

FOOD&CHEMISTRY

# Properties of hydrolyzed $\alpha$ -lactalbumin, $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin by the alcalase and its immune-modulation activity in Raw 264.7 cell

Jae Min Yu<sup>1</sup>, Ji Yoon Son<sup>1</sup>, Gerelyuya Renchinkhand<sup>1</sup>, Kwang-Yeon Kim<sup>1</sup>, Jae Young Sim<sup>2</sup>, Myoung Soo Nam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Bio-system Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

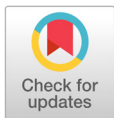
<sup>2</sup>Dairy and Food Science Department, South Dakota State University, Brookings, South Dakota, SD 57007, USA

\*Corresponding author: [namsoo@cnu.ac.kr](mailto:namsoo@cnu.ac.kr)

## Abstract

This study investigated the effects of the proteolytic hydrolysates of  $\alpha$ -lactalbumin (LA),  $\beta$ -lactoglobulin (LG) and bovine serum albumin (BSA) by alcalase on inflammatory cytokines. The proteolytic hydrolysates were separated into two fraction of peptides,  $\leq 10,000$  Da and  $> 10,000$  Da, respectively, because various low molecular weight peptides were generated during the hydrolysis reaction time. Among the hydrolysate peptides, BSA (all types),  $\beta$ -LG ( $> 10,000$  Da), and  $\alpha$ -LA ( $> 10,000$  Da) showed an inhibitory activity against thymic stromal lymphopoietin (TSLP) mRNA expression in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 murine macrophages.  $\alpha$ -LA ( $> 10,000$  Da),  $\beta$ -LG (hydrolysates), and BSA ( $> 10,000$  Da) showed an inhibitory activity against tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  expression.  $\alpha$ -LA (all types),  $\beta$ -LG (hydrolysates,  $> 10,000$  Da), and BSA ( $> 10,000$  Da) showed an inhibitory activity against interleukin-6 (IL-6) expression.  $\alpha$ -LA ( $> 10,000$  Da),  $\beta$ -LG ( $> 10,000$  Da), and BSA (all types) showed an inhibitory activity against inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression.  $\alpha$ -LA ( $> 10,000$  Da),  $\beta$ -LG ( $> 10,000$  Da), and BSA (all types) showed an inhibitory activity against cyclooxygenase (COX)-2 expression. The lowest level of TNF- $\alpha$  production was measured with  $\alpha$ -LA ( $> 10,000$  Da) and  $\beta$ -LG ( $> 10,000$  Da) for all types, and a similar low level was measured for all types of BSA. The highest level of IL-6 production was measured with  $\alpha$ -LA ( $\leq 10,000$  Da) among  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, and IL-6. The low level of NO production was similar with  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, and BSA but not with  $\alpha$ -LA ( $\leq 10,000$  Da). These potential peptides from whey protein hydrolysates could be used for food, medicinal, and industrial applications.

**Keywords:** cyclooxygenase (COX)-2, interleukin-6 (IL-6), peptides, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$



## OPEN ACCESS

**Citation:** Yu JM, Son JY, Renchinkhand G, Kim KY, Sim JY, Nam MS. 2020. Properties of hydrolyzed  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin by the alcalase and its immune-modulation activity in Raw 264.7 cell. Korean Journal of Agricultural Science 47:459-470. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200035>

**Received:** April 17, 2020

**Revised:** June 25, 2020

**Accepted:** July 10, 2020

**Copyright:** © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Introduction

우유 단백질로부터 유래된 peptides는 건강에 유익한 효과를 나타내는 면역조절 기능이 있는 식품으로 인식되어지고 있고(Gill et al., 2000), 우유와 유제품은 지난 30 - 40년에 걸쳐 영양적인 측면을 뛰어넘어 우수한 골다공증, 고혈압, 체중 증가와 체지방, 결장암을 포함한 만성질환의 위험 감소에 도움을 주었다(Huth et al., 2004). 유청은 치즈 제조과정에서 얻어지는 부산물로 버려지는 산물로 생각되어져 왔는데 영양학적으로 응용 가치를 높일 수 있는 기능성 식품으로서 유청을 재발견을 했다(Walzem et al., 2002). 유청에 포함된 유청단백질은  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulins, enzymes, glycomacropeptides와 같은 성분들이 존재한다. 유청단백질은 면역 활성의 향상뿐만 아니라 필수아미노산을 공급한다(Marshall, 2004). 우유 단백질의 가수분해물에 대한 생리활성 기능 연구는 지금까지 많이 진행되어 왔고 유청단백질도 예외는 아니다(Smyth and Fitz-Gerald, 1998). 우유 단백질 가수분해물의 생리활성 peptides에 대한 연구를 보면 항고혈압 peptides로써 angiotensin-II, enkephalins (Petrillo and Ondetti, 1982), ACE-inhibitory peptides (Gobbetti et al., 2004), 우유단백질로부터 유래된 casokinins라 명명된 peptide (Meisel and Schlimme, 1994), 유청단백질로부터 유래된 lactokinins로 명명된 peptide (FitzGerald and Meisel, 2000)이 있다. 항산화 peptides에 관한 연구 보고는  $\alpha$ <sub>s</sub>-casein으로부터 유래된 peptide (Suetsuna et al., 2000; Rival et al., 2001), 유청단백질로부터 유래된 peptide (Bounous and Gold, 1991) 등이 있다. 또한  $\beta$ -lactoglobulin으로부터 유래된 cholesterol 흡수 저해 peptides는 Nagoaka et al. (2001)가 보고했고, morphine과 같은 통증완화 기능이 있는 opioid agonists 역할을 하는 peptides는  $\alpha$ <sub>s1</sub>-casein-exorphin ( $\alpha$ <sub>s1</sub>-CN f90-96),  $\beta$ -casomorphins-7 과 -5 ( $\beta$ -CN f60-66 과 f60-64), lactorphins ( $\alpha$ -lactalbumin f50-53,  $\beta$ -lactoglobulin f102-105)이 있고, opioid antagonists는 casoxins ( $\kappa$ -CN f35-42, f58-61, f25-34) (Meisel and FitzGerald, 2000; Gobbetti et al., 2007)이 있다. 항균작용 peptides는 bovine lactoferrin과 human lactoferrin 유래의 lactoferricins (Kitts and Weiler 2003; Wakabayashi et al., 2003)은 pepsin 분해 효소에 의해 생성된 peptides이다. 우유단백질의 peptides가 염증반응에 미치는 영향에 관한 연구는 Carvalho-Silva et al. (2012)와 Tavares et al. (2013)가 보고하였다.

염증관련 cytokine들의 특성을 보면 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)는 아토피 피부질환과 알레르기 관련 cytokine이고(Yoo et al., 2005), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 는 세포신호전달 단백질로 대식세포와 T세포에 의해 주로 생산되며 염증 반응에 관여한다(Zelová and Hošek, 2013). 또한 interleukin (IL)-6는 T세포와 기타 세포에서 생산되며 T 세포 활성화 및 B세포 항체 분비 촉진 역할을 한다. 또한 염증, 면역반응 및 조혈에 관한 다양성 효과를 갖는 가용매개체이다(Tanaka et al., 2014). Nitric oxide (NO)는 대식세포와 기타 다른 세포에서 생산되는 cytokine으로 신호전달 분자로서 염증의 병인에 중요한 역할을 한다. 정상적인 생리적 환경에서는 항염증반응을 하지만, 불균형된 생산은 혈관수축, 염증 및 조직 손상을 야기한다(Sharma et al., 2007). Cyclooxygenase (COX)-2는 주로 염증매개 물질에 의해 유도되는 효소로 외부의 자극에 의해 통증과 염증을 유발하는 prostaglandin 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Seibert and Masferrer, 1994).

본 연구는 우유 유청단백질인  $\alpha$ -lactalbumin (LA),  $\beta$ -lactoglobulin (LG), bovine serum albumin (BSA)를 alcalase 효소로 가수분해하여 생성된 peptides가 염증관련 cytokine인 TSLP, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현과 생성에 미치는 영향을 마우스 대식세포인 Raw264.7 cell을 이용하여 조사하였다. 이러한 결과를 바탕으로 유청 단백질을 이용한 식품 소재 또는 이를 강화한 발효유 제조의 소재로 활용하기 위한 기초자료를 얻기 위해 수행하였다.

## Materials and Methods

### 유청단백질 준비

유청단백질 준비는 Renchinkhand et al. (2012)의 방법에 따라  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA를 정제하고 4°C 냉장고에 저장하면서 실험에 이용하였다.

### 유청단백질 가수분해물 제조 및 10,000 Da $\leq$ , 10,000 Da $>$ 분리

분리된  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA를 2% 용액으로 조정하고 alcalase (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) (1 : 100, v/v) 효소를 첨가하고 40°C, pH 8.0 조건에서 180분 동안 가수분해시키고 분해된 산물을 4°C, 12,000  $\times$  g 조건에서 25분 동안 원심분리하고 supernatant을 수집하여 HPLC로 peptides 분해 양상을 관찰하였다. 수집한 supernatant을 hydrolysates (가수분해물 전체)와 Vivaspin 6 tube (GE Healthcare, Chicago, USA)를 사용하여 4°C, 10,000  $\times$  g에서 1시간 동안 원심분리하고 10,000 Da  $\leq$ 과 10,000 Da  $>$  으로 분리하여 -20°C에 저장하면서 실험에 사용하였다.

### 분자량에 따른 가수분해물의 peptides 양상

가수분해가 끝난 유청단백질의 peptides 양상은 HPLC (Waters, USA)로 분석하였고 시료는 0.5 mg/mL로 조정하여 C18 column (Vydac218TPTM, Grace Division Discovery Science, USA)에 주입하였다. 유동상은 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)가 함유된 acetonitrile과 0.1% TFA가 함유된 증류수를 사용하였다. HPLC 작동 조건은 Table 1과 같다.

**Table 1.** Operation condition of HPLC.

Column	C18 (4.6 $\times$ 250 mm)
Flow rate	1 mL $\cdot$ min <sup>-1</sup>
Elution solution	A: 0.1% TFA (distilled water) B: 0.1% TFA (acetonitrile)
Elution time	40 min (linear gradient)
Inject volume+	20 $\mu$ L (2 mg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ), non-hydrolysates 20 $\mu$ L (5 mg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ), hydrolysates
Absorbance	214 nm

TFA, trifluoroacetic acid.

### 세포 배양

Raw264.7 cells는 한국생명공학연구원(Daejeon, Korea)에 분양 받았고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Rockville, MD, USA), 과 1% (100 U  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>) penicillin/streptomycin (Sigma, St. Louis, USA)을 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 대기 습도가 유지되는 배양조건에서 배양하였다. 24 well (Sigma, St. Louis, USA)에 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 조정하여 24시간 배양 후 양성대조구로 LPS를 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>을 처리하고,  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, BSA 각각 alcalase로 처리한 가수분해물 전체(hydrolysates), 분자량 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  으로 구분하여 50  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>의 농도로 세포에 처리하여 3시간 배양 후 RT-PCR로 cytokine의 발현을 조사하였다.

## TSLP, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2의 발현

RT-PCR을 시행하기 위해 3시간 배양한 Raw264.7 cells의 배지 상층액을 제거한 뒤 1 mL의 TRizol (Invitrogen Co., Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)을 넣고 5분 동안 방치한 후 chloroform을 넣고 10초 동안 vortexing하고 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후, 상층액을 취하여 500  $\lambda$  isopropanol을 혼합하여 inverting을 했다. 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 75% 에탄올에 washing하여 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 다음 DEPC로 pellet을 녹여 정량 한 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 RT-PCR을 시행하기 위해 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후 94°C에서 30초 동안 denaturation시키고, 55 - 60°C에서 30초 동안 annealing시킨 다음, 72°C에서 30초 동안 extension시키는 cycle을 22 - 32회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5분 동안 Gene Amp PCR system-2700 (Applied Biosystems, Foster, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 20분 동안 전기영동을 통하여 분석하였다. TSLP, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 2).

**Table 2.** The primers for RT-PCR analysis.

Primer	Sequence
Mouse TSLP	Forward 5'- CGACAGCAITGGTTCTTCTCA -3' Reverse 5'- GGACTTCTGTGCCATTTC -3'
Mouse IL-6	Forward 5'- CCGGAGAGGAGACTTCACAG -3' Reverse 5'- GGAAATTGGGGTAGGAAGGA -3'
Mouse TNF- $\alpha$	Forward 5'- TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC -3' Reverse 5'- CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC -3'
Mouse iNOS	Forward 5'- CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG -3' Reverse 5'- GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA -3'
Mouse COX-2	Forward 5'- TTGAAGACCAGGAGTACCGC -3' Reverse 5'- GGTACAGTCCCATGACATCG -3'
GAPDH	Forward 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' Reverse 5'- CACCACCCTGTTGCTGTAGCC -3'

TSLP, thymic stromal lymphopoietin; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; iNOS, induced nitric oxides synthesis; COX-2, cyclooxygenase-2; GAPDH, glyceride-3-phosphate dehydrogenase.

## TNF- $\alpha$ , IL-6 생산

RAW264.7 cells를  $2 \times 10^5$  cells·mL<sup>-1</sup>의 세포수가 되도록 조정하여 위와 같은 조건으로 20시간 배양 후 상층액을 모아 mouse 용 enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) kit (BD Bioscience, Oxford, UK) 방법에 따라 5 - 10분간 상온에서 incubation을 한 뒤 520 - 550 nm 사이의 파장 값으로 TNF- $\alpha$ , IL-6를 측정하였다.

## NO 생산

RAW264.7 cells를  $2 \times 10^5$  cells·mL<sup>-1</sup>의 세포수가 되도록 조정하여 위와 같은 조건으로 20시간 동안 배양 한 후 배양액을 수거하여 96 well plate에 50  $\lambda$ 씩 분주를 하고 griess reaction을 수행한다. Sulfanilamide solution (Promega, Madison, USA)을 50  $\lambda$ 씩 분주하고 5 - 10분간 상온에 incubation을 한 후 50 $\lambda$ 의 NED solution (Promega, Madison, USA)을 넣어준다. 5 - 10분간 상온에서 배양한 다음 520 - 550 nm 사이의 파장 값으로 측정하였다.

## 통계처리

통계분석은 MYSTAT statistical analysis program (ver 2.0, Korea)을 사용하여 평균, 표준편차를 분석하였다. 값은 평균  $\pm$  SEM으로 표시했다. \* $p < 0.05$  인 경우 평균 차이가 유의하게 고려되었다.

## Results and Discussion

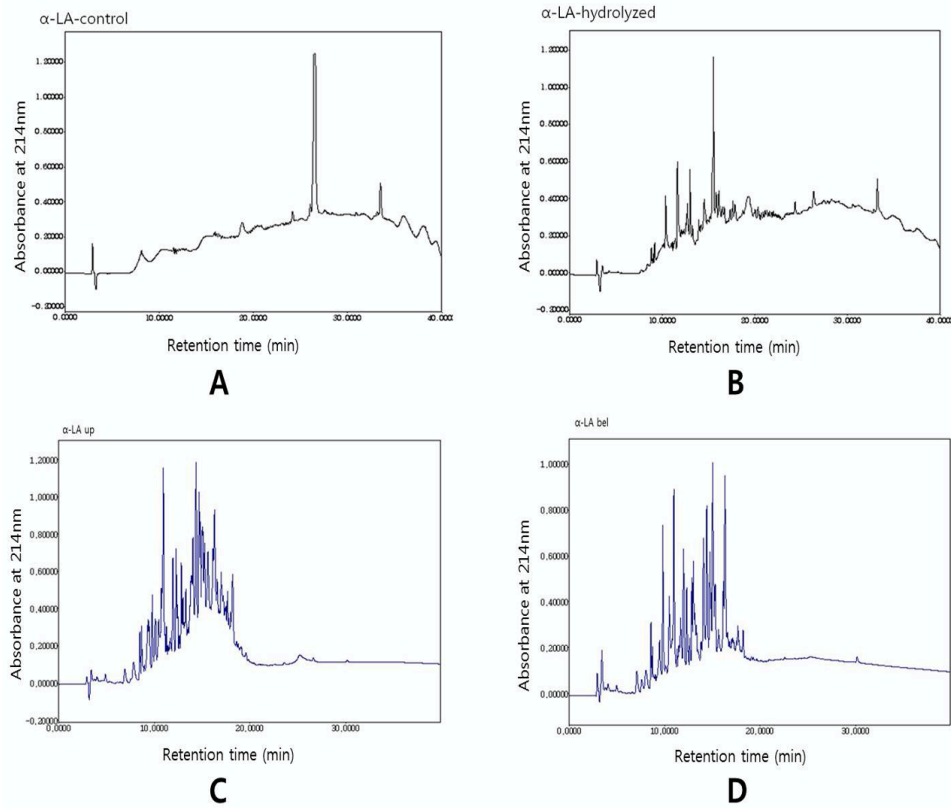
### Alcalase에 의한 가수분해 양상

분리된  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA를 alcalase 효소로 가수분해 후 peptides 양상을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 1-3과 같다. Fig. 1은  $\alpha$ -LA를 가수분해한 결과로 A는 intact  $\alpha$ -LA, B는 hydrolysates, C는  $10,000 \text{ Da} \leq$ , D는  $10,000 \text{ Da} >$ 이다.

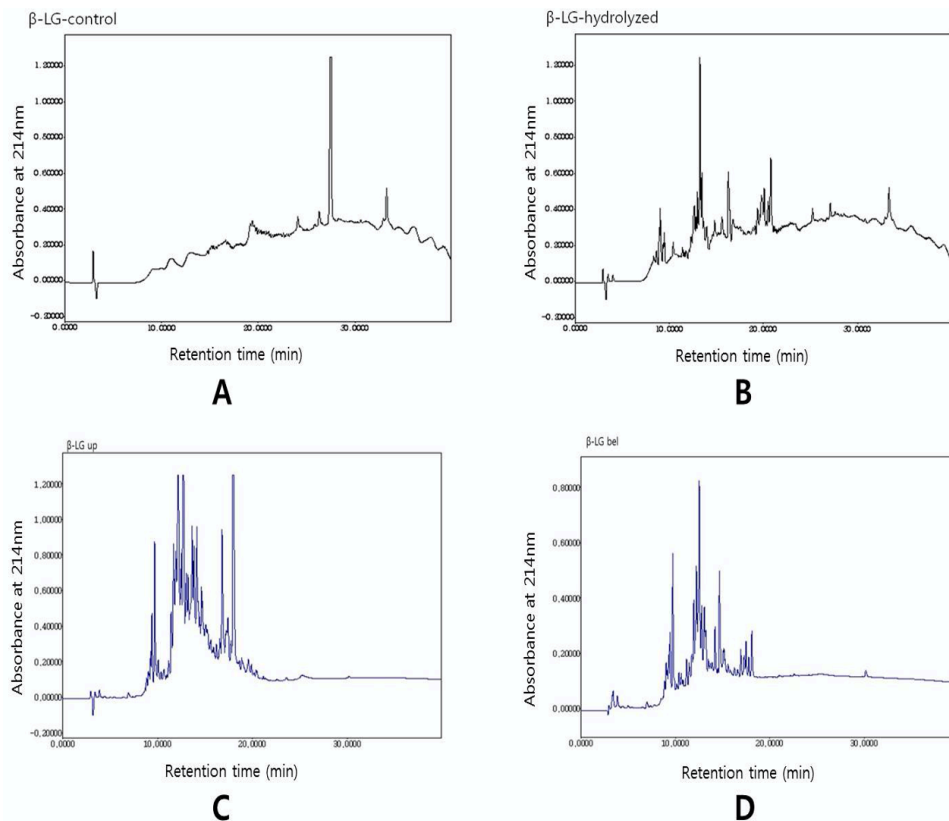
Fig. 1에 나타난 바와 같이 intact  $\alpha$ -LA는 분리 시간 27분에 단일 peak로 확인 (Fig. 1A) 되었고, hydrolysates (Fig. 1B)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 다양한 peptides의 양상을 보여주었고,  $10,000 \text{ Da} \leq$  (Fig. 1C)와  $10,000 \text{ Da} >$  (Fig. 1D)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 매우 다양한 peptides가 생성되었음을 알 수 있었다. Fig. 2는  $\beta$ -LG를 가수분해한 결과로 Fig. 2A는 intact  $\beta$ -LG, B는 hydrolysates, Fig. 2C는  $10,000 \text{ Da} \leq$ , Fig. 2D는  $10,000 \text{ Da} >$ 이다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 intact  $\alpha$ -LA는 분리 시간 27분에 단일 peak로 확인(Fig. 2A) 되었고, hydrolysates (Fig. 2B)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 다양한 peptides가 생성된 양상을 보여주었고,  $10,000 \text{ Da} \leq$  (Fig. 2C)와  $10,000 \text{ Da} >$  (Fig. 2D)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 매우 다양한 peptides가 생성되었음을 알 수 있었다. Fig. 3는 BSA를 가수분해한 결과로 Fig. 3A는 intact BSA, Fig. 3B는 hydrolysates, Fig. 3C는  $10,000 \text{ Da} \leq$ , Fig. 3D는  $10,000 \text{ Da} >$ 이다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 intact  $\alpha$ -LA는 분리 시간 27분에 단일 peak로 확인(Fig. 3A) 되었고, hydrolysates (Fig. 3B)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 다양한 peptides가 생성된 양상을 보여주었고,  $10,000 \text{ Da} \leq$  (Fig. 3C)와  $10,000 \text{ Da} >$  (Fig. 3D)는 분리 시간 10 - 20분 사이에 매우 다양한 peptides가 생성되었다.

### 유청단백질 가수분해물이 TSLP의 발현에 미치는 영향

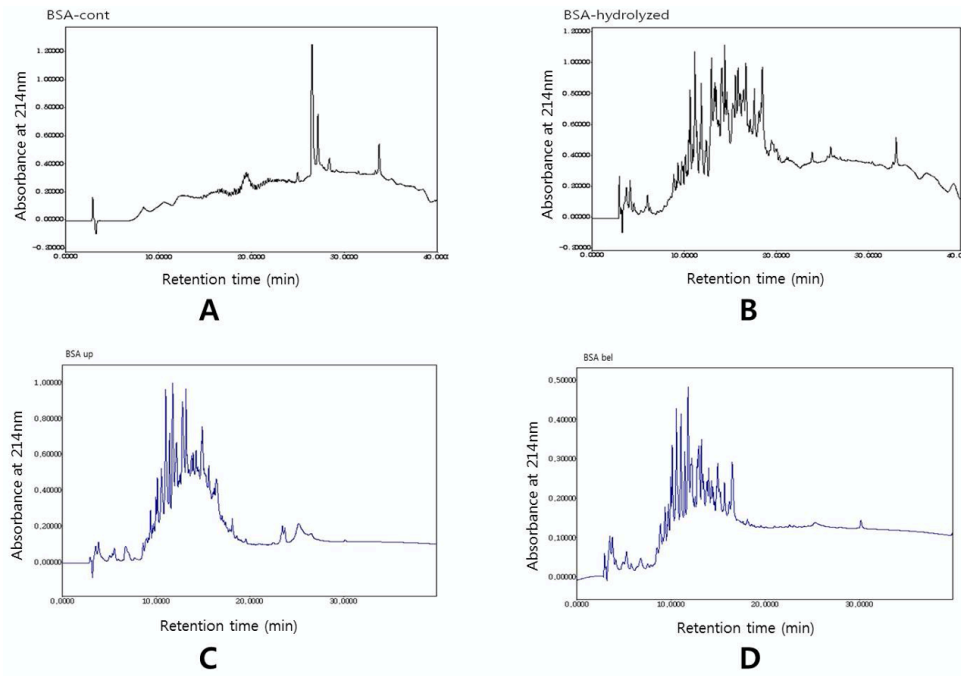
아토피 피부염은 공통적인 피부 알레르기 염증 질환으로 심한 가려움증과 만성적인 습진에 의한 특징지어지고 알레르기 질병의 개인 또는 가족력과 종종 관계가 있다(Oranje and de Waard-van der Spek, 2002; Kang and Stevens, 2003). TSLP cytokine은 최근에 인간의 아토피피부염의 발병학과 다른 알레르기 질환에 관련되어 있다고 보고하였다(Yoo et al., 2005). 알레르기와 관련 있는 cytokine인 TSLP의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 Raw264.7 cell에  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA hydrolysates,  $10,000 \text{ Da} \leq$ ,  $10,000 \text{ Da} >$ 을 각각  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  처리한 다음 3시간 배양 후 TSLP의 발현 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. LPS (positive control) 처리구는 TSLP가 강하게 발현되었는데,  $\beta$ -LG와  $\alpha$ -LA의 hydrolysates와  $10,000 \text{ Da} \leq$ 에서는 약하게 발현되었고  $10,000 \text{ Da} >$  처리구에서는 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 4A and B). 한편 BSA의 hydrolysates,  $10,000 \text{ Da} \leq$ 과  $10,000 \text{ Da} >$  처리구 모두에서 TSLP는 전혀 발현되지 않았다(Fig. 4C). 이와 같이 TSLP는  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA 모두  $10,000 \text{ Da} >$ 에서는 발현이 안되는 것으로 확인되었다. 따라서 저분자 물질로 가수분해된 peptides가 TSLP 발현을 억제하는 것으로 나타나 알레르기 질환 예방에 영향을 미치는 것으로 사료된다.



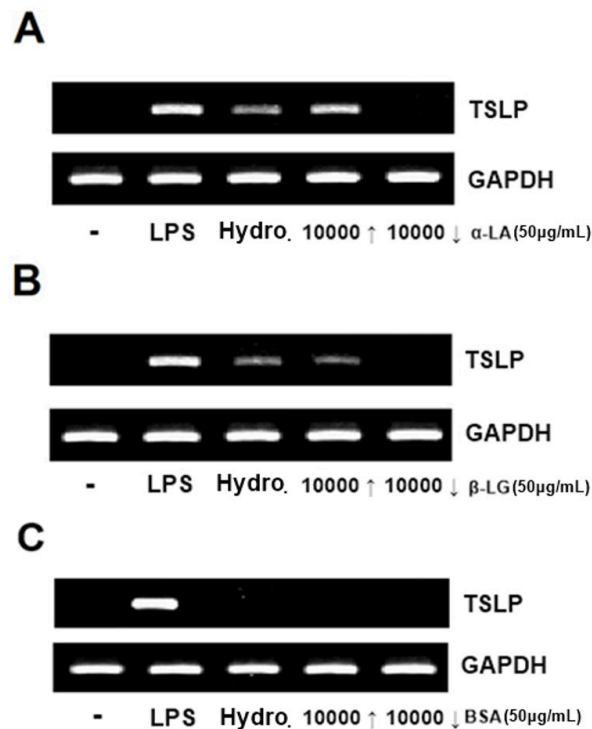
**Fig. 1.**  $\alpha$ -Lactalbumin (LA) hydrolysate by enzyme Alcalase in ratio 1 100 (v/v) for 5 h by HPLC analysis.  $10 \text{ kDa} \leq$  and  $10 \text{ kDa} >$  was isolated by centricron. Intact  $\alpha$ -Lactalbumin (A), hydrolysates (B),  $10 \text{ kDa} \leq$  (C),  $10 \text{ kDa} >$  (D).



**Fig. 2.**  $\beta$ -Lactoglobulin (LG) hydrolysate by enzyme Alcalase in ratio 1 : 100 (v/v) for 5 h by HPLC analysis.  $10 \text{ kDa} \leq$  and  $10 \text{ kDa} >$  was isolated by centricron. Intact  $\beta$ -Lactoglobulin (A), hydrolysates (B),  $10 \text{ kDa} \leq$  (C),  $10 \text{ kDa} >$  (D).



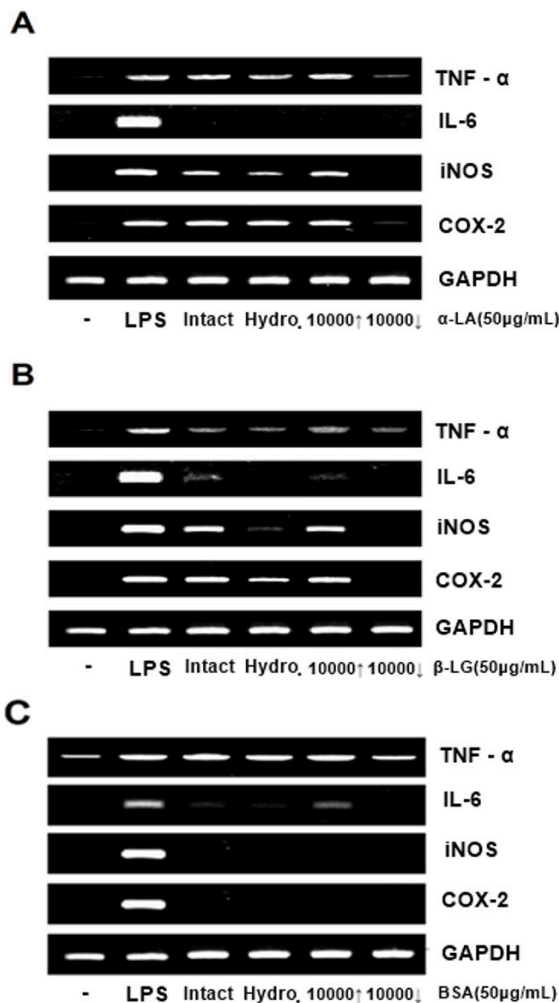
**Fig. 3.** Bovine serum albumin (BSA) hydrolysate by enzyme Alcalase in ratio 1 : 100 (v/v) for 5 h by HPLC analysis. 10 kDa  $\leq$  and 10 kDa  $>$  was isolated by centricron. Intact BSA (A), hydrolysates (B), 10 kDa  $\leq$  (C), 10 kDa  $>$  (D).



**Fig. 4.** Effects of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin hydrolysates (hydro.), 10,000  $\leq$  Da and 10,000  $>$  Da on mRNA expression of TSLP in treated RAW 264.7 cells. LPS was treated with  $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . LPS, lipopolysaccharide; GAPDH, glyceride-3-phosphate dehydrogenase; TSLP, thymic stromal lymphopoietin. (A)  $\alpha$ -lactalbumin (B)  $\beta$ -lactoglobulin (C) bovine serum albumin.

### 유청단백질 가수분해물이 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2의 발현에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2 모두 염증질환과 관련이 있는 cytokine으로  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA 가수분해물이 이들 cytokine의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 5는 Raw264.7 cell에  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  을 각각 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  처리한 다음 3시간 배양 후 염증반응과 관련이 있는 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2의 발현을 나타내었다. Fig. 5A는  $\alpha$ -LA 처리구로 LPS (positive control)는 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2 유전자 모두 강하게 발현이 되었고, TNF- $\alpha$ 는 10,000 Da  $>$  처리구에서만 아주 미약하게 발현되었고, IL-6는 intact, hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  모두 발현되지 않았다. iNOS는 10,000 Da  $>$  처리구에서만 발현되지 않았고 COX-2 역시 10,000 Da  $>$  처리구에서만 아주 미약하게 발현되었다. Fig. 5B는  $\beta$ -LG 처리구로 TNF- $\alpha$ 는 intact, hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  모두 약하게 발현되었다. IL-6는 intact와 10,000 Da  $\leq$  처리구에서 미약하게 발현되었고, hydrolysates 와 10,000 Da  $>$  처리구에서는 발현되지 않았다. iNOS는 hydrolysates 처리구는 아주 미약하게 그리고 10,000 Da  $>$  처리구는 발현되지 않았고 COX-2 역시 10,000 Da  $>$  처리구에서만 발현되지 않았다. Fig. 5C는 BSA 처리구로 TNF- $\alpha$ 는 intact, hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  모든 처리구에서 강하게 발현되었다. IL-6



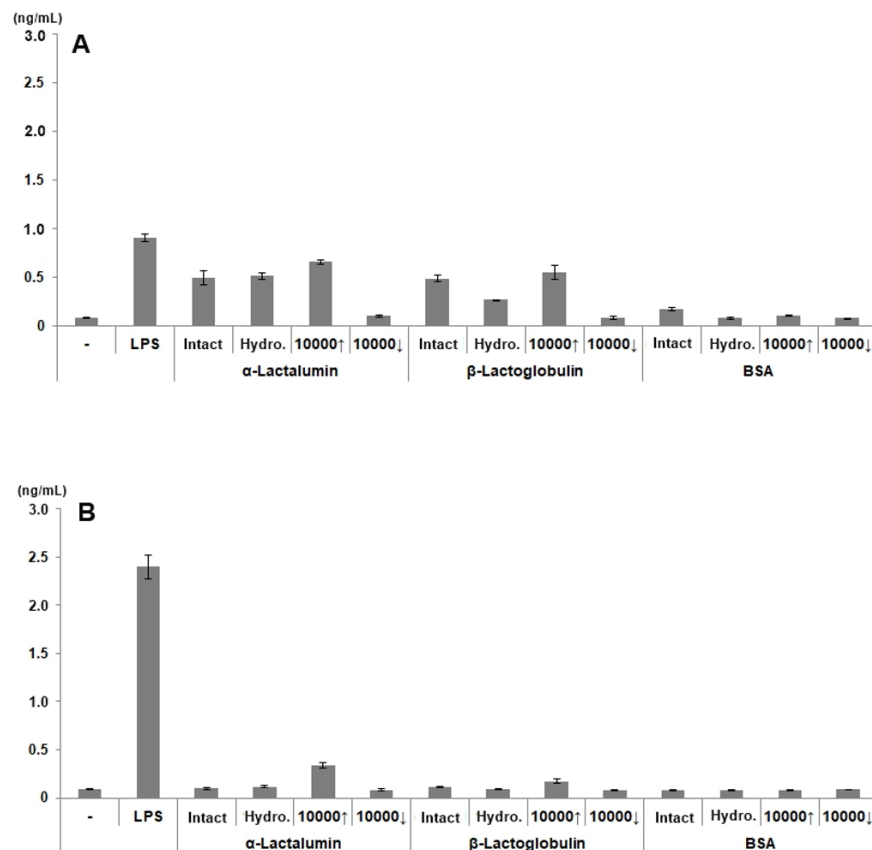
**Fig. 5.** Effects of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin hydrolysates (hydro.), 10,000  $\leq$  Da and 10,000  $>$  Da on mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, COX-2 in treated RAW 264.7 cells. LPS was treated with 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . LPS, lipopolysaccharide; GAPDH, glyceride-3-phosphate dehydrogenase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6, interleukin-6; iNOS, induced nitric oxides synthesis; COX-2, cyclooxygenase-2. (A)  $\alpha$ -lactalbumin (B)  $\beta$ -lactoglobulin (C) bovine serum albumin.



는 intact, hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$  처리구에서는 미약하게 발현되었고 10,000 Da  $>$  에서는 발현되지 않았다. 또한 iNOS와 COX-2도 모든 처리구에서 발현되지 않았다. Ma et al. (2016)는 유청단백질에 alcalase 가수분해로 생성된 특정 peptides가 Raw264.7 cell에서 염증관련 cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2의 mRNA 발현 수준과 분비 수준을 연구한 보고에 따르면 특정 peptides가 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 본 연구의 결과와 매우 유사한 결과이다. 한편 Son et al. (2020)은 유청단백질의 한 종류인 lactoferrin 가수분해물을 Human embryonic kidney (HEK)-293, rat basophilic leukemia mast cells (RBL)-2H3, human mast cells (HMC)-1 세포에 처리하여 IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , COX-2의 발현에 미치는 영향을 보고하였는데, lactoferrin 가수분해물이 분자량의 크기에 따라 염증 관련 cytokine들의 발현에 상당한 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

### 유청단백질 가수분해물이 TNF- $\alpha$ , IL-6의 생산에 미치는 영향

Fig. 6 는 Raw264.7 cell에  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA hydrolysates, 10,000 Da  $\leq$ , 10,000 Da  $>$  을 각각 50  $\mu$ g·mL $^{-1}$ 로 처리하여 20시간 배양 후 TNF- $\alpha$ , IL-6의 생산량을 측정하여 나타내었다. Fig. 6A는 TNF- $\alpha$ 의 생산량을 나타낸 것으로 양성대조구인 LPS는 0.9 ng·mL $^{-1}$ 로 가장 높게 생산되었고,  $\alpha$ -LA 처리구 중 10,000 Da  $\leq$ 이 0.75 ng·mL $^{-1}$ 로 가장 높게 생산되었고, 10,000 Da  $>$  은 0.15 ng·mL $^{-1}$ 로 가장 낮게 생산되었다.  $\beta$ -LG 처리구 역시  $\alpha$ -LA 처리구와 같은 경향으로 10,000 Da  $\leq$  0.6 ng·mL $^{-1}$ 로 가장 높고, 10,000 Da  $>$  가 0.1 ng·mL $^{-1}$ 로 음성대조구와 같게 나타났다.



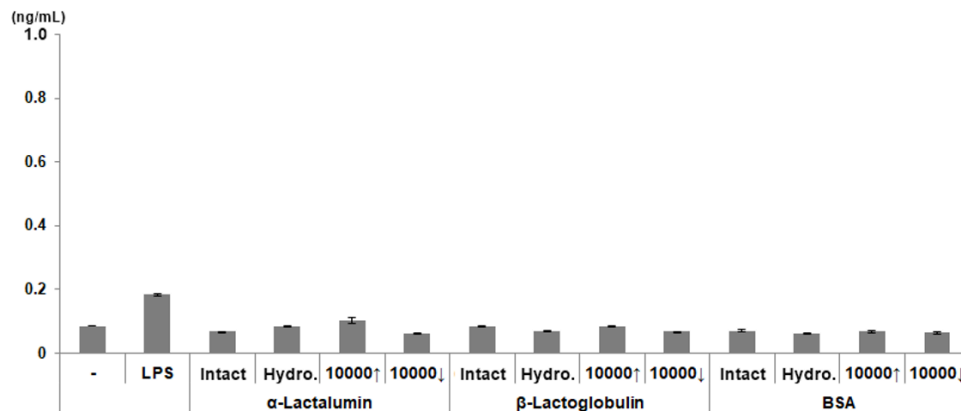
**Fig. 6.** Effects of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin hydrolysates (hydro.), 10,000  $\leq$  Da and 10,000  $>$  Da on secretion of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 in RAW264.7 cell. RAW264.7 cells were treated with the indicated concentrations (50  $\mu$ g·mL $^{-1}$ ) of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) and bovine serum albumin (BSA) for 20 h. LPS was used as a positive control to compare with  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA. (A) TNF- $\alpha$  (B) IL-6.

BSA는 intact 처리구가  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 이었고, hydrolysates,  $10,000 \text{ Da} \leq, 10,000 \text{ Da} >$  는 음성대조구와 비슷한 수준으로 생산되었다.

Fig. 6B는 IL-6의 생산량을 나타낸 것으로 양성대조구인 LPS는  $2.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로 가장 높게 생산되었고,  $\alpha$ -LA 처리구 중  $10,000 \text{ Da} \leq$  이  $0.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로 가장 높게 생산되었고, 다른 처리구는 음성 대조구와 비슷하게 낮게 생산되었다.  $\beta$ -LG 처리구 역시  $\alpha$ -LA 처리구와 같은 경향으로  $10,000 \text{ Da} \leq 0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로 가장 높고, 다른 처리구는 음성대조구와 비슷하게 나타났다. BSA는 모든 처리구에서 음성대조구와 비슷하여 영향을 미치지 못했다. 이와 같이 peptides의 분자량  $10,000 \text{ Da} >$ 이  $10,000 \text{ Da} \leq$ 보다는 cytokine의 분비 저해 효과가 큰 것으로 나타났다.

### 유청단백질 가수분해물이 NO의 생산에 미치는 영향

Fig. 7은 NO의 생산량을 나타낸 것으로 양성대조구인 LPS는  $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로 가장 높았고,  $\alpha$ -LA 처리구 중 hydrolysates와  $10,000 \text{ Da} \leq$  이 음성대조구보다 약간 높았고,  $\beta$ -LG의 intact와  $10,000 \text{ Da} \leq$  는 음성 대조구보다 약간 높았다. 한편 BSA는 모든 처리구에서 음성대조구와 비슷하게 나타났다. 이와 같이 유청단백질 가수분해물의 peptides는 염증 관련 cytokines의 발현과 분비에 억제효과가 있는 것으로 확인되었다. 한편 체내에서 생성되는 NO는 염증이 발생하였을 경우 염증을 제거하기 위해 증식한 대식세포가 질소산화물을 과도하게 만들어내어 생성되는 것으로 알려졌고 염증질환의 병리생리학에 중요한 역할을 한다(Sharma et al., 2007).



**Fig. 7.** Effects of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin hydrolysates (hydro.),  $10,000 \leq \text{Da}$  and  $10,000 > \text{Da}$  on secretion of nitric oxides (NO) in RAW264.7 cell. RAW264.7 cells were treated with the indicated concentrations ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) and bovine serum albumin (BSA) for 20 h. LPS was used as a positive control to compare with  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA.

## Conclusion

우유 유청단백질인  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, BSA를 alcalase 로 가수분해하여 생성된 peptides의 염증 관련 cytokine의 억제효과를 연구하여 cytokine억제 기능이 있는 결과를 얻었다. 따라서 이러한 결과는 유청단백질 가수분해물을 이용한 기능성 식품과 일반 식품 및 의약품 소재 분야로 응용할 수 있는 기초자료로 활용할 수 있다고 사료된다.

## Authors Information

Jae Min Yu, Harim Company, Junior manager

Ji Yoon Son, Precision Bio, Assistant researcher

Gerelyuya Renchinkhand, <https://orcid.org/0000-0003-2107-0430>

Kwang-Yeon Kim, <https://orcid.org/0000-0003-3770-8005>

Jae Young Sim, <https://orcid.org/0000-0002-6772-8181>

Myoung Soo Nam, <https://orcid.org/0000-0003-0866-1041>

## References

- Bounous G, Gold P. 1991. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: Role of glutathione. *Clinical and Investigative Medicine* 14:296-309.
- Carvalho-Silva LB, Pacheco MTB, Bertoldo R, Carvalho-Veloso C, Teodoro LC, Giusti-Paiva A, Lollo PCB, Soncini R. 2012. Anti-inflammatory activities of enzymatic (alcalase) hydrolysate of a whey protein concentrate. *African Journal of Biotechnology* 11:2993-2999.
- FitzGerald RJ, Meisel H. 2000. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: *Advances in Dairy Chemistry*. Fox PF and McSweeney PLH 3<sup>rd</sup> ed. pp. 675-698. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA.
- Gill HS, Coull FR, Rutherford KJ, Cross ML. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *The British Journal of Nutrition* 84:S111-S117.
- Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology* 57:173-188.
- Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG. 2007. Bioactive peptides in dairy products. In: *Handbook of food products manufacturing*. Vol. 2, Edited by Hui YH. pp. 489-517. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Huth PJ, DiRienzo DB, Miller GD. 2004. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *Journal of Dairy Science* 89:1207-1221.
- Kang K, Stevens SR. 2003. Pathophysiology of atopic dermatitis. *Clinical Dermatology* 21:116-121.
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9:1309-1323.
- Ma Y, Liu J, Shi H, Yu L. 2016. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science* 99:6902-6912.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review* 9:136-156.
- Meisel H, FitzGerald RJ. 2000. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 84:27-31.
- Meisel H, Schlimme E. 1994. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme derived from bovine casein (casokinsins). In: Brantl V, Teschemacher H,  $\kappa$ -casomorphins and related peptides: Recent developments. pp. 27-33. VCH, Weinheim, Germany.
- Nagoaka S, Futamura Y, Miwa K, Takako A, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 281:11-17.
- Oranje AP, de Waard-van der Spek FB. 2002. Atopic dermatitis: Review 2000 to January 2001. *Current Opin Pediatr* 14:410-413.
- Petrillo EW Jr, Ondetti MA. 1982. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Medicinal chemistry and biological actions. *Medicinal Research Reviews* 2:1-14.
- Renchinkhand G, Bae HC, Jeong SG, Nam MS. 2012. Isolation of whey protein and hydrolysis pattern of whey protein by proteolytic enzyme. *Korean Journal of Agricultural Science* 39:561-568. [in Korean]

- Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. 2001. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:295-302.
- Seibert K, Masferrer JL. 1994. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor Spring* 4:17-23.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15:252-259.
- Smyth M, Fitz-Gerald RJ. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *International Dairy Journal* 8:819-827.
- Son JY, Bae HC, Renchinkhand G, Nam MS, Kim WS. 2020. Effects of lactoferrin hydrolysates on inflammatory cytokine modulation in HEK-293, RBL-2H3, and HMC-1 cells. *Korean Journal of Agricultural Science* 47:83-93. [in Korean]
- Suetsuna R, Ukeda H, Ochi H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 11:128-131.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tavares TG, Spindola H, Longato G, Pintado ME, Carvalho JE, Malcata FX. 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of novel dietary protein hydrolysate produced from whey by protease of *Cynara cardunculus*. *International Dairy Journal* 32:156-162.
- Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. 2003. Lactoferrin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design* 9:1277-1287.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:353-375.
- Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. 2005. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *The Journal of Experimental Medicine* 202:541-549.
- Zelová H, Hošek J. 2013. TNF- $\alpha$  signaling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research* 62:641-651.