

발간등록번호

11-1543000-000821-01

**유단백질의 마이알 반응 발효물을 이용한
프로바이오틱 기능성 유제품 개발**

(Development of probiotic functional dairy products
using fermented MRPs)

서울우유협동조합

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “유단백질의 마이알 반응 발효물을 이용한 프로바이오틱 기능성 유제품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 01 월 27 일

주관연구기관명 : 서울우유협동조합

주관연구책임자 : 이 건 봉

1협동연구기관명 : 고려대학교

1협동연구책임자 : 김 세 현

2협동연구기관명 : 고려대학교

2협동연구책임자 : 이 광 원

요 약 문

I. 제 목

유단백질의 마이알 반응 발효물을 이용한 프로바이오틱 기능성 유제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 및 마이알반응 생성물의 발효가수분해물을 제조하고 제조한 기능성 신소재의 심혈관 보호 및 면역 증진 효과를 입증하고자 함
- 최근 다양한 생리활성을 지닌 신소재 개발은 전 세계적으로 천연소재에 대한 기술적 접근 방법을 추구되면서 기능성 소재 개발에 초점이 맞춰 지고 있음. 특히 우유는 면역 활성을 비롯한 기능성 효과가 입증되었으며, 이를 이용하여 새로운 기능성 소재를 개발을 통해 기능성을 높이고, 다양한 기능성 효과를 측정함으로써 우유의 고부가가치 제품 생산을 가능하게 할 것으로 기대함
- 프로바이오틱스 균주를 이용한 우유 단백질의 발효가수분해물과 마이알반응 발효가수분해물을 이용하여 면역 조절 및 심혈관 보호 효과를 측정함으로써 우유 단백질의 면역 조절 기능성 성분 증가 및 안전성을 확보하고 기업체의 제품개발 참여로 개발기술을 산업화시켜 제품화를 시키고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 프로바이오틱스의 능력 및 항산화활성을 평가하여 우수한 프로바이오틱스 균주를 선발하고 마이알반응생성물의 발효가수분해물 제조를 위한 발효조건을 확립하고자 함
- 유단백질 발효 가수분해물과 마이알 반응 가수 분해물을 이용한 콜레스테롤 저해 효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 심혈관 보호 효과 기능성을 검증함
- 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효가수분해물의 안전성 검증은 주요기관 유래 세포주를 이용한 세포 독성 확인 및 동물 모델을 이용한 14일 반복투여 독성시험을 통하여 확인함. 면역 조절 기능성 검증은 면역세포의 생육 증진, 대식세포의 nitric oxide, 사이토카인 생성 및 대식작용 활성 확인과 복강암 유발 동물 모델에서 면역 조절 효과 및 고형암 생성 억제 효과 확인, 혈액 생화학적, 조직병리학적 분석을 통하여 검증함

IV. 연구개발결과

- 본 연구에서는 심혈관계 질환의 약물요법 외에 식품 식이를 통한 예방적 연구에 중점을 두고 다양한 생리활성이 보고된 유단백질과 유당의 마이알 반응 생성물의 가수분해물을 이용하여 항산화 효과 및 심혈관 보호 효과의 기능성을 확인하였음

- 프로바이오틱스 능력(내산성, 내담즙성) 및 항산화 활성 평가를 통한 발효 미생물 균주를 선정하였고 최적의 발효 조건 및 제조 방법을 확립하였음
- 선정된 최적의 프로바이오틱스 균주와 마이알반응 생성물을 이용하여 발효가수분해물을 제조하였고 이것을 이용하여 기능성 신소재의 심혈관 보호 효과 확인을 *in vitro*와 *in vivo* 차원에서 검증하였음
- 면역 활성 스크리닝을 통하여 유청단백질 자체 내 유당과의 24시간 반응으로 생성된 마이알반응 생성물과 *LCOI* 균주를 이용한 발효가수분해물을 선정하였으며, 세포 독성 실험과 동물모델을 이용한 14일 반복 투여 독성 실험을 통해 안전성을 확인하였음. *In vitro* 실험에서 유단백질, 마이알반응 생성물, 발효가수분해물 순으로 대식세포를 통해 nitric oxide 생성과 사이토카인 발현 및 대식작용 활성이 증가함을 확인하였음.
- 복강암 유발 동물모델에서 혈청 내 nitric oxide 생성 및 lysozyme 활성이 증가함을 확인하였으며, 비장 조직 내 사이토카인의 발현 증가와 고형암의 생성이 억제되는 것을 확인함으로써 유단백질 마이알반응 발효가수분해물의 면역 조절 효과를 검증하였음

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 연구성과
 - 국내외 학술발표 17건
 - SCI 논문 게재 5건
 - 특허 출원 및 등록 3건
 - 홍보 1건 진행 중
 - 기술이전 1건 진행 중
- 유단백질 마이알반응물의 발효물로부터 심혈관 보호 및 면역 조절 효과를 지니는 소재의 개발 및 제품화를 위한 최적 생산 공정 확보
- 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효생성물을 이용한 기능성 유제품 개발
- 임상시험을 통한 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효생성물의 기능성 규명 및 개별인정형 원료 등록 예정
- 본 연구 결과를 바탕으로 유단백질의 심혈관 보호 및 면역 조절 효과를 지니는 유제품을 개발하여 우유 및 우유 내 부산물의 부가가치 상승 기대

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of probiotic functional dairy products using fermented MRPs

II. Purpose and Necessity of the Research and Development

- This research tried to produce fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics and confirmed that the produced new functional materials has protective effect on cardiovascular disease and immunomodulating effects.
- Recently, the technological approach of natural ingredients and the development of new materials that carry various biological activity is demanded throughout the world. Especially, this research proved that milk has not only positive effect on immune system but also have other positive function. This research shows that the development of new functional materials is mandatory. Also, it will be possible to produce high value milk products through this research as it found out that milk have various positive effects.
- By using probiotics strains, our research is trying to measure the protective effect of fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics which affects cardiovascular disease and manipulation of immune system, so we can retain safety and functionality that milk protein has about increasing positive effect to immune system. This can lead the company to participate more on developing product, related technology and industrialization.

III. Research and Development Contents and Range

- By assessing ability and anti-oxidization activity of probiotic strains, our research practiced screening some outstanding strains and decision of the best fermenting condition of fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics was confirmed.
- Cholesterol reduction and protection of cardiovascular disease were investigated with invitro and in vivo study through the fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics and substances from Maillard reaction.

- Safety of milk protein Maillard reaction products and its fermented hydrolysate was confirmed by a cytotoxicity on cell line derived main organ and a 14-day repeated-dose oral toxicity study on animal models. To confirm the immunomodulating activity, we were performed a proliferation on immune cells and nitric oxide, cytokine, and phagocytosis activity on macrophage in vitro, and immunomodulatory, anti-cancer, blood biochemical test and histopathologic assessment in vivo on solid tumor animal model.

IV. Research and Development Results

- This research investigated preventing effect against cardiovascular disease not through pharmacotherapy but diet therapy. This research confirmed functionality of various anti-oxidative and protecting cardiovascular disease from fermented maillard reaction products using probiotics.
- Screening probiotics strains with some criteria (Bile and acid tolerance ability, anti-oxidant activity) and made decision of the best fermenting condition of fermented maillard reaction products using probiotics was confirmed.
- By using selected probiotic strains and substances from Maillard reaction, our research made fermented maillard reaction products using probiotics. Our research confirmed functionality and protective effects of cardiovascular disease with the product in vitro.
- This research investigated that the fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics has the protective effect of cardiovascular disease through cholesterol-lowering and thrombin inhibitory activity in vivo.
- We were selected the whey protein concentrate Maillard reaction products that was generated reaction with lactose contained in whey protein concentrate for 24 hour and its fermented hydrolysate using LC01 probiotics strain through the screening of immune activity. Safety of these samples were confirmed by a cytotoxicity and a 14-day repeated-dose oral study. In vitro, nitric oxide production, cytokine expression and phagocytosis increased on macrophage in the order of milk protein, Maillard reaction products, and fermented hydrolysate. In vivo, nitric oxide production and lysozyme activity in serum and cytokine expression in spleen increased and generation of solid tumor decreased. Therefore, we confirmed that the fermented hydrolysate of milk protein Maillard reaction products has immunomodulating effects.

V. Research Results and Plans for Utilization

- Research Results
 - 17 Academic presentations
 - 5 SCI Papers
 - 3 Patent Applications and Patent Registrations
 - 1 Publicity in progress
 - 1 Technology Transfer in Progress
- Establishment of the optimum manufacturing process for the development and commercialization of functional material having a cardiovascular protective and immune enhancing effect
- Development of milk product using functionality of the fermented maillard reaction products from milk proteins using probiotics.
- Functional Characterization of fermented maillard reaction products from milk protein using probiotics through clinical trials and application for individual recognition functional food.
- From this investigation, development of milk products that have protecting effects of cardiovascular disease and manipulating immune system of milk whey protein can lead to increase the usage and the added value of milk with by-products in milk.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY	2
Chapter 1. Overview of the study	12
Chapter 2. Current status of technology in domestic and foreign	15
Chapter 3. Study contents and results	18
Section 1. Development of probiotic functional dairy products using fermented MRP's	18
1. Functional analysis of milk protein and enzyme hydrolysed Maillard reaction products	18
2. Charaterization of enzyme hydrolysed and fermented Maillard reation products	26
3. Prodiuction of Maillard reaction products and optimization of the fermentation process conditions	36
4. Development of dairy products using fermented Maillard reaction products	40
5. Production of fuctional dairy products using fermented Maillard reaction products	42
Section 2. Production of Fermented Maillard Reaction Products from Milk Proteins Using Probiotics and Investigation of Cardiovascular Functionality ...	50
1. Evaluation for acid and bile tolerance of probiotics strains	50
2. Evaluation for anti-oxidant activity of probiotics strains	52
3. Estimation for ability to degrade milk proteins of probiotics strains ·	53
4. Selection of probiotics strains with Maillard reaction products utilizing ability	59
5. Optimal fermentation condition using Maillard reaction products	61
6. Anti-oxidant effect of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains (<i>in vitro</i>)	64
7. Hypocholesterolemic effect of Maillard reaction products and fermented	

hydrolysate using probiotics strains (<i>in vitro</i>)	69
8. Fibrinolytic activity of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains(<i>in vitro</i>)	77
9. Thrombin inhibitory activity of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains (<i>in vitro</i>)	80
10. HMG-coA reductasee inhibition of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains (<i>in vitro</i>)	87
11. Identification of selected probiotics strains	88
12. Hypocholesterolemic effect of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains(<i>in vivo</i>)	88
13. Thrombin inhibitory activity of Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strains (<i>in vivo</i>)	100
 Section 3. Immunomodulating effects of milk protein Maillard reaction products with lactose and its fermented hydrolysate	104
1. Optimal manufacturing condition of milk protein Maillard reaction products with lactose	104
2. Generation of milk protein-lactose Maillard reaction products	108
3. Bioactivity screening of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strain (<i>in vitro</i>)	109
4. Safety of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strain (<i>in vitro</i>)	113
5. Furosine concentration of milk protein-lactose Maillard reaction products	119
6. Reduced manufacturing time of milk protein-lactose Maillard reaction products	122
7. Immunomodulating effects of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strain (<i>in vitro</i>)	127
8. Phagocytosis activity of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strain (<i>in vitro</i>)	133
9. A 14-day repeated-dose oral toxicity study of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics strain (<i>in vivo</i>)	135
10. Anti-cancer and immunomodulating effects of milk protein-lactose Maillard reaction products and fermented hydrolysate using probiotics	

strain (<i>in vivo</i>)	138
Chapter 4. Achievement and contribution to relevant fields	145
Chapter 5. Achievements of research and development and plans for utilizing research results	149
Chapter 6. Technical information and knowledge acquired for the study	154
Chapter 7. References	158

목 차

요약문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절. 심혈관 보호와 면역조절 가능성을 가진 유단백 및 마이알반응 발효 가수분해물을 이용한 유제품의 개발 관련 연구	18
1. 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소 처리 가수분해물의 기능성 확인	18
2. 유단백질 마이알반응 생성물의 효소 처리 가수분해물 및 발효 가수분해물의 지표 물질 분석	26
3. 유단백질 마이알반응 생성물의 제조 및 발효 조건 최적 공정 설계	36
4. 유단백질 마이알반응 생성물의 발효 가수분해물 적용 유제품 개발	40
5. 유단백질 마이알반응 생성물의 발효 가수분해물 적용 유제품의 제조	42
제 2 절. 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질의 발효 생성물 제조 및 심혈관 기능성 검증	50
1. 내산성 및 내담즙성을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발	50
2. 향산화능을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발	52
3. 프로바이오틱스 균주의 유단백질 분해 활성 확인	53
4. 마이알반응 생성물 이용능을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발	59
5. 마이알반응 생성물을 이용한 발효 최적 조건의 탐색	61
6. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 향산화 활성 확인(<i>in vitro</i>)	64
7. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 콜레스테롤 저해 능력 확인(<i>in vitro</i>) ·	69
8. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 혈전용해 활성의 확인(<i>in vitro</i>)	77
9. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 트롬빈 저해 활성 확인(<i>in vitro</i>)	80
10. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 HMGR 저해 활성 확인(<i>in vitro</i>) ···	87
11. 선정된 프로바이오틱스 균주의 동정	88
12. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 콜레스테롤 저해 능력 확인(<i>in vivo</i>) ·	88
13. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 트롬빈 저해 활성 확인(<i>in vivo</i>) ···	100

제 3 절. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 및 마이알반응 발효가수분해물의 면역 조절 효과 확인	104
1. 유당과 유단백질을 이용한 마이알반응 생성물의 최적 반응 조건 확립	104
2. 유단백질-유당 마이알반응 생성물의 제조	108
3. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성 물의 생리활성 스크리닝 (<i>in vitro</i>)	109
4. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반 응 생성물 발효가수분해물의 안전성 검토 (<i>in vitro</i>)	113
5. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물의 furosine 함량 측정	119
6. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 시간 단축	122
7. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성 물의 면역 활성 기능성 확인 (<i>in vitro</i>)	127
8. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성 물의 대식작용 활성화 확인 (<i>in vitro</i>)	133
9. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성 물의 반복 투여 독성시험 (<i>in vivo</i>)	135
10. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생 성물의 항종양 및 면역 활성 기능성 확인 (<i>in vivo</i>)	138
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	145
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	149
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	154
제 7 장 참고문헌	158

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

연구개발 최종목적 : 유단백질의 마이알 반응 발효물을 이용한 프로바이오틱 기능성 유제품 개발	
<p>[주관]</p> <p>심혈관 보호와 면역조절 기능성을 가진 유단백 및 마이알 반응 발효가수분해물을 이용한 유제품의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▣ 상업용 단백질분해효소를 처리한 유단백과 마이알반응물의 가수분해물 제조 및 생리활성 스크리닝 ▣ 유단백질 및 마이알반응 발효 가수분해물의 분리정제 및 지표 성분 확인 연구 ▣ 기능성이 확인된 생성물을 이용하여 기능성 유제품을 개발
<p>[제1협동]</p> <p>프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질의 발효 생성물 제조 및 심혈관 기능성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▣ 프로바이오틱스 균주 선발 및 마이알반응 발효가수분해물 제조 ▣ 유단백질 발효 가수분해물과 마이알반응 발효 가수분해물을 이용한 콜레스테롤 저해 효과 측정 (<i>in vitro, in vivo</i>)
<p>[제2협동]</p> <p>유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 및 마이알반응 가수분해물의 면역 조절 효과 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▣ 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 ▣ 면역 조절 효과를 갖는 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반응 발효가수분해물 선정 ▣ 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효가수분해물의 면역 조절 효과 검증 (<i>in vitro, in vivo</i>) ▣ 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효가수분해물의 안전성 검증 (<i>in vitro, in vivo</i>)

제 2 절. 연구개발의 필요성

- 국내 식품시장에서 건강기능식품 전체 시장은 건강에 대한 관심, 고령화 등의 영향으로 업계 추산 약 4조원 규모로 연 4~5% 신장률을 나타내고 있고 그 중에서도 특히 프로바이오틱스로 대변되는 유산균 시장은 전년 대비 55% 상승하는 등 폭발적인 성장세를 보이고 있음.
- 마이알반응 생성물은 항산화, 면역활성, 항당뇨, 항고혈압, 간보호, 지질대사조절 등의 다양한 생리활성 효과가 있어 새로운 건강기능성 소재로서 주목받고 있음 (Jing et al. 2002, Marko et al. 2003, Prabhu et al. 2002)
- 우유 단백질은 카제인과 유청단백질이 있으며, 우유 단백질이 질병을 예방하는 등의 건강

기능성이 있는 것으로 알려지면서 우유 단백질에 대한 관심이 증가하고 있음. 우유 단백질과 우유 단백질의 마이알 반응 생성물 및 가수분해물이 항산화 활성과 면역 활성 등의 생리활성 효과를 가지고 있으나 우유 단백질의 마이알반응 발효가수분해물의 면역 조절 효과는 아직까지 보고된 바 없음 (김철현, 2009, Silanikove et al. 2005, 이광원, 2013)

- 현대인들은 대사증후군, 심혈관계질환 등의 발병률이 높아지고 있음에 따라 이에 관한 연구가 체계적으로 진행되고 있으며 이를 예방하고자 하는 기능성 식품 소재들의 개발의 필요성이 부각되고 있음.
- 프로바이오틱스로서 유산균의 주요 섭취원인 발효유의 제조 중 유단백질은 유산균에 의해 소화되면서 펩타이드를 생성하게 되며, 이로 인한 단백질의 소화율 증가, 생성된 일부 펩타이드들은 면역체계, 혈압 및 혈액응고 조절과 같은 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 여러 논문에서 연구됨.
- 최근 다양한 생리활성을 지닌 신소재 개발은 전 세계적으로 천연소재에 대한 기술적 접근 방법을 추구되면서 기능성 소재 개발에 초점이 맞춰 지고 있음. 특히 우유는 면역 활성을 비롯한 기능성 효과가 입증되었으며, 이를 이용하여 새로운 기능성 소재를 개발을 통해 기능성을 높이고, 다양한 기능성 효과를 측정함으로써 우유의 고부가가치 제품 생산을 가능하게 할 것으로 기대함
- 단백질 및 마이알반응 생성물의 발효가수분해 같은 기능성 물질 발굴 및 이용 기술은 바이오산업의 원천소재 확보와 다양한 기능성 신소재의 이용을 통한 신규 산업제품 창출이 가능해지기 때문에 식품 시장에서의 잠재력이 매우 크다고 볼 수 있음.
- 따라서 본 연구에서는 프로바이오틱스 균주를 이용한 우유 단백질의 가수분해물과 발효가수분해물을 이용하여 심혈관 보호 효과 및 면역 조절 효과를 확인 하고 향후 건강기능 식품의 주원료로서 기업체의 제품개발 참여로 개발기술을 산업화시켜 제품화를 시키는 것을 목표로 함.

제 3 절. 연구개발의 범위

1. 주관 : 심혈관 보호와 면역조절 가능성을 가진 유단백 및 마이알반응 가수분해물을 이용한 유제품의 개발
 - 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물 제조
 - 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물의 선발
 - 유용물질 분리정제 및 지표물질 확인연구
 - MRPs 제조 및 발효 조건 최적 공정 설계와 유제품 개발
 - 심혈관보호 및 면역활성 가능성을 지닌 유제품의 개발

2. 제1협동 : 프로바이오틱스를 이용한 유단백질의 발효생성물 제조 및 심혈관 기능성 검증
 - 프로바이오틱스 균주 선발
 - 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 발효생성물 및 마이알반응 생성물 발효가수분해물 제조
 - 기능성 신소재의 심혈관 보호 효과 확인 (in vitro)
 - 동물모델을 이용한 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 발효생성물 및마이알반응 생성물 발효가수분해물의 기능성 확인 (in vivo)

3. 제2협동 : 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 및 마이알반응 가수분해물의 면역 조절 효과 확인
 - 유단백질-유당의 비율, 반응 용매, 반응 시간, 반응 방법 등의 변수를 달리하여 면역 조절 가능성을 가지는 마이알반응 생성물의 최적 제조 조건 확립
 - 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반응 발효가수분해물의 면역 활성 스크리닝을 통한 발효 균주 및 발효가수분해물 선정
 - 주요기관 유래 세포주를 이용한 세포 독성 확인 및 동물 모델에서의 14일 반복 투여 독성 실험을 통한 마이알반응 생성물 및 발효가수분해물의 안전성 검증
 - 면역 세포를 이용하여 세포 수준에서 마이알반응 생성물 및 발효가수분해물의 면역 조절 기능성 검증
 - 복강암 유발 동물 모델에서 혈액 생화학적 분석, 조직 병리학적 관찰 및 조직 내 사이토카인 발현, 고형암 생성 억제 확인 등을 통한 면역 조절 기능성 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 기술개발 현황

- 최근 발효유 제조에 사용되는 스타터 컬처와 더불어 프로바이오틱스가 함유된 상업적 발효유의 생산이 급증하고 있고, 이로 인한 발효유의 풍미 및 조직감과 같은 관능적 특성에 미치는 영향뿐 아니라 프로바이오틱스의 인체유용효과와 생리활성 물질 생성에 관한 연구가 다양해지고 있음
- 마이알반응 생성물에 관한 연구는 그들 중 하나로써 그 의미는 아미노산과 환원당(포도당, 과당, 맥아당 등)이 작용하여 갈색의 중합체인 ‘멜라노이딘’이라는 갈변물질을 만드는 반응을 말함. 우유의 단백질로부터 분해되어 나오는 아미노산이 환원당과 만나 마이알 반응을 하게 되는데 이때, 항산화, 면역활성, 항당뇨, 항고혈압, 간보호, 지질대사조절 등의 다양한 생리활성 효과가 있어 새로운 건강기능성 소재로서 주목받고 있음
- 우유 단백질은 카제인과 유청단백질이 있으며, 우유 단백질이 질병을 예방하는 등의 건강기능성이 있는 것으로 알려지면서 우유 단백질에 대한 관심이 증가하고 있음. 이에 비례하여 단백질의 마이알 반응 생성물 및 가수분해물이 항산화 활성과 면역 활성 등의 생리활성 효과에 대한 관심도 증가하는 추세임. 하지만 우유 단백질의 마이알반응의 발효가수분해물의 구체적인 면역 조절 효과는 아직까지 보고된 바 없음
- 프로바이오틱스로써 유산균의 주요 섭취원인 발효유의 제조 중 유단백질은 유산균에 의해 소화되면서 펩타이드를 생성하게 되며, 유산균에 의해 단백질의 소화율이 증가됨은 물론 이때 생성된 일부 펩타이드들은 면역체계, 혈압, 무기물 수송 및 혈액응고 조절 등과 같은 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있음
- 유산균 단백질은 아미노산과 인의 공급원으로서 중요한 의의를 갖고 있으며 특히 필수아미노산을 함유하고 있어 식물성 단백질의 섭취에 따른 필수 아미노산 결핍을 방지할 수 있음. 또한 천연물을 대상으로 유산균 발효를 통해 생성되는 항균성 물질, 콜레스테롤 저하 물질 등 다양한 기능성을 강조한 연구들이 많이 이루어지고 있음. 유산균 단백질에는 면역기능을 증강시키는 다양한 면역물질 등이 함유되어 있어 질병 예방 및 생체 방어기능을 나타냄
- 국내 유가공 산업의 안정적인 발전 및 외국 제품과의 경쟁력 측면에서 독자적이고 창의적인 기능성 식품 개발이 필요함

제 2 절. 제품 및 시장 분석

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 유제품 판매 비율을 보면, 전체 유제품 판매액 중 50%를 시유가 차지하며, 약 25%는 발효유가 차지하는 것으로 나타났으며, 최근 국내 우유 생산량은 감소하는 반면 우유의 소비량은 증가하는 것으로 나타나고 있음
- 국내 우유 단백질을 이용한 제품으로는 유청 단백질을 이용한 다이어트 음료, 가수분해된 유청단백질을 이용한 단백질 보충제, 카제인 나트륨을 이용한 커피의 프림, 우유 단백질을 이용한 팩 또는 로션 등이 시중에 출시되어 있음
- 전 세계 5명 중 1명 꼴로 자가 면역 질환을 앓고 있음. 또한 추후에도 지속적으로 증가할 것으로 보이며, 세계의 자가 면역 질환 치료제 시장은 2011년 약 390억 달러를 기록하며 Compound Annual Growth Rate(CAGR) 7.2%로 2016년 550억 달러에 도달할 것으로 예측되고 있음 (BCC Reaserch, 2011)
- 산업화, 도시화에 따른 생활환경의 변화와 대기오염 등으로 인해 아토피 피부염 등 환경성 질환 환자가 증가하고 있음. 아토피 피부염을 포함한 알레르기질환을 앓고 있는 환자의 수는 세계적으로는 약 4억 명(5.9%)에 이르며, 우리나라의 경우 2008년 국민건강보험공단의 집계에 따르면 아토피 피부염 환자는 전체 인구의 2.24%에 해당하는 108만 명에 이룸. 특히 영·유아기의 유병율이 높아 1세 영아의 26.5%가 환자로 등록된 바 있으며, 연간 10만 명중 70명에 발생(총 3만4천여 명)하는 추세이고, 나이가 들어도 지속되는 경향이 증가하고 있음 (이혜경, 2011)
- 전 국민의 20~25%정도가 식품 아토피 문제를 겪고 있고 아토피 환자 50%가 식품과 연관이 있다고 하며, 우유 섭취시 우유 단백질이 아토피를 유발한다고 알려져 있음. 우유 단백질을 이용하여 기능성 신소재를 제조·개발하면 우유 단백질로 인한 아토피 발생을 줄일 수 있음 (시험검사소, 2006)
- 국내 면역질환치료제 시장은 연간 10~20% 상승세를 나타내며, 사이토카인, 케모카인 및 치료용 항체를 포함하는 면역 조절 단백질 국내시장은 2005년 2.214억원, 2011년 2조 7,600억원 정도이며, 이는 단백질 제품 국내시장규모의 40% 정도임 (한국과학기술정보연구원, 2004)
- 국내의 경우, 면역억제제 연구는 제약사를 위주로 기존의 제제나 제형을 개량하는 연구개발이 진행되고 있으며, 면역기능제어 및 면역조절치료제 제조·기술개발, 단일항체치료제, 감염성 질환치료제 백신, 대사성 질환치료제에 대한 연구와 유산균을 이용한 장관 면역증강제 및 염증성 장질환 치료제 개발 등의 연구가 보고되고 있으나 성과는 아직 미비한 상태임 (한국과학기술정보연구원, 2004)

- 국내 생물산업제품의 상당부분을 항생제, 항암제, 백신류, 호르몬제, 진단제가 차지하고 있으나 최근 들어 선진국에서 개발된 면역조절제, 면역치료제 등의 시장규모가 급속히 확장될 것으로 예상됨 (한국과학기술정보연구원, 2004)

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 기능성 우유시장은 소득증대에 따라 건강기능위주의 소비패턴이 확산되고 핵가족화로 고급 소비재의 구매기준이 자녀중심으로 변화되면서 유럽을 비롯해 소득수준이 높은 나라일수록 원유의 성분을 첨삭한 기능성 우유의 종류가 다양하며 지속적인 신장세로 시장규모 역시 비례적으로 확대되는 경향을 보임 (식품음료신문)
- 국외의 경우, 우유 단백질을 이용한 제품으로는 국내와 마찬가지로 가수분해된 유청단백질을 이용한 단백질 보충제, 우유 단백질을 이용한 샴푸, 팩, 로션 등이 생산 및 판매되고 있음
- 면역치료제의 세계시장규모는 매년 18% 이상의 성장을 거듭하고 있으며, 최근 국외시장은 면역조절 단백질의 대부분이 치료용 항체제제이고, 기존 제품의 매출액이 매년 20~50%의 급신장 추세임 (한국과학기술정보연구원, 2004)
- 1796년 Jenner에 의해 종두법이 개발된 이후 Pasteur에 의해 백신을 이용한 예방접종이 개발되면서 면역현상 및 면역조절치료제의 개념 및 연구가 시작되었음. 면역조절치료제의 연구 개발의 동향을 보면 미국, 영국 등의 선진 바이오 기업들은 기능유전체학, 단백질체학 및 생물정보학을 기반으로 새로운 작용기전을 갖는 신규 면역조절치료제 탐색 및 개발이 가속화 되고 있으며, 세포성 면역을 유도하기 위한 항원 단백질과 펩타이드를 이용하던 수준에서, DNA, 바이러스 및 수지상 세포를 활용하는 기술로 발전되고 있고, 투여경로도 주사제, 경구용, 패취형 등의 다양한 제품이 개발되고 있음 (생명공학정책연구센터, 2006)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 심혈관 보호와 면역조절 가능성을 가진 유단백 및 마이알반응 발효 가수분해물을 이용한 유제품의 개발 관련 연구

[주관 : 서울우유협동조합]

1. 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소 처리 가수분해물의 기능성 확인

가. 실험방법

(1) 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소 처리 가수분해물 제조

- 가수분해 효소로 *Aspergillus oryzae* 유래 flavourzyme, *Bacillus* 유래의 protamex, neurase 1.5, *Bacillus licheniformis* 유래 alcalase를 사용함
- 유단백질(WPC, sodium caseinate) 및 마이알반응 생성물(WPC-lactose, sodium caseinate-lactose)은 효소/기질 비율을 1:100(w/v)로 첨가하여 뚜껑 있는 시험관에 취하여 shaking incubator에서 180 rpm으로 shaking하면서 flavourzyme, alcalase, neurase의 경우 50 °C에서 반응시켰고, protamex의 경우 40 °C에서 반응시켰음
- 가수분해 시간은 1 시간, 2 시간, 3 시간으로 하였으며 가수분해 완료 후, 85 °C 물에서 5 분간 시험관을 넣어 반응을 정지시킴
- 가수분해물의 향산화활성 측정을 위해 각 시간별로 샘플링한 가수분해물은 GE사의 vivaspin ultrafiltration을 이용해서 10,000 MWCO로 필터한 후, 시료를 제조함

(2) Degree of hydrolysis(DH) 측정

- DH는 Nielsen 등(2001)의 방법을 참고하여 o-phthaldialdehyde(OPA) method로 측정하였음. Dithiothreitol(DTT)이 있을 때, amino group과 o-phthaldialdehyde가 반응하여 생성된 colored compound를 측정하였음
- Tryptone을 이용하여 표준곡선을 작성하였으며, 분석시료 및 표준물질, D.W.(blank)는 OPA reagent와 2분 동안 반응시켜 340 nm에서 흡광도를 측정하여 tryptone 농도(mg/mL)로 나타내었음

(3) SDS-PAGE 분석

- 유단백질 및 마이알반응 생성물 가수분해물의 단백질 조성을 확인하기 위하여 Laemmli(1970) 방법에 따라 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시함

(4) 향산화 활성

(가) FARP assay

- Ferric reducing ability of plasma(FRAP) assay는 total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridytriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridytriazine(Fe^{2+} -TPTZ)로 환원되는 것을 이용하여 측정하는 항산화력 측정 방법으로, Fe^{2+} -TPTZ은 강한 파란색을 가지므로 595 nm에서 모니터 할 수 있음
- Sample을 FRAP reagent와 1:30의 비율로 혼합한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화활성을 확인하고, 표준곡선을 iron(II)sulfate heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)로 작성하여 유단백질 및 마이알반응 생성물의 환원력 활성 정도를 비교함

(나) ABTS assay

- ABTS를 potassium persulphate와 반응시켜 청록색의 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical을 형성시켜 이를 734 nm에서 흡광도 측정 후 시료를 가하여 시료 내 항산화물질의 농도와 비례하여 감소하는 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 의 흡광도를 확인하여 항산화능을 측정하는 원리임
- 7 mM ABTS{2, 2-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid)}와 2.45 mM potassium persulfate를 상온에서 12 시간 동안 반응시킨 후 에탄올을 이용하여 734 nm의 파장에서 흡광도가 1.4 ± 0.02 가 되도록 희석하였음
- 20 μl 의 Control(EtOH only)과 각 시료에 180 μl 의 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution을 넣은 후 6분 후 734 nm 파장의 흡광도를 통해 라디칼 소거능을 측정함

(다) DPPH assay

- DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay는 DPPH로 최초 산화를 개시한 후 시료에 의한 radical의 소거 활성을 알아보기 위한 실험임. DPPH는 화학적으로 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로서, 517 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내며, 전자를 받으면 흡광도가 감소하여 다시 산화되기 어려워짐
- 500 μM 의 DPPH reagent 100 μL 와 시료 100 μL 를 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음

(5) NO assay

- NO assay를 통하여 RAW264.7 cell에서의 염증 억제효과를 확인함. 염증 억제 활성 스크리닝의 경우 LPS와 시료를 동시에 처리하여 LPS만 독립적으로 처리하였을 때 발생한 NO 생성량과 비교하여 NO 생성 억제능을 확인함
- RAW 264.7 cell을 2.0×10^5 cells/mL로 seeding한 후 over night로 starvation시킴. 시료를 처리한 후 24 시간 후, 상등액만 50 μL 를 취하여 96 well plate에 분주함. 1% sulfanilamide / 5% phosphoric acid 용액을 50 μL 를 넣고, 0.1% NEAD 50 μL 를 넣어 준 후, 540 nm에서 흡광도를 측정함

(6) HMGR reductase inhibition assay

- HMGR reductase inhibition assay는 cholesterol synthesis 과정 중 다음 반응을 유도하는 HMG-CoA reductase 활성을 억제시켜 cholesterol 합성을 저해시키는 효과가 있는지 확인하는 실험임
- $\text{HMG-CoA} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{mevalonate} + 2\text{NADP}^+ + \text{CoA-SH}$

- HMG-CoA와 NADPH를 기질로 하고 시료를 첨가한 후, HMG-CoA reductase 활성의 억제 정도를 NADP⁺의 흡광도를 통해 측정하였음

(7) micellar solubility of cholesterol inhibition assay

- Dietary 또는 free cholesterol이 담즙산과 인지질이 결합하고 있는 micelle에 incorporation 되어 함께 enterocyte에 흡수되는데, micelle과 결합력이 더 강한 시료를 이용해 cholesterol의 micellar solubility를 감소시키는 효과가 있는지를 확인하는 원리임
- cholesterol, 담즙산 및 인지질을 포함하는 micellar solution에 시료를 첨가한 후, 37 °C에서 24 시간 배양 후, cholesterol 양을 비교 측정하였음

나. 실험결과

(1) 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물의 생성정도 확인

- 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물의 생성정도 결과 (Fig. 1), 유단백질 및 마이알반응 생성물 모두 가수분해 시간이 지날수록 DH가 서서히 증가하였음
- 유단백질의 경우, tryptone을 표준물질로 하여 가수분해 시간별 tryptone 생성량 변화를 측정한 결과, WPC가 13.36 ± 1.17 mg/mL에서 31.71 ± 1.46 mg/mL의 범위를 나타냈으며, sodium caseinate는 14.14 ± 0.86 mg/mL에서 40.54 ± 0.69 mg/mL의 범위를 나타냄
- 마이알반응 생성물의 경우, WPC-MRPs는 4.08 ± 0.29 mg/mL에서 21.71 ± 0.44 mg/mL의 범위를 나타냈고, sodium caseinate-MRPs는 9.51 ± 0.52 mg/mL에서 29.10 ± 0.69 mg/mL의 범위를 나타냄
- 가수분해 시간에 따른 유단백질 가수분해물의 DH와 비교하였을 때, MRPs 가수분해물의 DH가 전체적으로 더 낮은 분포를 나타내는 것을 확인하였는데, 이는 마이알반응으로 인해 생성된 cross-linkage로 인해 효소 작용에 제한을 받았기 때문으로 판단됨

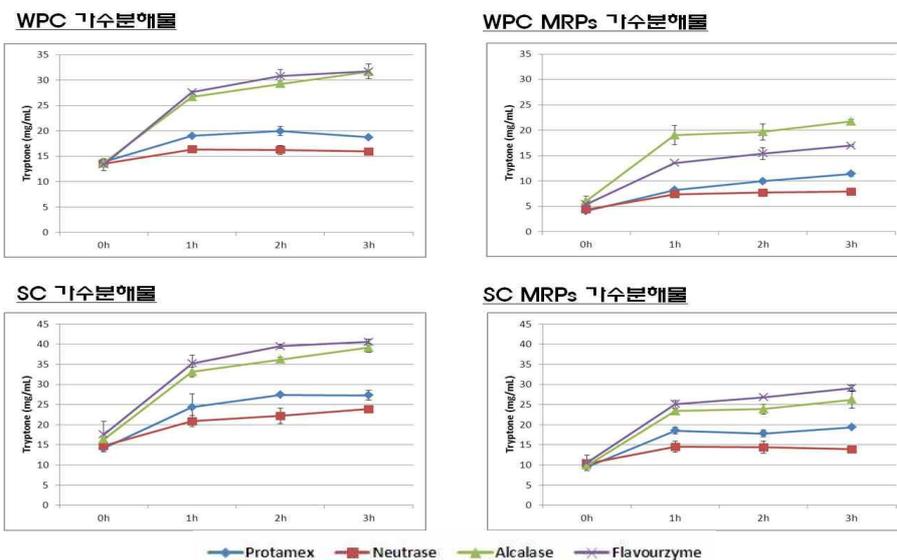


Fig. 1. 유단백질 및 마이알반응 생성물의 시간별 가수분해 정도 변화

- 효소처리 3 시간 후 유단백질 가수분해물에서는 alcalase와 flavourzyme 처리군에서 상대적으로 높은 가수분해 정도를 확인하였는데, WPC 가수분해물의 경우 alcalase 처리군에서 31.61 ± 0.44 mg/mL, flavourzyme 처리군에서 31.71 ± 1.46 mg/mL의 tryptone 농도를 나타내었고, sodium caseinate 가수분해물의 경우, alcalase 처리군에서 39.08 ± 1.03 mg/mL, flavourzyme 처리군에서 40.54 ± 0.69 mg/mL의 tryptone 농도를 나타내었음
- 유단백질과 마찬가지로 마이알반응 생성물에서도 alcalase와 flavourzyme 처리군에서 높은 가수분해 정도가 측정되었는데, MRPs-WPC 가수분해물에서는 alcalase 처리군에서 21.71 ± 0.44 mg/mL, flavourzyme 처리군에서 16.97 ± 0.15 mg/mL의 농도를 나타내었고, sodium caseinate 가수분해물에서는 alcalase 처리군에서 26.18 ± 2.06 mg/mL, flavourzyme 처리군에서 29.10 ± 0.69 mg/mL의 tryptone 농도를 나타내었음
- 이 결과를 통해 가수분해 정도를 고려하였을 때, 유단백질 및 마이알반응 생성물의 가수분해물에서 alcalase 및 flavourzyme 처리군이 다른 가수분해 효소와 비교하였을 때 향후 연구에 적합할 것으로 판단됨

(2) SDS-PAGE 분석

- 유단백질 및 마이알반응 생성물 가수분해물의 단백질 조성을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 마이알반응 생성물의 경우 대조군과 비교했을 때 마이알반응 생성물로 추정되는 75 kDa 이상의 cross-linkage band가 생성된 것을 확인하였음 (Fig. 2)
- 각 가수분해 효소별로 효소처리 3 시간 후 band의 분해정도를 비교했을 때, alcalase가 가장 높은 분해정도를 나타내었고, neutrase가 가장 낮은 분해정도를 나타내었음. Sodium caseinate의 경우, 효소처리 3 시간 후 특히 neutrase 처리군에서 17 kDa과 20 kDa 위치에서 가수분해된 band가 생성된 것을 확인하였음

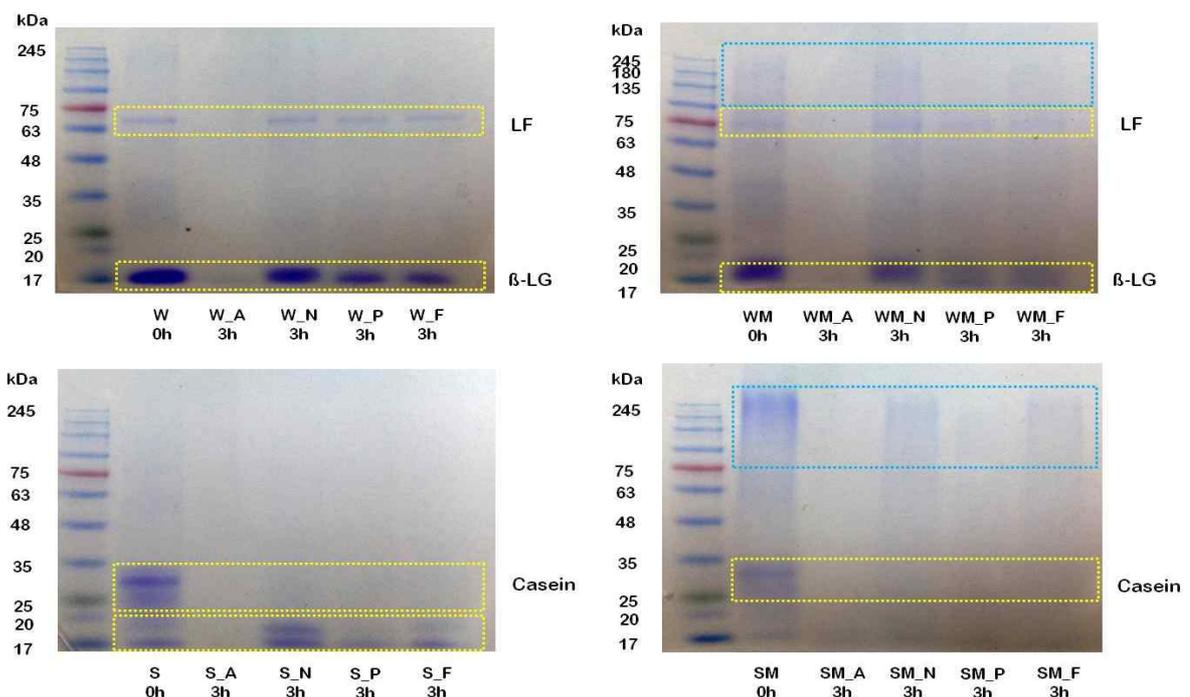


Fig. 2. 유단백질 및 마이알반응 생성물의 SDS-PAGE 결과

(3) 유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물의 항산화 활성

- FRAP 활성 측정 결과 (Fig.3), 유단백질의 경우 가수분해 시간이 증가할수록 환원력이 크게 변화하지는 않았으나, alcalase 처리군의 경우 다른 효소에 비해서 차이를 보이며 증가하는 것을 확인하였음
- 마이알반응 생성물의 경우 유단백질과는 다르게 가수분해 시간이 증가할수록 환원력이 서서히 증가하는 것을 확인하였고, 특히 0 시간에서 1 시간 사이에 크게 증가한 것을 확인하였음
- 가수분해 효소별로 환원력을 비교해 보면, 유단백질 가수분해물과 마이알반응 생성물 가수분해물 모두에서 alcalase 처리군이 가장 높은 환원력을 나타내는 것을 확인하였음
- 마이알반응 생성물에서는 마이알반응을 시키지 않은 유단백질에 비해 현저하게 환원력이 증가하는 것을 확인하였고, 유단백질과 마찬가지로 alcalase 처리군이 가장 높은 환원력을 나타내었음

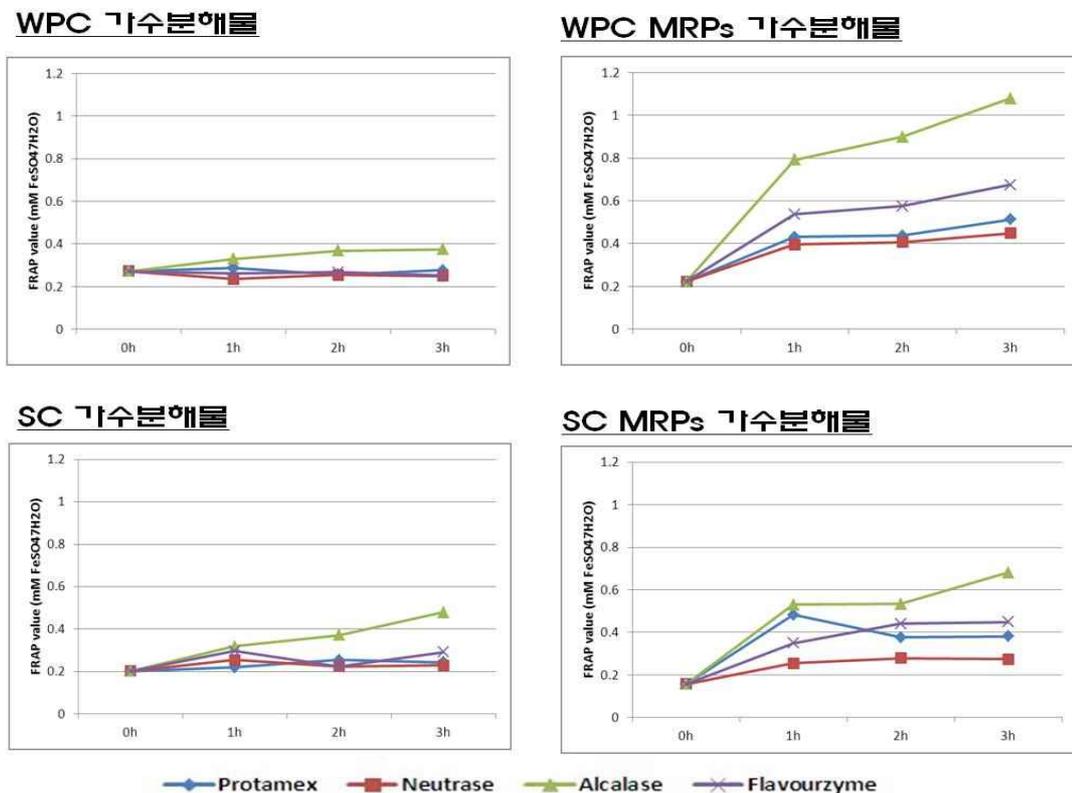


Fig. 3. 마이알반응 생성물의 가수분해 시간별 FRAP 결과

- 유단백질 및 마이알반응 생성물 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거능은 control(ethanol only)만 처리하였을 때의 O.D. 값의 50%를 감소시키는 시료의 농도인 IC50(mg/mL)로 나타내었음 (Fig, 4)
- 유단백질 및 마이알반응 생성물 모두 각 효소처리 1 시간 후 라디칼 소거능이 크게 증가하였으나, 효소처리 초반 1 시간 이후부터는 라디칼 소거능의 변화에 유의적인 차이를 발견할 수 없었음
- 유단백질 가수분해물의 라디칼 소거능 측정 결과에서는 WPC에서는 alcalase가 유의적으로

높은 소거능을 나타내었고, sodium caseinate의 경우 효소간 큰 차이는 나타나지 않았으나 처리 3 시간 후 alcalase 처리군이 비교적 높은 소거능을 나타내었음. 또한, 마이알반응 생성물 또한 효소별 라디칼 소거능 비교 결과, alcalase 처리군이 가장 높은 소거능을 보였음. 이는 FRAP assay의 환원력 측정 결과와도 일치하는 결과로, alcalase 처리군이 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인함

- ABTS 라디칼 소거능 측정 결과에서는 마이알반응이 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인함

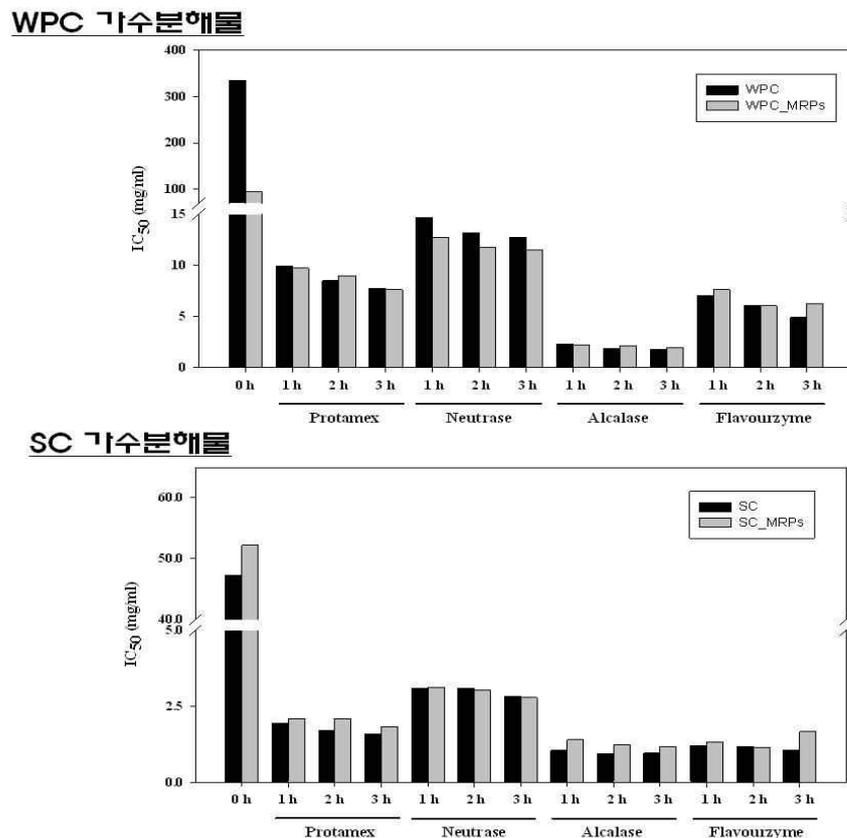


Fig. 4. 마이알반응 생성물의 가수분해 시간별 ABTS 결과

- 마이알반응 생성물의 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능 측정 결과 (Fig. 5), 가수분해 시간이 증가할수록 라디칼 소거능 또한 증가하는 것을 확인하였음. 각 효소별로 비교해 보았을 때, WPC와 sodium caseinate 모두에서 alcalase 처리군이 다른 효소 처리군에 비해 높은 라디칼 소거능을 보임. 이는 ABTS assay와 FRAP assay의 결과와 일치함
- 마이알반응 생성물의 가수분해물이 마이알 반응을 하지 않은 대조군에 비해 현저하게 높은 항산화능을 나타내는 것으로 보아, 마이알 반응은 DPPH 라디칼 소거능을 증가시킨다는 것을 확인함. 이 결과는 FRAP assay의 환원력 측정 결과와도 일치함

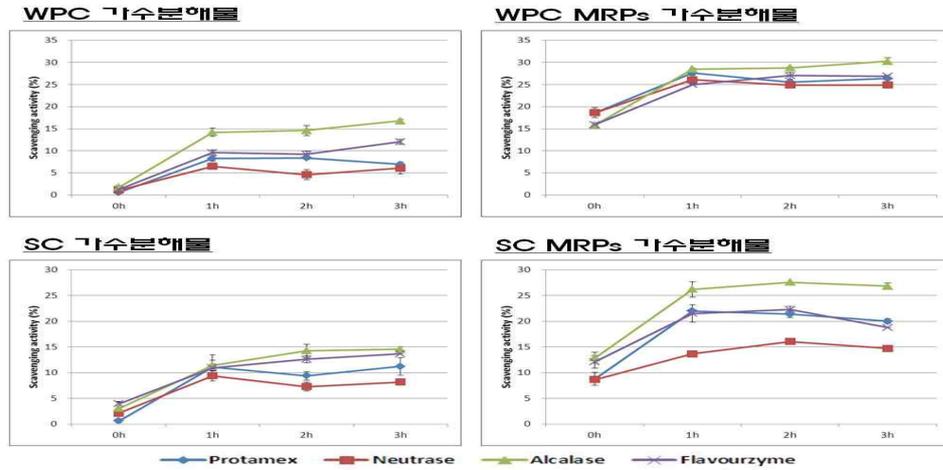


Fig. 5. 마이알반응 생성물의 가수분해 시간별 DPPH 결과

- 위의 3가지 항산화 활성 측정 결과를 통해 alcalase를 처리한 마이알반응 생성물의 가수분해물이 가장 높은 항산화 활성을 나타냄을 확인하였고, 이는 OPA method를 통한 DH 측정 결과와 SDS-PAGE를 통한 단백질 조성 변화 확인 결과와도 일치하는 것으로 향후 further study에 사용될 가수분해물로 적절할 것으로 판단됨

(4) 유단백질 가수분해물의 염증 억제 효과 확인

- WPC와 sodium caseinate의 면역 활성 및 염증 억제 효과를 확인한 결과 (Fig. 6), 유단백질에서는 면역 활성이 나타나지 않았고, 염증억제 활성의 경우, sodium caseinate에서는 활성이 없었으나 WPC 가수분해물에서는 염증 억제 효과를 확인하였음
- 각 가수분해 효소별로 비교했을 때, WPC 가수분해물 중 특히 alcalase와 neutrase 처리군에서 효소처리 3 시간 후 염증 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였음. 반면에, SC 및 SC 가수분해물은 염증 억제 효과를 나타내지 않음

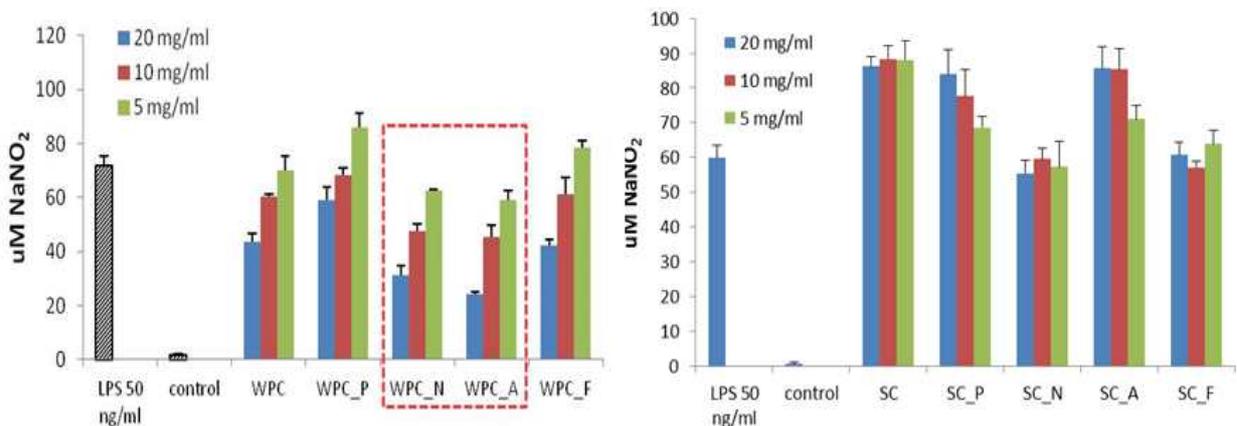


Fig. 6. WPC 및 SC 가수분해물의 염증 억제 효과 측정

(5) 유단백질 및 마이알반응 생성물의 가수분해물의 콜레스테롤 감소 활성

- WPC와 sodium caseinate의 HMG-CoA reductase 억제효과를 확인한 결과 (Fig. 7), WPC는 약 40%, sodium caseinate는 약 28%의 효과를 나타냄
- WPC는 효소처리 전에 비해 가수분해물의 효과가 낮거나 거의 같았고, sodium caseinate는 가수분해물의 효과가 높게 나타났으며, 각 가수분해 효소별로 비교한 결과, flavourzyme과 alcalase에 의한 가수분해물의 효과가 비교적 높게 나타남

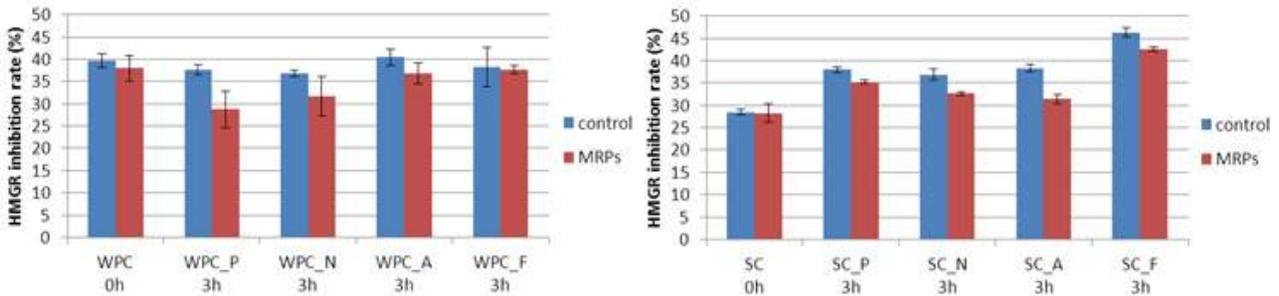


Fig. 7. WPC, sodium caseinate 가수분해물의 HMG-CoA reductase inhibition 효과

- micellar solubility of cholesterol inhibition assay는 dietary 또는 free cholesterol이 담즙산과 인지질이 결합하고 있는 micelle에 incorporation 되어 함께 enterocyte에 흡수되는데, micelle과 결합력이 더 강한 시료를 이용해 cholesterol의 micellar solubility를 감소시키는 효과가 있는지를 확인하는 원리임. cholesterol, 담즙산 및 인지질을 포함하는 micellar solution에 시료를 첨가한 후, 37 °C에서 24 시간 배양 후, cholesterol 양을 비교 측정하였음 (Fig. 8)
- 가수분해 효소별로 활성을 확인한 결과, 다른 효소에 비해서 alcalase를 처리한 MRPs 가수분해물에서 효소처리 전에 비해 cholesterol solubility가 유의적으로 감소함

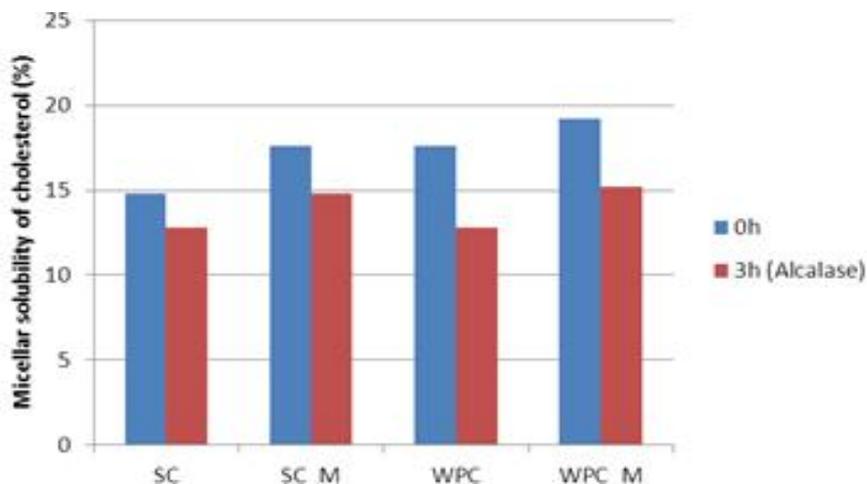


Fig. 8. WPC, sodium caseinate 가수분해물의 micellar solubility of cholesterol inhibition 효과

2. 유단백질 마이알반응 생성물의 효소 처리 가수분해물 및 발효 가수분해물의 지표물질 분석

가. 실험방법

(1) 당의 종류에 따른 MRPs(maillard reaction products)의 항산화 효과 확인 및 MRPs 효소 처리 가수분해물의 제조

- 1차년도에서 유단백질 WPC80(whey protein concentration, protein 80%), SC(sodium caseinate)와 lactose 마이알 반응물인 G-WPC(glycated-WPC), G-SC(glycated-SC)의 네 가지 (flavourzyme, protamex, neutrase, alcalase) 효소 처리한 가수분해물 중에서 ‘G-WPC의 alcalase 처리 가수분해물’이 선발되었음
- FRAP, ABTS, DPPH의 세 가지 메커니즘으로 항산화 효과를 비교 측정된 결과, G-WPC의 alcalase 처리 가수분해물의 항산화 효과가 가장 좋았으며, NO assay를 통한 면역활성과 HMGR inhibition, cholesterol reduction assay에서도 동일하게 높은 활성을 나타내었음
- 추가적으로, 당의 종류에 따른 마이알 반응 생성물의 항산화 효과의 차이를 확인하기 위해 lactose 대신 glucose를 사용한 마이알 반응 생성물을 제조하여 항산화 효과(FRAP, ABTS, DPPH)를 비교 측정하였음
- 마이알 반응은 55°C의 shaking water bath에서 60 rpm으로 7일간 반응을 하였으며, 효소/기질 비율을 1:100(w/v)로 첨가하여 뚜껑 있는 시험관에 취하여 shaking incubator에서 180 rpm으로 shaking하면서 50 °C에서 반응시켰음

(2) 한외여과시스템(UF)을 이용한 MRPs 효소 처리 가수분해물의 분리 및 분획 제조

- Vivaspın ultrafiltration (GE healthcare lifescience)을 이용하여 분자량에 따른 MWCO(molecular weight cut off)에 의해 시료를 분리·농축하였음
- UF에 의해 (5,000~10,000MW), (3,000~5,000MW), (3,000MW>)의 세 가지 분획을 얻었음

(3) 단백질분리시스템(FPLC)을 이용한 MRPs 효소 처리 가수분해물의 단백질과 펩타이드 분리·분석

- GE healthcare 사의 AKTA FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) 시스템에 Table 1의 두 가지 컬럼을 장착하여 시료의 단백질과 펩타이드를 분리 정제하였음

Table 1. FPLC column 종류

Column	Type of chromatography	Matrix	Bed volume	Optimal separation range (globular proteins)
Superose 12 10/300 GL	SEC	cross-linked agarose	24mL	5,000-5 x 10 ⁶
Superdex™ Peptide 10/300 GL	SEC	cross-linked agarose and dextran	24mL	100-7,000

- FPLC 시스템을 이용한 시료의 단백질은 다음과 같은 조건으로 분석하였으며, 단백질 표준 물질의 분자량과 retention volume은 Fig. 9과 같음
 - 컬럼: Superose 12 10/300 GL
 - 용매: 50mM phosphate buffer, 0.15M NaCl (pH 7.0)
 - 유속/유량: 0.5mL/min, 1.5CV
 - 주입량: 100uL
 - 측정과장: 280nm

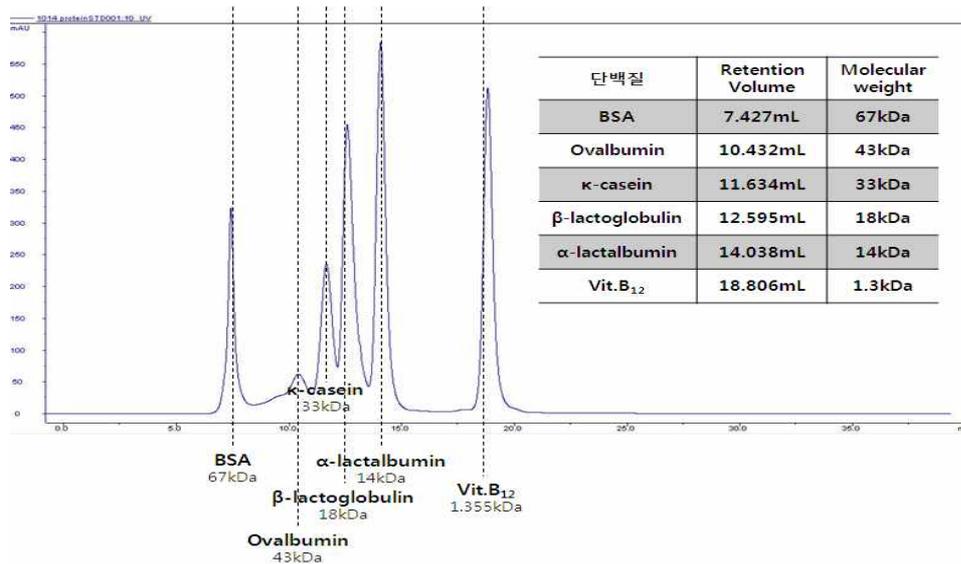


Fig. 9. Superose 컬럼으로 분석한 단백질 표준물질 피크

- FPLC 시스템을 이용한 시료의 펩타이드는 다음과 같은 조건으로 분석하였으며, 펩타이드 표준물질의 분자량과 retention volume은 Fig. 10와 같음
 - 컬럼: Superdex™ Peptide 10/300 GL
 - 용매: 50mM phosphate buffer, 0.15M NaCl (pH 7.0)
 - 유속/유량: 0.5mL/min, 1.5CV
 - 주입량: 100uL
 - 측정과장: 214nm

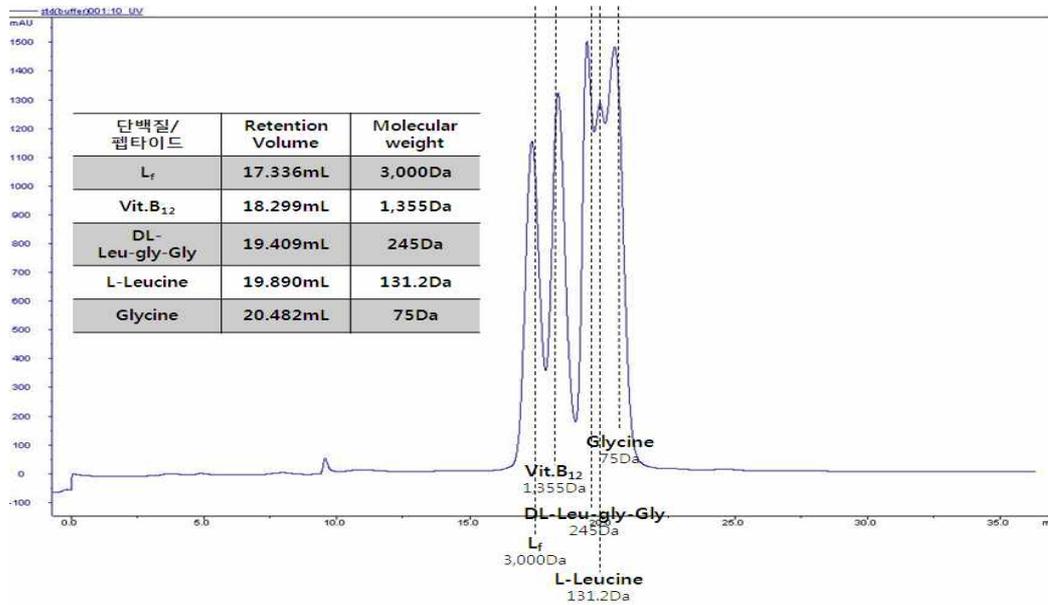


Fig. 10. Superdex 컬럼으로 분석한 펩타이드 표준물질 피크

(4) 프로바이오틱스를 이용한 MRPs 발효 가수분해물의 단백질과 펩타이드 분리·분석

- 1·2차년도 제 1 협동에서 선발된 G-SC MF27 발효 가수분해물, G-WPC MF31 발효 가수분해물과 제 2 협동에서 선발된 G-WPC LC01 발효 가수분해물을 대상으로 단백질과 펩타이드를 분리·분석하였음
- G-SC MF27 발효 가수분해물은 cholesterol reduction 효과가 뛰어났으며, G-WPC MF31 발효 가수분해물은 thrombin 저해 활성이 가장 좋았음. 이에 따라 심혈관 보호 기능성이 가장 우수한 발효물로서 선발되었음
- G-WPC LC01 발효 가수분해물은, 대표적인 면역반응의 일종인 phagocytosis에서 필수적으로 생성되는 물질로 면역 활성화 지표로 사용되는 NO와 대표적인 면역 싸이토카인인 TNF- α 의 발현을 가장 유의적으로 증가시켰으며, 이에 따라 면역 증강 효과가 가장 우수한 발효물로서 선발되었음
- 제 1 협동과 제 2 협동에서 사용된 MRPs 의 제조 조건은 각 기능성의 효과에 따라 Table2와 같은 차이가 있으므로 MRPs와 MRPs 발효 가수분해물을 각각 비교 분석하였음

Table 2. 제 1 협동과 제 2 협동의 MRPs 제조 조건

	제 1 협동	제 2 협동
유단백질 : Lactose	1 : 5	1 : 0
반응 온도	55 °C	55 °C
반응 시간	1 day	1 day

(5) MRPs 발효 가수분해물 분획의 심혈관 보호 효과 확인

- 제 1 협동 선발 시료인 G-WPC 발효 가수분해물(MF31)의 펩타이드 분획은 심혈관 보호 효과를 측정하기 위해 thrombin 저해 활성을 비교 측정하였음
- Thrombin inhibition 활성은 S.B. Zhang 등(2008)의 anti-thrombotic activity assay를 사용하여 측정하였음
- Thrombin은 혈액 응고의 본질인 혈액 속의 가용성 피브리노겐을 가수분해하여 불용성인 피브린으로 변화시켜 혈액을 응고시키므로 thrombin 저해율을 측정함
- 시료 및 buffer(blank), 헤파린(positive control)은 피브리노겐과 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후, thrombin을 첨가하여 효소반응을 개시하고, 37°C, 10분 후 405nm에서 흡광도를 측정하여 헤파린 대비 저해율(%)로 나타내었음

나. 실험결과

(1) 당의 종류에 따른 MRPs의 항산화 효과 확인

- 당의 종류에 따른 마이알 반응에 의한 항산화 활성의 실험결과, 유당과 비교하여 glucose를 사용한 마이알 반응 생성물의 항산화 활성이 유의적으로 크게 증가한 것을 확인하였음 (Fig.11)
- 상기 결과에 따라, 유단백질과 glucose 마이알 반응 생성물의 alcalase 처리 가수분해물을 제조하였으며, 항산화 활성 유용물질 분리 정제를 위해 단백질 및 펩타이드 분석을 실시하였음

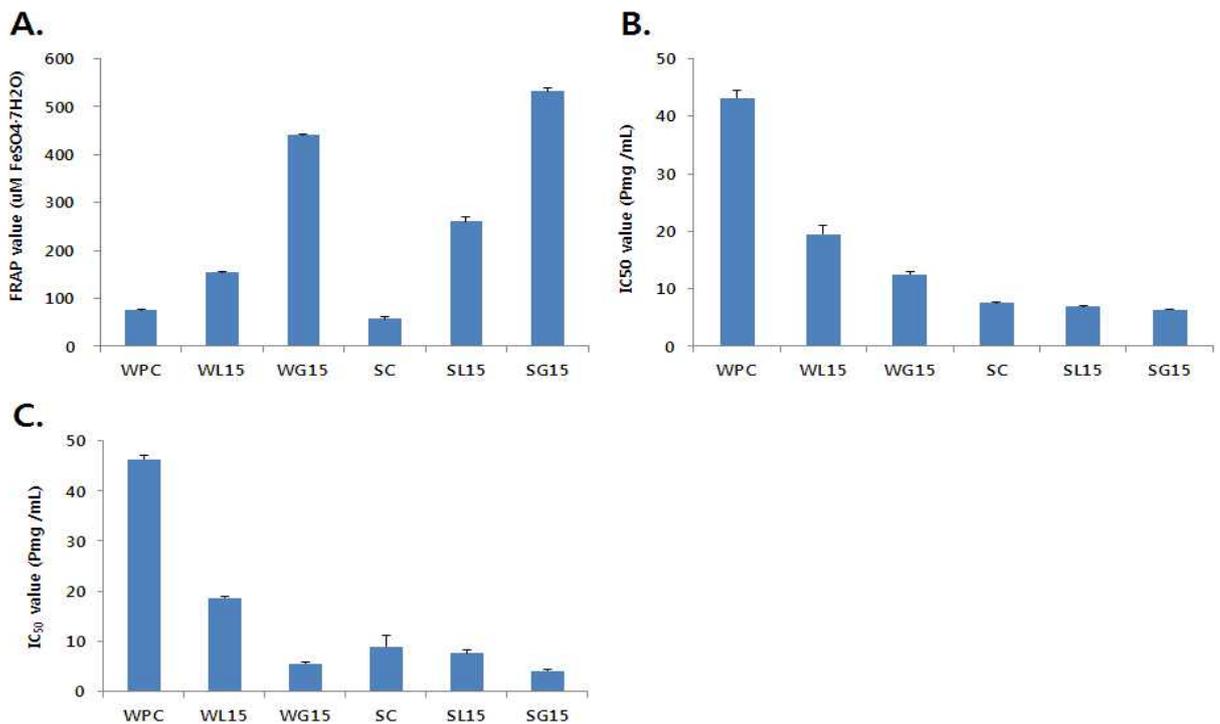


Fig. 11. 유단백질 및 마이알 반응 생성물의 당별 항산화 활성
A. FRAP assay, B. ABTS assay, C. DPPH assay

(2) MRPs 효소 처리 가수분해물의 단백질 분리·분석

- WPC와 G-WPC의 단백질을 비교 분석하여 실제적으로 마이알 반응에 의한 MRPs의 생성 여부를 분석하였음
- WPC를 구성하는 주요 단백질인 β -lactoglobulin(18.4kDa), α -lactalbumin(14.2 kDa), bovine serum albumin(66.5kDa)이 Fig.12에서와 같이 분자량 크기에 따라 순차적으로 검출되었음
- 마이알 반응에 의해 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin 피크가 감소한 반면, 18.4kDa - 66.5kDa 범위 내 피크가 증가함에 따라 MRPs의 생성을 확인하였음(Fig.12)

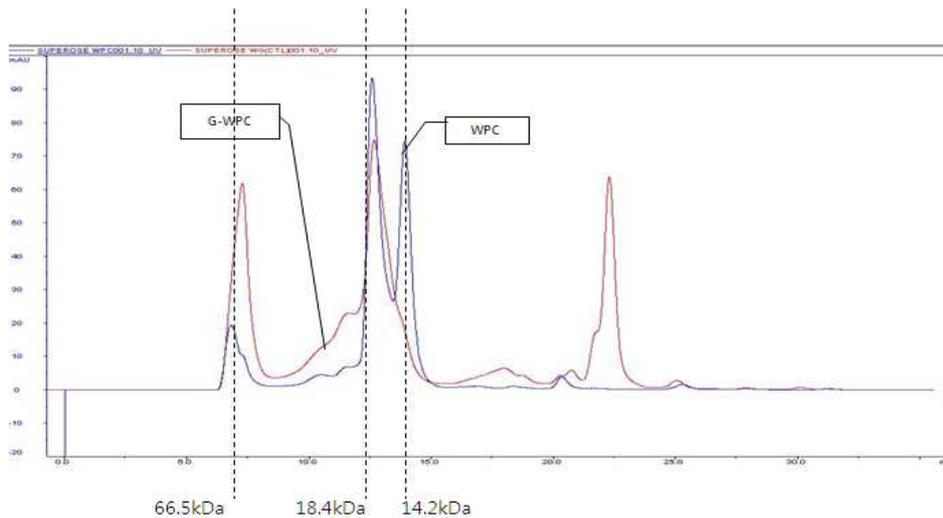


Fig. 12. WPC과 G-WPC의 단백질 분석

- G-WPC와 G-WPC alcalase 처리 가수분해물의 단백질을 비교 분석한 결과, Fig.13에서와 같이 약 14.2kDa - 66.5kDa 범위의 분자량을 가진 단백질 피크가 크게 감소하였으며, 약 14.2kDa 이하의 분자량을 갖는 단백질 피크의 양은 증가함
- 마이알 반응 생성물이 alcalase 처리에 의해 가수분해되어 작은 분자량의 단백질들이 생성된 것을 확인하였음

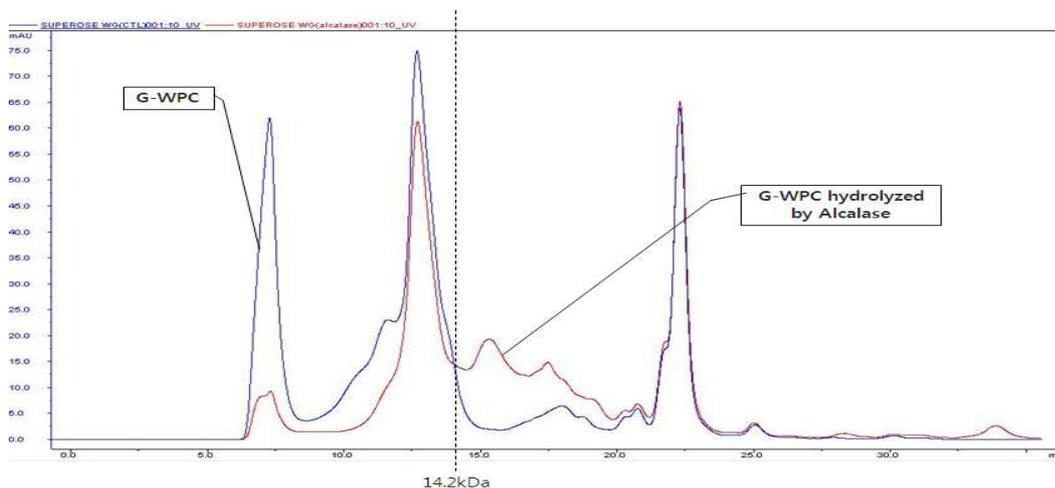


Fig. 13. G-WPC와 G-WPC alcalase 처리 가수분해물의 단백질 분석

(3) MRPs 효소 처리 가수분해물의 펩타이드 분리·분석 및 분획의 항산화 활성 확인

- WPC보다 마이알 반응 생성물이 항산화 활성이 좋았으며, 마이알 반응 생성물보다 마이알 반응 생성물의 효소 처리 가수분해물이 항산화 활성이 좋다는 1차년도 결과에 따라, Fig.13에서 효소처리에 의해 생성된 피크(14.2kDa 이하)의 분자량을 갖는 단백질에 대한 분석과 기능성 검토가 필요함
- G-WPC alcalase 처리 가수분해물을 UF하여 (5,000~10,000MW), (3,000~ 5,000MW), (3,000MW>)의 세 가지 분획을 얻었으며, 이들의 펩타이드를 비교·분석하였음(Fig.14A). Fig.14A에서 각 분획의 크로마토그램의 면적으로 펩타이드 양의 비율을 구하였으며, 분획의 항산화 활성 비교에 적용하였음
- 각 분획의 항산화 효과 비교 결과, Fig.14의 B에서와 같이 ABTS와 DPPH assay에서 (3,000MW>) 분획의 효과가 가장 좋았으며, FRAP assay에서는 (5,000~ 10,000MW)에 이어 두 번째로 효과가 좋았음

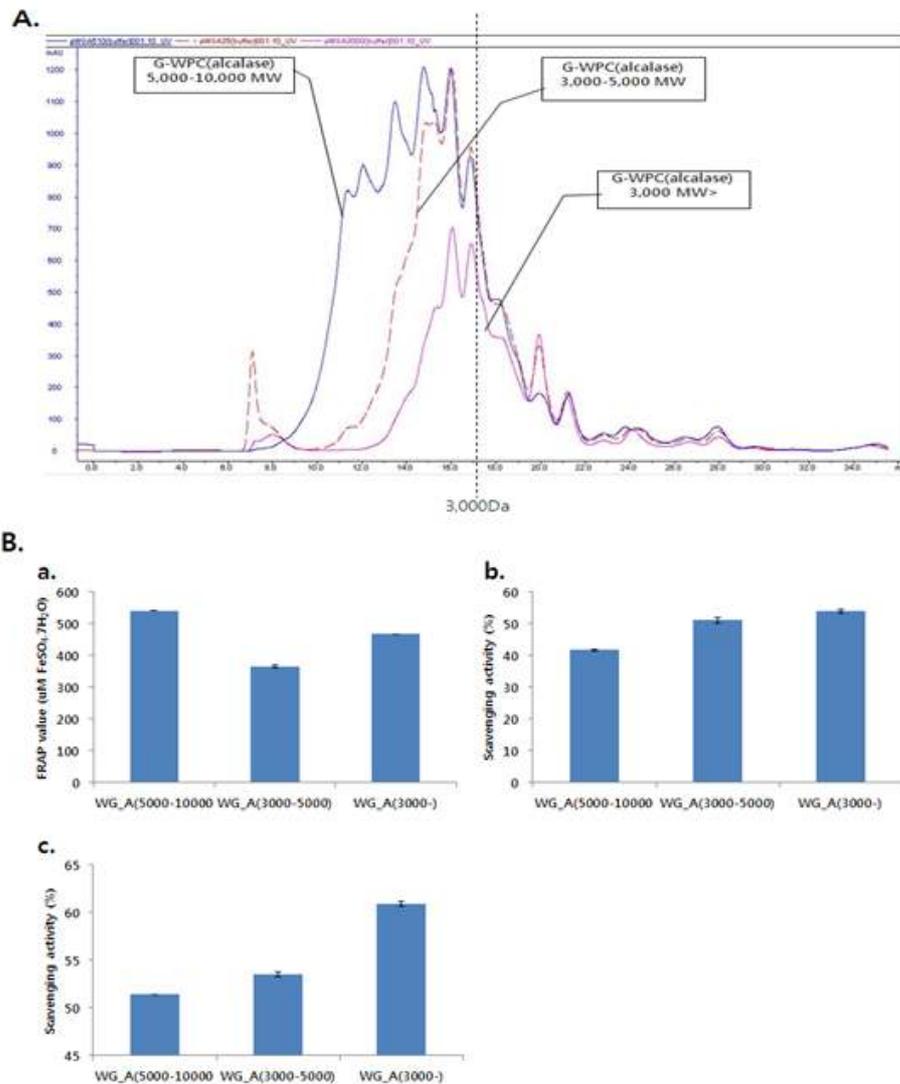
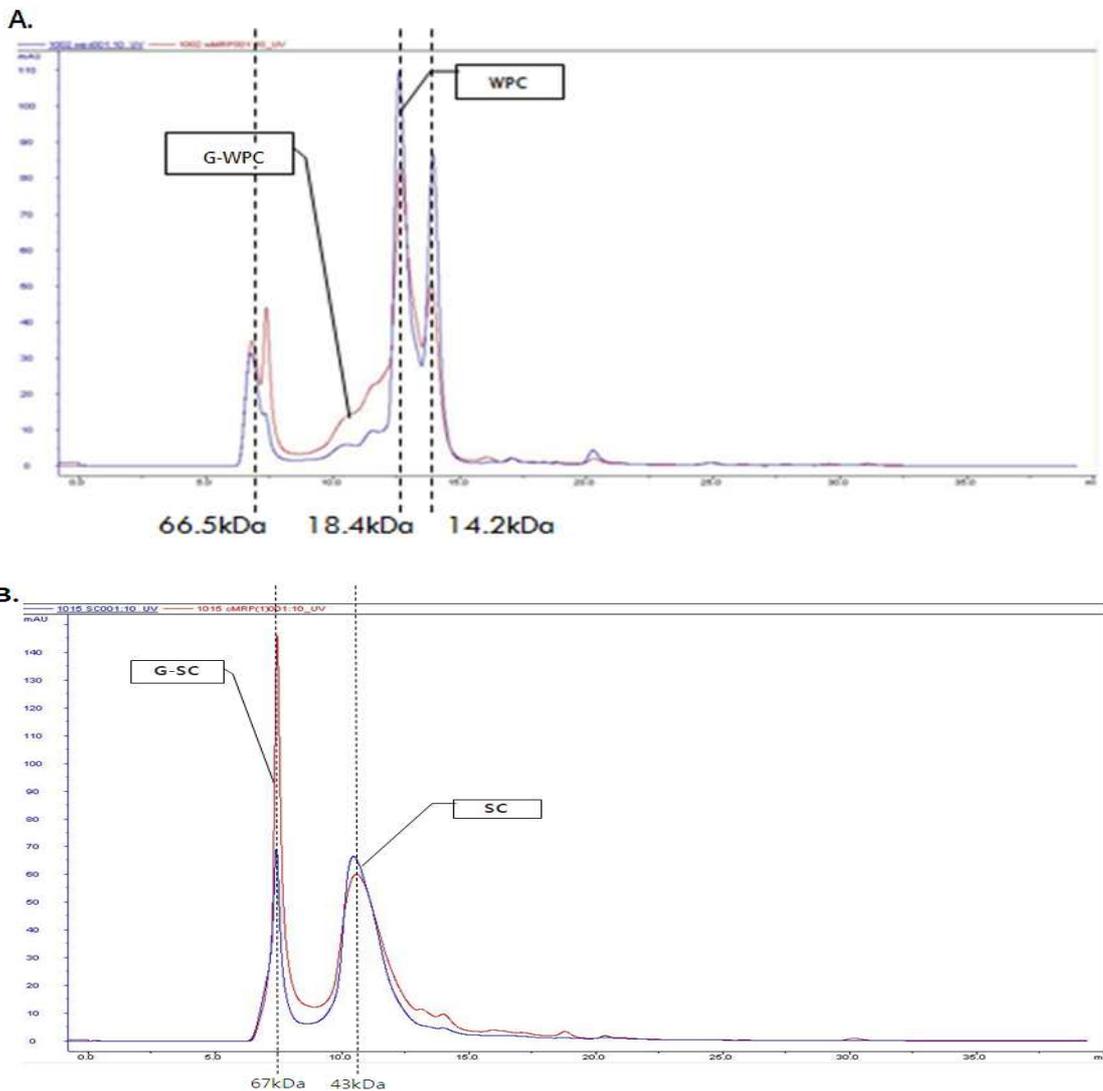


Fig. 14. G-WPC alcalase 처리 가수분해물 분획의 펩타이드 분석과 항산화 효과
 A. 펩타이드 분석, B. 항산화 활성 (a. FRAP assay, b. ABTS assay, c. DPPH assay)

(4) 프로바이오틱스를 이용한 MRPs 발효 가수분해물의 단백질 분리·분석

- 유단백질과 마이알 반응 생성물의 단백질을 비교 분석하여 실제적으로 마이알 반응에 의한 MRPs의 생성여부를 분석하였음
- WPC를 구성하는 주요 단백질인 β -lactoglobulin(18.4kDa), α -lactalbumin(14.2 kDa), bovine serum albumin(66.5kDa)이 분자량 크기에 따라 순차적으로 검출되었으며, 마이알 반응에 의한 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin 피크의 감소와 18.4kDa - 66.5kDa 범위 내 피크의 증가로 MRPs의 생성을 확인하였음(Fig.15A와 C)
- SC의 주요 구성 단백질은 α s1-casein(23.2kDa), α s2-casein(25.4kDa), β -casein (24.0kDa), κ -casein(19.0kDa)이지만, Fig.15B와 H. Ecroyd (2010)에 따르면 casein은 사이즈 크로마토그래피로 분리 시 분리가 잘 이루어지지 않는 경향이 있음
- G-SC는 SC에 비해 약 67kDa 분자량의 피크가 증가하였고, 약 43kDa 분자량의 피크는 조금 감소하였음에 따라 마이알 반응에 의한 단백질의 변화를 확인하였음(Fig.15B)



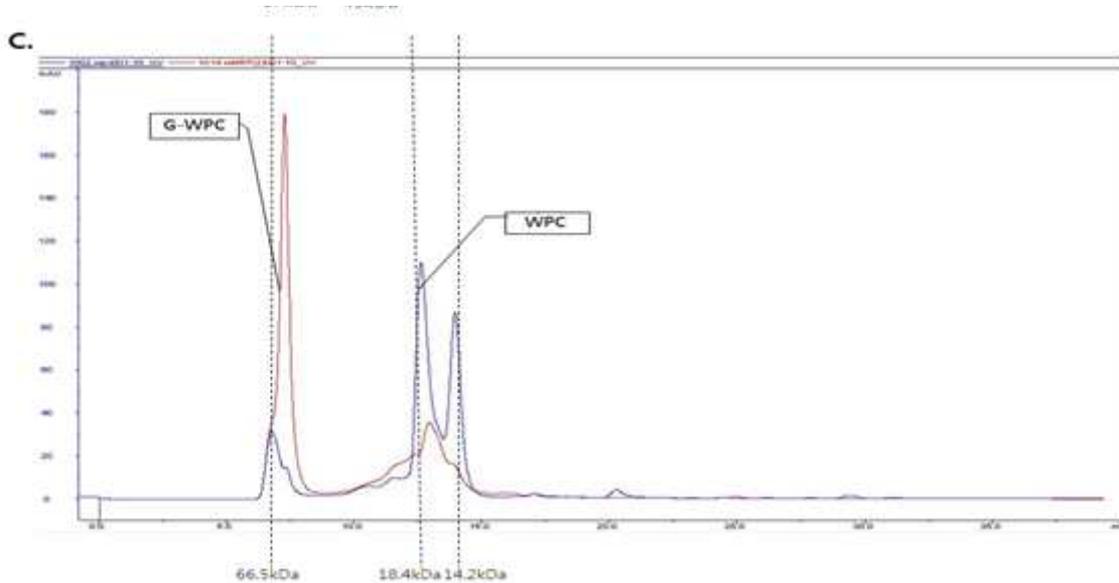


Fig. 15. 유단백질과 마이알 반응 생성물의 단백질 비교 분석

A. WPC 및 G-WPC(제 1 협동)

B. SC 및 G-SC(제 1 협동)

C. WPC 및 G-WPC(제 2 협동)

- G-WPC와 MF31 발효물의 단백질을 비교 분석한 결과, 발효물에서 약 18kDa - 67kDa 범위의 피크와 14kDa 이하 분자량의 피크가 증가했으며, 14kDa - 18kDa 범위의 피크는 감소하였음(Fig.16A)
- 18kDa - 67kDa 범위의 피크 증가는 Fig.15의 A와 C에서 마이알 반응에 의해 증가한 피크의 범위와 일치하므로 발효조건에 의해 마이알 반응이 진행되어 마이알 반응 생성물이 계속적으로 생성된 것이라고 판단됨
- Fig.16의 A와 C에서 발효에 의해 생성된 14kDa 이하 분자량의 피크를 통해, MRPs가 분해되어 펩타이드가 생성된 것을 확인하였음
- G-SC와 MF27 발효물의 단백질을 비교 분석한 결과, 발효물에서 33kDa - 67kDa 범위의 분자량 피크는 감소하였고, 33kDa 이하의 피크는 증가하였음(Fig.16B)
- G-SC의 MF27에 의한 발효에 따라 분해되고 생성된 펩타이드를 확인하였음
-

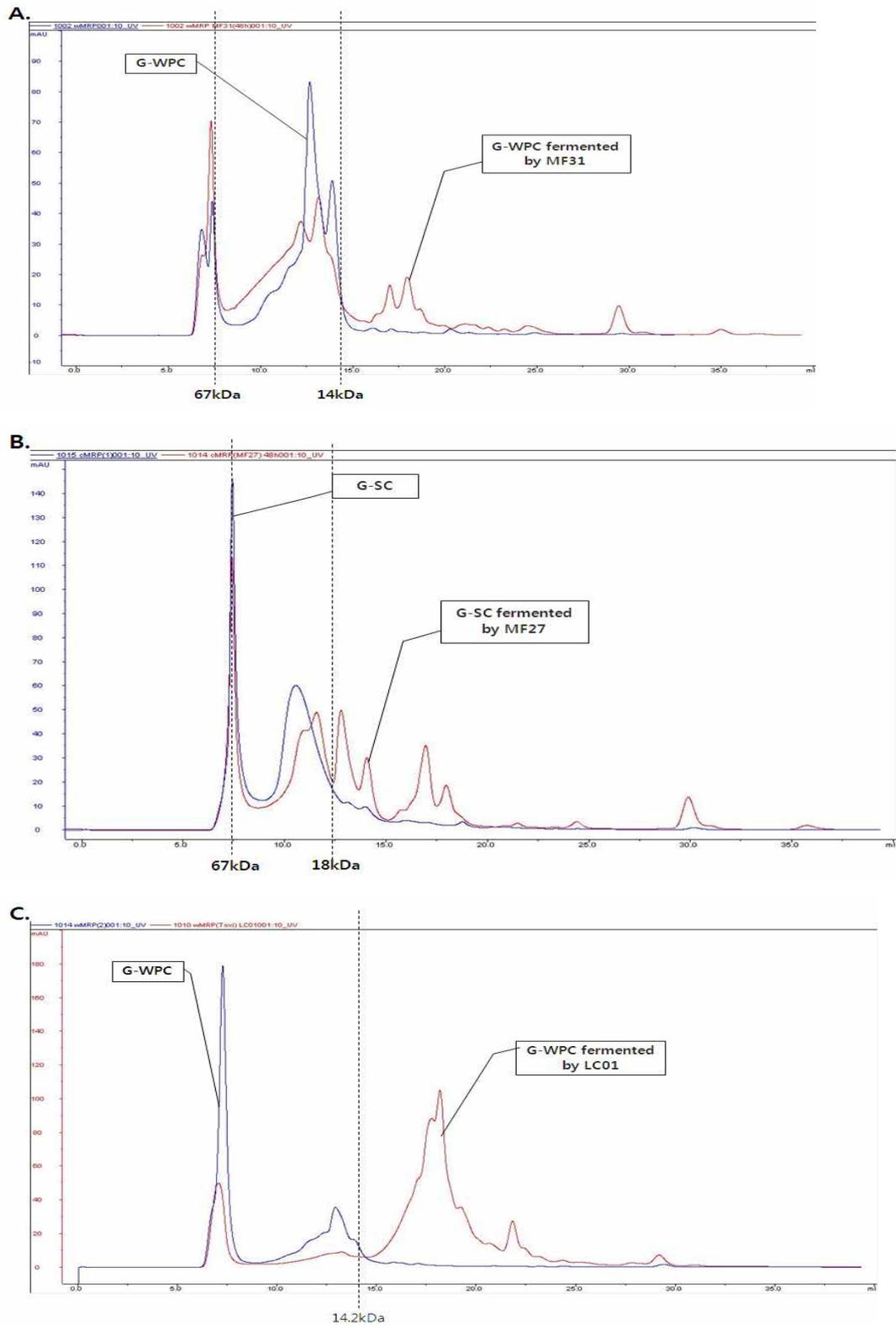


Fig. 16. 유단백질 마이알 반응 생성물과 발효물의 단백질 비교 분석
 A. G-WPC와 MF31 발효물(제 1 협동)
 B. G-SC와 MF27 발효물(제 1 협동)
 C. G-WPC와 LC01 발효물(제 2 협동)

(5) 프로바이오틱스를 이용한 MRPs 발효 가수분해물의 펩타이드 분리·분석

- 시료의 분석에 사용된 컬럼(Superdex)은 분석 가능 범위가 100-7,000Da (Table1)이며, 12,384Da 이상 분자량의 피크는 단백질 집합체로 분석되었음(Fig.17)
- MRPs 발효 가수분해물의 펩타이드를 분석한 결과, Fig.17에서와 같이 1,355Da - 3,000Da 범위의 피크가 현저히 증가하였고, 12,384Da 이하에서도 다수의 피크가 생성되었음

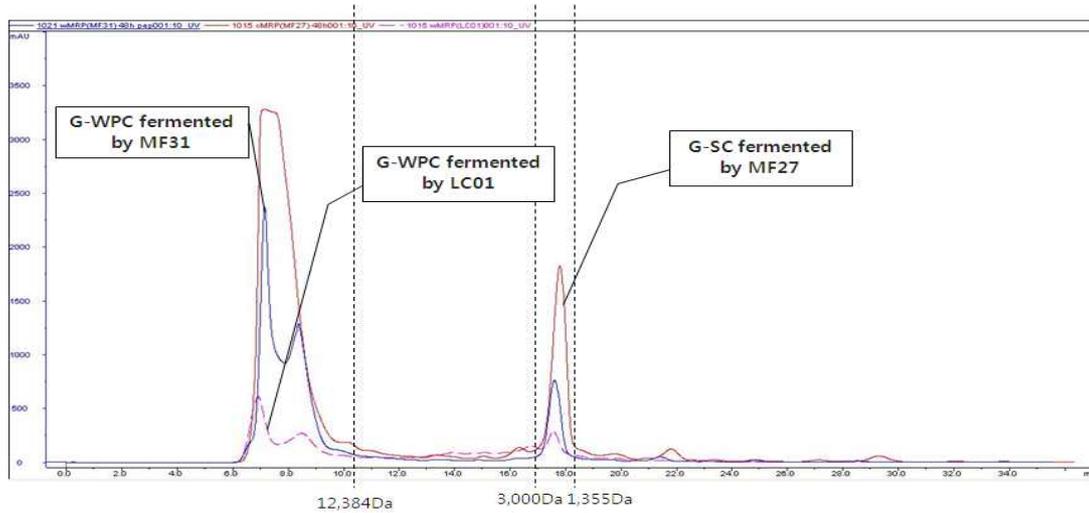


Fig. 17. 유단백질 마이알 반응 생성물 발효물의 펩타이드 분석

- G-WPC MF31 발효물의 시간 별 펩타이드 분석결과, 발효시간에 따라 1,355 - 3,000Da 범위 분자량의 피크가 감소하는 것을 확인하였음(Fig.18). 기 분자량 펩타이드의 감소에 따라 thrombin 저해 활성 역시 감소하는 것을 확인하였음

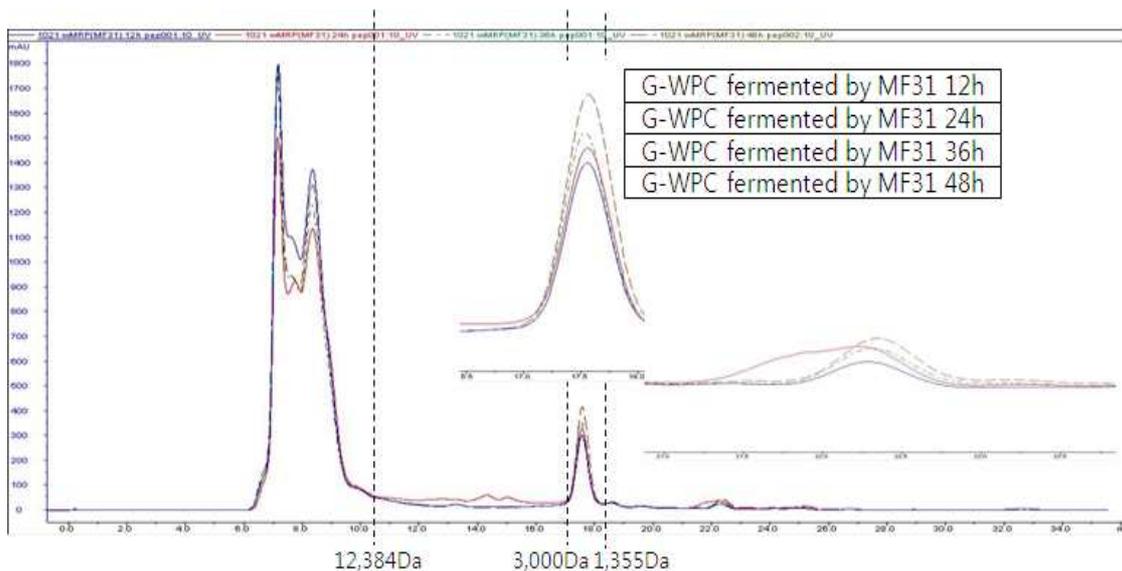


Fig. 18. G-WPC MF31 발효물의 발효 시간별 펩타이드 비교 분석

(6) MRPs 발효 가수분해물 분획의 심혈관 보호 효과 확인

- G-WPC MF31 발효물의 분획에 대한 thrombin 저해 활성을 비교해 본 결과, F1 분획의 효과가 가장 좋았으며, F6 분획을 제외한 분획에서 비슷한 수준의 효과를 나타냈음
- 각 분획의 펩타이드 양이 동일하지 않으므로, Fig.19의 크로마토그램 면적 비율로 thrombin 저해 효과를 나누어 비교해 본 결과, F4 분획의 효과가 가장 좋았음
- 분획 F1 - F4는 12,384Da 이상의 분자량을 갖고 있는 단백질 집합체의 피크에 속하며, 해당 분획의 분리·분석이 필요함
- 또한 분획의 동결건조에 의한 농축과 분말화를 통해 동일 농도 조건에서의 기능성 비교를 진행 중임

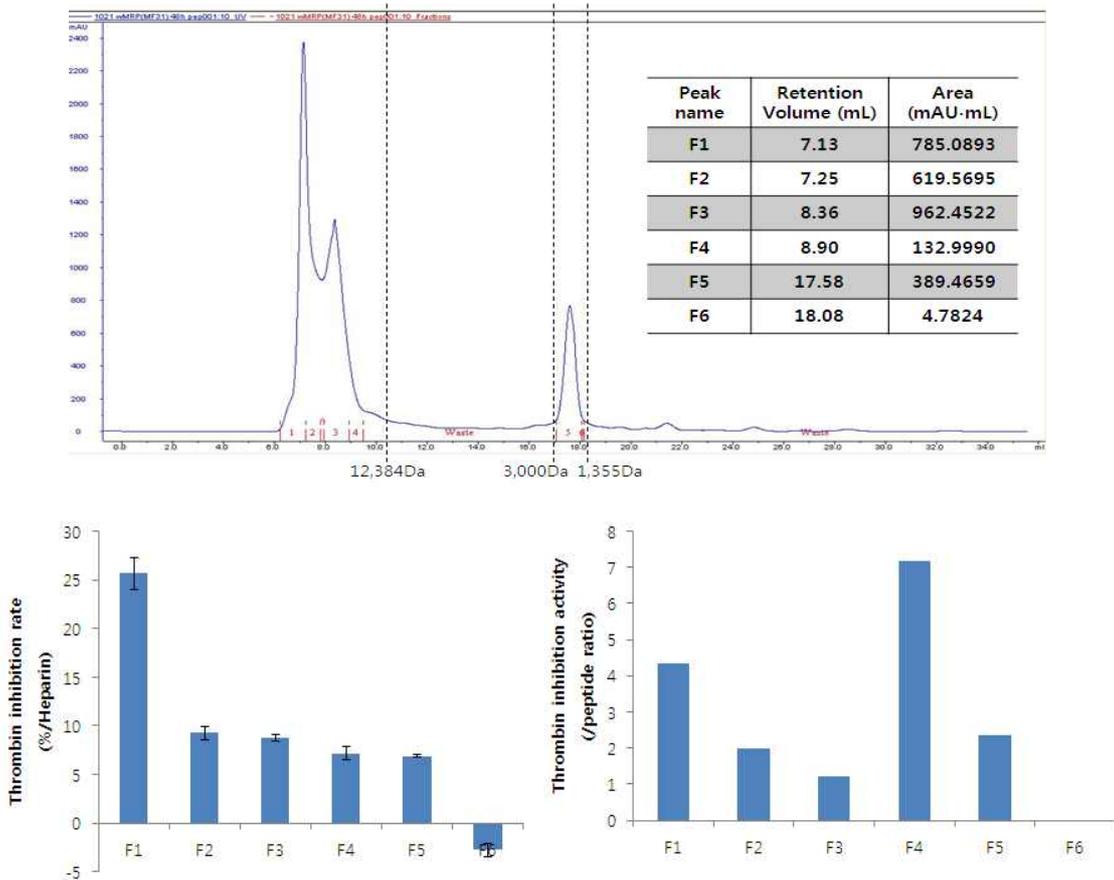


Fig. 19. G-WPC MF31 발효물의 분획별 Thrombin 저해 효과

3. 유단백질 마이알반응 생성물의 제조 및 발효 조건 최적 공정 설계

가. 실험내용 및 결과

(1) MRPs 발효조건 단계별 scale up을 통한 생산 공정 최적화

- 심혈관 보호 효과와 면역 활성 효과의 기능성이 확인된 MRPs 발효물의 제조 공정 최적화를 위해 lab-scale의 소량생산을 실시함
- 「축산물의 가공기준 및 성분규격」(식약처 고시 제2013-230호)에 고시되어있는 발효유와

유음료의 정의와 성분규격(Table 3)은 다음과 같음

- 발효유류에 속하는 ‘발효유: 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이나, 이에 다른 식품 또는 식품첨가물 등을 위생적으로 첨가한 것으로 무지유고형분 3% 이상의 것을 말한다.’
- 가공유류에 속하는 ‘유음료: 무지유고형분이 4% 이상 함유된 음료로서 다른 가공품에 해당되지 아니하는 것을 말한다.’

Table 3. 「축산물의 가공기준 및 성분규격」 중 발효유와 유음료의 성분규격

항목	유형	발효유	유음료
(가) 정상		고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가진 액상으로서 이미·이취가 없어야 한다.
(나) 무지유 고형분(%)		3.0이상	4.0이상
(다) 유지방(%)		-	-
(라) 세균수		유산균수 또는 효모수로서, 1ml당 10,000,000이상	1ml당 20,000이하 (평균제품의 경우 55℃에서 1주 또는 30℃에서 2주보관 후 표준평판배양법에 의할때 음성이어야 한다)
(마) 대장균군		n=5, c=2, m=<3, M=10	n=5, c=2, m=0, M=10 (평균제품의 경우 음성이어야 한다)

- Table 3의 성분규격에 부합하는 제품 제조를 위해 탈지분유 함량, 마이알 반응 생성물 함량, 점중 균수를 다르게 하여 다양한 조건에서 소량생산을 실시함
- MRPs 발효유와 유음료의 대량생산 시, 제조원가 절감과 공정의 효율성을 고려하여 MRPs 제조과정 중 투석과정을 효소처리로 대체하였음
- Novozymes 사의 Lactozyme® Pure 6500 L을 사용하여 유당을 분해하였으며, 이로 인해 생성되는 glucose는 유산균의 발효에 도움이 되게 하여 따로 glucose를 첨가할 필요가 없도록 조절함



Fig. 20. MRPs 발효물 제조에 사용된 Bio-Reactor

(2) MRPs 발효물의 생산 공정 최적화

- 탈지분유의 첨가가 발효시간에 미치는 영향을 고려하여 함량 조정 실험을 실시한 결과, 탈지분유 2% 첨가 MRPs의 발효시간과 4% 첨가 발효시간에 하루 정도의 차이가 있었으며, 제조공정에서의 발효시간 단축과 성분규격으로 고시되어있는 무지유 고품분의 함량에 맞추어 그 함량을 2%로 최소로 하였음
- 마이알 반응 생성물 함량에 따른 함량 조정 실험을 실시한 결과, (유단백질 5% : 유당 25%) 발효 시 48시간 후에도 발효가 진행되지 않았으며, (유단백질 2.5% : 유당 12.5%)로 조정된 결과 약 24시간의 발효시간이 걸렸음
- 선발된 유산균의 접종 균수를 107 CFU/mL, 108 CFU/mL로 하였을 때, 발효시간에 약 하루 정도 차이가 있었으며, 최종적으로 108 CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 pH가 약 4.8이 될 때 까지 배양하였음
- 다양한 조건의 조정실험 결과, lab-scale에 최적화된 MRPs 발효물의 생산 공정도는 Fig.21과 같음

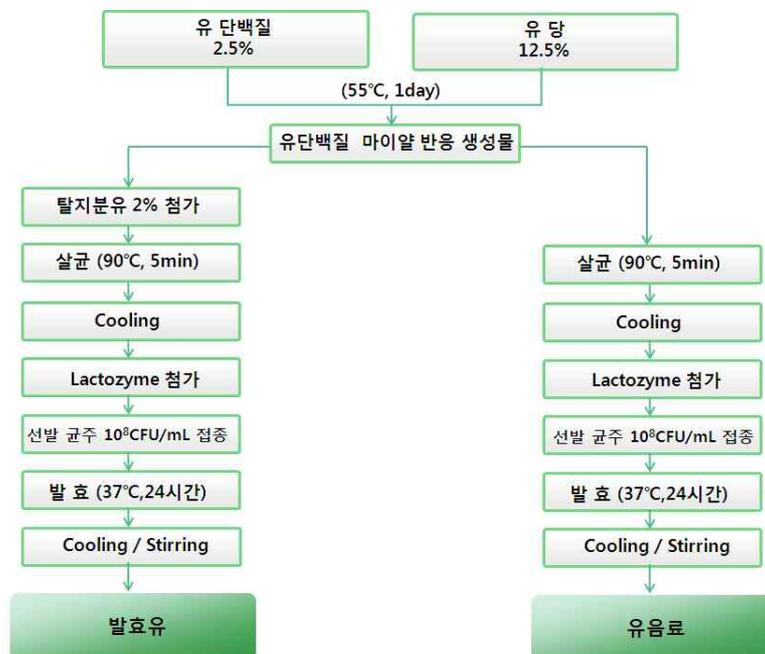


Fig. 21. 기능성 MRPs 발효유와 유음료 생산 공정도

(3) MRPs와 MRPs 발효물 소량생산 시험 및 제조

- MRPs와 MRPs 발효물의 소량생산 시험을 위해 (재)춘천 바이오 산업 진흥원에서 발효조 (500 kg)와 동결건조(300 kg)를 사용한 pilot scale 실험을 진행하였음
- WPC 50 mg/mL을 55°C 발효조에 넣고 24 시간 동안 마이알 반응시켜 MRPs를 제조하였음



Fig. 22. MRPs와 MRPs 발효물 소량생산 시험에 사용된 발효조
(재)춘천 바이오 산업 진흥원

가.



나.



Fig. 23. (재)춘천 바이오 산업 진흥원의 가. 한외여과기와 나. 동결건조기

4. 유단백질 마이알반응 생성물의 발효 가수분해물 적용 유제품 개발

가. 실험방법

(1) MRPs 발효 유제품 제조 및 기능성분 함량 평가

- Lab-scale에 최적화된 공정도에 따라 제 1 협동, 제 2 협동에서 선발된 MF31, MF27, LC01 균주로 발효한 MRPs 발효유와 MRPs 발효 유음료를 제조하였음
- MRPs 발효 유제품은 「축산물의 가공기준 및 성분규격」의 발효유와 유음료의 성분규격을 참고하여, 무지유 고형분과 균수, 당 성분을 분석·측정하였음
- 무지유 고형분은 수분, 회분, 단백질을 분석하고 이들의 총 %함량을 제외한 고형분으로 하여 % 함량으로 구하였음
 - 수분은 미리 가열하여 향량으로 한 칭량접시에 시료와 해사를 넣어 잘 섞은 후 105°C 건조기에 넣어 향량한 후 무게 차이를 이용하여 측정하였음
 - 회분은 미리 회화하여 향량으로 한 회화 도가니에 시료를 넣은 후 550°C 회화로에 넣어 향량한 후 무게 차이를 이용하여 측정하였음
 - 조지방 분석은 마조니어관에 시료와 암모니아수를 가하여 항온수조에서 알칼리 가수분해시킨 후 에테르와 석유에테르를 순차적으로 가하여 추출하였음. 원심분리하여 에테르 층을 미리 향량한 지방수기에 옮긴 후 에테르는 100°C 이하 hot plate에서 증발시켰음. 추출과 증발을 3회 반복하고 105°C 건조기에서 향량한 후 무게 차이를 이용하여 조지방 함량을 측정하였음
 - 조단백질 분석은 Kjeldahl Digestion Unit K-438을 이용하여 가수분해하고, Auto Kjeldahl Unit K-370을 사용하여 증류, 적정을 통해 조단백질을 분석하였음. 34% NaOH로 증류시켜 얻은 암모니아 가스를 4% 붕산(pH 4.65)에 흡착, 포집하여 0.1N HCl로 적정하여 조단백질 함량을 측정하였음
- 일반세균은 Plate Count Agar 배지에, 유산균은 BCP agar 배지에 적당히 희석하고 도말하여 균수를 측정하였으며, CFU/mL로 나타내었음
- Lactozyme 처리에 따른 유당과 glucose의 변화를 알아보기 위해 HPLC를 사용하여 분석하였음. 시료 약 3g에 D.W.와 아세트니트릴 1:1 혼합용액을 가하여 녹인 후, 원심분리한 상등액을 0.45um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였으며, HPLC 분석 조건은 Table 4와 같음

Table 4. 당 분석을 위한 HPLC 분석 조건

검출기	시차굴절계(RI)
컬럼	Carbohydrate, 4.6mm x 300mm, 5um(Waters, USA)
이동상	물:아세트니트릴(25:75)
유속	1mL/min
주입량	10ul

나. 실험결과

(1) MRPs 발효 유제품 제조 및 기능성분 함량

- 제조한 MRPs 발효유와 MRPs 발효 유음료는 Fig.24와 같음



A	MRPs 발효유 (LC01)	B	MRPs 발효 유음료 (LC01)
C	MRPs 발효유 (MF31)	D	MRPs 발효 유음료 (MF31)
E	MRPs 발효유 (MF27)	F	MRPs 발효 유음료 (MF27)

Fig. 24. MRPs 발효유와 MRPs 발효 유음료

- MRPs 발효유와 MRPs 발효 유음료의 성분규격은 Table 5와 같음

Table 5. MRPs 발효유와 MRPs 발효 유음료의 성분규격

	MRPs 발효유				MRPs 발효 유음료			
	접종전	LC01	MF31	MF27	접종전	LC01	MF31	MF27
수분 (%)	83.22	84.22	84.73	84.07	84.53	85.27	85.64	85.57
회분 (%)	0.37	0.35	0.29	0.34	0.19	0.25	0.17	0.15
단백질 (%)	4.34	4.03	4.12	4.30	3.40	3.30	3.29	3.47
지방 (%)	0.19	0.17	0.19	0.19	0.14	0.12	0.16	0.13
무지유 고형분(%)	11.88	11.23	10.67	11.10	11.74	11.06	10.74	10.68
유당 (%)	15.56	5.86	2.19	2.68	14.09	12.80	12.64	13.26
Glucose (%)	0	2.39	4.16	4.13	0	0.01	0	0
유산균	발효전	5.9×10^8	5.3×10^8	7.1×10^8	발효전	5.3×10^8	4.1×10^8	5.6×10^8
	발효후	1.4×10^8	1.5×10^8	1.3×10^8	발효후	2.4×10^8	2.9×10^8	1.4×10^8
일반세균	발효전	-	-	-	발효전	-	-	-
	발효후	-	-	-	발효후	-	-	-

- 제조한 MRPs 발효유와 유음료의 일반성분 및 균수 실험 결과, 무지유 고형분은 발효유 3%이상, 유음료 4% 이상의 성분규격에 부합하며, 발효유의 유산균수는 mL당 108 CFU 이상 함유되어 있음

5. 유단백질 마이알반응 생성물의 발효 가수분해물 적용 유제품의 제조

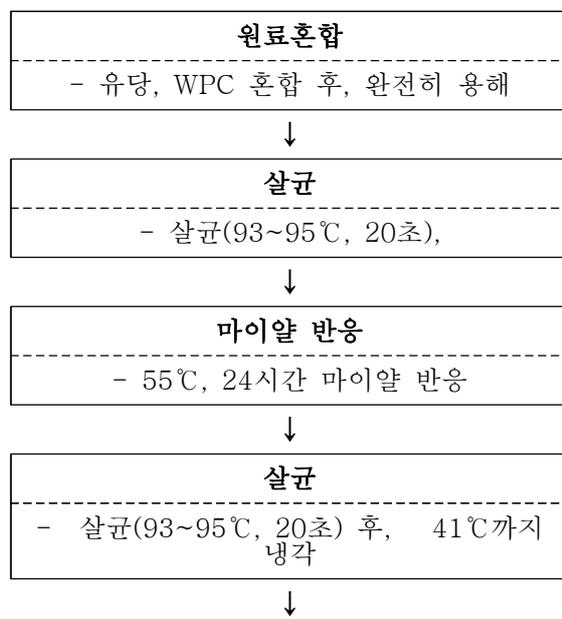
가. 실험방법

(1) MRPs 유산균 음료의 제조 및 대량 생산

- Lab-scale에서 MRPs 발효 가수분해물을 이용한 유산균 음료의 최적 공정 확립 후에 대량 생산을 실시하여 시제품을 생산하였음
- MRPs 유산균 음료는 아래 Table 6.에 제시된 배합비에 따라 제조 되었으며, (주) 데어리젠 문막공장에서 아래의 절차 (Fig. 25)에 따라 대량생산 시제품을 제조하였음

Table 6. MRPs 유산균 음료 시제품의 배합비

원료명	배합비 (%)
WPC	3.500
유당	7.000
ABY-3	0.014
유산균주 (MF31, MF27, LC01)	0.140
정수	59.500
액상과당	4.000
백설탕	1.000
Pectin	0.250
파인애플 농축액	3.820
파인애플향	0.100
정 수	20.830
합계	100.000



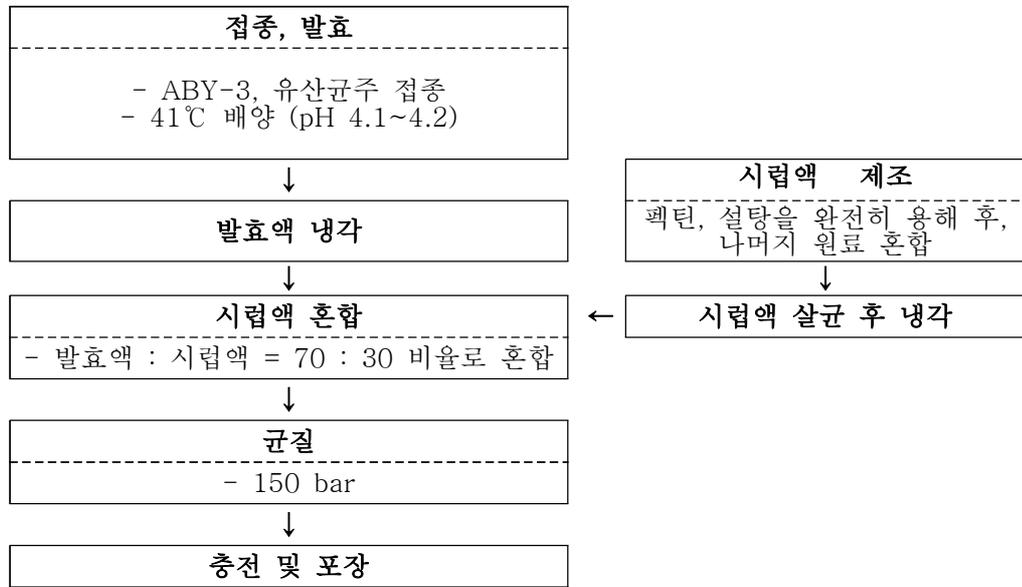


Fig. 25. MRPs 유산균 음료의 제조과정

(2) 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균의 제조 및 대량 생산

- Lab-scale 및 pilot-scale에서 MRPs 발효 가수분해물의 생산 공정을 최적화하여 (재)춘천 바이오 산업 진흥원에서 발효조 (500 kg)와 동결건조 (300 kg)를 사용하여 MRPs 발효 가수분해물의 동결건조물을 제조하였음
- MRPs 발효 가수분해물의 동결건조물은 부형제 및 기타원료와 혼합하여 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균은 아래 도식 에 제시된 절차에 따라 (주) 아람에서 제조하였음



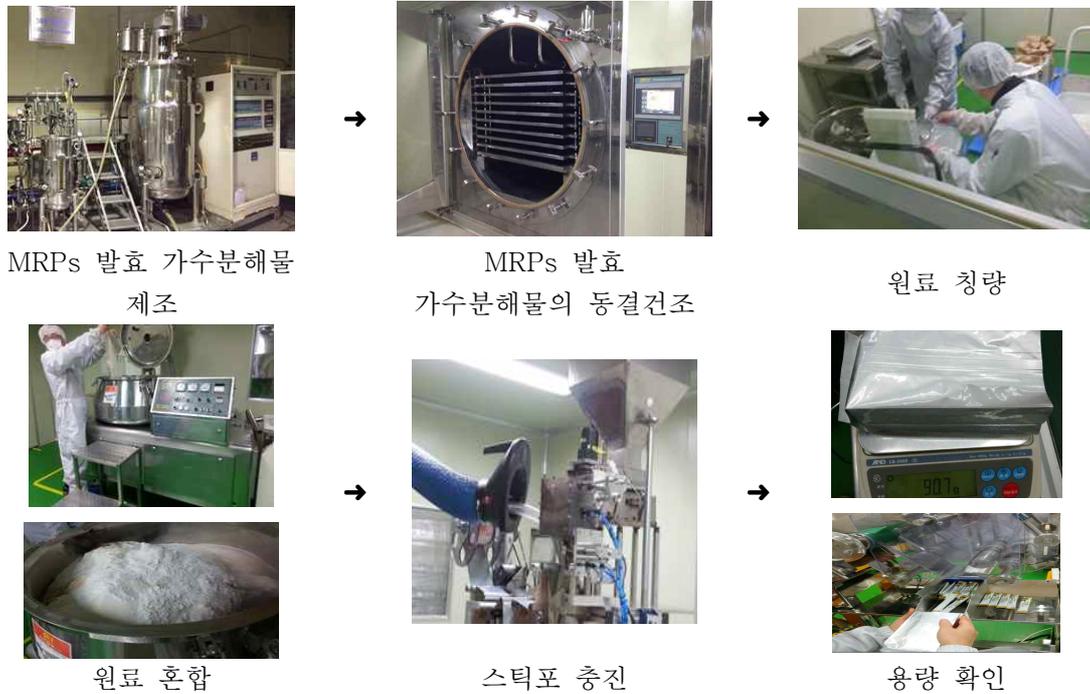


Fig. 26. 프로바이오틱 MRPs 혼합유산균 제제의 제조과정

(3) 이화학적 및 미생물학적 안정성 평가

- MRPs 유산균 음료는 「식품의 기준 및 규격」을 참고하여, 무지유 고형분과 균수, 당 성분을 분석·측정하였음
- 유산균은 BCP agar 배지, 대장균균은 Desoxycholate Lactose Agar, 효모 및 진균은 Potato Dextrose Ager에 적당히 희석하고 도말하여 균수를 측정하였으며, CFU/mL로 나타내었음

(4) 제품 관능 개선 및 평가

- 평가 항목은 맛, 향, 조직감 및 종합 기호도의 네 가지 항목으로 하였고, 평가 방법은 각 항목별로 7점 척도법을 사용하여 관능적 특성을 평가하였음. 평가 항목별 세부 기준은 Fig.27과 같이 정하여 진행하였음



Fig. 29. MRPs 유산균 음료 시제품

- MRPs 유산균 음료의 이화학적, 미생물학적 및 관능 특성 평가 결과
- (주) 데어리젠 문작공장에서 대량생산한 MRPs 유산균 음료 시제품의 이화학적 및 미생물학적 특성평가를 실시하여 최종 제품의 안정성을 확인하였음 Table 7, 8과 같음

Table 7. MRPs 유산균 음료의 이화학적 실험결과

	MRPs 발효유
수분 (%)	83.86
회분 (%)	0.32
단백질 (%)	2.69
지방 (%)	0.11
pH	3.90~4.00
산도 (%)	0.52, 젖산으로서
당도	17.82
비중	1.064~1.066

Table 8. MRPs 유산균 음료의 미생물학적 실험결과

	저장온도 (4 ± 2 °C)			
	생산 후	1주일 후	2주일 후	3주일 후
유산균 (CFU/g)	1.9x10 ⁸	1.6x10 ⁸	1.0x10 ⁸	8.2x10 ⁷
효모 및 곰팡이	음성	음성	음성	음성
대장균군	음성	음성	음성	음성

- MRPs 유산균 음료의 관능분석

- 대량생산 시작품인 MRPs 유산균 음료의 관능특성 분석은 6가지 품질척도를 대상으로 (신맛, 단맛, 짠맛, 향, 질감, 전체적 기호도) 7점 척도법을 활용하여 평가하였음. 관능특성 분석 결과, 신맛과 단맛은 강하지 않아 좋다는 의견이 대부분 이었으며, 향과 질감은 6점대로 높은 선호도를 나타냄. 결론적으로 MRPs 유산균 음료의 전반적인 선호도는 5.6점대로 높은 선호도를 나타냄

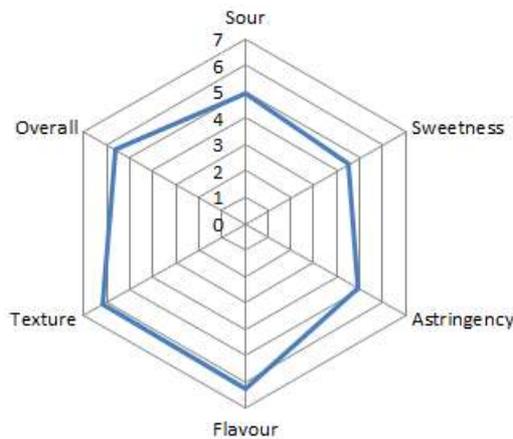


Fig. 30. MRPs 유산균 음료 시작품의 관능특성 분석 결과

- MRPs 유산균 음료의 식품 유형 및 규격 검토

- [식품의 기준 및 규격]을 참고하여 MRPs 유산균 음료의 식품 유형 및 규격을 검토하였으며, 식품의 유형은 발효음료류 중 유산균 음료에 해당함. 유산균 음료의 기준 및 규격은 Table 9와 같음

Table 9. 발효음료류의 기준 및 규격 (식품의 기준 및 규격, 2014)

<p>발효음료류</p> <p>1) 정의 발효음료류라 함은 유가공품 또는 식물성원료를 유산균, 효모 등 미생물로 발효시켜 가공한 것을 말한다(다만, 축산물의 가공기준 및 성분규격에 해당되지 않는 것을 말한다).</p> <p>2) 원료 등의 구비요건</p> <p>3) 제조·가공기준</p> <p>4) 식품유형</p>
--

- (1) 유산균음료
유가공품 또는 식물성 원료를 유산균으로 발효시켜 가공(살균을 포함한다)한 것을 말한다.
- (2) 효모음료
유가공품 또는 식물성 원료를 효모로 발효시켜 가공(살균을 포함한다)한 것을 말한다.
- (3) 기타발효음료

유가공품 또는 식물성 원료를 미생물 등으로 발효시켜 가공(살균을 포함한다)한 것을 말한다.

5) 규격

- (1) 유산균수 또는 효모수 : 1 mL당 1,000,000 이상(유산균, 효모음료에 한하며, 살균제품은 제외한다)
- (2) 세균수 : 1 mL당 100 이하(살균제품에 한한다)
- (3) 대장균군 : 음성이어야 한다.
- (4) 보존료(g/kg) : 다음에서 정하는 것 이외의 보존료가 검출되어서는 아니 된다.

소르빈산 소르빈산칼륨 소르빈산칼슘	0.05 이하(소르빈산으로서, 다만, 살균제품은 검출되어서는 아니 된다)
--------------------------	--

6) 시험방법

- (1) 유산균수 또는 효모수
제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.9 유산균수 또는 3.10 진균수(효모 및 사상균수)에 따라 시험한다.
- (2) 세균수
제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5.1 일반세균수에 따라 시험한다.
- (3) 대장균군
제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.2 정성시험 나. 테스옥시콜레이트 유당환천 배지법에 따라 시험한다.
- (4) 보존료
제9. 일반시험법 2.1 보존료에 따라 시험한다.

(2) 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균

- 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균의 제조

- (재) 춘천 바이오산업 진흥원에서 선발균주 중 심혈관 보호 효과를 확인한 *Lactobacillus gasseri* MF31, *Lactobacillus fermentum* MF27과 면역활성 효과를 지니는 *Lactobacillus plantarum* LC01 균주를 사용하여 MRPs 발효 가수분해물을 제조하였음. 유산균 수는 동결 건조 전과 후에 측정하였으며 결과는 Table 10과 같음

Table 10. 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균의 미생물학적 특성 평가결과

	동결건조 전	동결건조 후
MF31 발효 가수분해물	6.9x10 ⁷	3.3x10 ⁸
MF27 발효 가수분해물	1.7x10 ⁷	1.3x10 ⁸
LC01 발효 가수분해물	1.1x10 ⁸	4.2x10 ⁸

- 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균 제제의 식품 유형 및 규격 검토

- [건강기능식품의 기준 및 규격]을 참고하여 프로바이오틱 MRPs 혼합 유산균 제제의 식품

유형 및 규격을 검토하였으며, 식품의 유형은 건강기능식품 중 프로바이오틱스에 해당함. 프로바이오틱스의 기준 및 규격은 Table 11와 같음

Table 11. 프로바이오틱스의 기준 및 규격 (건강기능식품의 기준 및 규격, 2014)

프로바이오틱스	
1) 제조기준	
(1) 원재료 : 다음의 미생물 또는 이를 혼합한 균과 균 또는 배양체를 배양시키기 위한 배지 및 보호제	
	종 류
Lactobacillus	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii ssp. bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhannosus, L.salivarius</i>
Lactococcus	<i>Lc. lactis</i>
Enterococcus	<i>E.faecium, E.faecalis</i>
Streptococcus	<i>S.thermophilus</i>
Bifidobacterium	<i>B.bifidum, B.breve, B.longum, B.animalis ssp. lactis</i>
(2) 제조방법 : 상기 미생물을 배양·건조하여 제조하여야 함.	
(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 생균을 100,000,000 CFU/g 이상 함유하고 있어야 함	
2) 규격	
(1) 색상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	
(2) 프로바이오틱스 수 : 표시량 이상	
(3) 대장균군 : 음성	
3) 최종제품의 요건	
(1) 기능성 내용 : 유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음	
(2) 일일섭취량 100,000,000 ~ 10,000,000,000 CFU	
4) 시험법	
(1) 프로바이오틱스 수	
(가) 유산간균 및 구균 : 제 4. 3-58 유산간균 및 구균	
(나) 비피더스균(<i>Bifidobacterium</i>) : 제 4. 3-59 비피더스균(<i>Bifidobacterium</i>)	
(2) 대장균군 : [별표 4] 참조	

제 2 절. 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질의 발효 생성물 제조 및 심혈관 기능성 검증

[제 1협동 : 고려대학교 김세헌 교수]

1. 내산성 및 내담즙성을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발

가. 실험 방법

- 프로바이오틱스는 생균제제로 섭취되어 장내에 도달함으로써 여러 가지 건강증진 활동을 하기 때문에, 숙주의 소화기 환경에 대해 내성을 가지고 있어야 함. 따라서 소화기의 대표적인 환경인 위와 장에서 겪는 스트레스 조건인 산성조건과 담즙염 조건에서 내성을 지닌 균주를 확보하는 것이 필수적인 과정임. 다양한 근원에서 분리하여 식품미생물학 실험실에서 보관중인 유산균주들을 대상으로 프로바이오틱스 기본 특성인 내산성 및 내담즙성을 측정함

(1) 균주의 내산성 확인

- 유산균주를 Lactobacilli 증균 배지인 MRS 배지에 접종하여 37°C, 18 시간 동안 배양 후 13,000 rpm에서 원심 분리하여 균체를 침전시킴. 이것을 멸균 saline (0.85 % NaCl)으로 2 회 세척하고 균체 현탁액을 대조구인 MRS 배지와 인공위액에 각각 10⁶ CFU/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 0 시간, 3 시간 배양 후 생존 균수를 확인함. 인공위액은 1N HCl 을 사용하여 MRS 배지에 pH를 2.5로 조정하고, pepsin을 1,000 units/mL 의 농도로 처리하여 멸균하여 제조하였음. 생균수의 측정은 KH₂PO₄, L-cystein HCl, tween80 등이 함유된 phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하여 연속희석법을 통해 희석하여 MRS 평판 agar 배지에 접종, 생균수를 측정함. 대조구인 0 시간과 인공위액 조건에서 3 시간 배양 후에 생균수 차이를 계산함. 사용한 배지 조성은 아래와 같음(Table 1)

(2) 내담즙성의 확인

- 내담즙성의 측정은 내산성과 유사한 방법으로 측정하였으며, 인공위액을 대신하여 담즙염 (Oxgall)이 0.3% 함유된 MRS 배지에 접종한 후 내산성 평가방법과 동일한 방법으로 0, 24 시간 간격으로 생균수를 측정함. 이 때 위와 마찬가지로 0 시간을 대조구로 하여 24 시간 배양 후에 생균수를 확인함. 사용한 배지 조성은 아래 표와 같음(Table 1)

Table 1. 내산성 · 내담즙성 확인 배지 조성

Ingredient		조성(%)	gram / Liter
glucose		2%	20 g
beef extract		1%	10 g
peptone No.3		1%	10 g
yeast extract		0.5%	5 g
sodium acetate		0.5%	5 g
magnesium sulfate-7H ₂ O		0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)
manganeise sulfate-4H ₂ O		0.005%	1 mL (5 g/50 mL w/v)
tween 80		0.1%	10 mL (5 mL/50 mL w/v)
diammonium citrate		0.2%	2 g
dipotassium phosphate		0.2%	2 g
내산 배지	pepsin	0.234%	2.34 g
내담즙 배지	oxgall	0.3%	3 g

나. 실험 결과

(1) 내산성 및 내담즙성

- 실험실에서 보유하고 있는 균주들 중 468 균주들을 대상으로 내산성과 내담즙성을 측정하였으며 결과는 아래와 같음(Fig. 1와 Fig. 2)

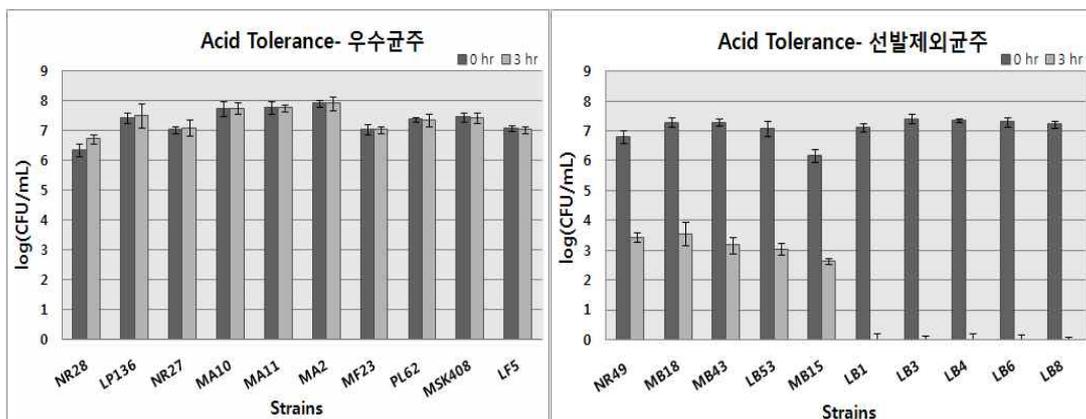


Fig. 1. 내산성 선발 결과

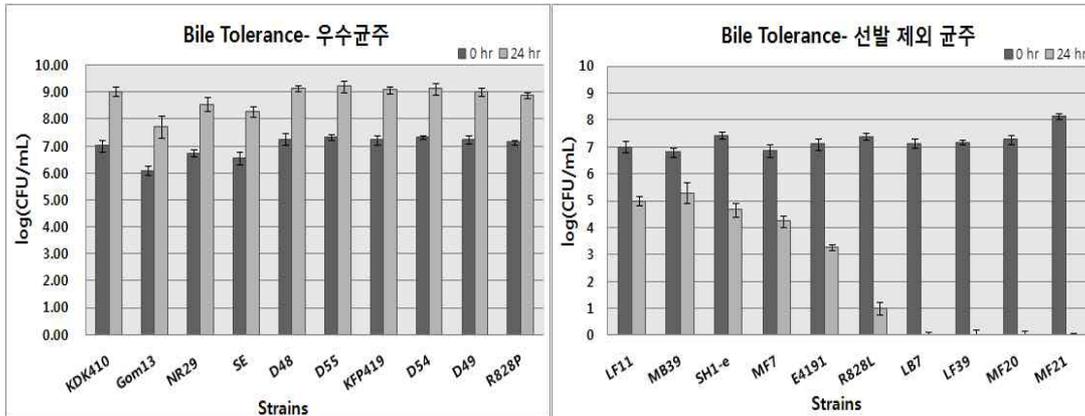


Fig. 2. 내담즙성 선발 결과

- 내산성이 우수한 것으로 나타난 균주들의 경우, 내산성 배지에서 3 시간 동안 배양 한 이후의 생균수가 감소하지 않거나 소폭으로 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 산성 조건에 생장이 저해 받지 않는 것을 알 수 있었음. 반면 내산성이 약한 것으로 나타난 균주들의 경우, 3 시간 배양 이후의 생균수가 로그 2 이상 크게 감소한 것을 볼 수 있었으며, 산성의 조건에서 생장이 저해되는 것을 확인함(Fig. 1). 내담즙성이 우수한 균주의 경우 24 시간 배양 후 생균수가 증가한 것을 확인할 수 있었고, 균의 성장에 담즙염이 영향을 주지 않는 것으로 볼 수 있었으나, 선발 제외 균주에서는 로그 2 이상 감소하는 것을 볼 수 있었음(Fig. 2)
- 최종 내산성과 내담즙성이 우수한 256 균주를 선발함

2. 항산화능을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발

가. 실험 방법

- 0.3mM DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)를 methanol에 오랜 시간 가시광선을 제거한 상태에서 용해시킨 후, 517nm의 흡광도에서 0.9~1.0의 흡광도를 갖도록 D.W로 희석하여 DPPH reagent를 제조함
- 내산성과 내담즙성이 있는 것으로 선별된 256 균주의 배양 상등액을 이용하여 DPPH와 반응하여 항산화 활성을 측정하였음. 증균배지인 MRS 배지에서 37°C에서 18 시간 동안 배양 한 후, 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 균체와 배양 상등액을 분리함. 배양 상등액 50 μ L과 DPPH solution 150 μ L를 반응시킨 후 암소에서 30 분간 정치 한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정함. 대조구로 배양상등액과 동량의 D.W.를 DPPH reagent와 반응시켜 이를 대조구로 삼음. 대조구의 흡광도 값과 배양 상등액에서 나타난 흡광도 값을 이용하여 scavenging activity(%)를 계산함
- 이 때 blank로 배양 상등액 자체의 흡광도를 제거하여 배지의 영향을 제거하였으며, 아래 계산식에 의해 scavenging activity (%)를 계산함

$$\text{Scavenging Activity}(\%) = \left(1 - \frac{OD_{517nm, sample}}{OD_{517nm, control}}\right) \times 100$$

나. 실험 결과

- Positive control로 0.2 mM의 ascorbic acid solution 과 DPPH를 반응시켜 scavenging activity를 계산하였으며, 내산성 및 내담즙성에서 선발된 256 균주의 항산화 활성을 측정한 결과는 아래와 같음(Fig. 3)

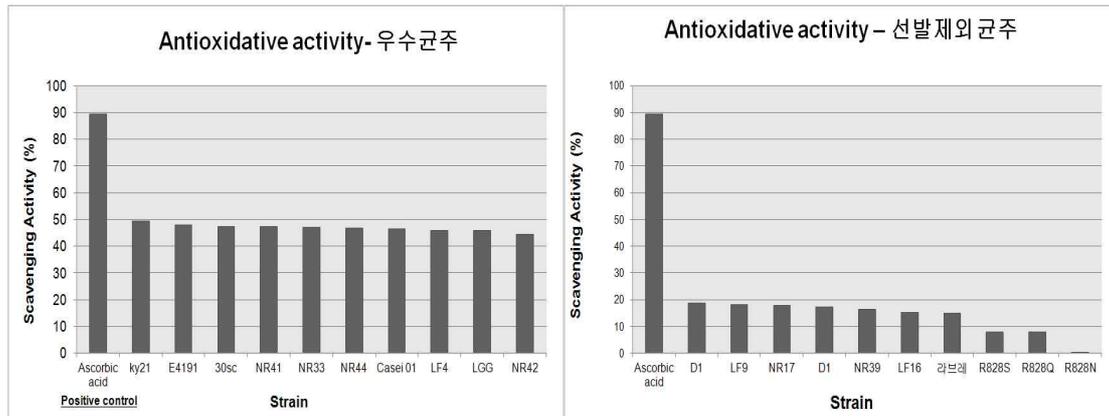


Fig. 3. 균주의 항산화 활성 확인 결과

- 총 256 균주에서 20 %이하의 균주는 항산화 활성이 매우 미약한 것으로 판단하고, 20 % 이하의 균주를 제외한 243 균주를 선발함

3. 프로바이오틱스 균주의 유단백질 분해 활성 확인

가. 실험 방법

- 유산균의 유단백질 분해 활성을 확인하는 실험에는 다양한 실험방법들이 있으며, 전통적으로는 tyrosine method가 사용되고 있음. tyrosin method의 경우 단백질 분해반응에 의해 유리되는 tyrosine 과 tryptophan을 phenol reagent와 반응 시켜 발색반응을 진행시킨 후 650 nm에서 흡광도를 측정함(Hull, 1947). 그러나 tyrosine method의 경우, 발색시약과의 반응시간이 매우 길고(48 시간), 그 민감도가 떨어진다는 단점이 있음
- 따라서 해당 연구에서는 Ortho-Phthaldehyde (OPA)를 이용하여 균주의 proteolytic activity를 측정하였음. OPA 는 thiol group의 존재하에 단백질의 분해 작용에 의해 유리되는 free amino-acid와 반응하여 화합물을 형성하게 되며, 이 화합물이 340 nm에서 최대 흡광도를 갖게 되어 proteolytic activity를 나타내는 척도로 사용할 수 있는 방법임
- 균주에서의 OPA 반응의 측정은 유단백질 배지의 배양 상등액을 이용하여 측정하였음. 유단백질이 포함된 배지에 MRS 상에서 3차 계대 배양하여 활력을 최적화 시킨 균주를 PBS 에 2~3회 washing 한 후 1%를 접종함. 48 시간 배양 후 배지성분을 추출하여 여기에 110 mM TCA solution을 1:3 비율로 첨가하여 가용성 펩타이드 및 아미노산을 용출시킴. 이것을 2,000 x g에서 30분간 원심분리하여 분해되지 않은 고분자들을 제거하고, 상등액 10 μL를 OPA reagent 190 μL 와 반응 시켜 2분간 정치한 후 340 nm에서 흡광도를 측

정하였음

- OPA Reagent는 disodiumtetraborate decahydrate 7.620 g 과 200 mg 의 sodium-dodecyl-sulfate(SDS)를 150 mL의 증류수에 희석한 solution A에 ethanol 에 160 mg의 OPA를 녹인 용액과 176 mg 의 dithiothreitol (DTT)를 증류수에 녹인 solution을 혼합하여 최종 200 mL의 OPA reagent를 제조하였음. OPA 자체가 빛에 민감하여 쉽게 분해되기 때문에, 사용하기 바로 직전에 제조하여 사용하였음
- 또한 해당 실험에서는 skim milk media를 이용하여 OPA 반응을 측정하여 각기 다른 성질의 유단백질인 casein과 WPC에 대한 분해능이 확실히 구분되지 않는 단점을 보완하고자, 각각 casein 과 WPC가 함유된 적절한 배지조성을 탐색하는 선행 작업을 진행 한 후, 균주 선발을 진행하였음

나. 실험 결과

(1) OPA-반응에 적합한 배지조성의 탐색

- OPA 반응에 적합한 배지를 탐색하기 위해서 Lactobacilli의 증균용 배지로 사용되는 MRS 배지의 조성을 기반으로 하여 배지 함량을 조절하여 최적 배지조건을 탐색함. MRS 상에 첨가되는 질소원으로는 beef extract, yeast extract, proteos peptone No.3 가 있으나 각 성분은 갈색의 높은 background color를 지니며, 또한 가수분해 된 형태의 단백질이기 때문에 OPA 반응에 적용하기 어려운 단점이 있음. 따라서 이를 보완하고, 또 실험에서 보고자 하는 유단백질의 분해활성을 보기 위해서 질소원 성분을 유단백질(casein, WPC)로 치환하는 방법으로 접근함

(가) 1단계

- MRS 배지에서 질소원으로 사용된 beef extract, yeast extract, peptone No.3 (전체 2.5%)를 전부 유단백질 (casein 및 WPC, 1%)로 치환하여 균의 성장 여부를 확인하였으며, 일반적으로 치즈를 비롯한 유제품에서 단백질 분해활성이 있다고 알려진 균주인 *Lactobacillus helveticus* SJ20을 이용하여 성장과 OPA 반응을 확인함(Fig. 4)

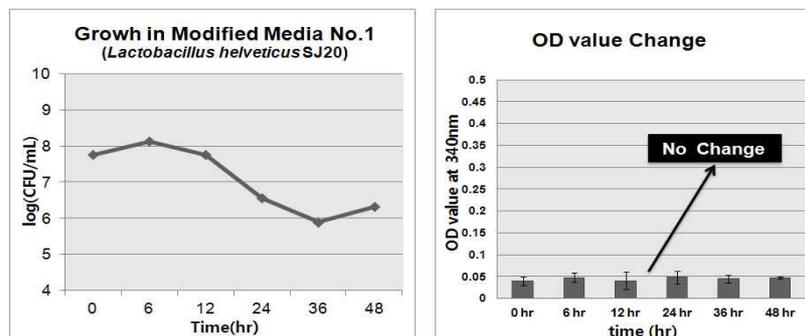


Fig. 4. 1단계 배지에서 성장 및 OPA반응 특성

- 1차 과정에서는 균의 생장이 증가하지 않았으며, 이로 인해 단백질 분해 활성도 나타나지 않아, OPA반응이 증가하지 않은 것을 확인함

(나) 2단계

- MRS 배지 조성을 기본으로 유단백질로 치환된 1단계 배지에 초기 생장에서 효소 합성 등에 사용하기 위한 소량의 yeast extract와 peptone No.3 단백질을 소량 첨가하여, 균의 성장을 관찰함
- Yeast extract와 peptone을 각각 0.3% 첨가하였을 때 균의 생장이 109 CFU/mL수준으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, OPA와의 반응에서 단백질 분해 작용으로 인해 340 nm에서 흡광도가 증가하는 반응이 나타나지 않았음
- 또한 균의 생장이 일어나지 않은 0 시간에서 흡광도가 지나치게 높게 나타나는 것으로 관찰됨. 첨가된 질소원인 yeast extract와 peptone에 의한 영향과 배지 내 다른 성분들에 의한 간섭으로 인해 다음과 같은 결과가 나타난 것으로 보이며, 이를 보완하기 위한 다음단계의 실험을 진행함(Fig. 5)

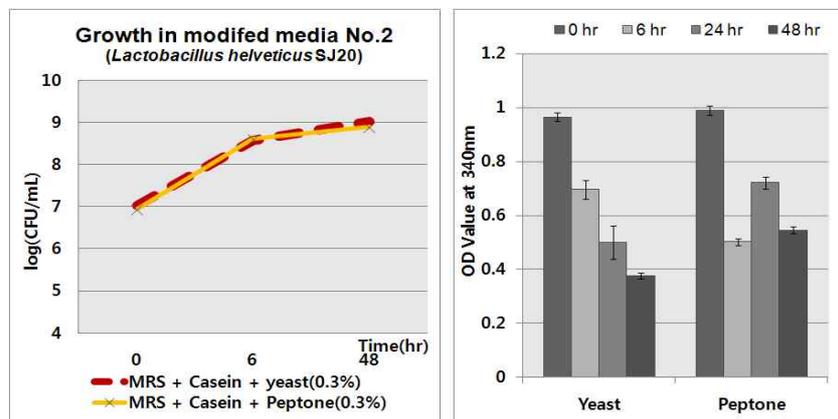


Fig. 5. 2단계 배지에서 성장 및 OPA 반응 특성

(다) 3단계

- 저 배지에 첨가되는 Yeast extract와 Peptone을 각각 다양한 농도의 수용액으로 제조하여 OPA reagent와 반응시켜 흡광도 값의 추이를 확인하였으며 그 결과는 아래와 같음(Fig. 6)

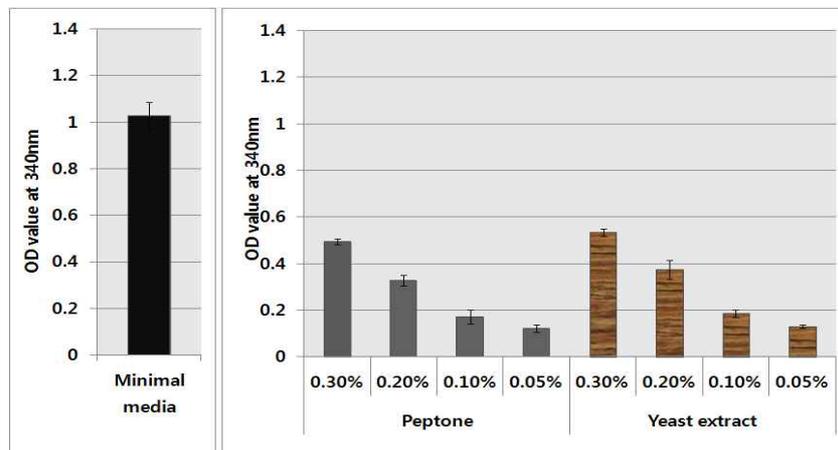


Fig. 6. Peptone과 yeast extract 농도별 OPA 반응 양상

- 해당 질소원의 농도를 낮출수록 OPA 반응에 미치는 영향이 적어지는 것을 확인 할 수 있었음. 그러나 0.3%를 처리한 기존의 2단계 배지는 여전히 1보다 높은 흡광도를 보이는 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 배지 내 다른 성분들이 OPA 반응에 영향을 미치는지 여부를 확인하는 실험을 진행하였음. 배지에 첨가되는 모든 성분들을 같은 %농도로 각각의 수용액을 제조하여 OPA 와 반응 시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였음(Fig. 7)

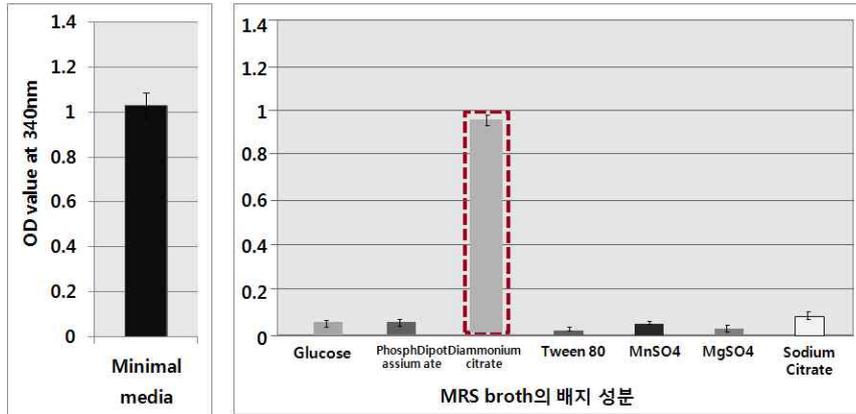


Fig. 7. 배지 각 성분들과 OPA반응 양상

- 배지에 첨가되는 염성분인 diammonum citrate 성분이 OPA와 반응하여 흡광도를 증가시키는 것을 확인하였으며, 배지에서 해당 성분을 제거하여 배지를 제조하였음. 이와 더불어 yeast extract와 peptone의 양을 0.3%보다 낮추면서 균의 성장이 저해되지 않는 최저 농도를 탐색하였음
- Diammonum citrate 성분을 제거하고 yeast extract와 peptone의 농도를 0.01% 까지 낮추었을 때 성장특성을 확인한 결과는 아래와 같음(Fig. 8).

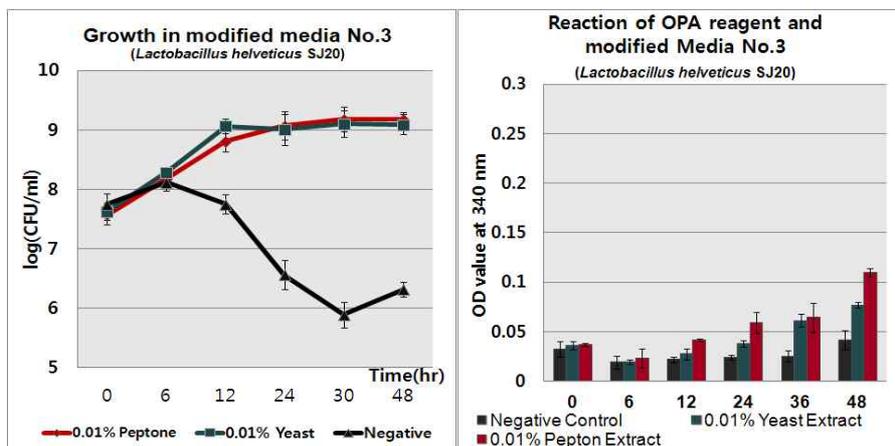


Fig. 8.. 3단계 배지에서의 성장 특성 및 OPA 반응 특성

- 위의 성장곡선에서 MRS 배지의 성장과 유사한 수준으로 성장 (10^9 CFU/mL)되는 것으로 확인되었으며, 해당 배지에서 단백질 분해 반응을 OPA반응으로 확인한 결과는 시간별로 그 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 8). 앞의 결과들과 다르게 배양 시간이 증가

할수록 0 시간에 비해 340 nm에서의 흡광도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 해당 조성의 배지를 사용하여 단백질분해 활성을 확인하는 실험에 적용할 가능성을 확인함

(라) 4단계

- 유단백 (casein, WPC)를 각각 1%를 처리한 경우 48 시간 이후의 배양에서 흡광도의 증가가 관찰되었으나, 증가값이 미미하다는 단점이 있었음. 이를 보완하기 위해 유단백질의 함량을 1%에서 3%까지 증가시켜 OPA와의 반응에서 유의한 흡광도의 증가가 관찰되는지를 확인하였음
- Fig. 7의 그래프와 같이 유단백질의 농도가 증가하는 것과 더불어 0 시간에서의 흡광도가 증가하였으나, 48 시간 이후의 O.D.값의 증가폭이 커지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 SJ20 뿐만 아니라 상업균주인 *Lactobacillus casei* 393, *Lactobacillus rhamnosus* GG에서도 흡광도 값이 증가하는 폭이 증가하는 것을 확인함. 따라서 최종적으로 아래 표와 같은 조성의 배지를 제조하여 유산균의 단백질 분해활성을 OPA 방법을 이용하여 확인하였음 (Fig. 9)

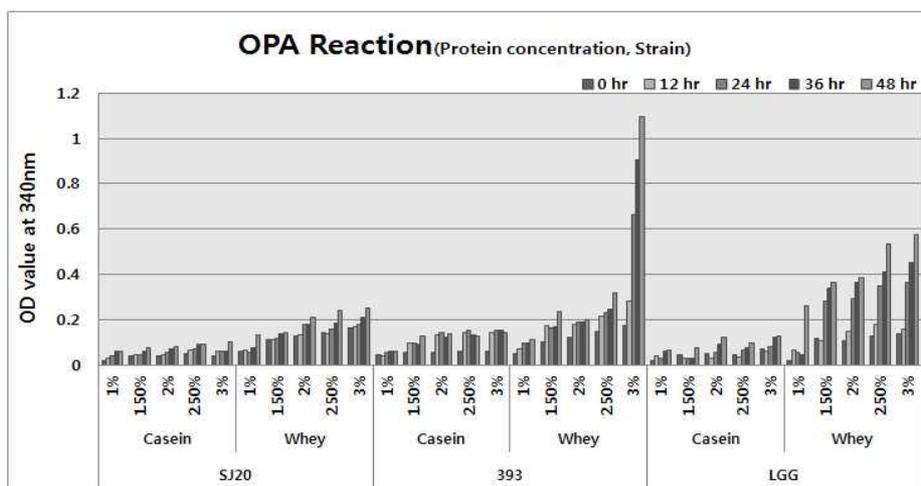


Fig. 38. 4단계 배지에서의 OPA 반응 특성

Table 2. 유단백 가수분해활성 실험에 적용한 최종 배지 조성

Ingredient	%	gram / liter
glucose	2%	20 g
casein / WPC	3%	30 g
peptone No.3	0.01%	0.1 g
sodium acetate	0.5%	5 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL sol)
MnSO ₄ -4H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mLw/v)
tween 80	0.1%	10 mL (5 g/50 mL w/v)
K ₂ HPO ₄	0.2%	2 g

(2) 프로바이오틱스 균주의 유단백질 분해 활성 확인

- MRS 배지에서 3 차에 걸쳐 계대배양을 진행하여 생리활성을 최대화 한 균주들을 사용하여 단백질 분해활성을 확인함. 해당 균주들을 0.1 M phosphate buffer saline (pH 6.8)을 사용하여 2~3회 washing하여 13,000 rpm에서 원심 분리하여 cell pellet을 모은 후, 이를 다시 0.1 M phosphate buffer saline (pH 6.8)에 현탁한 후, casein과 WPC가 각각 함유된 배지에 1%의 균 현탁액을 접종함. 이후 48 시간동안 배양 후, 배양을 시작한 0 시간과 48 시간 이후의 OPA반응의 흡광도를 측정하여, 값의 차이를 확인함

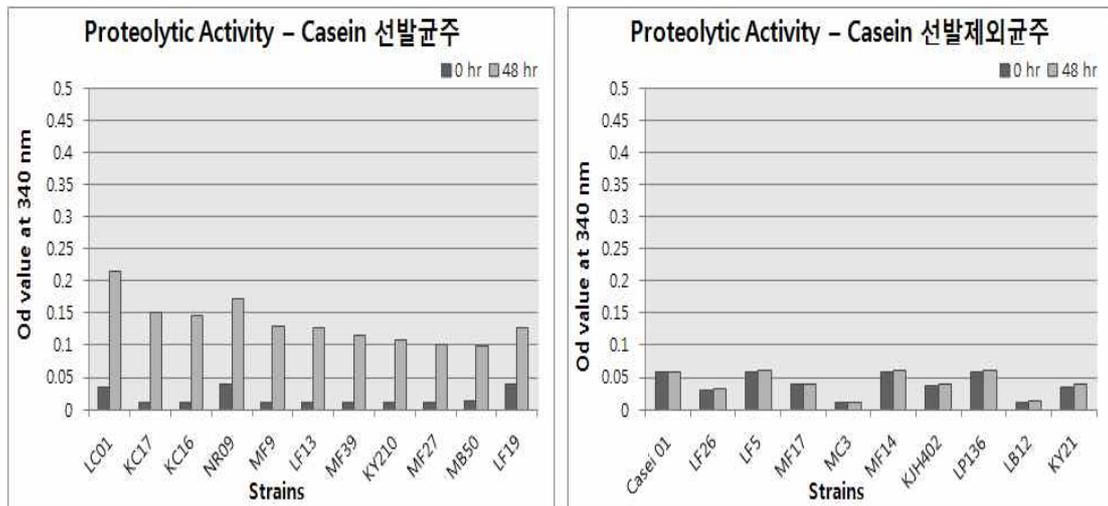


Fig.10. 선발 및 비선발균주의 Casein 가수분해 활성

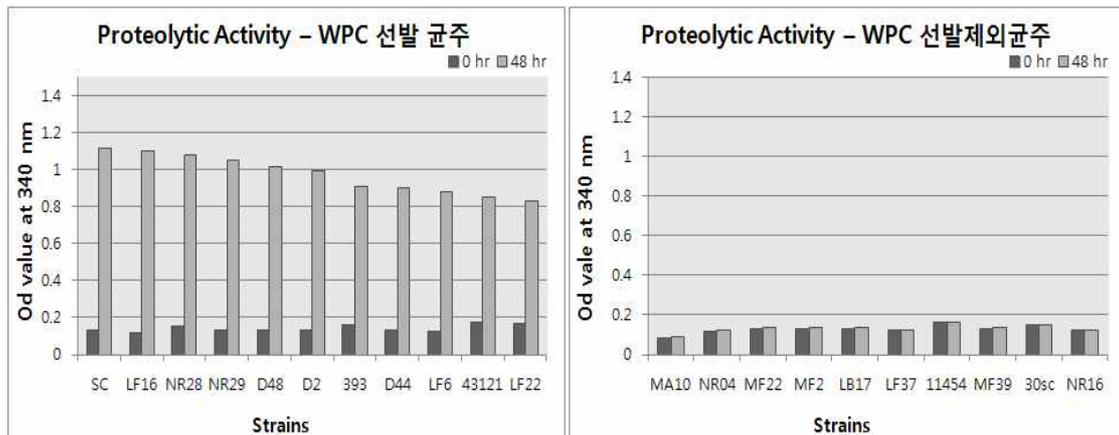


Fig. 11. 선발 및 비 선발 균주의 WPC 가수분해 활성

- 흡광도의 변화의 경우 casein의 경우 0.17(O.D. value) 정도가 가장 높은 증가 폭으로 나타났으며(Fig.. 10), WPC의 경우 약 1 (O.D. value) 정도의 증가폭이 가장 높은 폭으로 나타났음(Fig. 11). 이는 Casein의 경우 분자 구조가 유청 단백질들에 비해 고분자이기 때문에 가수분해가 일어나기 어려운 조건임에 기인하는 것으로 볼 수 있음
- 흡광도의 증가 수치를 casein과 WPC를 각각 단백질 분해효소인 proteinase K를 0

activity unit/mL~1 activity unit/mL 까지 반응 시켜 직선의 검량 곡선을 작성한 후 (Fig. 12), 해당 검량곡선을 토대로 흡광도의 증가값을 proteinase K 의 activity unit/mL로 변환함

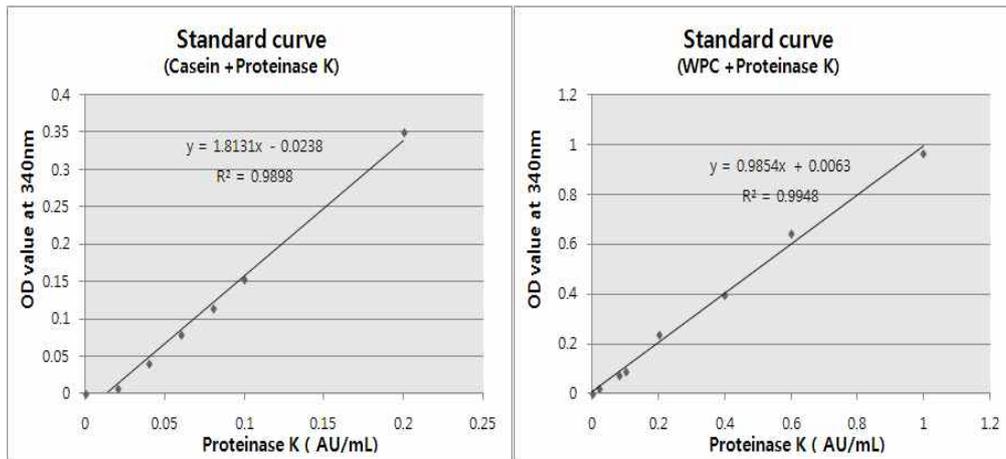


Fig. 12. Proteinase K와 유단백(Casein, WPC)의 반응 검량곡선

균의 proteolytic activity를 흡광도 값의 증가와 proteinase K의 activity unit으로 변환한 결과를 정리하여 상위 10 개의 균주의 값을 수치로 나타낸 결과는 아래 표와 같음(Table 3)

Table 3. 유단백 가수분해 활성 측정 결과

CASEIN 배지(3%)					WPC 배지(3%)				
Strain	O.D. at 340nm		O.D. 변화값	Au변환 (AU/ml)	STRIN	O.D. at 340nm		O.D. 변화값	Au변환 (AU/ml)
	0 HR	48 HR				0 HR	48 HR		
LC01	0.036	0.215	0.179	0.112	SC	0.133	1.116	0.983	0.992
KC17	0.011	0.151	0.141	0.091	LF16	0.118	1.099	0.980	0.989
KC16	0.011	0.147	0.136	0.088	NR28	0.156	1.077	0.922	0.929
NR09	0.039	0.173	0.134	0.087	NR29	0.133	1.050	0.917	0.924
MF9	0.011	0.129	0.119	0.078	D48	0.133	1.012	0.879	0.885
LF13	0.011	0.127	0.117	0.078	D2	0.133	0.994	0.861	0.867
MF39	0.011	0.114	0.104	0.070	D44	0.133	0.902	0.769	0.774
KY210	0.011	0.109	0.099	0.067	LF6	0.126	0.877	0.751	0.756
MF27	0.011	0.102	0.091	0.064	43121	0.175	0.852	0.677	0.681
MB50	0.011	0.100	0.089	0.062	LF22	0.170	0.831	0.661	0.665

4. 마이알반응 생성물 이용능을 갖는 프로바이오틱스 균주의 선발

가. 실험 방법

- 유단백질 가수분해 활성이 높은 균주 14 개 균주 (casein 7 균주, WPC 7 균주)를 선발하여 마이알반응 생성물에 대한 이용능이 있는지를 확인함. 유단백질 가수분해 활성 실험에서 사용한 배지성분을 기본으로 하여, 유단백질을 casein 유래 마이알반응 생성물과 WPC 유

래 마이알반응 생성물로 각각 치환하였으며, 또한 균의 성장을 원활하게 해주기 위해서 yeast extract와 peptone 단백질의 함량을 0.3%로 증가시킨 배지를 사용하였음. 자세한 배지의 조성은 아래와 같음 (Table 4)

Table 4. 마이알반응 생성물 이용능 확인에 사용한 배지 조성

strain		control	c마이알반응 생성물	w마이알반 응 생성물
WPC 선발	D49	+	-	-
	KC20	+	-	-
	D2	++	-	-
	D48	++	-	-
	NR28	+	-	-
	NR29	+	+	++
	SC	+	+	++
casein 선발	LF19	++	+	++
	MF27	++	++	+
	KY210	+	++	+
	MF39	+	-	-
	LF13	+	-	-
	MF9	+	+	+
	LC01	+	++	++

(-): OD600 < 0.5, (+): 0.5 < OD600 < 0.9, (++) : OD600 > 0.9

나. 실험 결과

- 흡광도를 이용한 1 단계 실험에서는 총 14 균주 중 6 균주에서 마이알반응 생성물에 대한 이용능이 있는 것으로 확인되었음. WPC 가수분해능이 우수한 균주에서 2 균주(NR29, SC), casein 분해능이 우수한 것으로 선발된 4 균주(LF19, MF27, KY210, LC01)가 마이알반응 생성물에 대한 이용능이 있는 것을 확인되었으며, 이를 더 명확하게 확인하고자, 연속 희석 후 평판 배지에 접종하여 생균수를 확인하고 및 pH측정을 실시하였음. 또한 2 단계 선별과정에서 마이알반응 생성물을 첨가한 배지에 대해 MRS에서 18 시간동안 배양한 결과와 비교하여 48 시간 배양 후 pH와 생균수가 이 수준과 비슷한 수준으로 확인되는지 여부도 확인하였음(Table 5)

Table 5. 마이알반응 생성물 이용 균주 선별 2차 결과

	MRS 18h		c마이알반응 생성물		w마이알반응 생성물		Control	
	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH
LC01	9.60	3.88	8.99	4.47	9.31	4.97	8.09	3.81
KY210	9.37	4.34	8.87	4.57	8.91	6.18	7.44	4.46
MF39	8.43	3.84	7.64	5.24	7.87	5.16	8.23	3.91
LF19	9.02	3.84	7.69	4.57	7.89	5.15	7.89	3.91
NR29	9.71	4.3	8.13	5.52	9.05	6.21	7.95	4.44
SC	9.05	4.36	7.02	5.83	8.10	6.24	7.35	4.43

- Casein 유래 마이알반응 생성물에서는 LC01와 KY210에서 균의 성장이 비교적 MRS에서 18 시간 동안 배양한 결과와 유사한 생균수를 보이는 것으로 나타났으며, pH 변화도 이에 유의하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 마이알반응 생성물이 들어가지 않은 control 배지에서의 성장보다 마이알반응 생성물이 첨가된 배지에서 성장이 우수하게 나타났으므로, 이를 토대로 해당 균주에서 마이알반응 생성물에 대한 이용능이 존재하며, 이로 인해 성장이 증가된 것으로 볼 수 있음. WPC 유래 마이알반응 생성물에서는 LC01, NR29에서 위와 동일한 결과가 나타나는 것을 알 수 있었음
- 최종적으로 2 단계 선별작업에서 casein 유래 마이알반응 생성물에서는 LC01와 KY210이, WPC 유래 마이알반응 생성물에서는 LC01과 NR29가 각각 이용능 우수한 균주로 확인되었으며, 총 3 균주를 마이알반응 생성물에 이용능이 있는 균주로 선별하였음. 그러나 WPC 유래 마이알반응 생성물이 포함된 배지에서 pH가 많이 떨어지지 않은 것을 확인하였는데, 이는 whey protein 자체가 염기성 단백질로 같은 젖산이 생성되더라도 whey protein의 효과에 의해서 pH가 많이 떨어지지 않은 것으로 보임

5. 마이알반응 생성물을 이용한 발효 최적 조건의 탐색

가. 실험 방법

- 마이알반응 생성물의 가수 분해물 제조를 위한 최적조건의 탐색을 위해, small-scale의 다양한 배합비 구성을 통해 발효조건을 확립함. 최적발효조건은 다양한 배합비의 구성에서 배양 후 pH가 적정수준인 pH 4 수준으로 떨어진 것과 희석 평판법에 의한 생균수 측정을 통해 균의 성장이 가장 좋은 조건을 최적 발효조건으로 결정함
- 균주의 탄소원, 질소원으로써 마이알반응 생성물의 사용을 강화시키기 위해 MRS 조성을 기반으로 탄소원과 질소원의 농도를 조정하여 modified MRS 배지를 사용하여 발효 최적조건을 탐색하였음. 탄소원인 glucose의 농도를 기존 2%와 그보다 낮은 수준으로 조정하였음
- 질소원으로 사용되는 beef extract의 경우 분석이 완벽하게 되지 않는 다양한 단백질 및 그 분해 물질이 포함되어 있어 차후 분석과정에서 문제가 될 여지가 있으므로 이를 제거하고, 다른 질소원의 경우 성장 초기에 성장에 필요한 기본적 효소들의 생성에 필요한 최소의 질소원이 필요하기 때문에 yeast extract와 proteose peptone NO.3의 양을 성장이 확인된 농도인 0.3% 보다 낮추는 방향으로 배양을 진행했으며, 또한 질소원으로 사용되는 염인 ammonium citrate를 제거함
- 또한 마이알반응 생성물의 농도는 전 단계의 실험에서 균의 성장이 확인된 기존 3%의 농도보다 더 높은 농도를 처리하여 마이알반응 생성물에 대한 이용능이 증가할 수 있는지를 확인하였음. modified MRS 의 조성은 아래와 같음(Table 6)

Table 6. 최적발효 조건의 탐색을 위한 배지 조건

Ingredient	%	gram/liter
glucose	2% / 1%	20 g / 10 g
L+C or L+WPC	3% / 5% / 7%	30 g / 50 g / 70 g
peptone No.3	0.3% / 0.1% / 0.05%	0.3 g / 0.1 g / 0.05 g
yeast extract	0.3% / 0.1% / 0.05%	0.3% / 0.1% / 0.05%
sodium acetate	0.5%	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL sol)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)
Tween 80	0.1%	10 mL (5 g/50 mL w/v)
K ₂ HPO ₄	0.2%	2 g

나. 실험 결과

- 위의 조성을 달리한 배지에(Table 6), MRS 배지에서 3차 계대하여 생장을 최적화 시킨 균주를 PBS에 washing한 후 배지에 1% 접종한 후, 각각 0 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간에서 생균수와 pH를 측정하였음. 생균수의 경우 0.1% peptone수에 연속 희석하여 평판 배지(MRS agar)에 접종하여 확인하였음. 총 4 가지 경우에서 생장 곡선 및 pH를 확인하면 아래와 같음(Fig. 13, Fig. 14, Fig. 15)

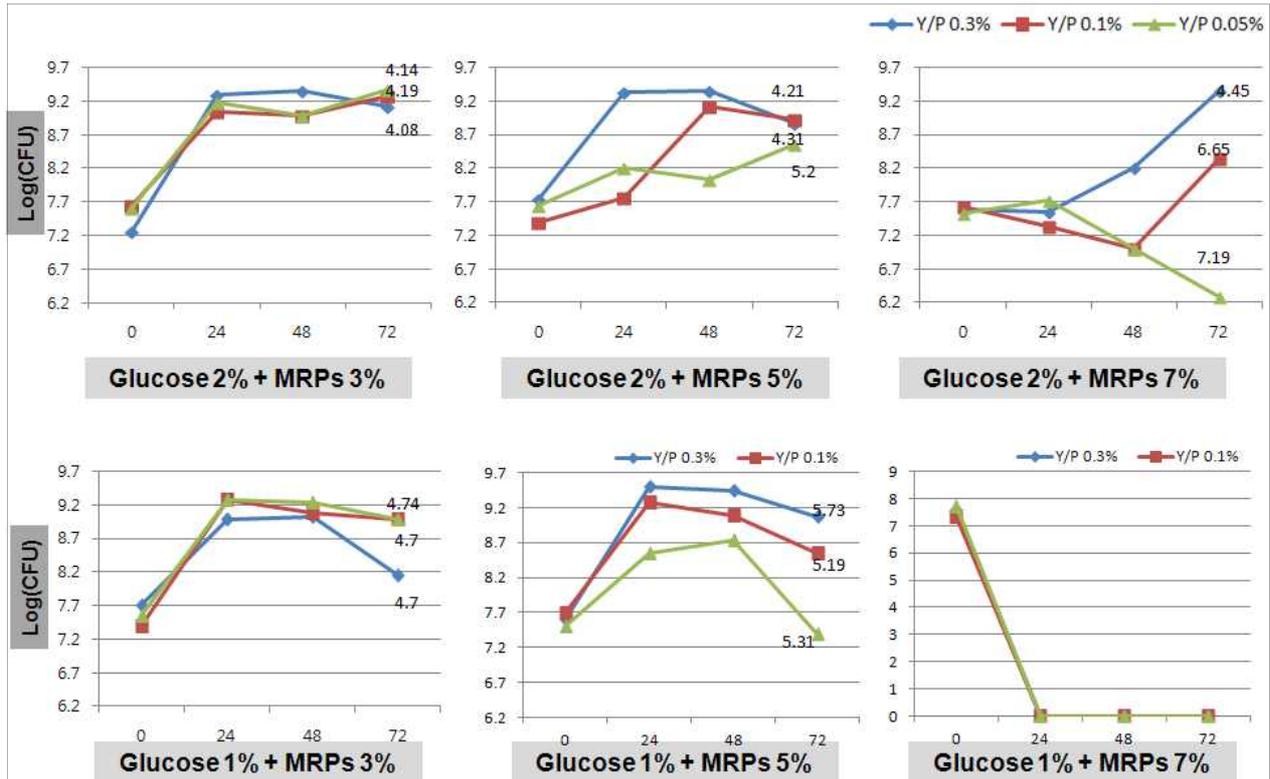


Fig. 13. Casein 유래 마이알반응생성물에서 L.C01과 KY210의 최적발효 조건 탐색 결과 (그래프 상의 숫자는 발효 후 pH)

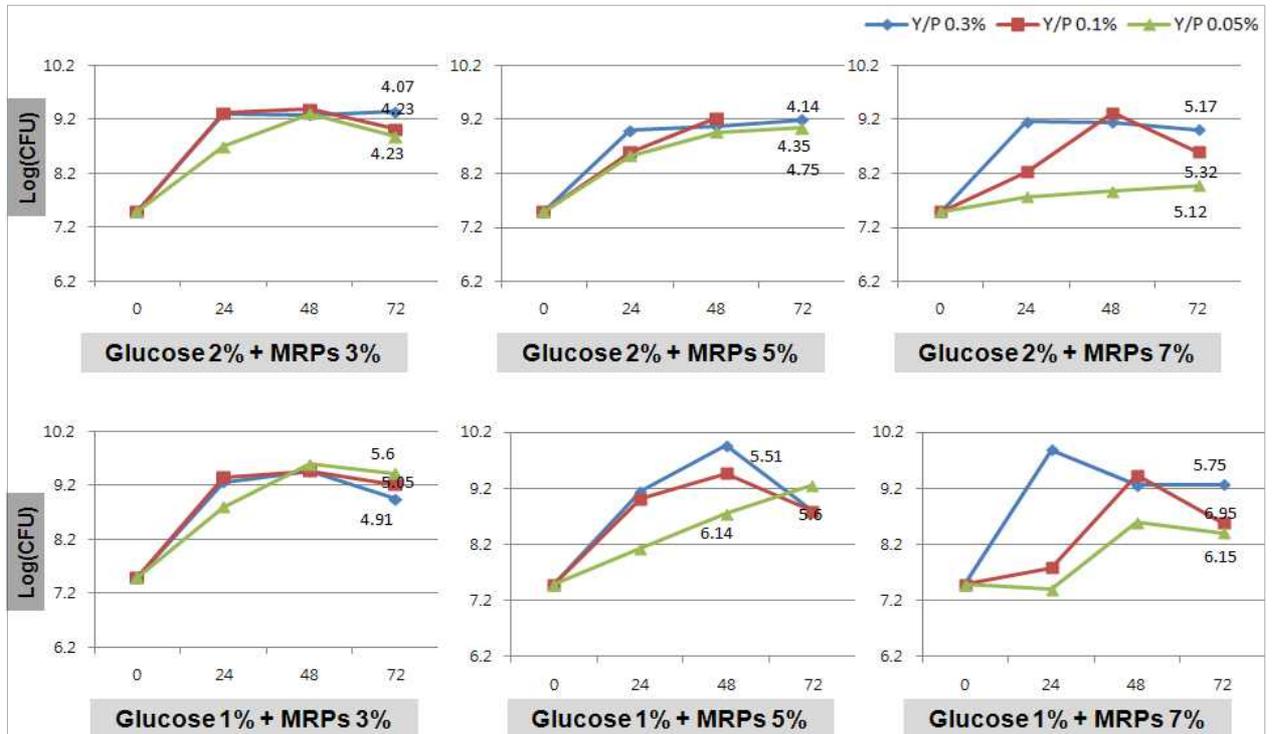


Fig. 14. WPC 유래 마이알반응생성물에서 LC01 최적발효 조건 탐색 결과
(그래프 상의 숫자는 발효 후 pH)

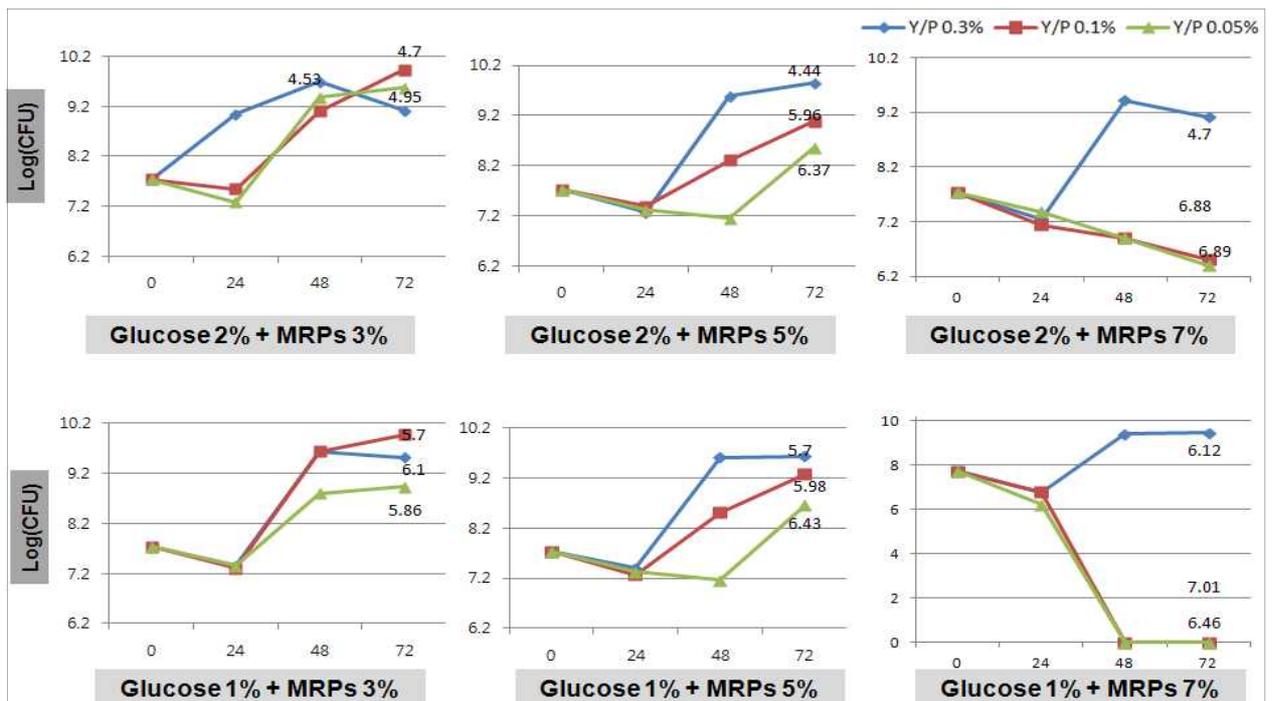


Fig. 15. WPC 유래 마이알반응 생성물에서 NR29의 최적발효 조건 탐색 결과
(그래프 상의 숫자는 발효 후 pH)

- 종합적으로 마이알반응 생성물의 농도가 증가할수록 균주의 성장이 inhibition되는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, Yeast extract와 Peptone NO.3의 양이 적어질수록 성장

이 저해되고 발효 이후 pH가 증가하는 것을 관찰할 수 있었음

- 또한 Glucose의 경우 2%보다 낮아질 경우 성장은 비슷한 양상으로 증가하는 것으로 보이나, pH의 경우 2%를 첨가한 경우보다 더 낮게 떨어지는 것을 관찰할 수 있었음. 이를 토대로 Casein 및 WPC 유래 마이알반응 생성물을 이용한 최적발효의 조건은 아래 표와 같음(Table 7)

Table 7. 마이알반응 발효가수분해물 제조를 위한 최적발효 조건

Strain	최적발효조건	
	개별조건	공통조건
LC01	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucose : 2% ▪ Casein MRPs : 3% ▪ Yeast extract & Pepton No.3 : 0.1% 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sodium acetate : 0.5 % ▪ MgSO₄-7H₂O : 0.01 % ▪ MnSO₄-4H₂O : 0.01% ▪ Tween 80 : 0.1 % ▪ K₂HPO₄ : 0.2 % ▪ 발효시간: 48 시간
KY210	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucose : 2% ▪ Casein MRPs : 3% ▪ Yeast extract & Pepton No.3 : 0.1% 	
LC01	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucose : 2% ▪ WPC MRPs : 5% ▪ Yeast extract & Pepton No.3 : 0.1% 	
NR29	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucose : 2% ▪ WPC MRPs : 3% ▪ Yeast extract & Pepton No.3 : 0.1% 	

6. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 항산화 활성 확인

가. 실험 방법

- 마이알반응 생성물의 프로바이오틱스 가수분해물의 제조를 위해 위에서 기술한 최적 발효 조건에서 마이알반응 생성물을 발효시킨 뒤, 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 배양 상등액을 동결건조하여 분말화 하였음
- 분말화된 마이알반응 생성물 가수분해물은 Bradford method를 이용하여 BSA 단백질 정량 방법을 통해 단백질 양을 동일하게 처리한 수용액을 제조하여 항산화 활성의 확인실험에 사용하였음
- 나머지 배지성분의 효과를 배제하기 위해서 대조구로 마이알반응 생성물이 포함되지 않고 나머지 배지성분은 동일한 성분을 같은 조건과 시간에서 발효시킨 후, 동결건조를 진행하였

음. 마이알반응 생성물의 가수분해물과 동량의 yeast extract 와 peptone 단백질이 들어간 solution을 제조하여 항산화 활성을 비교하여 마이알반응 가수분해물의 항산화 효과를 확인함

- 양성대조구(positive control)로 항산화 활성이 높은 것으로 알려진 0.2 mM의 ascorbic acid 수용액을 사용하여 이를 비교할 수 있도록 하였음
- 또한 유단백질 가수분해물을 동일한 조건에서 발효하여 얻어진 유단백질 가수분해물의 항산화 활성도 같은 방법으로 확인하여 유단백질 가수분해물과 마이알반응 생성물의 가수분해물의 항산화 활성에도 차이가 나타나는 지를 확인함
- 항산화 효과는 다양한 방법들이 있는데, DPPH method, ABTS method, FRAP method를 사용하여 여러 항산화 실험에서 비슷한 경향성이 나타나는지를 파악하였음.

(1) DPPH method

- 0.3 mM DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)를 methanol에 오랜 시간 가시광선을 제거한 상태에서 용해시킨 후, 517 nm의 흡광도에서 0.9~1.0의 흡광도를 갖도록 D.W를 이용하여 희석하여 DPPH reagent를 제조함
- 여기에 1 mg/mL로 단백질 양이 조절 된 마이알 반응 가수분해물 및 유단백 가수분해물 sample 용액 50 μ L 와 DPPH reagent 150 μ L를 혼합한 후, 암조건의 37°C에서 30 분간 반응 시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였음. 대조구(control group)로 sample과 동량의 D.W.를 DPPH reagent와 반응 시킨 후 scavenging activity(%)를 계산하는 공식에 적용하여 최종적으로 scavenging activity를 계산함. scavenging activity는 다음의 공식에 의하여 계산하였음

$$Scavenging\ activity(\%) = \left(\frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \times 100$$

(2) FRAP method

- FRAP reagent는 다음과 같은 방법으로 준비함. 0.31 g의 sodium acetate trihydrate에 1.6 mL의 glacial acetic acid를 첨가한 후 D.W.를 첨가하여 100 mL로 부피를 조절하여 solution A를 제조함. 또한 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl- s-triazine)를 10 mL 40 mM의 HCl과 혼합하여 solution B를 제조함. 또한 FeCl₃·6H₂O (Iron(III) Chloride hexahydrate) 20 mM을 10 mL D.W.에 녹인 solution C를 제조함. 최종적으로 solution A, B, C를 혼합하여 FRAP reagent를 제조하였음
- 5 mg/mL로 단백질양을 조절한 마이알반응 가수분해물 수용액 6 μ L와 FRAP reagent 180 μ L를 혼합한 뒤, 37°C에서 30분간 반응을 진행한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였음. 대조구로 sample과 동량의 D.W.를 FRAP reagent와 반응시켜 blank값으로 삼음
- FeSO₄ 7H₂O (iron(II)sulfate heptahydrate)를 0~1.0 mM의 농도로 조정하여 이를 593 nm 파장대에서 흡광도를 측정하여 해당 흡광도를 이용하여 직선의 검량곡선을 작성하고, sample의 항산화력을 FeSO₄7H₂O의 농도에 대비하여 나타내었음. 즉 항산화력이 있는 sample에서는 Fe³⁺ 이온이 Fe²⁺ 이온으로 환원시키는 환원력이 크기 때문에 항산화력이

높은 sample에서 상대적으로 높은 Fe²⁺ 농도가 나타나게 됨(Fig. 16)

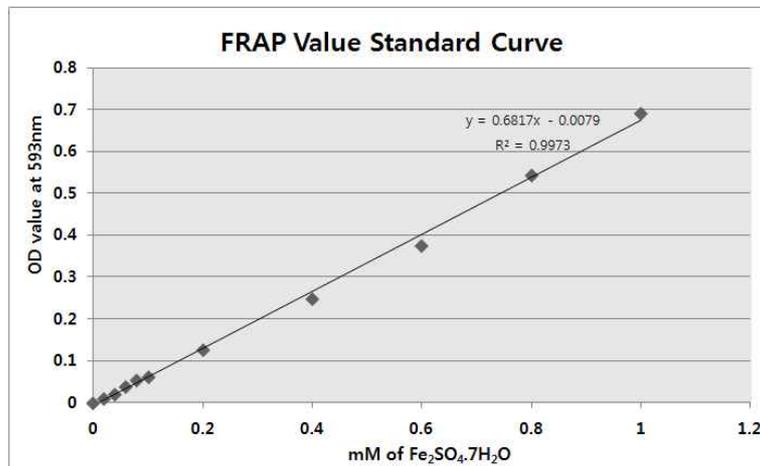


Fig. 16. FRAP value 환산 검량 곡선

(3) ABTS method

- Ethanol에 7 mM의 ABTS (2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfo nic acid) diammonium salt)를 녹인 solution A 와 증류수에 2.45 mM potassium persulfate를 녹인 solution B를 잘 혼합한 후 상온에서 12~16 시간 정치하여 radical을 생성시키고, 이를 743 nm에서 흡광도가 1.4가 되도록 D.W.로 희석하여 ABTS reagent를 제조함
- 여기에 5 mg/mL 로 단백질양을 조절한 마이알반응 가수분해물 수용액 20 μL를 180 μL ABTS reagent와 반응시킨 후 6 분간 정치함. 정치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정함. 대조구로 ABTS reagent와 D.W. 20 μL를 반응 시킨 후, 대조구와 비교하여 O.D.값이 감소한 것을 측정하여 scavenging activity(%)를 계산하였으며 계산식은 아래와 같음

$$Scavenging\ activity(\%) = \left(\frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \times 100$$

나. 실험 결과

(1) DPPH method

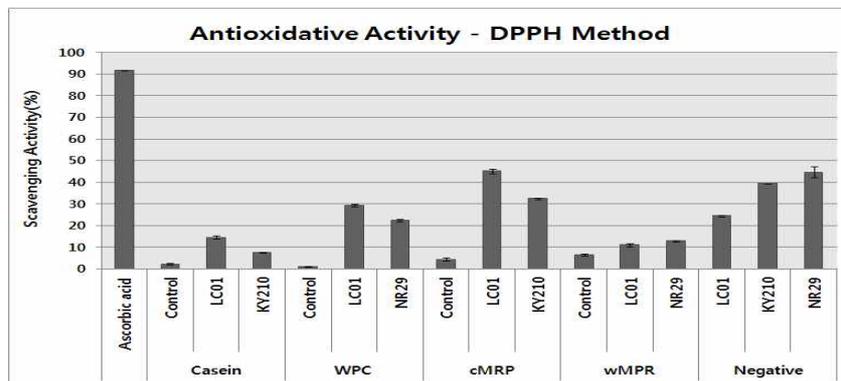


Fig. 17. 마이알반응 생성물 및 유단백질 발효 가수분해물의 DPPH method를 이용한 항산화 활성의 확인

- 그래프 상에 control로 나타낸 group의 경우 발효 이전의 sample을 말하며, 유단백질(casein, WPC) 와 마이알반응 생성물(cMRPs, wMRPs)를 비교했을 때 각각 그 항산화 활성이 소폭 증가한 것을 확인할 수 있음(Fig. 17)
- 선발된 균주로 48 시간의 가수분해를 진행한 경우 발효 이전 보다 가수분해 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 그러나 마이알 반응 생성물(또는 유단백질)이 첨가되지 않은 배지에서 프로바이오틱스 균주로 가수분해를 진행한 경우보다 높은 라디칼 소거능이 나타나는 것으로 관찰되어, 실질적으로 비교의 의미가 없는 것으로 볼 수 있음. 이는 DPPH를 용해시킨 methanol에 의해 단백질 성분들을 비롯한 배지 내 여러 성분들이 용해되지 않고 반응 중에 석출되어 나타나는 문제로 볼 수 있으며, 또한 DPPH 자체가 배지 내 여러 성분들에 의해 영향을 받기 때문인 것으로 추측할 수 있음. 따라서 DPPH 외에 다른 항산화 활성을 확인하는 방법들을 사용하여 실험을 진행함.

(2) FRAP method

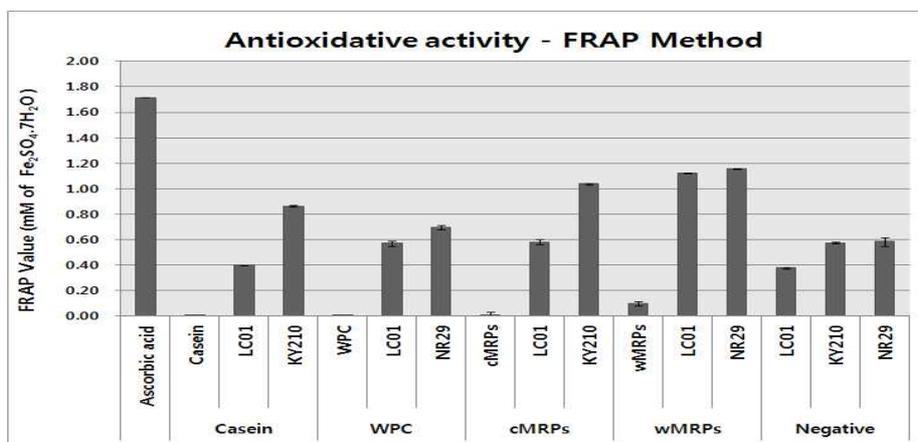


Fig. 18. 마이알반응 생성물 및 유단백질 발효 가수분해물의 FRAP Method를 이용한 항산화 활성의 확인

- DPPH method와는 다르게, 특정 성분이 석출되지 않는 것으로 나타났으며, 이를 통해 더 정확한 항산화 활성을 확인할 수 있었음. 각각의 group에서 프로바이오틱스 균주를 사용하여 발효를 진행한 이후에 항산화 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 유단백과 비교했을 때 마이알반응 생성물의 가수분해물에서 비교적 더 높은 FRAP value를 나타내는 것을 볼 수 있으며, 이를 통해 마이알반응 가수분해물에서 더 높은 항산화 활성을 나타낸다고 볼 수 있음(Fig. 18)
- 마이알반응 생성물 및 유단백질이 첨가되지 않은 배지의 경우 가수분해물보다 낮은 항산화 활성을 나타내는 것으로 나타났으며, 이를 통해서 최종적으로 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반응 발효가수분해물에서 항산화 활성이 존재하는 것을 확인할 수 있었음.

(3) ABTS method

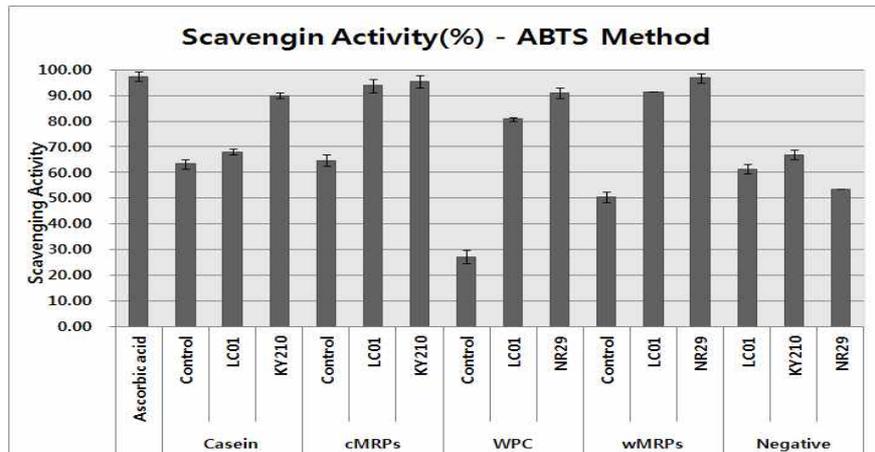


Fig. 19. 마이알반응 생성물 및 유단백질 발효 가수분해물의 ABTS Method를 이용한 항산화 활성의 확인

- 발효 이전보다 발효 이후의 샘플에서 항산화 활성이 높게 나타나는 것을 볼 수 있으며, 유단백질과 비교하였을 때 마이알반응 가수분해물에서 더 높은 항산화 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 19)
- 또한 유단백과 마이알반응 생성물이 포함되지 않은 negative control group에서 유단백과 마이알 반응 생성물이 포함된 group에 비해 항산화 활성이 낮게 나온 것을 확인할 수 있었으며 이를 통하여 최종적으로 유단백질 발효가수분해물 및 마이알 반응 생성물 발효가수분해물에서 모두 항산화 활성이 있는 것을 확인할 수 있었음

(4) 항산화 활성 확인 결론

- DPPH method의 경우 DPPH를 용해시킨 methanol에 의해 발효에 사용한 배지 내에 포함되어 있는 단백질을 비롯한 여러 수용성 성분들이 석출되어 뿌옇게 흐려지면서 흡광도에 영향을 주는 것으로 나타났기 때문에 항산화 활성을 확인하는데는 어려움이 있었기 때문에, 결론적으로 ABTS method와 FRAP method의 두 가지 실험 결과를 비교하여 항산화 활성을 확인하였음
- 두 가지 항산화 활성 방법을 이용하여 발효가수분해물의 항산화 활성을 확인해본 결과 세 결과에서 비슷한 경향성을 나타내는 것을 볼 수 있었음
- 유단백질과 마이알반응 생성물의 발효가수분해물에서 모두 발효 이전보다 항산화 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 발효가수분해물이 포함되지 않은 negative control 군에 비해서 더 높은 항산화 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 결론적으로 발효가수분해물에서 항산화 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었음
- 심혈관계 질환은 여러 가지 원인들이 작용하나, 산화적 스트레스가 한 가지 원인으로 보고되고 있으며, 항산화 활성이 높은 여러 식품성분들의 섭취가 심혈관계 질환의 위험성을 낮춰줄 수 있는 한 가지 방법으로 작용한다고 하는 여러 가지 연구들이 최근까지 진행되고

있음(L. Franzini *et al*, 2012)

- 과거 연구들에서 콩 단백질의 대표적 성분인 Isoflavone의 경우 serum lipid 저감 효과와 함께 항산화 활성을 통해 심혈관계 질환을 낮추는데 기여한다는 보고가 있었으며(Mohktar *et al*, 2004 , Chung *et al*, 2008), 항산화 활성이 높은 차 성분 추출물에서 심혈관계 질환의 위험성을 낮추는데 기여한다는 보고도 있었음(Kris-Etherton *et al*, 2002)
- 이러한 과거 연구 결과들을 통해서 항산화 활성을 갖는 마이알반응 가수분해물이 심혈관 기능을 개선시킬 수 있는 잠재적 기능성 있는 물질로 볼 수 있으며, 심혈관 기능 개선과 관련된 cholesterol의 저감 및 항혈전작용 실험에 적용해 볼 수 있을 것으로 생각됨

7. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 콜레스테롤 저해 능력 확인(*in vitro*)

- 콜레스테롤은 관상동맥성 심혈관 질환을 유발하는 주요 원인물질로 알려져 있는데, 관상동맥성 심혈관 질환은 현재 모든 사망원인의 30% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있음. 식품 형태로 섭취된 cholesterol의 경우 장관계에서 주로 흡수되어 혈중으로 전달되게 되며, 관상동맥성 심혈관 질환의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있음. 따라서 장관계 및 소화관 환경에서 콜레스테롤의 흡수를 저해함으로써 혈중 콜레스테롤 농도를 조절함으로써 관상동맥성 심혈관 질환의 발생을 조절할 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 원리를 이용한 다양한 약제 들이 시판되어 있음
- 기존 프로바이오틱스 균주의 경우, Cholesterol assimilation, bile salt의 분해 등과 같은 기작을 통해 콜레스테롤의 흡수를 낮추어 줄 수 있는 연구결과 들이 보고 되어 있으며, 같은 원리로 유단백질의 가수 분해물과 식품 유래 단백질 성분들의 가수분해물에서도 콜레스테롤의 흡수 저해를 유도할 수 있는 기능성 펩타이드들이 보고되어있음
- 해당 실험에서는 1차년도에 선발한 프로바이오틱스 균주와 함께, 균주를 통해 마이알 반응 생성물을 발효시켜 만들어진 발효 가수분해물에서 콜레스테롤의 저해 효과를 확인하는 것을 목표로 하였음

가. 실험 방법

- 선발된 프로바이오틱스 균주의 cholesterol 저하 능력을 평가하기 위해 Colorimetric assay를 통해 이를 검증하였음
- 프로바이오틱스 균주의 경우, 균주를 MRS에 0.3% oxgall 과 0.2%의 sodium thioglycolate를 첨가하여 121℃에서 15분간 autoclave하여 MRS-THIO배지를 제조함. 여기에 Cholesterol micelle (Cholesterol 1mg/ml in 0.4 mM sucrose solution)을 1% (w/v) 접종하여 Cholesterol의 농도가 100ug/ml 이 되도록 함. 여기에 선발된 균주를 1% (W/v) 접종한 이후 37℃에서 24시간동안 배양한 이후, 배양 상등액에서 cholesterol양을 정량하여 감소한 cholesterol의 양을 확인하였으며, 이때 cholesterol의 저감효과가 나타나지 않은 대조군으로는 균을 접종하지 않은 MRS-THIO 배지를 사용함. MRS-Thio배지에서 24시간 배양 이후 11,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액 2mL에 95~97%

ethanol 3mL과 50% KOH 2mL을 첨가하여 water bath에서 60°C, 10분간 처리함. 상온에서 냉각한 후, hexane 5mL을 첨가하여 콜레스테롤을 추출하고, Hexane층을 분리하여 60°C 온도에서 hexane을 기화시켜 제거함. hexane이 제거된 튜브에 o-phtalaldehyde (0.55mg/acetic acid 1mL) 4mL을 첨가한 후, 황산 2mL을 서서히 첨가하고 550nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 구함. 미리 준비해둔 cholesterol standard curve를 이용하여 cholesterol의 양을 정량함

- 마이알 반응 생성물(MRPs) 가수분해물의 콜레스테롤 저감효과를 확인하기 위해서, MRS 성분을 기반으로 하여, 마이알 반응 생성물이 첨가된 배지를 제조함. 배지 조성은 아래와 같음(Table 8).

Table 8. MRPs medium의 조성

Ingredient	조성 (g/L)
Dextrose	20
Beef extract	0.0
Proteose peptone No.3	5
Yeast extract	2.5
Sodium acetate	5.0
Ammonium citrate	2.0
Dipotassium phosphate	2.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Tween 80	1.0
MRPs	30

- 위의 배지 조성에 0.3% oxgall 과 0.2%의 sodium thioglycolate를 첨가하고 여기에 cholesterol micelle (cholesterol 1mg/ml in 0.4mM sucrose solution)을 1% (w/v) 접종하여 cholesterol의 농도가 100ug/ml 이 되도록 함. 여기에 선별된 균주를 1% (W/v) 접종한 이후 37°C에서 48시간동안 배양한 이후 배양 상등액에서 cholesterol양을 정량하여 감소한 cholesterol의 양을 확인하였으며, 정량 방법은 상기에 기술한 colorimetric 방법을 동일하게 적용하였음
- 콜레스테롤의 저감효과는 % reduction rate로 계산하였으며 계산식은 아래와 같음

$$\% \text{cholesterol reduction rate} = \left(\frac{\text{Control cholesterol} - \text{Sample cholesterol (ug)}}{\text{Control Cholesterol (ug)}} \right) \times 100$$

- 또한 선별된 균주의 MRPs의 가수분해 활성을 확인하기 위해 o-phtalaldehyde (OPA) method를 이용하여 가수분해 활성을 측정함. 발효물의 경우 MRPs외에 다른 단백질 성분들이 성장 인자로 첨가되어 있기 때문에, 반응에서 간섭현상이 나타나기 때문에, 직접적으로 가수분해 활성 측정에 사용하기는 어려운 문제점이 있었음. 따라서 이를 보완하고자, 마이알 반응 생성물 3% (w.v) 과 glucose 2% (W/V) 가 첨가된 수용액에 109 CFU/mL 수준으로 균을 접종한 후 발효를 진행하여 간접적으로 균주의 가수분해 활성을 확인함. 발효가 끝난 상등액을 200uL 따서 110mL TCA와 반응시켜 30분간 정치시킴. 이후 4000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 탄 후, OPA reagent와 반응시킴. 반응 이후 340nm에

서 흡광도를 측정하여 발효 전 후의 흡광도 변화값의 차이를 이용하여, 가수분해 활성도를 측정하였음

나. 실험 결과

- 1차년도에 선발한 3가지 균주 (LC01, KY210, NR29)에서 균주와 균주를 이용한 발효가수분해물의 콜레스테롤 저감화 효과를 확인하였음(43121의 경우, 콜레스테롤 저감 효과가 있는 프로바이오틱스 균주(*Lactobacillus acidophilus*)로써 positive control로 사용된 균주임)

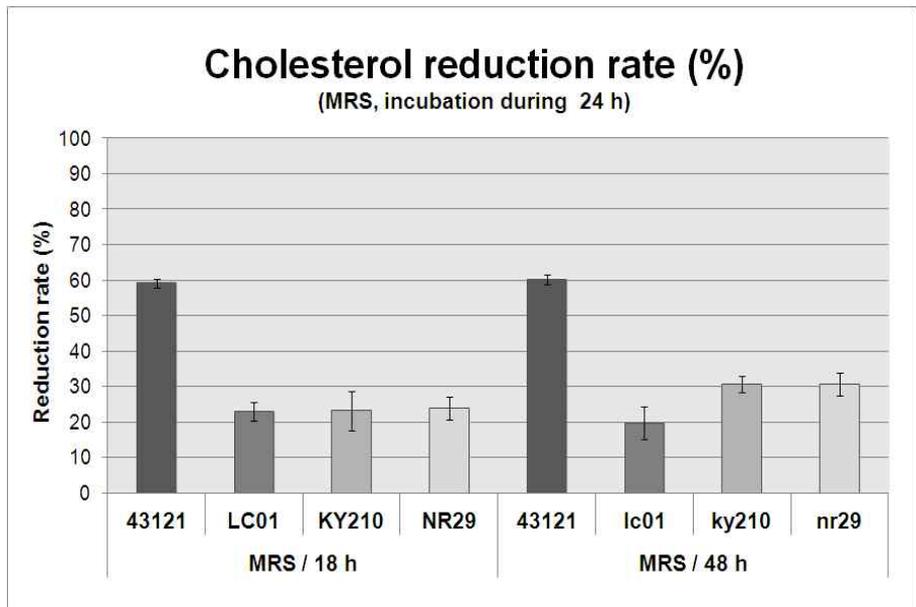


Fig. 20. 1차 선별 균주의 Cholesterol저감 효과 확인

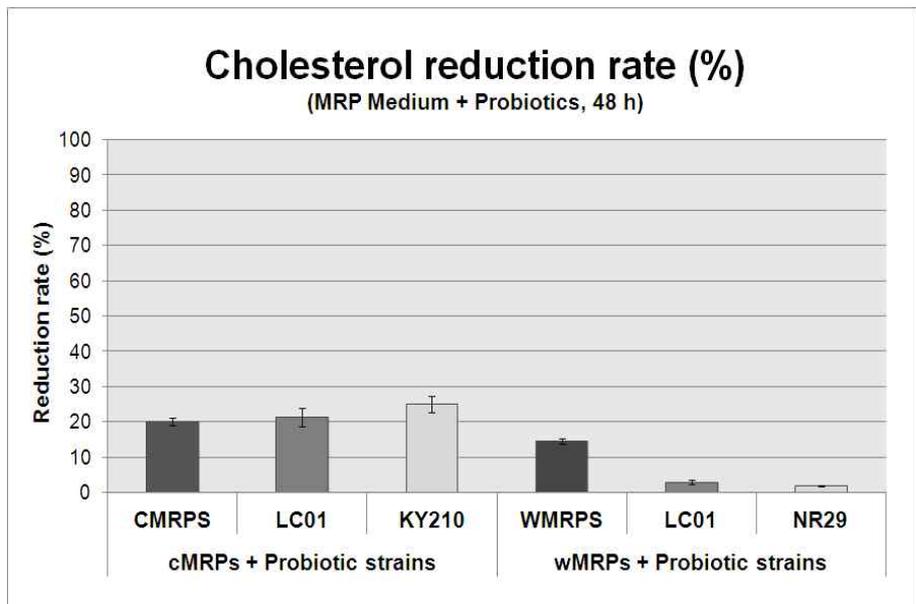


Fig. 21. 1차 선별 균주의 MRPs 발효가수분해물의 Cholesterol저감효과

- 균주의 cholesterol 저감 효과는 20-30% 대의 낮은 효과를 보이는 것으로 보였으며, 균주 간 큰 차이가 나타나지 않는 것으로 확인되었음(Fig. 20). 또한 3 균주를 이용한 발효물에서 균주가 갖는 cholesterol 저감 효과와 비슷하거나 더 낮은 10% 이하의 결과를 보이는 것으로 나타났음(Fig. 21). 결과적으로 위 세 균주와 세 균주를 이용해서 제조한 마이알 반응 생성물의 발효 가수분해물에서 모두 cholesterol 저하 기능성은 약한 것으로 결론지을 수 있음
- 따라서, 1차년도에 유단백 가수분해 활성이 있는 균주들을 대상으로 새로운 프로바이오틱스 균주의 선별 작업을 진행하였음
- Casein 과 WPC에 대해서 가수분해 활성을 갖는 균주들 중에서, 마이알 반응 생성물이 첨가된 배지에서 생장이 Lactobacilli의 증균배지인 MRS에서 수준만큼 생장이 확인되는 동시에 pH가 4점대 까지 떨어지는, 발효능이 있는 것으로 판별되는 균주들을 새로 선발함. 선발한 결과는 아래와 같음(Table 9).

Table 9. 마이알반응 생성물의 이용 가능 균주의 선별

	MRS18h		cMRPs			MRS18h		wMRPs	
	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH		log(CFU)	pH	log(CFU)	pH
LC01	9.6	3.88	8.991	4.47	LC01	9.6	3.88	9.309	4.97
KY210	9.37	4.34	8.871	4.57	NR29	9.71	4.3	9.051	4.21
MF39	8.43	3.84	7.639	5.24	NR28	9.05	4.36	8.1	6.24
LF19	9.02	3.84	7.693	5.57	D2	9.12	3.84	7.894	5.15
MF9	9.31	3.96	7.451	5.97	KC20	8.94	4.12	7.41	6.21
MF27	9.04	4.01	8.54	4.31	D49	9.1	3.99	7.15	6.1
MB50	8.95	3.89	8.94	4.52	MF36	8.97	3.94	9.02	4.32
LF19	9.27	3.95	8.97	4.21	9018	9.21	9.82	9.12	4.1
					SC	9.01	3.9	8.97	4.6

- Casein+ Lactose 반응을 통해 제조된 G-casein 모델에서는 기존 LC01, KY210 외에 MF27, MB50, LF19 균주가 MRPs를 사용 가능한 것으로 확인되었으며(Fig. 22), WPC+ Lactose 반응을 통해 제조된 G-WPC 모델에서는 기존 LC01, NR29 외에 MF36, 9018, SC 균주가 각각 G-WPC에 대한 이용능이 확인되었으며, 해당 균주들을 가지고 cholesterol 저해 효과를 함(Fig. 23)
- 또한 발효 시간 별 cholesterol 저해 효과의 변화 추이를 확인하기 위해서 발효시간을 24시간, 48시간, 72시간으로 다양화하여 cholesterol 저해 효과를 함

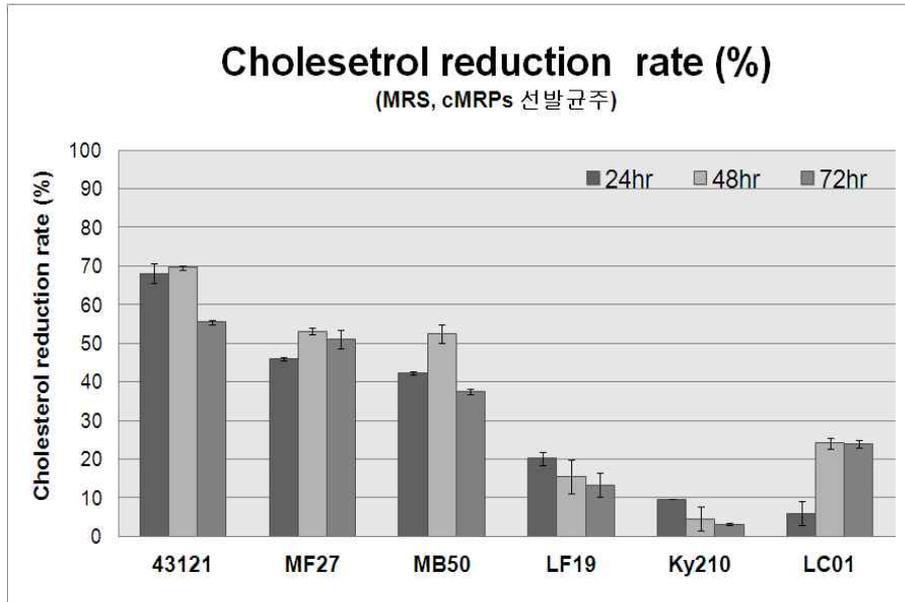


Fig. 22. 2차 선별 균주(G-casein 그룹) 의 Cholesterol저감 효과

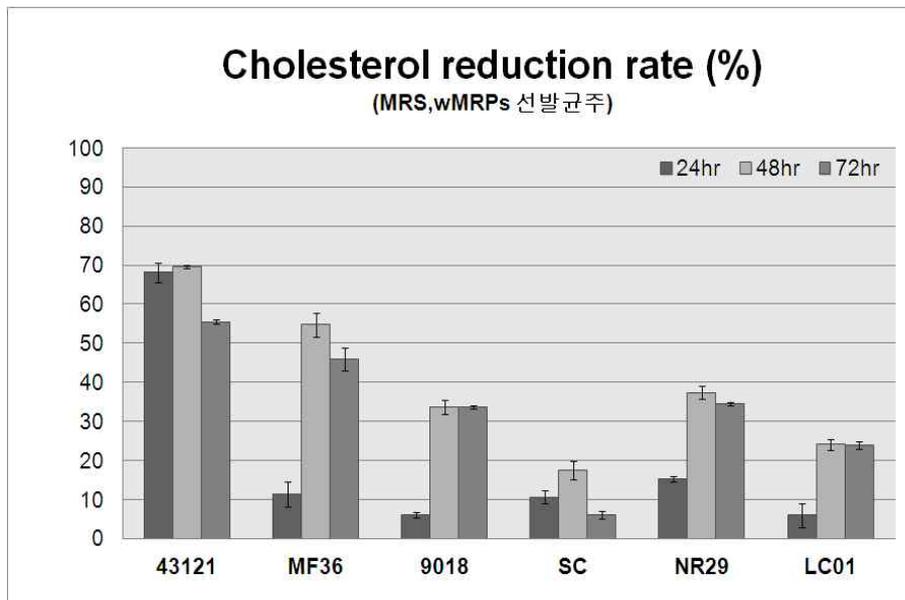


Fig. 23. 2차 선별 균주(G-WPC 그룹) 의 Cholesterol저감 효과

- 2차 선별 균주들은, MRS에서 Cholesterol 저해 효과를 확인했을 때, G-casein 그룹에서 MF27, MB50 균주에서 40-50 %대의 비교적 높은 Cholesterol저해 효과가 있는 것을 확인하였음. 또한 G-WPC 그룹에서는 MF36이 50 %의 높은 콜레스테롤 저해 효과를 나타냈고 9018이 40 %대의 효과를 나타냈으며, Sc, NR29, LC01의 경우에는 콜레스테롤 저해 효과가 상대적으로 미미한 것으로 나타났음. 발효시간에 의한 효과는 균주마다 각각 다른 양상을 보이는 것으로 나타났으며, G-casein그룹에서는 실험오차를 고려할 때 각 시간별로 콜레스테롤의 저감효과가 유의적으로 변하는 것으로는 보기 어려울 것으로 보임. G-WPC 그룹에서는 24시간에서 콜레스테롤 저해 효과가 유의하게 낮게 나오는 것들을 확인할 수 있었으며, 이것의 원인을 확인하기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 보임

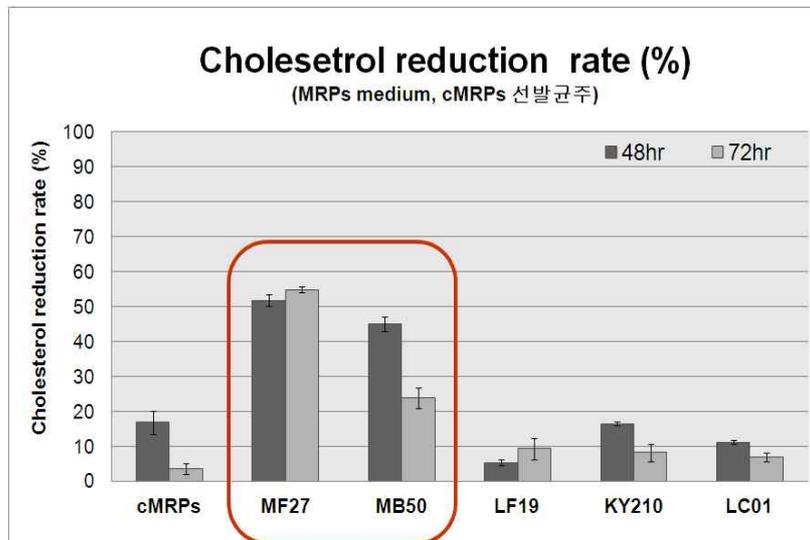


Fig. 24. 2차 선별 균주(G-casein 그룹) 의 MRPs 발효 가수분해물의 Cholesterol저감 효과

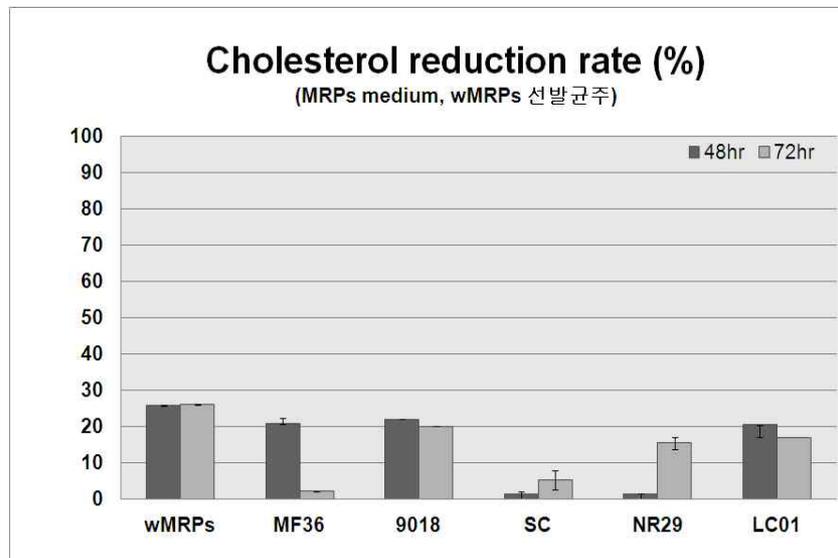


Fig. 25. 2차 선별 균주(G-WPC 그룹) 의 MRPs 발효 가수분해물의 Cholesterol저감 효과

- 마이알 반응 생성물의 가수분해물에서는 Casein + Lactose 반응에서 생성된 G-casein에서 MF27을 이용한 발효물에서 50% 의 콜레스테롤 저해 효과를 확인할 수 있었으며, MB50에서는 약 40% 의 콜레스테롤 저감 효과를 확인할 수 있었음(Fig. 24). 또한 발효 전의 G-casein이 20%의 낮은 콜레스테롤 저해효과를 나타내는데 반해, MF27과 MB50으로 발효한 후에 콜레스테롤 저해 효과가 증가한 것을 확인할수 있었음
- 반면 G-WPC에서는 전반적으로 20% 이하의 낮은 콜레스테롤 저해 효과가 확인되었으며, 발효 전 G-WPC가 20% 대에 효과를 보이는 반면 발효 이후에 이러한 효과들이 균주에 따라 다양하지만 소폭씩 감소하는 것들을 확인할 수 있었음(Fig. 25)
- 해당 실험들을 통해서, casein + Lactose 반응에서 생성된 G-casein에서 MF27과 MB50

을 사용하여 발효를 진행한 MRP_s 발효 가수분해물에서 50% 수준의 콜레스테롤 저해효과가 있는 것으로 결론 내릴 수 있었음

- 1차년도에 선발한 균주 외에, 콜레스테롤 저해 가능성을 갖는 균주들을 대상으로 균주 선별작업을 한번 더 진행하였음. 기존에 해당 실험실에서 콜레스테롤 저해 가능성을 갖는 균주들로 선별되어 있는 균주들 중에서 MRP_s에 대한 이용능 및 발효능이 있는 것으로 보이는 균주들을 선발함. 즉 MRP_s가 들어가 있는 배지 조건에서 MRS와 비슷한 수준의 성장과 pH 저하를 보이는 균주들을 추가로 선발함(Table 10)

Table 10. 콜레스테롤 저해 기능성 균주의 MRP_s 이용능 균주 선별 결과

Strain	MRS18h		cMRPs		wMRPs	
	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH	log(CFU)	pH
43121	9.34	3.8	7.98	6.15	8.24	4.98
LF35	9.21	3.6	7.01	6.65	8.95	4.25
SF	9.01	4.02	7.51	6.54	7.5	6.98
MA1	8.95	3.98	8.45	4.32	8.67	4.58
LF1	9.13	3.78	6.67	6.87	7.21	7.32
B719	8.47	4.1	6.98	6.51	7.15	7.45

- 실험결과, G-casein에서는 MA1이, G-WPC에서는 43121, LF35, MA1 총 3균주가 MRP_s에 대한 이용능을 갖는 것으로 평가되었으며, 이 3가지 균주를 가지고, MRP_s가 포함된 배지를 제조하여, 콜레스테롤 저해 능력을 측정하였음

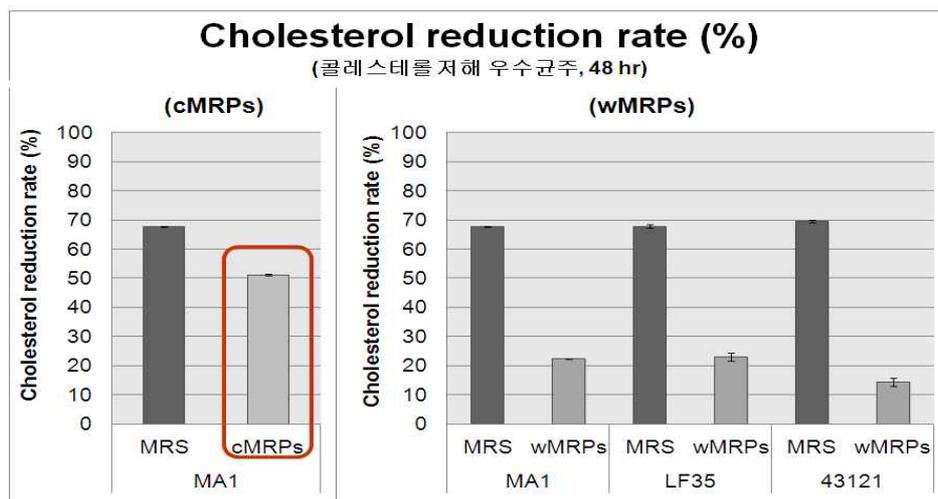


Fig. 26. 콜레스테롤 저해 우수 균주의 MRS-THIO배지와 MRP_s 첨가 배지 상에서 콜레스테롤 저해 효과의 확인

- 실험결과, Fig. 8에서와 같이 MRS상에서 나타나는 콜레스테롤 저하 효과보다 소폭 하락하는 결과들을 확인할 수 있었음. 그러나 G-casein에서 MA1으로 발효한 샘플에서 콜레스테롤이 50% 가량 높게 저하 되는 것을 확인할 수 있었던 반면, G-WPC에서는 위의 결과와 마찬가지로 MRS보다 매우 낮은 콜레스테롤 저하 효과를 나타내는 것으로 나타났음(Fig. 26)
- 최종적으로, 콜레스테롤의 저감화 효과는 casein과 Lactose의 반응을 통해 생성된 G-casein 그룹에서 나타나는 것으로 확인할 수 있었으며, G-casein에서 MF27, MB50, MA1 의 세 가지 균주를 가지고 발효를 진행했을 때, 콜레스테롤의 저감 효과가 나타나는 것으로 실험을 통해 확인할 수 있었음
- 또한 Casein 과 G-casein간에 효과를 확인하기 위해 선발된 세 가지 균주를 G-casein이 첨가된 배지와 casein이 첨가된 배지 조건에서 콜레스테롤 저감 효과를 확인하여, 마이알 반응이 일어난 샘플과 일어나지 않은 샘플간의 차이를 알아보는 실험을 진행하였음

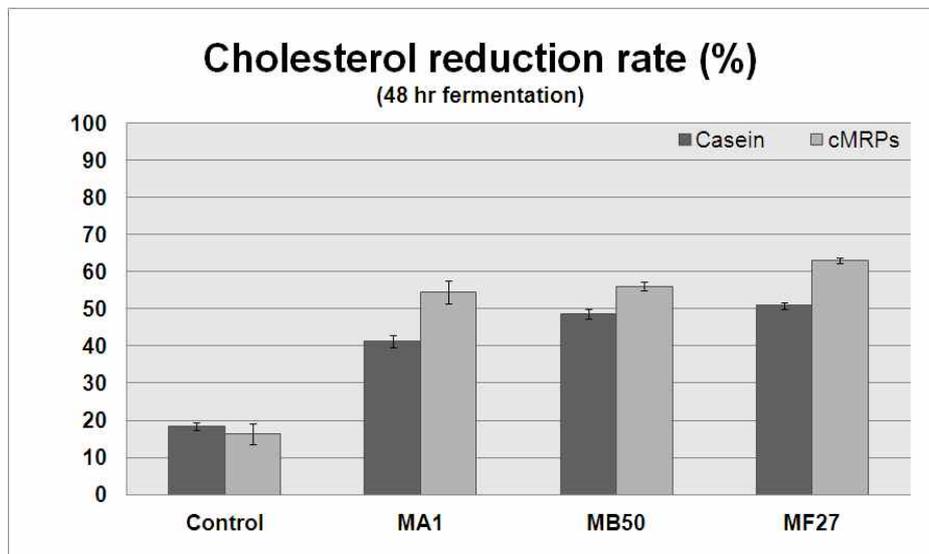


Fig. 27. 콜레스테롤 저하 효과에 대한 G-casein과 casein의 차이

- Casein 과 G-casein 모두 발효 전에 비해서 발효 후에 콜레스테롤 저하 효과가 증가하게 되는 것을 확인할 수 있었음. Casein과 G-casein을 비교했을 때 , 선발된 3가지 균주 모두 casein 보다 G-casein에서 더 높은 콜레스테롤 저하 효과를 확인할 수 있었음(Fig. 27). 해당 실험을 통해 Casein의 발효물 보다 마이알 반응에 의해 생성된 G-casein의 발효물이 콜레스테롤 저해 효과가 소폭이나마 조금 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과에 대한 원인은 추후에 더욱 연구가 필요할 것으로 사료됨
- 선발된 세 균주의 G-casein에 대한 가수분해 활성을 확인하고자, 상기 기술된 OPA방법을 이용하여 G-casein의 분해 정도를 확인하였으며, 결과는 아래와 같음(Fig. 28)

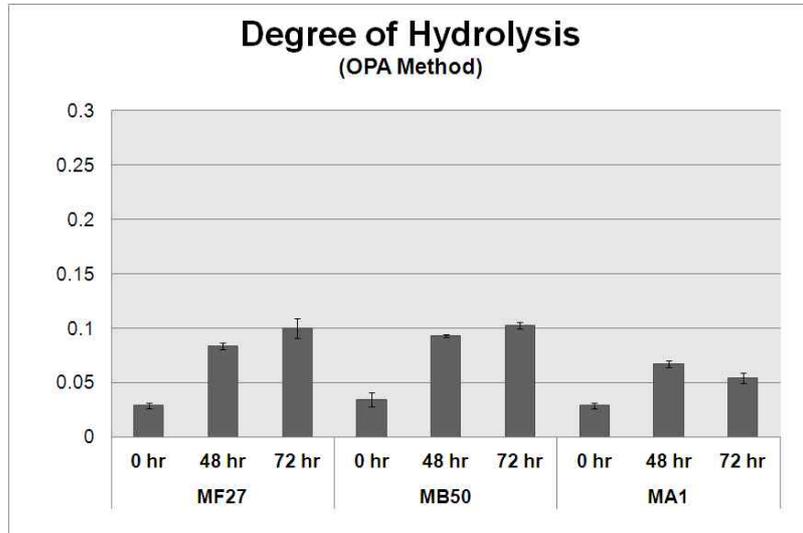


Fig. 28. 선발 균주의 G-casein에 대한 가수분해 활성

- 발효 시간에 대비하여 G-casein에 대한 흡광도 값이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 이를 통해 선발된 세 균주 모두 발효과정에서 G-casein에 대한 가수분해를 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 OPA값의 변화 폭이 크지 않으며, MRS에서 나타나는 cholesterol의 저하 효과가 MRPs 상에서도 비슷한 경향으로 나타나는 것을 통해서 MRPs의 분해의 영향보다는, 균주 자체가 갖는 콜레스테롤 저감화 효과에 대한 영향이 조금 더 큰 것으로도 해석해 볼 수 있음(Fig. 28)
- 계획서 상에서는 GC-FID 분석을 이용하여 콜레스테롤 저하 활성을 정량적으로 확인하는 것으로 계획되어 있었으나, colorimetric assay에서 반복실험을 통해 충분히 Cholesterol의 정량 결과가 입증되었으며, 오차의 범위도 높지 않았기 때문에 Colorimetric assay만으로도 충분히 연구 목표를 달성했다고 판단하였음. 이에 GC-FID분석은 진행하지 않음

8. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 혈전용해 활성의 확인(*in vitro*)

- 건강한 사람에게서는 혈전이 상처 부위의 지혈 및 보호 효과를 나타내는 반면, 혈전증을 비롯한 다양한 심혈관 질환에서 혈액 응고의 과다로 인한 혈전의 생성은 혈전증이라고 불리며 다양한 증상을 동반하게 됨. 동맥에서 혈전의 과다한 생성이 일어나게 되면 급성 심근경색을 비롯한 뇌졸중, 폐 혈전증, 급성말초 동맥 폐쇄증이 나타나게 되며 정맥에서 혈전의 과다 생성은 심부정맥 혈전증을 비롯한 다양한 부위에서 혈관 폐쇄를 유도하여, 심혈관계 질환을 일으키는 중요한 요소로 보고되고 있음.

가. 실험 방법

- 마이알반응 생성물과 프로바이오틱스, 그리고 프로바이오틱스 균주를 활용한 마이알반응 생성물의 발효가수분해물의 혈전에 대한 용해능을 확인하기 위해, plasminogen free fibrin plate method를 사용하여 혈전에 대한 용해능을 평가하였음. 해당 방법에서는 plate상에서 혈전을 생성시키고, 혈전 상에 확인하고자 하는 샘플을 적접하여 반응시킨 후, 혈전이 용해되면서 나타나는 투명환(Clear-zone)의 생성 여부를 확인하여 혈전용해 활성의 확인의 지표로 사용하였음
- 실험과정은 다음과 같음. 0.1M의 Borate buffer (pH 7.8)을 제조하여 모든 샘플과 반응 기질 및 효소를 용해 시킴. 1% (w/v)의 fibrinogen을 borate buffer에 충분히 녹여줌. 여기에 1.2% agarose solution을 가열하여 충분히 식힌 후, Fibrinogen solution과 섞어 준 후, 여기에 5unit/ml의 농도로 Thrombin을 첨가하여 Fibrinogen을 Fibrin으로 전환시켜 혈전을 생성시킴. 실온에서 충분히 Plate가 굳은 것을 확인 한 후, 2mm 직경의 구멍을 Plate 위에 만들어 줌
- Sample은 다음의 절차에 따라서 준비함. 먼저 프로바이오틱스 균주의 혈전용해 활성을 확인하기 위하여, 24시간 동안 배양한 MRS culture의 cell free supernatant를 모은 후, pH를 7.8로 조정하여 이를 Fibrin plate위에 적접함. MRPs 발효물의 효과를 확인하기 위해 다음 두 가지 조건에서 발효를 진행함
- 첫 번째 조건은 MRPs Medium으로 명명하며, MRS 조성을 기본으로 하여 질소원 성분을 3% MRPs 배지로 교체 한 위에서 언급한 Table 1의 조성에 균을 10^7 CFU/ml 수준으로 접종하여 37 °C 48시간 동안 배양하여 pH를 7.8로 조정한 후, 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용함. 두 번째 조건은 MRPs Solution으로 명명하며, MRPs 3% + Glucose 2% 수용액에 10^9 CFU/ml 수준으로 균을 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, pH를 7.8로 조정하고 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용하였음
- 위에 방법으로 제조된 용액상의 샘플 20uL를 Fibrin plate상의 2mm 직경의 hole에 적접한 후 37 °C에서 3시간동안 반응 시킨 후, Clear zone의 생성 여부를 판단함
- Positive control로는 혈전 용해 약제로 사용되고 있는 Urokinase를 사용하였으며, 다양한 농도를 Plate상에서 처리한 이후에, 생성되는 Clear zone의 면적을 구하여 검량곡선을 작성한 후, 샘플에서 나타난 Clear zone의 면적을 이에 대비하여, 혈전 용해 능을 수치화 하였음. 또한 Negative control로는 0.1 M Phosphate buffer saline을 사용함
- 실험에서는, 1차년도에 선별한 세 가지 균주인 LC01, KY210, NR29를 비롯하여, 유단백질 가수분해 활성이 나타난 균주들을 사용하였음. Casein 선발 그룹에서 상위 10균주를 선택하여, G-casein의 발효물 제조에 사용하였으며, WPC 선발 그룹에서 상위 15균주를 선택하여 G-WPC의 발효물 제조에 사용하였음

나. 실험 결과

- Urokinase를 0 unit/ml ~ 500 unit/ml 수준으로 처리하였을 때, Clear-zone이 이에 대비하여 증가하는 것을 확인하였음(Fig. 29)

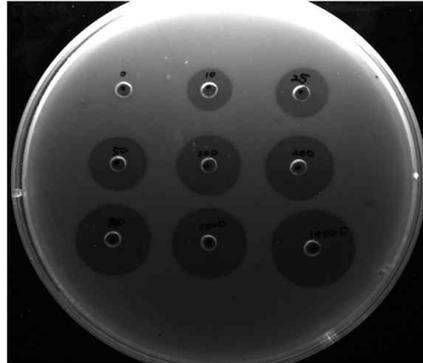


Fig. 29. Positive 약제인 Urokinase를 농도별 처리 했을 때 나타나는 Clear zone의 양상

- 또한 발효를 진행하기 전 sample들을 Control 그룹으로 설정하여 혈전용해 현상이 발생하는지를 확인하였음
- 발효 전의 MRS, MRPs medium, MRPs Solution 모두 혈전용해 활성을 나타내지 않는 것을 확인함(Fig. 30)

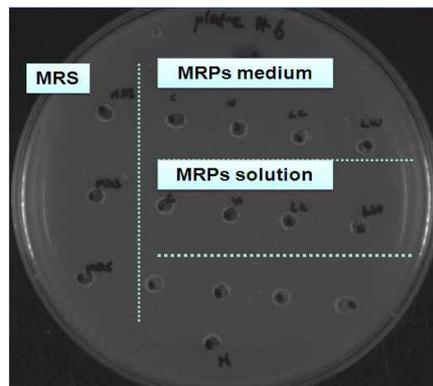


Fig. 30. 발효 전 Sample의 혈전용해 활성 확인

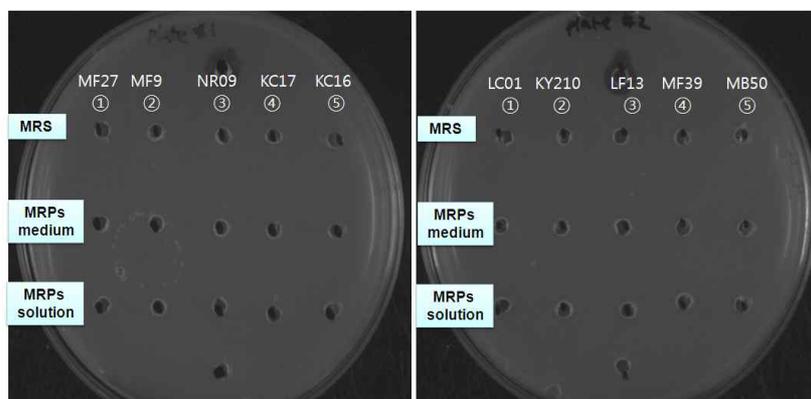


Fig. 31. Casein 선발 균주 및 MRPs 발효가수분해물의 혈전용해 활성 확인

- Casein 선발 10개 균주에서, 균주의 활성을 보기 위한 MRS 상등액, MRPs 발효 가수분해물에서 모두 Clear-zone이 발견되지 않았으며, 이를 통해 Casein 선발 균주 및 Casein 선발균주에 의한 MRPs 발효 가수분해물에는 혈전용해 활성이 없는 것으로 결론 내릴수 있었음(Fig. 31)

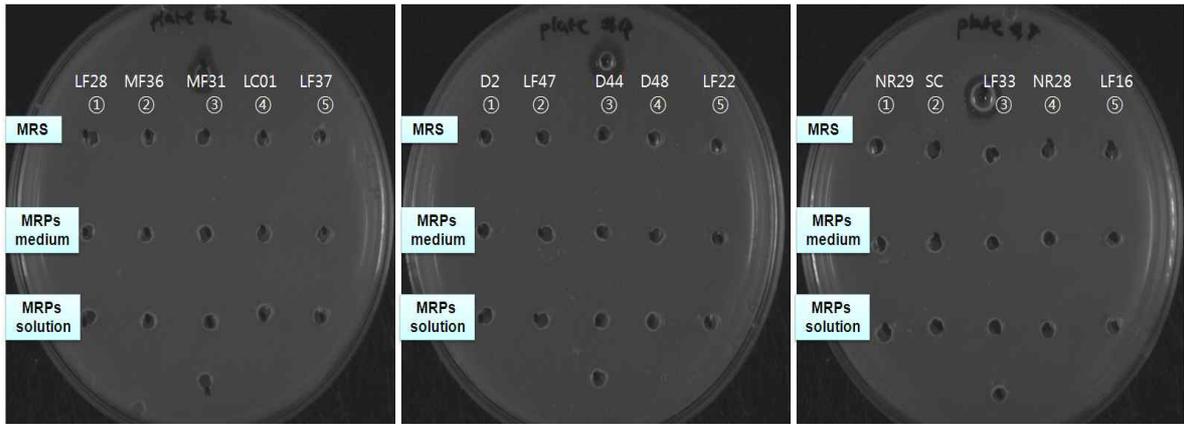


Fig. 32. WPC 선발 균주 및 MRPs 발효가수분해물의 혈전용해 활성 확인

- WPC 선발 15개 균주에서도 위와 마찬가지로, 균주 자체의 효과와 MRPs 가수분해물에서 혈전 용해 효과가 없는 것으로 나타났음(Fig. 32)
- 최종적으로, 본 연구에서 선별한 프로바이오틱스 균주와 마이알반응 생성물, 균주를 이용한 마이알 반응 생성물의 발효 가수분해물에서 모두 혈전용해 활성이 없는 것으로 결론내릴 수 있었음

9. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 트롬빈 저해 활성 확인(*in vitro*)

- Thrombin은 혈관 손상 등의 다양한 자극을 통해서 외부요인 또는 내부적 단백질 메커니즘에 의해서 활성화 되어 fibrinogen을 Fibrin으로 전환시켜 혈전(fibrin clot) 생성에 관여하며, 뿐만 아니라, 혈소판 응집, 혈구의 안정성 파괴 및 구조 변화, 면역세포 등의 응집을 촉진시켜, 혈관 내 혈전을 생성시키고 혈관을 폐쇄 시키는데 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있음. 또한 고 콜레스테롤 혈증을 비롯한 다양한 성인병모델에서 thrombin의 활성의 증가 및 Fibrinogen의 증가 등에 의한 혈전증의 발생 빈도가 더욱 높게 나타난다는 보고들이 기존 연구들을 통해서 보고된 바 있음.

가. 실험 방법

- 기존 계획서 상에는 Aggregometer를 활용한 혈소판 응집 억제 활성을 확인하는 것으로 계획되어 있었으나, Aggregometer의 경우 기기가 현재 해당 연구 시설 내에 구비되어 있

지 않는 문제가 있었음. 또한 이 기기의 외부 분석을 의뢰할 경우 실험에 사용하는 Rat의 혈액에서 준비한 Platelet rich plasma (PRP)와 Platelet poor plasma (PPP)를 준비한 이후에 외부에서 분석을 진행해야 하는데, PPP와 PRP의 경우 준비 이후에 1~2시간 이내에 사용하지 않으면 Platelet의 구조가 파괴되어 안정적인 실험결과를 얻을 수 없는 문제가 있음. 따라서 해당 방법을 이용한 여러 가지 샘플의 스크리닝에는 부적합 한 것으로 결론짓고, thrombin 저해 활성을 확인하는 것으로 실험방법을 변경함

- 따라서 본 연구에서는, 과다한 혈전생성을 통해 혈전증을 유발하는 것으로 알려진 thrombin의 억제활성을 측정하여, 혈전증을 감소시킬 수 있는 잠재적 활성을 갖는 프로바이오틱스 균주 및 마이알 반응 생성물 발효 가수분해물을 찾고 최적 발효 조건을 탐색하는 것으로 실험방법을 대체하였음
- 모든 샘플 및 substrate는 0.05 M Tris-HCL (pH7.2) buffer를 사용하여 용해시킨 후 실험에 사용하였음. 0.2 % (w/v)의 fibrinogen을 해당 buffer에 충분히 용해시킴. fibrinogen solution을 96 well 에 140 uL 씩 분주한 후, 여기에 억제활성을 확인하고자 하는 sample 들을 40uL을 첨가한 후 섞어 줌. 이후 37°C에서 10분간 Pre-incubation을 시켜 준 이후에 405nm에서 흡광도 값을 측정해줌 (OD 405nm, sample blank). 여기에 적절한 농도의 Thrombin solution을 10uL 첨가해 준 이후, 적절한 시간 동안 반응 시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정함. Positive control로는 Thrombin 억제제인 Heparin을 사용하였으며, Negative control로는 PBS를 사용하였음. 측정한 흡광도 값을 이용하여, 최종적으로는 % inhibition rate로 환산하였으며, % inhibition rate 환산 공식은 아래와 같음

$$\% \text{thrombin inhibition rate} = \left[\frac{OD_{405nm, \text{-ative control}} - (OD_{405nm, \text{sample}} - OD_{405nm, \text{sample blank}})}{OD_{405nm, \text{-ative control}}} \right] \times 100$$

- 샘플은 혈전 용해 실험에서 적용했던 세 가지 샘플을 같은 방식으로 적용하였음. 먼저 프로바이오틱스 균주 자체의 thrombin 저해 활성을 확인하기 위해, 24시간 동안 배양한 MRS culture의 cell free supernatant를 모은 후, pH를 7.2로 조정하여 실험에 사용하였음. MRPs 발효물의 효과를 확인하기 위해 다음 두 가지 조건에서 발효를 진행함. 첫 번째 조건은 MRPs Medium으로 명명하며, MRS 조성을 기본으로 하여 질소원 성분을 3% MRPs 배지로 교체 한 위에서 언급한 Table 1의 구성에 균을 10^7 CFU/ml 수준으로 접종하여 37°C 48시간 동안 배양하여 pH를 7.2로 조정한 후, 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용함. 두 번째 조건은 MRPs Solution으로 명명하며, MRPs 3% + Glucose 2% 수용액에 10^9 CFU/ml 수준으로 균을 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, pH를 7.2로 조정하고 원심 분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용하였음

나. 실험 결과

- 실험 최적조건을 찾기 위해 먼저, substrate의 농도를 0.2%로 고정한 후 thrombin의 농도를 다양하게 처리하여 OD값이 적절한 수준까지 올라가는 것을 확인함(Fig. 33)

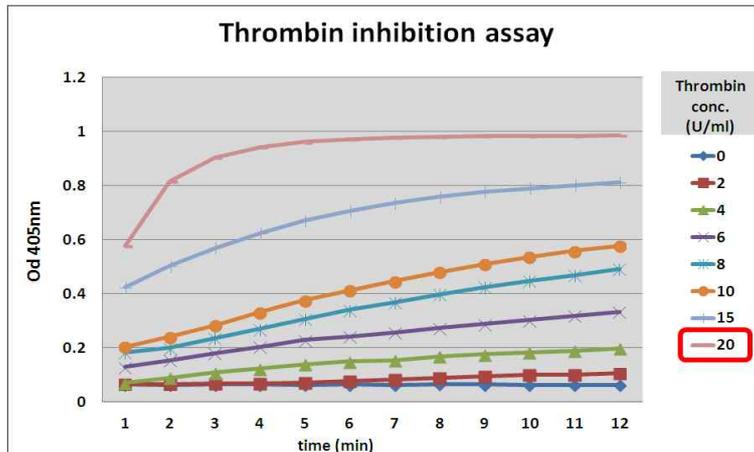


Fig. 33. 최적 Thrombin의 확인

- 즉, Thrombin의 농도를 높일수록, Fibrinogen이 Fibrin으로 전환되어 OD값이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, OD 값이 반응 이후 1 수준까지 상승한 20 Unit/ml을 최적 농도로 결정하여 실험을 진행함.

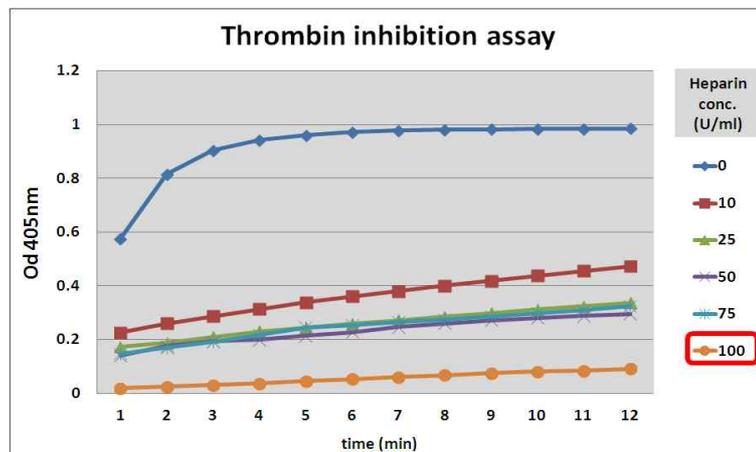


Fig. 34. 최적 Heparin 농도의 확인

- Heparin의 농도를 높게 처리할수록 Thrombin의 저해 효과가 증가하여 흡광도 값이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 34), 90% 이상의 저해효과가 나타나는 100 IU/ml을 최적 농도로 설정하여, 실험을 진행하였음

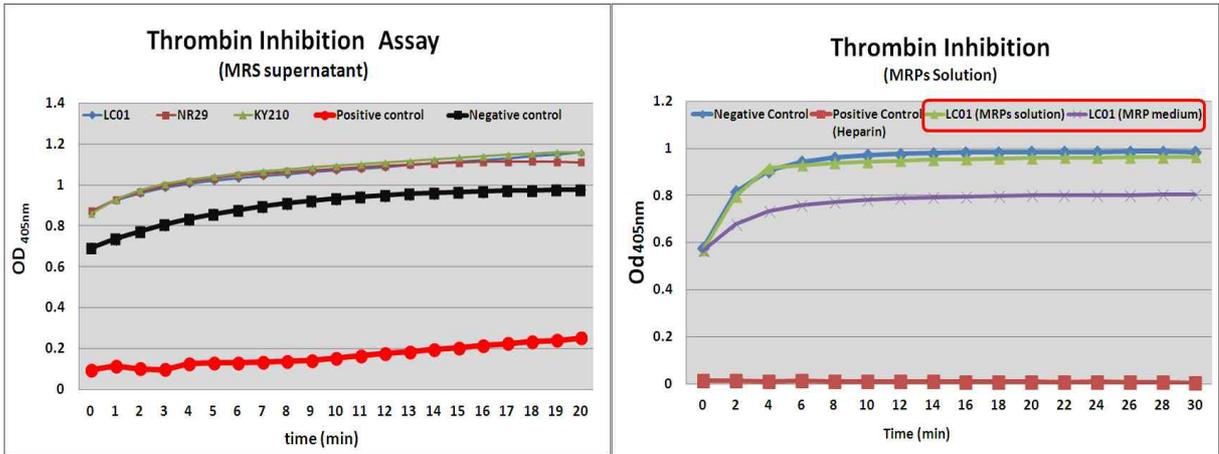


Fig. 35. MRS 처리 군과 MRPs 발효물 처리군의 결과 비교

- 먼저 MRS 배양 상등액을 처리한 결과는 MRPs 발효물과 비교했을 때, PBS를 처리한 Negative control군에 비해 Thrombin의 활성화가 증가하여 흡광도가 더 증가하는 것으로 확인되었음(Fig. 35). 이는 MRS 상등액 자체에 Thrombin의 활성화 효과가 있다기보다는, MRS 성분 자체에 다양한 성분들이 포함되어 있기 때문에, 이로 인한 간섭현상으로 인해서 이러한 결과가 나타난 것으로 짐작할 수 있으며, 추후에는 MRS 배양 상등액을 제외하고 MRPs 발효 가수분해물만을 가지고 실험을 진행하는 것으로 방법을 수정하였음

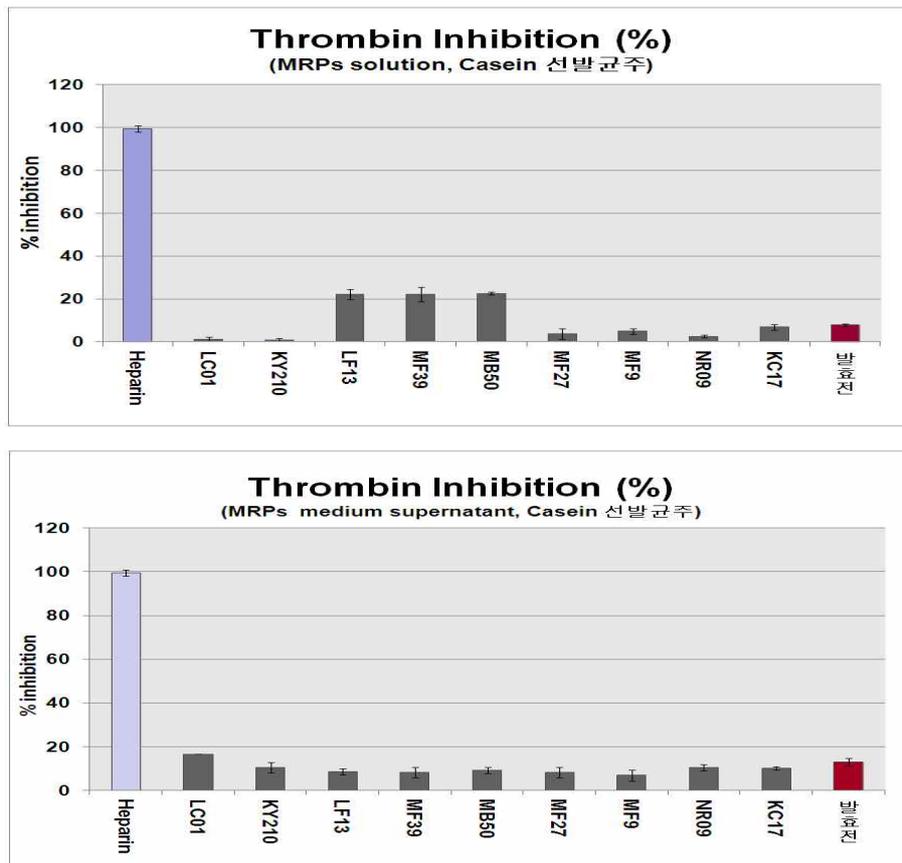


Fig.36. G-casein 발효물의 Thrombin 저해 활성

- Casein 유래 MRP에 대한 실험결과를 나타내었음. MRPs solution에서는 발효 전 약 10% 미만의 낮은 저해활성을 나타냈으며, 프로바이오틱스 균주를 이용해 발효를 진행한 샘플에서는 몇 가지 균주에서는 활성이 증가하는 반면 몇 가지 균주에서는 활성이 감소하는 것이 확인되었음(Fig. 36). 반면 MRPs medium조건에서는 발효 전 약 15% 정도의 저해활성을 보인 반면, 발효 후에는 오히려 15 %보다 낮은 활성을 보이는 것으로 나타났음. 이를 통해서 MRPs medium 보다는 MRPs solution를 이용한 발효 조건이 Thrombin 저해 활성을 나타내는데 최적 조건임을 확인하였음(Fig. 36).

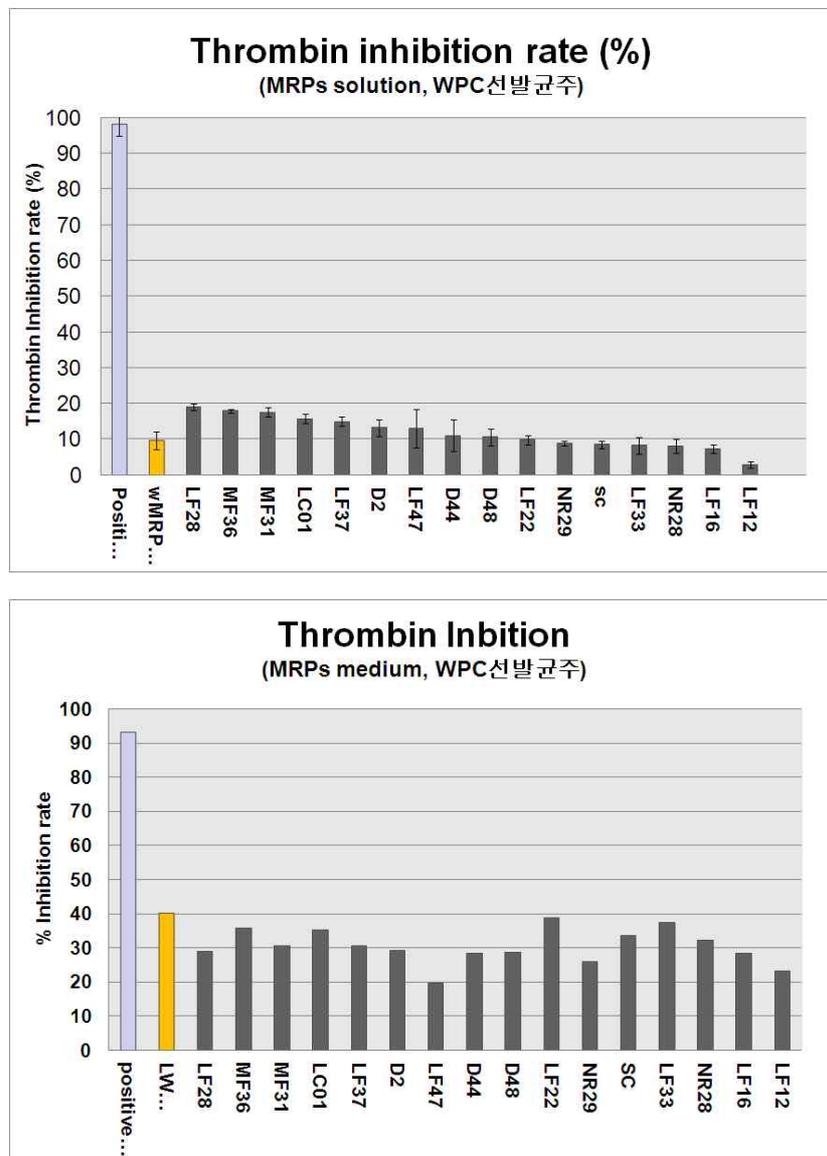


Fig. 37. G-WPC 발효물의 Thrombin 저해 활성

- WPC 유래 MPRs의 Thrombin 저해 활성 실험결과는 MRPs solution 상에서는 발효 전 10% 수준의 저해활성을 보인 반면 발효 이후에 일부 균주의 발효물에서는 저해활성이 증

가되었고, 일부 균주에서는 저해활성이 감소되었음. MRPs medium에서는 발효 전 40 % 수준의 비교적 높은 저해활성을 보였으나, 발효 이후 모든 균주에서 저해 수준이 낮아지는 것으로 확인되었음(Fig. 37). 따라서 Casein 유래 MRPs 와 WPC 유래 MRPs 모두 MRPs medium조건이 아닌 MRPs solution 상에서 발효를 진행하는 것이 thrombin 저해 활성을 개선시키는데 더욱 효과적인 샘플임을 확인하였음

- 이후 MRPs solution 상에서 Casein 선발 균주 중 thrombin 저해 활성 상위 세 균주인 LF13, MB50, MF39와, WPC 선발 thrombin 저해 활성 상위 세 균주인 MF31, MF36, LF25를 각각 발효시간을 조절하여, thrombin 저해 활성이 다르게 나타나는 지를 확인하였음

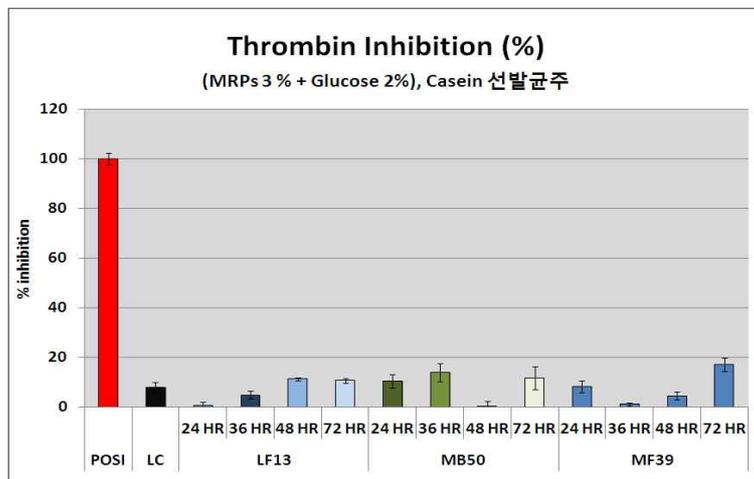


Fig. 38. G-casein 발효 시간에 따른 Thrombin 저해 활성 변화

- Casein 유래 MRPs (G-casein)에서는 발효 시간별로 균주별로 각각 다른 양상을 나타내는 것으로 확인되었음(Fig. 38). LF13의 경우에는 발효가 진행될수록 thrombin 저해활성이 약하게나마 증가한 반면, MB50이나 MF39 같은 경우에는 특정 시간대에 급격하게 감소했다가 다시 소폭 상승하는 등의 결과를 보였음(Fig. 38).

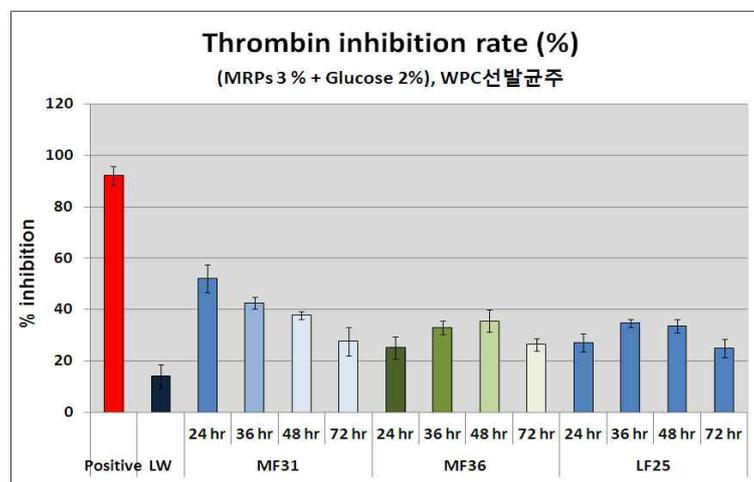


Fig.39. G-WPC 발효 시간에 따른 Thrombin 저해 활성 변화

- WPC 유래 MPRs에서는 발효시간에 대비하여 저해 활성이 크게 증가하는 균주들이 확인되었음. MF31의 경우는 발효 시간에 대비하여 저해 활성이 감소하였던 반면, MF36과 LF25는 발효 시간 대비 소폭 증가 후 하락하는 양상을 나타냈으며, MF31의 경우에는 약 50 % 이상의 비교적 높은 thrombin 저해 효과를 나타내는 것으로 확인되었음(Fig. 39)
- Casein 유래 MPRs와 WPC 유래 MPRs의 실험결과를 종합해 봤을 때, WPC 유래 MPRs에서 casein 유래 MPRs보다 더 높은 저해 활성을 나타내는 것으로 확인되었고, 특히 G-WPC를 MF31과 MF36으로 발효 했을 때, thrombin 저해 활성이 더욱 증가하는 것으로 확인되었음
- 이러한 실험 결과는, bioactive peptide의 생성에 의한 것으로 여겨짐. 즉 bio-active compounds가 특정 균주에서는 발효 초반에 생성된 이후 단백질 분해 효소들에 의해 분해되면서 해당 저해 효과가 감소하는 것으로 볼 수 있으며, 발효가 진행될수록 저해활성이 높아지는 균주들의 경우에는 반대로 bio-active compound들이 발효 이후에 생성되게 되기 때문에 이러한 양상들이 나타나는 것으로 추측해볼 수 있으며, 해당 Bio-active compound들의 경우에는 HPLC 또는 FPLC등을 활용한 정제 및 분리, 구조 분석 등을 통하여 그 구조를 파악할 수 있을 것으로 기대됨
- 최종적으로, thrombin 저해 활성은 G-WPC를 MF31과 MF36으로 발효하는 것이 최적 조건임을 확인하였으며, 해당 균주를 이용한 발효물의 MPRs 가수분해 정도를 확인하기 위해 상기 기술한 OPA method를 이용하여 가수분해 정도를 측정하였음

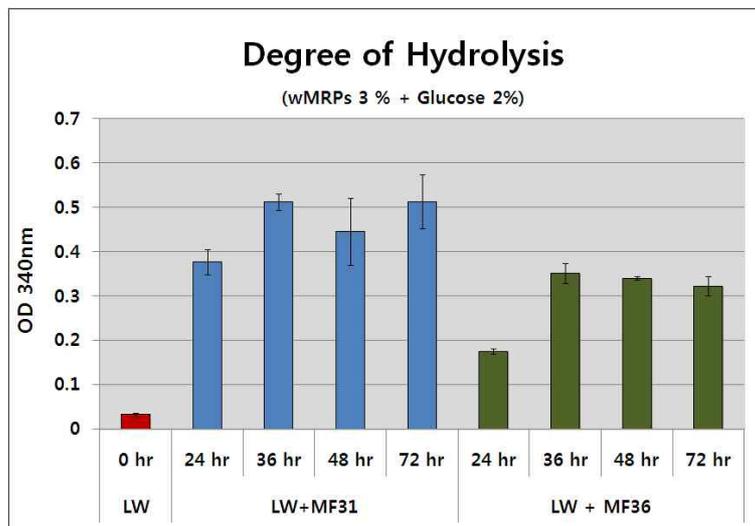


Fig. 40. 발효 시간에 따른 MPRs 가수분해 정도 확인

- G-WPC를 MF31와 MF36으로 발효시킨 경우, 발효전인 0 hr 조건 보다 발효 이후에 OPA 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 MPRs 가 발효에 의해 가수분해 되는 것을 확인할 수 있었음. 또한 두 균주 모두 발효 시간이 지날수록 가수분해도가 증가하는

양상을 보이는 것으로 확인되었음(Fig. 40).

- 이를 통해 최종적으로 WPC 유래 MRPs를 MF31과 MF36으로 발효할 경우, MRPs의 가수분해가 일어나며 이로 인해 생성되는 MRPs 가수분해 물에서 thrombin의 저해활성이 나타나는 것으로 결론지을 수 있음. 또한 thrombin 저해 활성에 의해 심혈관 질환의 예방 및 완화에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

10. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 HMGR 저해 활성 확인(*in vitro*)

가. 실험 방법

- HMG reductase inhibition assay는 cholesterol synthesis 과정 중 다음 반응을 유도하는 HMG-CoA reductase 활성을 억제시켜 cholesterol 합성을 저해시키는 효과가 있는지 확인하는 실험임
- $\text{HMG-CoA} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{mevalonate} + 2\text{NADP}^+ + \text{CoA-SH}$
- HMG-CoA와 NADPH를 기질로 하고 시료를 첨가한 후, HMG-CoA reductase 활성의 억제 정도를 NADP⁺의 흡광도를 통해 측정하였음

나. 실험 결과

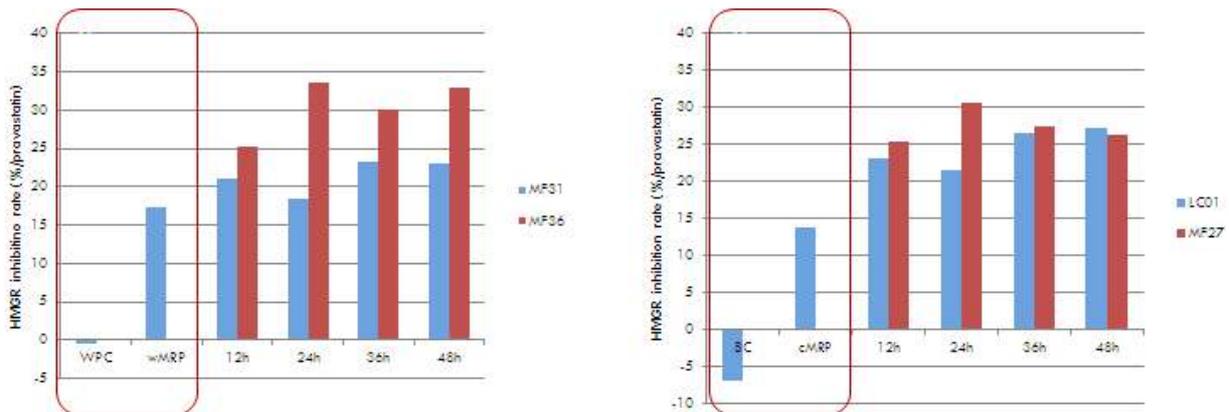


Fig. 41. MRPs 발효 가수분해물의 HMGR 저해 효과 확인

- HMGR 저해 효과 확인 결과, Fig. 23에서와 같이 WPC와 SC 모두 마이알 반응에 의해 저해율이 크게 증가하였음. G-WPC는 약 17.8 %, G-SC는 약 20.7 % 저해율이 증가하였음 (Fig. 41)
- G-WPC와 G-SC 모두 발효에 의해 저해율이 증가했으며, G-WPC는 MF36 발효에 의해 16.2 % 저해율 증가, G-SC는 MF27 발효에 의해 16.9 % 저해율이 증가하였음(Fig. 41)
- 이를 통해 유단백질의 마이알 반응을 통한 MRPs와 이의 발효물은 HMGR 저해 활성을 증

가시키며, HMGR 저해 활성을 통한 인체 내 콜레스테롤의 합성 저하와 심혈관 질환의 예방 및 완화에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

11. 선정된 프로바이오틱스 균주의 동정

- 기능성을 중심으로 선발된 2차년도 균주를 대상으로 16s rDNA를 분리하여 16s rDNA의 상동성을 분석하여 선발된 균주를 동정하였으며 결과는 아래와 같음(Table 11)

Strain	Sequence result (Genus, species)	Homology (%)
MF27	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98 %
MB50	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99 %
MA1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99 %
MF31	<i>Lactobacillus gasseri</i>	98 %
MF36	<i>Lactobacillus gasseri</i>	98 %

Table 11. Sequence results of selected probiotics strains

12. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 콜레스테롤 저해 능력 확인(*in vivo*)

- 동맥경화, 뇌졸중 등의 혈행 장애로 발생하는 심혈관계 질환은 미국, 유럽, 아시아 등 전세계적으로 주요한 사망 원인이 되고 있음. 우리나라에서도 심혈관계질환이 사망원인의 1위를 차지하고 있는 것이 각종 조사 결과 보고되었으며, 한국보건사회연구원의 보고에 따르면 우리나라 국민의 뇌혈관질환 및 혈행 장애 등의 심혈관질환 발병율 및 그로 인한 사망율이 점차 증가하는 추세로 2001년에도 교통사고를 제외한 우리나라 사망율 원인의 1, 2위를 차지하고 있는 것으로 조사되고 있음
- 심혈관계 질환을 유발하는 원인은 식습관, 생활방식, 유전적인 요인 등 여러 가지가 보고되어 있는데 국민 생활수준의 증가 및 선진화가 진전될수록 혈행 장애 등의 발병율은 더 증가하는 경향을 보임
- 최근 동물성 식품의 섭취량이 증가하으며, 특히 동물성 지방의 과다섭취로 인한 동맥경화·심근경색·고압 등과 같은 순환계 질환의 발생 위험이 증가하고 있음. 지방의 과잉섭취는 지질사의 이상을 초래하여 혈액과 조직의 지질성분에 변화를 일으키며 지방간, 고압, 고지혈증, 동맥경화증, 심장질환 등 심계 질환, 유방암과 장암 등에 위험인자로 작용할 수 있음.
- 또한 지방의 과잉 섭취는 세포막의 손상을 초래하게 되는데, 다양한 세포손상은 세포막 지질의 과산화, DNA 변성, 단백질 성분의 손상, 효소 불활성화 등 생체 내 산화 작용과도 연관되어있음

가. 실험 방법

(1) 쥐 model을 이용한 실험디자인 설계

- 본 실험에서는 30마리의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 랫드를 영바이오(한국)에서 구입하여 사용하였음. 1주일간 AIN-76 식이를 기본으로 한 Normal 식이로 적응시킨 후, 5마리씩 6개 그룹으로 분류하여 8주간 실험하였고 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였음. 실험 동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 50~60%를 유지하였음. 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 지침에 준하여 수행하였음
- 실험 동물은 6그룹으로 분류되었으며, 각 그룹에 기본식이에 지방함량과 콜레스테롤 함량이 높은 고지방/고콜레스테롤 식이(20% fat, 0.5% cholesterol)를 하고 그룹별로 각각 다음과 같이 처리함. 사용한 식이 조성은 아래 표와 같음(Table 12)

Table 12. Formula of experimental diets used in the present study

Composition(g/kg)	Normal diet (ND, AIN-76)	High fat/ cholesteroldiet (HD)
Milk casein	200	200
DL-methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	341.46
Cellulose	50	50
Corn oil	50	—
tallow	—	200
Mineral mixture	35	35
Vitamin mixture	10	10
Choline chloride	2	2
Sodium cholate	0.5	0.5
cholesterol	—	5

- 그룹 1은 대조군으로 정상 식이(Normal diet, ND)와 PBS, 그룹 2는 고지방/고콜레스테롤 식이 대조군으로서, 고지방/고콜레스테롤 식이(High fat/high cholesterol diet, HD)와 PBS, 그룹 3은 양성 대조군으로서, 고지방/고콜레스테롤 식이와 statin계열의 약제(simvastatin, 30mg/kg/day), 그룹 4는 고지방/고콜레스테롤 식이와 선발된 probiotics(*L. fermentum* MF27 10^8 CFU/ml), 그룹 5는 고지방/고콜레스테롤 식이와 cMRP(Maillard-reacted sodium caseinate, 1500mg/kg/day), 그룹 6은 고지방/고콜레스테롤 식이와 선발된 probiotics에 의해 발효된 cMRP(Maillard-reacted sodium caseinate fermented by *L. fermentum* MR27, 1500mg/kg/day)를 처리하였음.
- 실험 기간은 총 8주로 실험군은 2주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 하여 고콜레스테롤혈증을 유도한 후, 6주간 샘플들을 처리하여 진행하였음. 이것은 샘플들의 심혈관 질환의 예방 효과와 치료효과를 동시에 확인해 볼 수 있는 디자인으로써 고부가가치의 기능성을 파악해 볼 수 있음

(2) 발효가수분해물 제조

- 2차년도에 설립된 MRPs 배지조성을 바탕으로 제조하였고 선발된 균주(*L. fermentum* MF27)를 10⁸ CFU/ml 접종하여 37℃에서 48시간 배양하였음. 배양이 끝난 후, 10,000rpm에서 30분간 원심분리를 실시하였고 상등액을 분리하여 동결건조를 진행하였음. 배지조성은 아래와 같음(Table 13)

Table 13. Compositions of MRPs medium

Ingredient	조성 (g/L)
Dextrose	20
Beef extract	0.0
Proteose peptone No.3	5
Yeast extract	2.5
Sodium acetate	5.0
Ammonium citrate	2.0
Dipotassium phosphate	2.0
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Tween 80	1.0
MRPs	30

(3) 체중변화 및 식이효율 측정

- 체중은 일주일 간격으로 일정한 시간에 디지털 계량기를 사용하여 측정하였으며, 식이량은 매일 일정한 시간에 측정하였음. 식이효율(feed efficiency ratio)은 ‘8주간의 증체량/8주간의 식이량’으로 계산하였음

(4) 채혈 및 장기 중량 측정

- 실험이 종료되고 모든 실험동물을 심장 천공법에 의해 혈액을 채취하였고 채취한 혈액은 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 뒤 -20℃에서 냉동 저장, 보관하며 실험에 사용함. 또한 간과 심장, 대동맥을 적출하여 무게를 측정하여 비교하였음

(5) 혈청 내 지질함량과 간 기능 지표 효소 함량 측정

- 혈청 지질 인자인 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TC), high density lipoprotein(HDL)-콜레스테롤(HDL-C), low density lipoprotein(LDL)-콜레스테롤(LDL-C)의 농도를 혈청 생화학 분석기(Bayer Express 550; Bayer, USA)를 사용하여 측정하였음
- 분리된 혈장 중 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)의 활성도 측정을 위해서 한국 국내에서 가장 널리 사용되고 있는 Reitman-Frankel법에 의해 조제된 진단용 kit를 사용하여 Magellan software(version 6, TECAN, Austria)로 505nm에서 흡광도를 측정하였음
- 간 기능을 알아보기 위해 혈액 중 AST(Aspartate aminotransferase)와 ALT(Alanine aminotransferase)를 분석하였음. AST와 ALT는 간세포에 다량 존재하는 효소이며 간 손

상 시 세포외로 다량 유출되어 혈액 중에 증가함으로써 간 손상의 지표로 이용됨(Yang S *et al*, 2006). AST는 심장, 간, 골격, 신장, 뇌 및 췌장 등에 분포하며 간염, 폐쇄성 황달 등의 간질환 외에도 심근경색, 진행성근이영양증에서 상승하다고 보고되어 있음(Forsythe WA *et al*, 1980). ALT는 혈중으로 유리되기 쉬운 구조를 가졌으며 심근, 간, 근육 및 혈구 등에 다량 존재함

(6) 간 조직에서 지질대사와 항산화 관련 단백질의 mRNA 발현

- 70°C 냉장고에 보관해 놓았다가 고르고 잘게 다지고 으갠 0.2g간 조직을 GeneJET RNA Purification Kit(Fermentas,m, Burlington, ON, Canada)를 이용하여 RNA을 추출 하였음. 최종 RNA 농도는 NanoDrop 2000 spectrophotometer(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA)을 이용하여 측정하였으며 최적의 RNA sample을 이용하기 위해 260nm와 280nm에서 측정된 O.D.값의 ratio를 가지고 RNA의 purity가 1.8에서 2.1사이에 있는 sample만 사용하였음. cDNA는 cDNA synthesis kit(LeGene Biosciences, San Diego, DA, USA)에 의해 합성되었고 85°C에서 5분간, 45°C에서 50분간 incubation되었음
- Reverse Transcriptase PCR(RT-PCR)에 사용되는 Primer set는 아래 표와 같음(**Table 14.**). PCR product는 1.5% agarose gel과 ethidium bromide staining을 이용하여 electrophoresis를 통해 가시화되었음. 각 밴드의 강도는 Kodak DC290 zoom digital camera와 Kodak 1D image analysis software(Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)를 이용하여 분석되었으며 각 유전자의 mRNA 발현 정도는 housekeeping gene 인 beta-actin의 발현량으로 보정하였음.

Table 14. Oligonucleotide primer sequences and product sizes

Gene	Sequence(5'-3')		Product size	Annealing Temp.	Accession number
CAT	F	ATTGCCGTCCGATTCTCC	411bp	54.3	NM_01252
	R	CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG		56.3	0.2
GSH-Px1	F	GTCCACCGTGTATGCCTTC	452bp	57.1	NM_03082
	R	CTCTTCATTCTTGCCATTCTCC		56.3	6.3
SOD2	F	GACCTGCCTTACGACTATG	119bp	54.9	NM_01705
	R	TACTTCTCCTCGGTGACG		54.3	1.2
CYP7A1	F	CACCATTCCTGCAACCTT	170bp	52.1	NM_01294
	R	GTACCGGCAGGTCATTCA		54.3	2.2
HMGR	F	GCTTGAGCATCCTGACATAC	203bp	55.4	NM_01313
	R	GAACCATAGTCCCACGTCT		57.5	4.2
LDLR	F	ACCGCCATGAGGTACGTAAG	421bp	57.5	NM_17576
	R	GGGTCTGGACCTTTCTCTC		57.5	2.2
β-actin	F	AGCCATGTACGTAGCCATCC	411bp	57.5	NM_03114
	R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG		57.5	4.3

(7) 간 조직의 병리조직학적 분석

- 적출한 간을 10% formalin 용액에 고정하였고, 수세 및 탈수 과정을 거쳐서 paraffin block을 만든 후, 박절하여 H&E(haematoxylin-eosin)염색과 Oil red O 염색을 하였음. 광학 현미경으로 100배의 배율에서 관찰하였음.

(8) 통계처리

- 본 연구의 실험 결과는 SPSS 프로그램(Statistical Package for the Social Sciences)을 이용하여 각 실험군의 평균값과 표준오차로 계산되었고 ANOVA 분석 후, Duncan's multiple range test에 의해 실험군 각 군 간의 차이를 검증하고, α값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였음

나. 실험결과

(1) 체중변화 및 식이효율, 장기 중량

- 8주간의 체중변화는 Table 15에 나타내었음. 정상 식이그룹에 비하여 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹의 체중은 유의적으로 증가하였음. 그에 비해, 고지방/고콜레스테롤 식이와 함께 Simvastatin(SV), *L. fermentum* MF27(MF27), cMRP, F-cMRP를 처리한 그룹에서는 정상 대조군과 유의적 차이가 없었음. 특히, F-cMRP를 처리한 그룹은 고지방/고콜레스테롤 식이 대조군에 비해 효과적으로 체중이 감소한 것을 확인할 수 있었음

Table 15. Body weight

	Initial weight(g)	Final weight(g)
ND	153.1±5.11 ^a	440.8±12.36 ^b
HD	148.4±4.12 ^a	495.2±16.68 ^a
SV	153.6±3.78 ^a	483±30.58 ^{ab}
MF27	155±3.32 ^a	465.6±31.75 ^{ab}
cMRP	151.8±6.98 ^a	454.3±42.19 ^{ab}
F-cMRP	151.7±4.27 ^a	442.3±44.36 ^b

Values are means ±SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly defferent(P<0.05)

- 실험 동물의 식이효율은 Table 16에 나타내었음. 고지방/고콜레스테롤 사료의 식이효율은 정상 사료의 식이효율에 비해서 높게 나타났으며, 고지방/고콜레스테롤 식이를 하면서 Simvastatin(SV)과 *L.fermentum* MF27(MF27), cMRP를 처리한 그룹은 정상 식이 그룹 보다는 높지만 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 보다는 낮은 경향을 보이고 있고 F-cMRP 를 처리한 그룹은 정상 식이 대조군과 유의적 차이가 없음. 이를 통해 식이효율에 있어서 그룹 간 큰 유의적 차이는 없다는 것을 확인 하였고, 제조된 식이와 사육 환경에는 문제가 없다는 것을 알 수 있음

Table 16. Feed efficiency ratio(FER).

	FER
ND	0.23±0.01 ^c
HD	0.29±0.01 ^a
SV	0.26±0.01 ^b
MF27	0.26±0.02 ^b
cMRP	0.27±0.01 ^b
F-cMRP	0.24±0.01 ^c

Values are means ±SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly different(P<0.05)

- 실험동물의 조직 중량 결과 심장과 대동맥의 중량에서는 모든 그룹에서 유의적 차이가 없었으나, 간의 중량에서는 정상 식이 그룹에 비해 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹의 중량이 증가하였음. 이것은 고지방/고콜레스테롤 식이에 의해서 간에 지질이 축적되었다는 것을 알 수 있고 sample을 처리한 그룹의 간 중량은 정상 식이 대조군과 유의적 차이가 없는 것을 보았을 때, sample에 의해서 지질 축적이 완화되었다는 것을 유추해 볼 수 있음(Table 17)

Table 17. Organ weight.

	ND	HD	SV	MF27	cMRP	F-cMRP
Heart	1.34±0.06 ^a	1.37±0.05 ^a	1.33±0.09 ^a	1.33±0.10 ^a	1.39±0.04 ^a	1.37±0.10 ^a
Aorta	0.36±0.04 ^a	0.36±0.03 ^a	0.33±0.04 ^a	0.31±0.10 ^a	0.34±0.04 ^a	0.33±0.01 ^a
Liver	14.46±0.80 ^a	18.00±0.61 ^b	15.32±0.58 ^a	15.09±0.09 ^a	14.26±1.30 ^a	14.15±0.81 ^a

Values are means ±SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly different(P<0.05).

(2) 혈청 내 지질함량과 간 기능 지표 효소 함량 측정

- 혈액 내 지질대사를 알아보기 위해 혈청 내 총 지질, 중성지방, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량을 분석하였음(Fig. 42). 총 지질의 농도는 대조군인 정상 식이 그룹이 88.0±6.4 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹이 107.8±10.2 mg/dl으로 혈중에 총 지질 농도가 월등히 증가한 것을 알 수 있음(Fig. 42)
- 반면에 실험군에서 양성 대조군인 Simvastatin을 처리한 그룹은 70.8±9.3 mg/dl, MF27 그룹은 87.5±1.7 mg/dl, cMRP그룹은 70.8±2.2 mg/dl, F-cMRP그룹은 71.8±4.1의 결과를 보이고 있으며 이것은 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹에 비해 상당히 감소된 수치를 나타내었음(Fig. 42)
- 중성지방의 농도에서는 정상식이 그룹 116.3±30.7 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹

194.3±26.1 mg/dl, Simvastatin 그룹 57.0±9.4 mg/dl, MF27 그룹 149.0±25.2 mg/dl, cMRP 그룹 165.3 mg/dl, F-cMRP 그룹 106.0±32.0 mg/dl의 결과를 보이고 있으며, Simvastatin 그룹이 가장 낮은 수치의 결과를 나타내었고 MF27 그룹과 F-cMRP 그룹은 정상 식이 그룹과 유의적 차이가 없었음(Fig. 42)

- HDL-콜레스테롤 수치의 농도는 정상 식이 그룹 97.0±9.7 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 60.5±6.5 mg/dl, Simvastatin 그룹 73.8±7.4 mg/dl, MF27 그룹 64.3±6.1 mg/dl, cMRP 그룹 59.8±6.2 mg/dl, F-cMRP 그룹 57.3±3.3 mg/dl의 결과를 나타내었으며 정상 식이 그룹의 수치가 가장 높았고 나머지 그룹에서는 유의적 차이가 없었음(Fig. 42)
- LDL-콜레스테롤 결과에서는 정상 식이 그룹 8.5±1.9 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 46.7±6.1 mg/dl, Simvastatin 그룹 25.8±5.3 mg/dl, MF27 그룹 16.0±2.9 mg/dl, cMRP 그룹 15.3±1.9 mg/dl, F-cMRP 그룹 14.3±3.8 mg/dl의 수치를 보였으며 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹이 가장 높은 반면에 Simvastatin 그룹과 MF27 그룹, cMRP 그룹에서 감소된 수치를 나타냈으며 F-cMRP 그룹에서 가장 많이 감소하여 정상 식이 대조군과 유의적 차이가 없었음(Fig. 42)

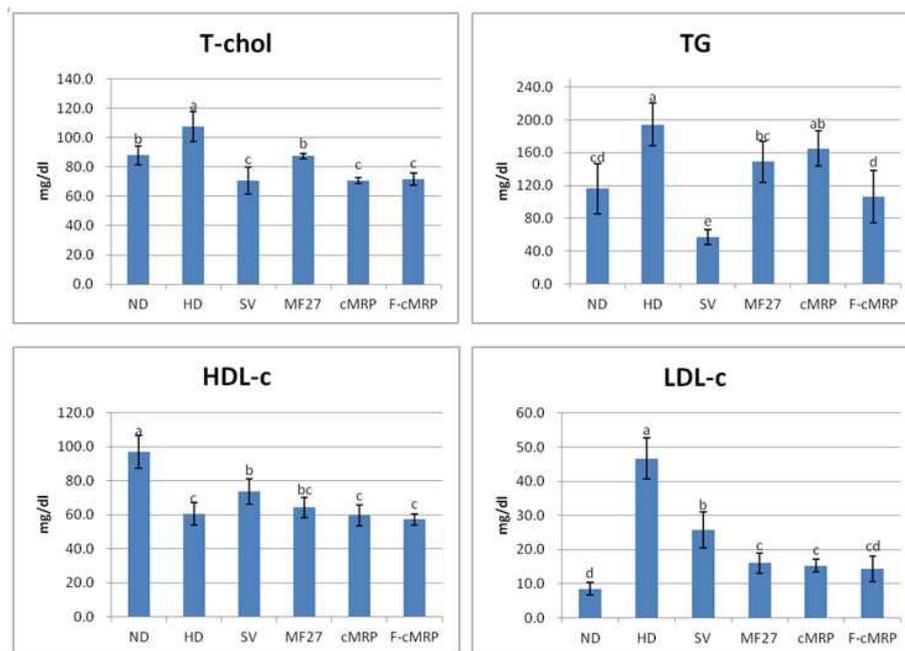


Fig. 42. Serum analysis of rats fed by experimental diet

Values are means ±SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly different (P<0.05).

ND: Normal diet + PBS, HD: High fat/high cholesterol diet + PBS, SV: HD + simvastatin, MF27: HD + *Lactobacillus fermentum* MF27, cMRP: HD + Maillard-reacted sodium caseinate, F-cMRP: HD + cMRP fermented by *L. fermentum* MF27

- 간 기능을 알아보기 위해 혈액 중 AST(Aspartate aminotransferase)와 ALT(Alanine

aminotransferase)를 분석하였음(Fig. 43). 혈청 내 AST의 농도는 정상 식이 그룹 81.8 ± 12.3 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 123.5 ± 11.5 mg/dl, Simvastatin 그룹 128.0 ± 13.5 mg/dl, MF27 그룹 135.0 ± 16.0 mg/dl, cMRP 그룹 122.3 ± 12.9 mg/dl, F-cMRP 그룹 100.8 ± 7.5 mg/dl의 결과를 나타내었고 특히 F-cMRP를 처리한 그룹의 수치가 정상 식이 그룹과 유의적 차이가 없는 결과를 보였음(Fig. 43)

- 혈청 내 ALT의 농도에서는 각각 정상 식이 그룹 25.3 ± 1.7 mg/dl, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 34.3 ± 4.0 mg/dl, Simvastatin 그룹 40.3 ± 11.2 mg/dl, MF27 그룹 28.8 ± 2.6 mg/dl, cMRP 그룹 28.3 ± 1.3 mg/dl, F-cMRP 그룹 19.8 ± 1.5 mg/dl의 수치를 보였으며 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹과 Simvastatin 그룹, MF27 그룹, cMRP 그룹 사이의 유의적 차이는 없었음. 하지만 F-cMRP 그룹의 결과에서는 정상 식이 그룹과 유의적 차이가 없었고 이것은 간의 손상이 가장 개선되었다는 것을 알 수 있음(Fig. 43)

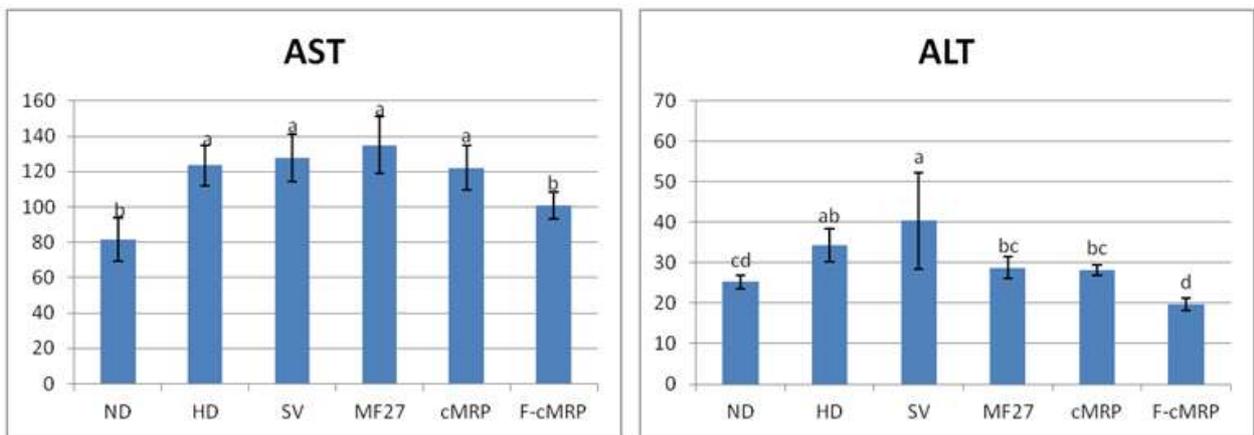


Fig. 43. Serum analysis of rats fed by experimental diet

Values are means \pm SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly different (P<0.05).

ND: Normal diet + PBS, HD: High fat/high cholesterol diet + PBS, SV: HD + simvastatin, MF27: HD + *Lactobacillus fermentum* MF27, cMRP: HD + Maillard-reacted sodium caseinate, F-cMRP: HD + cMRP fermented by *L. fermentum* MF27

(3) 간 조직에서 지질대사와 항산화 관련 단백질의 mRNA 발현

- 간 조직에서 지질대사와 항산화 관련된 단백질의 mRNA 발현을 알아보았음. 지질대사와 관련한 유전자로는 HMG-CoA reductase, CYP7a1, LDL-receptor, 항산화 관련한 유전자는 SOD, GSH-Px, CAT의 발현 정도를 각 그룹 사이에서 비교하였음
- 간에서 콜레스테롤 생합성 경로의 조절효소인 Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoA reductase)는 생체 내에서 콜레스테롤의 합성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 효소이며, HMG-CoA reductase의 활성이 저하되면 LDL-receptor(Low density lipoprotein receptor)의 활성이 증가하여 혈청 콜레스테롤 농도가 감소하게 됨 (Brown MS *etal*,1973)
- LDL-Receptor는 세포막에 존재하는 단백질로 혈중의 LDL-cholesterol을 세포내로 흡수

하는 역할을 하며 CYP7A1 (Cholesterol 7 α -hydroxylase 1)는 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 분해시키는 과정의 속도제한 효소로서 콜레스테롤을 담즙산으로 배설을 증가시키는 역할을 함

- 본 연구에서 HMG-CoA reductase의 발현은 정상 식이 그룹과 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹 간 유의적 차이가 없었고 Simvastatin 그룹과 MF27 그룹에서 가장 낮은 결과를 나타내었음. F-cMRP 그룹에서는 정상 식이 그룹과 유의적 차이가 없었으며 cMRP 그룹에서는 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹과 유사한 결과를 보였음. CYP7a1 발현의 경우, 정상 식이 그룹에 비해 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹이 발현 정도가 낮았으며 cMRP 그룹과 F-cMRP 그룹의 경우 발현 정도가 정상 식이 그룹과 유의적 차이가 없었음. LDL-receptor의 발현 결과도 CYP7a1 발현의 결과와 같은 경향을 보이고 있음(Fig. 44, Fig. 46)
- 산화스트레스란 체내에서 산화 촉진물질(pro-oxidant)과 산화 억제물질(anti-oxidant)사이의 균형이 깨어져 산화촉진 쪽으로 기울어지는 교란 상태로 잠재적인 산화 손상을 야기시킬 수 있는 상태를 의미하며 이는 세포에 치명적인 손상을 주는 것으로 알려져 있음(Reed, 1990). 또한 산화적 스트레스에 의해 DNA가 손상을 입으면 염기배열에 문제가 발생하므로 다른 유전정보가 전달되어 돌연변이를 유발시키고 세포를 병들게 하여 암을 유발시킬 수도 있음(Lovlin et al., 1987)
- 정상시에는 산화제로 작용하는 이들의 수준이 항산화제와 균형을 이루고 있지만 식사를 통한 항산화 영양소들의 섭취가 부족 되거나 체내에서 과산화물 및 ROS가 과잉 생산되면 균형이 깨어짐(이은숙, 2002) 생명체는 활성산소로부터 생체를 스스로 보호하기 위한 방어체계를 가지고 있는데 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxide(GSH-Px), catalase(CAT), glutathione S-transferase(GST), glutathione reductase(GR) 등의 효소적 항산화계와 비타민 C, 비타민 E, selenium 등의 비효소적 항산화계가 존재하고 있음
- SOD는 아연과 구리를 갖는 금속함유 효소로서 세포내에서 생성된 superoxide radical은 SOD에 의해 일차적으로 H₂O₂로 전환하는 작용을 하며, 여러 연구 결과, 비만인 사람의 SOD 활성이 유의적으로 낮게 나타났음
- Catalase와 GSH-Px는 생성된 H₂O₂를 무독한 H₂O로 분해하는 효소로 작용하며, 조직을 과산화적 손상으로 보호해주게 되고 동물 세포에서 간과 신장에 높게 분포되어 있음(Harris, 1992). GSH-Px는 살아있는 세포의 과산화물 독성치료 메커니즘을 제공하는 것으로 과산화물 분해를 촉진하는 free radical의 작용으로 생기는 세포 손상을 보호하는 효소임
- 본 연구에서 항산화 관련한 단백질의 mRNA 발현을 측정한 결과, SOD의 경우 정상 식이 그룹과 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹, MF27 그룹 간의 유의적 차이가 없었고 가장 낮은 수치를 보이고 있음. 하지만 Simvastatin 그룹과 cMRP 그룹의 발현은 그보다 높은 수치를 나타내었고 F-cMRP의 SOD 발현 정도가 유의적으로 가장 높게 측정되었음. GSH-Px 발현 정도는 6개의 모든 그룹에서 유의적 차이를 보이지 않았고 CAT의 경우는 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹이 유의적으로 가장 낮은 발현량을 나타내었고 나머지 그룹에서는 그보다 높은 결과를 보였으며 그룹간 유의적 차이를 보이지 않았음(Fig. 45, Fig. 46.).

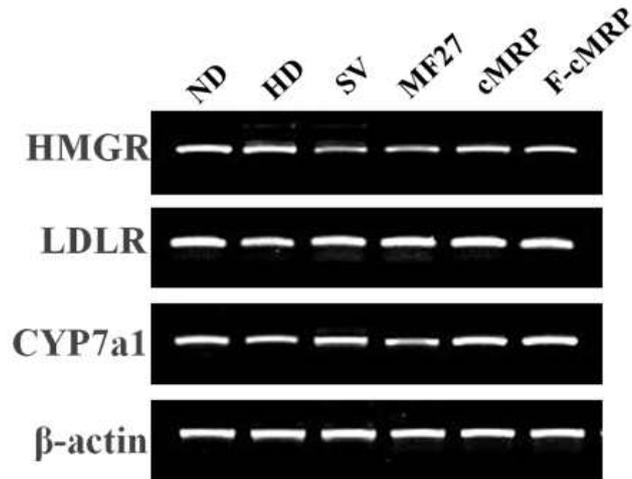


Fig. 44. Hepatic mRNA expression by RT-PCR in different groups

HMGR: hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, CYP7A1: cholesterol 7a-hydroxylase1, LDLR: low density lipoproteins receptor.

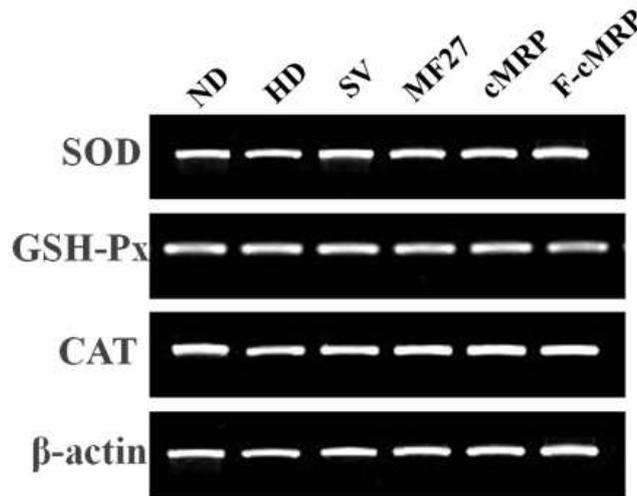


Fig. 45. Hepatic mRNA expression by RT-PCR in different groups

SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, CAT: catalase.

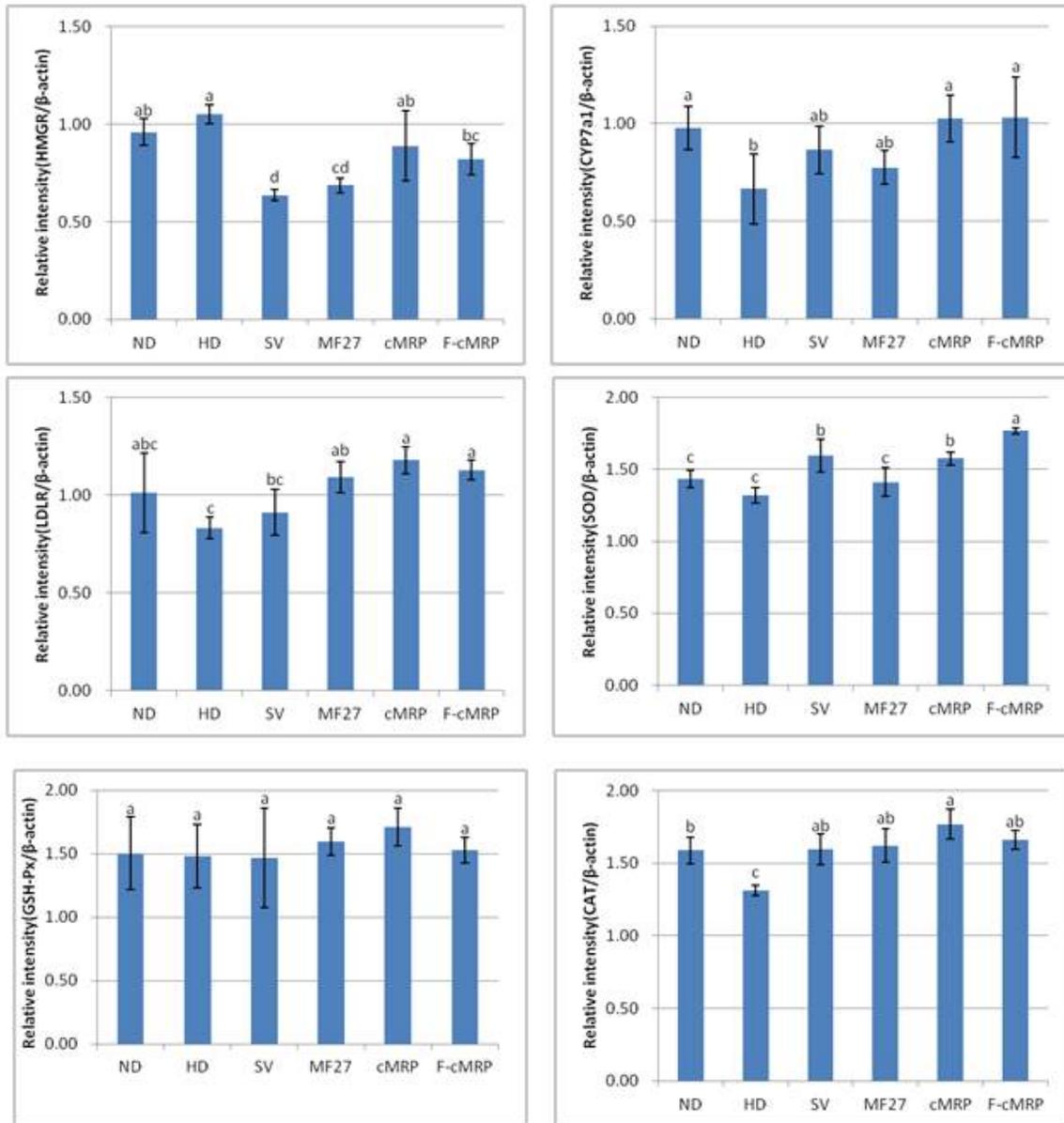


Fig. 46. Relative mRNA levels of gene expression in liver of rats
 HMGR: hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, CYP7A1: cholesterol 7 α -hydroxylase1, LDLR: low density lipoproteins receptor, SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, CAT: catalase.

(4) 간 조직의 조직병리학적 분석

- 본 연구에서 발효를 통한 MRPs 가수분해물이 간 조직에 미치는 영향을 조직병리학적으로 분석하기 위해 H&E 염색과 Oil red O 염색을 진행하였음
- 간 조직의 H&E 염색 결과, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹에서 간 조직 실질 내에 다량의 하얀 방울의 형태를 가진 구들이 현저하게 관찰되었고 이것은 지방 공포들로 유추할 수 있음. 반면에, Simvastatin과 MF27, cMRP, F-cMRP를 처리한 그룹에서는 고지방/고콜레스

테롤 식이 그룹에 비하여 정상 식이 그룹과 유사한 수준으로 간 조직이 개선된 것을 광학 현미경 상에서 관찰할 수 있음(Fig. 47)

- 간 조직의 H&E 염색 결과에서 나타난 하얀 방울의 구들이 지방 공포로 구성되어 있는지를 확인하기 위해 Oil red O 염색을 실시하였음
- 간 조직의 Oil red O 염색 결과, 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹에서 적색으로 염색된 지방 축적이 확연하게 관찰되었고 반면에, Simvastatin과 MF27, cMRP, F-cMRP 처리에 의해 지방 축적이 억제되었음을 확인하였음(Fig. 48)

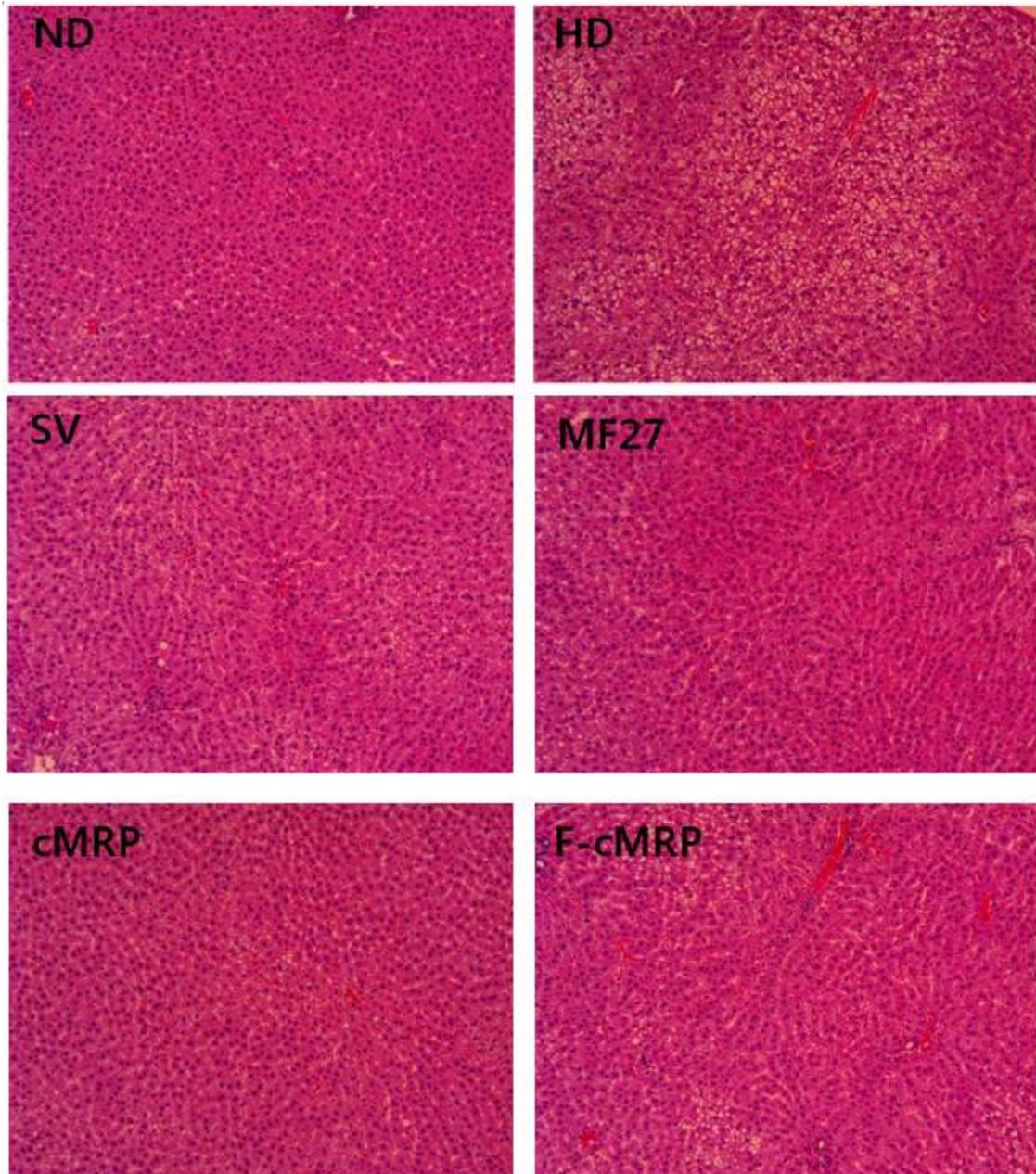


Fig. 47. Histological examination of liver by H&E staining in different groups(magnification, x100)

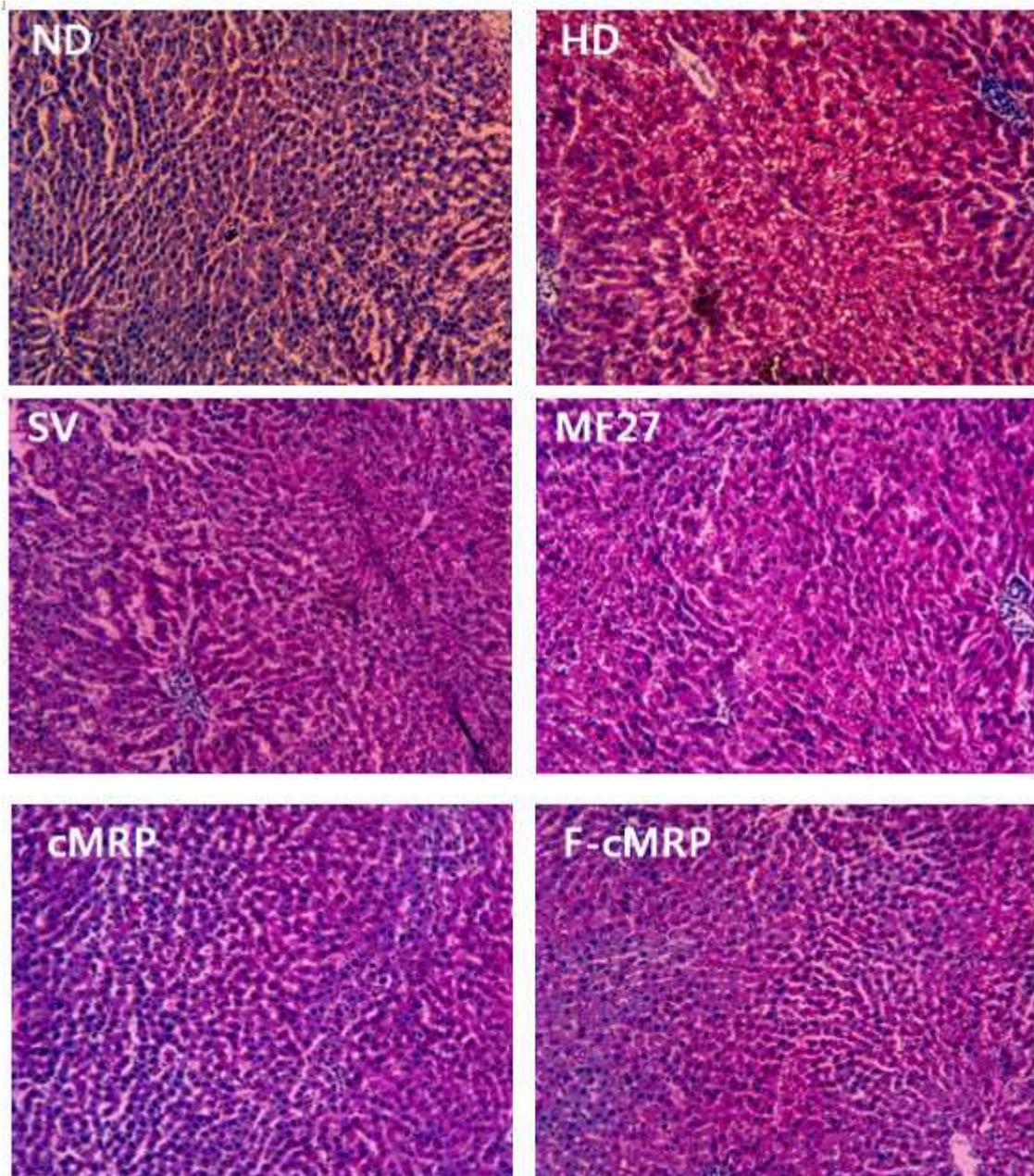


Fig. 48. Histological examination of liver by Oil red O staining in different groups(magnification, x100)

13. 마이알반응 생성물 발효 가수분해물의 트롬빈 저해 활성 확인(*in vivo*)

- 혈전증은 생체내의 심혈관 및 혈관 내에서 혈액의 응고, 즉 혈전이 형성된 것으로 혈액이 혈관계 내를 흐르는 동안 생리적 손상을 받을 경우 혈액 성분의 하나인 혈소판이 침착하는 기전으로부터 발생됨. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며, 정상적으로 순환되는 동안에는 혈전이 형성되지 않음
- 그러나 여러 가지 병적인 요인으로 인해 균형이 깨지게 되면, 혈액의 흐름이 원활하지 못하게 되고 이로 인한 심혈관계 질환이 발생하게 됨. 따라서 혈액의 기능적 이상 및 순환 이상

발생은 다양한 혈관계 질환을 유발하게 되며, 이러한 기능 및 순환 장애가 뇌 및 심장 등에서 나타나는 경우, 생명에 치명적이 되며, 그 후유증 또한 심각함

- 최근 우리나라에서도 경제수준의 향상으로 인하여 고영양, 고단백 등 식생활 양상의 변화에 따라 선진국과 같이 심혈관계 질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가하고 있음. 우리나라의 사망 및 사망원인에 대한 통계결과를 보면, 암·뇌혈관질환·심장질환 순으로 나타났음. 이를 단일 질환별 사망률로 보면, 순환계 질환이 가장 앞서며 또한 지난 10년간 추이를 살펴봐도 여전히 심혈관계 질환이 주요 사망원인별 사망률 1위를 유지하고 있음.
- 현재까지 혈전질환의 예방 및 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 그리고 이미 형성된 혈전을 용해하는 혈전용해제 등으로 나누어져 있음. 특히 항혈소판제의 대표적인 약물로 사용되고 있는 아스피린은 항응고 효과가 탁월하지만 위장 장애 등의 부작용을 일으키며, 그 외에 항응고제로 사용하고 있는 헤파린이나 쿠마린 등은 너무 고가의 약물이기 때문에 손쉽게 사용하기 어려움
- 따라서 약물의 부작용을 줄이면서도 동일한 효능을 보이는 물질을 찾기 위하여 천연물 또는 한방처방으로부터 혈액순환 개선 작용을 하는 물질에 대한 탐색 연구가 활발히 진행되고 있음

가. 실험 방법

(1) 쥐 model을 이용한 실험디자인 설계

- 본 실험에서는 60마리의 수컷 ICR계 흰쥐 마우스를 영바이오(한국)에서 구입하여 사용하였음. 1주일간 AIN-76 식이를 기본으로 한 정상 식이로 적응시킨 후, 15마리씩 4개 그룹으로 분류하여 1주간 실험하였고 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였음. 실험 동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고 온도는 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 50~60%를 유지하였음. 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 지침에 준하여 수행하였음
- 실험 동물은 총 4그룹으로서 그룹 1은 대조구로 정상 식이(Normal diet, ND)와 PBS, 그룹 2는 양성 대조구로 정상 식이와 혈전증 치료제인 Aspirin을 처리한 그룹, 그룹 3은 wMRP(Maillard-reacted whey protein concentration, 1500mg/kg/day)를 처리한 그룹, 그룹4는 선발된 probiotics에 의해 발효된 wMRP(wMRP fermented by *L. gasseri* MF31)를 처리한 그룹임
- Sample 제조는 2차년도에 설립된 배지 조성을 바탕으로 제조 되었음. 즉, MRPs solution (MRPs 3% + glucose 2%) 상에서 기존에 선발된 균주(*L. gasseri* MF31)를 10^8 CFU/ml 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하였음. 발효가 끝난 후, 10,000rpm에서 30분간 원심분리를 실시하였고 상등액을 분리하여 동결건조를 진행하였음

(2) Tail bleeding time 측정

- 마우스의 tail bleeding time은 Hornstra법(Hornstra, G.etal,1981)을 수정하여 측정하였음. 마우스에 PBS, Aspirin, 그리고 wMRP 1500 mg/kg, F-wMRP 1500 mg/kg을 7일간 각각 경구투여 하였으며 마지막 투여 후 60분이 되었을 때 ketamin hydrochloride(75 mg/kg)으로 마취시키고 마우스의 꼬리 끝으로부터 4mm 되는 부분을 surgical blade로 자르고 꼬리의 나머지 부분을 37°C 의 생리식염수에 직각으로 담갔음. Bleeding time은 꼬리

를 자른 시간부터 측정하여 bleeding이 처음 멈춘 시간 까지를 기준으로 하여 측정하였음

(3) Anti-thrombotic assay 측정

- 마우스의 혈전 유발 억제에 대한 실험을 DiMinno와 Silver의 방법을 수정하여 진행하였음. ICR 마우스에 sample을 PBS 0.3ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 하루에 1회씩 7일간 경구투여를 하였고 실험동물을 실험 전 12시간 절식시킨 후 sample 경구투여 90분 후에 collagen과 epinephrin 혼합용액인 collagen (7.91ug/mouse) + epinephrin (0.91ug/mouse) / 200ul saline 을 꼬리정맥에 주입하였음. 주사한 후 혈소판 응집시약으로 인한 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물을 백분율로 계산하였으며 여기서 마비는 15분간 뒷다리의 마비의 지속, 또는 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림상태가 지속될 때를 기준으로 하였음.

나. 실험 결과

(1) Tail bleeding time 측정 결과

- 혈소판과 혈장인자들 그리고 혈관과 연관된 hemostatic plug가 형성되는 능력을 측정하기 위하여 tail bleeding time을 측정하였음. wMRP와 F-wMRP를 7일간 경구투여 후 마우스 tail bleeding time system을 이용하여 혈행개선 효과를 시험하였음. PBS를 투여한 대조군의 경우, 86.85±11.11초의 결과를 보였으며 양성 대조군인 Aspirin을 처리한 그룹에서는 50mg/kg을 투여하였을 때, 239.71±30.39초로 연장되었음. wMRP와 F-wMRP를 처리한 그룹의 결과, 1500mg/kg 투여하였을 때, 각각 250±51.96초, 184.28±24.22초로 연장되었고 Aspirin을 처리한 그룹과 유의적 차이가 없는 결과를 보였음(Table 17).

Table 17. Mouse tail bleeding time

Treatment	Doses	Bleeding time(sec)
PBS (control)	10ml/kg/day	86.85±11.11 ^b
Aspirin	50mg/kg/day	239.71±30.39 ^a
wMRP	1500mg/kg/day	250±51.96 ^a
F-wMRP (MF31)	1500mg/kg/day	184.28±24.22 ^a

Values are means ±SD, n=5, Values within the same column bearing different superscripts are significantly different(P<0.05).

(2) Anti-thrombotic assay 결과

- 마우스를 이용하여 혈전유발 억제능을 측정한 결과, PBS를 투여한 대조군의 경우 15분 이내 회복되는 비율이 14.2%였으며, Aspirin을 투여한 양성 대조군의 경우에는 86.6%의 결과를 보였음(Table 18). 실험군인 wMRP와 F-wMRP를 1500mg/kg 투여하였을 때, 각각 86.6%, 93.3%의 회복율을 나타냈고 이것은 Aspirin과 비슷한 증상 개선 효과가 있는 것으로 판단됨

- 본 연구에서 사용된 sample이 Aspirin과 같은 약물이 아니고 또한 아스피린이 갖는 사용상의 제한점인 소화성 궤양 또는 신장애 환자들은 사용하기 어려운 점 등을 고려하면 본 wMRP 시료와 프로바이오틱스에 의해 발효된 F-wMRP시료가 항혈전 또는 혈전 예방 소재로서 개발 가능성이 있는 것으로 생각됨

Table 18. Inhibitory effect of samples on collagen/epinephrine thrombotic death in mouse

Sample	Doses	No.killed or paralyzed /no.tested	Protection(%)
PBS (control)	10ml/kg/day	12/14	14.2
Aspirin	50mg/kg/day	2/15	86.6
wMRP	1500mg/kg/day	2/15	86.6
F-wMRP (MF31)	1500mg/kg/day	1/15	93.3

(3) 결론

- 고지방/고콜레스테롤 식이로 비만과 고콜레스테롤혈증을 유도한 동물모델을 이용하여 프로바이오틱스를 통한 마이알반응 생성물 발효가수분해물(F-cMRP)의 기능성을 확인하였음
- 프로바이오틱스를 통한 마이알반응 생성물 발효가수분해물을 처리한 그룹(F-cMRP)이 고지방/고콜레스테롤 식이를 처리한 그룹에 비하여 체중과 장기 중량이 감소된 것을 확인하였고 혈청 내 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 그리고 중성 지방의 함량이 유의적으로 낮게 관찰되었음
- 또한 간 조직에서 지질대사와 관련한 단백질의 mRNA발현에서 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹과 비교했을 때, HMG-CoA reductase의 발현이 낮게 측정되었고 반대로 LDL-receptor와 CYP7a1의 발현정도는 정상식이 그룹과 유의적으로 차이가 없는 결과를 나타내었음. 항산화 관련한 단백질의 mRNA발현에서도 SOD와 Catalase의 발현이 유의적으로 높게 측정된것을 확인하였음
- 조직병리학적인 분석을 통해 간 조직의 실질 내 고지방/고콜레스테롤 식이 그룹에서 다량의 지방공포들이 관찰되었고 프로바이오틱스를 통한 마이알반응 생성물 발효가수분해물(F-cMRP)를 처리한 그룹에서는 지방공포들이 현저하게 감소된 것을 확인하였음
- 혈행 기능 개선 효과를 확인하기위해 진행된 tail bleeding time 측정과 anti-thrombotic assay를 진행한 결과, 프로바이오틱스를 통한 마이알반응 생성물 발효가수분해물(F-cMRP)을 처리한 그룹이 양성 대조군으로 이용된 아스피린을 처리한 그룹과 유사한 결과를 보였음
- 즉, 프로바이오틱스를 통한 마이알반응 생성물 발효가수분해물(F-cMRP)이 항산화 및 심혈관 보호 효과를 가지고 있으며 유용한 생리활성물질로 판단됨. 향후 관련하여 지표물질의 명확한 분리 정제 및 규명에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨

제 3 절. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 및 마이알반응 가수분해물의 면역 조절 효과 확인

[2협동 : 고려대학교 이광원]

1. 유당과 유단백질을 이용한 마이알반응 생성물의 최적 반응 조건 확립

가. 실험방법

- 유단백질 (sodium caseinate (C), whey protein concentrate (WPC))은 주관연구기관인 서울우유로부터 제공받아 실험에 사용하였으며, 유당 (Lactose (L))은 sigma- aldrich로부터 구입하여 실험에 사용하였음
- 다음 요인을 변수로 두어 최적 반응 조건을 확인하였음. 반응 용매에 따른 Glycated Products with Milk Protein-Lactose (GPML)의 생성 정도 비교하기 위해, 반응 용매를 distilled water (DW)와 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 7.4)로 하여, 유단백질과 유당을 1:2의 비율로 섞어주고 동결건조를 한 뒤 얻은 고체 상태의 시료를 KBr을 이용하여 습도를 79%로 맞춘 55°C의 인큐베이터에서 7일간 반응하였음 (Table 1). 반응 방법에 따른 GPML의 생성 정도 비교하기 위해, 반응 방법을 고체와 액체로 하여 반응하였음. 고체 반응 방법은 유단백질과 유당을 1:2의 비율로 0.1 M SPB (pH 7.4)에 넣어 섞어주고 동결건조를 한 뒤 얻은 고체 상태의 시료를 KBr을 이용하여 습도를 79%로 맞춘 55°C의 인큐베이터에서 7일간 반응하였음. 액체 반응 방법은 유단백질과 유당을 1:2의 비율로 섞어주고 55°C의 shaking waterbath에 넣고 60 rpm으로 7일간 반응하였음 (Table 2). 반응 용질의 비율에 따른 GPML의 생성 정도 비교하기 위해, 유단백질과 유당의 비율을 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5로 하여 섞어주고 액체 상태로 55°C의 shaking waterbath에 넣고 60 rpm으로 7일간 반응하였음 (Table 3). 이 시료들을 반응 날짜별로 일부를 취해 Fluorescence를 측정하는데 사용하였음

Table 1. Condition of glycation on reaction solvent

	C or WPC	L+C or L+WPC	C or WPC	L+C or L+WPC
Protein : Lactose	1 : 0	1 : 2	1 : 0	1 : 2
Reaction solvent	DW		0.1 M SPB (pH 7.4)	
Glycation	Dry state Humidity : 79% Temperature : 55°C Incubation time : 7 days			

Table 2. Condition of glycation on reaction states

	C or WPC	L+ C or L+ WPC	C or WPC	L+ C or L+ WPC
Protein : Lactose	1 : 0	1 : 2	1 : 0	1 : 2
Reaction solvent	0.1 M SPB (pH 7.4)			
Glycation	Dry state Humidity : 79% Temperature : 60°C Incubation time : 7 days		Wet state Temperature : 55°C Shake : 60 rpm Incubation time : 7 days	

Table 3. Condition of glycation on protein-lactose ratios

	C or WPC	L+ C or L+ WPC	L+ C or L+ WPC	L+ C or L+ WPC
Protein : Lactose	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3
Reaction solvent	0.1 M SPB (pH 7.4)			
Glycation	Wet state Temperature : 55°C Shake : 60 rpm Incubation time : 7 days			

- Fluorescence 측정은 유단백질-유당 마이알반응 생성물 제조 여부를 확인하기 위한 방법 중 하나로, 단백질의 아미노기와 환원당의 카르보닐기의 마이알반응으로 생성된 마이알반응 생성물은 excitation 370 nm와 emission 440 nm의 특정 파장에서 형광을 나타내며, 이를 Victor3 (Perkin Elmer co.) 형광분석기를 이용하여 측정하였음(Reynolds, 1962)

나. 실험 결과

(1) 반응 용매에 따른 GPML 생성 정도 비교

- DW를 반응 용매로 한 GPML의 형광도와 0.1 M SPB (pH 7.4)를 반응 용매로 한 GPML의 형광도를 Fig. 1로 나타내었음. DW를 반응 용매로 한 GPML의 경우 (Fig. 1A.), C의 마이알반응 생성물 (L+C)은 C보다 형광도가 약 2.8배 증가하였으나, WPC의 마이알반응 생성물 (L+WPC)은 WPC와 비교했을 때 형광도의 증가 양상은 나타나지 않았음. 0.1 M SPB (pH 7.4)를 반응 용매로 한 GPML의 경우 (Fig. 1B), L+C은 C보다 형광도가 약 8.1배 증가하였고, L+WPC은 WPC 보다 약 1.5배 형광도가 증가하였음. 반응 용매를 DW로 사용하였을 때보다 0.1 M SPB (pH 7.4)를 이용하였을 경우, L+WPC가 더 큰 형광도의 증가 양상을 보이며 마이알반응이 진행됨을 예측할 수 있었으며, 이를 통해 GPML의 최적 반응 용매를 0.1 M SPB (pH 7.4)로 선정함

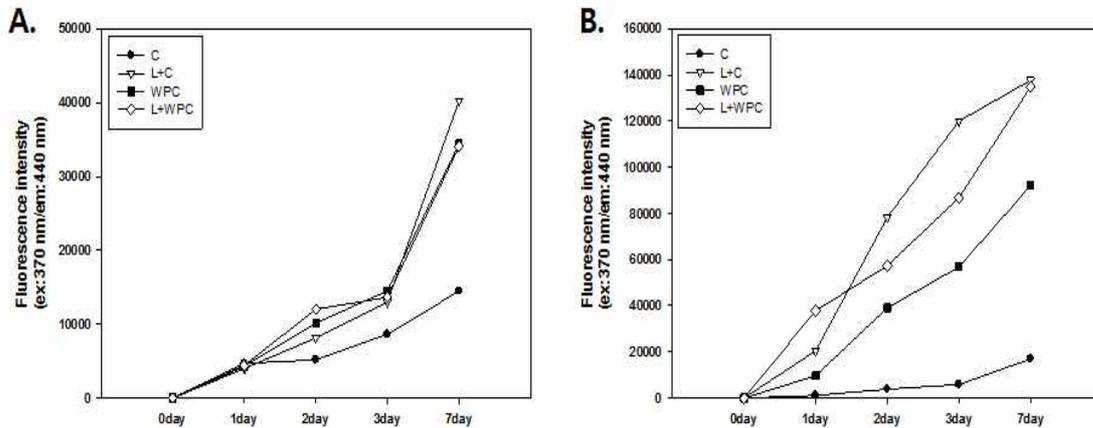


Fig. 1. Fluorescence (ex 370 nm/em 440 nm) intensities of glycated products with milk proteins and lactose (GPML) with different reaction solvents during incubation times

Comparison reaction solvents between DW (A) and 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) (B). L : lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate.

(2) 반응 방법에 따른 GPML 생성 정도 비교

- 고체 상태로 반응한 GPML의 형광도와 액체 상태로 반응한 GPML의 형광도를 Fig. 2로 나타내었음. 고체 상태로 반응한 GPML의 경우 (Fig. 2A), L+C는 C보다 형광도가 약 8.1배 증가하였고, L+WPC는 WPC 보다 약 1.5배 형광도가 증가하였음. 액체 상태로 반응한 GPML의 경우 (Fig. 2B), L+C은 C보다 형광도가 약 91.9배 증가하였고, L+WPC는 WPC 보다 약 2.3배 형광도가 증가하였음. 반응 방법을 고체 상태로 하였을 때보다 액체 상태로 마이알반응에 이용하였을 경우, L+WPC가 더 큰 형광도의 증가 양상을 보이며 마이알반응이 진행됨을 예측할 수 있었으며, 이를 통해 GPML의 최적 반응 방법은 액체 상태 (55°C, 60 rpm)로 선정함

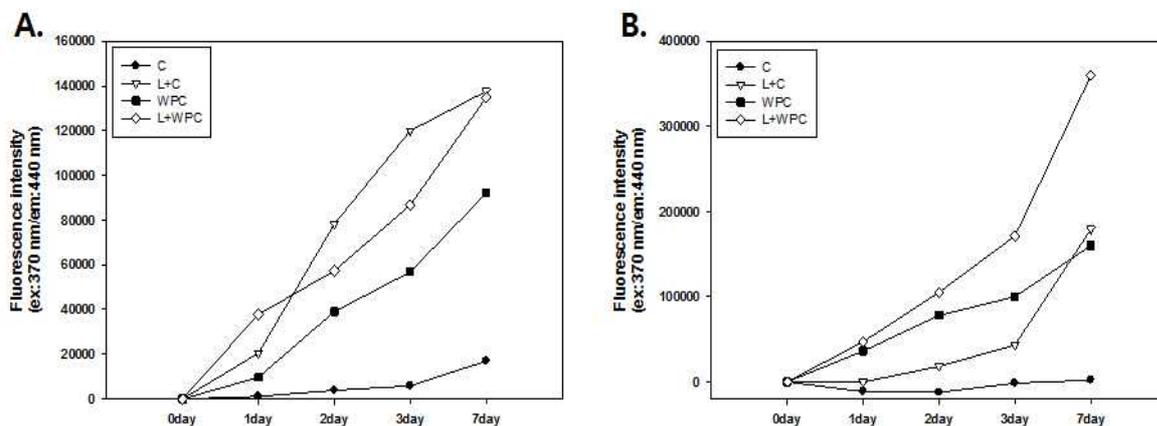


Fig. 2. Fluorescence (370 nm/em:440 nm) intensities of GPML with different reaction states (dry state vs. wet state) during incubation times

Comparison reaction matter types between dry condition (A) and wet condition (B). L

: lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate

(3) 반응 비율에 따른 GPML 생성 정도 비교

- 유단백질과 유당의 비율을 각각 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5로 반응한 GPML의 형광도를 Fig. 3로 나타내었음. 유단백질과 유당의 비율을 1 : 1로 반응한 GPML의 경우 (Fig. 3A), L+C는 C보다 형광도가 약 80.8배 증가하였고, L+WPC는 WPC보다 약 2.4배 형광도가 증가하였음. 유단백질과 유당의 비율을 1:2로 반응한 GPML의 경우 (Fig. 3B), L+C는 C보다 형광도가 약 91.9배 증가하였고, L+WPC는 WPC보다 약 2.3배 형광도가 증가하였음. 유단백질과 유당의 비율을 1:5로 반응한 GPML의 경우 (Fig. 3C), L+C은 C보다 형광도가 약 8.3배 증가하였고, L+WPC는 WPC보다 약 3.1배 증가하였음. 유단백질과 유당의 비율을 1 : 5로 반응한 GPML에서 L+C의 형광도가 다른 반응 비율의 GPML보다 낮은 수치를 나타냈으나, L+WPC의 형광도 증가율은 다른 반응 비율의 GPML보다 높아 더 많은 마이알반응이 일어났음을 확인할 수 있었음

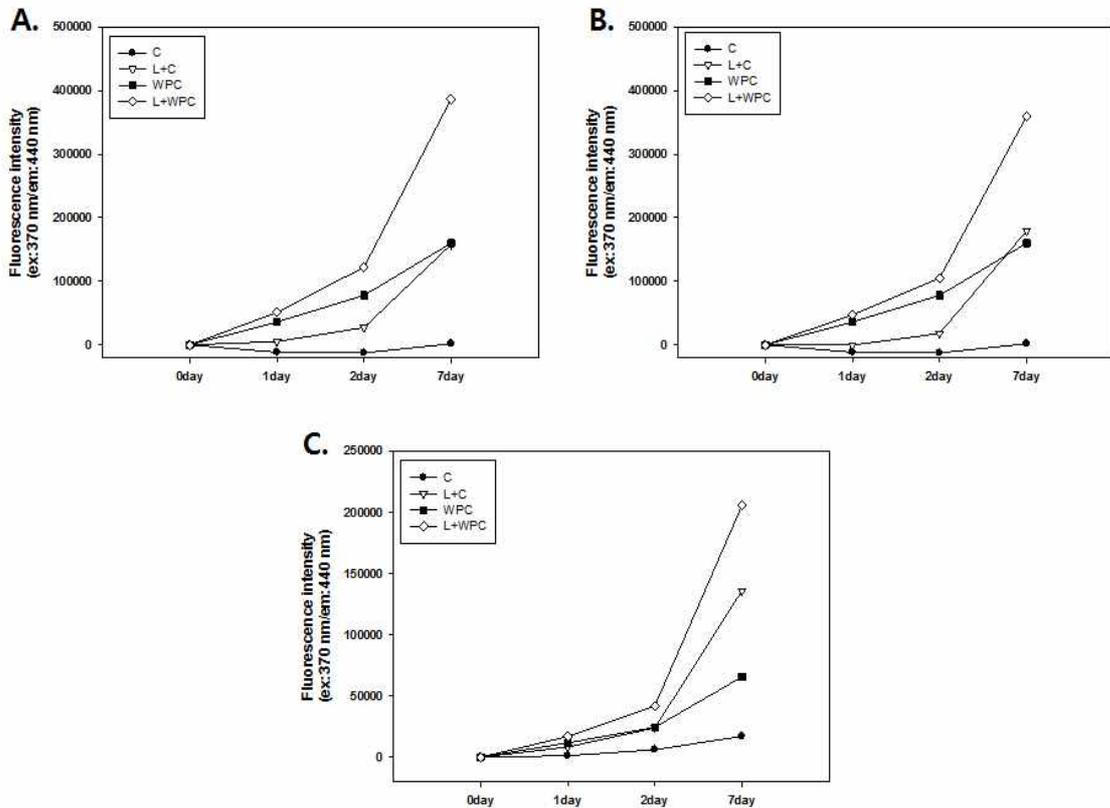


Fig. 3. Fluorescence (370 nm/em:440 nm) intensities of GPML with different ratio of milk protein to lactose (w/w) during incubation times

Comparison milk protein-lactose ratios between 1 : 1 (A), 1 : 2 (B) and 1 : 5 (C). L : lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate

2. 유단백질-유당 마이알반응 생성물의 제조

가. 실험방법

- 최적 반응 조건을 이용하여 최종 선정된 유단백질-유당의 GPML을 제조함.
- 유단백질과 유당의 비율을 1 : 5로 하여 0.1 M SPB (pH 7.4)에 넣어 섞어준 뒤 액체 상태로 55°C의 shaking waterbath에서 60 rpm으로 7일간 반응하였으며, 반응 날짜별로 시료의 일부를 취해 -75°C에서 보관하였음. 시료 내 반응하지 않은 당을 제거하기 위해서 3,500 MWCO membrane을 이용하여 투석을 24 시간동안 진행하였으며, 투석된 시료를 3일간 동결 건조하여 추후 실험에 이용하였음.
- Fluorescence 측정과 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 GPML 제조 여부를 확인하였음. SDS-PAGE는 단백질을 음전하로 코팅하여 polyacrylamide gel에서 단백질 분자량에 따라 전기영동하는 방법으로 유단백질인 casein (>23 kDa)과 whey proetin (>14 kDa)이 유당 (342.3 Da)과 반응하여 합성되면 단백질 자체 질량보다 무거운 영역에서 전기영동 밴드로서 나타남. SDS-PAGE는 Laemmli (Laemmli 1970)의 방법을 따랐으며, gel은 12% acrylamide gel을 사용하였고 running gel과 stacking gel의 조성은 Table 4와 같음. 모든 시료들은 BCA 정량법에 의해 동량의 단백질을 함량 (24 µg/lane)으로 loading 되었으며, coomassie blue staining을 실시하였음

Table 4. Acrylamide gel component

Reagent	12% running gel (mL)	5% stacking gel (mL)
H ₂ O	8.24	2.753
1.5M Tris-HCl	6.25 (pH 8.8)	0.5 (pH 6.8)
30% Acryl/bis Acryl	10	0.667
10% SDS	0.25	0.04
10% APS	0.25	0.04
TEMED	0.01	0.004

나. 실험 결과

- 최적 반응 조건에 따라 제조된 GPML의 형광도를 측정한 결과 (Fig. 4A), L+C는 C 보다 약 25.6배 증가하였으며, L+WPC는 WPC 보다 약 2.6배 증가함을 확인하였음. Fig. 4B에서 보는 것과 같이 반응 7 일차 GPML에서 유단백질의 주요 단백질 밴드가 감소하고, 170 kDa 이상에서 upper 밴드가 생성되는 것을 확인할 수 있음. WPC에는 α-lactoglobulin (14 kDa), β-lactoglobulin (18 kDa), immunoglobulin (20~25 kDa, 50~70 kDa), bovine serum albumin (69 kDa)가 존재함
- 유당의 첨가없이 WPC만을 7 일간 반응시킨 시료의 SDS-PAGE 결과를 보면 (Fig. 4B), 주요 단백질 밴드외의 upper 밴드가 미약하게 존재함을 확인할 수 있으며, 이는 Fig. 4A의

형광도 결과에서도 동일하게 반응 일자가 증가함에 따라 형광도가 증가함을 확인할 수 있음. 이는 상업적으로 구입한 WPC내에 자체적으로 약 5%의 유당을 함유하고 있기 때문에 반응이 진행됨에 따라 WPC 자체 내 유당과의 반응이 일어난 것으로 보이나, WPC에 유당을 첨가하여 7 일간 반응시킨 L+WPC에서 WPC 보다 주요 단백질 밴드가 감소하고 upper 밴드가 더 생성됨을 확인할 수 있었음

- SDS-PAGE의 upper 밴드의 생성과 형광도의 증가를 경향이 일치함을 볼 수 있었고, 이 두 가지의 assay를 통해서 GPML의 제조가 잘 일어남을 확인하였음

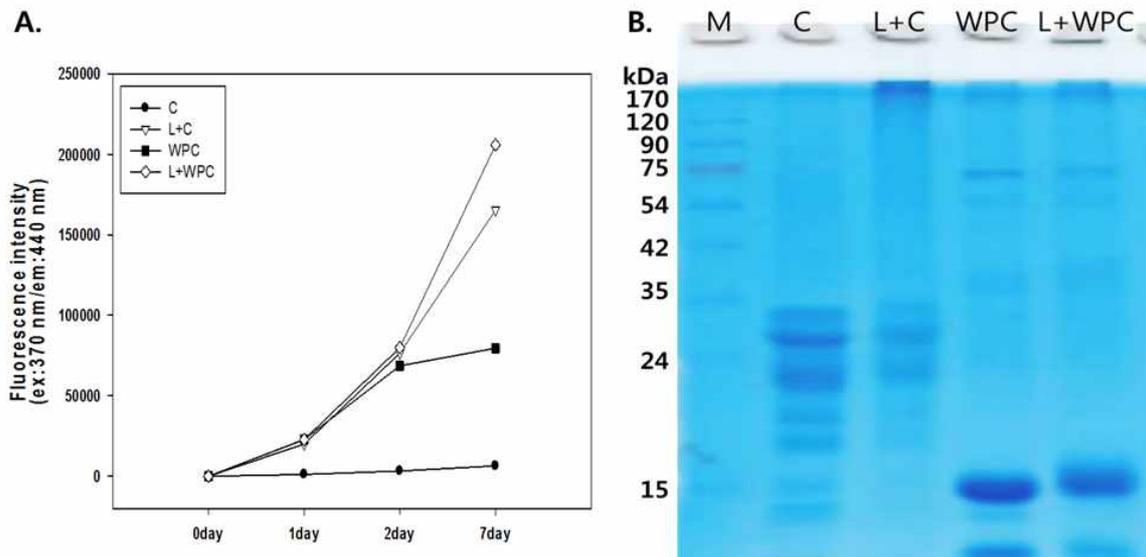


Fig. 4. Glycation characteristics of GPML

Time course ex:370 nm/em:440 nm fluorescence intensity (A) and SDS-PAGE (B) of milk protein and glycated milk protein. Protein (7 days) are loaded 24 μ g each lane on 12% gel. M : marker, L : lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate

3. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 생리 활성 스크리닝 (*in vitro*)

가. 실험방법

- GPML과 1협동으로부터 얻은 프로바이오틱스 균주를 이용한 GPML의 발효생성물 (Fermented (F)-GPML)의 면역활성 기능성을 스크리닝하기 위해 대식세포로부터 생성되는 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 발현을 각각 NO assay와 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 측정하였으며, 이를 통해 새로운 기능성 소재 개발을 위한 GPML과 F-GPML을 선정함
- 즉각 면역반응을 일으키는 세포 중 하나인 대식세포의 작용 활성화 측정을 위해 murine monocyte/macrophage cell line인 RAW 264.7을 이용하였으며 세포는 10% 소혈청단백질 (Fetal bovine serum, FBS)과 1% 항생제를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건에서 배양하였음. 계대에는 100 mm 2 cell

culture dish에 세포가 자라면 배지를 제거하고, 파이펫을 이용하여 세포를 떼어 낸 후 한 곳에 모아 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 1.0×10^6 cells/mL로 96-well plate에 각각 200 μ L씩 분주하여 실험에 이용하였음. 모든 시료를 처리하기 전에 FBS가 들어가지 않은 배지로 6 시간 starvation 하였으며, 시료를 처리하고 24시간 후 배지 상등액 50 μ L를 취하여 96 well plate에 분주하였음. 양성대조군으로는 Lipopolysaccharide from *E. coli* O111:B4 (LPS)를 1 μ g/mL의 농도로 이용하였음

- NO assay는 배지 상등액 50 μ L와 100 μ L의 Griess reagent (1% Sulfanil amide / 5% phosphoric acid 용액과 0.1% N-(1-Naphthyl)ethylene diamine dihydrochloride (NEAD))를 첨가한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질로 sodium nitrite (NaNO_2)를 이용하였으며, 0~100 μ M의 농도로 DMEM 배지에 희석하여 실험에 사용하였음. NO는 대표적인 면역반응의 일종인 phagocytosis에서 필수적으로 생성되는 물질로 면역활성화 지표로 사용되며, NO 측정 방법은 Fig. 5와 같이 세포가 분비하는 NO가 sulfanil amide 및 NEAD와 azo compound를 형성하여 540 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 물질을 정량하는 Griess method (Schulz et al. 1999)를 이용하였음

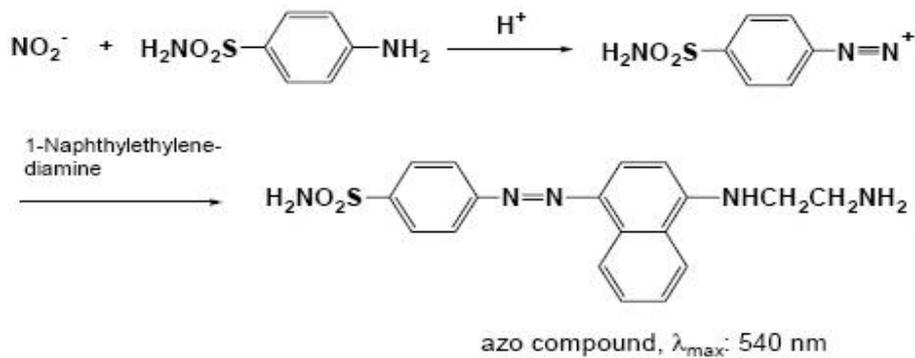


Fig. 5. Principles of nitric oxide (NO) assay

- 단백질 수준에서 TNF- α 의 발현량을 측정하기 위해 배지 상등액을 취하여 mouse TNF- α ELISA kit (KOMA biotech)에 명시된 방법에 따라 실험을 진행하였음

나. 실험 결과

(1) GPML의 면역조절 활성 비교

- 유단백질과 GPML의 면역조절 활성을 비교하기 위하여, LPS 처리군 대비 GPML 처리군의 NO 생성량과 단백질 수준에서의 TNF- α 발현량을 Fig. 6으로 나타내었음. Fig. 6B를 보면, 유단백질과 GPML 사이의 TNF- α 발현량은 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났으나, NO assay 결과 (Fig. 6A), L+C는 C보다 NO 생성이 감소하는 경향을 보인 반면, L+WPC는 WPC보다 NO 생성량을 증가시키는 것으로 나타났음. NO assay를 통해 대식세포의 작용을 확인한 결과에서 L+WPC의 NO 생성량이 증가하는 것으로 보아, L+WPC가 면역 증강효과를 가질 것으로 예상함

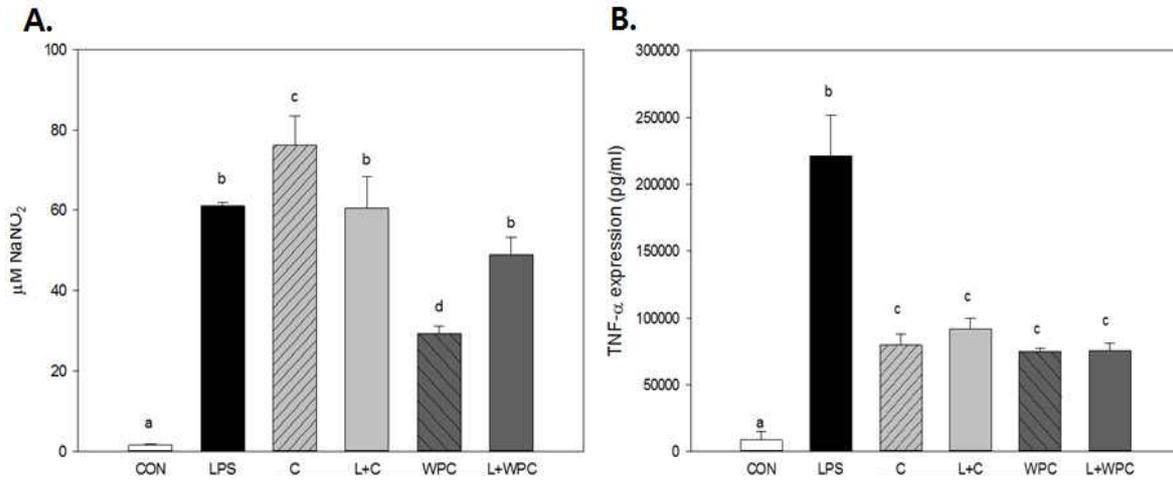


Fig. 6. Effect of GPML on NO production (A) and TNF- α expression (ELISA) (B)

The cell were treated sample 1 mg/ml for 24 h. LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. LPS : lipopolysaccharide, L : lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. ^{a-c} Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

- Fig. 6에서 면역증진 효과를 가질 것으로 예상되는 L+WPC의 농도별 면역증진 활성을 확인하고자 NO assay와 TNF- α 의 발현량을 측정된 결과 (Fig. 7), WPC와 L+WPC 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, L+WPC에서 농도별로 NO 생성량과 TNF- α 발현이 증가하는 것을 보아 면역증강 효과를 가지는 것으로 예상함

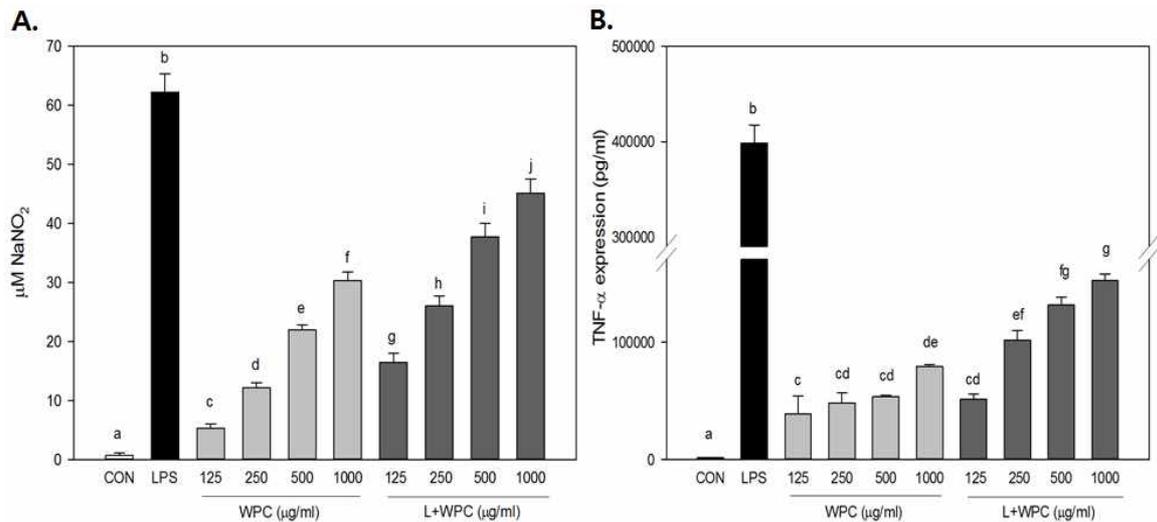


Fig. 7. Effect of GPML with WPC and lactose on NO production (A) and TNF- α expression (ELISA) (B)

The cell were treated sample 125 $\mu\text{g/ml}$ to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h. LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. ^{a-j} Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(2) 프로바이오틱스 균주를 이용한 F-GPML의 면역조절 활성 비교

- GPML과 프로바이오틱스 균주를 이용한 F-GPML의 면역조절 활성을 비교하기 위해 LPS 처리군 대비 F-GPML 처리군의 NO 생성량을 비교하였음 (Fig. 8, 9). Fig. 8A는 *LC01* 균주를 이용하여 얻은 C와 L+C의 발효가수분해물의 NO 생성량을 나타낸 것으로 C의 발효가수분해물보다 L+C의 발효가수분해물에서 NO 생성량이 낮아짐을 확인하였고, Fig. 8B는 *KY210* 균주를 이용하여 얻은 C와 L+C의 발효가수분해물의 NO 생성량으로 62.5 μ g/mL의 농도에서는 C의 발효가수분해물보다 L+C의 발효가수분해물에서 NO 생성량이 증가함을 확인하였으나, 1 mg/mL의 농도에서는 NO 생성량이 감소함을 확인하였음

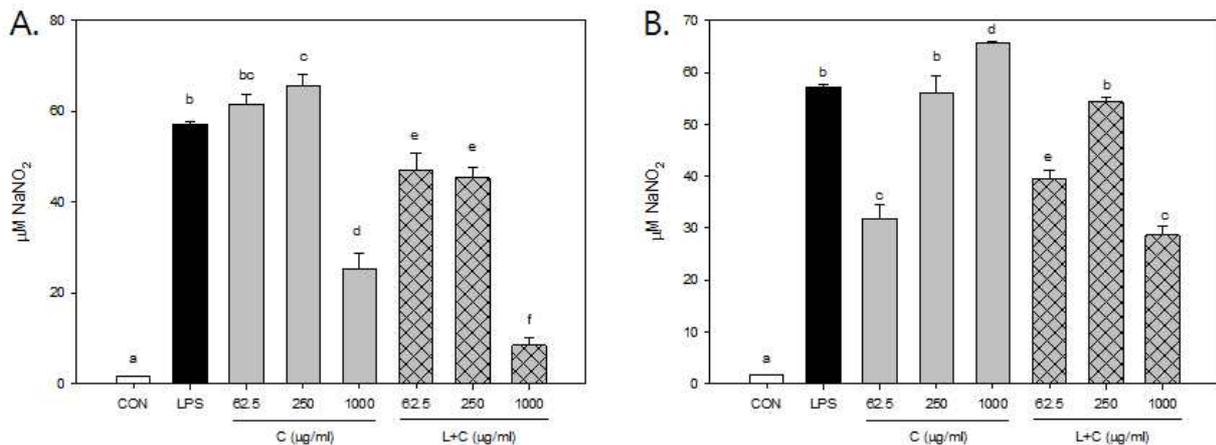


Fig. 8. Effect of F-GPML with sodium caseinate and lactose on NO production

Sodium caseinate and MRPs were fermented by *LC01* (A) and *KY210*(B). The cell were treated sample 62.5 μ g/ml to 1,000 μ g/ml for 24 h. LPS(1 μ g/ml) was used as positive control. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. ^{a-f} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

- Fig. 9A는 *LC01* 균주를 이용하여 얻은 WPC와 L+WPC의 발효가수분해물의 NO 생성량을 나타낸 것이며, Fig. 9B는 *NR29* 균주를 이용하여 얻은 WPC와 L+WPC의 발효가수분해물의 NO 생성량을 나타낸 것임. Fig. 9의 결과를 보면, WPC보다 L+WPC의 발효가수분해물에서 NO 생성량이 증가함을 확인하였으나, *NR29* 균주로 발효된 L+WPC 1 mg/mL의 농도에서는 NO 생성량이 감소함을 확인하였으며, L+WPC의 발효가수분해물에서 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소함을 확인하였음. *LC01*과 *NR29* 균주를 이용하여 얻은 L+WPC의 발효가수분해물이 농도 의존적으로 NO의 생성량을 증가시키는 결과는 보이지 않았지만, 낮은 농도에서 면역 조절 효과가 있음을 확인하였음

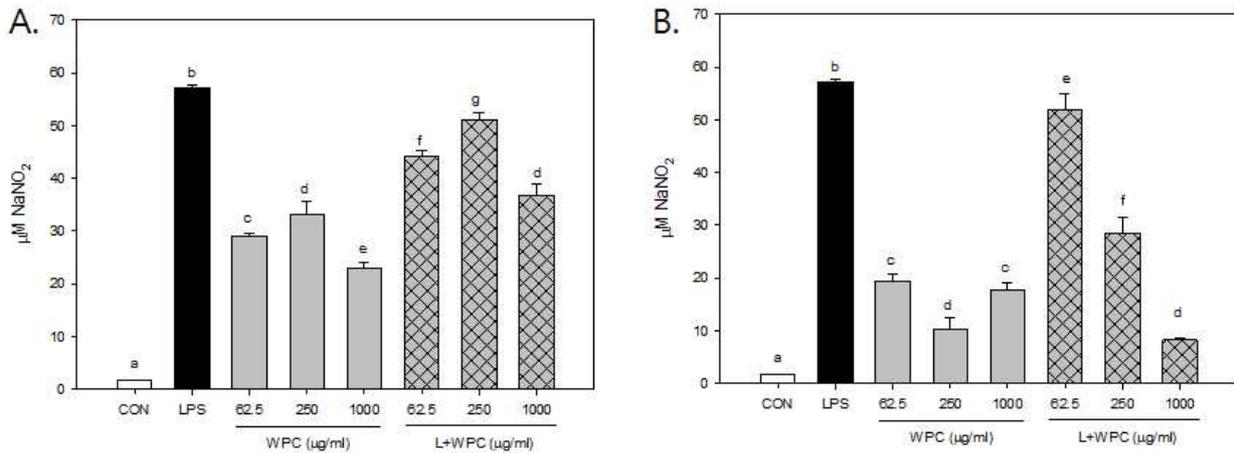


Fig. 9. Effect of GPML with WPC and lactose on NO production at the variation of protein levels

WPC and MRPs were fermented by *LCO1* (A) and *NR29* (B). The cell were treated sample 62.5 µg/ml to 1,000 µg/ml for 24 h. LPS(1 µg/ml) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-g} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

4. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반응 생성물 발효가수분해물의 안전성 검토 (*in vitro*)

가. 실험방법

- 주요기관 유래 세포주를 이용한 세포 생존율 측정을 통한 GPML과 F-GPML의 *in vitro* 수준에서의 독성 유무를 확인하였음. 면역조절 활성 확인에 앞서 세포 독성 확인을 위해 RAW 264.7 세포, murine fibrosarcoma cell line인 Sarcoma 180 세포, human breast cell line인 HeLa 세포, human umbilical vein endothelial cell line인 HUVEC 세포를 사용하였으며, 세포 생존율 측정을 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983)와 5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) 측정법을 이용하였음 (Jiang et al. 2010)
- MTT 측정법은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 숙신산 탈수소효소에 의해 노란 색의 MTT가 보라색의 formazan을 형성하는 것을 흡광도(540 nm)로 측정하는 방법이며, MTS 측정법은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan을 형성하는 것을 흡광도(490 nm)로 측정하는 방법임. 불용성의 formazan 생성물은 살아있는 세포 미토콘드리아 내의 활성 정도를 측정하는 것으로 세포 독성이 있을 경우 감소하고, 대사를 촉진시킬 경우 증가하는 형태를 보이는 것을 알 수 있음
- RAW 264.7 세포, HeLa 세포, HUVEC 세포에서는 LPS와 GPML, F-GPML이 세포 독성을 나타내는지 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였으며, suspension 타입인 Sarcoma

180 세포에서 LPS와 GPML, F-GPML이 세포 독성을 나타내는지 확인하기 위해 MTS assay를 시행하였음. 각 세포의 배양 조건은 Table 5와 같으며, 이를 통한 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였음

Table 5. Condition of each cell culture

Cell line	RAW 264.7	Sarcoma 180	HeLa	HUVEC
Media	DMEM	RPMI-1640	MEM	EGM-2
Cell density (cells/mL)	1.0×10^6	1.5×10^6	1.0×10^5	2.0×10^5
Culture plate	96-well	96-well	48-well	48-well
Cell viability	MTT assay	MTS assay	MTT assay	MTT assay

나. 실험 결과

(1) Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell을 이용한 세포 생존률 측정

- LPS와 GPML 및 F-GPML의 안전성 확인을 위해 RAW 264.7 세포와 Sarcoma 180 세포, HeLa 세포, HUVEC 세포에서의 세포 독성을 측정하였음. RAW 264.7 세포에서의 면역 증진 효과 확인에 앞서 세포독성을 확인한 결과 (Fig. 10), LPS 1 µg/mL과 GPML 1 mg/mL의 농도에서 세포 생존율이 95%이상 되는 것을 확인 할 수 있었음. 또한 F-GPML의 면역조절 활성 확인을 진행하기 앞서 RAW 264.7 세포에서의 세포 독성을 측정한 결과 (Fig. 11), 대부분의 F-GPML에서 세포 생존율이 80%이상 되는 것을 확인 할 수 있었으며, C와 L+C를 *LCOI*을 이용하여 얻은 발효가수분해물에서 1 mg/mL의 농도일 때, 각각 72.95%와 76.87%의 세포 생존율을 나타냄을 확인하였음. 따라서 NO assay와 TNF-α 발현 확인을 위한 *in vitro* 실험에서 GPML과 F-GPML의 농도를 1 mg/mL 이하로 처리하여 실험을 진행하였음

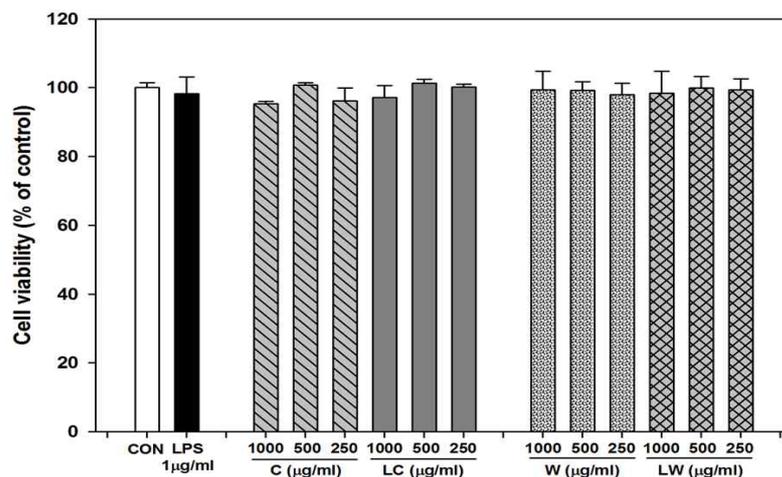


Fig. 10. Cell viabilities of RAW 264.7 cells with GPML treatment

Cell viability were measured by MTT assay on RAW 264.7 cells. The cells were treated with samples 250 $\mu\text{g/ml}$ to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h. Sample were compared with control. LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. The results have no significantly different ($p < 0.05$).

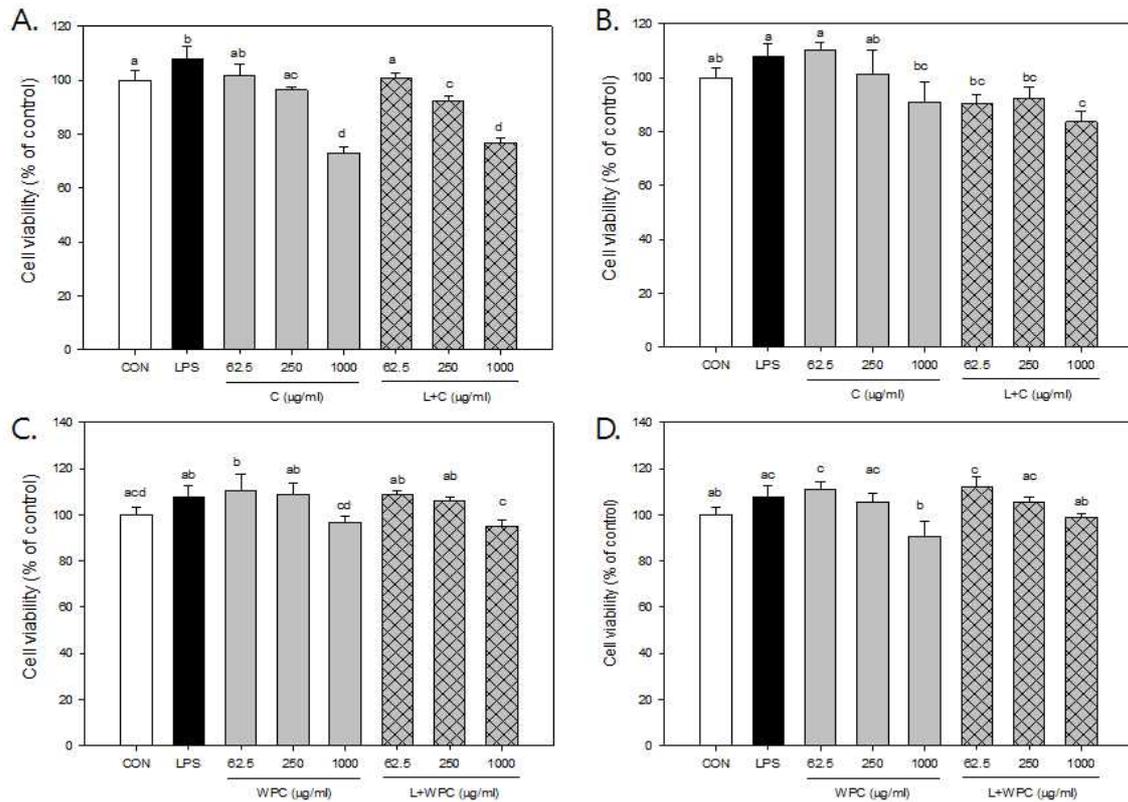


Fig. 11. Cell viabilities of RAW 264.7 cells with F-GPML treatment

Sodium caseinate and MRPs were fermented by *LC01* (A) and *KY210* (B). WPC and MRPs were fermented by *LC01* (C) and *NR29* (D). Cell viability were measured by MTT assay on RAW 264.7 cells. The cells were treated with samples 62.5 $\mu\text{g/ml}$ to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h. Sample were compared with control. LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. ^{a-d} Mean with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(2) Murine fibrosarcoma cell line인 Sarcoma 180 cell을 이용한 세포 생존율 측정

- Sarcoma 180 세포에서의 세포독성을 확인한 결과 (Fig. 12), LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 140%의 세포 생존율을 나타냈으며, GPML의 농도에서 세포 생존율이 64~105%로 나타났음. C에서 농도가 낮아짐에 따라 세포 생존율도 감소함을 확인할 수 있었고, L+C에서는 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포 생존율이 대조군과 비슷한 수준이었으나, 처리농도가 높아지면서 Sarcoma 180 세포의 생존율이 60% 정도로 감소함을 확인할 수 있었음. WPC의 경우, 농도간의 세포 생존율에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, L+WPC에서 처리 농도가 증가함에 따라 세포 생존율도 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었음. 또한 F-GPML의 Sarcoma 180 세포에서의 세포 독성을 측정된 결과 (Fig. 13), F-GPML에서는 12~114%의 세포 생존율을 나타내었으며, 처리농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소함을

확인할 수 있었음. *LC01*을 이용하여 얻은 L+C의 발효가수분해물에서는 C 발효가수분해물보다 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 생존율이 증가하였으며, *KY210* 균주를 이용하여 얻은 C와 L+C의 발효가수분해물은 동일 농도에서 유의적인 차이가 나타나지 않았음. L+WPC를 *LC01*과 *NR29*균주를 이용하여 얻은 발효가수분해물에서 WPC 발효가수분해물과의 세포 생존율에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, L+WPC의 *LC01* 균주 발효가수분해물을 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 WPC 발효가수분해물보다 세포 생존율이 유의적으로 낮게 나타났음을 확인함. F-GPML은 Sarcoma 180 세포에서 세포 독성을 가지고 있음을 확인 할 수 있으며, Sarcoma 180 세포는 복강암 세포로서 이를 통해 항암 효과가 있을 것으로 예상할 수 있음

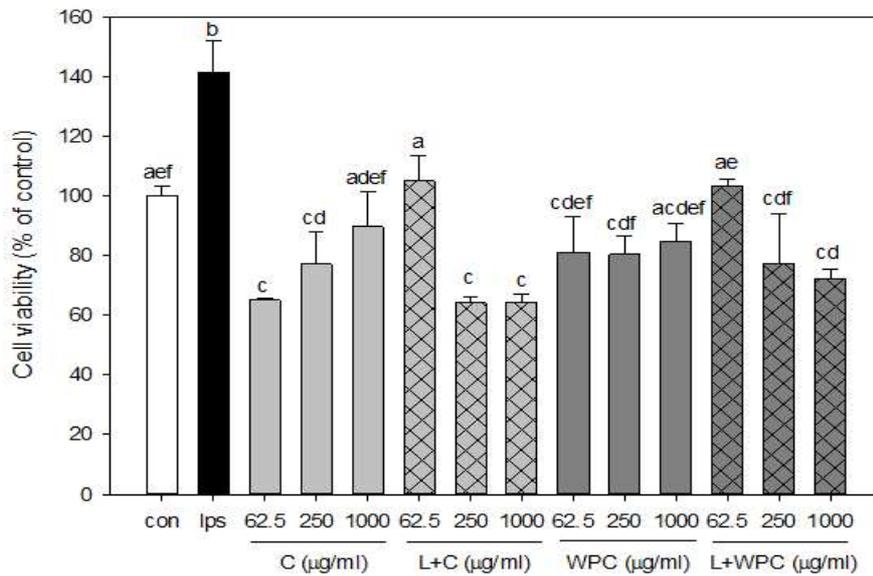


Fig. 12. Cell viabilities of Sarcoma 180 cells with GPML treatment

Cell viability were measured by MTT assay on Sarcoma 180 cells. The cells were treated with samples 62.5 $\mu\text{g/ml}$ to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h. Sample were compared with control. LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) was used as positive control. Value are shown as mean \pm S.D. of three individual experiments. The results have no significantly different ($p < 0.05$).

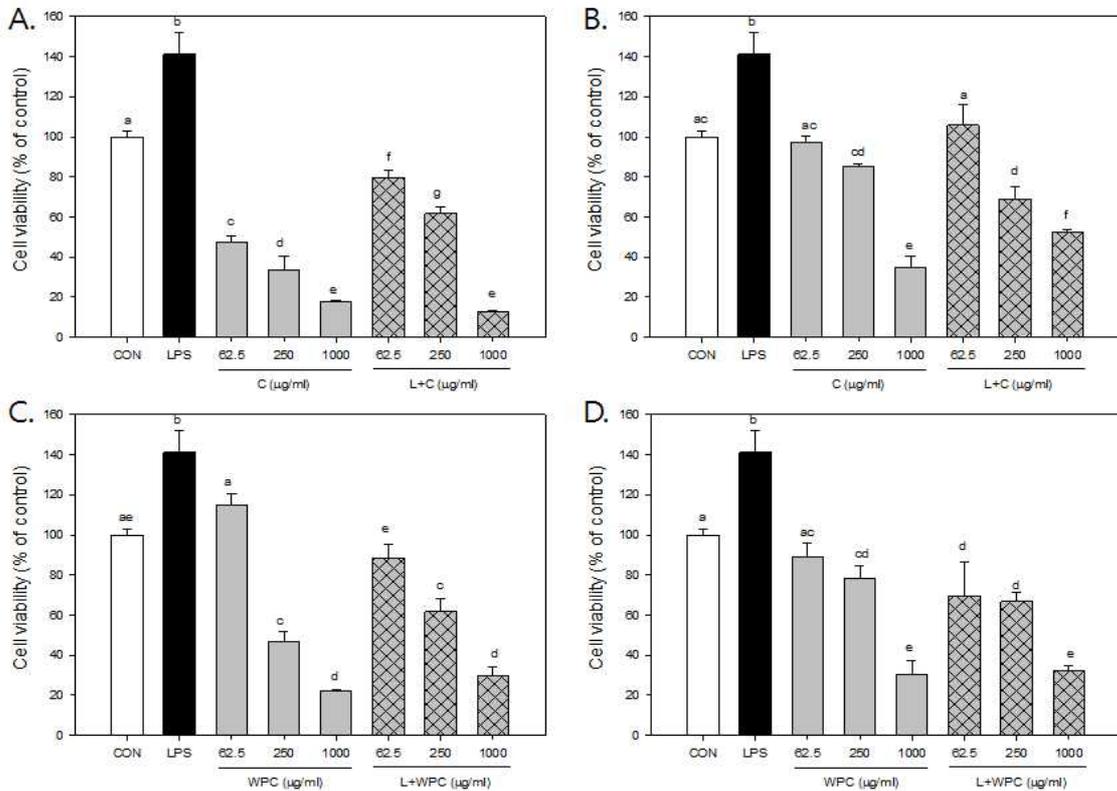


Fig. 13. Cell viability of concentration of F-GPML in Sarcoma 180 cells

Sodium caseinate and MRPs were fermented by *LC01* (A) and *KY210* (B). WPC and MRPs were fermented by *LC01* (C) and *NR29* (D). Cell viability were measured by MTT assay on Sarcoma 180 cells. The cells were treated with samples 62.5 µg/ml to 1,000 µg/ml for 24 h. Sample were compared with control. LPS(1 µg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. The results have no significantly different ($p < 0.05$).

(3) Human breast cell line인 HeLa cell을 이용한 세포 생존률 측정

- HeLa 세포에서의 세포독성을 확인한 결과 (Fig. 14), LPS 1 µg/mL와 GPML 250~1,000 µg/mL의 농도에서 세포 생존율은 96~129로 나타났으며, GPML은 HeLa 세포에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였음. 또한 F-GPML의 HeLa 세포에서의 독성을 측정한 결과 (Fig. 15), LPS 1 µg/mL와 대부분의 F-GPML에서 세포 생존율이 80%이상 되는 것을 확인 할 수 있었음. *LC01*과 *KY210* 균주를 이용한 L+C 발효가수분해물에서 1 mg/mL의 농도일 때, 각각 12.08%와 20.13%의 세포 생존율을 나타냄을 확인하였으며, L+WPC를 *NR29* 균주로 얻은 발효가수분해물의 6.25 µg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각의 세포 생존율은 67.23%와 38.03%로 나타남을 확인하였음

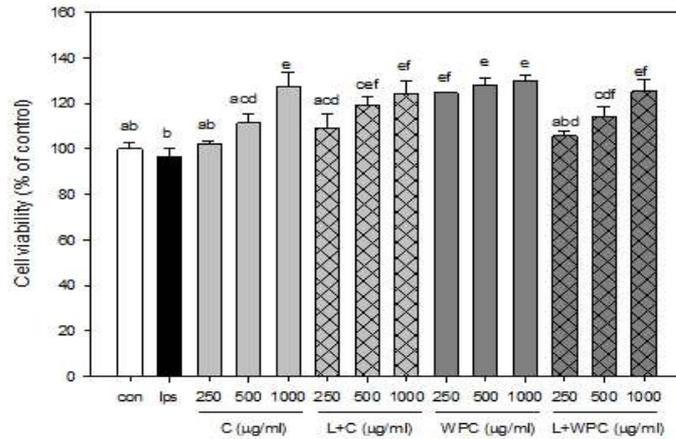


Fig. 14. Cell viabilities of HeLa cells with GPML treatment

Cell viability were measured by MTT assay on HeLa cells. The cells were treated with samples 250 µg/ml to 1,000 µg/ml for 24 h. Sample were compared with control. LPS (1 µg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-f} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

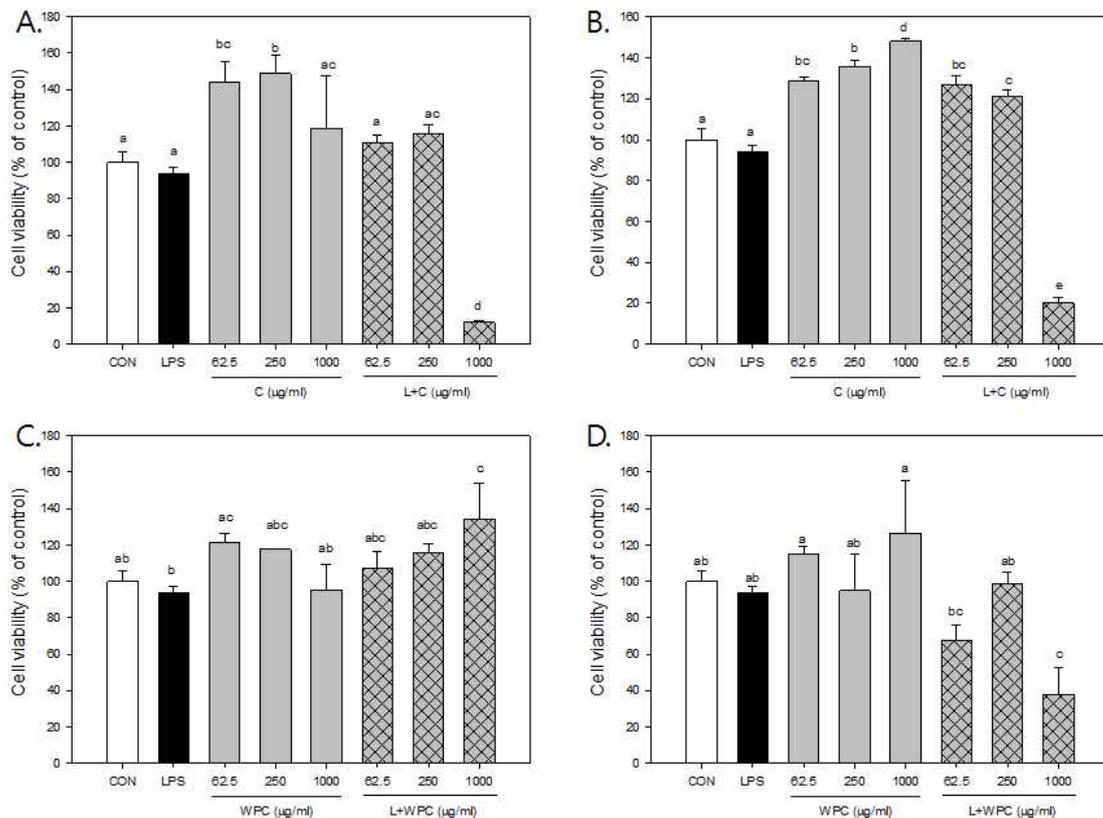


Fig. 15. Cell viabilities of Sarcoma 180 cells with F-GPML treatment

Sodium caseinate and MRPs were fermented by *LC01* (A) and *KY210* (B). WPC and MRPs were fermented by *LC01* (C) and *NR29* (D). Cell viability were measured by MTT assay on HeLa cells. The cells were treated with samples 62.5 µg/ml to 1,000 µg/ml for 24 h. Sample were compared with control. LPS (1 µg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-e} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

(4) Human umbilical vein endothelial cell line인 HUVEC cell을 이용한 세포 생존률 측정

- HUVEC 세포에서의 세포 독성을 확인한 결과 (Fig. 16), LPS 1 µg/mL와 L+C에서의 세포 생존율은 95%이상으로 나타났으며, L+ WPC 100 µg/mL에서는 100% 이상의 세포 생존율을 나타냈음. 500 µg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 WPC는 77.68%와 48.45%, L+ WPC는 69.02%와 44.52%의 세포 생존율을 나타내었으며, WPC과 L+ WPC의 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 cell viability가 감소함을 확인하였음.

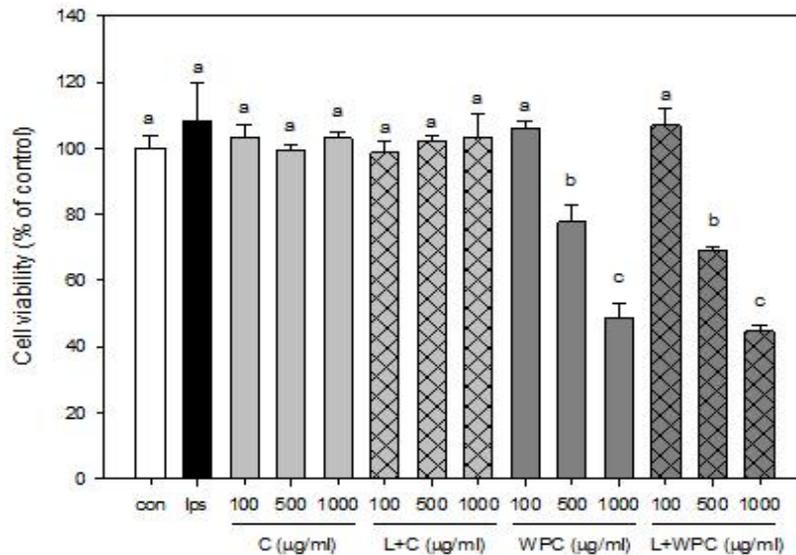


Fig. 16. Cell viabilities of HUVEC cells with GPML treatment

Cell viability were measured by MTT assay on HUVEC cells. The cells were treated with samples 100 µg/ml to 1,000 µg/ml for 24 h. Sample were compared with control. LPS (1 µg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-c} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

5. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물의 furosine 함량 측정

가. 실험방법

- 마이알반응은 크게 3가지(초기, 중간, 최종) 단계로 이루어져 있으며, furosine (Fig. 17) 은 마이알반응의 초기 단계 생성물인 amadori 화합물의 가수분해에 의해 생성되는 물질로서, 마이알반응 생성물을 가수분해함으로써 furosine 함량을 측정할 수 있으며 (Renterghem et al. 1996), GPML 내의 furosine 함량을 측정함으로써, 동일한 수준의 GPML을 제조하는데 지표로서 사용하고자 하였음

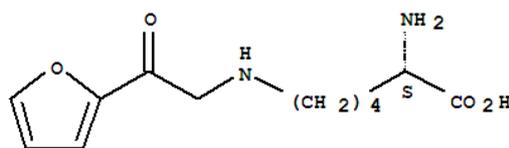


Fig. 17. Structure of furosine

- 시료의 전처리 : 동결건조를 통해 얻은 GPML을 pyrex screw cap vial에 30 mg을 넣고, 7.4 N HCl을 4 mL 첨가하였음. 60초간 질소로 충전하고, 테프론으로 밀봉하여 110°C에서 24시간동안 가수분해하였음. 가수분해된 시료를 25°C에서 냉각한 뒤 2,500 rpm으로 10분간 원심분리하였음. Methanol 5 mL과 D.W. 10 mL를 넣어 미리 활성화시킨 INOPAK SPE C18 cartridge에 가수분해된 시료 상등액 0.5 mL을 넣고, 3 N HCl 3 mL로 분리하였음. 0.45 µm PVDF filter를 통과시킨 시료를 HPLC 분석에 사용하였음
- HPLC 분석 조건 : HPLC 분석에 사용한 용매는 0.05% Trifluoroacetic acid(TFA) in D.W.와 Methanol이며 모두 HPLC용으로 사용하였음. HPLC는 Diode-array detector와 autosampler가 장착된 Agilent 1200 series를 사용하였으며 분석용 칼럼은 YMC-Triart (C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm)를 사용하였음. 분석에 사용한 용매는 0.05% TFA buffer와 methanol 을 100:0으로 시작하여 유속 1 mL/min의 gradient 조건을 걸어 15분에 50:50, 16분에 0:100, 20분에 0:100, 21분에 100:0으로 바꿔주어 총 22분 동안 분석을 실시하였으며, 파장은 280 nm에서 분석을 실시하였음. 자세한 분석 조건은 Table 6과 같음

Table 6. Analytical conditions of HPLC

Detector	: Diode-array detector		
Column	: YMC-Triart C18, 250×4.6 mm, 5 µm		
Mobile phase	Solvent A : 0.05% TFA Solvent B : Methanol		
	Time (min)	% of solvent A	% of solvent B
	0	100	0
	2	100	0
	15	50	50
	16	0	100
	20	0	100
	21	100	0
	22	100	0
Flow rate	: 1.0 mL/min		
Wavelength	: 280 nm		
Injection volume	: 2 µL		

나. 실험 결과

- GPML 중 마이알반응 초기 지표산물인 furosine을 이용하여 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µg/mL의 5가지 농도로 희석한 후 HPLC 분석을 통해 검량선을 그린 결과 검량선의 R²는 0.999로 이상으로 직선성을 나타내었으며 (Fig. 18B), Furosine의 retention time은 7.9분이었음 (Fig. 18A). 이를 토대로 GPML 내의 furosine 함량을 측정하기 위해 30 mg D.M.에 4 mL의 7.4 N HCl을 가해 24 시간동안 110°C에서 가수분해한 뒤 원심분리하여 얻은 상등액 0.5 mL를 C18 cartridge를 이용하여 3 mL의 3 N HCl로 추출한 시료를 분석하였으며, 그 결과 시료에서의 retention time이 7.9분에 나오는 것을 확인하였음 (Fig. 20). 또한 이 peak의 검증을 위해 시료에 2.5 µg/mL의 furosine을 spiking하여 분석한 결과 (Fig. 19), 동일한 retention time에 peak가 나오는 것을 알 수 있으며, peak의 높이와 면적이

증가하는 것을 통해 시료 내에 furosine이 존재하는 것을 확인 할 수 있었음. GPML 내에 생성된 furosine의 함량을 알기 위하여 Fig. 18B의 furosine 검량곡선에 대입하여, 건물 1 mg에 들어있는 GPML의 furosine 함량을 확인하였음 (Fig. 21). 각각의 시료 1 mg에 들어있는 furosine의 함량은 0 µg (C), 0.18 µg (L+C), 0.07 µg (WPC), 0.13 µg (L+WPC) 임을 확인하였음.

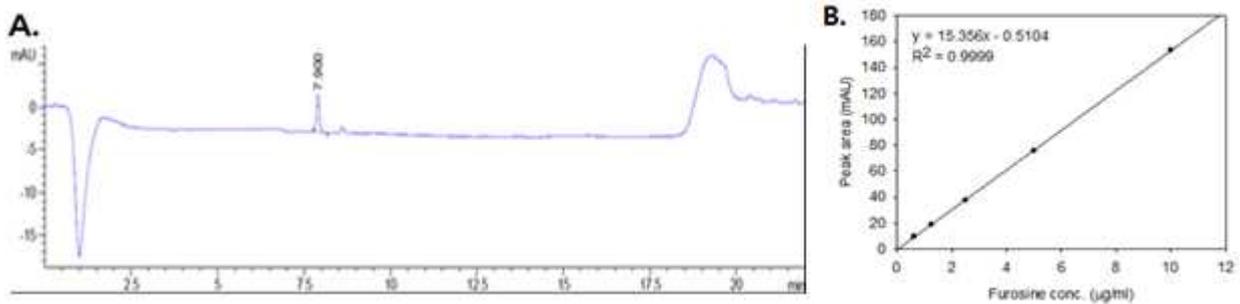


Fig. 18. HPLC-UVD chromatogram of furosine and standard curve
Representative chromatograms of 10 µg/mL furosine (A), standard curve (B).

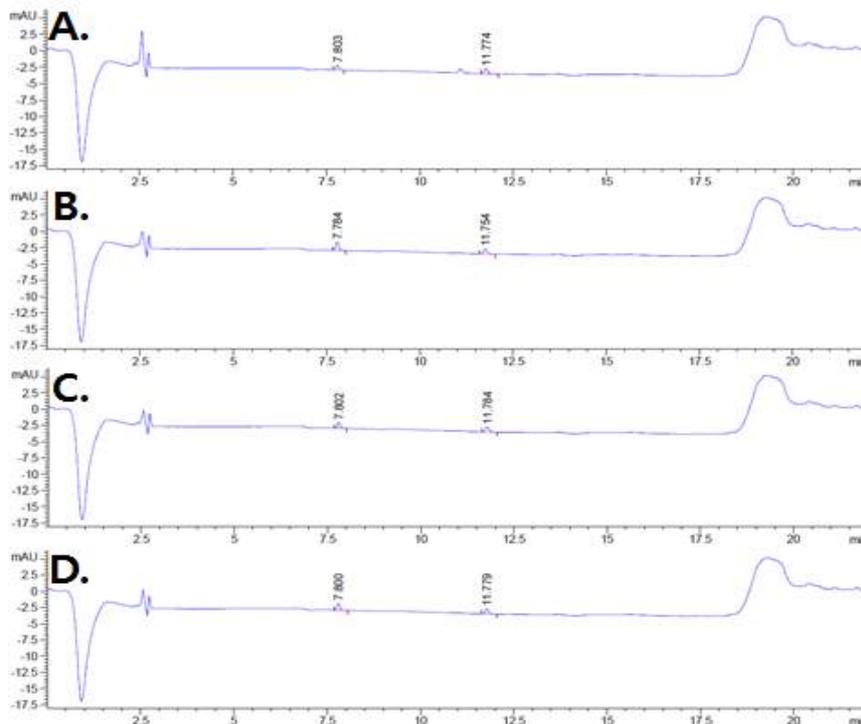


Fig. 19. Spiking of HPLC analysis on milk protein and GPML
Furosine (2.5 µg/mL) were spiking on samples (1 mg/mL). A : Furosine + C, B : Furosine + L+C, C : Furosine + WPC, D : Furosine + L+WPC

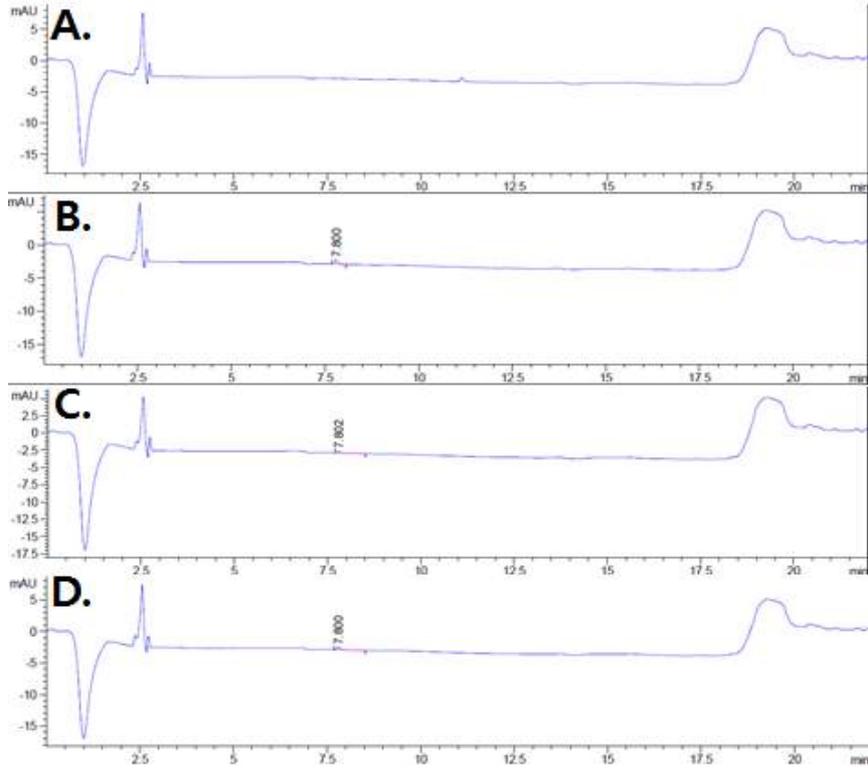


Fig. 20. HPLC chromatogram of GPML

Representative chromatograms of 1 mg/mL milk protein and glycated milk protein with lactose.

A : C, B : L+C, C : WPC, D : L+WPC

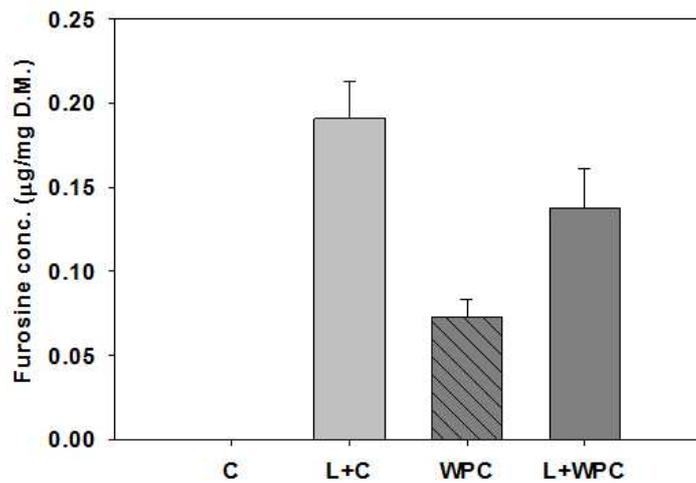


Fig. 21. Furosine concentration of GPML

L : lactose, C : sodium caseinate, WPC : whey protein concentrate

6. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 시간 단축

가. 실험방법

- GPML 제조에 사용된 유단백질은 앞선 결과들에서 면역 조절 활성을 보인 WPC로 선정되

었으며, 면역 조절 활성을 보이는 WPC의 마이알반응 생성물 (L+WPC)의 제조 시간을 단축하기 위해 WPC의 GPML의 생성량이 많았던 유단백질과 유당의 비율인 1 : 5로 하여 최적 반응 조건으로 선정된 0.1 M SPB (pH 7.4)에서 55°C의 온도 조건하에 shaking 60 rpm으로 7일간 반응을 하여 날짜별로 시료를 취해 -75°C에서 보관하였음. 시료내의 반응하지 않은 당을 제거하기 위해서 3,500 MWCO membrane을 이용하여 투석을 24 시간동안 진행하였으며, 투석된 시료를 3일간 동결 건조하여 추후 실험에 이용하였음

- Fluorescence 측정과 SDS-PAGE를 이용하여 GPML의 생성 정도를 확인하였으며, NO assay를 통해 면역 조절 확인을 함으로써 면역 조절 활성을 갖는 GPML의 최소 제조 시간을 선정하였음. 단축된 제조 시간에 따라 생성된 GPML을 프로바이오틱스 균주를 이용하여 얻은 F-GPML의 면역 조절 활성 확인을 통해 최종 시료를 선정함
- WPC내 자체적으로 함유되어 있는 유당 및 유단백질의 함량과 수분, 회분, 지방의 함량을 확인하기 위해 식품공전 제 9. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분분석법에 따라 시험하였음 (식품의약품안전처, 2014)

나. 실험결과

- 시간별 GPML의 면역 조절 활성을 확인하기 전에 GPML의 제조가 잘 이루어 졌는지 반응 시간별로 형광도 (Fig. 22)와 SDS-PAGE (Fig. 23)를 확인하였음. Fig. 22에 나타난 바와 같이, WPC와 L+WPC 모두 반응 시간이 증가함에 따라 형광도가 증가함을 확인하였으며, L+WPC의 경우 반응 1일차까지는 WPC와 거의 비슷한 수준으로 증가하다가 반응 2일차부터 WPC의 형광도 증가폭이 감소하면서 L+WPC와의 형광도 값의 차이가 나타남을 확인하였음. 형광도와 마찬가지로 GPML의 SDS-PAGE 결과, WPC와 L+WPC 모두 반응 시간이 증가함에 따라 upper 밴드가 증가함을 확인하였고, 특히 L+WPC의 경우 반응시간이 증가함에 따라 WPC의 주요 단백질 밴드가 눈에 띄게 감소함을 확인 할 수 있었음 (Fig. 23). 또한, WPC와 L+WPC 모두 미약하지만 반응 1일차부터 upper 밴드가 형성됨을 확인하였음

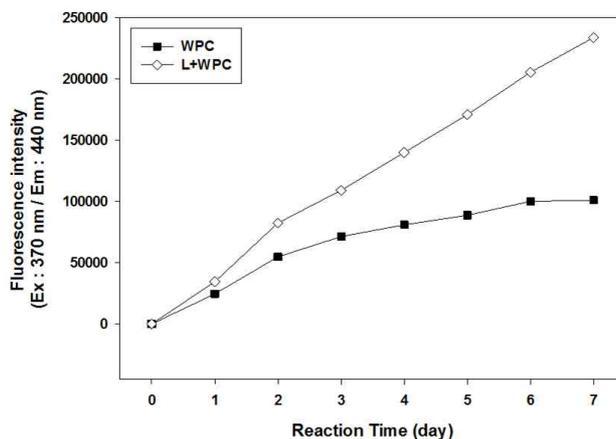


Fig. 22. Fluorescence (ex 370 nm/em 440 nm) intensities of GPML according to reaction times

L : lactose, WPC : whey protein concentrate.

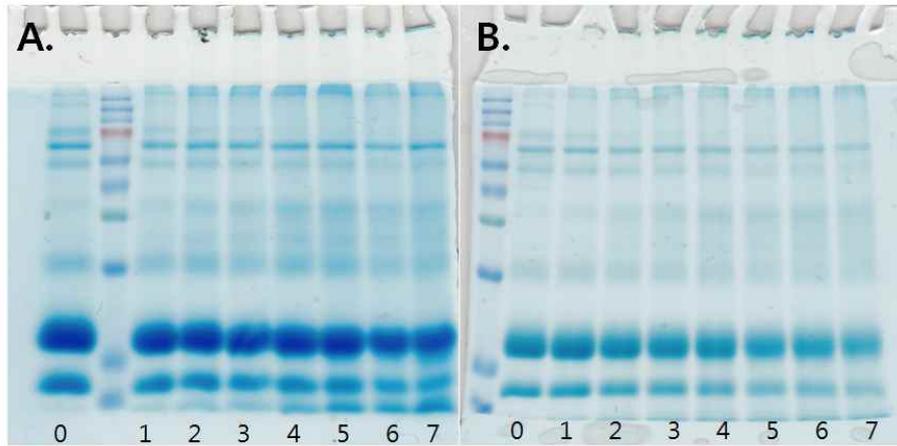


Fig. 23. SDS-PAGE of GPML according to reaction times

Time course SDS-PAGE of WPC (A) and L+WPC (B). Proteins are loaded 32 μg each lane on 12% gel. L : lactose, WPC : whey protein concentrate.

- 면역 조절 활성을 갖는 최적 GPML 제조 단축 시간을 찾고자 RAW 264.7 세포에서 반응 시간별 제조된 GPML에 따른 NO 생성량을 측정하여 Fig. 24로 나타내었음. WPC와 L+WPC를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 두 시료 모두 반응 1일차에서 WPC only 보다 높게 나타났으며 LPS 수준으로 NO 생성량이 증가함을 확인 할 수 있었으며, 면역활성을 나타내는 반응 시간은 24시간으로 충분할 것으로 보임. 반응 1일차에서 WPC보다 L+WPC의 NO 생성량이 조금 더 높게 나타났으나, 반응 시 WPC에 유당 첨가 유무가 면역활성 증가에 크게 작용하지 않는 것으로 보이며, 본 실험에서 사용된 WPC는 자체 내에 유당을 함유하고 있는 제품으로 24 시간 동안 WPC 자체 내 함유 당과의 마이알반응이 이루어진 것으로 보임

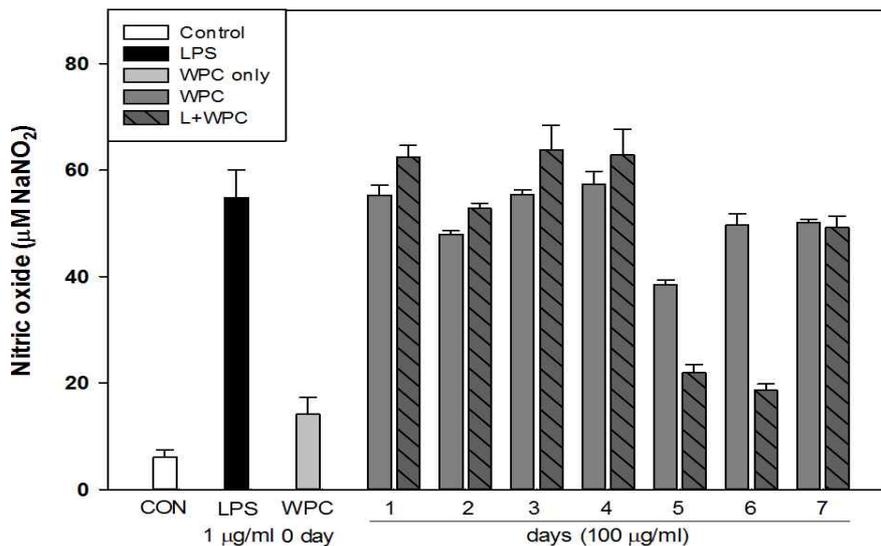


Fig. 24. Effect of GPML on NO products of RAW 264.7 cells

The cell were treated sample 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 h. LPS was used as positive control. L : lactose, WPC : whey protein concentrate.

- 새로이 선정된 GPML의 최적 제조 조건 검증을 위하여 마이알 반응을 24 시간 동안 진행하였으며, F-GPML을 제조하기 앞서 형광도와 SDS-PAGE를 통해 GPML의 제조 여부를 확인하였음 (Fig. 25). Fig. 25A의 형광도를 보면, WPC와 L+WPC 모두 24 시간 동안 형광도가 증가하였으며, 반응 24 시간 때 WPC의 형광도 값은 L+WPC보다 약 1.42배 높게 나타났음. 형광도와 마찬가지로 SDS-PAGE 결과를 보면 (Fig. 25B), 반응하지 않은 WPC에선 보이지 않던 upper 밴드가 WPC와 L+WPC 모두 비슷한 수준으로 생성되었음을 확인하였으며, 24시간 반응으로 GPML의 제조가 잘 이루어졌음을 확인하였음

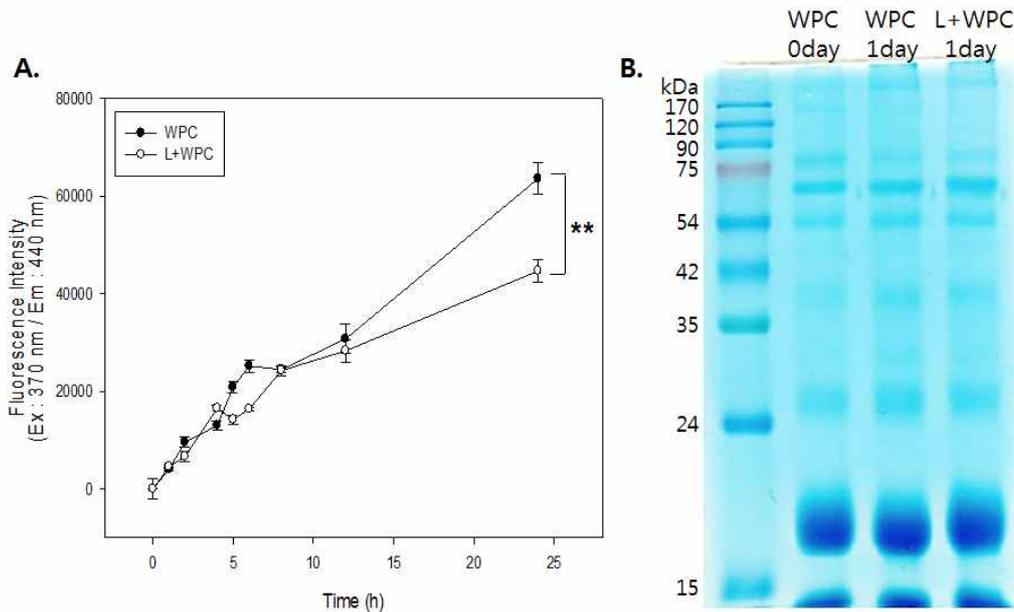


Fig. 25. Comparison between WPC and L+WPC

Time course ex:370 nm/em:440 nm fluorescence intensity (A) and SDS-PAGE (B) of WPC and L+WPC. Proteins are loaded 24 μ g each lane on 12% gel.

- 반응 24시간의 GPML과 균주별 F-GPML의 면역 조절 활성을 통한 스크리닝을 위해 NO 생성량을 비교하였음 (Fig. 26). 시료의 농도를 6, 13, 25 μ g/mL의 세 농도로 처리한 결과, GPML에서는 WPC가 L+WPC보다 NO 생성량이 유의적으로 증가했으며 이는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보여주었음. 프로바이오틱스 균주를 이용한 F-GPML의 NO 생성량을 비교해 보면 *LC01* 균주를 이용한 발효가수분해물이 *NR29* 균주를 이용한 발효가수분해물보다 WPC와 L+WPC 전반적으로 NO 생성량을 높이는데 효과적으로 나타남. L+WPC보다 WPC에서 높은 NO 생성량을 나타낸 것으로 보아 GPML 제조 시 유당의 첨가가 무의미하다고 판단하였으며, 유당 첨가 없이 24시간동안 반응시켜 얻은 WPC 마이알 반응 생성물 (G-WPC)를 제조하고, *LC01* 균주를 이용하여 발효한 가수분해물 (F-WPC)을 시료로 선정하여 향후 실험에 사용하였음

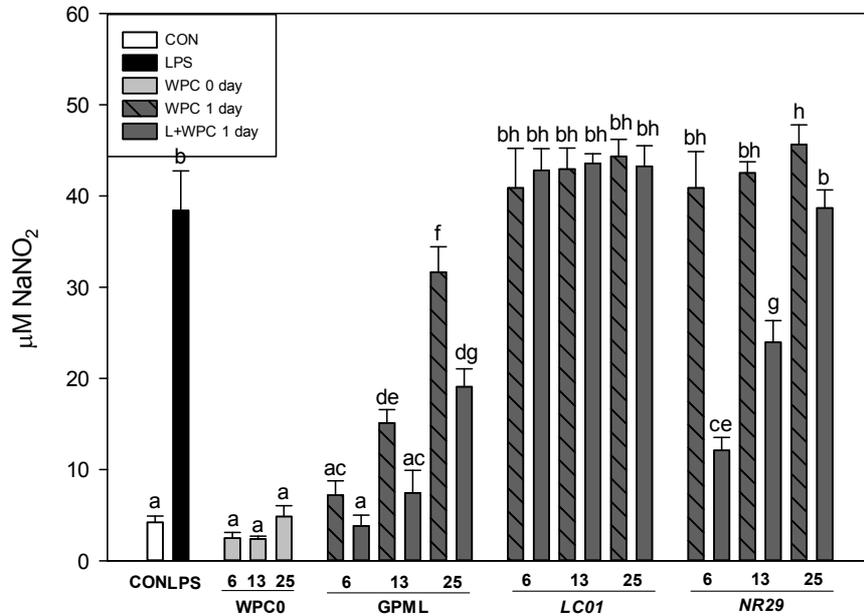


Fig. 26. Effect of GPML and fermented GPML on NO production

WPC and L+WPC (1 day) were fermented by *LC01* and *NR29*. The cell were treated sample 6, 13 and 25 μg/mL for 24 h. LPS (1 μg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-h} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

- GPML의 반응시간이 기존 7일에서 1일로 단축됨에 따라 NO 생성효과가 L+WPC보다 WPC에서 높게 나타났으며, 이는 형광도 결과와도 유사하게 보임. WPC를 24시간 반응하였을 때 형광도의 증가나 SDS-PAGE의 upper band 생성, 또는 NO 생성량이 증가하는 이유는 본 연구에 사용된 WPC 자체 내에 유당을 함유하고 있기 때문으로, GPML의 제조 시 당과 단백질의 비율을 확인하기 위해 WPC 내 함유된 유당과 단백질 함량 및 지방 함량 등을 측정한 결과는 Table 7과 같음. WPC 내 유당이 7.66% 함유되어있으며, 총 단백질량은 73.62%로 당과 단백질의 비율은 약 1 : 10로 존재함을 확인하였음

Table 7. WPC characterization

	WPC
Moisture (%)	5.17±0.04
Total protein (%)	73.62±0.16
Total fat (%)	3.41±0.25
Lactose (%)	7.66±0.14
Ash (%)	2.64±0.00

7. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 면역 활성화 기능성 확인 (*in vitro*)

가. 실험방법

(1) NO assay 및 T 세포와 B 세포, NK 세포의 생육 증진을 통한 면역 활성화 확인

- WPC와 G-WPC, F-WPC의 면역 조절 활성을 확인하기 위해, 선천면역의 대표적인 세포로 알려진 대식세포 중 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성량을 비교하여 면역 활성화 증진 여부를 확인함. 다양한 면역세포 (B, T, NK 세포)의 생육 증진 활성을 확인함으로써 면역 활성화 증진 여부를 확인하였으며, 항체를 생산하는 B세포와 감염된 세포, 종양 세포 및 외부 세포를 접촉하여 죽이거나 B세포의 분화를 촉진하는 T세포는 림프구로 후천면역의 대표적인 세포임. T세포와 B세포의 생육이 증진된다는 것은 외부 침입 병원균에 대응할 수 있는 방어면역이 증가함을 의미함. 또한 자연살상 (NK) 세포는 미결정 세포독성 세포이며, 바이러스 감염 세포나 종양세포와 접촉하여 죽이는 기작을 하는 세포로서 대식세포, 수지상세포와 마찬가지로 우리 몸에 이미 존재하고 있는 대표적인 선천성 면역 세포임. NK세포 활성화도의 증가는 곧 체내 선천면역의 증가를 의미함
- T세포로 human leukemic T cell line인 Jurkat clone E6-1 (Jurkat)과 B세포로 mouse myeloma cell line인 Sp2/0-Ag14을 한국 세포주 은행 (KNCC)에서 구입하여 이용하였으며, NK세포는 human natural killer cell line인 NK-92MI 을 (ATCC)에서 얻어 이용하였음. 각 세포의 배양 조건은 Table 8과 같으며, 세포는 24-well에 분주하여 배양하였으며, T와 B 세포는 시료를 처리하였지만 NK 세포는 시료에 노출된 T와 B 세포의 상등액을 취해 처리함. T와 B 세포는 시료 처리 24 시간 후, NK 세포는 상등액 처리 48 시간 후를 1일로 하여 총 6일 동안 hemocytometer를 이용하여 각 세포의 생세포수를 측정함으로써 세포의 생육 증강도를 측정하였음 (Seo et al. 2011)

Table 8. Condition of each cell culture

Cell line	T cell (Jurkat)	B cell (Sp2/0-Ag14)	NK cell (NK-92MI)
Media	RPMI-1640 + HEPES	DMEM	α-MEM + L-glutamine + inositol + 2-mercaptoethanol + folic acid
Cell density (cells/mL)	1.0×10^4	1.0×10^4	1.0×10^4
Culture plate	24-well	24-well	24-well
Treatment	Samples	Samples	Supernatant of T or B cell

(2) 면역관련 바이오마커인 사이토카인 발현 확인

- 면역활성을 측정하는 지표로서 사이토카인인 TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6와 NO 생성에 관여하는 inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)를 이용하였으며, 본 실험에서는 각 시료를 이용하여 RAW 264.7 세포에서 사이토카인과 iNOS 생성을 효과적으로 조절하는 것을 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 방법을 통하여 확인하였음. mRNA 수준에서의 발현량을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포를 12-well plate에 4.5×10^5 cells/mL로 분주하여 실험에 이용하였으며, 모든 시료를 처리하기 전에 FBS가 들어가지 않은 배지로 6 시간 starvation 후 시료를 처리하였음. 시료를 처리하고 4 시간 (TNF- α , IL-1 β , iNOS, β -actin)과 12시간 (IL-6) 후 차가운 PBS로 씻어주고 500 μ L의 trizol을 처리하여 세포를 취하였음. mRNA 발현정도는 1.2% agarose gel에 전기영동 시킨 후 Gel-red (Koma Biotech, Seoul, Korea)로 염색하여 시각화함. 각 gene의 primer sequence와 크기, annealing temperature는 Table 9와 같음

Table 9. Primer sequences for RT-PCR

Primer	Sequence		Size	A.T.
TNF- α	Forward	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	432	60.5 $^{\circ}$ C
	Reverse	5'-AGCAATGACTCCAAAGTAGACC-3'		
IL-1 β	Forward	5'-ATGGCAACTGTTTCCTGAACTCAACT-3'	563	62.5 $^{\circ}$ C
	Reverse	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3'		
IL-6	Forward	5'-GATGCTACCAAACCTGGATATAATC-3'	269	63.3 $^{\circ}$ C
	Reverse	5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'		
iNOS	Forward	5'-CTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGCG-3'	487	64 $^{\circ}$ C
	Reverse	5'-GAGCCTCGTGGCTTTGGGCTCCTC-3'		
β -actin	Forward	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	514	60 $^{\circ}$ C
	Reverse	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'		

나. 실험결과

(1) NO assay를 통한 면역활성 기능성 확인

- WPC와 24 시간 반응 시킨 G-WPC, *LC01* 균주를 이용한 F-WPC의 면역 조절 활성을 비교하기 위해, RAW 264.7 세포에서의 NO 생성량을 LPS 처리군과 비교하였음. 25 μ g/mL의 시료들을 처리하였을 때의 NO 생성량을 비교한 결과 (Fig. 27), WPC, G-WPC, F-WPC 순으로 NO의 생성량이 증가하였으며 F-WPC의 NO 생성량은 LPS와 비슷한 수준

으로 증가하였음을 확인하였음. G-WPC를 *LC01* 균주로 발효하는 과정에서 균주의 생육을 위해 배지에 다른 단백질이 첨가되는데, F-WPC의 NO 생성량의 증가가 G-WPC 발효가수 분해물에 의한 효과가 맞는지 검증하고자 동일 발효가수분해 조건에서 G-WPC를 첨가하지 않은 것을 F-CON으로 하여 NO 생성량을 확인해보았음. 그 결과 F-CON의 NO 생성량은 F-WPC 보다 낮게 나타났으며, 이는 G-WPC의 NO 생성량과 비슷한 수준임을 확인하였음. F-CON의 NO 생성량이 F-WPC의 NO 생성량과 유의적으로 차이가 나타나는 것으로 보아 F-WPC의 NO 생성량 증가는 *LC01* 균주에 의한 G-WPC의 발효가수분해물의 효과로 볼 수 있음. NO는 선천면역의 대표적인 세포인 대식세포에 의해 생성되는 물질이므로, WPC가 마이알반응하고 발효가수분해되면서 NO의 생성량이 증가하는 것을 통해 선천 면역 증진에 효과가 있을 것으로 예상함. 또한 Nitric Oxide Synthase (NOS)는 L-arginine이 L-citruline으로 변화되는 과정에서 면역계에서 외부물질에 대한 방어작용을 하는 중요한 신호 전달 물질인 NO를 생성함 (Nathan et al. 1991). NOS는 세포질 내 항상 존재하는 constitutive (eNOS)와 면역학적으로 변화에 의해 유도되는 inducible form (iNOS)가 있으며, 이 중 LPS와 사이토카인에 의해 NOS 유전자 발현이 유도되는 것은 iNOS임 (Vane et al. 1994). RAW 264.7 세포에서 시료에 의한 iNOS의 발현을 확인한 결과 (Fig. 28), Fig. 27의 NO 생성량 결과와 유사하게 WPC, G-WPC, F-WPC 순으로 발현이 증가했고, F-CON에서의 발현량은 F-WPC보다 낮음을 통해 F-WPC의 iNOS 발현 증가에 F-CON이 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였음

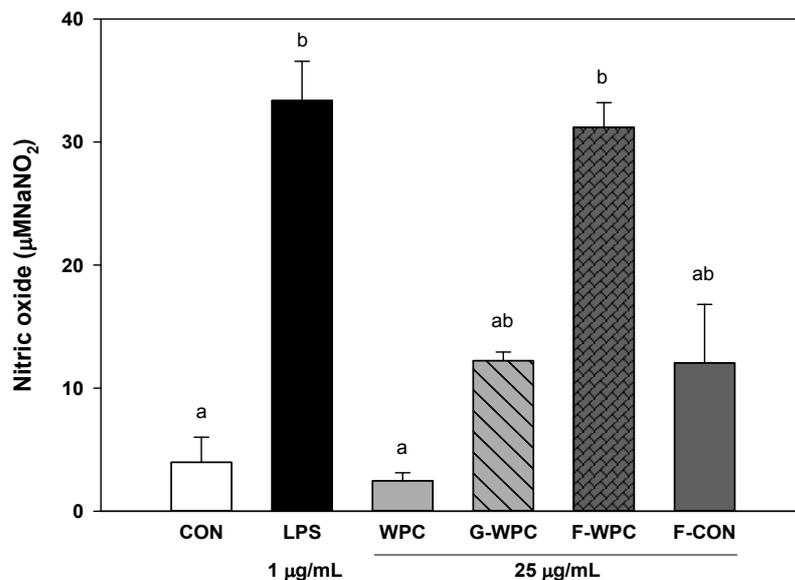


Fig. 27. Effect of G-WPC and F-WPC on NO production

F-WPC was G-WPC fermented by *LC01*. F-CON was fermented only *LC01* without G-WPC as control of F-WPC. The cell were treated sample 25 µg/mL for 24 h. LPS (1 µg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. ^{a-b} Mean with different letters are significantly different (p<0.05).

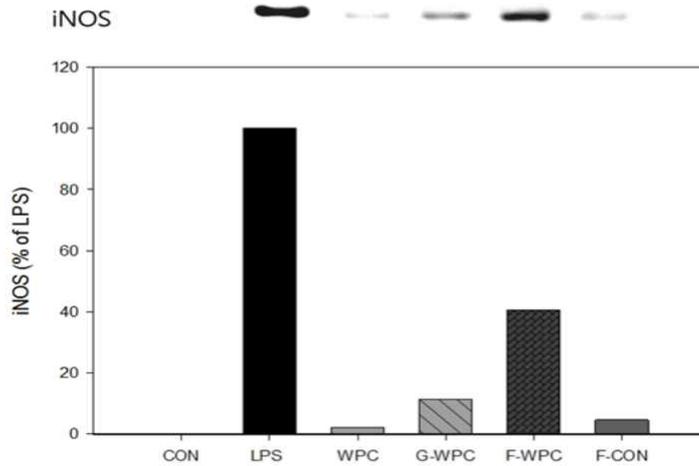


Fig. 28. Effects of iNOS expression in mRNA levels by G-WPC and F-WPC on RAW 264.7 cells

The cells were treated sample 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 4 h. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control.

(2) T 세포와 B 세포의 생육 증진을 통한 면역 활성화 확인

- 대표적인 후천 면역세포로 알려진 T, B 세포를 이용하여 WPC, G-WPC, F-WPC와 F-CON에 의한 생육 증진 정도를 확인한 결과 (Fig. 29), 시간이 경과함에 따라 T세포와 B세포의 생육은 증진하나 WPC, G-WPC, F-WPC, F-CON을 처리한 그룹들 간의 경향성 있는 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 앞선 선천 면역 증진 효과와는 달리 후천 면역에서는 효과가 있는 것으로 보이지 않음. 이전의 실험 결과에서 RAW 264.7 세포를 이용한 NO 생성량은 WPC, G-WPC, F-WPC로 갈수록 증가하는 경향을 보임 (Fig. 27). 이 점에 착안하여 T, B세포에 직접 WPC, G-WPC, F-WPC 그리고 F-CON을 처리하지 않고 RAW 264.7 세포에 각각 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 처리하고 24시간 뒤 그 상등액을 T, B 세포에 처리해 본 결과 동일한 결과를 얻었음

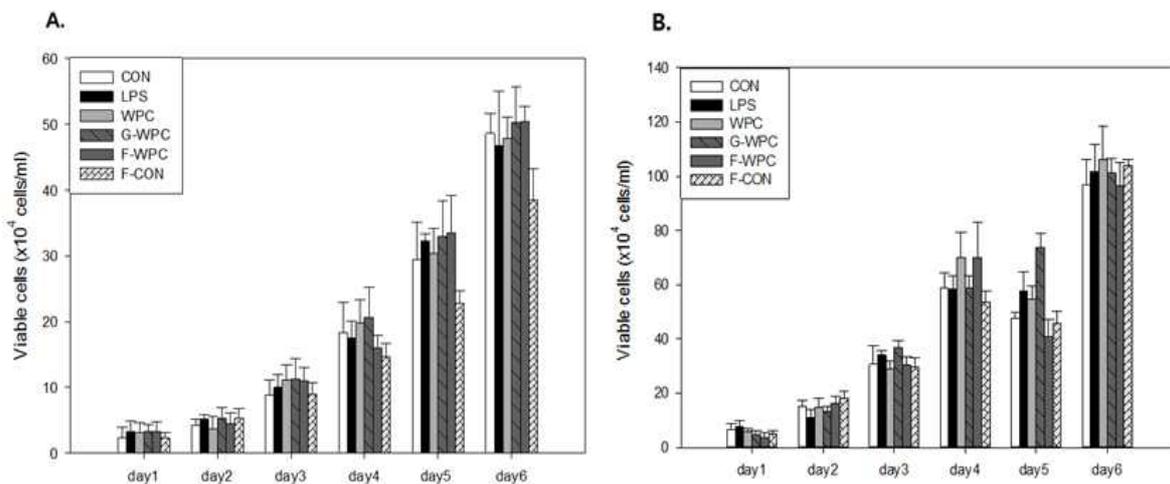


Fig. 29. T and B cells proliferation by G-WPC and F-WPC

T cells proliferation (A) and B cells proliferation (B). The cells were treated sample 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control.

(3) NK 세포 활성화 측정을 통한 면역 활성화 확인

- NK 세포는 T, B 세포에 비하여 보다 원시적인 생체 방어기구를 가지고 있다고 알려져 있는 선천성 면역 세포임. NK 세포에 T 세포 상등액을 처리, B 세포 상등액을 처리, T&B 세포의 상등액을 동시에 처리한 것을 모두 관찰해 본 결과, T 세포 상등액을 처리한 것 (Fig. 30A)은 6일차에 모든 군에서 생육이 증진하였으나 WPC, G-WPC, F-WPC 간에 유의적 차이가 없었음. 반면 B 세포의 상등액을 처리한 NK 세포 (Fig. 30B)는 6일차에 F-WPC를 처리한 그룹에서 다른 것에 비해 유의적으로 증가한 것이 관찰되었음. T와 B 세포의 상등액을 같이 처리한 NK 세포에서도 6일차에 다른 그룹에 비해 F-WPC를 처리한 그룹에서 유의적으로 증가하였으며 (Fig. 30C), 이는 B 세포의 영향인 것으로 파악됨. NK 세포의 생육증진은 B 세포의 상등액이 자극을 주는 것으로 생각하여 이후 NK 세포 생육증진 실험에는 B 세포의 상등액을 처리하였음. WPC, G-WPC, F-WPC와 F-CON을 25 μ g/mL의 농도로 B 세포에 처리하고 48시간 후 상등액을 NK 세포에 처리한 결과 (Fig. 30D), 6일차에서 F-WPC 처리그룹이 WPC 처리그룹보다 4.24 배, G-WPC 처리그룹보다 4.13 배 증가하였고, 또한 F-CON 처리그룹보다는 2.96 배 높은 생육 활성을 보였음. 생육증진의 결과가 발효 가수 분해물 때문이라는 것이 다시 한 번 확인하였음

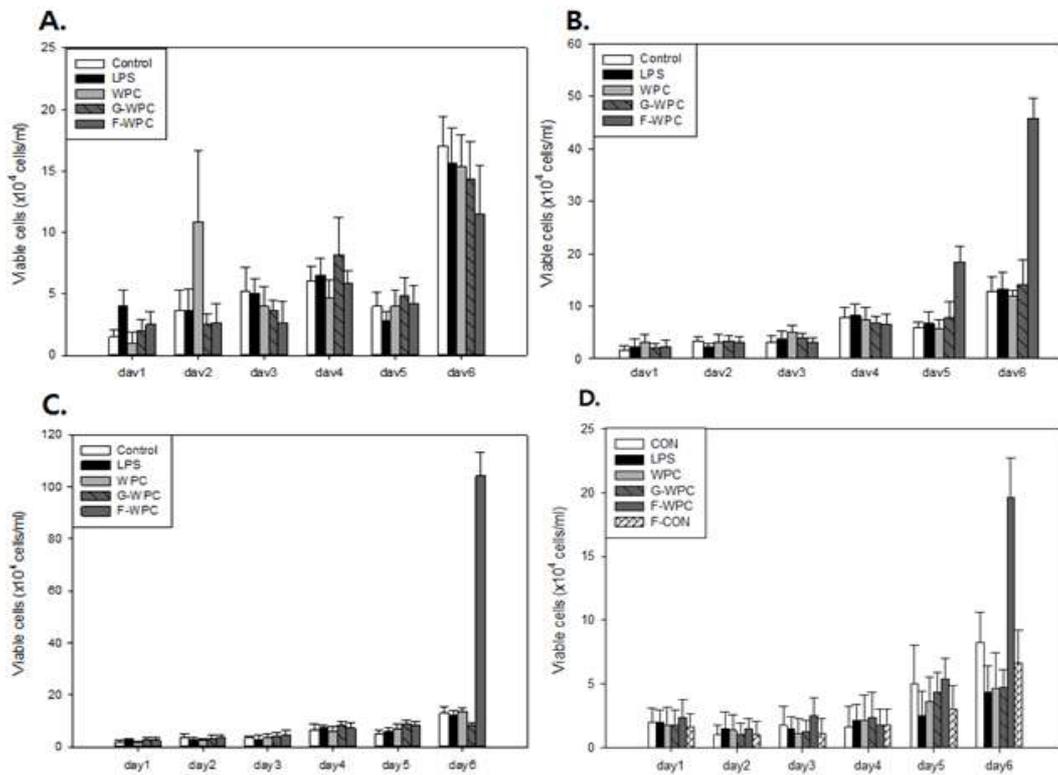


Fig. 30. Effects of NK cells proliferation

The T, B cells were treated WPC, G-WPC and F-WPC 25 μ g/mL for 48 h. LPS (1 μ g/ml) was used as positive control. The NK cells were treated a supernatant of T cells (A), a supernatant of B cells (B) and a supernatant of T & B cells (C). The B cells were treated WPC, G-WPC, F-WPC and F-CON 25 μ g/mL for 48 h. The NK cells were treated a supernatant of B cells (D). Columns are significantly different ($P < 0.001$) as determined by one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test.

(4) 면역 관련 바이오마커인 사이토카인과 iNOS의 발현 확인

- TNF- α 는 수지상세포를 성숙시켜 T 세포의 활성화와 성장 등을 조절하며 암세포의 살상 및 암 전이의 억제 작용 등의 항암작용을 나타냄 (Strieter et al. 1993, Kikuchi et al. 2003). IL-1 β 는 T세포의 활성화, B 세포의 성숙 및 NK 세포의 활성을 증가시키며, 암세포의 증식을 억제하는 활성을 가지고 있고, IL-6는 B 세포의 분화 촉진, 항체 분비 자극, Ig 생성 유도 및 T 세포의 분화 증식에 관여함 (Chen et al. 2001, Delgado et al. 2003). 따라서 이 cytokine들의 생성을 촉진하는 물질은 면역반응을 조절하는 작용과 항암기능을 가지고 있을 것으로 추정됨. mRNA 수준에서 시료에 의한 사이토카인들 (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 발현을 확인한 결과 (Fig. 31), TNF- α , IL-1 β , IL-6 모두 WPC, G-WPC, F-WPC 순으로 발현이 증가함을 확인하였음. House keeping gene으로 β -actin을 이용하여, 이미지를 정량하였으며, TNF- α 의 경우 F-WPC는 WPC 보다 1.31배, G-WPC 보다 1.41배 높은 발현을 보였음. IL-1 β 의 경우 F-WPC가 WPC보다 8.35배, G-WPC 보다 2.11배 높은 발현을 보였으며, IL-6의 경우 다른 사이토카인들에 비해 LPS의 발현량이 매우 높았으며, F-WPC는 WPC보다 30.98배, G-WPC 보다 6.34배 높은 발현을 보였음. F-CON의 발현은 세 사이토카인 모두 F-WPC 보다 적게 발현된 것으로 보아 F-WPC의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 발현 증가에 F-CON이 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨

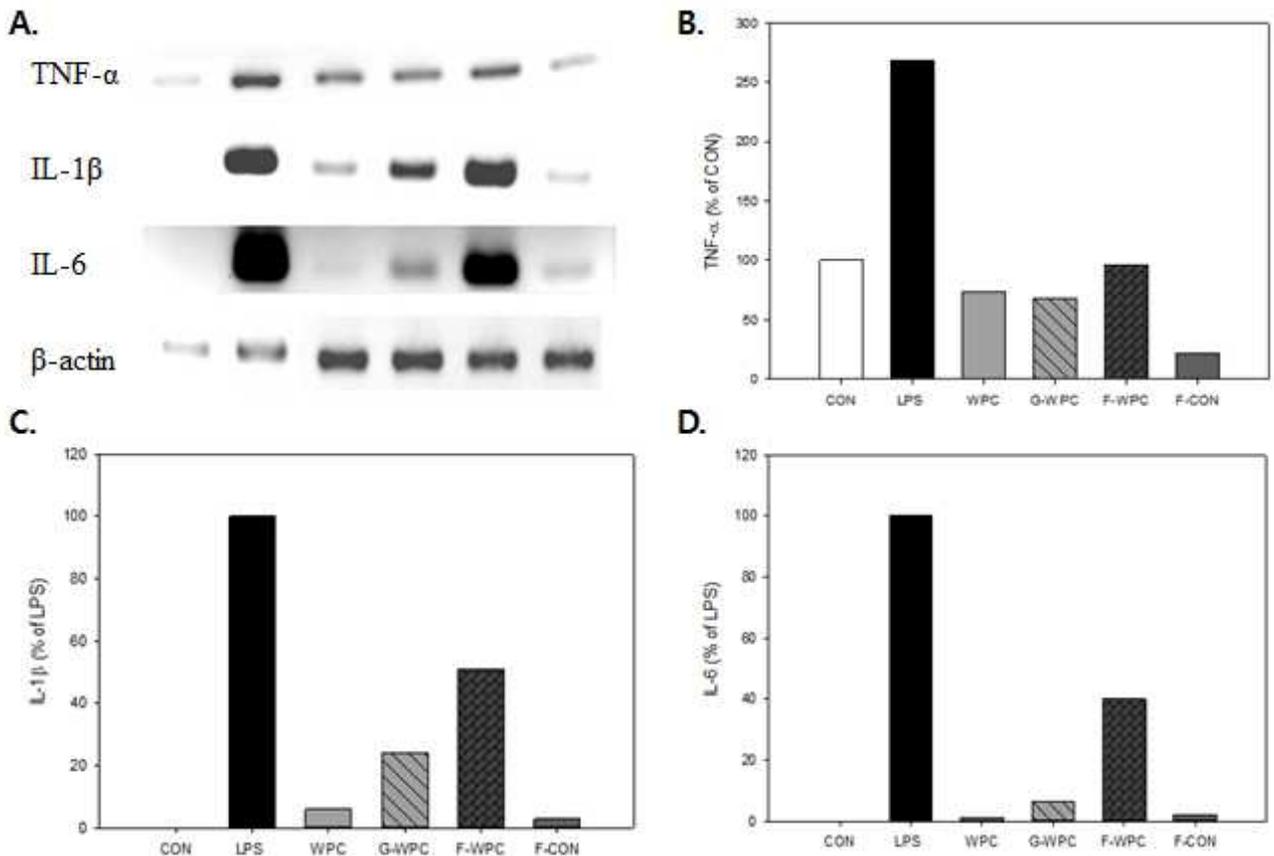


Fig. 31. Effects of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and β -actin expression in mRNA levels by G-WPC and F-WPC on RAW 264.7 cells

The cells were treated sample 25 μ g/mL for 4 h (TNF- α , IL-1 β , β -actin) or 12 h (IL-6). LPS (1 μ g/ml) was used as positive control.

8. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 대식 작용 활성화 확인 (*in vitro*)

가. 실험방법

- 대식세포의 외부 병원균 침입에 대한 1차 면역 방어 체계로서 가장 대표적인 활성화는 대식 작용이며, 대식세포의 역할은 항원을 잡아먹은 다음 활성화산소와 질소물질의 독성을 이용하여 항원을 죽이는 것임. 따라서 대식세포의 대식작용이 활성화 된다는 것은 면역 활성화의 증가를 의미함 (Aderem et al. 1999)
- *E. coli* 전처리 : fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-labeled *E. coli*는 invitrogen에서 구입하였으며, 살아있는 균주를 세포에 처리하기 위해 5×10^6 CFU/well이 되도록 PBS에 녹이고 동량의 opsonizing reagent와 섞어 반응시켜줌. 1시간 뒤 PBS로 세척하여 추후 실험에 사용하였음
- 대식세포인 RAW 264.7 세포를 4.5×10^5 cells/mL로 12 well에 분주하여 실험에 이용하였으며, 각 well에 시료를 처리한 후 24시간 뒤 전처리된 FITC-*E. coli* (5×10^6 CFU/well)를 100 μ l씩 첨가하고 2시간 배양함. 각 well에 100 μ L의 trypan blue를 처리하고 1분 뒤 PBS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 침투하지 못한 FITC-*E. coli*를 5번 씻어내 제거하였음. RAW 264.7 세포의 대식작용 확인을 위해 confocal laser scanning microscope (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Germany)를 사용하였고, 이미지 정량을 위해 Image J (Research Service Branch, National Institutes of Mental Health, Bethesda, USA)를 사용하였음. 대식세포의 대식작용 활성화는 RAW 264.7 세포에 처리해 세포내 섭취된 FITC-*E.coli*의 양을 측정함으로써, 시료가 첨가되지 않은 FITC-*E. coli*만 첨가된 대조군과 비교하여 시료의 대식작용 활성화를 비교하였음

나. 실험결과

- FITC-*E.coli*를 RAW 264.7 세포에 처리해 세포 내 섭취된 FITC-*E.coli*의 양을 측정함으로써, 각 그룹간의 대식작용 활성화 정도를 비교하였음 (Fig. 32). Fig. 32A는 RAW 264.7 세포의 confocal laser scanning image이며 이를 image J를 통해 정량한 결과 (Fig. 32B), WPC와 G-WPC 사이의 유의적 차이는 발견되지 않았으나, F-WPC는 유의적으로 LPS 수준으로 증가함을 확인하였음. 대식작용 활성화에서도 NO 생성량이나 사이토카인 발현과 마찬가지로 F-CON의 작용을 확인해 본 결과, F-CON의 대식작용 활성화 정도는 WPC나 G-WPC 수준이며, F-WPC 보다 적음을 확인하였음. 따라서 F-WPC의 대식작용 활성화 증가에 F-CON이 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단함. 결과적으로, WPC를 24시간 반응하여 얻은 G-WPC를 *LC01* 균주를 이용하여 발효 가수분해한 F-WPC는 대식세포를 활성화하여 대식작용의 활성화를 증가시키고, iNOS의 발현을 증가시켜 NO의 생성을 높이고, TNF- α , IL-1 β , IL-6등의 사이토카인의 발현을 증가시킴. 또한 T, B 세포에 직접적인 생육증진 활성을 나타내지는 않았으나, B 세포의 상등액을 처리한 NK 세포의 활성화가 증진됨을 확인하였음. 이상의 근거를 토대로 본 연구에서 사용된 F-WPC는 면역 증진에 효과가 있다고 판단함

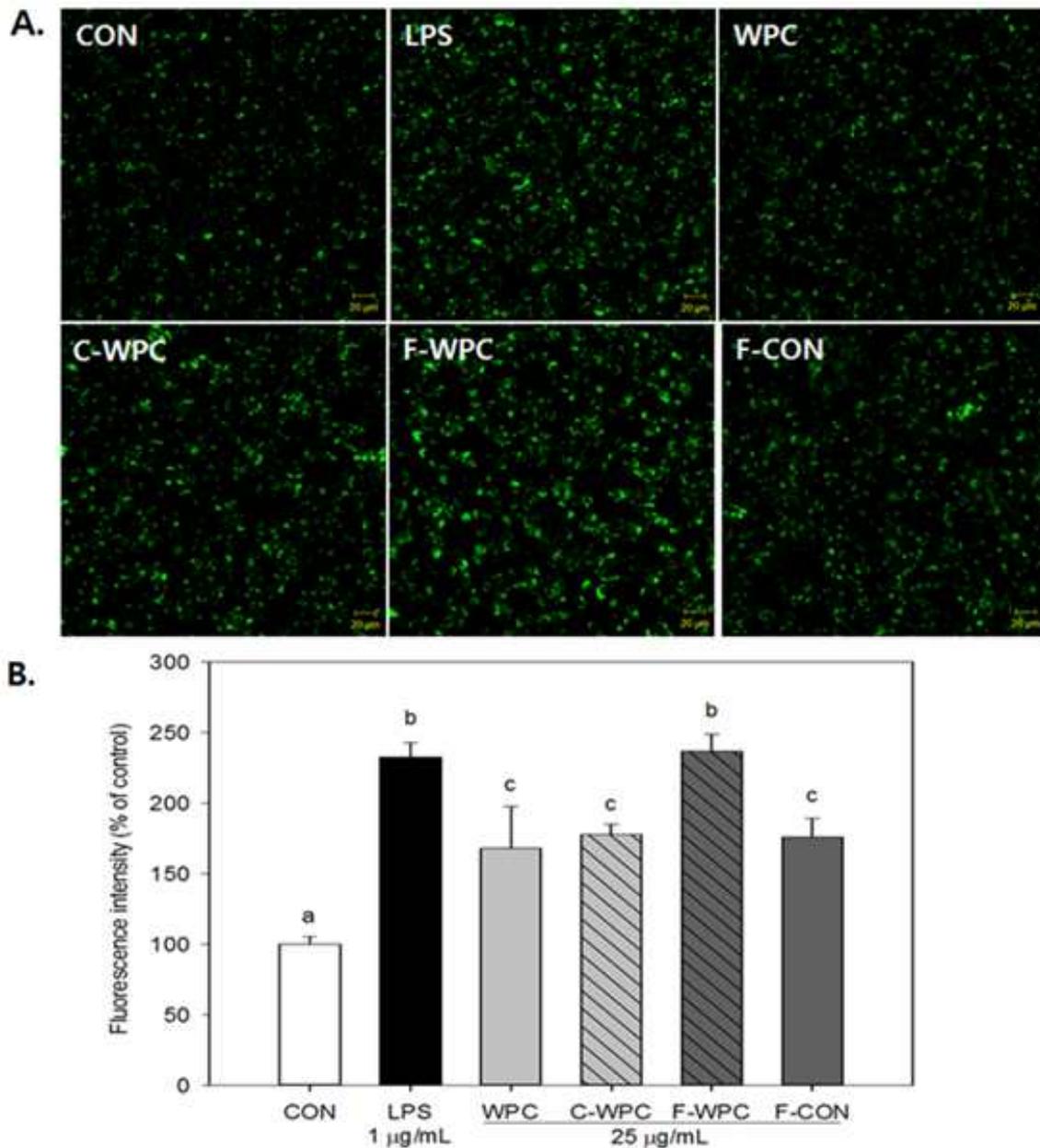


Fig. 32. Phagocytosis effect of G-WPC and F-WPC on RAW 264.7 cells

A confocal laser scanning microscope image (A) and image analysis using image J (B). The cells were treated with samples 25 μg/ml for 24 h. FITC-labeled *E. coli* was added each well and incubated for 24 h. Sample were compared with control. LPS (1 μg/mL) was used as positive control. Value are shown as mean ± S.D. of three individual experiments. The results have no significantly different ($p < 0.05$).

9. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 반복 투여 독성시험 (*in vivo*)

가. 실험방법

- 14일 반복투여 독성시험을 위해 7주령의 Sprague-Dawley rat (SD rat, 수컷 : 230 g, 암컷 : 170 g)을 암수 각각 20마리씩 준비하여 일주일 간의 순화를 하였음. Rat은 케이지에서 사육되었으며 자유 음수 섭취 및 표준 사료를 제공하였고 그룹별 분류는 Table 10과 같음. 14일 동안 Control group (CON)은 Distilled water (D.W.)를, 나머지 그룹들은 WPC, G-WPC, F-WPC를 1000 mg/kg body weight의 농도로 경구 투여하고, 매일 오전 열시에 음수량과 사료 섭취량을 확인하여 기록하였고 1, 4, 8, 11, 14일째에 몸무게를 기록하였으며 설사, 이상 유무 등도 확인함. 실험 종료 후 24시간 동안 절식 후 희생하고 EDTA-3K가 포함된 튜브에 전혈을 채취하여 white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT)를 측정함. 또한 채취한 혈액 일부를 serum sep clot activator 튜브에 넣고 상온에서 30분에서 1시간 둔 뒤, 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻음. 이 혈청으로 total protein (T.P), albumin (ALB), glucose (GLU), total cholesterol (CHOL), total bilirubin (T.BIL), glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), alkaline phosphate (ALP)를 측정함. 장기(흉선, 심장, 폐, 신장, 간, 비장, 정소/난소)를 적출하여 무게를 측정하였음

Table 10. Grouping of animals

	Group	Sample (dose)	Number (male + female)
1	CON	Distilled Water (DW)	10
2	WPC	WPC (1,000 mg/kg·bw)	10
3	G-WPC	G-WPC (1,000 mg/kg·bw)	10
4	F-WPC	F-WPC (1,000 mg/kg·bw)	10

나. 실험결과

- 14일 동안, 죽거나 이상 증상을 보인 쥐는 없었음 (Table 11). 경구투여 시작일부터 실험 종료일까지 쥐의 평균 몸무게는 수컷은 70 g, 암컷은 40 g이 증가하였음. CON1 그룹과 비교하여 샘플 처리 그룹들에서 몸무게의 통계적인 유의적 차이는 보이지 않음 (Table 12)
- Rat의 부검 후, 육안으로 보이는 샘플 투여로 인한 이상 증상은 보이지 않음. 또한 샘플 처리 그룹군에서 장기(흉선, 폐, 심장, 신장, 간, 비장 그리고 정소/난소)의 무게는 CON 그룹과 비교하여 유의적 차이를 보이지 않음 (Table 13). 독성 물질을 섭취하면 해독작용을 하

는 간이 독성 물질에 크게 영향을 받게 되며, Table 12의 결과를 보면 간의 무게는 그룹 간에 차이를 보이지 않는 것으로 보아 샘플의 독성은 없는 것으로 생각됨. 다른 장기들의 무게에 있어서도 동일한 결과를 보임

- Rat의 사료 섭취량과 음수량은 다음과 같았음. 수컷과 암컷의 사료 섭취량은 각각 CON 그룹에서 수컷 30.59 ± 3.14 g/day, 암컷 26.12 ± 3.05 g/day; WPC 그룹은 35.51 ± 3.10 g/day, 24.07 ± 3.12 g/day; G-WPC 그룹은 35.84 ± 4.49 g/day, 26.82 ± 4.09 g/day; F-WPC 그룹은 32.37 ± 3.89 g/day, 24.50 ± 4.39 g/day이었음. 수컷과 암컷의 음수량은 각각 CON 그룹에서 수컷 34.43 ± 6.58 mL/day, 암컷 34.14 ± 10.92 mL/day; WPC 그룹은 41.07 ± 6.67 mL/day, 40.75 ± 7.38 mL/day; G-WPC 그룹은 41.14 ± 7.43 mL/day, 40.57 ± 7.16 mL/day; F-WPC 그룹은 39.43 ± 7.14 mL/day, 42.33 ± 4.27 mL/day이었음
- 샘플의 경구투여 후, 쥐에서 혈액을 채취하여 hematological value (Table 14)와 biochemical value (Table 15)를 측정 한 결과, 모든 그룹군에서 각 수치의 유의적인 차이는 보이지 않았으며 WPC, G-WPC, F-WPC는 섭취 시 동물에 독성을 나타내지 않았음

Table 11. Mortality of SD rats orally administered with WPC, G-WPC and F-WPC for 14-day repeated toxicity test

Group summary of mortality															
		Days on test													
Groups		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CON	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WPC	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G-WPC	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-WPC	a	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number of animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

Table 12. Body weight in SD rats orally administered with WPC, G-WPC and F-WPC for 14-day repeated toxicity test

Period	Group	Summary of body weight (g)			
		Samples (1,000 mg/kg·bw)			
		CON	WPC	G-WPC	F-WPC
Day 1	Male	209.2 ± 26.8	234.6 ± 6.8	236.4 ± 14.2	231.60 ± 11.5
	Female	177.4 ± 7.0	168.8 ± 1.9	160.2 ± 14.7	172.8 ± 11.7
Day 4	Male	242.8 ± 28.4	268.2 ± 13.0	271.6 ± 14.3	265.6 ± 7.1
	Female	190.0 ± 3.5	183.8 ± 11.8	180.6 ± 19.5	185.8 ± 13.8
Day 8	Male	263.2 ± 27.6	295.5 ± 5.9	295.25 ± 15.9	282.4 ± 14.4
	Female	201.6 ± 5.0	189.4 ± 12.6	185.0 ± 25.5	198.0 ± 13.6
Day 11	Male	261.6 ± 35.5	305.2 ± 11.3	300.4 ± 23.1	292.6 ± 22.4
	Female	203.4 ± 10.3	197.0 ± 11.0	187.4 ± 31.2	201.2 ± 15.3
Day 14	Male	266.0 ± 33.9	321.7 ± 9.8	307.0 ± 25.0	294.2 ± 40.2
	Female	214.8 ± 8.3	203.6 ± 10.7	205.2 ± 30.9	200.8 ± 20.3

Table 13. Organ weight in SD rats orally administered with WPC, G-WPC and F-WPC for 14-day repeated toxicity test

Organ (g)	Male				Female			
	CON	WPC	G-WPC	F-WPC	CON	WPC	G-WPC	F-WPC
Thymus	0.63±0.18	1.03±0.87	0.69±0.16	0.63±0.23	0.47±0.04	0.51±0.17	0.41±0.04	0.47±0.13
Lung	1.50±0.18	1.65±0.09	1.52±0.16	1.48±0.16	1.31±0.10	1.29±0.09	1.21±0.14	1.22±0.09
Heart	1.08±0.12	1.24±0.08	1.26±0.11	1.12±0.15	0.97±0.04	0.89±0.07	0.86±0.19	0.85±0.10
Kidney	2.28±0.62	2.74±0.20	2.69±0.27	2.54±0.21	1.78±0.07	1.76±0.06	1.80±0.33	1.85±0.21
Liver	10.28±1.75	11.98±0.90	11.44±2.15	10.77±2.37	7.66±0.82	7.44±0.44	7.92±1.39	7.23±0.92
Spleen	0.73±0.09	0.82±0.05	0.78±0.07	0.75±0.18	0.67±0.08	0.59±0.08	0.62±0.09	0.60±0.07
Testis/ Ovary	3.42±0.22	3.35±0.46	3.16±0.09	3.29±0.12	0.17±0.04	0.14±0.02	0.16±0.04	0.17±0.02

Table 14. Hematological values in SD rats orally administered with WPC, G-WPC and F-WPC for 14-day repeated toxicity test

Parameter	Male (dose : 1,000 mg/kg·bw)				Female (dose : 1,000 mg/kg·bw)			
	CON	WPC	G-WPC	F-WPC	CON	WPC	G-WPC	F-WPC
WBC (10³ /μL)	7.88±0.40	7.25±0.05	7.83±0.87	7.79±0.45	7.55±0.38	7.38±0.36	7.56±0.38	7.63±0.73
RBC (10⁶ / μL)	5.59±1.13	4.75±0.22	5.86±0.66	4.63±1.32	4.30±0.45	3.66±1.04	3.53±1.25	2.62±0.80
HCt (%)	47.60±2.20	45.64±0.79	48.12±4.28	47.60±2.41	45.82±2.16	44.80±1.71	46.84±3.11	46.44±4.37
Hb (g/dL)	15.02±0.25	13.96±0.89	15.40±1.09	15.08±1.03	15.02±0.48	14.78±0.25	15.76±1.46	15.28±0.28
MCV (μ³)	60.46±2.40	62.96±1.34	61.62±1.48	61.18±1.40	60.74±1.13	60.76±1.41	62.04±4.45	60.86±2.39
MCHC (g/dL)	31.56±1.35	30.62±2.31	32.06±1.13	31.68±1.47	32.76±0.91	33.04±1.15	33.62±2.41	33.16±3.94
PLT (10³ / μL)	1063.80 ± 214.09	1054.00 ± 158.88	1040.20 ± 164.42	938.80 ± 437.32	1146.00 ± 88.10	1001.40 ± 96.50	1122.40 ± 143.22	1124.40 ± 97.77

Table 15. Serum biochemical values in SD rats orally administered with WPC, G-WPC and F-WPC for 14-day repeated toxicity test

Parameter	Male (dose : 1,000 mg/kg·bw)				Female (dose : 1,000 mg/kg·bw)			
	CON	WPC	G-WPC	F-WPC	CON	WPC	G-WPC	F-WPC
ALB (g/dL)	3.8±0.2	3.9±0.1	3.9±0.1	3.8±0.2	3.9±0.2	3.8±0.1	4.1±0.1	3.9±0.2
T.BIL (mg/dL)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
ALP (U/L)	167.4±30.5	212.0±18.1	169.4±25.3	193.6±28.5	161.8±44.9	142.2±30.1	196.2±95.8	128.6±16.5
AST (U/L)	152.2±41.9	160.0±34.6	156.0±53.1	139.0±20.6	134.0±16.2	122.4±41.1	119.0±9.4	144.6±17.1
ALT (U/L)	45.6±9.1	47.0±10.7	49.2±8.5	51.4±17.9	35.8±8.6	30.6±4.4	35.0±9.3	33.8±7.5
GLU (mg/dL)	155.8±29.3	141.6±19.0	147.0±17.5	150.2±19.9	169.6±30.1	163.2±16.6	154.8±48.4	110.0±19.5
CHOL (mg/dL)	66.8±8.0	74.2±14.7	63.0±8.3	69.4±9.1	77.0±7.4	82.0±15.7	81.6±12.0	81.6±11.7
T.P (g/dL)	5.4±0.3	5.6±0.1	5.6±0.1	5.4±0.3	5.5±0.1	5.6±0.1	5.7±0.2	5.5±0.2

10. 유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 항종양 및 면역 활성화 기능성 확인 (*in vivo*)

가. 실험방법

(1) 실험동물 사육 환경 및 종양 유발

- 8주령의 수컷 BALB/c mice (20-22 g)를 56마리 준비하여 일주일 간의 순화를 하였으며, 마우스는 케이지에서 사육되었으며 자유 음수 섭취 및 표준 사료를 제공하였고 그룹별 분류는 Table 16와 같음.
- Sarcoma 180 세포는 한국 세포주 은행 (KNCC)에서 구입하여 이용하였으며, 세포는 10%의 heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1%의 항생제를 첨가한 Roswell Park Memorial Institute with L-glutamine (RPMI)-1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였음. 종양 유발에 충분한 정도의 세포가 자라면 T-75 flask에 있는 배지를 모아 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여, 상등액을 제거하고 PBS로 희석하여 한 마리당 1.0×10^7 cells/mL의 농도로 0.3 mL씩 rat의 왼쪽 사타구니에 피하 주사하여 종양을 유발함. 암세포 주입 일주일 후부터 2주간 CON과 Negative control (NC) 그룹은 D.W.를 투여하고 나머지 그룹은 각각의 샘플을 고농도 (1,000 mg/kg·bw)와 저농도 (100 mg/kg·bw)로 경구 투여함. 각 그룹은 7마리씩 배정하여 총 8그룹으로 나누었으며, CON 그룹은 암세포를 주입하지 않고 D.W.만 먹인 그룹이고, NC 그룹은 암세포 주입하여 종양을 유발한 뒤 D.W.를 먹인 것이며 나머지 샘플 처리 그룹들은 암세포 주입 후 각각의 샘플을 고농도 (1000 mg/kg·bw)와 저농도 (100 mg/kg·bw)로 경구투여 하였음

Table 16. Grouping of animals

	Group	Injection of sarcoma cell	Sample (dose)	Number of mice
1	Control (CON)	X	Distilled Water (DW)	7
2	Negative control (NC)	O	Distilled Water (DW)	7
3	High dose of WPC (WH)	O	WPC (1,000 mg/kg·bw)	7
4	Low dose of WPC (WL)	O	WPC (100 mg/kg·bw)	7
5	High dose of G-WPC (GH)	O	G-WPC (1,000 mg/kg·bw)	7
6	Low dose of G-WPC (GL)	O	G-WPC (100 mg/kg·bw)	7
7	High dose of F-WPC (FH)	O	F-WPC (1,000 mg/kg·bw)	7
8	Low dose of F-WPC (FL)	O	F-WPC (100 mg/kg·bw)	7

(2) 혈청의 NO assay를 통한 면역 활성화 확인

- 혈액 속의 Nitric oxide (NO)는 면역계에서 다양한 역할을 하며, 활성화된 대식세포에서 만들어 지는 NO는 암세포의 성장 저해와 사멸을 유도함. 또한 iNOS의 유도는 림프구에서 tumor necrosis factor (TNF)와 interferon (IFN)- γ 를 방출시켜 암세포의 사멸을 이끌어

냄. 혈액 내 존재하는 NO의 측정은 세포 내 NO 생성량 측정법과 동일하게 Griess method를 이용하였음. NO assay의 음성대조군으로는 암세포인 sarcoma 180 cell을 주입하여 종양을 유발한 뒤 D.W.만 먹인 NC 그룹을 이용하였으며, 채취한 혈액을 ep tube에 담아 아이스에 넣고 10분 정도 둔 뒤, 12,000 RPM에서 10분간 원심 분리하여 그 상등액인 혈청을 얻음. 혈청 80 μ L를 취하여 96 well plate에 분주하고, 80 μ L의 Griess reagent (1% Sulfanilamide / 5% phosphoric acid 용액 40 μ L와 0.1% NEAD 40 μ L)를 첨가한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질로 sodium nitrate (NaNO_2)를 이용하였으며, 0~100 μ M의 농도로 DMEM 배지에 희석하여 실험에 사용하였음

(3) 혈청의 Lysozyme activity를 통한 면역 활성 확인

- Lysozyme은 선천 면역계에서 중요한 방어 물질로, 미생물 침입에 저항하는 역할을 함. 항균 작용 외에도 대식세포와 백혈구를 활성화함으로써 직접적으로 대식작용을 유도하는 역할을 하거나 간접적으로 옹소닌 작용을 하기도 함 (Saurabh et al. 2008). lysozyme은 활성화된 대식세포에서 방출되는 효소로 대식작용 하는 동안 나옴 (Nudo et al. 2011). 이 효소는 직접적으로 면역 세포를 활성화시키거나 암세포의 면역원성 (immunogenicity)를 증가시키는 역할을 하여 결과적으로 항암 효과를 나타냄 (Sava et al. 1988)
- Lysozyme activity 측정은 *Micrococcus lysodeikticus* 현탁액을 혈청 속 lysozyme이 lysis 하는 정도를 측정하는 방법을 이용하였음 (Nudo et al. 2011). 마우스에서 채취한 혈액을 ep tube에 담아 아이스에 넣고 10분 정도 둔 뒤, 12,000 RPM에서 10분간 원심 분리하여 그 상등액인 혈청을 얻음. 75 mg의 *Micrococcus lysodeikticus* (sigma-aldrich, M-3770)를 100 mL의 0.1 M phosphate/citrate buffer with 0.09% NaCl (pH 5.6)에 넣어 녹임. 96 well plate에 앞에서 만든 균 현탁액 175 μ L를 분주한 뒤, 혈청 또는 표준물질인 hen egg white lysozyme standard (sigma-aldrich, L-6876)를 25 μ L 첨가하여 30분 정도 상온에 둠. 그런 다음 lysis한 정도를 450 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질로 사용된 hen egg white lysozyme standard는 0~50 μ g/mL의 농도로 0.1 M phosphate/citrate buffer with 0.09% NaCl (pH 6.8)에 녹여 준비하여 실험에 사용하였음

(4) 면역관련 바이오마커인 사이토카인 발현 확인

- 면역활성을 측정하는 지표로서 사이토카인인 Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β 를 이용하였으며, 본 실험에서는 각 시료를 이용하여 마우스 비장 조직에서 사이토카인 생성을 효과적으로 조절하는 것을 RT-PCR 방법을 통하여 확인하였음. mRNA 수준에서 사이토카인 발현량을 측정하기 위해 마우스의 비장에 trizol reagent (Invitrogen)을 넣고 갈아 RNA를 추출하였음. cDNA synthesis kit (Legene Bioscience Inc.)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, thermal cycler (BioRad)로 합성한 cDNA를 증폭시킴. mRNA 발현정도는 1.2% agarose gel에 전기영동 시킨 후 Gel-red (Koma Biotech, Seoul, Korea)로 염색하여 시각화함. 각 gene의 primer sequence와 크기, annealing temperature는 Table 17과 같음

Table 17. Primer sequences for RT-PCR

Primer	sequence		size	A.T.
TNF- α	Forward	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	432	60°C
	Reverse	5'-AGCAATGACTCCAAAGTAGACC-3'		
IFN- α	Forward	5'-CTACCTCAGACTCTTTGAAGTCT-3'	246	59.3°C
	Reverse	5'-CAGCGACTCCTTTTCCGCTT-3'		
IL-1 β	Forward	5'-ATGGCAACTGTTCTTGAAGTCAACT-3'	555	61.4°C
	Reverse	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3'		
β -actin	Forward	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	514	60°C
	Reverse	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'		

(5) 고행암의 부피 감소를 통한 항종양 효과 확인

- 마우스에서 고행암을 적출하여 버니어 캘리퍼스를 이용하여 가장 긴 길이와 가장 짧은 길이를 잴. 고행암의 부피는 다음의 식을 이용하여 구함

$$\text{고행암의 부피} = \frac{1}{2} \times \text{largest length} \times (\text{smallest length})^2$$

나. 실험결과

(1) 혈청의 NO assay를 통한 면역 활성화 확인

- 암세포의 성장저해와 사멸은 면역계에서 NO의 한 기능임. iNOS에 의한 NO의 생성은 암 전이를 방지하는 역할을 한다는 것이 *in vivo* 실험에서 검증된 바 있음. NO는 암세포 성장을 위한 필수 효소를 저해하고, 암세포가 TNF-induced cytotoxicity에 민감하게 만듦으로써 항암 작용을 나타냄 (Bogdan, 2001)
- 모든 샘플 처리 그룹군에서 NO의 생성은 NC 그룹보다 4배에서 10배 이상 증가한 것을 관찰할 수 있음 (Fig. 33). 이것은 WPC, G-WPC, F-WPC가 sarcoma cell의 주입으로 인한 종양 유발로 감소되었던 NO의 양을 CON 그룹 수준으로 또는 그 이상으로 회복시켰음을 의미함. 특히, 저농도(100 mg/kg body weight)의 F-WPC (FL)를 투여하였을 때 혈청 속 생성된 NO의 양은 78.2 μ M로 유의적으로 가장 많았음. 이러한 결과로 비추어보아 F-WPC는 NO를 생성하며 면역계에 영향을 미치고, 항종양 효과를 보임을 확인할 수 있었음

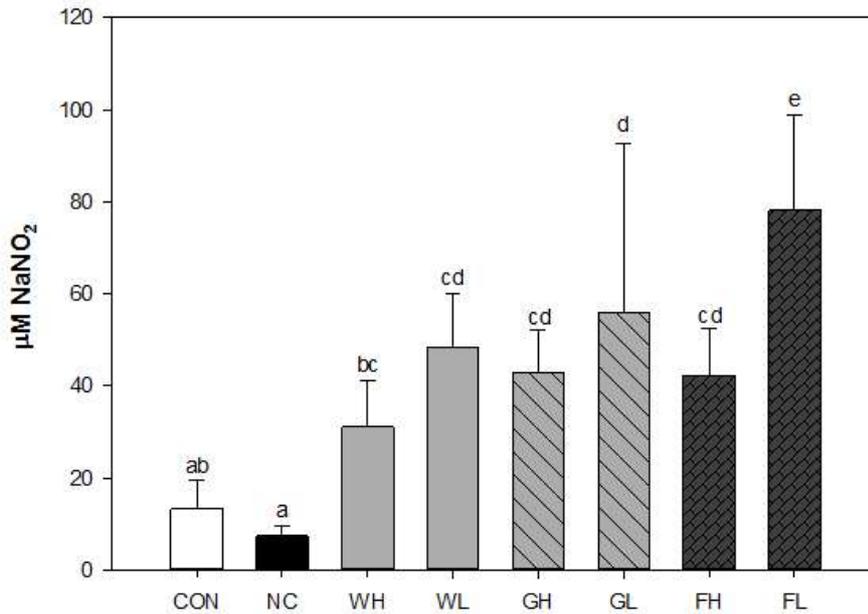


Fig. 33. Effect of WPC, G-WPC and F-WPC on NO production in serum

CON; control group, NC; negative control group that transplanted sarcoma cells, WH; group administrated high dose of WPC, WL; group administrated low dose of WPC, GH; group administrated high dose of G-WPC, GL; group administrated low dose of G-WPC, FH; group administrated high dose of F-WPC, FL; group administrated low dose of F-WPC. High dose was 1,000 mg/kg body weight and low dose was 100 mg/kg body weight. Values are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. ^{a-e} Means are significantly different at the $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range test for value.

(2) 혈청의 Lysozyme activity를 통한 면역 활성 확인

- Fig. 34에 의하면, NC 그룹의 평균적인 lysozyme 양은 CON 그룹보다 적은 것을 알 수 있음. sarcoma 180 cell의 투여로 인한 종양 유발이 혈청 속 lysozyme의 양을 감소하게 만들었고 그 결과 보통의 쥐에 비해 방어 능력이 감소한 것이라고 생각됨. WPC와 G-WPC가 혈청 속 lysozyme의 양을 CON 그룹 수준으로 증가시킨 것을 확인할 수 있었으나 각각의 샘플에서 고농도와 저농도 투여 그룹 사이에 큰 유의적인 차이를 보이지 않음. F-WPC의 투여는 혈청 내 lysozyme의 양을 CON 그룹 수준으로 또는 그 이상으로 증가시켰음. 특히 저농도의 F-WPC 투여는 lysozyme의 양 (16.62 $\mu\text{g/mL}$)을 유의적으로 증가시키며 대식세포로 하여금 대식작용을 유도하고, 암으로부터 숙주의 방어 시스템을 돕는 역할을 하며 면역 증진 효과뿐만 아니라 항암효과도 보임

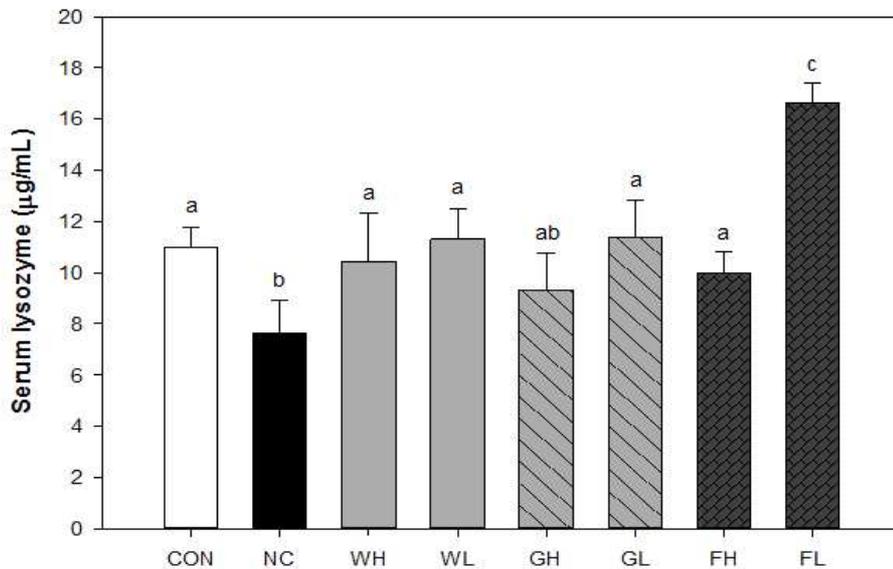


Fig. 34. Effect of WPC, G-WPC and F-WPC on serum lysozyme activity

Values are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. ^{a-c} Means are significantly different at the $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range test for value.

(3) 면역관련 바이오마커인 사이토카인 발현 확인

- IFN- γ 는 활성화된 대식세포가 암세포를 살상하게 하는 기폭제 (priming agent)로서의 역할을 함. IFN- γ 는 nitric oxide synthase (NOS)에 대한 유전자의 발현을 증가시키며 NOS에서 생성된 NO는 cytotoxic mediator의 역할을 함 (Lorsbach et al. 1993). IFN- γ 는 LPS에 의해 자극받은 단핵구에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 mRNA를 증진시킴 (Burchett et al. 1988). TNF- α 는 대식세포가 암세포를 파괴하는 역할을 하도록 하는 중요한 mediator임 (Urban et al. 1986). 또한 대식세포의 대식작용을 촉진시키는 항암 작용을 하는 사이토카인으로 알려져 있음 (Balkwill, 2009). IL-1 β 는 T세포의 활성화, B 세포의 성숙 및 NK 세포의 활성을 증가시키며, 암세포의 증식을 억제하는 활성을 가지고 있음 (Dinarello et al. 1993). 따라서 이 사이토카인들의 생성을 촉진하는 물질은 면역반응을 조절하는 작용과 항암기능을 가지고 있을 것으로 추정됨
- mRNA 수준에서 샘플에 의한 사이토카인들 (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β)의 발현을 확인하였으며 (Fig. 35), house keeping gene으로 β -actin을 이용하여 정량하였음. Fig. 33를 보면 모든 샘플 투여 그룹에서 NO의 생성량이 NC 그룹에 비해 4배에서 10배까지 증가한 것을 확인할 수 있었음. IFN- γ 는 NO의 생성 증가와 관련되어 있으며 암 전이의 감소와 영향이 있는 것으로 추측됨. IFN- γ 의 mRNA 발현이 F-WPC 투여 그룹에서 증가하였고 특히 저농도의 F-WPC 투여 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 증가함 (Fig. 35B). TNF- α (Fig. 35C)와 IL-1 β (Fig. 35D)의 mRNA 발현은 저농도의 F-WPC 투여 그룹에서 유의적으로 증가하였음. 또한 고농도 투여 그룹들은 저농도 투여 그룹들에 비해 사이토카인이 덜 발현됨을 확인하였음. 결과적으로 저농도의 F-WPC의 투여는 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 의 발현을 유의적으로 증가시킴으로써 면역 증진 효과와 항종양 효과를 보임을 확인할 수 있었음

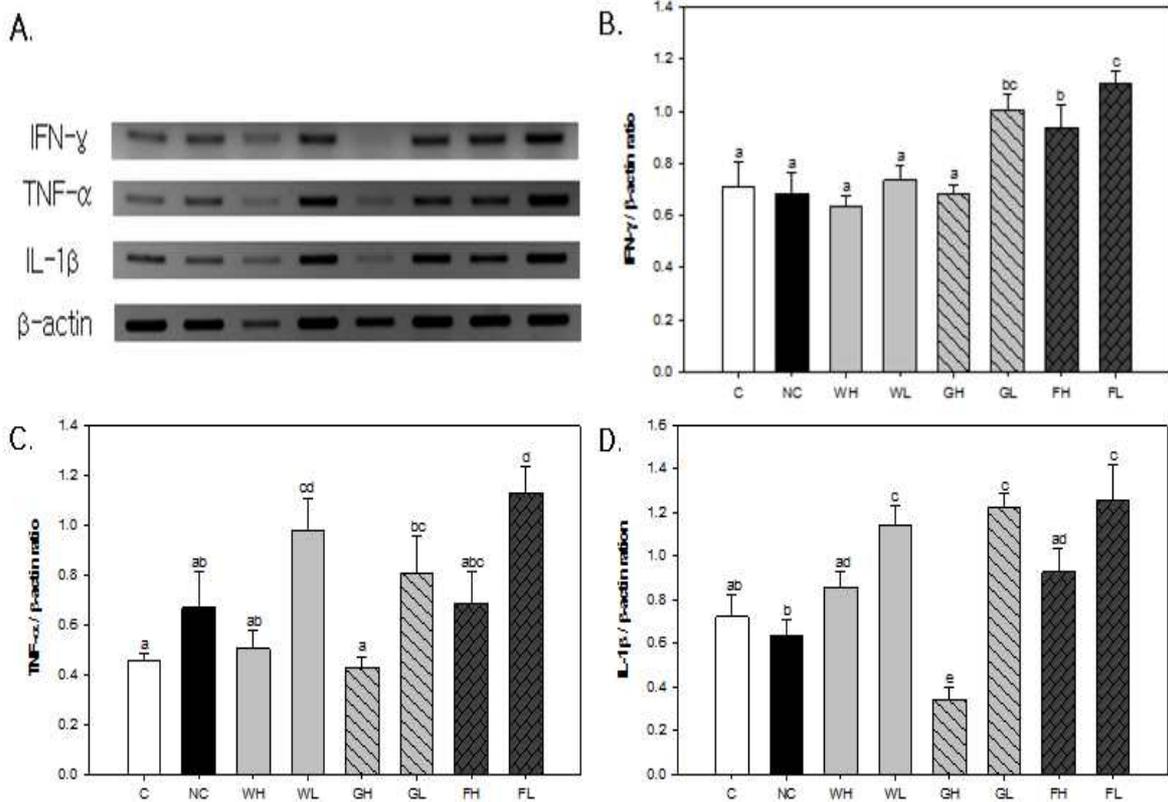


Fig. 35. Expression of IFN- γ , TNF- α and IL-1 β mRNA in mouse spleen

The mRNA expressions of IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-1 β (D) and β -actin were measured by RT-PCR. These levels are normalized by expression of β -actin mRNA and quantified with Image J software. Values are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate. ^{a-e} Means are significantly different at the $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range test and Tukey's studentized range test for value.

(4) 고휘형암의 부피 감소를 통한 항종양 효과 확인

- 암세포인 sarcoma 180 cell을 이식한 쥐에서 고휘형암을 적출하여 중량 및 부피를 잰 결과는 Table 18와 같음. Table 18를 보면 모든 샘플 투여 그룹에서 NC 그룹보다 암의 유발율이 감소한 것으로 나타남. 고농도의 F-WPC (FH) 투여 그룹에서 암의 크기는 NC 그룹의 암의 크기보다 컸지만, 암이 유발된 쥐는 오직 한 마리 뿐이었으며, 저농도의 샘플 처리 그룹을 비교하면, WPC, G-WPC, F-WPC로 갈수록 암의 평균 부피가 감소하는 것을 확인함으로써 저농도의 F-WPC (FL) 투여는 면역증진에 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 항종양 효과를 보임을 다시 한 번 확인할 수 있었음

Table 18. Effect of WPC, G-WPC and F-WPC on the solid tumor weight and volume of BALB/c mice transplanted sarcoma 180 cells

Groups	Tumor weight (g)	Tumor volume (mm³)	Number of tumor induction mice
CON	-	-	-
NC	0.336±0.267	301.18±244.51	5/7
WH	0.053±0.015	49.35±21.15	3/7
WL	0.080	138.46±6.37	2/7
GH	0.050±0.032	57.28±39.57	4/7
GL	0.180±0.147	118.57±82.83	3/7
FH	0.72	554.37	1/7
FL	0.108±0.125	95.0±103.96	4/7

Mice were treated with samples for 14 days. Values are mean±S.D.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발의 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	[주관] 서울우유 협동조합	유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물 제조	100%	· 상업용 단백질 분해효소를 사용한 단백 질 가수분해 조건 정립
		유단백질 및 마이알반응 생성물의 효소처리 가수분해물의 선별	100%	· 항산화 활성, cholesterol 감소능력 평 가, 면역 활성 평가의 스크리닝을 통한 최적 조건의 sample 선정
	[제1협동] 고려대학교	프로바이오틱스 균주 선별 및 유단백질 발효생성물 제조	100%	· 프로바이오틱스의 기본 특성(내산성 내 담즙성) 및 항산화 활성 평가를 통한 발효 적용 미생물의 균주 선정
			100%	· 프로바이오틱스의 유단백질 가수분해능 측정
		프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 발효생성물 및 마이알반응 생성물의 가수분해물 제조	100%	· 유단백 가수분해능 우수균주 대상으로 한 마이알반응 생성물에 대한 이용능 있는 균주의 선별
				· 다양한 조건의 발효과정을 통한 최적의 발효조건 및 제조 방법 정립
	[제2협동] 고려대학교	유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조	100%	· 선정된 최적의 프로바이오틱스 균주와 마이알반응 생성물을 이용하여 발효가 수분해물의 제조
				· 발효가수분해물의 항산화 활성 확인
				· 유단백질과 유당의 마이알반응 생성물 제조의 반응 용매, 반응 시간, 용질의 비율, 반응 방법을 달리하여 유단백질- 유당 마이알반응 생성물 중 기능성을 갖는 최적 생성 조건 확립
				· 마우스로부터 유래된 면역대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용한 NO assay 로 스크리닝을 실시하여 면역 조절 기 능성을 갖는 최적의 sample 선별
	유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 발효생성물의 선별	100%	· 세포 생존률 측정을 통한 세포수준에서 의 독성 유무 확인 (Raw 264.7, Sarcoma 180, HeLa, HUVEC 세포주)	
			· HPLC를 이용하여 유단백질-유당의 마 이알반응 생성물 내 furosine 함량을 측정함	
유단백질-유당의 마이알반응 생성물 및 프로바이오틱스 균주를 이용한 마이알반응 생성물 발효가수분해물의 안전성 검토 (<i>in vitro</i>)	100%	· HPLC를 이용하여 유단백질-유당의 마 이알반응 생성물 내 furosine 함량을 측정함		
		· HPLC를 이용하여 유단백질-유당의 마 이알반응 생성물 내 furosine 함량을 측정함		
유단백질-유당의 마이알반응 생성물의 furosine 함량 측정	100%	· HPLC를 이용하여 유단백질-유당의 마 이알반응 생성물 내 furosine 함량을 측정함		
		· HPLC를 이용하여 유단백질-유당의 마 이알반응 생성물 내 furosine 함량을 측정함		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	[주관] 서울우유 협동조합	유용물질 분리정제 및 지표물질 확인연구	100%	· 한외여과시스템(UF) 및 단백질분리시 스템(FPLC)을 이용한 프로바이오틱스 와 효소처리 가수분해물의 분리 및 분 획 제조 · 유용 LC/MS/MS를 이용한 분획별 성 분 조성확인
		MRPs 제조 및 발효 조건 최적 공정 설계	100%	· MRPs 제조 및 발효조건 단계별 scale up을 통한 생산 공정 최적화 · 단계별 생산물의 관능개선 연구
		MRPs 발효 가수분해물 적용 유제품 개발	100%	· 발효유 및 유음료 개발을 위한 기초배 합비 작성 · 실험실적 공정최적화 연구 · 소량생산 시험 및 기능성분 함량 평가
	[제1협동] 고려대학교	기능성 신소재의 심혈관 보호 효과의 확인 (<i>in vivo</i>)	100%	· Spectrophotometer 및 GC-FIC를 이용 한 Cholesterol 감소 능력의 확인
			100%	· Plasminogen free fibrin plate method 법을 이용한 혈전용해 능력의 평가
			100%	· Thrombin inhibition assay를 통한 혈 전형성 enzyme의 억제 효과 확인
	[제2협동] 고려대학교	유단백질-유당의 마이알반응 생성물 제조 시간 단축	100%	· 반응 시간별 유단백질 마이알반응 생성 물의 NO assay를 통한 면역 활성 확 인으로 제조 시간 단축
			100%	· RAW 264.7 세포를 이용한 NO assay 를 통해 면역 활성 확인
		프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 발효생성물 및 마이알반응 생성물 발효가수분해물의 면역 활성 기능성 확인 (<i>in vitro</i>)	100%	· T세포와 B세포의 생육 증가를 확인하 여 면역 활성 확인
			100%	· NK 세포 활성화도 측정을 통한 면역 활 성 확인
		100%	· RAW 264.7 세포에서 면역 관련 바이 오마커인 사이토카인 (TNF- α , IL-6, iNOS, β -actin)의 발현을 측정함	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용	
3차 년도 (2014)	[주관] 서울우유 협동조합	가능성 유제품 개발	100%	· Pilot scale 및 대량생산 시험을 통한 막 분리 및 최종 공정의 완성	
				· 이화학적, 미생물학적 및 열안정성 평가	
				· 제품 관능 개선 및 평가	
					· 기능 성분 함량 평가
					· 기능성 표시기준 및 관련 법령 검토
					· 최종 시제품(유산균음료 1종, 유산균 제제 1종)생산
	[제1협동] 고려대학교	동물모델을 이용한 프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 발효생성물 및마이알반응 생성물 발효가수분해물의 기능성 확인 (<i>in vivo</i>)	100%	· 동물 모델을 통한 Cholesterol 저해 능력 평가	
				- 혈청 내 Cholesterol 저해활성 측정	
				- 향산화 및 지질 대사 관련 인자발현 확인	
			100%	· 동물 모델을 통한 혈행 개선 기능 평가	
			- Tail bleeding time 측정		
			- Anti-thrombotic assay 측정		
[제2협동] 고려대학교	프로바이오틱스 균주를 이용한 유단백질 마이알반응 생성물의 발효가수분해물의 안전성 및 면역 활성 기능성 확인 (<i>in vivo</i>)	100%	· 14일 반복투여 독성평가		
		100%	· 복강압 유발 동물모델의 혈청을 이용하여 NO assay 및 lysozyme activity 측정		
		100%	· 비장에서 면역 관련 바이오마커인 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , β -actin)의 발현을 측정		
		100%	· 복강압 유발 동물모델의 고형암 생성 여부 및 크기 측정을 통한 고형암 생성 억제 활성 확인		

제 2 절. 관련 분야의 기술발전예의 기여도

- 유단백질의 마이알반응 생성물 및 발효생성물의 기능성 검증을 통한 소재 개발
- 우유 및 유제품 또는 단백질 보충제 등으로 많은 소비가 이루어지는 유단백질을 활용한 심혈관 보호 및 면역 조절 효과를 가지는 기능성 소재를 개발
- 우유의 부산물인 유단백질의 부가가치 향상으로 인한 낙농가소득 증대 도모
- 새로운 소재 제조공정 개발하고 심혈관보호 및 면역조절 기능성 연구와 식품 내에서의 안전성 연구를 통하여 국제 시장에서 유단백질의 우수성을 알리고 고부가가치의 상품을 수출할 수 있음
- 유단백질 마이알반응 생성물 및 발효생성물을 이용한 기능성 유제품 개발
- 본 연구 결과를 바탕으로 유단백질의 심혈관 보호 및 면역 조절 효과를 지니는 유제품을 개발하여 우유 및 우유 내 부산물의 부가가치 상승 기대
- 건강기능성식품으로서 국내외적으로 약 20% 정도가 겪고 있는 면역질환의 예방과 국민건강 증진에 기여할 것으로 사료됨

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 학술발표

발표일자 (년,월,일)	학술발표명	발표학회	구분
2012.04.12	Immune-modulating Effect of Glycated Galactomannan-Lysozyme product	대한면역학회	포스터
2012.06.15	Immune Activity of Maillard Reaction Products of Milk Protein with Lactose	한국식품과학회	포스터
2012.11.01	Antioxidant Activity and Anti-inflammatory Activity of Milk Protein Hydrolysates	한국식품영양과학회	포스터
2012.11.01	The Effect of Maillard Reaction on Characteristics and Antioxidant activity of milk protein	한국식품영양과학회	포스터
2012.11.1	Optimal Medium and Screening for Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria	식품영양과학회	포스터
2013.04.24	Anti-inflammatory effect of MRPs model (Lysine-Galactose) and its cut-off products in the Caco-2 and RAW264.7 cells co-culture system	Experimental Biology 2013	포스터
2013.08.29	Improving Antioxidant Activities of Maillard Reaction Products derived from Milk Protein and Sugars Model Systems	한국식품과학회	포스터
2013.08.29	Immune Enhancing Activity of Maillard Reaction Products of Whey Protein Concentrate Immune Enhancing Activity of Maillard Reaction Products of Whey Protein Concentrate and Its Fermented Product	한국식품과학회	포스터
2013.11.22	Immune-modulating Effect and Characterization of Maillard Reaction Product of Lysozyme with Galactomannan	한국산업식품공학회	포스터
2013.8.29	Anti-oxidative Activity of Fermented Maillard Reaction Products(MRPs) by Probiotic <i>Lactobacillus</i> strains	식품과학회	포스터
2014.04.27	Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation endproducts and Maillard reaction products in Korean food and health	Experimental Biology 2014	포스터

2014.06.24	Evaluation of Antioxidant Properties and Hepatoprotective Effects of Different Sugar-Milk Protein Maillard Reaction Products	IFT	포스터
2014.06.24	Preventive Effect of Fermented Maillard Reaction Products from Milk Proteins in Cardiovascular Health	IFT	포스터
2014.08.26	Effect of Fermented Maillard Reaction Products on Antioxidant Activity and Enhancement of Cardiovascular Health in Mice	한국식품과학회	포스터
2014.09.08	Hepato-protective and anti-diabetic effects of <i>Capsosiphon fulvescens</i> and pheophorbidea in streptozotocin-induced diabetic rats	Eurotox 2014	포스터
2014.10.24	Characterization of the Immune-Enhancing Active Compound in Glycated Whey Protein Concentrate	한국식품위생안전성학회	포스터
2014.6.25	Hypocholesterolemic and Anti-thrombotic Effects of Fermented Maillard Reaction Product(MRPs) by Probiotic Lactobacillus strains	미생물생명공학회	포스터
2014.8.25	Effect of Fermented Maillard Reaction Products on Antioxidant Activity and Enhancement of Cardiovascular Health in Mice	식품과학회	포스터

2. 논문

게재일자 (년,월,일)	논문명	학회지명 (권, 호, 쪽)	SCI(E)
2012.10.09	Seperation of the Antioxidant Compound Quercitrin from <i>Lindera obtusiloba</i> Blum and Its Antimelanogenic Effect on B16F10 Melanoma Cells	Bioscience Biotechnology and Biochemistry 77(1): 58-64	SCI
2013.06.10	Immune enhancing effect of a Maillard-type lysozyme-galactomannan conjugate via signaling pathways	International Journal of Biological Macromolecules 60: 399-404	SCI
2013.06.13	The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins	Journal of Dairy Science 96(8), 4899-4911	SCI
2014.04.11	Preventive effect of fermented Maillard reaction products from milk proteins in cardiovascular health	Journal of Dairy Science 97(6), 3300-3310	SCI

2014.04.24	Effects of Chebulic Acid on Advanced Glycation Endproducts-Induced Collagen Cross-Links	Biological & Pharmaceutical Bulletin 37(7): 1162-1167	SCI
2015 (투고완료)	Immune Enhancing Effect of Maillard Reaction Products from Whey Protein Concentrate and Their Fermented Products in Immune health	Journal of Dairy Science	SCI
2015 (투고완료)	Dietary Maillard Reaction Products Derived from Milk Protein and Their Fermented Products Reduce Cardiovascular Risk in Animal Model	Journal of Dairy Science	SCI
2015 (투고예정)	Enhanced hepatoprotective effect of Maillard-reaction products derived from milk protein on the human HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide	Food Research International	SCI

3. 특허

출원 또는 등록일자 (년,월,일)	구분	특허명	출원 또는 등록번호	국가
2014.12.02	등록	유단백질 마이알 반응물의 가수분해물 및 이의 제조방법	제10-1470739호	대한민국
2015.01.30	등록	유단백질 마이알반응물의 발효물을 함유하는 면역활성 증강용 조성	제10-1490656호	대한민국
2015.01.30	등록	유단백질 마이알반응물의 발효물을 함유하는 심혈관질환 예방 또는 치료용 조성물	제10-1090657호	대한민국

제 2 절. 성과활용 계획

1. 기능성 식품 소재로서의 활용

- 현재 MALDI-TOF/MS를 이용하여 유단백질 마이알반응물의 기능성 지표물질의 분석을 진행하고 있음. 추후, 유단백질 마이알반응 발효가수분해물의 peptide sequencing을 실시할 예정임. 또한, 추가적으로 기능성 신소재의 지표물질에 대한 안전성을 확인하기 위하여 독성 평가를 진행할 예정임
- 현재 농림축산식품부 2015년도 식품기능성평가 지원 사업에 선정되어 유단백질 마이알반응 발효가수분해물의 면역증진 효과를 입증하기 위한 임상시험을 추진 중이며, 2016년도까지 완료하여 본 연구 과제를 통해 개발된 기능성 신소재의 면역증진 효과를 과학적으로 규명하고자 함. 추후, 유단백질 마이알반응 발효가수분해물의 심혈관계 질환 예방 효과를 입증하기 위한 임상시험을 완료할 예정임
- 유단백질 마이알반응 발효가수분해물의 임상시험 완료 후, 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 획득을 추진 예정이며 생리활성기능 1등급 획득을 목표로 함
- 유단백질 마이알반응물의 발효가수분해물을 활용하여 심혈관 보호 및 면역증진 효과 등의 다양한 기능성을 지닌 유제품의 개발에 적용
- 국내 발효유 제품에 사용되는 유산균주는 해외 수입에 의존하고 있는 실정이며, 본 연구과제에 활용된 유산균주의 기능성 연구 및 발효유 제품에의 활용가능성 검토를 통하여 자체 종균확보 및 사업화를 위한 방안을 모색 중임

2. 기술이전을 통한 사업화 실시

- 본 연구과제의 수행결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화를 위하여 기술실시 계약 체결을 추진 중임
- 현재 유단백질 마이알반응물의 발효가수분해물을 이용한 유산균 음료 및 유산균 제제 시작품 제작을 완료하였으며, 출시 예정인 제품의 스케일업을 통한 대량생산 실험을 진행하여 최적화된 공정을 완성할 계획임. 또한, 유통·저장 중의 안정성 및 안전성 연구 및 외부관능 검사[초점그룹인터뷰(FGI) 및 소비자 기호도조사]와 제품의 스토리텔링을 통한 마케팅 방안 설정할 예정임
- 본 연구 과제를 통해 개발된 최종제품의 출시 방안을 서울우유협동조합 마케팅본부와 협의 중이며, 향후 개별인정형 원료 인정을 완료하여 건강기능식품의 유형으로 제품 2 종을 출시

할 계획임

- 국내 프로바이오틱스 제품은 장기능 및 소화기능 개선 등의 효과를 지니는 제품에 국한되어 있으나, 심혈관계 질환 보호 및 면역증진 효과 등의 다양한 기능성 유제품의 개발을 통해 유제품의 활용 가능성을 증대시켜 고부가가치의 시장을 창출할 것으로 사료됨

3. 연구수행을 통한 인력 양성

- 본 연구과제를 통해 기업체 연구인력 2명을 양성하였으며, 프로바이오틱스 및 우유 유래 기능성 물질 관련 연구 기술력을 확립하고 전문 연구인력 양성을 촉진하고자 함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절. 논문

논문명	Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism
게재지	molecular nutrition & food research, 2011, volume 55, issue 12 pages 1829-1840
내용 요약	LDLR -/- mice를 대상으로 18주동안 AIN-76 콜레스테롤 식이를 실시하여 커큐민의 콜레스테롤 저하능을 실험함. 대동맥의 콜레스테롤 침적 수준이 lovastatin을 사용한 그룹과 비슷하며, 간 콜레스테롤 수치는 그보다 더 낮은 것으로 나타남.
논문명	Protective effect of Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang against hepatic steatosis in mice fed a high-cholesterol diet
게재지	BMC Complementary and Alternative Medicine 2013, volume 13
내용 요약	삼화사심탕의 콜레스테롤 식이를 실시한 쥐에 대한 지방간 보호효과를 실험한 논문임. SREBP-2, LXR, LDLR, HMG-CoA의 유전자 발현을 억제하는 효과를 나타내어 지방간 억제효과가 있다고 볼 수 있음.
논문명	Antithrombotic activity of methanolic extract of <i>Umbilicaria esculenta</i>
게재지	journal of ethnopharmacology, 2006, volume 105, issue 3, pages 342-345
내용 요약	<i>Umbilicaria esculenta</i> 메탄올 추출물의 항혈전효과를 실험한 논문임. tail bleeding 실험에서는 헤파린과, 폐혈전증에 대한 효과는 아스피린과 비교하였으며, 100mg/kg이상 섭취할 때 비교한 약품들과 유사한 효과를 나타냄.
논문명	Antithrombotic Activities of Green Tea Catechins and (-)-Epigallocatechin Gallate
게재지	Thrombosis Research 1999, volume 96, issue 3, pages 229-237
내용 요약	녹차카테킨과 epigallocatechin gallate의 항혈전작용을 실험한 논문임. 폐혈전증 생존률,tail bleeding time, 혈소판 응집제(ADP, 에피네프린, 콜라젠,A23187)의 IC50을 측정함. 효과는 모두 아스피린과 비교함. 혈전증 생존률과 bleeding time은 아스피린과 비슷한 수준의 결과를 나타내었으며, 응집 억제효과는 아스피린보다 뛰어난 것으로 나타냄.
논문명	Antithrombotic activity of argan oil: An <i>in vivo</i> experimental study
게재지	Nutrition 2012, volume 28, issue 9, pages 937-941
내용 요약	argan oil을 섭취하여 아스피린이나 heparin과 유사한 혈전 용해효과를 얻음.

논문명	Shengmai San reduces hepatic lipids and lipid peroxidation in rats fed on a high-cholesterol diet
게재지	Journal of Ethnopharmacology 2008, volume 116, issue 1, pages 49-57
내용 요약	고콜레스테롤 식이를 실시한 rat에게 2%.4%의 shengmai san을 섭취시켜 간과 분변 콜레스테롤을 감소시킴.
논문명	Blockade of glycoprotein IIb/IIIa mediates the antithrombotic activity of butanol fraction of <i>Actinostemma lobatum Maxim</i>
게재지	Journal of Ethnopharmacology 2008, volume 116, issue 3, pages 431-438
내용 요약	butanol fraction of <i>Actinostemma lobatum Maxim</i> 이 콜라겐,ADP, thrombin으로 유도한 혈전을 억제하고 피브리노겐이 혈전에 응집하는 것을 억제함.
논문명	Effect of dietary inclusion of <i>lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats
게재지	microbial biotechnology, 2007, volume 17, pages 655-662
내용 요약	고 콜레스테롤 식이를 섭취하는 rat에게 락토바실러스 43121균을 섭취시킬 경우 혈중 콜레스테롤이 일반식이를 섭취하는 rat의 콜레스테롤 수준로 감소하였으며 LDL수준이 크게 감소하였다.
논문명	In Vitro Investigation of the Potential Immunomodulatory and Anti-Cancer Activities of Black Pepper (<i>Piper nigrum</i>) and Cardamom (<i>Elettaria cardamomum</i>)
게재지	JOURNAL OF MEDICINAL FOOD, 2010, 13, 2, 371-381
내용 요약	Black pepper와 cardamom의 면역조절 효과와 항암효과를 관찰한 논문으로, BALB/c와 C57/BL6 mice로부터 splenocytes와 macrophage를 분리하여 실험에 사용하였다. splenocytes의 생육 증진 및 macrophage에서의 NO 생성이 증가함을 확인하였으며, NK 세포의 활성 증가 및 사이토카인의 발현 증가를 통해 면역 조절 효과를 확인하였다. 또한 지방암세포를 이용하여 <i>in vitro</i> 상에서 항암효과를 확인하였다. 따라서, black pepper와 cardamom이 사이토카인 발현에 있어 길항작용을 함을 확인하였고, 이들이 다양한 면역 세포의 기능 조절에 대한 잠재성을 갖고 있음을 확인하였다.
논문명	Demonstration of Antioxidant and Anti-inflammatory Bioactivities from Sugar-Amino Acid Maillard Reaction Products
게재지	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60, 27, 6718-6727
내용 요약	아미노산과 당의 마이알반응 생성물의 항산화 및 항염증 효과를 확인한 논문으로, 마이알반응 생성물을 HPLC로 분리하여 낮은 분자량의 fraction을 얻었으며, 이 중 fraction 3에서의 HMF와 HMFA의 생성량 확인을 통해 반응 정도를 측정하였다. 라디칼 소거능 확인을 통해 항산화 효과를 확인하였으며, 대장암

	세포를 이용하여 NO의 생성 및 사이토카인의 발현을 확인함으로써 항염증 효과를 확인하였다.
논문명	Immunostimulatory properties of glycated chitosan
게재지	Journal of X-Ray Science and Technology, 2011, 19, 285-292
내용 요약	갈락토오스와의 마이알반응으로 생성된 키토산의 마이알반응 생성물의 면역 조절 효과를 확인한 논문으로, 세포에서의 면역 조절 효과 확인과 암 유발된 BALB/c mice로부터 사이토카인의 발현을 측정하였다. 마이알반응을 통해 대식세포의 대식작용이 증가함을 형광 이미지로 확인하였으며, mice로부터 TNF- α 의 발현 증가와 암세포의 생존을 저감을 통해 면역 조절 및 항암 효과를 확인하였다. 따라서 마이알반응을 통해 단백질의 면역 조절 효과 및 항암 효과가 증가함을 확인할 수 있다.

제 2 절. 특허

특허명	혈당상승억제 효능을 나타내는 아르기닌 유도체 또는 이의 염을 포함하는 조성물의 제조방법
보유국가 및 등록년도	대한민국, 2009
내용 요약	마이알 반응에 의해 생성된 화합물의 기능성을 제시함. 우유 속에 존재하는 단백질과 당의 합성 반응에 의해 생성된 물질이 아니며, 면역 활성화와 항산화능력이 아닌 항당뇨 기능에 집중되어 있음
특허명	항고혈압 및 항산화 기능성 난백 펩티드의 제조방법
보유국가 및 등록년도	대한민국, 2006
내용 요약	마이알 반응에 의해 생성된 화합물의 기능성을 제시함 우유 속에 존재하는 단백질과 당의 합성 반응에 의해 생성된 물질이 아니며, 면역 활성이 아닌 항고혈압 활성화에 집중되어 있음
특허명	항고혈압용 난백 가수분해물-당 반응 조성물의 제조방법
보유국가 및 등록년도	대한민국, 2010
내용 요약	우유 속에 존재하는 단백질과 당의 합성 반응에 의해 생성된 물질이 아니며, 면역 활성이 아닌 항고혈압 활성화에 집중되어 있음
특허명	락토바실러스 카제이 에치와이418의 배양액으로부터 분리된 혈압강하 펩타이드 혼합물 및 그 분리방법
보유국가 및 등록년도	대한민국, 2001
내용 요약	본 발명은 미생물을 이용한 배양액으로부터 분리된 혈압강하 효과가 있는 새로운 펩타이드 혼합물 및 그 분리방법 분리된 펩타이드가 기대한 생리활성을 갖는지의 여부에 대한 추가실

	험(<i>in vitro, in vivo</i>)이 필요함.
특허명	항고혈압 우유 조성물
보유국가 및 등록년도	대한민국, 2006
내용 요약	유단백질(카세인)의 가수분해물을 이용, 심혈관성 질환 완화의 효과 검색, 우유에 풍부한 영양소를 공급할 수 있는 기능성 우유 조성물을 제공

제 7 장 참고문헌

1. Aderem, A.; Underhill, D. M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annual review of immunology 1999, 17(1), 593-623.
2. Balkwill, F., Tumour necrosis factor and cancer. Nature Reviews Cancer 2009, 9(5), 361-371.
3. BCC Reaserch, 자가면역 질환 치료제와 치료법: 세계시장. 2011
4. Bogdan, C., Nitric oxide and the immune response. Nature Immunology 2001, 2(10), 907-916.
5. Burchett, S. K.; Weaver, W. M.; Westall, J. A.; Larsen, A.; Kronheim, S. H. I. R. L. E. Y.; Wilson, C. B., Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. The Journal of Immunology 1988, 140(10), 3473-3481.
6. Chen, F.; Castranova, V.; Shi, X., New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. The American Journal of Pathology 2001, 159(2): 387-397.
7. Choi YG, Chun C, Sung KS, Kim DJ, Kwon YH, Chan CC Change of Hepatic Antioxidative Enzymes in Mouse After Treatment with Paraquat and Germanium-132. Kor. J. Gerontol. 1999, 9(3):34-4.
8. Corinna B, Tobias S, Diana B, Kristin WB, Andreas SM, Gabriele IS Glutathione deficiency down-regulates hepatic lipogenesis in rats. Lip. Heal. Dis. 2010, 9:50-58.
9. Delgado, A. V.; McManus, A. T.; Chambers, J. P., Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides 2003, 37(6): 355-361.
10. Dinarello, C. A.; Wolff, S. M., The role of interleukin-1 in disease. New England Journal of Medicine 1993, 328(2), 106-113.
11. Jeon, W.-K., Kim, H.-K., Lee, J.-H., Ko, B.-S., Lee, A-Y., Lee, K.-G. and Shin, H.-K. : Study on Anti-thrombotic Activities of KIOM2003-080. Korean Journal of Oriental Medicine 2007, 13, 143.

12. Jiang, X.; Gwye, Y.; Russell, D.; Cao, C.; Douglas, D.; Hung, L.; Kovar, H.; Triche, T. J.; Lawlor, E. R., CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC cancer* 2010,, 10(1), 116-127.
13. Jing, H.; Kitts, D. D., Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology* 2002, 40.7: 1007-1015.
14. Kikuchi, K.; Yanagawa, Y.; Aranami, T.; Iwabuchi, C.; Iwabuchi K.; Onoé, K., Tumour necrosis factor- α but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* 2003, 108(1): 42-49.
15. Korea National Statistical Office. A study on causes of death for 2007.
16. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
17. Lee, M. S., Roh, S. S., Lim, R. C., Song, H. C., Shin, S. S. and Kim, S. H. : Antithrombotic activity and protective effects of hexane fraction of kamihiylbuchukeotang (KHBCT) on brain injury by KCN and MCA occlusion. *Kor. J. Pharmacogn.* 2010, 31, 373.
18. Lorsbach, R. B.; Murphy, W. J.; Lowenstein, C. J.; Snyder, S. H.; Russell, S. W., Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 1993, 268(3), 1908-1913.
19. Marko, D.; Habermeyer, M.; Kemény, M.; Weyand, U.; Niederberger, E.; Frank, O.; Hofmann, T., Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. *Chemical Research in Toxicology* 2003, 16.1: 48-55.
20. Miwa, K., Kambara, H. and Kawai, C. : Effect of aspirin in large doses on attacks of variant angina. *Am. Heart J.* 1983, 105, 351.
21. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65, 55-63.
22. Nathan, C. F.; Hibbs Jr, J. B., Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology* 1991, 3, 65-70.

23. Nudo, L. P.; Catap, E. S., Anti-immunosuppressive Effects of *Chromolaena odorata* (Lf.) King & Robinson (Asteraceae) Leaf Extract in Cyclophosphamide-injected Balb/C Mice. *Philippine Journal of Science* 2012, 141(1), 35-43.
24. Prabhu, K. S.; Zamamiri-Davis, F.; Stewart, J. B.; Thompson, J. T.; Sordillo, L. M.; Reddy, C. C., Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor- κ B in up-regulation. *Biochemical Journal* 2002, 366: 203-209.
25. Reynolds, T. M., Chemistry of nonenzymic browning. I. the reaction between aldoses and amines. *Advances in Food Research* 1962, 12, 1-52.
26. Saurabh, S.; Sahoo, P. K., Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 2008, 39(3), 223-239.
27. Sava, G.; Benetti, A.; Ceschia, V.; Pacor, S., Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review). *Anticancer research* 1988, 9(3), 583-591.
28. Schulz, K.; Kerber, S.; Kelm, M., Reevaluation of the griess method for determining NO/NO⁻² inaqueousandprotein-containing samples. *Nitric Oxide* 1999, 3, 225-234.
29. Seo, Y. C.; Choi, W. Y.; Lee, C. G.; Cha, S. W.; Kim, Y. O.; Kim, J. C.; Drummen, G. P. C.; Lee, H. Y., Enhanced immunomodulatory activity of gelatin-encapsulated *Rubus coreanus* Miquel nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, 12(12), 9031-9056.
30. Silanikove, N.; Shapiro, F.; Shamay, A.; Leitner, G., Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radical Biology and Medicine* 2005, 38(9): 1139-1151.
31. Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Bone, R. C., Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Critical Care Medicine* 1993, 21(10): S447.
32. Urban, J. L.; Shepard, H. M.; Rothstein, J. L.; Sugarman, B. J.; Schreiber, H., Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986,

83(14), 5233-5237.

33. Van Renterghem, R.; De Block, J., Furosine in consumption milk and milk powders. *International Dairy Journal* 1996, 6(4), 371-382.
34. Vane, J. R.; Mitchell, J. A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtall, J.; Willoughby, D. A., Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, 91, 2046-2050.
35. Winston G, Richard T, Giulio D Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *AQY. Toxicol.* 1991, 19(2):137-161.
36. Zhang XH, Chio SK, Seo JS Effect of Dietary Grape Pomace on Lipid Oxidation and Related Enzyme Activities in Rats Fed Hig Fat Diet. *Kor. J. Nutr.* 2009, 42(5):415-422.
37. 김복란, 김종, 함승시, 최용순, 이상 향미성 Natto의 섭취가 흰쥐의 지질사에 미치는 향. *한국양식량학회지.* 1995, 24(1):121-126.
38. 김철현, 유산균과 유단백질 유래 peptide의 면역 조절 기능 연구 동향. *한국유가공기술과 학회지* 2009, 27(1): 37-43.
39. 생명공학정책연구센터, 면역조절치료제. *BT 기술동향 보고서* 2006
40. 시험검사소, 알레르기 유발 식품 모니터링 결과 보고서. *한국소비자원* 2006, 12: 1-31.
41. 식품의약품안전처, 식품공전 2014
42. 이광원, 우유의 카제인과 안전성. (사)한국식품안전연구원 2013
43. 이혜경, 환경보건정책에 관하여 -아토피피부염을 중심으로-. *환경관리연구소* 2011
44. 한국과학기술정보연구원, 면역치료제: 유전자 치료를 이용한 면역치료제. 2004
45. 한정순, 한용 고지방식이와 식이섬유가 흰쥐의 체내 지질사에 미치는 향. *한국양식량학회 지.* 1994, 23(4):541-547.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.