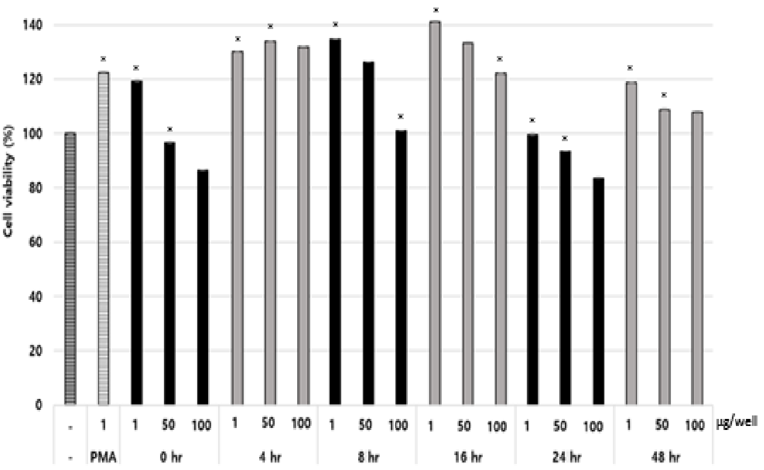

Fig. 4. Effect of fermented whey by kefir grain on the cell viability (WST-1) in HMC-1 cells for 24 hr at 37℃. Different concentrations of fermented whey by kefir grain were treated to HMC-1 cells. Incubation of fermented whey by kefir grain is 0, 4, 8, 16, 24, 48 hr. Each bar represents the average ± SE of three independent experiments. PMA (1 μg/ml) treatment alone served as a positive control. Level of significance was identified statistically compare with control using Duncan's multiple range test (*p<0.05).

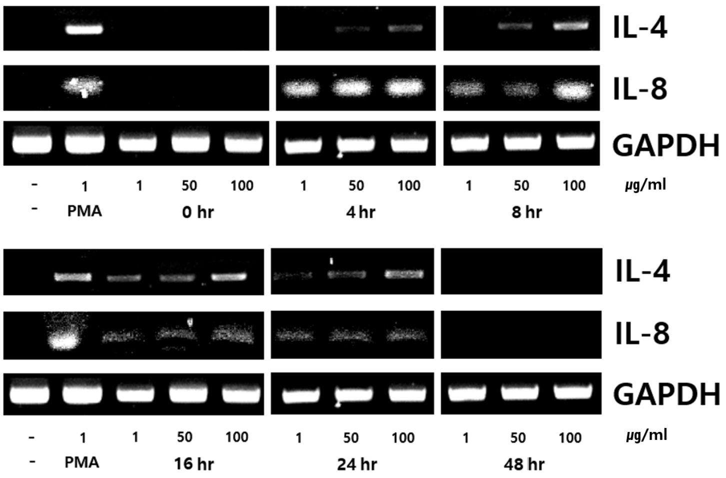

Fig. 5. Cytokine expression after treated with fermented whey by kefir grain in HMC- 1 cells. Different concentrations (1, 50, 100 μg/ml) of fermented whey by kefir grain were treated to HMC-1 cells. Incubation of fermented whey by kefir grain is 0, 4, 8, 16, 24, 48 hr.

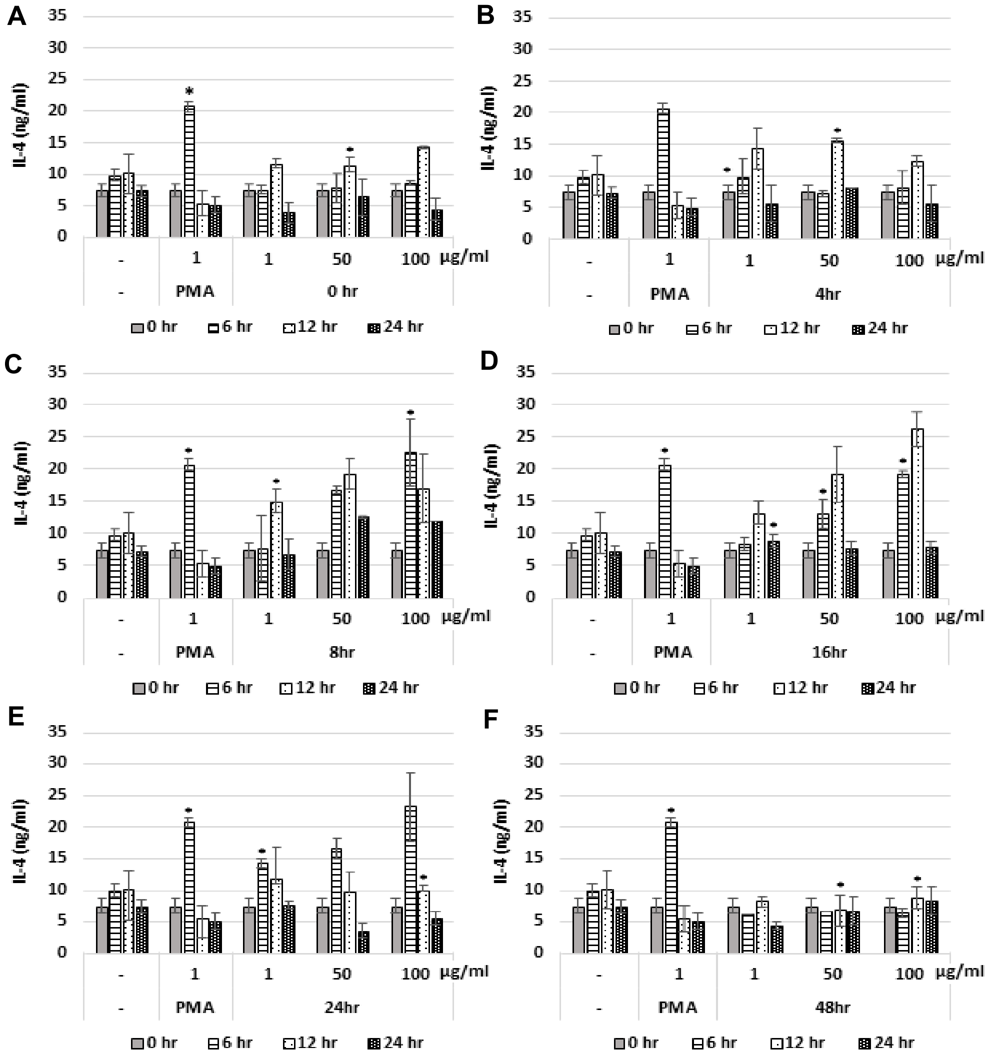

Fig. 6. The concentration of expression of IL-4 in HMC-1 cells for 24 hr at 37℃. Different concentrations (1, 50, 100 μg/ml) of fermented whey by Kefir grain were treated to HMC-1 cells. Incubation of fermented whey by kefir grain is (A) 0 hr, (B) 4 hr, (C) 8 hr, (D) 16 hr, (E) 24 hr, (F) 48 hr. Each bar represents the average ± SD of three independent experiments. PMA (1 μg/ml) treatment alone served as a positive control. Level of significance was identified statistically compare with control using Duncan's multiple range test (**p*<0.05).

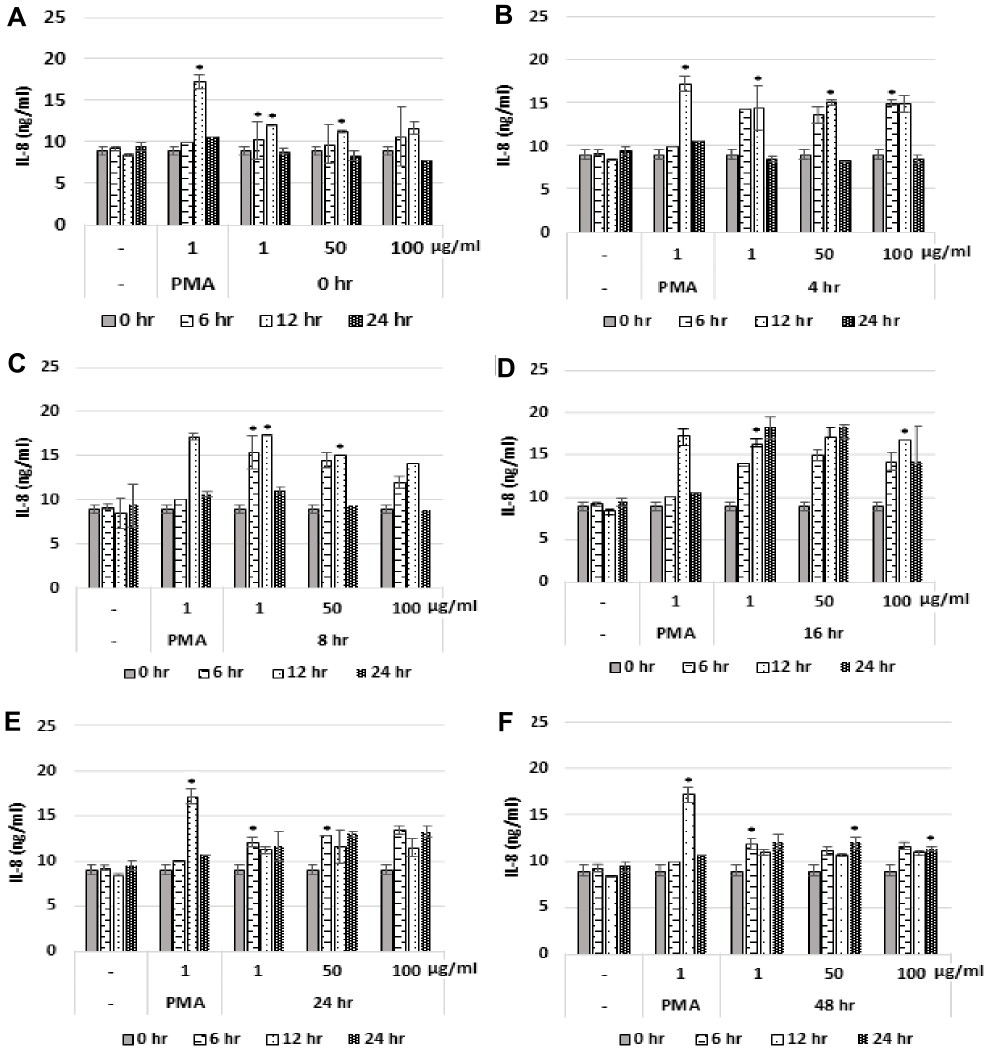

Fig. 7. The concentration of expression of IL-8 in HMC-1 cells for 24 hr at 37℃. Different concentrations (1, 50, 100 μg/ml) of fermented whey by Kefir grain were treated to HMC-1 cells. Incubation of fermented whey by kefir grain is (A) 0 hr, (B) 4 hr, (C) 8 hr, (D) 16 hr, (E) 24 hr, (F) 48 hr. Each bar represents the average ± SD of three independent experiments. PMA (1 μg/ml) treatment alone served as a positive control. Level of significance was identified statistically compare with control using Duncan's multiple range test (*$p<0.05$).

에 함유된 분비량을 측정한 결과는 Fig. 6과 7에 나타내었다. IL-4의 분비양상을 보면 HMC-1세포에 발효액을 1, 50, 100 μg/ml 처리 후 4시간 유청발효액 처리구는 15 ng/ml 전후였고 8, 12, 24시간 유청발효액 처리구는 20-25 ng/ml 전후로 유의적으로 분비되었다. 48시간 유청발효액 처리구를 6, 24시간 반응시킨 경우도 유의적으로 5 ng/ml 전후로 낮게 분비되었다(Fig. 6). Kefir 유청발효액의 처리에 따른 IL-4의 발현 결과와 동일하게 배양 초기에 비해 배양 시간이 길어짐에 따라 IL-4의 생산이 저해됨은 kefir 유청발효물의 발효 초기 보다는 48시간 배양액에서 다양한 대사산물들에 의해 저해되기 때문으로 사료된다.

Mast cell은 Th2 type의 cytokine을 분비하며 항염증 및 allergy와 관련된 물질로 알려진 IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α등을 분비한다. Th2세포는 B세포를 활성화하여 외부에서 들어오는 이물질에 대항하게 한다. Th2 type의 대표적 cytokine인 IL-4는 mast cell에서 분비된다[6]. Fig. 6에 나타난 바와 같이 IL-4는 48시간 동안 발효시킨 유청발효액을 처리한 경우 HMC-1 세포에서 분비가 저해됨을 알 수 있는데, 이는 유청발효액이 allergy와 관련이 있는 IL-4의 분비를 저해시켜 allergy를 저감시키는 것으로 생각된다. 한편 BALB/c mice의 복강에 ovalbumin (OVA)를 투여하여 감작시킨 후 kefir로부터 분리한 *Lactobacillus kefiranofaciens* M1과 *Lactobacillus kefiranofaciens* M2를 투여한 후 cytokine과 IgE 분비를 조사한 바, allergy 증상을 유도하는 cytokine은 Th1/Th2 cytokine의 분비 균형에 의해 조절되고, IgE의 양은 *Lactobacillus kefiranofaciens* M1의 섭취양이 증가함에 따라 감소되었다고 보고하였는데[13],

이는 kefir 유청 발효물을 HMC-1 세포에 처리했을 때 IL-4의 분비를 억제하여 allergy를 저감시키는 결과와 유사하다고 할 수 있다.

한편, rat에 육아종양을 유도하고 Tibetan mushroom (TM) 배양액을 처리하여 육아종양의 무게를 측정하였는데 대조군에 비해 42±5%가 감소되었고, rat 발에 dextran을 주입시켜 부종을 유발시키고 TM grain을 섭취시켰을 때 대조군에 비해 53±18% 가 억제됨을 알 수 있었고, histamin을 주입시켜 부종을 유발한 경우는 TM 현탁액과 파쇄시킨 TM grain을 섭취시켰을 때 각각 52±26%와 43±22%의 억제 효과가 나타났다고 보고하였다[9]. 이와 같이 kefir 발효액이 부종을 완화시키는 것은 allergy 증상의 저감화와 상통하는 결과이다. IL-8은 mast cell에서 분비되어지며 neutrophils, T-lymphocytes, eosinophils과 관련되어 염증에 영향을 주는 인자로써 활동한다[6]. Fig. 7은 IL_8의 생산량을 측정한 결과로 kefir로 0, 4, 8, 16, 24, 48시간 동안 발효한 유청발효액을 세포에 처리한 경우 4, 8, 16시간 동안 발효한 유청발효액을 HMC-1 세포에 6, 12시간 반응시켰을 때 IL-8은 15-20 ng/ml 전후로 유의적으로 분비되었다. 그러나 24시간 유청발효액으로 6, 12, 24시간 처리구는 11-13 ng/ml, 48시간 유청발효액으로 6, 12, 24시간 처리구는 8 ng/ml 정도로 IL-8의 분비가 저해됨을 알 수 있는데, 이 또한 kefir 유청발효액이 배양 초기에 비해 배양 시간이 길어짐에 따라 IL-8의 발현이 저해되는 결과와 동일한 것으로 kefir 유청발효액의 발효 초기 보다는 48시간 배양액의 다양한 대사산물들에 의해 유청발효액이 염증 관련 cytokine인 IL-8의 분비를 저해시켜 염증반응을 저감시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년 충남대학교 학술연구지원사업(과제번호 : 2015-1179-01)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Bensmira, M., Nsabimana, C. and Jiang, B. 2010. Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Food Sci. Technol.* **43,** 1180-1184.
2. Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U. and Stohs, S. J. 1994. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother. Res.* **8,** 78-82.
3. Chen, Z., Shi, I., Yang, X., Nan, B., Liu, Y. and Wang, Z. 2015. Chemical and physical characteristics and antioxidient activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *Int. Dairy J.* **43,** 15-21.
4. Cheirsilp, B. and Radchabut, S. 2011. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. *N. Biotechnol.* **28,** 574-580.
5. Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **11,** 254-262.
6. Coico, R. and Sunshine, G. 2009. *Immunology, A short course.* 14. Hypersensitivity: Type I. pp. 221-235, 6th ed., John Wiley & sons, Inc., : Hoboken NJ, USA.
7. *Dairy Statistics Year Book*. 2014. pp. 226, ed., Published by Korea Dairy Committee. Sejong, Korea.
8. Dave, R. I. and Shah, N. P. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.* **81,** 2804-2816.
9. Diniz, R., Garla, I., Schneedorf, J. and Carvalho, J. C. 2003. Study of antiinflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacol. Res.* **47,** 49-52.
10. Farnworth, E. R. and Mainville, I. 2003. *"Kefir: a fermented milk product" in Handbook of Fermented Functional Foods.* pp. 77-112, ed., CRC Press: Boca Raton, FI, USA.
11. Fontan, M. C, G., Martinez, S., Franco, I. and Carballo, J. 2006. Microbiological and chemical changesJuring the manufactureof Kefir made from cow's milk, using a commercial starter culture. *Int. Dairy J.* **16,** 762-767.
12. Garrote, G. L., Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. 2010. "Microbial Interactions in Kefir: a natural probiotic drink", pp. 327-340, ed., In: Mozzi, F., Raya, R. R. and Vignolo, G. M. (eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria.* Wiley-Blackwell: Ames, IA, USA.
13. Hong, W. S., Chen, Y. P. and Chen, M. J. 2010. The anti-allergic effect of Kefir Lactobacilli. *J. Food Sci.* **75,** H244-253.
14. Marshall, K. R., 1982. Industrial Isolation of Milk Protein: Whey Proteins. pp. 339-374. ed., In: Fox, P. F. (eds.), Development in Dairy Chemistry-1. Proteins. Applied Science publishers, London and York.
15. Prado, M. R., Blandon, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology.* Doi:10.3389/fmicb.2015.01177.
16. Rodrigues, K. I., CarvalhoJ, C. T. and Schneedorf, J. M. 2005. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology* **13,** 485-492.
17. Schägger, H. and von Jagow, G. 1987 Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kD. *Analytical Biochem.* **166**, 368-379.
18. Serafini, F., Turroni, P., Ruas-Madiedo, G. A. Lugli, C., Milani, S., Duranti, N., Zamboni, N., Bottacini, F., Sinderen, D. V., Margolles, A. and Ventura, M. 2014. Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene exoression. *Int. J. Food Microbiol.* **178,** 50-59.
19. Spreer, E. (Original Author) and Mixa, A. (Translated) 1998. *Milk and Dairy Product Technology.* pp. 405-422. ed., Marcel Dekker: Madison Avenue, NY, USA.
20. St-Onge, M., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu,

A. and Jones, P. J. 2002. Kefir consumption does not alter- plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesisrates relative to milk in hyperlipidemicmen:a randomized controlled trial. *BMC Complement. Altern. Med.* 2:1. Doi: 10.1186/ 1472-6882-2-1.

21. Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. 2008. Physiocochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.* **43,** 283-288.

초록 : Kefir grain에 의한 유청발효액의 특성과 human mast cell-1 (HMC-1)에서 염증 cytokine 조절에 미치는 영향

손지윤[1] · 박영우[2] · 렌친핸드[1] · 한정필[1] · 범진우[1] · 백승희[3] · 이조윤[4] · 남명수[1*]
([1]충남대학교 동물바이오시스템과학과, [2]포트벨리 주립대학교 농업연구본부, [3]연암 대학 외식산업계열, [4]중부대학교 관광보건대학)

Kefir는 약한 신맛과 백색의 끈적한 특징을 가지는 산성-알코올성 발효유제품이다. Kefir는 오랫동안 probiotic 미생물로 면역조절 효과를 포함한 건강에 도움이 되는 발효유로 알려져 왔다. 본 연구는 Kefir grain를 이용한 유청발효액의 발효특성과 pro-inflammatory cytokine의 발현과 분비에 미치는 영향을 *in vitro* 실험을 통하여 조사하기 위해 수행했다. Kefir grain를 이용한 유청발효액의 유산균수와 효모수는 발효 16시간에 최고 수준인 1.83×10^8 CFU/ml, 6.5×10^5 CFU/ml로 나타났다. 또한 유당과 유청단백질은 부분적으로 가수분해되었다. Human mast cell (HMC)-1을 이용하여 *in vitro*에서 조사한 항염증 효과는 8, 16, 24시간 동안 발효한 유청발효액에서 pro-inflammatory cytokine인 interleukin (IL)-4가 발현되었으나 48시간 유청발효액에서는 발현되지 않았다. 또한 IL-8도 8, 16, 24시간 동안 발효한 유청발효액에서 발현되었으나 48시간 유청발효액에서는 발현되지 않았다. 이러한 cytokine들의 분비는 IL-4는 8, 16, 24시간 동안 발효한 유청발효액에서는 20-25 ng 정도였으나 48시간 유청발효액에서는 5 ng 정도로 낮았다. IL-8은 8, 16, 24시간 발효한 유청발효액에서는 15-20 ng 분비되었으나 48시간 유청발효액에서는 8 ng 정도로 낮았다. 이와 같이 Kefir grains을 이용한 유청발효액은 항염증 기능이 있어 기능성 식품소재와 의약품 소재로 응용할 수 있을 것으로 판단된다.