

최 중
연구보고서

장내 점착성과 면역활성이 우수한 발효
유제품 starter 개발

Development of dairy starter culture having potent
adhesive property and immunopotentiating activities

연구기관
경기대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “장내 점착성과 면역활성이 우수한 발효 유제품 starter 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 경기대학교
총괄연구책임자 : 이 호
세부연구책임자 : 이 호
연 구 원 : 신 광 순
연 구 원 : 배 송 환
협동연구기관명 : 경기대학교
협동연구책임자 : 서 형 주
참 여 기 업: (주)새롬바이오

요 약 문

I. 제 목

장내 점착성과 면역활성이 우수한 발효 유제품 starter 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유산균은 건강한 사람의 장내 상재 미생물로서 예로부터 많은 전통 발효식품에 이용되어 왔을 뿐만 아니라, 유당불내증의 개선, 장내 균총의 개선, 병원균에 대한 항균성, 혈청 cholesterol의 저하, 항암활성 및 면역조절작용 등 인체의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 유용한 유산균의 생리활성이 발휘되기 위해선 인간의 대장 점막에 점착성이 있어야 장내 상재성을 나타낼 수 있으며 따라서 장내 점착성은 새로운 유산균주의 선택에 있어 가장 중요한 기준이 될 수 있다. 본 연구의 목적은 장내 점착능과 면역증진 활성이 우수한 유산균주를 선별하고 이들의 점착특성 및 면역특성을 *in vitro*와 *in vivo* 실험에 의해 규명함으로써, 새로운 형태의 유산균 스타터 개발과 probiotics로서의 이용성을 제시하는 데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

최종목표를 달성하기 위해 연구내용에 따라 다음과 같이 제 1 및 2 세부(협동)과제로 구성하였다.

제 1 세부과제 : 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명

1. 장내 점착성 우수 균주 분리 및 동정

- 1) colonic mucin-binding assay의 분석조건을 확립

- 2) 확립된 분석방법을 활용한 장내 점착능 우수균주 분리 및 동정
- 3) 분리균주의 내산성 및 내담즙성 평가
2. 분리균주의 장내 점착특성 규명
 - 1) 분리 균주의 점착특성 평가를 위한 lectin 분리
 - 2) 분리된 lectin을 활용한 점착특성 및 기작 평가
3. 분리 균주의 장내 점착특성에 대한 *in vivo* 실험
 - 1) *In vivo* 장내 점착성 평가를 위한 ELISA assay계 확립
 - 2) *L. brevis* FSB-1의 경구투여에 의한 장내 점착성 *in vivo* 실험

제 2 세부과제 : 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발

1. 면역활성이 우수한 유산균주 선별 및 *in vitro*와 *in vivo* 면역 특성
 - 1) 면역활성이 우수한 균주의 선별
 - 2) 분리균주의 면역활성에 대한 *in vitro* 실험
 - 2) 분리균주의 면역활성에 대한 *in vivo* 실험
2. *Lactobacillus brevis* FSB-1의 exopolysaccharide (EPS) 생산능 및 면역활성과 시제품 제작
 - 1) 분리균주의 EPS 생산능력 확인 및 생산조건 확립
 - 2) 곡물을 활용한 EPS의 수율 및 면역활성 측정
 - 3) 분리균주를 이용한 시제품 생산

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

장내 점착능과 면역활성이 우수한 유산균주를 분리하고, 면역활성 및 특성을 규명하였다. 또한 분리균주로부터 *in vitro* assay계 및 *in vivo* assay계의 장내 점착특성 및 면역특성을 확립하였다. 뿐만 아니라 분리균주를 활용한 시제품을 생산함으로써 산업화하였다. 본 실험결과는 장내점착능과 면역활성이

우수한 유산균주를 분리하는데 유용한 기술이며, 발효유제품생산에 응용하여 장내 점착성 및 면역활성과 같은 생리활성을 소유한 발효유제품의 생산이 가능하다. 이 외에 유산균이 가지는 생리활성을 지닌 유산균제재 생산 및 기능성식품으로서의 소재활용에 대한 응용을 기할 수 있다. 또한 면역활성이 우수한 유산균을 분리함에 따라 이를 대량 배양하여 면역활성 물질만을 회수함에 따라 면역증진 소재로의 개발 및 활용이 가능할 것으로 판단된다.

각 세부과제별 연구개발결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 제 1 세부과제 : 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명

가. 장내 점착성이 우수한 균주 분리 및 동정

본 연구는 인간의 대장내 점막에 대하여 장내 점착능과 면역활성이 우수한 균주를 분리할 목적으로, 장내 점착능이 우수한 균주를 신뢰성 있게 선별할 수 있는 방법을 고안하고자 하였으며 분리된 유산균의 장내 상재성에 대한 기작을 제안하고자 하였다.

유산균은 인간의 유용미생물로, 유당 불내증의 완화, 정장작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤 저하작용, 항암 작용 및 면역 활성화 작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다. 이러한 유산균의 유용한 효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다. 따라서 인간의 대장내 점막에 대하여 점착능이 우수한 유산균주를 선별할 목적으로, colonic mucin-binding assay를 고안하고 최적의 분석조건을 검토하였다. 그 결과, microtiter plate의 well에 대한 colonic mucin의 부착은 pH 4.8, biotinylated SLP의 농도는 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 시판 HRP-conjugated streptoavidin은 24,000배 희석용액, TMB의 발색시간은 10분의 조건에서 측정시 최적의 결과를 나타냈다. 동 조건에서 본 assay system을 이용할 경우, 장내 점착능 측정 및 우수 유산균주의 선별에 있어 신속하고 재현성 있는 결과를 제공할 수 있으며, 인간의 대장에 대한 유산균의 점착능을 정량적으로 분석할 수 있음을 보여주었다. 공시균주 32종 및 유아분변 유래의 분리균주 18종을 포함한 총 50종의 유산균

주에 대하여, colonic mucin-binding assay를 이용하여 대장 mucin에 대한 결합능을 비교, 측정된 결과, *Lactobacillus* species FSB-1이 가장 높은 결합능을 보였다. 따라서 *L. species* FSB-1을 대상으로 형태학적 특성, 생리 및 생화학적 특성과 16S rDNA에 대한 부분 염기서열 분석을 포함한 동정실험을 수행한 결과, 장내 점착능 우수 유산균주로 선별된 *L. species* FSB-1은 *Lactobacillus brevis*로 최종 동정되었다. 또한 분리균주에 대한 소화기관내 안정성을 측정하기 위하여 내산성 및 내담즙성을 평가한 결과 소화기관내에서 매우 안정한 결과를 보였으므로 기능성소재로의 활용에 대한 가능성을 제시하였다.

나. 분리 균주의 장내 점착특성 규명

유산균이 갖는 유효한 생리효과가 유지되기 위한 대장내 상재성의 한 요인으로 유산균 표면에 존재하는 lectin상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 대장내 점막층(mucin)의 당쇄구조간 인식의 중요성이 보고되고 있다. 따라서 앞의 연구에서 장내 점착능이 가장 우수한 유산균주로 선별된 *L. brevis* FSB-1을 대상으로 점착능에 관여하는 인자들을 규명하였다. *L. brevis* FSB-1의 SLP로부터 대장 mucin과 결합하는 특정 lectin을 분리한 후 SDS-PAGE를 통해 측정된 결과, 분자량 24, 55 및 75 kDa의 단백질을 확인하였다. 또한 분리된 각각의 분자량별 lectin과 대장 점막층간의 결합능(binding affinity)을 비교한 결과, 차이가 없는 것으로 나타났다. *L. brevis* FSB-1의 lectin상 단백질이 인식 및 결합하는 대장내 mucin의 당단백질 중 구성당쇄를 규명하기 위하여, modified colonic mucin-binding assay와 TLC-immunostaining을 이용하여 조사하였다. Modified colonic mucin-binding assay의 경우, *L. brevis* FSB-1의 lectin상 단백질은 점막층 구성당 중 단당의 경우 sialic acid를, 올리고당의 경우 GalNAc₁₋₃Gal을 인식하는 것으로 추정되었다. 또한 TLC-immunostaining의 경우, 단당간의 결합능에는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 올리고당에서는 Neu5Ac₂₋₆Gal_β 1-4GlcNAc와의 결합능이 상대적으로 매우 높은 결과를 보였다. 따라서 *L. brevis* FSB-1의 lectin상 단백질은 RCM의 구성당 중 외부의 당쇄(external

sugar chains)를 인식하여 결합하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 인간의 대장내 점막에 대한 점착능 측정방법인 colonic mucin-binding assay로 점착능이 우수한 *L. brevis* FSB-1을 분리할 수 있었을 뿐만 아니라 대장 내에서 *L. brevis* FSB-1이 인식하는 당 및 기질을 규명 하였다.

다. 분리 균주의 장내 점착특성에 대한 *in vivo* 실험

Gastrointestinal(GI) tract내에서 *L. brevis* FSB-1의 생육능력 및 점착능을 검토하기 위하여 Wister rat을 이용한 *in vivo* 실험을 실시하였다. 쥐의 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 분리 및 검출을 위하여 polyclonal antibodies를 조제한 후, ELISA법을 이용하여 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양을 측정하는 방법을 고안하였다. Wister rat에 대하여 *L. brevis* FSB-1을 10^{10} cells/mL로 경구투여한 후, GI tract을 통과하여 배변되기까지 걸리는 시간은 약 8시간이었으며, 이때 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양은 $10^{7.40}$ cells/g of wet feces였다. 또한 *L. brevis* FSB-1을 10^{10} cells/day로 20일간 매일 1회씩 Wister rat에 경구투여한 다음, 경구투여 기간과 경구투여 중단 후의 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양을 측정하였다. 경구투여 기간내 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양은 평균 $10^{7.22}$ cells/g of wet feces였으며, 경구투여 중단 후 8일과 10일 후의 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양은 각각 $10^{7.50}$ 과 $10^{7.46}$ cells/g of wet feces였다. 따라서 *L. brevis* FSB-1은 GI tract내에서 생육이 가능하며, 경구투여 기간뿐만 아니라 경구투여 중단 후 10일까지도 장내에 점착하여 생육하는 것으로 판단되므로 장내 생육능력과 점착능이 매우 우수한 균주로 여겨졌다. 또한 polyclonal antibodies를 이용한 ELISA법에 의한 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 검출방법은 섭취시킨 유산균의 검출정도를 신속하게 파악할 수 있는 매우 유용한 방법임을 확인할 수 있었다.

2. 협동과제 : 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발

가. 면역활성이 우수한 유산균주 선별 및 *in vitro*와 *in vivo* 면역 특성

면역활성이 우수한 유산균주를 선별할 목적으로 총 27종의 공시균주 및 일부

분리 균주를 대상으로 면역증진활성을 검토한 결과, 우리나라 전통 발효식품인 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* 과 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분이 가장 높은 항보체 활성을 보여 우수 균주로 선별하고 이후의 실험에 사용하였다. 이들 중 주관기관에서 장내 점착능이 우수한 균주로 선별된 *L. brevis* FSB-1는 장내 점착능과 면역활성 모두가 우수하였으므로 이들을 대상으로 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체 외 획분으로 각각 분리한 다음 각종 면역 증진활성을 측정하였다. 장관면역 활성의 측정결과, Peyer's patch 세포를 매개로 한 골수세포 증식활성의 경우, 세포벽 및 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 농도 의존적으로 보인 반면, 직접적인 골수세포 증식활성은 나타내지 않았다. 마크로파지 활성화능은 전균체, 세포벽 및 세포질 획분에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, splenocyte mitogen 활성화능의 경우는 이들 획분에서 공히 대조군의 약 200%이상의 활성증가가 관찰되었다. 그러나 양성 대조군인 LPS의 활성화에는 다소 미치지 못하였다. 한편 보체계 활성화능을 검토한 결과는 균체 외 획분을 제외한 모든 획분에서 높은 활성화능을 보였으며, 특히 세포질 획분에서 농도 의존적으로 매우 강력한 활성을 나타냈다. 또한 세포질 획분에 의한 보체계 활성화는 anti-human C3를 이용한 2차원 면역 전기영동에 의해, classical 및 alternative pathway의 양 경로를 경유함을 확인할 수 있었다. *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분을 대상으로 *in vivo* 보체계 활성화능이 측정되었다. *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분은 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg, 0 mg/kg씩 각각 복강내에 주사하고, 혈중 보체가를 측정 한 결과, 각 투여군에서 대조군에 비하여 보체가의 급격한 감소가 관찰되었다. 보체가는 초기 급격한 감소를 보이다가, 투여 4시간 이후를 경계로 회복되는 양상을 보여주었다. 이러한 결과는 보체의 활성화에 의한 것으로 이들 활성 다당 획분이 체내 보체계를 직접 활성화 할 수 있음을 시사하는 것이다. 한편 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분의 복강 내 투여가 C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 영향을 검토한 결과, 회수된 macrophage 중 complement C3의 분해산물이 결합되어 있어 C3-positive한 형광성 세포는 무투여 대조군이 7.8%인데 반하여 10 mg/kg 투여군에서는 32.6%, 20 mg 투여군에서는 48.9%를 나타냄으로써 급격한 증가를 보였으며 이러한 결과는 *L. brevis*

FSB-1의 세포질 획분이 complement를 활성화하여 생성된 부산물(C3b)에 의해 macrophage를 활성화할 수 있으며, 특히 활성화된 macrophage에 의해 항암활성까지도 기대할 수 있음을 시사하는 내용으로 흥미로운 결과라 할 수 있다.

나. 면역활성이 우수한 유산균주 선별 및 *in vitro*와 *in vivo* 면역 특성

본 연구는 인간의 대장내 점막에 대하여 장내 점착능과 면역활성이 우수한 것으로 판명된 균주를 대상으로 이와 같은 생리활성을 소유한 유제품의 산업화 및 유산균제제와 생리활성물질 분획으로부터 기능성소재로서의 폭 넓은 활용을 제안하기 위한 목적으로 수행되었다. 특히 *L. brevis* FSB-1의 균체성분에 대한 면역활성 연구뿐만 아니라 대사산물에 의한 면역활성의 측정을 위하여 유산균의 대사산물로 생산될 수 있는 면역능 활성화물질인 exopolysaccharide (EPS)의 생산가능성 확인 및 최적의 생산조건을 규명하였다. 또한 곡물을 배지로 활용하여 EPS의 생산성 향상 및 EPS의 항보체, mitogen 및 cytokine 활성 등의 면역특성을 측정하였다. 그 결과 *L. brevis* FSB-1은 15% skim milk를 배지로 사용할 경우 EPS를 생산하였으며, 최적조건은 온도 40℃에서 30시간동안 배양할 때 최대의 EPS생산량을 보였으며 항보체활성을 보였다. 위의 EPS의 생산을 위한 최적조건을 바탕으로 8종의 곡물배지를 활용한 *L. brevis* FSB-1의 배양결과 가장 높은 EPS의 생산량을 보인 곡물은 검은콩, 보리 및 찹쌀현미였으며, 항보체활성이 가장 높은 EPS의 생산을 보인 곡물은 대두였다. EPS의 생산성을 보다 향상시키기 위하여 검은콩, 보리 및 찹쌀현미에 대한 배합비와 배양시간에 따라 *L. brevis* FSB-1을 배양한 결과, 배합비율은 보리와 찹쌀현미를 1:2로 배합했을 때, 배양시간은 24시간에서 54시간 사이에 최대 EPS의 생산량을 보였다. 이 때 생산된 EPS의 면역활성화능 측정결과 배양시간에 관계없이 높은 항보체활성과 mitogen 활성을 보였다.

이상의 결과로 선별된 *L. brevis* FSB-1과 *Lactobacillus plantarum*은 인간의 대장내 점착성 및 면역활성(균체성분 및 대사산물)을 소유하고 있는 것으로 사료된 바, 이를 활용하여 생리활성을 소유한 다양한 기능성 식품 소재로의 응용이 가능할 것으로 판단되었다.

SUMMARY

I. Project Title

Development of dairy starter culture having potent adhesive property and immunopotentiating activities

II. Objective and Importance of the Project

Lactic acid bacteria (LAB) have many beneficial effects on human health, such as the alleviation of symptoms of lactose intolerance, modulation of endogenous microflora, anti-microbial activity of pathogens, reduction in serum cholesterol, anti-carcinogenic and immunostimulation activities. Since the adhesion of LAB to the human colonic mucosa has been considered as an important element for many of the observed health aspects, the adhesion to intestinal mucosa has been used as a selection criteria for a new probiotic strain. The objectives of this project were to screen lactic acid bacteria with potent adhesive property to human colonic mucosa and immunopotentiating activities, to optimise the culture condition, to elucidate the adhesive mechanisms and immunopotentiating characteristics in vitro and in vivo, and to develop a new starter and processed products by using these selected lactic acid bacterial strains.

III. Scope and Contents of the Project

Following studies were done by two research groups.

Part I: Strain development of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa and elucidation of the adhesion property

1. Isolation of identification of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa
 - 1) Establishment of analysis condition of colonic mucin-binding assay
 - 2) Screening and identification of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa
 - 3) Resistance of acid and bile salts of the isolated strain in GI (gastrointestinal) tract

2. Elucidation of the adhesion property of *Lactobacillus brevis*. FSB-1
 - 1) Isolation of lectin for the elucidation of binding properties to human colonic mucosa
 - 2) Mechanism and mucin binding properties of lectin isolated from *L. brevis*. FSB-1

3. Determination of the adhesive property of *L. brevis* FSB-1 *in vivo*
 - 1) Establishment of ELISA assay for estimation of *in vivo* adhesion property
 - 2) *In vivo* adhesive property in human colonic mucosa by orally administration of *L. brevis* FSB-1

Part II. Isolation of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities and development of starter for the new dairy product

1. Screening of Isolation of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities and their *in vitro* and *in vivo* characterization

- 1) Screening of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities
 - 2) *In vitro* immunopotentiating activities of the isolated strain
 - 3) *In vivo* immunopotentiating activities of the isolated strain
2. Production and immunopotentiating activity of exopolysaccharides (EPS) by *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *L. platarum* and their application
- 1) Optimal production condition of the exopolysaccharide (EPS) by *L. brevis* FSB-1 and *L. platarum*.
 - 2) Production of the exopolysaccharides (EPS) using cereals by *L. brevis* FSB-1 and their immunopotentiating activities
 - 3) Development of starter and prototype products by isolated strains

IV. Results and Proposal for Application

Part I: Strain development of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa and elucidation of the adhesion property

A. Isolation and identification of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa

To screen probiotic LAB with potent adhesive property on human colonic mucin, colonic mucin-binding assay was introduced. This colonic mucin-binding assay actually measures the binding affinity of surface lectin-like protein (SLP) on colonic mucin, and the optimal conditions were examined. The optimal pH for colonic mucin coating on plate wells was 4.8, and $\times 24,000$ diluted solution of commercially available horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin yielded good results. For rapid screening, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of biotinylated SLP from lactic acid bacteria was

optimal, and optimal scintillation time of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) was 10 min. These conditions were useful for both rapid selection and quantitative analysis of lactic acid bacteria that have high adhesion to human intestinal tract. Among 50 strains of lactic acid bacteria, including 32 type culture strains and 18 isolated strains from infant feces, *Lactobacillus* species FSB-1 isolated from kimchi showed the highest binding affinity to colonic mucin. From the taxonomical viewpoints based on morphological study, physico-biochemical study, partial 16S rDNA sequencing, and phylogenetic analysis, *L.* species FSB-1 was identified as *Lactobacillus brevis*. The acid tolerances of *L. brevis* FSB-1 in MRS broth (pH 3.0) for 90 min, was high enough that the majority of the inocula survived. The bile tolerances of FSB-1 was also observed at a 4% oxgall concentration in MRS broth.

B. Elucidation of the adhesion property of *Lactobacillus brevis*. FSB-1

To maintain the valid physiological effects of LAB in large intestine, the adhesion properties of LAB to human colonic mucosa is essential. Since *L. brevis* FSB-1 showed the strong adhesion property in colonic mucin-binding assay, we studied to find the primary factors associated with the adhesion of LAB to rat colonic mucin, which contains sugar chains similar to those in human colonic mucin. Specific lectins bound to colonic mucin were isolated by using the reaction between the SLP of *L. brevis* FSB-1 and colonic mucin-coated membrane. When the isolated lectins of *L. brevis* FSB-1 analyzed by SDS-PAGE, three bands (about 24, 55 and 75 kDa) were observed on the electrophoretograms. It has been found that there were no differences in binding affinity among 3 lectin bands. From the results, it assumed that those lectins were contributed to the adhesion of the bacterial cell to the specific sugar chains of human

colonic mucosa. Therefore, we investigated the specific sugar chains in glycoprotein of mucin using modified colonic mucin-binding assay and TLC-immunostaining. The results of modified colonic mucin-binding assay indicated that SLP of *L. brevis* FSB-1 bound to sialic acid and GalNAc₁₋₃Gal, and the results of TLC-immunostaining indicated that SLP bound strongly to Neu5Aca₂₋₆Gal β ₁₋₄GlcNAc. Therefore, it could be concluded that SLP of *L. brevis* FSB-1 recognized the external sugar chains of rat colonic mucin and bound to it.

C. Determination of the adhesive property of *Lactobacillus brevis* FSB-1 *in vivo*

This study aimed to evaluate *in vivo* gastrointestinal survival and adhesive property of orally administered *L. brevis* FSB-1. Since ELISA using specific polyclonal antibodies for *L. brevis* FSB-1 was able to detect the organism in feces, we have developed the specific polyclonal antibodies to isolate and identify this strain. We collected the feces from Wister rats which were orally administered 10^{10} cells/rat/day for 20 days, and determined the LAB cells in feces. The mean recovery of *L. brevis* FSB-1 was about $10^{7.22}$ cells/g of wet feces during the oral administration period, and *L. brevis* FSB-1 cells were recovered $10^{7.50}$ and $10^{7.46}$ at 8 and 10 days after the end of the oral administration, respectively. These results indicated that *L. brevis* FSB-1 was able to survive in the gastrointestinal tract of rats and had the high adhesion property in rat colon. The fecal detection method by ELISA using polyclonal antibodies could provide as a useful tool for detecting specific dietary LAB *in vivo*.

Part II: Isolation of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities and development of starter for the new dairy product

A. Screening of Isolation of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities and their *in vitro* and *in vivo* characterization

Among 27 strains of lactic acid bacteria examined for their immunopotentiating abilities, *Lactobacillus plantarum* and *L. brevis* FSB-1 previously isolated from *Kimchi* showed high anti-complementary activity. In order to evaluate the potential utilization value as a novel probiotic strain, the immunopotentiating activities of the cellular components of *L. brevis* FSB-1 were examined. *L. brevis* FSB-1 isolated from kimchi were fractionated into the whole cell, cell wall, cytosol and extracellular preparations, and each fraction was examined on intestinal immune system modulating activity *in vitro*. The cell wall and cytosol preparations showed the relatively high bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch cell in a dose-dependent manner. But these preparations did not directly stimulate the bone marrow cell proliferation. The whole cell, cell wall and cytosol preparations also induced considerable levels of macrophage activation and mitogenicity of murine splenocytes *in vitro*. The anti-complementary activity (ITCH₅₀) of the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 was the most potent in the cellular components, and the activity showed dose dependency. The complement activation by the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 occurs *via* both alternative and classical pathways, which confirmed by the crossed immunoelectrophoresis using anti-human C3. The effect of complement activation *in vivo* by the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 was confirmed by TCH₅₀ analysis of sera drawn from sample injected guinea pig. And increases in third component of complement (C3)-positive cells in mice treated with the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 suggested that the cytosol fraction of *L. brevis* FSB-1 activated the complement system *in vivo*.

B. Production and immunopotentiating activity of exopolysaccharides (EPS) by *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *L. plantarum* and their applications

Cereal associated lactobacilli produce a large structural variety of exopolysaccharides (EPS). Because these lactobacilli have a widespread use as starter cultures in cereal fermentations, these polymers are available for food applications through the production by lactobacilli in situ during food fermentation. For the production of EPS from lactobacilli, we carried out various nutrients and culture conditions. *L. brevis* FSB-1 and *L. plantarum* showed the increase of EPS production with increase of skim milk amounts. Especially, addition of 15% skim milk showed high level of EPS production in both strains. *L. brevis* showed a high level of EPS production at 40°C, but *L. plantarum* at 30°C. *L. brevis* showed the highest EPS production between 30 h, but *L. plantarum* showed decrease of EPS production with increase of culture time. at 30°C. Anti-complementary activity of *L. brevis* was showed the highest level at 48 h culture. Various cereals, black bean, barley etc., were used to produce EPS. Barley was the most suitable cereal for the EPS production by *L. brevis*. However, soybean ferment with *L. brevis* showed a high activity of anti-complementary. Mitogenic activities showed high levels in soybean and millet ferments. However, cytokine activities in cereals ferments did not show high level. EPS production slightly increased using cereal mixture (barley:waxy brown rice = 1:1). However, there were not significantly increase of anti-complementary activity and mitogenic activities. Single uses of cereals, black bean or barley or waxy brown rice, showed higher mitogenic activities than mixtures of cereals. Using cereals mixture, barley-waxy brown rice (1:2) showed highest level of EPS production, but did not showed high level of mitogenic activity. Mitogenic activity using the mixture (1:4) showed the highest activity. For the

increase of mitogenic activity, the addition of amylase did not showed increase of activity, but showed increase of anti-complementary activity.

TABLE OF CONTENTS

Cover letter	1
SUMMARY (Korean)	3
SUMMARY (English)	11
TABLE OF CONTENTS (English)	19
TABLE OF CONTENTS (Korean)	21
Chapter 1. Summary of study	27
I. Significance	27
II. Objectives and Scope	30
Chaper II. State of the art	33
Chapter III. Contents and Results	36
Part I : Strain development of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa and elucidation of the adhesion property	36
I. Isolation of identification of lactic acid bacteria with potent adhesive property in human colonic mucosa	36
1. Introduction	36
2. Materials and methods	38
3. Results and discussions	43
II. Elucidation of the adhesion property of <i>Lactobacillus brevis</i> . FSB-1	63
1. Introduction	63
2. Materials and methods	66

3. Results and discussions	75
III. Determination of the adhesive property of <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1 <i>in vivo</i>	83
1. Introduction	83
2. Materials and methods	84
3. Results and discussions	89
 Part II : Isolation of lactic acid bacteria with immunopotentiating activities and development of starter for the new dairy product	103
I. Screening of Isolation of lactic acid bacteria with immunopo- tentiation activities and their <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> characterization ..	103
1. Introduction	103
2. Materials and methods	106
3. Results and discussions	117
II. Production and immunopotentiating activity of exopolysaccharides (EPS) by <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1 and <i>L. plantarum</i> and their applications	136
1. Introduction	136
2. Materials and methods	137
3. Results and discussions	144
 Chapter IV. Accomplishment and subsequent contributions	197
 Chapter V. Application of the results	198
 Chapter VI. References	199

목 차

제 출 문	1
요 약 문	3
SUMMARY	11
TABLE OF CONTENTS	19
목 차	21
제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구개발의 필요성	27
1. 기술적 측면	27
2. 경제·산업적 측면	29
3. 사회·문화적 측면	29
제 2 절 연구개발목표와 범위	30
1. 연구개발 목표	30
2. 연구 범위	31
가. 세부과제 (주관기관: 경기대) : 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	31
나. 협동과제 (협동기관: 고려대) : 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효유제품 starter 개발	31
3. 연차별 연구개발목표 및 내용	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황	33
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	36
제 1 절 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	

(세부과제: 경기대학교)	36
제 1 항 장내 점착성이 우수한 균주 분리 및 동정	36
1. 서 설	36
2. 재료 및 방법	38
가. 사용균주 및 실험동물	38
나. 유아분변으로부터 <i>Bifidobacterium</i> 속 균주의 분리	38
다. 유산균의 배양 및 surface lectin-like protein(SLP)의 조제	93
라. Biotinylated SLP의 조제	39
마. Rat colonic mucin(RCM)의 조제	40
바. Colonic mucin-binding assay	40
사. Colonic mucin-binding assay의 분석조건 설정	41
아. 장내 점착능 우수 유산균주의 동정	42
자. 분리균주의 내산성 및 내담즙성 평가	43
3. 결과 및 고찰	43
가. 장내 점착성 우수 유산균주 선별을 위한 colonic mucin binding assay의 분석조건 최적화	43
나. 대장 mucin에 대한 각종 유산균주의 결합능 비교	49
다. SLP의 농도에 따른 선별균주의 장내 점착능	54
라. 장내 점착능 우수 유산균주 <i>Lactobacillus species</i> FSB-1의 동정	56
마. 분리균주의 내산성 및 내담즙성	60
제 2 항 분리 균주의 장내 점착특성 규명	63
1. 서 설	63
2. 재료 및 방법	66
가. 사용균주 및 실험동물	66
나. 유산균의 배양 및 surface lectin-like protein(SLP)의 조제	76
다. Biotinylated SLP의 조제	67
라. Rat colonic mucin(RCM)의 조제	68
마. <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 SLP로부터 lectin의 분리	68

바. SDS-PAGE	69
사. RCM과 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 분리 lectin간의 결합 특성측정	69
아. Modified colonic mucin-binding assay를 이용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당 규명	69
자. Thin Layer Chromatography(TLC)-immunostaining을 이용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 균체가 인식하는 RCM의 당 규명	72
3. 결과 및 고찰	75
가. <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 SLP로부터 lectin 분리 및 RCM에 대한 각 분리 lectin의 결합특성	75
나. Modified colonic mucin-binding assay를 이용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당 규명	77
다. TLC-immunostaining을 이용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 균체가 인식하는 RCM의 당 규명	81
제 3 항 분리 균주의 장내 점착특성에 대한 in vivo 실험	83
1. 서 설	83
2. 재료 및 방법	84
가. 사용균주 및 실험동물	84
나. Polyclonal antibodies의 조제	85
다. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)	85
라. Wister rat을 이용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 섭취	86
마. Wister rat의 분변내 균총(microflora)의 회수	88
바. 통계 처리	88
3. 결과 및 고찰	89
가. ELISA법에 의한 polyclonal antibodies의 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1에 대한 인식능	89

나. <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 gastrointestinal(GI)	
tract내 생육능력 및 장내 점착능	93
제 2 절 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발	
(협동과제: 고려대학교)	103
제 1 항 면역활성이 우수한 유산균주 선별 및 <i>in vitro</i> 와 <i>in vivo</i> 면역	
특성	103
1. 서 설	103
2. 재료 및 방법	106
가. 사용균주 및 실험동물	106
나. 면역활성 우수균주의 선별	106
다. 균체성분의 분획물 조제	106
라. 장관면역 활성측정	108
마. 마크로파지 활성화능 측정	109
바. Splenocyte mitogen 활성화능 측정	110
사. 보체계 활성화능 측정	110
아. 보체계 활성화 경로 검토	114
자. <i>In vivo</i> 보체계 활성화능 실험	114
차. 통계 처리	115
3. 결과 및 고찰	117
가. 면역 활성 우수균주의 선별	117
나. 골수세포 증식에 의한 장관면역 활성	119
다. 마크로파지 활성화능	122
라. Splenocyte mitogen 활성화능	124
마. 보체계 활성화능	126
바. 보체계 활성화 경로	128
사. 2차원 면역 전기영동에 의한 C3산물의 동정	130
아. 보체계 활성화능의 <i>in vivo</i> 실험	132
제 2 항 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1 과 <i>Lactobacillus plantarum</i> 의	
exopolysaccharide (EPS) 생산능 및 면역 활성과 시작품	

제작	136
1. 서 설	136
2. 재료 및 방법	137
가. Exopolysaccharide(EPS) 생산을 위한 최적조건 확립	137
나. 곡물을 배지로 활용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 EPS 생산능	140
다. EPS의 항보체 활성	141
라. Mitogen 활성	142
마. Cytokine 활성	143
바. 통계 처리	144
3. 결과 및 고찰	144
가. EPS의 생산을 위한 최적조건 분석	144
나. 곡물을 배지로 활용한 <i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1의 EPS 생산능	155
다. 실험결과를 이용한 시작품 제작	187
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	 197
 제 5 장 연구개발결과와의 활용계획	 198
 제 6 장 참고문헌	 199

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

유산균의 주류를 차지하고 있는 *Lactobacillus*속과 *Bifidobacterium*속은 오래 전부터 각종 발효 유제품과 된장 및 김치 등 전통 발효식품에 응용되어 왔으며, 최근에는 의약품 및 사료의 첨가제에까지 광범위하게 활용되고 있다 (Jung, 1997; Jung과 Kang, 1997; Kim, 1994). 또한 유산균은 인간의 유용한 장내 미생물로서, 유당 불내증의 완화, 정장작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤의 저하작용, 항암작용 및 면역 활성화 작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다(Collins 등, 1998; Gill, 2003; Goldin, 1998; Klaenhammer와 Kullen, 1999; Ouwehand 등, 1999c; Salminen 등, 1999; Sherwood와 Gorbach, 2000). 이러한 유산균의 유효한 생리효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다(Coconnier 등, 1992). 유산균의 장내 상재성을 위해선 장내 점착능(adhesion property)이 중요한 인자로서 알려져 있으며, probiotics로 사용되는 유산균을 선택하는데 있어 하나의 기준으로 여겨지고 있다(Ouwehand 등, 1999d, 2001). 그러나 실질적으로 인간의 대장내 구조는 상피세포를 점막층(mucin)이 평균 400 μm 이상의 두께로 덮고 있기 때문에, 유산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 점막층물질에 결합하여 분열 및 증식하는 것으로 보고되고 있다(Matsumoto, 2002). 따라서 유산균이 장내 상재성을 갖고 유용한 제반 효과들을 발휘하기 위해서는 점막층과의 결합력이 필수적으로 요구된다 하겠다

(Blum 등, 1999; Kirjavainen 등, 1998).

적절한 장내 균총은 건강과 일치하며 장내 생태계의 변화는 면역학적 기능 장애나 면역결핍과 관련이 있다. 많은 장내 세균군에서도 젖산균은 1차적 보호장벽이 되어 장관감염과 유해균의 증식을 저지하고 장관의 환경을 정화하는 기능을 가진다. 프로바이오틱 젖산균은 장내까지 생존하여 들어가 유기산 생성에 의한 정장작용, 다른 유해균과의 영양성분에 대한 경쟁적 이용, 장내 생존성과 점착성, 인체의 비자기체 인식에 의한 면역체계의 증가와 특정한 면역 단백질 생성 증가, 유산균 세포 잔해물 (cell debris)에 의한 여러 가지 기능효과 등이 젖산균의 장내 유용효과로 인정되고 있다. 이와 같은 기능성은 프로바이오틱 균수와 균종에 따라서 차이가 있다. 따라서 장벽 점착성과 균주에 따른 면역활성의 차이는 장내 정장작용에 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 프로바이오틱 젖산균의 (수)많은 기능 중 장내에서의 병원체 감염억제에 대한 과정에 최우선적으로 관여하는 것은 장벽 정착능이라 판단되며, 유산균의 개발에 앞서 가장 먼저 검토 되어야 할 분야로 사료된다.

Inhibitory mechanisms of probiotics against pathogens in gastrointestinal tract

Items	Factors
Secretion of (General)	Organic acid Anti-pathogen materials Anti-rotavirus materials
Stimulation of (Immune-potential)	Cytokine secretion Phagocytosis Increase of specific IgA
Inhibition of (First gut mucosal barrier)	Adherence of pathogens Penetration of macromolecules

우리나라의 2001년도 요구르트 소비현황을 보면 액상제품은 377,965톤, 호상제품은 156,020 톤으로 액상제품의 비중이 높다. 따라서 국민 건강증진과 더불어 젖산균 발효 유제품의 소비증진을 위하여 유용한 유산균의 starter 개발이 중요하다. 앞서 지적하였듯이 유용한 젖산균의 장내 점착성과 젖산균이 지니는 면역활성의 증강 효과는 젖산균 발효 유제품의 유용성을 증대하므로 이에

대한 연구 및 starter 개발이 시급한 실정이다.

2. 경제·산업적 측면

유산균 발효물 또는 균체의 유용물질이 면역활성화능과 같은 생리활성을 지남에 따라 단순 발효 유제품의 생산 외에 고부가가치성을 가진 물질생산이 가능하게 됨에 따라 부가가치를 효과적으로 높일 수 있으며, 유제품 생산에 사용이 가능한 균주를 개발함에 따라 다양하고 새로운 starter를 획득함으로써 여러 종류의 수입 유제품들에 대한 경쟁력 있는 starter로의 대체효과를 얻을 수 있으며 나아가서는 starter의 해외 수출이 가능할 것으로 보인다. 뿐만 아니라 다양한 형태의 유산균 발효제품의 생산이 가능해 짐에 따라 우유 소비량의 증대가 이루어 질 수 있으며 이로 인한 농가의 수입증대 및 우유의 안정적인 매출을 기대할 수 있다. 더불어 안전성이 기 확보된 균주를 어린아이를 대상으로 하는 이유식 및 분유 등의 여러 식품에 활용함에 따라 면역능력이 떨어지는 어린아이들에게 면역활성화를 부여할 수 이 증진을 꾀할 수 있으리라 사료된다.

3. 사회·문화적 측면

현재 우리나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 결코 낮지 않으며 평균수명은 2006년기준 약 78세에 이르렀으며 건강수명 역시 증가하여 약 69세에 이르는 것으로 평가되고 있다. 그러나 사망원인 또한 감염형 질환의 비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 만성질환과 암에 의한 사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있어 건강수명을 늘리고자 하는 국민적 욕구가 증대하고 있다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 “고령화병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다”는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다. 우리나라가 2004년 건강기능식품제도를 정식으로 도입하게 된 배경

에는 식품소재를 통하여 고령화병을 예방함으로써 정부의료비 부담을 경감시키고 활동력을 갖는 고령화 노동인력을 확보하자는데 두고 있음은 주목할 필요가 있다.

따라서 면역활성화능을 가진 균주의 선별로 인한 식품에의 적용 및 기능성 소재로의 응용은 평소 식습관에서의 자연식품섭취가 가능하게 될 것이며 이로 인해 어린이들은 면역능력향상을, 성인은 각종 암과 같은 성인병 예방에 일조할 것으로 사료된다. 따라서 건강한 국가를 만드는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안으로 제시될 수 있을 것이다.

또한 본 연구 결과 장내점착능과 면역활성이 우수한 starter의 개발로 인한 유제품의 응용으로 안정적인 우유의 소비는 축산업계를 중심으로 농가 소득이 보장될 수 있으며, 이로 인해 농업인구의 이동이 감소되어 농촌의 공동화와 인구의 도시집중화로부터 기인하는 사회적 문제를 완화시킬 수 있을 것이라 예상된다.

본 연구는 장내 점착능과 면역증진 활성이 우수한 유산균주를 선별하고 이들의 점착 및 면역특성을 규명함으로써, 새로운 형태의 유산균 스타터 개발과 probiotics로서의 이용성을 제시하는 것을 최종 목표로 하고 있다. 최종 목표를 달성하기 위해 분야에 따라 1 및 2 세부과제(제 1 세부과제 및 제2 협동과제)로 구성하였으며 주요 연구개발 목표와 내용을 세부과제별로 요약하면 다음과 같다.

제 2 절 연구개발목표와 범위

1. 연구개발 목표

- 인간의 대장에서 우수한 점착능을 갖는 균주를 선별할 목적으로, 점막층 당단백질인 RCM과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합능을 측정하는 colonic mucin-binding assay의 분석조건을 확립

- 확립된 colonic mucin-binding assay의 분석조건을 이용하여 공시균주 및 분리균주에서의 장내 점착성이 우수한 균주 분리하고 이들을 동정한 후 장내 점착특성을 규명
- 젖산균의 면역증강물질은 세포벽에 존재하는 peptidoglycan과 다당계물질인 것으로 밝혀져 있으므로 공시균주 및 분리균주에서의 면역활성이 높은 균주 분리하고 면역 특성을 검토
- 미생물은 세포벽 외부에 다당류를 생성하는데 세포벽과 결합되어 있는 capsule (capsular polysaccharides)과 세포벽과 결합되지 않은 loose slime (ropy)의 형태로 구분되며, 이를 총칭하여 exopolysaccharide (EPS)라 명명하고 있으므로 공시균주 및 분리균주에서의 면역활성이 높은 균주를 분리하며 분리 균주의 EPS 생산조건을 검토
- 장내점착성과 면역활성이 높은 균주를 사용하여 제조한 유산균 발효물의 특성을 평가하여 starter로서의 적합성 확인
- 개발된 starter를 활용한 젖산균 발효물의 시제품 생산.

2. 연구 범위

가. 세부과제 (주관기관: 경기대) : 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명

- Colonic mucin-binding assay의 분석조건을 확립
- 확립된 분석방법을 활용한 장내 점착성(점착능) 우수균주 분리 및 동정
- 분리균주의 산내산성 및 내담즙성 평가
- 분리 균주의 점착특성 평가를 위한 lectin 분리
- 분리된 lectin을 활용한 점착특성 및 기작 평가
- Polyclonal antibody를 활용한 균주 점착성에 대한 *in vivo* 실험

나. 협동과제 (협동기관: 고려대) : 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발

- 면역활성 우수균주 분리 및 동정

- 분리균주의 EPS 생산능력 확인 및 생산조건 확립
- 분리균주의 면역 특성 평가
- 분리균주의 면역활성에 대한 실험동물에 의한 *in vivo* 실험
- Starter에 의한 시제품 생산

3. 연차별 연구개발목표 및 내용

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2006)	세부과제: 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Colonic mucin-binding assay의 분석조건을 확립 - 확립된 분석방법을 활용한 장내 점착성(점착능) 우수균주 분리 및 동정 - 분리균주의 산내산성 및 내담즙성 평가
	협동과제: 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 면역활성 우수균주 분리 - 분리균주의 EPS 생산능력 확인 및 생산조건 확립
2차년도 (2007)	세부과제: 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 분리 균주의 점착특성 평가를 위한 lectin 분리 - 분리된 lectin을 활용한 점착특성 및 기작 평가 - Polyclonal antibody를 활용한 균주 점착성에 대한 <i>in vivo</i> 실험
	협동과제: 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 분리균주의 면역 특성 평가 - 분리균주의 면역활성에 대한 실험동물에 의한 <i>in vivo</i> 실험 - Starter에 의한 시제품 생산

제 2 장 국내외 기술개발 현황

지금까지 유산균의 장내 점착능에 대한 연구는 대부분 인간의 대장내 상피세포 유래인 Caco-2 또는 HT-29 cells 등과 유산균간의 결합력을 기초로 한 균주의 선별이 그 주를 이루어 왔다(Blum 등, 1999; Chauviere 등, 1992; Coconnier 등, 1992; Greene과 Klaenhammer, 1994; Tuomola와 Salminen, 1998). 그러나 실질적으로 인간의 대장내 구조는 상피세포를 점막층(mucin)이 평균 400 μm 이상의 두께로 덮고 있기 때문에, 유산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 점막층물질에 결합하여 분열 및 증식하는 것으로 보고되고 있다(Matsumoto, 2002). 따라서 유산균이 장내 상재성을 갖고 유용한 제반 효과들을 발휘하기 위해서는 점막층과의 결합력이 필수적으로 요구된다(Blum 등, 1999; Kirjavainen 등, 1998). 유산균과 인간의 대장내 점막층과의 결합은 유산균 표면에 존재하는 lectin상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 점막층을 구성하는 단백다당체인 mucin의 당쇄구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되고 있으며, 이들간의 결합력은 유산균 표면의 lectin상 단백질의 특성과 점막층의 당쇄구조의 차이에 기인한다고 알려져 있다(Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996).

대장내 존재하는 mucin의 당쇄구조는 종에 따라 서로 상이한 것으로 알려져 있는데, 인간 대장내 mucin은 쥐의 mucin(rat colonic mucin, RCM)과 가장 유사한 당쇄구조를 가지고 있다고 보고되고 있다(Matsumura 등, 1999; Podolsky, 1985a; Slomiany 등, 1980; Takahashi 등, 1996). RCM의 경우 산성 및 중성당으로 구성된 당쇄가 단백질의 serine 및 threonine을 통하여 O-결합 형태를 하고 있으며, 약 8종류의 서로 다른 당 사슬 구조를 함유한다고 보고되고 있다(Slomiany 등, 1980). 최근 장내 점막층과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합력을 이용한 유산균의 장내 점착능의 연구가 보고되고 있다

(Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996). Takahashi 등(1996)은 RCM을 이용하여 polystyrene bead에 코팅하고, 유산균의 결합능을 측정하는 새로운 선별방법을 고안하여, *Lactobacillus acidophilus* group 유산균들과 RCM간의 결합능을 조사하였다. 그 결과, *L. acidophilus* YN 2062, YN 279, YN 266이 가장 높은 결합능을 보였다고 보고하였다. 한편 Matsumura 등(1999)은 여러 *Lactobacillus acidophilus* 균종과 RCM간의 결합능을 조사한 결과, *L. acidophilus* JCM 1024, SBT 267, LA2, SBT 2062가 높은 결합능을 가졌으며, 이들 균주의 lectin상 단백질과 colonic mucin의 내부 당쇄구조간의 결합의 중요성을 강조한 바 있다. 그러나 이 연구들은 *L. acidophilus* group에만 국한되어 있어 그 외 유산균이 소유한 점착능과의 전반적인 비교가 어려운 실정이다.

또한 유산균의 성장작용 외에 항암효과, 항균작용, 항콜레스테롤, 항변이원 작용, 면역증진 효과 등 생리활성에 관한 연구(Bhakdi 등, 1997; Fernandes와 Shahani, 1990; Gill, 2003; Hamilton-Miller, 2003)는 유산균체의 섭취 또는 세포성분 및 이들의 대사산물에 의한 것으로서(Kitazawa 등, 1998; Meydani와 Ha, 2000), 예를 들어 세포벽 성분(capsular polysaccharides, peptidoglycans, lipoteichoic acids)에 의한 대식세포의 cytokine 유도(Bhakdi 등, 1997; Keller 등, 1992) 및 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*에 의한 항암효과, 대식세포 활성화 및 cytokine의 유도가 보고되고 있다(Kitazawa 등, 1998, 2000; Uemura 등, 2003). 또한 *Lactobacillus plantarum*에 의한 대식세포의 cytokine 유도(Haza 등, 2003) 및 이 균체의 세포벽 성분에 의한 보체 활성화도 보고되고 있다(Kim 등, 2002). 유산균이 이러한 면역 활성화능을 발휘하기 위해서는 유산균이 소화기관을 거쳐 장내까지 생존하여야 하며, 장내 표면이나 상피세포에 어떠한 형태로든 결합하여 지속적으로 살아갈 수 있는 능력이 있어야 한다. 즉 장내 상재성을 갖는 유산균 및 이들이 생산하는 세포성분과 산물 등이 Gut Associated Lymphoid Tissue(GALT)를 자극시키고 Peyer's patch내의 면역세포의 분열 및 증식을 증가시키며, antibody(IgA의 분비)와 cytokine의 생산을 유도하여, 결과적으로 인체의 전신 면역계에 공헌하게 된다(Meydani와 Ha, 2000, Fig. 3-1).

Lactobacillus brevis ATCC 14869T와 ATCC 8287은 *in vitro* 실험결과 인간의 Caco-2 및 Intestine 407 cell에 대해(Elina 등, 2003), *L. brevis* PEL1은 인간의 장내 점막에 대하여(Ouwehand 등, 2001) 각각 매우 높은 장내 점착능을 보이고 있으며, 낮은 pH와 담즙산, 췌장액에 대한 저항성이 보고되고 있다(Elina 등, 2003). 또한 *L. brevis*는 우유, 치즈, 인간의 분변 및 입과 장내에서 분리되며(Elina 등, 2003; Kandler와 Weiss, 1986; Ouwehand 등, 2001), Generally Recognized As Safe(GRAS) 상태로 여겨져 probiotics로서의 잠재성에 대한 여러 연구가 보고되고 있다(Elina 등, 2003; Kishi 등, 1996; Playfair, 1987).

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명 (세부과제: 경기대학교)

제 1 항 장내 점착성이 우수한 균주 분리 및 동정

1. 서 설

유산균의 주류를 차지하고 있는 *Lactobacillus*속과 *Bifidobacterium*속은 오래 전부터 각종 발효 유제품과 된장 및 김치 등 전통 발효식품에 응용되어 왔으며, 최근에는 의약품 및 사료의 첨가제에까지 광범위하게 활용되고 있다 (Jung, 1997; Jung과 Kang, 1997; Kim, 1994). 또한 유산균은 인간의 유용한 장내 미생물로서, 유당 불내증의 완화, 정장작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤의 저하작용, 항암작용 및 면역 활성화 작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다(Collins 등, 1998; Gill, 2003; Goldin, 1998; Klaenhammer와 Kullen, 1999; Ouwehand 등, 1999c; Salminen 등, 1999; Sherwood와 Gorbach, 2000). 이러한 유산균의 유효한 생리효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다(Coconnier 등, 1992). 유산균의 장내 상재성을 위해선 장내 점착능(adhesion property)이 중요한 인자로서 알려져 있으며, probiotics로 사용되는 유산균을 선택하는데 있어 하나의 기준으로 여겨지고 있다(Ouwehand 등, 1999d, 2001).

지금까지 유산균의 장내 점착능에 대한 연구는 대부분 인간의 대장내 상피 세포 유래인 Caco-2 또는 HT-29 cells 등과 유산균간의 결합력을 기초로 한

균주의 선별이 그 주를 이루어 왔다(Blum 등, 1999; Chauviere 등, 1992; Coconnier 등, 1992; Greene과 Klaenhammer, 1994; Tuomola와 Salminen, 1998). 그러나 실질적으로 인간의 대장내 구조는 상피세포를 점막층(mucin)이 평균 400 μm 이상의 두께로 덮고 있기 때문에, 유산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 점막층물질에 결합하여 분열 및 증식하는 것으로 보고되고 있다(Matsumoto, 2002). 따라서 유산균이 장내 상재성을 갖고 유용한 제반 효과들을 발휘하기 위해서는 점막층과의 결합력이 필수적으로 요구된다(Blum 등, 1999; Kirjavainen 등, 1998). 유산균과 인간의 대장내 점막층과의 결합은 유산균 표면에 존재하는 lectin상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 점막층을 구성하는 단백다당체인 mucin의 당쇄구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되고 있으며, 이들간의 결합력은 유산균 표면의 lectin상 단백질의 특성과 점막층의 당쇄구조의 차이에 기인한다고 알려져 있다(Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996).

대장내 존재하는 mucin의 당쇄구조는 종에 따라 서로 상이한 것으로 알려져 있는데, 인간 대장내 mucin은 쥐의 mucin(rat colonic mucin, RCM)과 가장 유사한 당쇄구조를 가지고 있다고 보고되고 있다(Matsumura 등, 1999; Podolsky, 1985a; Slomiany 등, 1980; Takahashi 등, 1996). RCM의 경우 산성 및 중성당으로 구성된 당쇄가 단백질의 serine 및 threonine을 통하여 *O*-결합 형태를 하고 있으며, 약 8종류의 서로 다른 당 사슬 구조를 함유한다고 보고되고 있다(Slomiany 등, 1980). 최근 장내 점막층과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합력을 이용한 유산균의 장내 점착능의 연구가 보고되고 있다(Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996). Takahashi 등(1996)은 RCM을 이용하여 polystyrene bead에 코팅하고, 유산균의 결합능을 측정하는 새로운 선별방법을 고안하여, *Lactobacillus acidophilus* group 유산균들과 RCM간의 결합능을 조사하였다. 그 결과, *L. acidophilus* YN 2062, YN 279, YN 266이 가장 높은 결합능을 보였다고 보고하였다. 한편 Matsumura 등(1999)은 여러 *Lactobacillus acidophilus* 균종과 RCM간의 결합능을 조사한 결과, *L. acidophilus* JCM 1024, SBT 267, LA2, SBT 2062가 높은 결합능을 가졌으며, 이들 균주의 lectin상 단백질과 colonic mucin의 내부 당쇄구조간의 결합의 중

요성을 강조한 바 있다. 그러나 이 연구들은 *L. acidophilus* group에만 국한되어 있어 그 외 유산균이 소유한 점착능과의 전반적인 비교가 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인간의 대장에서 우수한 점착능을 갖는 균주를 선별할 목적으로, 점막층 당단백질인 RCM과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합능을 측정하는 colonic mucin-binding assay의 분석조건을 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3025를 이용하여 설정하였으며, 이 방법을 이용하여 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Lactococcus*속 등 공시균주 총 32종과 생후 1주 및 3세의 유아분변에서 분리한 *Bifidobacterium*속 균주로 추정되는 18종의 분리균주 등 총 50종의 유산균주를 대상으로 결합능을 측정하였다. 또한 가장 높은 활성을 보인 *Lactobacillus* species FSB-1에 대한 동정을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 실험동물

본 실험에 사용된 공시 및 분리 유산균주 32종은 각 기관에서 분양받거나 분리하여 경기대 대학원 식품생물공학과에서 보관 중인 균주로서, Table 1-2에 제시된 바와 같다. 한편 본 실험에서 colonic mucin-binding assay의 조건 확립에 사용된 균주는 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3025였다.

실험동물은 인간의 대장내 mucin과 가장 비슷한 조성(Matsumura 등, 1999; Podolsky, 1985a; Slomiany 등, 1980; Takahashi 등, 1996)을 가지고 있다고 알려진 Wister rat(웅성, 10주령, (주)샘타코, 경기)이 사용되었으며, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 및 55%의 상대습도로 조절된 사육조내에서 24~48시간 동안 적응토록 하였다. 이때 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다.

나. 유아분변으로부터 *Bifidobacterium*속 균주의 분리

경기도 수원지역에 거주하는 생후 1주 및 3세 미만의 유아분변을 채취하여 시료로 사용하였다. MRS(Difco Co., USA) 액체배지에서 유아분변을 혐기적으로 연속 희석하고, Mellissa 등(1993)의 triple-layer diffusion 방법에 따라 분변시료 현탁액이 중간층에 위치하도록 한 다음, 완전 혐기적 조건이 유지되도록 anaerobic systems(Becton Dickinson Lab, USA)를 이용하여 배양하였다. 이때 *Bifidobacterium*속 균주가 우선적으로 성장할 수 있도록 BL 고체배지(Difco Co., USA)를 선택배지로 사용하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. BL 고체배지에서 성장한 colony 중 형태가 상이한 colony 100개를 1차적으로 분리(B1~B100)하여, lithium chloride 0.5 mg/mL, sodium lauryl sulfate 20 µg/mL, sodium propionate 5 mg/mL, neomycin sulfate 10 µg/mL가 함유된 modified VF-Bouillon agar(Mellissa 등, 1993)를 이용하여 재차 적층한 다음, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 이때 시약들은 Sigma사 제품이 사용되었으며, 본 배지에서 성장한 총 18종의 균주를 *Bifidobacterium*속 추정균주로 하였다(Table 1-2 참조).

다. 유산균의 배양 및 surface lectin-like protein(SLP)의 조제

장내 점착능이 우수한 유산균주의 선별을 위해 사용된 공시 및 분리균주 50종 중 *Bifidobacterium*속 균주의 전 배양액 1%를 MRS 액체배지 300 mL에 각각 접종하고, 혐기적으로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. *Lactobacillus*속 등 기타 유산균주들을 동일한 배지조건에서 동량 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 후 실험에 사용되었다.

위에서 배양한 각각의 배양액을 4°C, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM phosphate buffered saline(pH 7.2, 이하 PBS)으로 3회 세척하였다. 2 M guanidine-HCl(Sigma Chemical Co., USA) 용액에 현탁한 후, 37°C에서 2시간 동안 진탕하여 균체 표면에 부착된 단백질을 추출하였다. 추출된 용액을 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 그 상등액을 증류수로 4°C에서 48시간 동안 투석한 후, 동결건조하여 SLP를 조제하였다.

라. Biotinylated SLP의 조제

SLP 1 mg을 0.15 M NaCl을 함유한 0.1 M Na₂HPO₄ 용액(pH 9.0)에 용해하고, biotin화 시약, D-biotinyl-ε-aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester(Roche Diagnostics Co., USA) 1 mg을 40 μL의 DMSO(Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 첨가한 후, 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 반응용액을 10 mM PBS(pH 7.2)로 4°C에서 24시간 동안 투석을 수행하여 biotin-conjugated SLP를 조제하였다. Biotinylated SLP 용액 중의 단백질 함량을 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA)을 표준물질로 하여 Micro BCA protein assay kit(Bio-rad Lab., Canada)을 이용하여 측정하였다.

마. Rat colonic mucin(RCM)의 조제

RCM은 Perret 등(1977)의 방법에 따라 Wister rat의 대장 내벽으로부터 조제되었다. 10주령의 웅성, Wister rat을 치사시켜 복부를 절개하고 대장을 적출한 다음, 대장 내벽을 slide glass로 긁어내어 점막층을 회수하였다. 회수된 점막층을 Folch's 용액(CHCl₃:CH₃OH=2:1, V/V, 시약 1급)에 현탁하여 탈지시킨 후, 4°C, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리를 수행하였다. 침전물을 Folch's 용액으로 2회 세척하고, diethyl ether(시약 1급)로 3회 재차 세척하여 탈지시켰다. 탈지된 회수 점막층에 6 M guanidine-HCl 용액을 가하여 37°C에서 2시간 동안 진탕하면서 반응시킨 다음 mucin을 추출하고, 상기 조건에서 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 증류수로 4°C에서 24시간 동안 투석한 후, 동결건조하여 RCM을 조제하였다.

바. Colonic mucin-binding assay

Microtiter plate(Maxisorp, Nunc, Denmark)에 RCM 용액(50 μg/mL, 6 M guanidine-HCl) 75 μL를 각각 분주하고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜

mucin을 well 표면에 부착시켰다. 다음날 plate를 PBST(PBS-0.05% Tween 20, 시약 1급)로 3회 세척한 후, blocking buffer(0.05% Tween 20과 1% BSA를 함유한 PBS, pH 7.2) 100 μ L를 재 분주한 다음, 상온에서 2시간 동안 방치하여 RCM이 부착되지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 각 well은 PBST를 이용하여 4회 세척하고, biotinylated SLP 용액 50 μ L를 재 분주하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응하지 않은 biotinylated SLP를 제거하기 위해 반응상등액을 제거한 다음, PBST를 이용하여 각 well을 3회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 적절히 희석된 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated streptavidin(Parmingen, Lab., USA) 50 μ L를 분주하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 결합하지 않은 HRP-conjugated streptavidin을 제거하기 위해, 상등액을 버린 다음 PBST로 7회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) liquid substrate system(Sigma Chemical Co., USA) 60 μ L를 첨가하여 발색시킨 후, 2 N H₂SO₄(시약 1급) 60 μ L를 분주하여 반응을 정지시켰다. 발색정도는 450 nm에서 Microtiter plate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

사. Colonic mucin-binding assay의 분석조건 설정

Colonic mucin-binding assay의 결과에 영향을 미치는 각각의 결정인자를 최적화하기 위하여, 대표적 유산균주인 *L. acidophilus* IFO 3025의 SLP를 이용하여 아래의 실험을 수행하고 최종적인 분석조건을 설정하였다.

1) pH에 따른 RCM의 부착조건

Microtiter plate에 대한 RCM의 부착정도에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 6 M guanidine-HCl 용액에 0.1 N NaOH(시약 1급) 또는 0.1 N HCl(시약 1급)을 가함으로서 pH를 4.8, 7.0, 10.0으로 조정하였다. 각 pH의 6 M guanidine-HCl 용액에 RCM을 첨가하여 농도가 50 μ g/mL가 되도록 조제하였다. Microtiter plate에 각각 75 μ L씩 분주한 다음, 4°C에서 16시간 동안 정지하여 RCM을 부착시켰다. Microtiter plate에 부착된 colonic mucin의 함량을

mucin중의 단백질 농도로 비교하고자, Micro BCA protein assay kit을 이용하여 측정하였다.

2) HRP-conjugated streptavidin의 처리농도 결정

Colonic mucin-binding assay에 있어서 HRP-conjugated streptavidin의 처리농도가 미치는 영향을 측정하기 위하여, biotinylated SLP의 농도를 5.0 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 고정하고, 시판 HRP-conjugated streptavidin의 농도별 희석액을 이용하여 분석을 수행한 다음 결과를 비교하였다. 이때 TMB 발색시간은 10분으로 하였다.

3) Biotinylated SLP의 처리농도 결정

최적 biotinylated SLP의 처리농도를 결정하기 위하여, 농도를 각각 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조정하여 다음, TMB 발색시간 10분에서 분석을 수행하고 그 결과를 비교하였다.

4) TMB 발색시간 결정

Colonic mucin-binding assay에서 TMB의 처리시간에 따른 영향을 검토하기 위하여, TMB 처리 0, 5, 10, 20, 40분 후에 발색을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 비교하였다.

아. 장내 점착능 우수 유산균주의 동정

본 실험에서 장내 점착능이 우수한 균주로 선별된 *Lactobacillus* species FSB-1의 동정을 위하여 S4700 SEM(Hitachi, Japan) 주사형 전자현미경에 의한 형태학적인 관찰(Shen 등, 1999)을 수행하였다. 그람염색, 산소 요구성, 운동성, 발효학적 특성 및 다양한 기질에 대한 효소 가수분해 활성 등의 생화학적 특성을 Cowan과 Steel(Cowan과 Steel, 1984) 및 Macfaddin의 방법(Macfaddin, 1984)에 따라 검사하고, Bergey's Manual of Systemic Bacteriology(Kandler와 Weiss, 1986)의 내용과 비교 및 검토하였다. 한편 보

다 정확한 동정을 위해, *L. species* FSB-1의 16S rDNA의 염기서열분석을 수행하였다. 16S rDNA를 2종류의 universal primer (5' - G A G T T T G A T C C T G G C T C A G - 3' , 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 사용하여 PCR에 의해 증폭하고 (Yoon 등, 1998), QIA Quick PCR Product Purification kit(Quiagen, Germany)에 의해 정제한 다음, ABI PRISM Big Dye Terminator 및 Genetic Analyzer 377(Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 서열을 분석하였다. 선별된 균주 *L. species* FSB-1의 16S rDNA 서열은 CLUSTRAL W software(Thomson 등, 1994)를 이용하여, 다른 *Lactobacillus*속 균주 및 EMBL/Gene Bank database로부터 얻은 유엔균주의 서열과 정렬시키고 상동성을 조사하였다.

자. 분리균주의 내산성 및 내담즙성 평가

분리균주의 내산성시험은 MRS broth를 pH 3으로 조정하여 멸균한 다음, 분리균주를 접종(10^6-10^7)한 후 37°C에서 90분간 유지시키면서 30분마다 생균수를 측정하여 내산성을 비교하였다(Berrada 등, 1991). 내담즙산시험은 Oxgall 함량이 1과 4%가 각각 포함되게 MRS agar를 제조한 후 분리균주를 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 다음 생균수를 비교하였다(M.G.M.B., 1994).

3. 결과 및 고찰

가. 장내 점착성 우수 유산균주 선별을 위한 colonic mucin-binding assay의 분석조건 최적화

1) RCM의 부착에 미치는 pH의 영향

장내 점착능이 우수한 유산균주를 선별하기 위한 수단으로 colonic

mucin-binding assay를 이용하기 위해, 본 분석방법의 결과에 영향을 미칠 수 있는 각종 조건을 최적화하고자 하였다. Colonic mucin-binding assay에서 microtiter plate의 well에 대한 RCM의 부착은 본 분석법에 있어 결과와 직결되는 중요한 반응 중 하나로, RCM의 부착에 미치는 pH의 영향을 조사하였다 (Table 1-1). RCM의 부착정도를 well에 부착된 단백질 함량으로 비교한 결과, 부착된 RCM은 pH 4.8, 7.0 및 10.0 조건에서 각각 흡광도 0.36, 0.35 및 0.34을 나타냈다. 이러한 결과는 RCM의 microtiter plate에 대한 부착정도가 pH의 변화에 따라 큰 차이가 없음을 나타내었다.

이와 유사한 실험결과로, Shi 등(2000)은 4가지의 합성 고분자물질 (polyurethane, polystyrene, silicone, polymethyl methacrylate)의 표면에 소의 이하선 mucin을 부착하는 실험에서, mucin의 부착이 가능한 이유가 mucin의 단백질 중심사슬(naked protein backbone)의 소수적 성질이 강한 합성 고분자 표면에 결합하기 때문이라고 하였으며, mucin은 이 단백질 중심사슬 구조에 탄수화물이 결사슬(carbohydrate cluster)로 결합되어 있는 구조로 되어있다고 보고하였다. 또한 Ohara 등(1997)과 He 등(2001)도 mucin의 microtiter plate에 대한 부착정도는 pH 2~9의 범위에서 큰 차이가 없다고 보고한 바도 있다. 이러한 결과는 본 실험과도 일치하는 결과였다.

Blum 등(1999)은 장내 상피세포층과 probiotic strain의 결합능을 측정할 때는 pH 7.0을, 점막층과 probiotic strain의 결합능을 측정할 때는 pH 4.5~5.0의 조건에서 측정할 것을 제안하였다. 따라서 이후의 실험에서는 RCM 조제시 사용된 용매인 6 M guanidine-HCl의 pH인 4.8에서 직접 부착시켜 분석에 이용하였다.

Table 1-1. Effects of pH on mucin-coating onto wells of microtiter plates in colonic mucin-binding assay

Mucin-coating pH	4.8	7.0	10.0
Bound protein ¹⁾ (OD, mean±SD)	0.36±0.03	0.35±0.01	0.34±0.01

¹⁾Bound protein contents were measured by Micro BCA protein assay kit and expressed as mean±SD of quadruplicate tests (Absorbance at 600 nm).

2) Colonic mucin-binding assay에서 HRP-conjugated streptavidin의 최적처리 농도 결정

Colonic mucin-binding assay의 최적 분석조건을 설정하기 위해, pH 4.8의 조건에서 RCM을 microtiter plate 표면에 부착시킨 후, *L. acidophilus* IFO 3025로부터 얻은 biotinylated SLP의 농도를 5.0 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 다음, 분석결과에 미치는 HRP-conjugated streptavidin의 농도영향을 조사하였다. Fig. 1-1에 나타난 바와 같이, HRP-conjugated streptavidin의 농도가 감소할수록 colonic mucin에 대한 결합이 낮게 측정되는 결과를 보였다. 특히 시판 HRP-conjugated streptavidin을 3,000~36,000배로 희석한 용액의 조건에서, biotinylated SLP 농도 5.0 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 colonic mucin간의 결합은 거의 직선상의 감소를 보였다. 따라서 본 실험에서는 colonic mucin에 대한 biotinylated SLP의 결합이 직선상의 경향을 나타내고, 흡광도가 1.0~2.0을 나타내는 HRP-conjugated streptavidin의 24,000배 희석용액을 최적의 농도로 결정하고, 이후의 실험에 사용하였다.

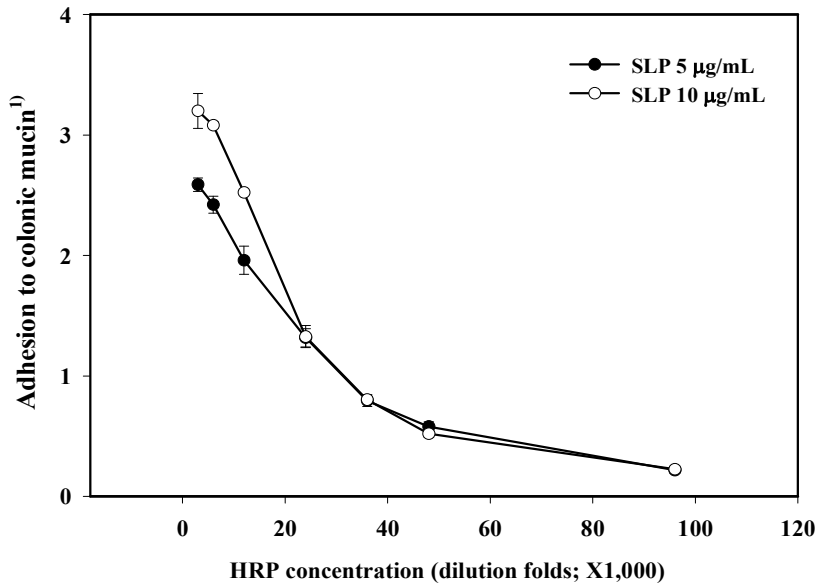


Figure 1-1. Effects of the concentration of horseradish peroxidase conjugated streptoavidin on binding affinity in colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests.

3) Colonic mucin-binding assay에서 biotinylated SLP의 처리농도 결정

Colonic mucin에 대해 적절한 결합정도를 나타내는 biotinylated SLP의 농도를 결정하기 위하여, 대표적 유산균인 *L. acidophilus* IFO 3025 기원의 SLP를 조제한 다음, biotinylated SLP의 농도에 따른 colonic mucin과의 결합능에 대한 영향을 비교, 측정하였다(Fig. 1-2). Biotinylated SLP의 농도가 증가함에 따라 colonic mucin에 대한 결합정도도 증가하는 경향을 보였다. 특히 colonic mucin에 대한 biotinylated SLP의 결합정도가 직선상으로 증가하고, 최종 흡광도가 1.0~2.0을 나타내는 농도인 biotinylated SLP 5.0 µg/mL가 본 분석방

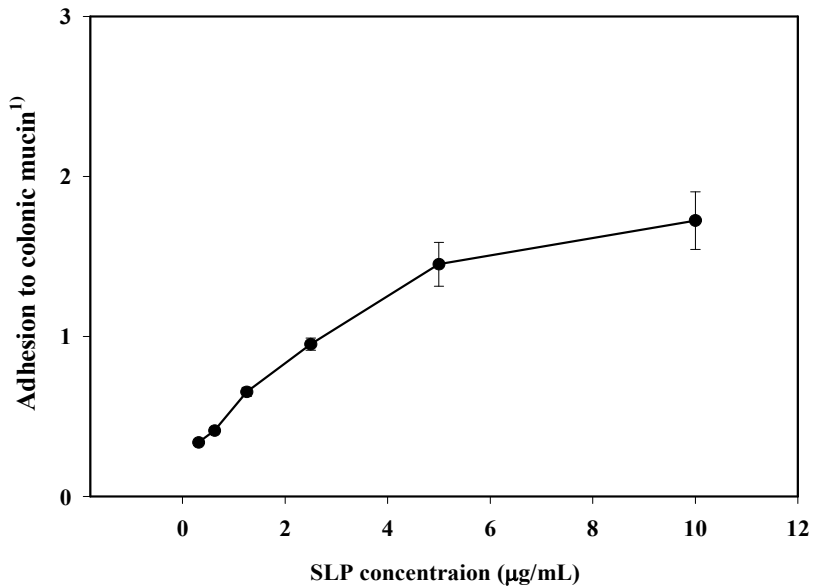


Figure 1-2. Effects of the concentration of biotinylated surface lectin-like protein on binding affinity in colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests.

법을 위한 최적조건이라고 판단되었다. 또한 biotinylated SLP의 농도에 따라 colonic mucin과의 결합이 유의성 있는 차이를 보여주는 본 실험결과는, 다양한 미생물의 장내 점착능 측정을 위해 본 측정방법이 유용하게 사용될 가능성이 있음을 확인시켜 주었다.

4) Colonic mucin-binding assay에서 TMB 발색시간 결정

이상의 실험에서 얻어진 최적조건에서 colonic mucin-binding assay의 분석 결과에 미치는 TMB 발색시간의 영향을 조사한 결과, Fig. 1-3에 나타난 바와 같이, TMB 처리시간이 길어질수록 colonic mucin에 대한 *L. acidophilus* IFO 3025 기원의 biotinylated SLP 결합수준도 증가하는 결과를 나타내었다.

따라서 본 실험도 상기한 결과에서와 동일하게, TMB 처리시간에 따른 colonic mucin에 대한 결합정도가 직선상의 경향을 보이고, 최종 흡광도가 1.0~2.0을 나타내는 10분 처리가 본 분석의 최적조건이라고 판단되었다.

따라서 지금까지의 결과를 종합해 볼 때, 유산균의 장내 상재성을 평가하기 위해 유산균 표면의 lectin상 단백질과 당단백질인 colonic mucin간의 결합능을 측정하는 colonic mucin-binding assay를 사용할 경우, mucin의 부착조건은 pH 4.8, HRP의 농도는 시판제품의 24,000배 희석액, biotinylated SLP의 처리농도는 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TMB의 발색시간은 10분이 최적의 분석조건임을 확인할 수 있었다.

Takahashi 등(1996)은 RCM을 가지고 polystyrene bead를 코팅하여 유산균의 결합능을 측정하는 새로운 선별방법을 보고한 바 있으나, polystyrene bead와 균주의 SLP간의 비특이적 결합이 큰 경향을 보여, 장내 상재성을 평

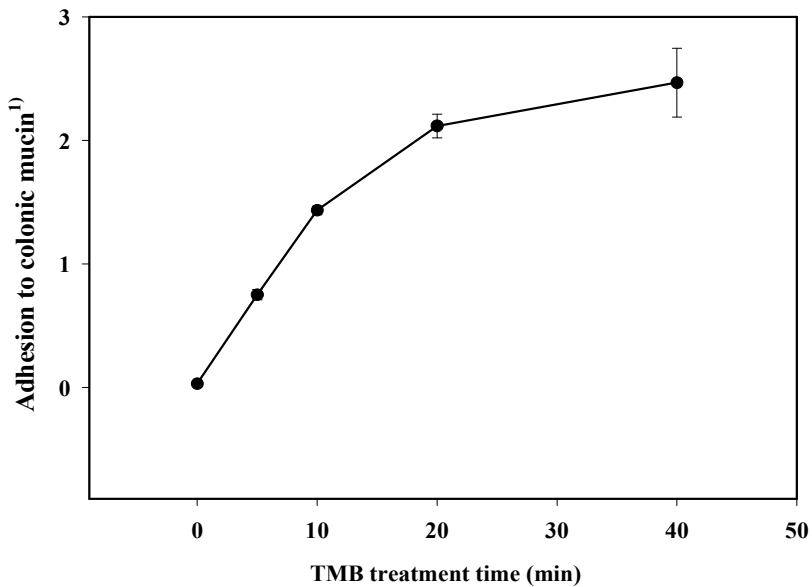


Figure 1-3. Effects of TMB scintillation time on binding affinity in colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean \pm SD of quadruplicate tests.

가하는 수단으로는 다소 부적절한 것으로 알려져 있다. 한편 Matsumura 등 (1999)은 RCM과 *Lactobacillus acidophilus* group간의 결합능을 비교, 측정하기 위하여, 본 실험과 유사한 방법을 실시한 바 있는데, 본 실험의 결과와 상당히 유사한 경향을 나타내었다.

나. 대장 mucin에 대한 각종 유산균주의 결합능 비교

*Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Lactococcus*속 등 32종의 공시균주와 생후 1주 및 3세의 유아분변에서 분리한 *Bifidobacterium*속으로 추정되는 18종의 균주 등, 총 50종의 유산균주를 대상으로, 대장 mucin에 대한 결합능을 colonic mucin-binding assay를 이용하여 측정함으로써, 장내 점착능을 비교, 분석하였다. Table 1-2에 나타난 바와 같이, SLP 기준농도 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 mucin에 대하여 상대적으로 높은 결합능(binding affinity)을 나타낸 공시균주는 *Lactobacillus hilgaridii* KFRI 229, *Lactobacillus* species FSB-1, *Bifidobacterium breve* KCTC 3220가 각각 2.31, 2.54, 1.69로 높은 활성을 보여 주었다. 유아분변 분리균주 중에는 B40, B49, B58균주가 각각 1.53, 1.41, 1.92로 비교적 높은 활성을 보여주었다.

그러나 colonic mucin-binding assay에 의한 결합능 측정은 SLP 농도 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 mucin에 대한 결합능의 비교이므로, 균주에 따라 표면에 존재하는 lectin상 단백질의 실제함량이 많을 경우, 결합능이 다소 낮더라도 전체적인 결합능은 상대적으로 우수할 수 있는 문제점을 갖고 있었다. 따라서 mucin에 대한 결합능을 각 균주로부터 분리한 SLP의 특정농도에서 측정 후 비교하는 단순비교보다는, 각 균주의 표면 단백질의 함량을 고려한 실질적인 결합능을 평가하는 것이 더 적절할 것으로 사료되었다. 따라서 각 균주로부터 분리한 SLP의 건조시료 1 mg에 함유된 실제 단백질 함량을 측정하였다. Table 1-2에 나타난 바와 같이, 공시균주의 경우는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3105, *Lactococcus garvieae* KCTC 3772가 각각 243.43, 234.11, 282.55, 181.44 μg 으

로 높은 단백질 수율을 보였으며, 유아분변 분리균주의 경우는 B8, B35, B49, B62균주가 높은 단백질 생산량을 보였다. 따라서 각 공시 및 분리균주의 실질적인 결합능(total binding affinity)의 비교는 각 유산균의 SLP 기준농도 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 mucin에 대한 결합능을 측정하듯 다음, 각 유산균의 lectin상 단백질 수율을 고려하여 비교, 분석하였다. 그 결과 공시균주의 경우는 *L. helveticus* ATCC 8018, *L. species* FSB-1, *L. garvieae* KCTC 3772가 각각 2.46, 3.64, 2.82으로 우수한 장내 점착능을 가진 것으로 평가되었으며, 유아분변 분리균주로는 B8, B49, B62균주가 각각 2.49, 2.39, 2.46로 상대적으로 높은 장내 점착능을 보였다(Table 2-2). 이러한 결과는 대장 mucin과 유산균간의 결합능이 형성되기 위해서는 단지 유산균 표면에 존재하는 SLP와 mucin간의 결합능 뿐만 아니라 유산균 표면의 실제 단백질 수율도 장내 점착능 평가에 있어 중요한 요소로 작용함을 보여주는 결과였다.

인간의 대장내 미생물의 균총은 태어난 지 일주일내에 형성된다고 보고되어 왔으며(Coconnier 등, 1992; Fernandes와 Shahani, 1990), 이 대장 미생물들 중 probiotics의 장내 점막에 대한 점착(adhesion)은 균총형성을 위한 선행조건으로 강조되어 왔다(Coconnier 등, 1992; Fernandes와 Shahani, 1990; Ouwehand 등, 1999d, 2001; Tuomola와 Salminen, 1998). 장내 점막에 대한 probiotics의 결합은 점막 중 특정성분 또는 부위와 균주 표면에 존재하는 lectin상 단백질이 관여되어 있다고 보고되고 있다(Ouwehand 등, 1999a). 특히, 장내 점막을 구성하는 당쇄성분이 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있는데, Kenji 등(1996)은 *Lactobacillus casei* IFO 3425의 장내 결합능이 대장 점막 중 다양한 당쇄구조에 따라 차이가 있음을 보고하고, mucin의 당쇄구조가 장내 점착능에 영향을 준다는 사실을 보고하였다. 또한 Ouwehand 등(1999a)도 대부분의 장내 세균은 mucin 중 당쇄부위에 따라 장내 점착능이 달라진다고 보고하였다. 이러한 장내 세균의 colonic mucin에 대한 결합능을 평가하는 방법은 주로 유산균 표면의 lectin상 단백질을 방사선물질로 표지하여 실시하는 것이 대부분이었다(He 등, 2001; Kirjavainen 등, 1998; Ouwehand 등, 1999a, 2000). He 등(2001a)은 건강한 유아와 알레르기를 갖고 있는 유아로부터 각각 bifidobacteria를 분리하고, 이들의 장내 점착능을 방사선강도로 비교

하였다. 그 결과 건강한 유아로부터 분리한 *Bifidobacterim bifidum* H-2-4와 *Bifidobacterium breve* H-1이 높은 점착능을 나타내었다고 보고하였다. Ouwehand 등(1999a)은 연령이 상이한 실험군(신생아, 생후 2개월, 생후 6개월, 25~52세, 74~93세)들의 분변으로부터 장 점막물질(mucin)을 분리하여, *Bifidobacterium* 균주 4종의 점착능을 비교한 결과, 유아군에서 분리한 mucin에 대하여 실험에 사용한 각 균주들은 높은 점착능을 보였다고 보고한 바 있다. 한편 Ouwehand 등(2000a)은 *Bifidobacterium lactis* Bb 12가 *Lactobacillus* GG 또는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 함께 존재하였을 때, mucin과의 결합능이 상승했다고 보고하면서, 균주간의 상호작용에 의해 장내 점착능이 상승하거나 하락할 수 있다고 보고하였다.

이와 같은 실험결과를 종합해 볼 때, 장내 점막층의 mucin의 당쇄구조와 유산균 표면의 lectin상 단백질의 결합을 이용한 colonic mucin-binding assay는 장내 점착능 평가를 위한 재현성 있고 신뢰성 높은 실험방법이라고 판단되었다.

Table 1–2. Screening of lactic acid bacteria with highly adhesiveproperty to colonic mucosa

Strain name of lactic acid bacteria	Protein ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Binding affinity ¹⁾ (mean \pm SD, OD at 450 nm)	Total binding affinity ²⁾ (mean \pm SD)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3025	44.08	1.35 \pm 0.11	0.60 \pm 0.05
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	243.43	0.62 \pm 0.18	1.52 \pm 0.45
<i>Lactobacillus amylophilus</i> KFRI 238	55.49	1.31 \pm 0.07	0.73 \pm 0.040
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109	101.75	1.30 \pm 0.18	1.32 \pm 0.18
<i>Lactobacillus confusus</i> KFRI 227	20.73	1.40 \pm 0.04	0.29 \pm 0.01
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KCTC 1047	38.42	0.88 \pm 0.12	0.34 \pm 0.05
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	42.00	1.38 \pm 0.06	0.58 \pm 0.03
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 8018	234.11	1.05 \pm 0.22	2.46\pm0.51
<i>Lactobacillus helveticus</i>	156.61	0.94 \pm 0.06	1.47 \pm 0.09
<i>Lactobacillus hilgardii</i> KFRI 229	19.65	2.31\pm0.11	0.46 \pm 0.02
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCTC 3120	57.80	1.95 \pm 0.07	1.13 \pm 0.04
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM 35472	104.59	1.13 \pm 0.04	1.18 \pm 0.04
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099	106.00	0.83 \pm 0.03	0.88 \pm 0.04
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	51.09	0.87 \pm 0.18	0.44 \pm 0.09
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3105	282.55	0.53 \pm 0.03	1.50 \pm 0.09
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	16.80	0.68 \pm 0.06	0.11 \pm 0.01
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	27.61	0.82 \pm 0.13	0.23 \pm 0.04
<i>Lactobacillus</i> species FSB–1	143.57	2.54\pm0.08	3.64\pm0.12
<i>Lactobacillus plantarum</i> FSB–2	69.36	0.63 \pm 0.10	0.43 \pm 0.07
ML4	154.52	1.45 \pm 0.05	2.25 \pm 0.07
<i>Streptococcus thermophilus</i>	131.08	1.05 \pm 0.04	1.38 \pm 0.06
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 14485	22.54	0.99 \pm 0.10	0.22 \pm 0.02
<i>Lactococcus garvieae</i> KCTC 3772	181.44	1.55 \pm 0.11	2.82\pm0.19
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 7962	40.26	0.93 \pm 0.03	0.37 \pm 0.01
<i>Enterococcus casseliflavus</i> KCTC 3079	66.35	1.29 \pm 0.07	0.86 \pm 0.05
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011	46.07	1.33 \pm 0.39	0.61 \pm 0.18
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KFRI 833	32.58	1.22 \pm 0.12	0.40 \pm 0.04

Strain name of lactic acid bacteria	Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Binding affinity ¹⁾ (mean \pm SD, OD at 450 nm)	Total binding affinity ²⁾ (mean \pm SD)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> KCTC 3358	69.17	0.74 \pm 0.06	0.51 \pm 0.04
<i>Bifidobacterium infantis</i> KCTC 3127	39.67	0.93 \pm 0.07	0.37 \pm 0.03
<i>Bifidobacterium breve</i> KCTC 3220	98.58	1.69\pm0.05	1.66 \pm 0.05
<i>Bifidobacterium longum</i> KCTC 3421	82.32	0.78 \pm 0.10	0.64 \pm 0.08
<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCTC 3357	68.30	1.19 \pm 0.30	0.81 \pm 0.20
B1	122.83	0.68 \pm 0.04	0.84 \pm 0.05
B8	208.30	1.20 \pm 0.04	2.49\pm0.09
B18	65.20	1.17 \pm 0.06	0.77 \pm 0.04
B21	50.40	1.14 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01
B35	167.27	1.24 \pm 0.13	2.07 \pm 0.21
B40	109.54	1.53\pm0.09	1.68 \pm 0.10
B49	169.47	1.41\pm0.05	2.39\pm0.08
B51	128.32	0.91 \pm 0.04	1.17 \pm 0.05
B52	123.19	1.09 \pm 0.07	1.34 \pm 0.09
B53	95.15	1.38 \pm 0.05	1.32 \pm 0.04
B54	113.01	0.96 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03
B55	140.26	0.78 \pm 0.05	1.10 \pm 0.08
B58	75.00	1.92\pm0.07	1.44 \pm 0.05
B62	190.86	1.29 \pm 0.04	2.46\pm0.08
B64	135.47	0.80 \pm 0.04	1.08 \pm 0.05
B66	60.40	0.87 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02
B67	74.80	0.87 \pm 0.05	0.65 \pm 0.04
B68	43.50	0.99 \pm 0.04	0.43 \pm 0.02

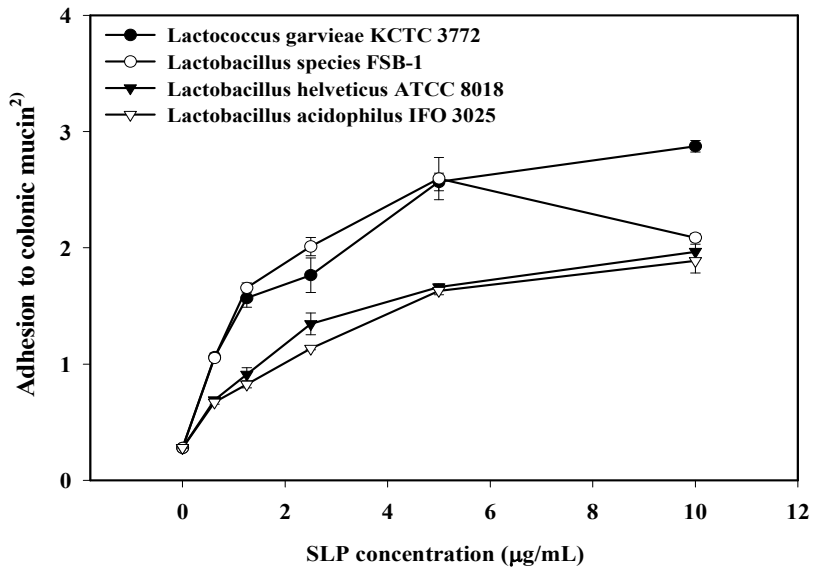
¹⁾Binding affinity to mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean \pm SD of quadruplicate tests. ²⁾Total binding affinity= Protein ($\mu\text{g/mL}$) \times Binding affinity/100

다. SLP의 농도에 따른 선별균주의 장내 점착능

장내 점착능이 우수한 균주의 선별과정에서 장내 점착능이 우수한 것으로 평가된 공시균주 *L. helveticus* ATCC 8018, *L. species* FSB-1, *L. garvieae* KCTC 3772와 유아분변 분리균주 B8, B49, B62균주에 대하여 biotinylated SLP 농도에 따른 결합능을 조사한 결과는 Fig. 1-4의 A) 및 B)에 나타난 바와 같다. *L. garvieae* KCTC 3772와 *L. species* FSB-1은 대조균주로 사용된 대표적인 probiotics 유산균주인 *L. acidophilus* IFO 3025보다 훨씬 우수한 장내 점착능 활성을 보였으며, *L. helveticus* ATCC 8018은 대조균보다 다소 낮거나 유사한 수준의 장내 점착능을 나타내었다. 그러나 이 모든 균주들은 SLP 농도에 의존적으로 활성이 높아지는 경향을 보여주었다. 한편 유아분변 분리균주 B8, B49, B62균주는 모두 대조균주와 유사한 수준의 장내 점착능을 보여주었다.

그러나 본 실험의 최종목표가 장내 상재성이 우수한 probiotics의 개발이라는 측면을 고려할 때 *L. garvieae* KCTC 3772는 그 발생 기원상 부적절할 것으로 판단되었으며, 유아분변 분리균주의 경우, 생장이 다소 늦은 생리적 특성과 유아분변 분리균주의 동정과정 중 *Bifidobacterium*이 아닌 균주가 발견되는 등 문제점이 있었다. 따라서 안정적으로 높은 장내 점착능을 보이고, probiotics로의 이용가능성이 높은 *L. species* FSB-1을 최종적으로 선별하고, 이후의 실험을 수행하였다.

A)¹⁾



B)

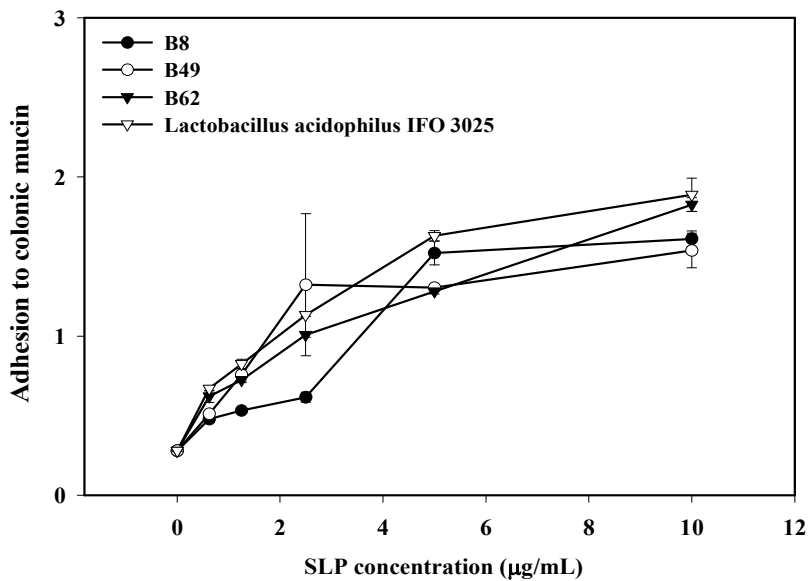


Figure 1–4. A quantitative analysis of binding affinity to mucin by lactic acid bacteria selected in first screening procedure.

¹⁾A) Type culture strains, B) Isolated strains from infant feces. ²⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests.

라. 장내 점착능 우수 유산균주 *Lactobacillus* species FSB-1의 동정

장내 점착능이 우수한 균주로 최종 선별되었던 *L. species* FSB-1은 경기대 대학원 식품생물공학과에서 김치로부터 분리하여 보관 중인 균주였다. 따라서 형태학적 관찰, 생리 및 생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열분석을 통한 동정을 수행하였다. *L. species* FSB-1의 형태적 관찰을 주사형 전자현미경 (SEM)을 이용하여 실시한 결과(Fig. 1-5), 직경 약 0.5~0.6 μm , 길이 3.0~5.0 μm 의 간균이었으며, colony는 MRS 고체배지 상에서 중심부위가 약간 움기한 흰색의 불규칙한(irregular) 형태였다. 생리, 생화학적 특성을 검토한 결과 Table 1-3에 나타난 바와 같이, Gram 양성, catalase 음성 및 비운동성의 특성을 갖고 있었으며, hetero발효형의 arginine 음성을 나타내었다. 이러한 결과들로 판단해 볼 때 *L. species* FSB-1은 잠정적으로 *Lactobacillus*속에 속하는 세균으로 판단되었다.

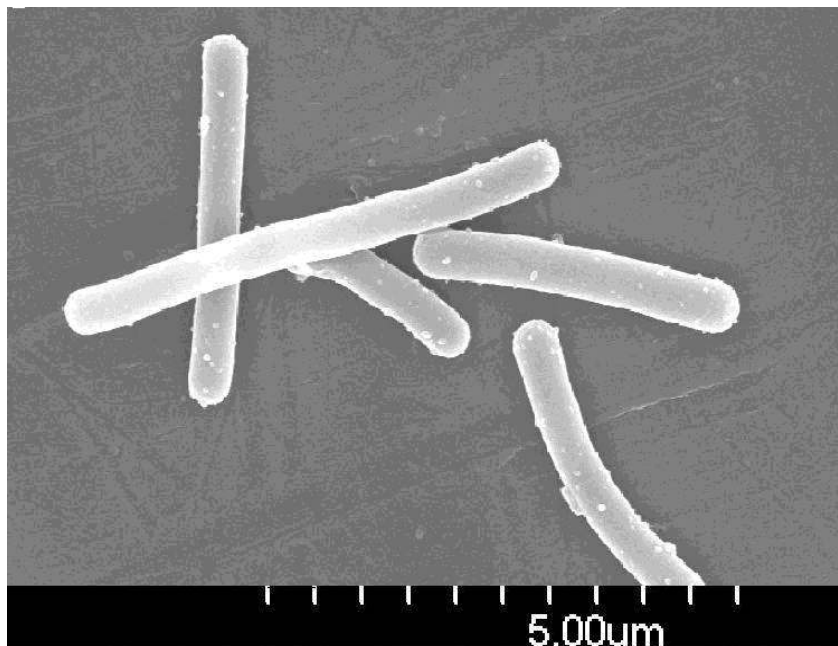


Figure 1-5. Scanning electronic microphotograph (SEM) of the isolate, *Lactobacillus* species FSB-1.

Table 1-3. Comparison of morphological, physiological and biochemical characteristics between strain FSB-1 and *Lactobacillus brevis*

Taxonomical factors	<i>Lactobacillus</i> species FSB-1	<i>Lactobacillus brevis</i>
Cell morphology		
Shape	rods	rods
Cell size (μm)	0.5~0.6 \times 3.0~5.0	0.7~1.0 \times 2.0~4.0
Motility	-	-
Spore	-	-
Colony	irregular, white, rough, raised center	irregular, white, rough
Found in	kimchi	human feces
Gram staining	+	+
Cultural characteristics		
Oxygen requirement	facultative anaerobes	facultative anaerobes
Growth at 5°C	-	-
15°C	+	+
45°C	+	+
Growth in 4.0 g/L NaCl	+	+
6.5 g/L NaCl	+	+
8.0 g/L NaCl	-	-

Taxonomical factors	<i>Lactobacillus</i> species FSB-1	<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i>
Physiological characteristics		
CO ₂ from glucose	+	+
Catalase	-	-
Arginase	-	+
Sugar fermentation		
Cellobiose	-	-
Trehalose	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Arabinose	-	+
Lactose	-	d
Melibiose	+	+
Raffinose	-	d
Xylose	+	d
Galactose	-	d
Mannose	-	-
Ribose	ND	+
Salicine	-	-
Saccharose	-	d
Rhamnose	-	-
Maltose	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Esculine	-	d

Symbols: +, positive reaction; -, negative reaction; ND, not determined; d, 11~89% strains positive.

L. species FSB-1의 발효특성 등 대부분 생화학적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Macfaddin, 1984)에서 Kandler와 Weiss가 묘사한 *Lactobacillus brevis*의 특성과도 상당부분 일치하였다.

한편 보다 정확한 동정을 위하여, 802 bp길이의 16S rDNA 부분 염기서열 분석(data는 제시하지 않았음)을 수행하고, 관련 data base를 토대로 유사성을 비교하였다. *L. species* FSB-1의 16S rDNA의 염기서열은 Table 1-4에 나타난 바와 같이, *Lactobacillus*에 속하는 99개의 종 및 아종 중 특히 *Lactobacillus brevis* ATCC 14869T 표준균주와 98.5%의 높은 상동성을 보였

Table 1-4. Levels of 16S rDNA sequence similarity for strain FSB-1 and type strains of some *Lactobacillus* species

Strain	Accession No.	Similarity (%)	Nucleotide differences /compaired
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869T	M58810	98.50	12/799
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123T	AB005893	94.13	47/800
<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558T	D79211	92.52	60/802
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667T	AJ306297	92.52	60/802
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149T	D79210	92.38	61/801
<i>Lactobacillus vermiforme</i> ATCC 13133	M59295	91.97	63/785
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290T	M58821	91.74	65/787
<i>Lactobacillus buchneri</i> ATCC 4005T	M58811	91.63	65/777
<i>Lactobacillus fructivorans</i> DSM 20203T	X76330	90.89	73/801
<i>Lactobacillus mali</i> ATCC 27053T	M58824	89.78	80/783
<i>Lactobacillus arizonensis</i> NRRL B-14768T	AF093757	89.67	82/794
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC 27651T	X76327	89.64	83/801

으며, 통상 16S rDNA gene의 염기서열 97%를 기준(16S rDNA full sequence: 약 1.500 bp)으로 종을 판단하는 최근 추세(Falsen 등,1999; Goodfellow 등, 1997)로 볼 때, 본 균주는 *Lactobacillus brevis* 또는 그 유연 균주로 사료되었다. 이상의 분류학적 특성을 고려할 때, 장내점착성이 우수한 균주로 최종 선별되었던 *L. species* FSB-1는 *Lactobacillus brevis*로 최종 동정되었다. 따라서 본 균주를 *Lactobacillus brevis* FSB-1으로 명명하였다.

마. 분리균주의 내산성 및 내담즙성

분리균주의 내산성 및 내담즙성을 측정하기 위하여, 내산성과 내담즙성을 소유하고 있다고 보고되어 온 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3025을 비교대상으로 설정한 다음 *L. species* FSB-1과의 생균수를 비교, 측정하였다(Table 1-5, 1-6). 젖산균이 프로바이오틱스로서 역할을 수행하기 위해서는 우선 강산성의 위를 통과하여 장내로 이동하여야 하는데 위에서 분비되는 염산은 정상 시 pH 0.78~0.9를 유지하지만, 음식물이 유입될 때에는 pH가 약 2.0~3.0으로 상승되며, 음식물이 위를 통과하는데 소요되는 시간은 약 2~4시간이다. 지금까지 젖산균의 위액에 대한 내산성 실험은 *in vivo*상에서 직접 생존율을 확인하는 실험과, 인공위액 및 PBS 등의 buffer를 이용한 *in vitro*상의 간접적인 방법이 이용되어 왔다. 그러나 위액에 의한 미생물 사멸작용의 주요원인이 염산에 의한 낮은 pH인 것으로 밝혀졌으며, *in vitro*의 실험 결과와 *in vivo*에서의 결과가 거의 유사하다고 보고됨으로써 미생물의 생존은 그들의 낮은 pH에 대한 저항성에 따른 것으로 알려지고 있다. 내산성 시험결과, 초기 접종균수(control)와 비교해 볼 때 처리시간인 90분 동안 대조군 *L. acidophilus* IFO 3025와 *L. species* FSB-1의 두 균주 모두 생균수에 변화가 없음을 확인할 수 있었다.

한편, 담즙산에 대한 내성은 위에서의 산성조건에 대한 저항성과 더불어 프로바이오틱스 미생물이 갖추어야 할 기본적인 특성 중 하나이다. 담즙은 소장 상부에서 분비되어 섭취된 지질식품의 소화, 흡수를 촉진하고, 미생물에 대해 세제와 유사한(detergent-like) 작용을 함으로써 지방과 지방산으로 구성되

Table 1-5. Acid tolerance of *Lactobacillus* species FSB-1 in MRS broth adjusted with pH 3.0 during 0~90 min

(cfu/mL)

Time(min)	Strain	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> species
	IFO 3025	FSB-1
control	3.1×10^7	4.2×10^6
0	3.8×10^7	5.0×10^6
30	3.1×10^7	4.9×10^6
60	3.3×10^7	4.3×10^6
90	2.9×10^7	4.4×10^6

어있는 미생물의 세포막에 영향을 주어 미생물 살균작용을 하는 것이다. 그러나 몇몇 미생물은 담즙산염 가수분해효소(bile salt hydrolase, BSH)에 의해 담즙산염을 가수분해하여, 그들의 용해도를 감소시킴으로써 이러한 작용을 저하시킬 수 있다. 특히 *Lactobacillus*를 포함한 많은 종의 젖산균에서 BSH 효소가 발견되었으나, 이들의 담즙산에 대한 작용기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 또한 내담즙성 시험결과 두 균주 모두 초기접종균수에 비해 생균수가 약간 감소되는 경향을 보이기는 했으나 큰 차이를 보이지 않았으며, Oxgall 함량(1과 4%)의 차이에 따른 생균수의 변화를 보이지 않았다. 따라서 장내 점착능이 우수한 균주로 분리된 *L. species* FSB-1은 내산성 및 내담즙성을 소유한 것으로 판단되었다. 이 결과는 분리균주의 섭취시 위산과 담즙산에 대한 내성을 소유한 것으로 소화기관내 통과에 대한 저항성을 소유한 것을 의미하며, 대장 내까지 살아가서 점착함으로써 유용한 생리효과를 발휘할 수 있다는 가능성을 제시하는 결과였다.

Table 1–6. Bile salt tolerance of *Lactobacillus* species FSB–1 in MRS broth according to oxgall concentrations

(cfu/mL)

Oxgall(%)	Strain	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO	<i>Lactobacillus species</i>
	3025	FSB–1
0	3.1×10^9	4.2×10^8
1	2.3×10^9	2.8×10^8
4	2.2×10^9	2.7×10^8

제 2 항 분리 균주의 장내 점착특성 규명

1. 서 설

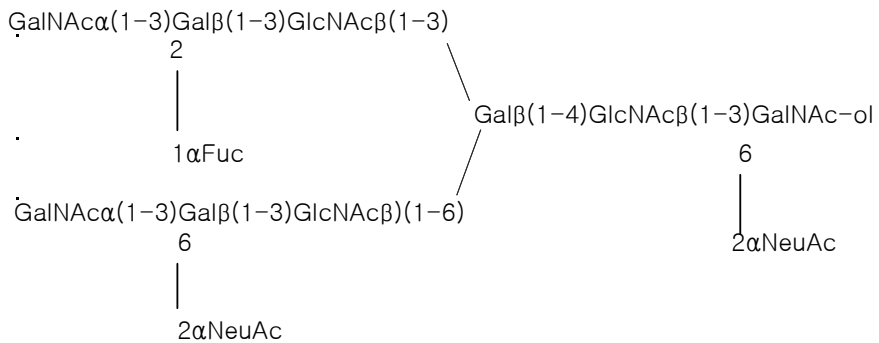
유산균은 인간의 유용한 장내 미생물로서, 유당 불내증의 완화, 정상작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 및 면역 활성화작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다(Collins 등, 1998; Gill, 2003; Goldin, 1998; Klaenhammer와 Kullen, 1999; Ouwehand 등, 1999c; Salminen 등, 1999; Sherwood와 Gorbach, 2000). 이러한 유산균의 유효한 생리효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다(Coconnier 등, 1992). 유산균의 장내 상재성을 위해 장내 점착능(adhesion property)은 중요한 인자로서 알려져 있으며, probiotics로 사용되는 유산균을 선택하는데 있어 하나의 기준으로 여겨지고 있다(Ouwehand 등, 1999d, 2001).

지금까지 유산균의 장내 점착능에 대한 연구는 대부분 인간의 대장 상피세포 유래인 Caco-2 또는 HT-29 cells 등과 유산균간의 결합력을 기초로 한 균주의 선별이 그 주를 이루어 왔다(Blum 등, 1999; Chauviere 등, 1992; Coconnier 등, 1992; Greene과 Klaenhammer, 1994; Tuomola와 Salminen, 1998). 그러나 실질적으로 인간의 대장내 구조는 상피세포를 점막층(mucin)이 평균 400 μm 이상의 두께로 덮고 있기 때문에, 유산균이 대장에서 상재할 때는 상피세포와의 결합보다는 점막층 물질에 결합하여 분열 및 증식하는 것으로 보고되고 있다(Matsumoto, 2002). 또한 성인의 경우 gastrointestinal(GI) tract의 점막층 표면은 300 m^2 에 이르므로 이에 대한 가능성은 매우 높다고 할 수 있다(Collins 등, 1998). 따라서 유산균이 장내 상재성을 갖고, 유용한 제반 효과들을 발휘하기 위해서는 점막층과의 결합력이 필수적으로 요구된다(Blum 등, 1999; Kirjavainen 등, 1998). 유산균과 인간의 대장내 점막층과의 결합은 유산균 표면에 존재하는 lectin상 단백질(surface lectin-like protein, SLP)과 점막층을 구성하는 단백다당체인 mucin의 당쇄구조간의 인식 및 결합에 의해 이루어진다고 보고되고 있으며, 이들간의 결합력은 유산균 표면의 lectin상 단

백질의 특성과 점막층의 당쇄구조의 차이에 기인한다고 알려져 있다 (Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996).

유산균 중 가장 전형적인 surface layer(S-layer)의 표면구조를 보이는 대표적인 예는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*이 있다(Kahala 등, 1997). 유산균의 S-layer를 구성하고 있는 물질은 단백질 또는 당단백질로서(Avall-Jaaskelainen 등, 2002; Hynonen 등, 2002; Kahala 등, 1997), 대부분 종(species)의 S-layer 단백질이 산성 단백질(pI 3~4)의 특성을 갖는 것과는 달리, *Lactobacillus*속의 S-layer 단백질은 염기성 단백질(pI > 9)의 특성을 가진다(Pouwels 등, 1998; Smit 등, 2001). Genera에 따라 다양하지만 S-layer의 단백질 함량은 총 단백질 함량의 약 10~15%를 차지하며, 약 40~200 kDa의 분자량으로 구성되어 있다(Avall-Jaaskelainen 등, 2002; Hynonen 등, 2002; Kahala 등, 1997). 일반적으로 S-layer의 기능은 cell shape determinants, protective coats, antigenic determinants, surface recognition, cell adhesion을 위한 promoter, molecular 및 ion trap의 기능이 보고되고 있으며(Avall-Jaaskelainen 등, 2002, 2003; Jakava-Viljanen 등, 2002; Sleytr 등, 2001), 이 중 유산균의 장내 상재성을 위한 점착능 기능이 강조되고 있다(Pouwels 등, 1996, 1998; Toba 등, 1995). 그러나 위에서 언급한 S-layer의 기능이 모든 유산균의 S-layer에서 일반적으로 인식되고 있지는 않으며(Avall-Jaaskelainen 등, 2002), 아직까지 연구가 부족한 실정이다(Avall-Jaaskelainen 등, 2003; Hynonen 등, 2002). 대장내 존재하는 mucin의 당쇄구조는 종에 따라 서로 상이한 것으로 알려져 있는데, 인간 대장내 mucin은 쥐의 mucin(rat colonic mucin, RCM)과 가장 유사한 당쇄구조를 가지고 있다고 보고되고 있다(Matsumura 등, 1999; Podolsky, 1985a; Slomiany 등, 1980; Takahashi 등, 1996). RCM의 경우 산성 및 중성당으로 구성된 당쇄가 단백질의 serine 및 threonine을 통하여 O-결합 형태를 하고 있으며, 약 8종류의 서로 다른 당 사슬 구조를 함유한다고 보고되고 있다(Slomiany 등, 1980). 인간의 장내 mucin(human colonic mucin, HCM)에 대한 연구도 보고

되고 있다(Gold와 Shochat, 1981; Podolsky, 1985a,b). Gold와 Shochat(1981)은 HCM을 protease로 처리한 후, sialic acid가 많은 sialomucin(mucin A)과 fucose가 많은 fucomucin(mucin B)으로 구분되었다. 이들 두 형태의 mucin은 당의 구성비와 서열의 차이로 매우 특이적인 면역학적 차이를 보였다고 보고하였다. 구조적으로는 단백질 중심부(peptide core)에 threonine과 proline이 많은 구조를 하고 있고, 당쇄부위(carbohydrate chain)에 sialic acid, fucose, galactose, glucosamine, galactosamine으로 구성되어 있으며, O-결합을 형성하고 있다고 보고하였다. Podolsky(1985a,b)는 HCM이 산성과 중성적 성질을 가지고 있는 올리고당으로 형성되어 있다고 보고하면서, 6개의 group(I ~ VI)으로 분리한 다음, 각 group에 따른 총 25종에 대한 올리고당의 구조적, 기능적 특징을 보고하였다. 이에 따른 HCM의 대표적인 당쇄구조는 다음과 같다(Podolsky, 1985a,b)



최근 장내 점막층과 유산균 표면의 lectin상 단백질간의 결합력을 이용한 유산균의 장내 점착능에 대한 연구가 보고되고 있는데, 이들은 유산균주의 SLP와 colonic mucin의 내부 당쇄구조간의 결합의 중요성을 강조한 바 있다(Kirjavainen 등, 1998; Matsumura 등, 1999; Takahashi 등, 1996).

Lactobacillus brevis ATCC 14869T와 ATCC 8287은 *in vitro* 실험결과 인간의 Caco-2 및 Intestine 407 cell에 대해(Elina 등, 2003), *L. brevis* PEL1은 인간 장내 점막층에 대하여 각각 매우 높은 장내 점착능을 보였다고 보고하였다(Ouwehand 등, 2001). 또한 *L. brevis* ATCC 8287의 S-layer slp A 단백질은 인간의 Caco-2와 Intestine 407 cell 뿐만 아니라 endothelial cell line

EA-hy 926, urinary bladder cell line T 24, immobilized fibronectin의 점착능에도 영향을 주었다고 보고하였다(Hynonen 등, 2002). 이외에도 *L. brevis*의 S-layer slp A 단백질의 장내 상피세포(gut epithelial cell)에 대한 점착능의 역할이 보고된 바 있었다(Avall-Jaaskelainen 등, 2003; Kahala 등, 1997). 또한 *L. brevis*는 항원의 전달 매개체 역할을 함으로서 기존에 vaccine vector로 사용되었던 *Salmonella*, *Mycobacterim*, *Bordetella* 및 *Vibrio*의 안전성 문제를 해결하였다(Avall-Jaaskelainen 등, 2002). *L. brevis*는 우유, 치즈, 인간의 분변 및 입과 장내에서 분리되며(Elina 등, 2003; Ouwehand 등, 2001; Kandler와 Weiss, 1986), 낮은 pH와 담즙산, 췌장액에 대한 저항성(Elina 등, 2003)을 가지고 있을 뿐만 아니라, Generally Recognized As Safe(GRAS) 상태로 여겨져 probiotics로서의 잠재성에 대한 여러 연구가 보고되고 있다(Elina 등, 2003; Kishi 등, 1996; Maassen 등, 2000; Playfair, 1987).

따라서 본 연구에서는 유산균의 장내 점착특성 규명을 위하여, HCM의 당쇄와 가장 유사한 구조로 알려진 RCM과 본 연구 제 1 항에서 장내 점착능이 가장 우수한 균주로 선별된 *L. brevis* FSB-1간의 점착특성을 연구하였다. 즉 *L. brevis* FSB-1의 lectin상 단백질(SLP)로부터 RCM의 당과의 인식 및 결합에 기여하는 lectin을 분리한 다음, SDS-PAGE를 실시하여 분자량을 확인하였으며, 분리된 각각의 분자량별 lectin과 대장 점막층간의 결합능을 비교, 측정하였다. 또한 *L. brevis* FSB-1의 lectin상 단백질이 인식하는 점막층의 당쇄를 규명하고자, RCM의 구성당으로 알려진 단당 6종(Murty 등, 1978)과 올리고당 6종(Slomiany 등, 1980)을 선별하였다. 선별된 각 당에 대한 *L. brevis* FSB-1과의 결합특성을 modified colonic mucin-binding assay와 Thin Layer Chromatography(TLC)-immunostaining을 이용하여 측정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 실험동물

본 실험의 균주는 본 연구 제 1 장에서 장내점착능이 가장 우수한 균으로 선별된 *Lactobacillus brevis* FSB-1이 사용되었다.

실험동물은 Wister rat(웅성, 10주령, (주)샘타코, 경기)과 Newzealand white rabbit(웅성, 무게 270 g, Biogenomics, Korea)이 사용되었으며, $24\pm 1^\circ\text{C}$ 및 55%의 상대습도로 조절된 사육조내에서 24~48시간 적응토록 하였다. 이때 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다.

나. 유산균의 배양 및 surface lectin-like protein(SLP)의 조제

MRS(Difco Co., USA) 액체배지 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종하여 37°C 에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후 실험에 사용하였다.

위에서 배양한 배양액을 4°C , 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM phosphate buffered saline(pH 7.2, 이하 PBS)으로 3회 세척하였다. 본 균체를 2 M guanidine-HCl(Sigma Chemical Co., USA) 용액에 현탁한 후, 37°C 에서 2시간 동안 진탕하여 균체 표면에 부착된 단백질을 추출하였다. 추출액을 4°C , 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 그 상등액을 증류수로 4°C 에서 48시간 동안 투석한 다음, 동결건조하여 SLP를 조제하였다.

다. Biotinylated SLP의 조제

SLP 1 mg을 0.15 M NaCl을 함유한 0.1 M Na_2HPO_4 용액(pH 9.0)에 용해하고, biotin화 시약, D-biotinyl- ϵ -aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester(Roche Diagnostics Co., USA) 1 mg을 40 μL 의 DMSO(Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 첨가한 후, 4°C 에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 반응용액을 10 mM PBS(pH 7.2)로 4°C 에서 24시간 동안 투석을 수행하여 biotin-conjugated SLP를 조제하였다. Biotinylated SLP 용액 중의 단백질 함량을 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA)을 표준물질로 하여,

Micro BCA protein assay kit(Bio-rad Lab., Canada)을 이용하여 측정하였다.

라. Rat colonic mucin(RCM)의 조제

RCM은 Perret 등(1977)의 방법에 따라 Wister rat의 대장내벽으로부터 조제되었다. 10주령의 웅성, Wister rat을 치사시켜 복부를 절개하고 대장을 적출한 다음, 대장 내벽을 slide glass로 긁어내어 점막층을 회수하였다. 회수 점막층을 Folch's 용액($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=2:1$, V/V, 시약 1급)에 현탁하여 탈지시킨 후, 4°C, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리를 수행하였다. 침전물을 Folch's 용액으로 2회 세척하고 diethyl ether(시약 1급)로 3회 재차 세척하여 탈지시켰다. 탈지된 회수 점막층에 6 M guanidine-HCl 용액을 가하여 37°C에서 2시간 동안 진탕 반응시켜 mucin을 추출하고, 상기 조건에서 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 증류수로 4°C에서 24시간 동안 투석한 후 동결건조하여 RCM을 조제하였다.

마. *Lactobacillus brevis* FSB-1의 SLP로부터 lectin의 분리

RCM 용액(RCM 25 mg/mL, 6 M guanidine-HCl) 500 μL 를 PVDF membrane(ImmobilonTM-P Transfer membrane, 25 cm², Millipore Co., USA)에 분주한 후 건조시켰다. 10 mM PBS(pH 7.2) 10 mL로 3회 세척한 다음 blocking buffer(0.2% polyvinylpyrrolidone 40/PBS, pH 7.2) 10 mL로 3회 blocking하였다. SLP 용액(SLP 40 mg/40 mL, 0.1% tween 20/PBS)과 1시간 동안 진탕하여 반응시킨 다음, 10 mM PBS(pH 7.2)에 옮겨 반응을 정지시킨 후, 10 mM PBS(pH 7.2) 10 mL로 3회 세척하였다. RCM과 결합한 SLP 용액 중의 특정한 단백질(lectin 분리)을 0.1 M formic acid-ammonia buffer(pH 2.5, Sigma Chemical Co., USA)로 10회 이상 반복하여 추출함으로써 회수하였다. 추출액을 Micro Acylizer(Asahi Chemical Co., Japan)를 이용하여 염류를 제거한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

바. SDS-PAGE

SDS-PAGE를 Lamml(1970) 방법에 의하여 수행하였다. 즉 10% separating gel을 사용하여 20 mA에서 2시간 동안 전기영동하여 단백질을 분리한 후 Coomassie brilliant blue R-240으로 염색한 후 탈색하였다. 분자량 측정을 위한 marker protein은 broad range molecular weight marker(Bio-rad Lab., Canada)가 사용되었다.

사. RCM과 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 분리 lectin간의 결합특성 측정

L. brevis FSB-1의 SLP로부터 분리된 lectin 혼합물을 여러 lane에 나누어 전기영동하여 분자량별로 분리하였다. Gel의 시료부분 중 한개의 lane과 marker protein lane(broad range molecular weight marker)을 Coomassie brilliant blue R-240로 염색하여 탈색한 후, 단백질의 위치를 확인하였다. 확인된 위치의 각 분자량별 lectin이 포함되어 있는 gel의 조각 부분만을 회수한 후, 1×1 mm의 크기로 자른 다음, 4°C에서 2 M guanidine-HCl로 으깨어 추출하였다. Gel의 혼입을 방지하기 위해 0.22 μm membrane으로 여과한 후, 0.15 M NaCl을 포함한 0.1 M Na₂HPO₄ 용액(pH 9.0)으로 4°C에서 2일 동안 투석하였다. 분리된 각 lectin에 대하여 biotinylated lectin을 제조한 후, colonic mucin-binding assay를 이용하여 RCM에 대한 결합능(binding affinity)을 비교, 측정하였다.

아. Modified colonic mucin-binding assay를 이용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당 규명

Modified colonic mucin-binding assay를 이용하여 *L. brevis* FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당을 규명하기 위하여, 본 실험에 사용된 단당(Sigma Chemical Co., USA) 6종과 올리고당 6종(Dextra Lab. Ltd., UK)은

Table 2-1과 같으며, 각 당들은 RCM의 구성당으로 보고되어 왔다 (Matsumura 등, 1999; Podolsky, 1985a; Slomiany 등, 1980; Takahashi 등, 1996). Microtiter plate(Maxisorp, Nunc, Denmark)에 RCM 용액(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 M guanidine-HCl) 75 μL 를 각각 분주하고, 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 mucin을 well 표면에 부착시켰다. 다음 날 plate를 PBST(PBS-0.05% Tween 20)로 3회 세척 후, blocking buffer(0.05% Tween 20과 1% BSA를 함유한 PBS, pH 7.2) 100 μL 를 재 분주한 다음, 상온에서 2시간 동안 방치하여 RCM이 부착되지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 각 well은 PBST를 이용하여 4회 세척하고, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 biotinylated SLP 용액 50 μL 와 각각의 단당 및 올리고당 용액 50 μL 를 재 분주하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Mucin 중의 당과 반응하지 않거나 위에서 분주한 단당 또는 올리고당과 반응한 biotinylated SLP를 제거한 다음, PBST를 이용하여 3회 세척하였다. 24,000배로 희석된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin(Parmingen, Lab., USA) 50 μL 를 분주하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 결합하지 않은 HRP-conjugated streptavidin을 제거하기 위해 상등액을 버리고 PBST로 7회 세척하였다. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) liquid substrate system(Sigma Chemical Co., USA) 60 μL 를 첨가하여 발색시킨 후, 2 N H_2SO_4 (시약 1급) 60 μL 를 분주하여 반응을 정지시켰다. 발색정도는 450 nm에서 Microtiter plate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

Table 2–1. Monosaccharides and oligosaccharides of RCM were used in this experiment

Monosaccharides		Oligosaccharides	
Structure	M.W.	Structure	M.W.
L–fucose	164.20	GalNAc α 1–3Gal	383.33
D–galactose	180.20	Fuc α 1–2Gal	326.30
D–mannose	180.20	GalNAc α 1–3(Fuc α 1–2)Gal	529.50
<i>N</i> –acetyl–D–galactosamine	221.20	GalNAc α 1–3Gal β 1–4Glc	545.50
<i>N</i> –acetyl–D–glucosamine	221.20	Fuc α 1–2Gal β 1–4GlcNAc	529.50
Sialic acid (<i>N</i> –acetylneuraminic acid)	309.30	Neu5Ac α 2–6Gal β 1–4GlcNAc	674.61

Abbreviation used: Gal, D–galactose; GalNAc, *N*–acetylgalactosamine; Glc, D–glucose; GlcNAc, *N*–acetyl–D–glucosamine; NeuAc, *N*–acetylneuraminic acid.

자. Thin Layer Chromatography(TLC)-immunostaining을 이용한

Lactobacillus brevis FSB-1의 균체가 인식하는 RCM의 당 규명

1) 사용균주의 배양 및 처리

MRS 액체배지 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 4°C, 6,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM PBS(pH 7.2)로 3번 세척하였다. 균체를 PBST로 재 현탁하여 약 10^8 cells/mL로 조정하여 다음 시료로 사용하였다.

2) Polyclonal antibodies의 조제

MRS 액체배지 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 4°C, 6,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 10 mM PBS(pH 7.2)로 균체를 재 현탁시킨 후, 10분 동안 열처리하여 균을 사멸시킨 다음, 2×10^8 cells/mL가 되도록 조절하였다. *L. brevis* FSB-1의 현탁액 500 μ L와 Freund's complete adjuvant 500 μ L를 혼합하여 안정된 water in oil 형태를 얻을 때까지 homogenization을 실시하였다. *L. brevis* FSB-1의 현탁액(10^8 cells/mL, PBS)을 rabbit의 엉덩이 1/4 지점의 근육내에 10회에 걸쳐 주사하였다. 2주 후 동일한 방법으로 rabbit에 2차 주사하여 boosting한 후, 1주 후에 본 균에 대한 IgG(polyclonal antibodies)를 함유한 혈청을 획득하였다(Bouh와 Mittal, 1999; Hay와 Westwood, 2002a; Kim 등, 1999; Raamsdonk 등, 1995)

3) TLC-immunostaining

Silica gel-coated plate(50×50 cm, Whatman Int. Ltd., UK)에 RCM의 구성당으로 알려진 단당 6종과 올리고당 6종을 각각 5 μ g씩 분주하여 건조한 다음, 0.4% polyisobutylmethacrylate 용액(PIM, Sigma Chemical Co., USA)으로 1분간 처리하여 고정시켰다. Blocking buffer[1% polyvinylpyrrolidone(PVP)과 1% skim milk/PBS]에

2시간 동안 침지시킨 후, 10 mM PBS(pH 7.2)로 5번 세척하였다. *L. brevis* FSB-1의 현탁액(10^8 cells/mL, PBST)과 상온에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 10 mM PBS(pH 7.2)와 PBST로 각각 3번씩 세척하였다. Blocking buffer에 1시간 동안 침지시킨 후 10 mM PBS(pH 7.2)로 4번 세척하였다. Rabbit-anti-*L. brevis* FSB-1 IgG polyclonal antibodies(10 mg/mL, 0.05% tween 20과 3% skim milk/PBS) 5 μ L와 상온에서 1.5시간 동안 반응시킨 다음, 10 mM PBS(pH 7.2)와 PBST로 각각 3번씩 세척하였다. Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies(goat)를 1:500으로 희석한 용액 50 μ L를 분주하여 상온에서 1.5시간 동안 반응시켰다. 10 mM PBS(pH 7.2)와 PBST로 각각 3번씩 세척한 다음, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) liquid substrate system 50 μ L를 분주하여 10분간 반응시킨 후 증류수로 세척하였다. 물기를 건조한 후 염색된 plate profile은 Digital camera(DSC-T11, Sony Corp., Japan)를 사용하여 읽었으며, 반응된 색깔의 강도는 Image-pro plus(version 4.5) 응용 프로그램을 사용하여 컴퓨터로 정량하였다(Fig. 2-1).

Silica gel-coated plate

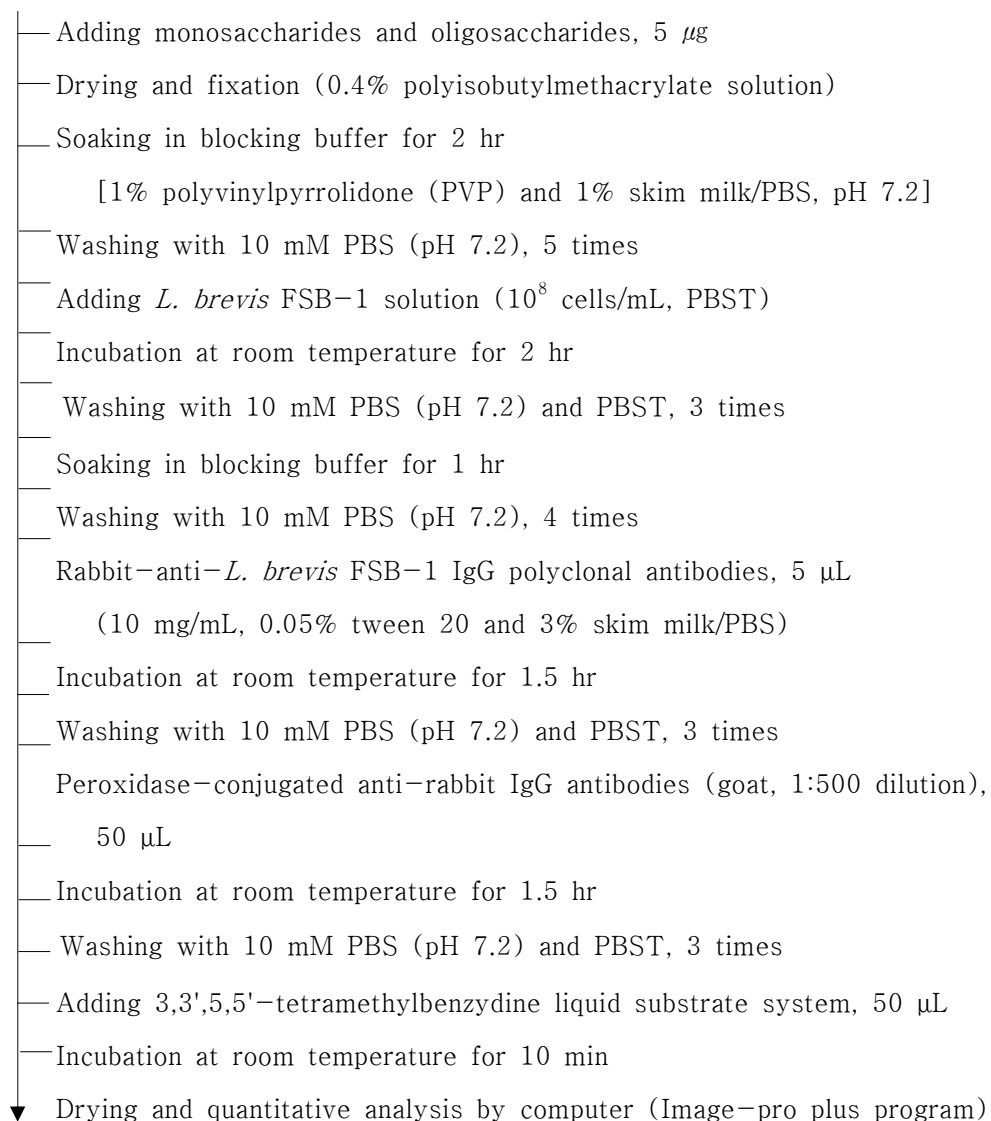


Figure 2-1. Schematic diagram of the TLC-immunostaining for determination of carbohydrates binding affinity with *Lactobacillus brevis* FSB-1.

3. 결과 및 고찰

가. *Lactobacillus brevis* FSB-1의 SLP로부터 lectin 분리 및 RCM에 대한 각 분리 lectin의 결합특성

RCM과 *L. brevis* FSB-1간의 결합능을 이용하여, *L. brevis* FSB-1의 SLP로부터 RCM의 당을 인식하는 lectin을 분리한 다음 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 SLP의 경우는 수많은 단백질의 band를 형성한 반면, RCM의 당과 특이적으로 결합한 단백질인 lectin의 경우는 3개의 band를 형성하였다(Fig. 2-2). 즉 *L. brevis* FSB-1의 SLP의 수많은 단백질 중 RCM의 당을 인식하여 결합하는 데 기여한 lectin은 3개의 단백질로서, 분자량 24, 55 및 75 kDa임을 확인하였다.

Yasui 등(1995)은 *Lactobacillus brevis* 41종에 대해 S-layer 단백질을 분석한 결과, 38종이 S-layer를 가지고 있으며 단백질의 분자량은 38~55 kDa의 범위를 보였다고 보고하였다. Jakava-Viljanen 등(2002)은 *L. brevis* ATCC 14869T를 호기적 또는 혐기적 조건으로 각각 배양한 후, 배양조건의 차이에 따른 S-layer 단백질의 분자량의 변화를 측정하였다. 그 결과 호기적 조건에서의 S-layer 단백질의 분자량은 43과 50 kDa을, 혐기적 조건에서는 50 kDa의 S-layer 단백질을 형성한다고 보고하였다.

이외에 Matsumura 등(1999)은 *Lactobacillus acidophilus* SBT 267, *L. acidophilus* LA 2, *L. acidophilus* LA 187에 대해 lectin상 단백질의 분자량을 측정된 결과, *L. acidophilus* SBT 267은 30과 50 kDa, *L. acidophilus* LA 2는 25, 30 및 60 kDa, *L. acidophilus* LA 187은 50과 30 kDa의 결과를 나타냈다고 보고하였다. Avall-Jaaskelainen 등(2003)은 *L. brevis* ATCC 8287의 slp A 단백질 중 receptor-binding region의 유전자를 점착능이 없는 유산균에 형질전환(transformation)시킴으로서 점착능을 부여할 수 있다고 보고하였다. 이 결과는 *L. brevis* FSB-1의 SLP 중 장내 점착능에 기여하는 lectin을 분리한 후, 장내 점착능을 소유하지는 않으나 유용한 생리활성을 가진 유산균에 우수한 장내 점착능까지 부여시

킬 수 있는 가능성을 제시하는 결과였다.

앞에서 분리한 *L. brevis* FSB-1의 SLP 중 각 분자량별 lectin(24, 55와 75 kDa)과 RCM간의 결합특성을 colonic mucin-binding assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 각 분리 lectin은 SLP의 결합능(binding affinity)보다 전반적으로 낮은 결과를 보였으며, 분자량에 따른 각 lectin과 RCM간의 결합능에도 차이를 보이지 않았다(Fig. 2-3). 이 결과는 RCM과 *L. brevis* FSB-1간의 결합이 특정 분자량의 lectin에 의해 형성되는 것이 아니라 여러 종류의 lectin이 복합적으로 결합하여 형성될 수 있는 가능성을 제시하였다.

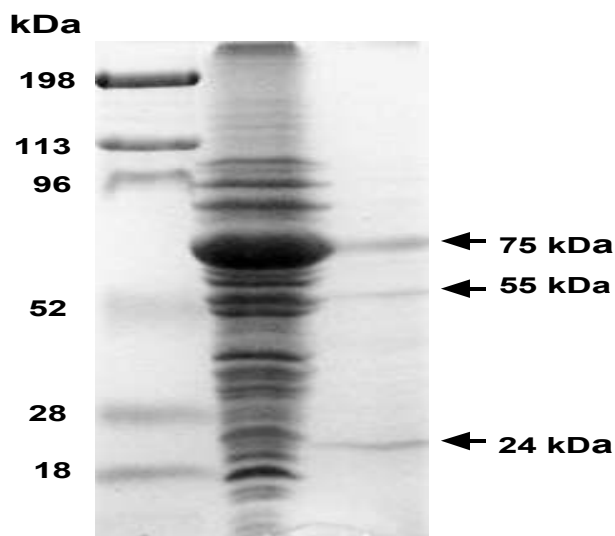


Figure 2-2. SDS-PAGE of isolated lectins by binding reaction between RCM and surface lectin-like protein (SLP) of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

Molecular weight marker (lane 1) and SLP of *Lactobacillus brevis* FSB-1 (lane 2). Isolated lectins by binding reaction relation RCM to surface lectin-like protein (SLP) of *Lactobacillus brevis* FSB-1 (lane 3).

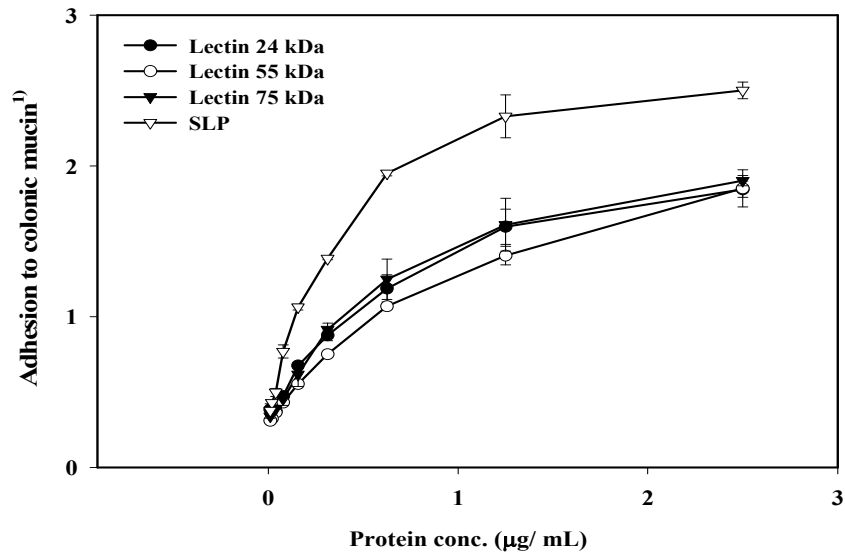


Figure 2-3. Comparison of binding affinity of various lectins (24, 55 and 75 kDa) and surface lectin-like protein (SLP) from *Lactobacillus brevis* FSB-1 by colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests.

나. Modified colonic mucin-binding assay를 이용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당 규명

Modified colonic mucin-binding assay를 이용하여 *L. brevis* FSB-1의 SLP가 인식하는 RCM의 당을 규명하기 위해, RCM의 구성당으로 알려진 단당과 올리고당 각 6종에 대하여 농도별로 조제한 후 *L. brevis* FSB-1의 SLP와의 결합능을 비교, 측정하

였다. Modified colonic mucin-binding assay는 colonic mucin-binding assay의 반응 과정 중 RCM의 당과 *L. brevis* FSB-1의 SLP간의 반응단계에서, 일정농도로 조제된 올리고당 및 단당을 직접 넣어줌으로서, RCM의 당과 첨가 단당 및 올리고당들이 *L. brevis* FSB-1의 SLP와 경쟁반응을 일으키게 된다. 이때 발생하는 결합능의 감소율로 첨가 단당 및 올리고당의 인식정도를 측정하였다. 즉 RCM에 대한 *L. brevis* FSB-1의 SLP와의 결합능을 기준으로 첨가 단당 및 올리고당을 첨가 후 결합능의 감소정도를 그 당에 대한 인식능력과의 상관관계로 비교, 측정하였다. 그 결과 단당의 경우는 10 mM 농도의 sialic acid에서 결합능이 급격히 감소하는 결과를 보였으며(Fig. 2-4), 올리고당의 경우는 0.1과 1 mg/mL 농도의 GalNAc α 1-3Gal에서 결합능이 급격히 감소하는 결과를 보였다(Fig. 2-5). 따라서 modified colonic mucin-binding assay를 이용하여 *L. brevis* FSB-1의 SLP가 인식하여 결합하는 당을 측정한 결과, 단당의 경우는 sialic acid를, 올리고당의 경우는 GalNAc α 1-3Gal을 인식하는 것으로 추정되었다. Sialic acid와 GalNAc α 1-3Gal은 RCM의 구조상 당의 외부 구조(external sugar chain)를 형성하는 당으로 보고되고 있다(Slomiany 등, 1980). 따라서 *L. brevis* FSB-1은 RCM의 구성당 중 외부 당쇄를 인식하여 결합함을 확인할 수 있었다.

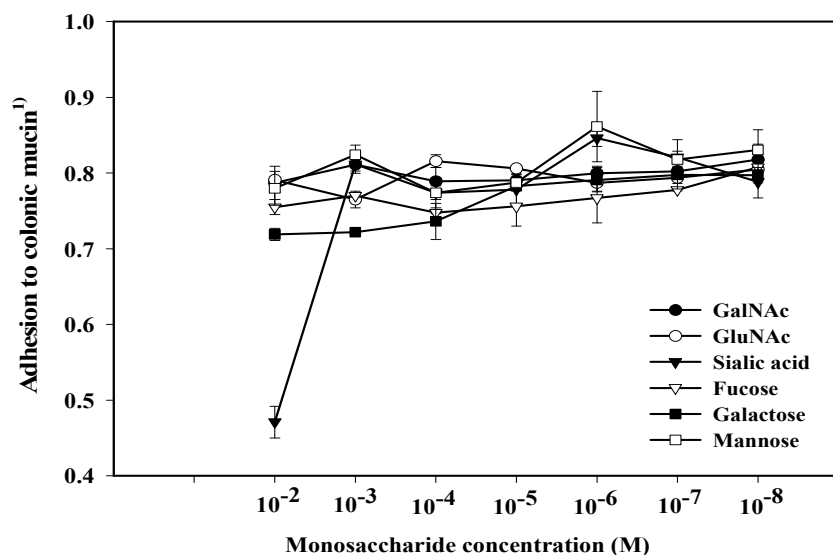


Figure 2-4. Effects of the concentration of various monosaccharides on binding affinity of RCM to surface lectin-like protein (SLP) from *Lactobacillus brevis* FSB-1 by modified colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests. Abbreviation used: Gal, D-galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Glc, D-glucose; GluNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; Sialic acid, *N*-acetylneuraminic acid.

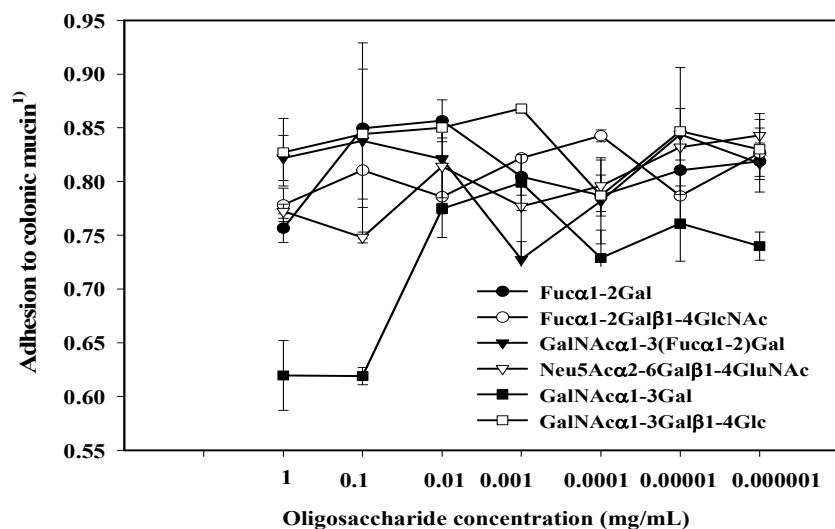


Figure 2–5. Effects of the concentration of various oligosaccharides binding affinity of RCM to surface lectin-like protein (SLP) from *Lactobacillus brevis* FSB-1 by modified colonic mucin-binding assay.

¹⁾Adhesion to colonic mucin was measured by colonic mucin-binding assay and expressed as mean±SD of quadruplicate tests. Abbreviation used: Gal, D-galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Glc, D-glucose; GluNAc, N-acetyl-D-glucosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid.

다. TLC-immunostaining을 이용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 균체가 인식하는 RCM의 당 규명

L. brevis FSB-1과 RCM 구성당으로 알려진 단당 및 올리고당 각 6종간의 결합능을 TLC-immunostaining을 이용하여 측정하였다. 이때 *L. brevis* FSB-1과 RCM 구성당간의 결합능의 정도를 결합강도(binding intensity)로 표현하였다. *L. brevis* FSB-1과 RCM 구성당간의 결합강도는 전반적으로 단당이 상대적으로 높은 결과를 보였다. 그러나 *L. brevis* FSB-1과 측정 단당간의 결합강도에는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, *L. brevis* FSB-1과 측정 올리고당간의 결합강도에서는 Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc와의 결합강도가 상대적으로 매우 높은 결과를 보였다. 따라서 *L. brevis* FSB-1과 RCM 구성당간의 결합능은 단당보다는 올리고당을 인식하여 결합하는 것으로 보였으며, 특히 RCM의 구성당 중 외부 구조를 형성하고 있는 Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc와의 인식 및 결합능이 높은 결과를 나타냈다(Table 2-2).

Yamamoto 등(1996)은 *Lactobacillus casei* IFO 3425와 여러 종류의 glycosphingolipid간의 결합능을 TLC-immunostaining을 이용하여 측정한 결과, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer(CTH)와의 결합능이 가장 우수하다고 보고하였다. 또한 쥐의 소장 점막에서 glycosphingolipid를 분리하여 acid glycosphingolipid와 nonacid glycosphingolipid를 분리한 후 *L. casei* IFO 3425와의 결합능을 측정한 결과, nonacid glycosphingolipid와는 결합하지만 acid glycosphingolipid와는 결합하지 않는다고 보고하였다. 그리고 결합능이 전혀 없었던 Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAca2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer(GM₁)에 sialidase를 처리한 후 결합능이 생성된 것으로 볼 때, sialic acid가 *L. casei* IFO 3425와의 점착능을 방해한다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 *L. brevis* FSB-1과 결합능이 가장 우수했던 Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc는 sialic acid를 포함하고 있는 구조로서, 본 실험과는 상이한 결과를 보여주었다.

Table 2-2. Binding affinity of *Lactobacillus brevis* FSB-1 to various carbohydrates by TLC-immunostaining

Carbohydrates	Relative binding intensity ¹⁾
L-fucose	27
D-galactose	33
D-mannose	39
<i>N</i> -acetyl-D-galactosamine	51
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	60
Sialic acid (<i>N</i> -acetylneuraminic acid)	33
GalNAc α 1-3Gal	42
Fuc α 1-2Gal	0
GalNAc α 1-3 (Fuc α 1-2) Gal	15
GalNAc α 1-3Gal β 1-4Glc	66
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc	10
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc	100

¹⁾Relative binding intensity of *Lactobacillus brevis* FSB-1 to Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc was taken as 100. Abbreviation used: Gal, D-galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Glc, D-glucose; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid.

제 3 항 분리 균주의 장내 점착특성에 대한 *in vivo* 실험

1. 서 설

유산균의 주류를 차지하고 있는 *Lactobacillus*속과 *Bifidobacterium*속은 오래 전부터 각종 발효 유제품과 된장 및 김치 등 전통 발효식품에 응용되어 왔으며, 최근에는 의약품 및 사료 첨가제에까지 광범위하게 활용되고 있다(Jung, 1997; Jung과 Kang, 1997; Kim, 1994). 또한 유산균은 인간의 유용 장내 미생물로서, 유당 불내증의 완화, 정장작용, 병원성 세균의 생육억제, 콜레스테롤 저하작용, 항암작용 및 면역 활성화작용 등 많은 생리효과가 보고되고 있다(Collins 등, 1998; Gill, 2003; Goldin, 1998; Klaenhammer와 Kullen, 1999; Ouwehand 등, 1999c; Salminen 등, 1999; Sherwood와 Gorbach, 2000). 이러한 유산균의 유효한 생리효과가 체내에서 발휘되기 위해서는 최우선적으로 인간의 소화기관에서 안정하여야 하며, 특히 대장내에서 상재성이 있어 장기간 생존하는 특성을 소유해야 한다(Coconnier 등, 1992). 유산균의 장내 상재성을 위해선 장내 점착능(adhesion property)이 중요한 인자로서 알려져 있으며, probiotics로 사용되는 유산균을 선택하는데 있어 하나의 기준으로 여겨지고 있다(Ouwehand 등, 1999d, 2001).

*Lactobacillus brevis*는 우유, 치즈, 인간의 분변 및 입과 장내에서 분리되며, Generally Recognized As Safe(GRAS) 상태로 여겨져 왔다(Elina 등, 2003; Kandler와 Weiss, 1986; Ouwehand 등, 2001). *L. brevis* ATCC 14869T와 ATCC 8287은 *in vitro* 실험결과 인간의 Caco-2 및 Intestine 407 cells에 대해(Elina 등, 2003), *L. brevis* PEL1은 인간의 장내 점막에 대하여 각각 매우 높은 장내 점착능이 보고되고 있다(Ouwehand 등, 2001). 또한 *L. brevis* ATCC 8287의 S-layer slp A 단백질은 인간의 Caco-2와 Intestine 407 cells 뿐만 아니라 endothelial cell line EA-hy 926, urinary bladder cell line T 24, immobilized fibronectin의 점착능에도 영향을 준다고 보고되고 있다(Hynonen 등, 2002). 이외에도 *L. brevis*의 S-layer slp A 단백질의 장내 상피세포(gut epithelial cell)에 대한 점착능의 역할이 보고된 바 있었다

(Avall-Jaaskelainen 등, 2003; Kahala 등, 1997). *L. brevis*는 항원의 전달 매개체역할을 함으로서 기존에 vaccine vector로 사용되었던 *Salmonella*, *Mycobacterim*, *Bordetella* 및 *Vibrio*의 안전성 문제를 해결했다고 보고하였다(Avall-Jaaskelainen 등, 2002). 또한 *L. brevis*는 낮은 pH와 담즙산, 췌장액에 대한 저항성이 보고되고 있으며(Elina 등, 2003), probiotics로서의 잠재성에 대한 여러 연구가 보고되고 있다(Elina 등, 2003; Kishi 등, 1996; Playfair, 1987; Maassen 등, 2000). 그러나 *Lactobacillus*속 및 *Bifidobacterium*속의 유산균들은 서로 다른 종(species)이나 균주(strain)에 따라 gastrointestinal(GI) tract내에서의 생육이 다양하므로 장내 상재성이 고려되어야 한다(Yuki 등, 1999).

따라서 본 연구에서는 본 연구 제 1 항에서 장내 점착능이 가장 우수한 균으로 선별되었던 *Lactobacillus brevis* FSB-1을 대상으로 gastrointestinal(GI) tract내에서의 생육능력 및 점착능을 검토하기 위하여, Wister rat을 이용하여 *in vivo* 실험을 실시하였다. 또한 쥐의 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 분리 및 검출을 위하여 polyclonal antibodies를 조제한 후 ELISA법을 이용한 *L. brevis* FSB-1의 검출방법을 고안하였다. Wister rat에 *L. brevis* FSB-1을 20일간 경구투여한 다음 경구투여 기간과 경구투여 중단기간의 분변에 대한 *L. brevis* FSB-1의 양을 ELISA법을 이용하여 측정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 실험동물

본 실험에 사용된 유산균주는 본 연구 제 1 항에서 장내 점착능이 가장 우수한 균으로 선별된 *Lactobacillus brevis* FSB-1이 이용되었다.

실험동물은 Newzealand white rabbit(웅성, 무게 270 g, Biogenomics, Korea,)과 Wister rat(웅성, 3주령, (주)샘타코, 경기)이 사용되었으며, 24±1℃ 및 55%의 상대습

도로 조절된 사육조내에서 일주일 동안 적응토록 하였다. 이때 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다.

나. Polyclonal antibodies의 조제

MRS(Difco Co., USA) 액체배지 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 배양액을 4°C, 6,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수한 후, 10 mM phosphate buffered saline(pH 7.2, 이하 PBS)으로 3회 세척하였다. 10 mM PBS(pH 7.2)로 균체를 재 현탁시킨 후 10분 동안 열처리하여 균을 사멸시킨 다음, 2×10^8 cells/mL가 되도록 조절하였다. *L. brevis* FSB-1의 현탁액 500 μ L와 Freund's complete adjuvant 500 μ L를 혼합하여 안정된 water in oil 형태를 얻을 때까지 homogenization을 실시하였다. *L. brevis* FSB-1의 현탁액(10^8 cells/mL, PBS)을 rabbit의 엉덩이 1/4 지점의 근육내에 10회에 걸쳐 주사하였다. 2주 후 동일한 방법으로 rabbit에 2차 주사하여 boosting한 후, 1주 후에 본 균에 대한 IgG(polyclonal antibodies)를 함유한 혈청을 획득하였다(Bouh와 Mittal, 1999; Hay와 Westwood, 2002a; Kim 등, 1999; Raamsdonk 등, 1995)

다. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)

ELISA법은 Voller 등(1976)의 방법을 기초로 실시하였다. 즉 bacteria를 10 mM PBS(pH 7.2)로 3회 세척한 다음 0.05 M Carbonate buffer(0.05 M Na_2CO_3 와 NaHCO_3 , pH 9.6)로 재 현탁시킨 후, 660 nm에서 OD(optical density) 1.0으로 맞추었다. Microtiter plate(Maxisorp, Nunc, Denmark)에 bacteria 현탁액 100 μ L를 분주한 후, 4°C에서 하룻밤 동안 incubation하여 well 표면에 부착시켰다. Dose-response relationship을 측정하기 위하여 다양한 장내 세균들(Table 3-1)에 대해서도 위와 동일한 방법으로 microtiter plate에 분주하여 incubation한 다음 well 표면에 부착시켰다. PBST(0.05% Tween 20을 함유한 PBS, pH 7.2)로 3회 세척한 후, blocking

buffer(1% BSA/0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6) 120 μ L를 분주하여 37°C에서 1시간 동안 incubation하여 blocking하였다. PBST로 3회 세척한 후, blocking buffer를 이용하여 25,000배로 희석한 rabbit-anti-*L. brevis* FSB-1 IgG polyclonal antibodies 90 μ L를 분주한 다음, 37°C에서 1.5시간 동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, blocking buffer를 이용하여 12,000배로 희석한 peroxidase-goat anti-rabbit IgG(H+L)(Zymed Lab. Inc., USA) 100 μ L를 분주한 다음, 37°C에서 1.5시간 동안 반응시켰다. PBST로 7회 세척한 후 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) liquid substrate system(Sigma Chemical Co., USA) 60 μ L로 발색시킨 다음, 2 N H₂SO₄(시약 1급) 50 μ L를 분주하여 반응을 정지시켰다. 발색정도는 450 nm에서 Microtiter plate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

라. Wister rat을 이용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 섭취

1) *Lactobacillus brevis* FSB-1의 배양 및 전처리

MRS 액체배지 300 mL에 *L. brevis* FSB-1의 전배양액 1%를 접종한 후, 37°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 배양액을 4°C, 6,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 0.9% saline으로 3회 세척한 후, 본 용액으로 재 현탁하여 *L. brevis* FSB-1의 균수를 10¹⁰ cells/mL로 조정하였다.

2) Wister rat을 이용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 섭취

Wister rat(웅성, 3주령) 각 3마리씩을 실험군과 대조군으로 분류한 다음, 24±1°C 및 55% 상대습도로 조절된 사육조내에서 각각 다른 cage에서 사육하였다. 이때 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다. 실험군의 경우는 매일 오후 1회씩 20일간 *L. brevis* FSB-1의 현탁액(10¹⁰ cells/mL, 0.9% saline) 1 mL를 경구투여(oro-gastrically injection)하였으며, 대조군의 경우는 *L. brevis* FSB-1의 현탁액 제조과정 중 바탕용액으로 사용된 0.9% saline 1 mL를 경구투여하였다. *L. brevis* FSB-1의 GI tract내에

Bacteria

- Wasing with 10 mM PBS (pH 7.2), 3 times
- Suspension with 0.05 M Carbonate buffer (0.05 M Na₂CO₃ and NaHCO₃, pH 9.6)
- Adjusting with OD 1.0 at 660 nm

Microtiter plate

- Adding bacteria suspension, 100 μL
- Incubation at 4°C for overnight
- Washing with PBST (PBS containing 0.05% Tween 20, pH 7.2)
- Adding blocking buffer (1% BSA/0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6), 120 μL
- Incubation at 37°C for 1 hr
- Washing with PBST
- Adding polyclonal antibodies/blocking buffer (×25,000 dilution), 90 μL
- Incubation at 37°C for 1.5 hr
- Washing with PBST
- Adding peroxidase–goat anti–rabbit IgG (H+L)/blocking buffer (×12,000 dilution), 100 μL
- Incubation at 37°C for 1.5 hr
- Washing with PBST
- Adding 3,3',5,5'–tetramethylbenzidine liquid substrate system, 60 μL
- Incubation at 37°C, 10 min
- Adding 2 N H₂SO₄, 50 μL

Reading absorbance at 450 nm

Figure 3–1. Schematic diagram of the ELISA for the detection of *Lactobacillus brevis* FSB–1 using polyclonal antibodies.

서의 생육능력 및 점착능을 측정하기 위한 분변의 회수는 경구투여 기간과 경구투여 중단기간으로 나누어 회수한 후 시료로 사용하였다. 즉 경구투여 기간은 *L. brevis* FSB-1의 경구투여 기간(1일~20)의 분변과 마지막 경구투여를 실시한 다음 24시간 후의 분변(21일)을 *L. brevis* FSB-1의 경구투여 기간군의 시료로, 경구투여 중단기간은 마지막 경구투여를 실시한 다음 48시간 이후의 분변을 *L. brevis* FSB-1의 경구투여 중단기간의 시료로 사용하였다. 이때 경구투여 중단기간의 분변에 대한 시료채취 간격은 6일간은 매일(22~27일), 6일간은 2일 간격(28~33일), 9일간은 3일 간격(34~42일)으로 실시하였다. 또한 *L. brevis* FSB-1의 GI tract 통과시간 및 생육능력을 측정하기 위하여, 실험군의 경우는 *L. brevis* FSB-1을, 대조군의 경우는 0.9% saline을 9일간 각각 경구투여를 실시한 다음 24시간이 지난시점을 0시간의 분변시료로 하였고, 10일째 경구투여를 실시한 다음 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24시간 후의 분변시료를 채취하여 GI tract의 통과시간 측정을 위한 시료로 사용하였다.

마. Wister rat의 분변내 균총(microflora)의 회수

Wister rat의 신선한 분변 1 g에 대하여 10 mM PBS(pH 7.2) 9 mL를 분주하여 충분히 현탁시킨 다음, 4°C, 1400 rpm에서 2분간 원심분리하여 분변내 균총(fecal microflora) 외의 특정물질에 대한 침전물을 제거하였다. 상등액을 4°C, 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 분변내 균총을 회수한 다음, 10 mM PBS(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 0.05 M Carbonate buffer(pH 9.6)로 재 현탁시킨 후 시료로 사용하였다. 분변 g당 *L. brevis* FSB-1의 양은 polyclonal antibodies를 이용하여 ELISA법으로 측정한 후 비교하였다.

바. 통계 처리

실험결과는 평균값±SD로 나타내었고, student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. ELISA법에 의한 polyclonal antibodies의 *Lactobacillus brevis* FSB-1에 대한 인식능

Polyclonal antibodies는 여러 개의 항원 결정기를 가지고 있으므로 항원으로 작용하는 물질의 구조와 유사한 것이 존재할 경우, 혈청학적 특이성(serological specificity)이 감소함에 따라 교차반응이 발생할 수 있다. 즉 본 실험에서 제조한 polyclonal antibodies는 본 항원(*L. brevis* FSB-1) 외의 다른 항원에 대한 결합능이 발생할 가능성이 있다. 그럼에도 불구하고 polyclonal antibodies는 특정한 항원(antigen)과 결합할 수 있는 기능을 가지고 있어 native antigen을 identification하거나 gene product를 수행함에 있어 부분적 염기서열을 표현하는 일에 아주 유용하게 사용되어 왔다고 보고되고 있다(Hay와 Westwood, 2002b).

따라서 *L. brevis* FSB-1을 항원으로 하여 제조한 polyclonal antibodies의 검출능력 및 특이성(specificity)을 측정하기 위하여, *L. brevis* FSB-1의 균수(cells/mL)와 polyclonal antibodies와의 상관관계를 ELISA법을 이용하여 측정하였다. Fig. 3-2에서 보는 바와 같이, *L. brevis* FSB-1의 균수가 증가할수록 ELISA법을 이용하여 측정된 흡광도도 비례적으로 증가하는 결과를 보였다. 또한 *L. brevis* FSB-1의 균수증가에 따른 흡광도의 직선상 증가범위는 *L. brevis* FSB-1의 균수가 $10^{6.04} \sim 10^{7.85}$ cells/mL일 때 흡광도 0.12~1.72의 결과를 보이는 범위였다. 따라서 본 실험에서 제조한 polyclonal antibodies의 *L. brevis* FSB-1에 대한 유효한 검출한계 범위는 *L. brevis* FSB-1의 균수가 약 $10^6 \sim 10^8$ cells/mL일 때 흡광도 0.12~1.72인 것으로 판단되었다. 다시 말해서 본 실험에서 제조한 polyclonal antibodies를 이용하여 ELISA법으로 분변 중 *L. brevis* FSB-1을 검출할 때 흡광도가 1.72이상 또는 0.12이하의 값은 유효하지 않은 것으로 판단되었다.

Yuki 등(1999)은 *Lactobacillus casei* Shirota를 항원으로 하여 monoclonal

antibodies를 제조하였으며, 이에 따른 *L. casei* Shirota의 검출한계가 10^5 cells/mL였다고 보고하였는데, monoclonal antibodies와 polyclonal antibodies의 특성을 고려해볼 때, 본 실험에서 *L. brevis* FSB-1의 검출을 목적으로 제조한 polyclonal antibodies의 검출능력은 상대적으로 매우 우수함을 확인할 수 있는 결과였다.

또한 본 실험에서 제조한 polyclonal antibodies의 *L. brevis* FSB-1에 대한 특이성을 측정하기 위하여, *Lactobacillus*속 7종과 *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3357, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, *Pediococcus pentosaceus* KFRI 833의 유산균과 장내 유해세균인 *Enterococcus faecalis* KCTC 2011, *Escherichia coli* MC 106, *Staphylococcus aureus*에 대하여 본 polyclonal antibodies와의 반응성(교차반응)을 비교, 측정하였다. 그 결과 *L. plantarum* ATCC 14917, *P. pentosaceus* KFRI 833, *L. helveticus* ATCC 8018 및 *L. brevis* ATCC 14869T에 대한 교차반응(cross reaction)을 보였으며, 그 외 다른 균주에 대해서는 반응성이 전반적으로 낮은 결과를 보였다(Table 3-1). 본 polyclonal antibodies는 특히 *L. helveticus* ATCC 8018와 *L. brevis* ATCC 14869T에 대하여 *L. brevis* FSB-1의 흡광도 1을 기준으로 비교할 때, 상대적인 값 0.74와 0.70을 각각 나타냄으로서 높은 교차반응을 보였다.

*L. helveticus*는 *L. brevis*와 매우 가까운 종(species)관계에 있으며, 유사한 S-layer 단백질(43~45 kDa)의 특징을 가지고 있는 균주로 보고되고 있다(Jakava-Viljanen 등, 2002; Pouwels 등, 1998). 따라서 상대적으로 높은 교차반응을 나타낸 것으로 추측되었다. 또한 *L. brevis* ATCC 14869T와도 높은 교차반응을 보였는데, 본 실험의 polyclonal antibodies의 제조에 사용된 *L. brevis* FSB-1은 본 연구 제 1 절에서 형태학적, 생리 및 생화학적 동정결과 *L. brevis*와 가장 가까운 종으로 동정되었으며, 유전자적 동정기법인 16S rDNA의 부분적 염기서열 상동성 분석결과, *L. brevis* ATCC 14869T와 98.5%의 가장 높은 상동성을 보인 바 있었던 균주였다. 따라서 높은 교차반응을 보인 것은 당연한 결과라고 판단되었다. 또한 본 실험에서 제조한 *L. brevis* FSB-1의 polyclonal antibodies가 *L. brevis* FSB-1의 검출을 위한 목적으로 사용하는데 적합하며 유효할 것으로 여겨졌다. 또한 *L. helveticus*와 교차반응이 있기는 하지

만, *L. helveticus*는 주로 sour milk와 cheese에서 분리되는 균주로 보고되고 있으므로 (Kandler와 Weiss, 1986), 분변 중 검출에 대한 가능성은 적을 것으로 판단되었다.

따라서 *L. helveticus*와 *L. brevis* ATCC 14869T와의 교차반응이 있기는 하지만, 본 실험에서 *L. brevis* FSB-1을 항원으로 제조한 polyclonal antibodies는 *L. brevis* FSB-1의 *in vivo* 장내 점착특성 연구를 위해 사용하는 데 충분한 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

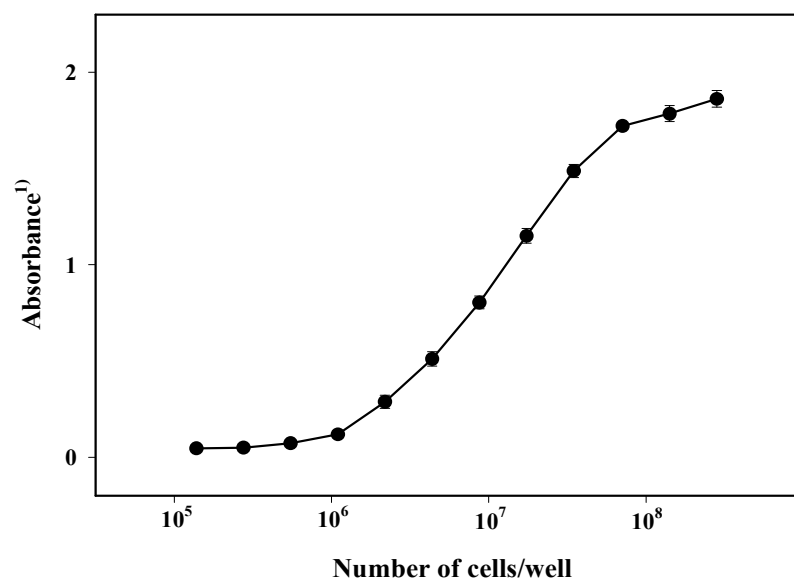


Figure 3-2. Detection of *Lactobacillus brevis* FSB-1 by ELISA using specific polyclonal antibodies.

¹⁾Absorbance was measured by ELISA at 450 nm and expressed as mean±SD of triplicate tests.

Table 3-1. Specificity of polyclonal antibodies produced by rabbit using *Lactobacillus brevis* FSB-1

Bacteria	Relative ELISA titer ¹⁾ (mean±SD)
<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1	1.00±0.00
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869T	0.70±0.01
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3025	0.31±0.00
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109	0.30±0.02
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	0.15±0.00
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 8018	0.74±0.05
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	0.49±0.00
<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCTC 3357	0.04±0.00
<i>Lactococcus lactis</i>	0.09±0.03
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	0.05±0.00
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KFRI 833	0.59±0.03
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 14485	0.33±0.02
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011	0.21±0.01
<i>Escherichia coli</i> MC 106	0.04±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.07±0.00

¹⁾Relative ELISA titer was measured by ELISA at 450 nm and expressed as mean±SD of triplicate tests.

나. *Lactobacillus brevis* FSB-1의 gastrointestinal(GI) tract내 생육능력 및 장내 정착능

1) *Lactobacillus brevis* FSB-1의 GI tract 통과시간 및 생육능력

L. brevis FSB-1의 현탁액(10^{10} cells/mL, 0.9% saline) 1 mL의 경구 투여군인 실험군과 *L. brevis* FSB-1의 현탁액 제조과정 중 배양용액으로 사용된 0.9% saline 1 mL의 경구 투여군인 대조군에 대하여 매일 오후 1회씩 10일 동안 Wister rat(웅성, 3주령) 3마리씩에 대하여 경구투여를 실시하였다. 실험군과 대조군에 대하여 9일째 경구투여 후 24시간 뒤의 분변(0시간)과 10일째 경구투여 후 시간대별(2, 4, 6, 8, 10, 12, 24시간) 분변을 각각 채취한 다음, 분변내 *L. brevis* FSB-1의 양을 ELISA법으로 측정하였다. Fig. 3-3에서 보는 바와 같이 실험군의 경우는 4시간 후 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 양을 나타내는 흡광도(0.15 ± 0.00)가 서서히 증가하기 시작하여 8시간 후에 가장 높은 흡광도(0.36 ± 0.02)를 보였으며, 10시간 후부터는 다시 흡광도(0.22 ± 0.01)가 감소하는 결과를 보였다. 이에 반해 대조군의 경우는 시간대에 상관없이 흡광도가 $0.06 \pm 0.00 \sim 0.09 \pm 0.01$ 의 값으로 일정한 수준을 보였다. 대조군의 흡광도 결과는 Fig. 4-2의 결과로 볼 때 검출한계 범위를 벗어나는 결과이며, 각 시간대별 실험군과 대조군간의 흡광도 결과에 대하여 student *t*-test를 실시한 결과, $p < 0.05$ 수준 이상에서 유의적인 차이를 보여주었다. 따라서 대조군의 분변 중에는 *L. brevis* FSB-1이 본 실험방법으로는 검출되지 않는 것으로 판단되었다.

실험군의 결과는 *L. brevis* FSB-1의 경구투여 후 장내 통과시간을 예측 할 수 있는 결과일 뿐만 아니라 GI tract의 통과 과정 중 위산, 담즙산 및 췌장액 등의 소화효소에 대한 저항성(내산성, 내담즙성, 췌장액에 대한 흐름의 저항) 등을 추정할 수 있는 결과로서, 장내에서의 생육정도를 판단할 수 있었다. 즉 Fig. 3-3의 결과로 볼 때, *L. brevis* FSB-1의 현탁액을 약 10^{10} cells/mL로 경구투여 후 배변되기 까지 걸리는 시간은 대략 8시간(가장 높은 흡광도 값을 보임)인 것으로 보이며, 이때의 흡광도 값을 기준으로 Fig. 5-2의 결과로부터 예측할 때, *L. brevis* FSB-1이 $10^{7.40}$ cells/g of

wet feces가 배변되는 것으로 판단되었다.

Tuleu 등(1999)은 Fisher rat(자성, 12주령)에 대하여 사료(fibre-free diet)의 크기와 밀도에 따른 장내 통과시간을 측정하였다. Fisher rat에게 크기 0.71~1.00(diameter, mm), 밀도 0.9 g/cm³의 사료를 약 0.5~1 g정도 섭취시켰을 때 사료가 쥐의 대장내에 머무르는 시간은 3시간 후부터 9시간 후까지였으며, 24시간 이후에는 대장에 남아있는 사료가 없었다고 보고하였다. 본 실험에서 경구투여한 시료는 유산균으로서 이 연구결과와 비교하기에는 차이가 있으나, 쥐의 사료에 대한 소화시간으로부터 미루어 짐작해 볼 때, 사료의 섭취 후 24시간 전에 장내에서 모든 영양분 및 균들이 소화 및 배설되는 것으로 여겨졌다. 따라서 *L. brevis* FSB-1을 경구투여한 다음 24시간이 지난 후의 분변에서 검출되는 *L. brevis* FSB-1은 소화기관내 생육능력과 점착능에 따라 달라질 수 있다고 판단되었다. 즉 *L. brevis* FSB-1을 Wister rat에 경구투여한 다음 24시간 이후에 배설되는 *L. brevis* FSB-1은 장내에 점착할 수 있는 능력을 소유하여 장내에서 생육 및 증식하였다가 배변되는 것으로 추정되었다. 또한 *L. brevis* FSB-1의 현탁액을 10¹⁰ cells/mL로 경구투여한 다음, 8시간 후에 *L. brevis* FSB-1이 약 10^{7.40} cells/g of wet feces가 검출되는 것으로 미루어 볼 때, *L. brevis* FSB-1은 GI tract내 환경에 저항성을 가지고 있어서 대장까지 살아갈 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

*L. brevis*는 낮은 pH와 담즙산, 췌장액에 대한 저항성이 이미 보고된 바 있으며 (Elina 등, 2003), 본 실험결과와 일치하였다.

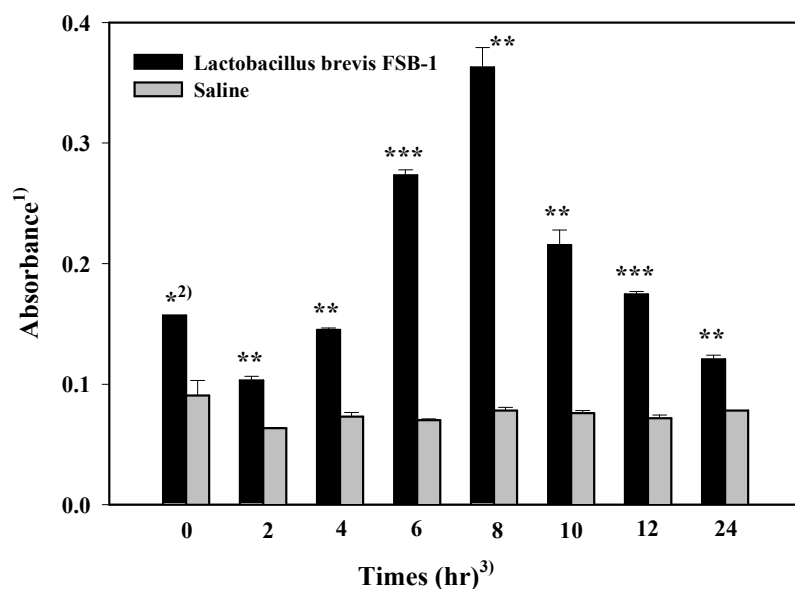


Figure 3–3. Detection of *Lactobacillus brevis* FSB–1 in rat fecal sample according to time course after the oral administration of *Lactobacillus brevis* FSB–1.

¹⁾Absorbance was measured by ELISA at 450 nm and expressed as mean±SD of triplicate tests. ²⁾*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, Significant difference between control (saline only) and sample each time. ³⁾Times (hr), Rat fecal sample was collected in the tenth day after the daily oral administration of *Lactobacillus brevis* FSB–1, 10^{10} cells/mL. 0, 9 days–after 24 hr; 2, 10 days–after 2 hr; 4, 10 days–after 4 hr; 6, 10 days–after 6 hr; 8, 10 days–after 10 hr; 12, 10 days–after 12 hr; 24, 10 days–after 24 hr.

2) *Lactobacillus brevis* FSB-1의 경구투여 기간내의 분변내 검출

L. brevis FSB-1의 현탁액(10^{10} cells/mL, 0.9% saline) 1 mL를 경구투여하는 실험군과 *L. brevis* FSB-1의 현탁액 제조과정 중 바탕용액으로 사용된 0.9% Saline 1 mL를 경구투여하는 대조군에 대하여 매일 오후 1회씩 20일간 Wister rat(3주령, 웅성) 3마리씩에 대하여 경구투여를 실시하였다. 실험군과 대조군에 대하여 매일 경구투여를 실시한 다음 24시간 후 채취한 각각의 분변에 대한 *L. brevis* FSB-1의 양을 비교, 측정하였다. 실험군의 경우는 평균 흡광도가 0.20 ± 0.07 의 값을, 대조군의 경우는 평균 흡광도가 0.10 ± 0.03 의 값을 보였다(Fig. 3-4). 실험군의 흡광도에 대한 평균값을 Fig. 4-2의 결과로 예측해 볼 때, 경구투여 기간 중 분변시료에는 *L. brevis* FSB-1이 평균 $10^{7.22}$ cells/g of wet feces가 검출되는 것으로 여겨졌다.

Nardi 등(1999)은 Wister rat 분변에 *Lactobacillus*속이 상재 미생물로 존재한다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 대조군의 평균 흡광도 0.10 ± 0.03 의 값은 앞의 Fig. 3-2의 결과에서 보았듯이, *L. brevis* FSB-1의 검출을 위한 유효한 흡광도값의 범위인 $0.12 \sim 1.72$ 의 범위를 벗어나는 결과였다. 또한 실험군과 대조군간의 흡광도에 대하여 student *t*-test를 실시한 결과, $p < 0.001$ 수준에서 유의적인 차이를 보였다. 따라서 대조군의 흡광도는 *L. brevis* FSB-1 외 균과의 비특이적인 반응의 결과로 예측되었으며, 실험군의 분변 중 *L. brevis* FSB-1의 검출 및 경향을 판단하는데 있어 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

Saxelin 등(1995)은 20명의 건강한 성인에 대하여 *Lactobacillus* GG를 1.6×10^8 과 1.2×10^{10} cells/mL로 조정 한 후 각각 gelatin을 이용하여 capsulation시킨 다음 7일간 매일 섭취시켰다. 각각의 *L. GG* 섭취기간 중 분변에서 *L. GG*의 양을 측정한 결과, 1.6×10^8 cells/mL의 섭취군의 분변에서는 *L. GG*가 검출되지 않았으며, 1.2×10^{10} cells/mL의 섭취군의 분변에서는 섭취기간 중 3일 후부터 7일까지 *L. GG*가 약 2.0×10^6 cells/g of feces가 검출되었다고 보고하였다. 이 실험은 GI tract내에서 *L. GG*의 안정성을 부여시켜 주기위해, *L. GG*를 gelatin으로 capsulation시킨 후 섭취하게

하였다. 이에 반해 본 실험은 *L. brevis* FSB-1을 0.9% saline에 현탁하여 경구투여한 결과로서, 경구투여 기간 중 분변에서 *L. brevis* FSB-1이 평균 약 10^7 cells/g of wet feces가 검출되는 결과를 보였다. 따라서 GI tract내에서의 *L. brevis* FSB-1의 생육능력이 *L. GG*에 비해 상대적으로 우수하다는 것을 확인할 수 있는 결과였다.

Huang 등(2003)은 Wister rat에 대하여 *Propionibacterium jensenii* 702를 약 10^{10} cells/mL로 81일간 매일 섭취시킨 후 분변에서 *P. jensenii* 702의 양을 측정하였다. 그 결과 36일간 경구투여 후 분변에서는 10^8 cells/g of feces, 81일간 경구투여 후 분변에서는 $10^8 \sim 10^9$ cells/g of feces가 검출되었다고 보고하면서, *P. jensenii* 702는 GI tract내에서 생육이 가능하다고 보고하였다. 또한 새로운 probiotics의 제안을 위해 독성검사를 실시할 경우는 10^7 cells/day이상을 섭취시켜야 한다고 보고하였다. 본 실험의 경우 Wister rat에 대하여 *L. brevis* FSB-1을 10^{10} cells/day의 농도로 20일간 경구투여를 실시하였으며, 경구투여 기간 동안 Wister rat은 비정상적인 행동을 하거나 설사, 구토 등의 소화기관내 이상을 보이지 않았다(data는 제시하지 않았음). 따라서 Wister rat에 있어서 본 균의 다량섭취가 경구투여 기간인 20일 동안에는 유해한 영향이 없는 것으로 판단되었다.

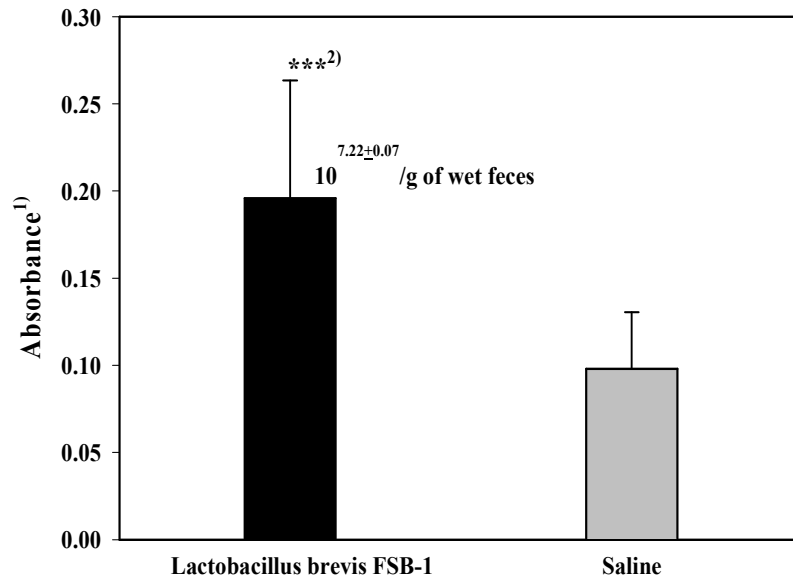


Figure 3-4. Detection of *Lactobacillus brevis* FSB-1 in daily rat fecal sample at 24 hr after the oral administration of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

¹⁾Absorbance was measured by ELISA at 450 nm and expressed as mean±SD of triplicate tests. ²⁾***, p<0.001, Significant difference between control (saline only) and sample.

3) *Lactobacillus brevis* FSB-1의 경구투여 중단 후의 분변내 검출

L. brevis FSB-1의 경구투여 중단 후 *L. brevis* FSB-1의 장내 생육 및 점착능을 측정하기 위하여, 실험군과 대조군에 대하여 경구투여 기간 20일 이후 48시간이상이 지난 경구투여 중단기간에 대하여, 6일간은 1일 간격, 6일간은 2일 간격, 9일간은 3일 간격으로 분변을 채취하였고, 각각의 채취분변에 대하여 *L. brevis* FSB-1의 양을 비교, 측정하였다.

경구투여 중단 이후 실험군의 경우 6일간의 분변 중 흡광도는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으며, 8일과 10일 후의 분변 중 흡광도가 각각 0.46 ± 0.02 과 0.42 ± 0.02 로 높게 나타났다가 다시 감소하는 경향을 보였다. 8일과 10일의 분변에 대한 흡광도는 Fig. 3-2의 결과로 볼 때, 모두 유효한 흡광도 값의 범위였으며, 8일과 10일의 분변에서 *L. brevis* FSB-1이 각각 $10^{7.50}$ 과 $10^{7.46}$ cells/g of wet feces가 검출되었다. 이 결과는 *L. brevis* FSB-1을 경구투여하지 않은 기간, 즉 20일간 경구투여 후 9일과 11일이 지난 기간의 분변에서 검출된 것으로서, 앞의 *L. brevis* FSB-1의 GI tract내 주요 통과시간이 8시간(Fig. 3-3)이었던 결과로 미루어 볼 때, *L. brevis* FSB-1이 대장내에 점착하는 능력을 소유하여 생육 및 증식하였다가 배변되었을 것으로 여겨졌다. 따라서 *L. brevis* FSB-1은 경구투여 기간뿐만 아니라 경구투여 중단 후 10일까지도 장내에 점착하여 생육하는 것으로 판단되었다.

L. brevis FSB-1은 본 연구 제 1 항에서 *in vitro* 실험인 colonic mucin-binding assay를 이용하여 대장내 점착능을 측정한 결과, 가장 우수한 균으로 선별된 바 있었던 균주로서, Wister rat을 이용한 *in vivo* 실험에서도 장내 점착능이 우수한 결과를 보였다. 따라서 본 연구 제 1 항에서 장내 점착능이 우수한 균주의 선별을 위해 사용된 colonic mucin-binding assay는 장내 점착능 우수균주 선별을 위한 방법으로 유효하며, *L. brevis* FSB-1은 우수한 장내 생육 및 점착능을 소유하고 있음을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 그러나 *L. brevis* FSB-1이 대장내에서 단기간뿐만 아니라 장기간에 걸쳐 지속적인 생육과 더불어 유용한 효과가 발휘되기 위해서는 *L. brevis* FSB-1의 꾸준한 섭취가 요구되었다.

Yuki 등(1999)은 8명의 성인 남자에게 3일간 *Lactobacillus casei* Shirota의 발효유 10^{10} cells/mL를 연속으로 섭취시킨 다음, 4일째 되는 날 분변 중의 *L. casei* Shirota를 monoclonal antibodies를 가지고 검출한 결과, 10^7 cells/g of feces가 검출되었다고 보고하였다.

Huang 등(2003)은 probiotic bacteria가 장내 생태계에서 유용한 효과를 발휘하기 위해서는 최소한 장내에 10^7 cells/g of feces에 도달해야 한다고 보고하였으며, Lee와 Salminen(1995)은 probiotic bacteria가 치료효과를 나타내기 위해서는 최소한 10^5 cells/g of feces가 요구된다고 보고하였다. 또한 Plant와 Conway(2002)는 GI tract내에서 점착능을 가지고 있는 Lactobacilli가 점착능을 소유하지 않은 유산균주에 비해 장내에서 오래 지속될 수 있을 뿐만 아니라, 항원에 대한 adjuvant 기능의 수행에 효과적이라고 보고하였다. 본 실험결과 *L. brevis* FSB-1은 경구투여 기간 뿐만 아니라 경구투여 중단 이후 10일까지의 분변 중에도 10^7 cells/g of wet feces이상이 검출되었으므로 장내에서의 유용한 효과를 발휘하는데 적합하다고 판단되었다.

Massen 등(2000)은 *Lactobacillus brevis* ML 12를 약 10^{10} cells/mL로 경구투여한 결과 TNF- α , IL-2 및 IL-1 β 를 유도했다고 보고하였으며, *L. brevis* FSB-1은 본 연구 제 2 절에서의 면역 증진활성 측정결과, 골수세포 증식능력, 마크로파지 활성화능, 비장 활성화능 및 보체계 활성화능을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다. 따라서 *L. brevis* FSB-1은 GI tract내에서의 생육능력과 점착능을 가지고 있을 뿐만 아니라 면역 활성 증진효과 등의 생리활성을 소유하고 있으므로 새로운 probiotics로서 제시할 만 하다고 판단되었다.

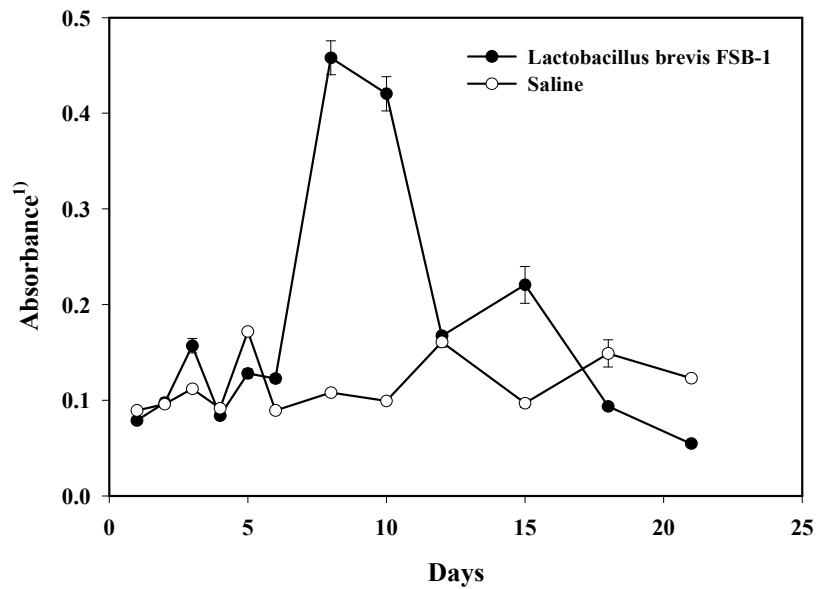


Figure 3-5. Detection of *Lactobacillus brevis* FSB-1 in rat fecal sample after the end of the oral administration of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

¹⁾Absorbance was measured by ELISA at 450 nm and expressed mean \pm SD of triplicate tests.

Table 3-2. Detection of *Lactobacillus brevis* FSB-1 in rat fecal sample after the oral administration of *Lactobacillus brevis* FSB-1

Days		<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		Saline
Intake	Stop	Absorbance ¹⁾	Cells/g of wet feces	Absorbance
1		0.24±0.00	10 ^{7.26±0.00}	0.22±0.01
2		0.23±0.00	10 ^{7.26±0.00}	0.10±0.00
3		0.36±0.01	10 ^{7.40±0.01}	0.12±0.00
4		0.31±0.01	10 ^{7.34±0.01}	0.08±0.00
5		0.18±0.00	10 ^{7.20±0.00}	0.08±0.00
6		0.19±0.01	10 ^{7.21±0.01}	0.09±0.00
7		0.22±0.00	10 ^{7.24±0.00}	0.09±0.00
8		0.25±0.00	10 ^{7.27±0.00}	0.10±0.00
9		0.16±0.00	10 ^{7.18±0.00}	0.07±0.00
10		0.10±0.00	—	0.09±0.01
11		0.12±0.00	10 ^{7.14±0.00}	0.08±0.00
12		0.25±0.01	10 ^{7.28±0.01}	0.07±0.00
13		0.27±0.01	10 ^{7.30±0.01}	0.07±0.00
14		0.20±0.00	10 ^{7.22±0.00}	0.09±0.02
15		0.18±0.00	10 ^{7.21±0.00}	0.11±0.02
16		0.17±0.00	10 ^{7.19±0.00}	0.07±0.00
17		0.16±0.01	10 ^{7.15±0.01}	0.08±0.00
18		0.11±0.00	—	0.09±0.00
19		0.17±0.00	10 ^{7.19±0.00}	0.13±0.00
20		0.18±0.00	10 ^{7.20±0.00}	0.11±0.00
	21	0.11±0.00	—	0.12±0.01
	22	0.08±0.00	—	0.09±0.00
	23	0.10±0.01	—	0.10±0.00
	24	0.16±0.01	10 ^{7.80±0.01}	0.11±0.00
	25	0.08±0.00	—	0.09±0.00
	26	0.13±0.00	10 ^{7.15±0.00}	0.17±0.00
	27	0.12±0.00	10 ^{7.14±0.00}	0.09±0.00
	29	0.46±0.02	10 ^{7.50±0.02}	0.11±0.00
	31	0.42±0.02	10 ^{7.46±0.02}	0.10±0.00
	33	0.17±0.00	10 ^{7.19±0.00}	0.16±0.01
	36	0.22±0.02	10 ^{7.25±0.02}	0.10±0.00
	39	0.09±0.00	—	0.15±0.01
	42	0.06±0.00	—	0.12±0.00

¹⁾Absorbance was measured by ELISA at 450 nm and expressed mean±SD of triplicate tests.

제 2 절 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발 (협동과제: 고려대학교)

제 1 항 면역활성이 우수한 유산균주 선별 및 *in vitro*와 *in vivo*면역 특성

1. 서 설

유산균은 19세기 중반 Pasteur에 의해서 그 존재가 밝혀진 이래 Metchnikoff의 장수설로 관심이 집중되어 왔다(Metchnikoff, 1907). 유산균은 건강한 사람의 장내 상재 미생물로서 대표적인 균으로는 *Bifidobacterium*속과 *Lactobacillus*속이 있다(Fang 등, 2000). 유산균은 오래 전부터 yoghurt, cheese 등 발효 유제품과 김치, 간장 등 전통 발효식품에 이용되어 왔으며, 식품산업에 있어 중요한 역할을 담당해 왔다(Jung, 1997; Jung과 Kang, 1997; Kim, 1994). 최근에는 유산균을 생균제제로 섭취하는 probiotics로서의 개념이 대두되고 있는데, 이에 따라 유산균이 갖는 정상작용 외에 항암효과, 항균작용, 항콜레스테롤, 항변이원 작용, 면역증진 효과 등 생리활성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Bhakdi 등, 1997; Fernandes와 Shahani, 1990; Gill, 2003; Hamilton-Miller, 2003). 항암 및 면역 활성화의 증진에 대한 연구는 유산균체의 섭취 또는 세포성분 및 이들의 대사산물에 의한 것으로서(Kitazawa 등, 1998; Meydani와 Ha, 2000), 예를 들어 세포벽 성분(capsular polysaccharides, peptidoglycans, lipoteichoic acids)에 의한 대식세포의 cytokine 유도(Bhakdi 등, 1997; Keller 등, 1992) 및 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*에 의한 항암효과, 대식세포 활성화 및 cytokine의 유도가 보고되고 있다(Kitazawa 등, 1998, 2000; Uemura 등, 2003). 또한 *Lactobacillus plantarum*에 의한 대식세포의 cytokine 유도(Haza 등, 2003)도 보고되고 있다. 유산균이 이러한 면역 활성화능을 발휘하기 위해서는 유산균이 소화기관을 거쳐 장내까지 생존하여야 하며, 장내 표면이나 상피세포에 어떠한 형

태로든 결합하여 지속적으로 살아갈 수 있는 능력이 있어야 한다. 즉 장내 상재성을 갖는 유산균 및 이들이 생산하는 세포성분과 산물 등이 Gut Associated Lymphoid Tissue(GALT)를 자극시키고 Peyer's patch내의 면역세포의 분열 및 증식을 증가시키며, antibody(IgA의 분비)와 cytokine의 생산을 유도하여, 결과적으로 인체의 전신 면역계에 공헌하게 된다(Meydani와 Ha, 2000, Fig. 4-1).

Lactobacillus brevis ATCC 14869T와 ATCC 8287은 *in vitro* 실험결과 인간의 Caco-2 및 Intestine 407 cell에 대해(Elina 등, 2003), *L. brevis* PEL1은 인간의 장내 점막에 대하여(Ouwehand 등, 2001) 각각 매우 높은 장내 점착능을 보이고 있으며, 낮은 pH와 담즙산, 췌장액에 대한 저항성이 보고되고 있다(Elina 등, 2003). 또한 *L. brevis*는 우유, 치즈, 인간의 분변 및 입과 장내에서 분리되며(Elina 등, 2003; Kandler와 Weiss, 1986; Ouwehand 등, 2001), Generally Recognized As Safe(GRAS) 상태로 여겨져 probiotics로서의 잠재성에 대한 여러 연구가 보고되고 있다(Elina 등, 2003; Kishi 등, 1996; Playfair, 1987).

따라서 본 연구에서는 균주의 안전성과 우수한 장내 점착능 그리고 probiotics로의 잠재성을 기초로 하여, 본 실험실에서 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 각 균체성분(전균체, 세포벽, 세포질 및 균체 외 획분)이 갖는 장관면역 활성화, 대식세포 활성화능, splenocyte mitogen 활성화능, 보체 활성화능 및 보체 활성화 경로에 대한 전반적인 면역 활성화능을 측정하였다. 따라서 본 균주의 균체 분획물이 면역증진 활성을 가지고 있는지 검토함으로써, 향후 probiotics 또는 의약품으로서의 응용 가능성을 제시할 수 있는 기초자료를 얻고자 하였다.

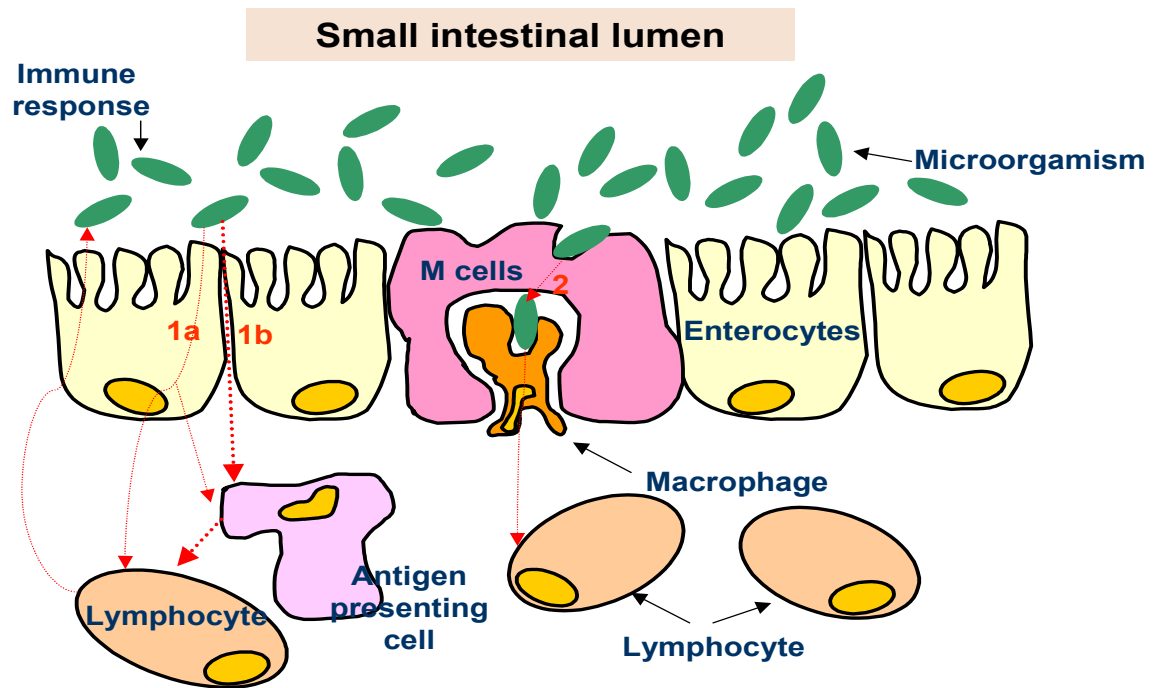


Figure 4-1. Possible ways of stimulation of the immune system by ingested probiotics.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 실험동물

본 실험에 면역활성 우수 균주 선별을 위한 공시 유산균주는 각 기관에서 분양받거나 경기대에서 보관 중인 균주 로써 Table 4-1에 제시한 바와 같다. 또한 *Lactobacillus brevis* FSB-1은 경기대학교 대학원 식품미생물학 실험실에서 김치로부터 분리 및 동정하여 보관 중인 균주로서, 본 연구 제 1 장에서 대장내 점착능이 가장 우수한 균주로 선별되었으며 면역 활성 측정에 사용되었다.

실험동물은 C₃H/HeN(자성, 7주령, (주)대한바이오링크사, 충북)과 ICR mouse(웅성, 6주령, (주)대한바이오링크사, 충북)를 사용하였으며, 24±1℃ 및 55%의 상대습도로 조절된 사육조내에서 24~48시간 동안 적응토록 하였다. 이때 사료(삼양사료, 인천)와 물을 자유급식시켰다.

나. 면역활성 우수균주의 선별

유산균을 MRS배지에서 37℃, 24시간 배양한 후 4℃, 3,000 rpm, 20분 동안 원심분리 하여 균체를 회수하고, 생리식염수(0.9% NaCl)용액으로 3회 세척한 후 증류수로 현탁하였다. 현탁 균체는 초음파 분쇄기(Ultra sonic processor, Sonics and Materials Inc. USA)로 세포벽을 파괴하여 4℃, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하고, 상등액(cytosol fraction)을 동결건조 하였으며, 일정 농도의 용액으로 제조한 후 항보체 활성을 측정하였다. 이중 활성이 높은 균주들을 최초 선별하여 이후의 실험에 사용하였다.

다. 균체성분의 분획물 조제

MRS 액체배지(Difco Co., USA) 300 mL에 최대 활성 균주로 선별된 *L. brevis* FSB-1의 전 배양액 1%를 접종한 후, 37℃에서 48시간 동안 혐기적으로 배양하였다.

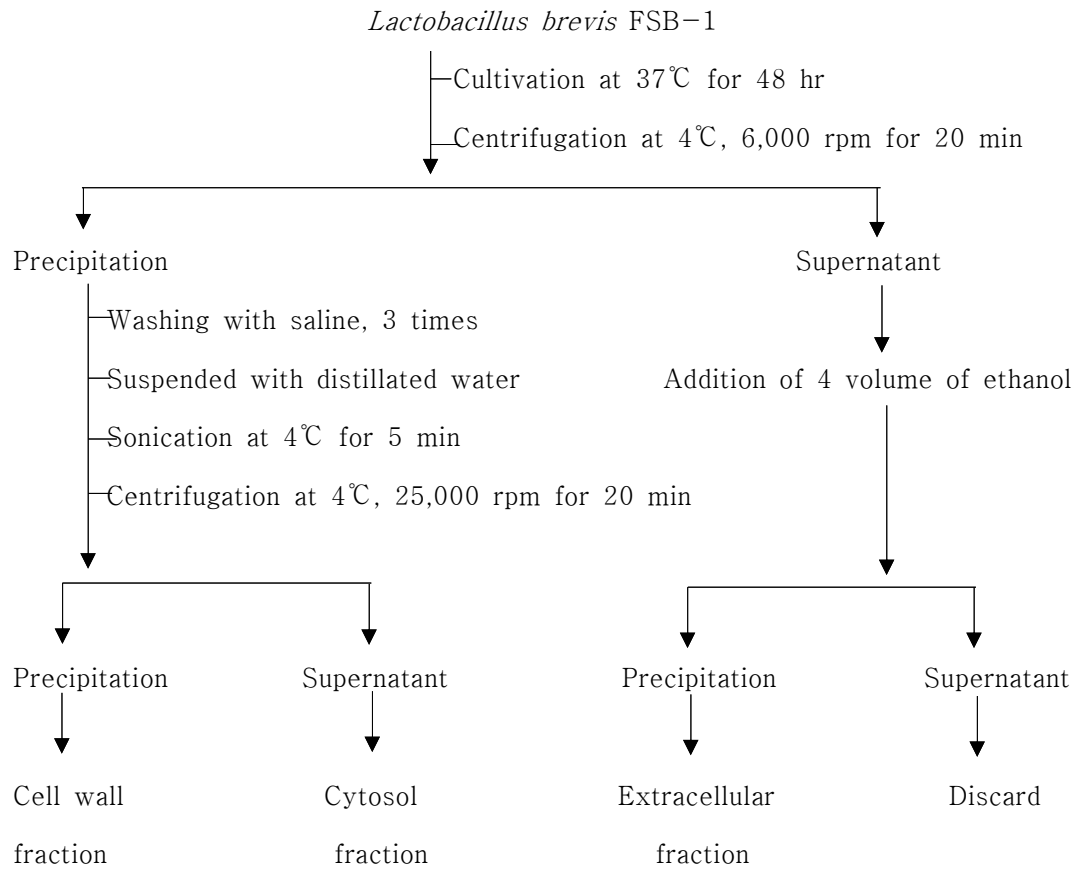


Figure 4-2. Preparation of cell wall, cytosol and extracellular fractions from *Lactobacillus brevis* FSB-1.

배양액 전체를 100℃에서 10분간 처리하여 균체를 사멸시킨 후, 4℃, 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 생리식염수로 3회 세척한 후 증류수에 현탁한 다음, 초음파 분쇄기(Ultrasonic processor, Sonics and Materials Inc., USA)를 이용하여 4℃에서 5분간 세포벽을 파쇄한 후, 6,000 rpm에서 원심분리하여 미파쇄 균체를 제거하였다. 상등액을 4℃, 25,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리하고, 각각을 세포질 획분(cytosol fraction)과 세포벽 획분(cell wall fraction)으로 하였다. 또한 배양상등액에 4배 부피의 에탄올(시약 1급)을 첨가하여 상온에서 하룻밤 동안 방치시킨 후, 원심분리하여 침전물을 회수하고 배양 상등액을 균체 외 획분(extracellular fraction)으로 하였다. 이렇게 얻어진 각 분획물을 동결 건조한 다음 보관하면서, 일정농도의 용액으로 조제한 후 활성 측정용으로 사용하였다(Fig. 4-2).

라. 장관면역 활성측정

장관면역 활성은 Hong 등(1998)의 방법에 의거하여 Peyer's patch 세포를 매개로한 골수세포 증식정도를 측정함으로써 평가되었다. 즉 C₃H/HeN mouse(자성, 7주령)를 경추탈구하여 치사시킨 후, 복부를 절개하여 소장을 적출하고 소장벽에 붙어 있는 Peyer's patch를 떼어낸 다음, 7% FBS(Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 RPMI 1640(Gibco BRL, USA) 배지(RPMI 1640-FBS)가 든 petri dish에 옮겼다. Patch 위에 멸균된 금속체(100 mesh)를 올려놓고 주사기의 고무 부분을 이용하여 조직을 파괴시킴으로서, Peyer's patch로부터 세포를 방출시켰다. 세포 현탁액을 멸균된 금속체(200 mesh)를 이용하여 재차 여과한 후 RPMI 1640-FBS 배지로 세척하였다. 세척 후 동일배지로 세포수를 2.0×10^6 cells/mL가 되도록 조절한 후, microtiter plate(Becton Dickinson Lab., USA)에 180 μ L씩 분주하고 각 시료를 20 μ L씩 분주한 다음, 37℃, 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다.

한편 골수세포액의 조제는 동일종의 마우스 대퇴부 뼈를 적출한 후, 주사기 바늘을

이용하여 RPMI 1640-FBS 배지를 빠 속으로 넣어 골수세포를 회수하였다. 골수세포를 위와 같이 여과 및 세척하고, 세포농도를 2.5×10^5 cells/mL로 조정하여 microtiter plate에 100 μ L씩 분주하였다. 그 후 Peyer's patch 세포와 시료를 반응시킨 배양상등액(간접자극) 또는 시료용액(직접자극) 50 μ L와 RPMI 1640-FBS 배지 50 μ L를 각각 plate에 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. 골수세포 증식 활성 측정은 Alamar Blue™ assay법(Page 등, 1993)이 이용되었다. 즉 골수세포의 배양종료 18시간 전에 Alamar Blue™ 용액(Biosource Co., USA) 20 μ L를 첨가하여 반응시킨 후에, 골수세포의 증식도를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 형광분석기(Luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer Ltd., UK)로 측정하였다. 골수세포 증식활성화 정도는 시료대신 생리 식염수를 사용한 대조구와 시료 처리구의 골수세포의 증식도를 비교하여 측정하였다.

마. 마크로파지 활성화능 측정

마크로파지 활성화능 측정은 Suzuki 등(1990)의 방법을 실험실 여건에 맞게 다소 변형하여 사용되었다. 즉, ICR mouse(웅성, 6주령)에 5% thioglycollate(TG, Sigma Chemical Co., USA) 배지 2 mL를 복강에 주사하고, 3일 후 유도된 복강내 마크로파지를 RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 회수한 다음 2~3회 세척하였다. 회수한 마크로파지를 1.0×10^6 cells/mL가 되도록 동일한 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후, microtiter plate에 200 μ L를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양함으로써 세포를 well 표면에 부착시켰다. 부착되지 않은 여분의 마크로파지를 RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 세척하고, 동일한 배지 180 μ L를 분주하였다. 여기에 각 농도별 시료 20 μ L를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액은 상등액을 제거한 후 RPMI 1640-FBS 배지로 세척하였으며, 각 well에 0.1% Triton X-100(Sigma Chemical Co., USA)을 25 μ L씩 분주하여 세포막을 용해시켰다. 마크로파지로부터 유리된 lysosomal phosphatase의 활성측정을 위해, 기질인

p-NPP(p-Nitrophenylphosphate, 1 mg/mL, 0.025 M citrate buffer, pH 5.0, Sigma Chemical Co., USA) 200 μ L를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 0.2 M borate buffer(pH 9.8) 50 μ L를 넣어 발색시킨 후, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. Splenocyte mitogen 활성화능 측정

ICR mouse(웅성, 6주령)를 치사시킨 후 비장을 적출하여 RPMI 1640-FBS 배지가 들어 있는 petri dish에 담근 후, 주사기의 고무마개와 화염멸균한 100 및 200 mesh 금속망을 이용하여 마쇄 및 여과를 실시하여 비장세포액을 얻었다. 이 세포액을 저장액 용혈법(0.2% NaCl 용액, 3 mL로 약 20초간 처리)을 이용하여 적혈구를 제거한 다음, RPMI 1640-FBS 배지로 2~3회 세척한 후, 세포수가 5.0×10^6 cells/mL가 되도록 조절하였다. 이 세포액을 microtiter plate에 90 μ L씩 분주하고 각 시료를 10 μ L씩 첨가하여 37°C, CO₂ incubator에서 3일 동안 배양하였다. 비장 림프구의 증식정도는 MTT법(Zheng 등, 2002)을 이용하여 측정되었다. 즉, 각 well의 세포배양액에 발색시약 MTT 용액(Methylthiazoletetrazolium, Sigma Chemical Co., USA) 50 μ L를 첨가하여 CO₂ incubator에서 5시간 동안 배양하였다. 형성된 MTT-formazan 침전을 회수한 후, 0.04 N HCl/isopropanol(시약 1급) 100 μ L를 이용하여 재차 용해시킨 다음, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 보체계 활성화능 측정

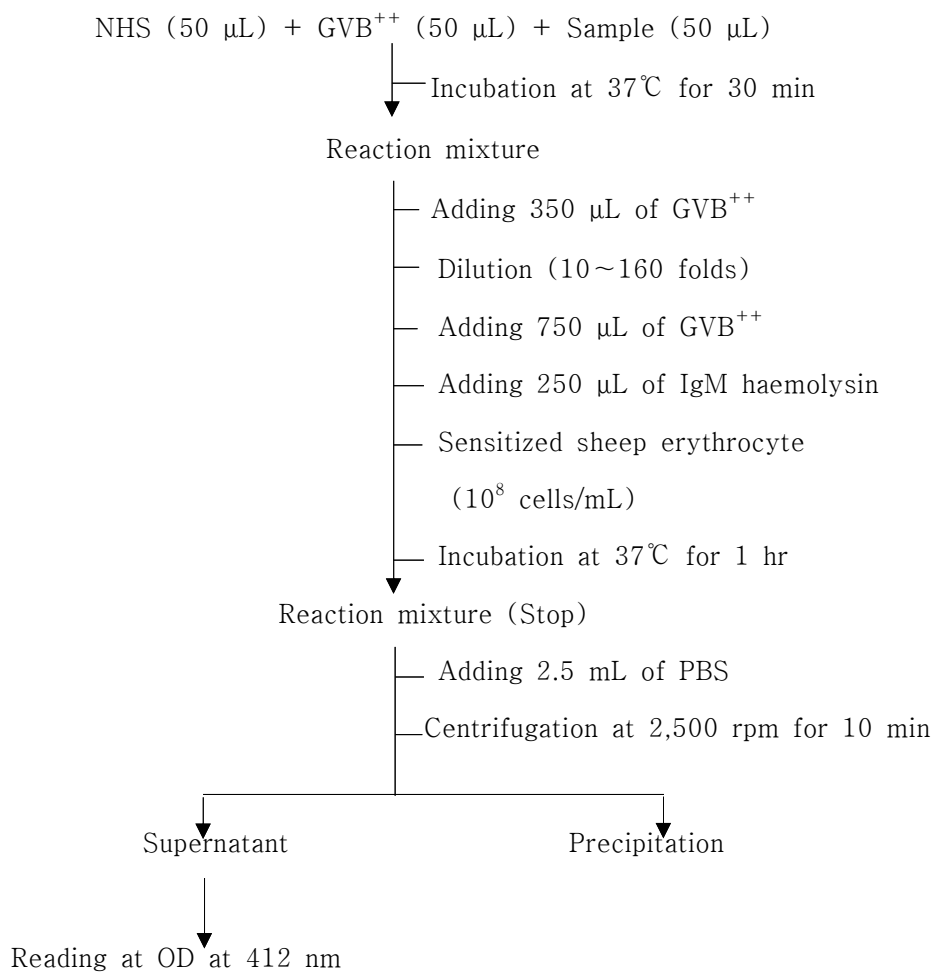
1) 정상 혈청(Normal human serum, NHS)의 조제

실험실의 건강한 성인을 대상으로 채혈하여 실온에서 30분씩 방치한 다음 혈액을 응고시킨 후 4°C, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈

청을 1 mL씩 나누어 -70°C 냉동고에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 보체계 활성화능 측정

보체계 활성화능은 항보체 활성으로 측정되었다. 항보체 활성은 Mayer법(Kabat과 Mayer, 1971)에 근거하여, 시료에 의해 보체를 활성화한 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거를 둔 complement fixation test를 이용하여 측정되었다. 즉, 정상인의 혈청과 $500\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{++}$, $2\ \text{mM}\ \text{Mg}^{++}$ 이 함유된 gelatin veronal buffered saline(GVB⁺⁺ buffer, pH 7.4, (주)일본동결건조연구소) 및 시료를 각각 50 μL 씩 혼합하여 37°C 에서 30분간 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB⁺⁺ buffer를 350 μL 씩 첨가하고 이를 10~160배까지 연속하여 희석하였다. 여기에 GVB⁺⁺ buffer 750 μL 와 양혈(Komed, Co., Ltd., Korea)과 hemolysin(Sigma Chemical Co., USA)으로 제조된 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA Cell, 1×10^8 cells/mL)를 각각 250 μL 씩 가하여 37°C 에서 1시간 동안 반응시키고 4°C 의 phosphate buffered saline(PBS) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C , 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻은 다음, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체 활성은 50% 총보체용혈에 대한 저지율(ITCH₅₀, inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타내었다(Fig. 4-3, 4-4).



$$\text{ITCH}_{50} = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

Figure 4-3. Schematic diagram of the assay for the determination of anti-complementary activity.

NHS, normal human serum; GVB⁺⁺, gelatin veronal buffered saline; PBS, phosphated buffered saline;

TCH₅₀, 50% total complement hemolysis ITCH₅₀, inhibition of 50% total complement hemolysis.

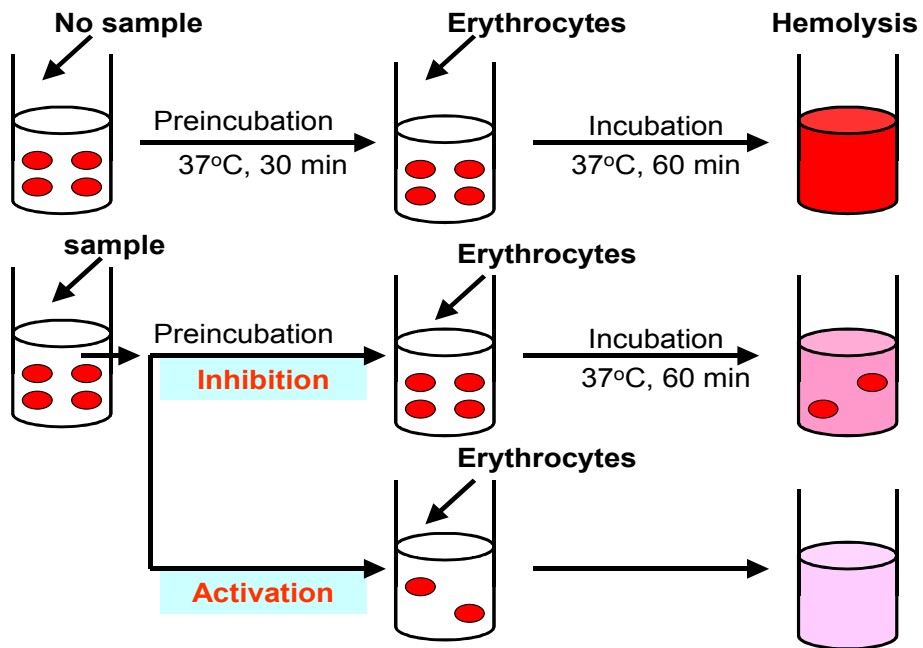


Figure 4-4. Assay procedure of complement system activation.

아. 보체계 활성화 경로 검토

1) 보체계 활성화 경로

보체계 활성화 경로를 조사하기 위하여 GVB^{++} buffer(classical 및 alternative pathway 경우), GVB^{++} 에서 Ca^{++} 만을 선택하여 제거하기 위해 2 mM $MgCl_2$ 및 10 mM EGTA가 함유된 Mg^{++} -EGTA- GVB^{--} buffer(alternative pathway 경우), 그리고 금속이온을 모두 제거하기 위하여 10 mM EDTA가 함유된 EDTA- GVB^{--} buffer에 시료 및 정상인의 혈청을 각각 첨가하고, 상기 방법과 같이 총보체용혈의 저지율을 측정함으로써 시료의 보체계 활성화 경로를 비교 및 검토하였다(Fig. 4-5).

2) 2차원 면역 전기영동(Crossed Immunoelectrophoresis)

GVB^{++} buffer(classical 및 alternative pathway 경우), Mg^{++} -EGTA- GVB^{--} buffer(alternative pathway 경우), EDTA- GVB^{--} buffer(lectin pathway 경우)에 각각 정상인의 혈청과 시료를 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, pH 8.6의 barbital buffer(ionic strength, 0.025)를 사용하여 조제한 1% agarose gel상에서 1차 전기영동을 실시하였다(3 mA/cm). 이후 0.5%의 anti-human C3 serum(Sigma Chemical Co., USA)이 함유된 1% agarose gel상에서 약 15시간 동안 2차 전기영동을 실시하였다(1 mA/cm). 전개된 gel은 bromophenol blue(Sigma Chemical Co., USA)로 염색시켜 항체와 반응하여 형성된 침강선을 관찰함으로써, C3의 분해산물을 확인하였다(Shimura 등, 1983).

자. *In vivo* 보체계 활성화능 실험

1) 활성 물질의 *in vivo* 항보체 활성

활성 물질의 *in vivo* 보체계 활성화능을 측정하기 위해 guinea pig (150 - 200 g)를 이용, 무투여군과 투여군으로 나누어 실험하였다. 멸균 생리식염수에 시료를 용해시킨 후, 실험 당일 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg 씩 각각 복강내에 주사하였으며 대조

군은 생리식염수만을 투여하였다. 보체계 활성화능을 측정하기 위해 시료 투여 후 각각 2, 4, 8, 12, 24시간 쯤에 hematocrit capillary pipette을 이용 guinea pig의 안와 정맥으로부터 채혈되었다. 각각 시간별로 채취한 혈액은 상온에서 30분이상 방치하여 응고시키고, 원심분리를 실시하여 혈청을 얻었으며 이를 대상으로 총보체 용혈 (50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)을 측정하였다.

2) Complement C3의 분해산물의 결합활성 측정

5주령의 ICR mouse에 세포수를 2×10^6 cell/ml로 조정된 Sarcoma-180을 복강에 이식하고, 생리 식염수에 녹인 활성시료를 처치 1일째 부터 3일간 , 20 mg/ml 및 10 mg/mL 씩 1일 1회 복강 주사하였다. 실험 6일째 치사하여 복강 macrophage를 회수하고 세척 후, 2×10^6 cell/ml로 조정하여 macrophage 부유액을 조제하였다. 동 부유액은 살 균 petridish에 놓여진 현미경 검경용 cover glass에 0.2 ml씩 분주하고, 5% CO₂ incubator에서 37°C, 30 min간 방치하여 glass 표면에 macrophage를 부착 시켰다. Cover glass에 부착된 cell은 풍건하고 95% ethanol로 고정한 후, anti-mouse C3 rabbit IgG를 처리하여 37°C, 60 min간 재배양하였다. 이후 각 Cover glass는 PBS로 수차례 세척한 후, goat에서 유도된 FITC-anti-rabbit IgG (Miles Yeda Ltd., IL, USA)를 처리하고 상온에서 1시간 방치하였다. 이 후 수차례 세척하고 현미경을 이용 검경하였다. 각 cover glass에 결합된 200개의 세포 중 형광성을 띄는 C3-positive cell의 수를 세어 활성 cell로 표시하였다.

차. 통계 처리

실험결과는 평균값±SD로 나타내었고, student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

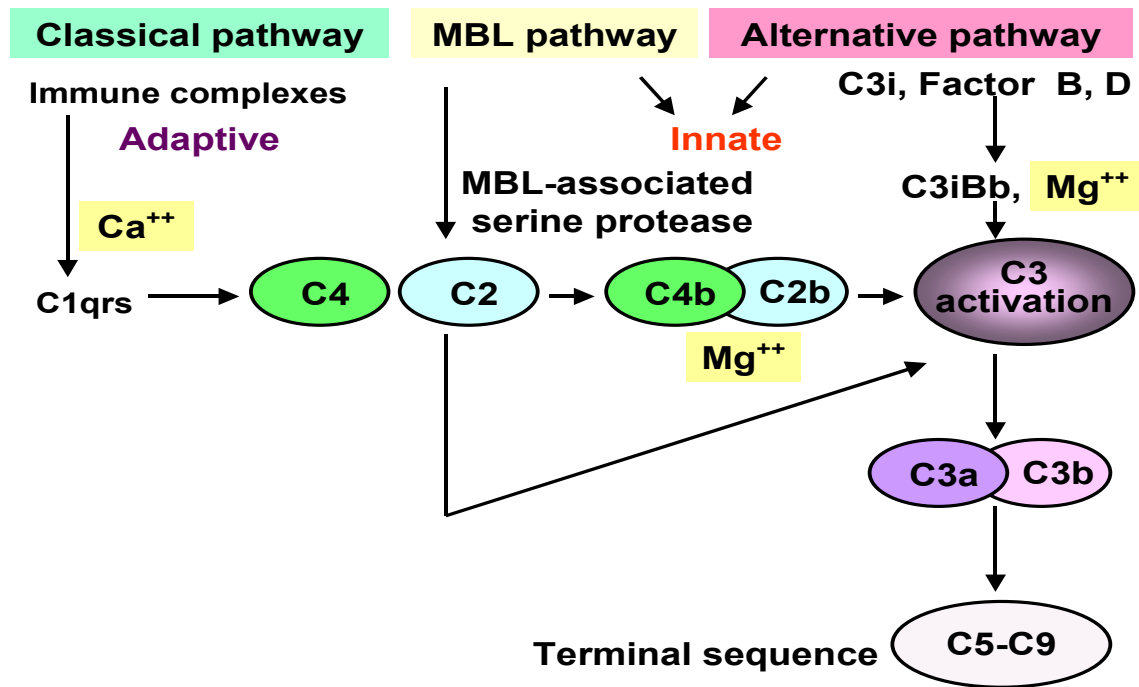


Figure 4-5. Overview of the complement system by C3 activation method.

3. 결과 및 고찰

가. 면역 활성 우수균주의 선별

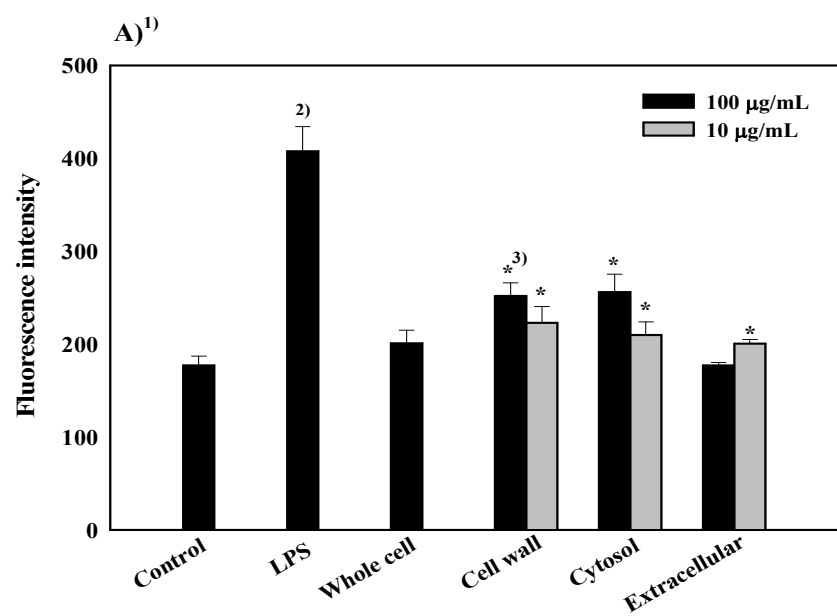
유산균체 및 대사산물이 갖는 면역활성능을 검토하기 위하여 Table 4-1에 제시된 바와 같은 각종 유산균들을 대상으로 보체계 활성화 정도를 검토하였다. 각 유산균들의 균체를 회수한 후, 5분간 초음파 처리하여 세포벽을 파쇄하고 상등액을 동결건조하여 유산균 세포질 획분을 각각 조제하였다. 건조된 시료들은 각각 1,000 µg/mL 농도로 조제하여 Mayer법에 의해 보체계 활성화능을 측정한 결과, 유산균주는 대체로 $ITCH_{50}$ 40% 이상의 활성을 보였다. 이들의 활성은 동일 농도에서 *Latobacillus brevis* FSB-1 (100%)과 *L. plantarum* FSB-2(97%)가 가장 높은 경향을 보여 주었으며, 그 외 활성의 순서는 *L. delbrueckii* KCTC 1047 (90%), *L. plantarum* ATCC 14917 (79%), *L. casei* KCTC 3109 (76%), *L. acidophilus* IFO 3025 (70%)의 순이었다. 이들 1차 선별한 균주들은 재차 배양하여, 활성을 반복 검토한 결과, 본 실험실에서 김치로 부터 분리한 *L. plantarum* FSB-2균주와 *L. brevis* FSB-1의 경우 지속적으로 양호한 활성을 보였으므로 본 균주들을 면역활성 최종 균주로 최종 선별하고 이후의 실험에 사용하였다. 특히 *L. brevis* FSB-1은 제 1 항에서 장내 점착성 우수 균주로 선별된 균이어서 동 균주의 경우 장내 점착성 및 면역성이 공히 높은 균주로 판단되었으며 따라서 이후의 실험에 주 균주로 사용되었다. *L. plantarum* FSB-2와 *L. brevis* FSB-1은 김치 발효에 관여하는 주요세균으로 전체 발효과정 중 주로 후숙기나 과숙기에 높은 빈도로 발견되고, 동종 유산발효균으로 김치 고온 발효 중 높은 젖산 생성능을 보여 김치를 빨리 익게 하는 산패균⁽²⁶⁾으로 취급되고 있으나, 최근 유산균의 기능성 연구 결과 항돌연변이 효과가 우수하고, *in vivo* 항암활성 및 면역증강 효과가 높은 것으로 보고되고 있어 새롭게 관심의 대상이 되고 있는 유산균이다. 본 실험 결과에서도, 이들이 높은 항보체 활성을 보이고 있는 것은 최근 보고되고 있는 이러한 실험결과와 비교할 때 상당히 흥미로운 부분이라 하겠다.

Table 4-1. Screening of lactic acid bacteria with immunopotentiating activity (anti-complementary activity)

Strain name of lactic acid bacteria	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %, mean±SD)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3025	70.1 ±4.2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	58.4±3.8
<i>Lactobacillus amylophilus</i> KFRI 238	65.9±6.2
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC 3109	76.3 ±4.2
<i>Lactobacillus confusus</i> KFRI 227	42.3±3.9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KCTC 1047	90.0 ±5.6
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	52.6±8.2
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 8018	52.8±4.3
<i>Lactobacillus helveticus</i>	40.8±3.2
<i>Lactobacillus hilgardii</i> KFRI 229	30.2±6.4
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCTC 3120	32.6±7.2
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM 35472	21.6±3.5
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099	65.2±3.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	63.7±4.6
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3105	57.2±5.6
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108	50.9±5.4
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	79.2 ±3.2
<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1	100.0 ±3.4
<i>Lactobacillus plantarum</i> FSB-2	97.4 ±4.8
ML4	36.5±5.2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	42.3±3.4
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 14485	53.8±6.1
<i>Lactococcus garvieae</i> KCTC 3772	24.5±7.2
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 7962	68.2±2.4
<i>Enterococcus casseliflavus</i> KCTC 3079	48.9±8.1
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011	40.1±5.6
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KFRI 833	39.9±2.4

나. 골수세포 증식에 의한 장관면역 활성화

면역 활성화 우수균주 선별과정에서 가장 높은 활성을 보였던 *L. brevis* FSB-1을 대상으로 분리한 전균체, 세포벽, 세포질 및 균체 외 획분을 대상으로 Peyer's patch 세포를 매개로한 골수세포의 증식도를 측정함으로써 장관면역 활성을 검토하였다. Fig. 4-6-A)에 나타난 바와 같이, 모든 획분에서 무첨가 대조군에 비해 상대적으로 높은 활성을 보였으며, 특히 세포벽과 세포질 획분에서 약 30%이상 증가된 활성경향을 나타내었다. 그러나 이들 활성은 양성 대조군인 LPS보다는 전반적으로 낮은 활성이었다. 골수는 1차 림프조직계로서 미성숙 림프구를 포함하여 순환계내에 있는 모든 혈구세포들이 동일한 전구세포에서 생성 및 분화되는 부위로서, 이들 세포들이 전신을 순환하며 각종 생체반응을 수행하므로, 골수세포 증식은 면역계에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있다고 할 수 있다(Benedetti 등, 1995; Janeway 등, 1994; Kim 등, 2000). 그러나 본 실험에 사용된 활성 측정법의 특성상, Peyer's patch 배양 상등액으로 골수세포의 증식을 유도하므로, Peyer's patch 배양 상등액에 존재했던 시료가 직접 골수세포를 증식시킬 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서는 골수세포의 증식활성이 시료가 직접 작용하여 나타난 결과(직접 자극)인지 또는 소장내에 존재하는 Peyer's patch 세포의 활성화에 기인한 간접적인 골수세포 증식활성인지를 확인하고자 하였다. Fig. 4-6-B)에 나타난 바와 같이, Peyer's patch 세포를 매개로 한 활성 [Fig. 4-6-A)]보다 직접 골수세포를 자극한 경우가 낮은 결과를 보였으며, 특히 모든 시료의 활성은 무첨가 대조군보다 낮은 경향을 나타냈다. 이러한 사실로부터 *L. brevis* FSB-1의 각 균체성분이 직접 골수세포증식에 관여하는 것이 아니라, Peyer's patch의 면역세포들을 활성화시킴으로서 골수세포 증식을 유발시키는 특정물질을 생성한다는 사실을 추론할 수 있었다. 이와 유사한 결과로서 Yasui 등(1991)은 유산균의 일종인 *Bifidobacterium breve*의 세포벽 획분을 첨가한 균에서 높은 Peyer's patch 세포의 증식이 일어났다고 보고하였으며, Shin 등(2004)은 *Bifidobacterium bifidum* SL 21의 세포벽 성분이 Peyer's patch의 림프구를 활성화시켰다고 보고하였다.



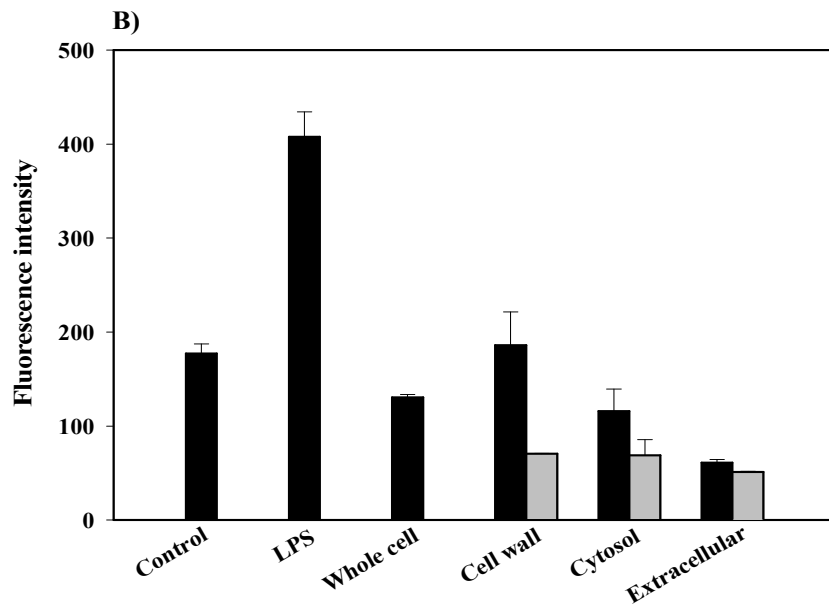


Figure 4–6. Comparison of A) Peyer's patch–mediated effect and B) direct effect of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB–1 on bone marrow cell proliferation.

¹⁾A) After Peyer's patch cells incubated with the sample, the resulting supernatant incubated with bone marrow cells, B) The sample directly incubated with bone marrow cells without reaction with Peyer's patch cells. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾*, $p < 0.05$; Significant difference between control (saline only) and sample.

다. 마크로파지 활성화능

마크로파지는 체내로 이물질(감염성 미생물 등)이 침입하였을 때 이들을 초기에 비특이적으로 제거시키는 탐식세포로서, 세포 매개성 면역에 중요한 역할을 담당하는 면역세포로 알려져 있으며, 염증반응(inflammation)이나 종양치사작용(tumoricidal effect)등 다양한 기능을 수행하고 있다고 보고되고 있다(Haza 등, 2003). 또한 마크로파지는 항원을 탐식 및 분해(processing)하여 그 일부를 자신의 세포 표면에 부착 및 제시(presentation)함으로서, T 림프구에 의한 면역반응을 유도하여 후천성 면역계가 작동할 수 있도록 해 주는 effector cell로서 작동한다(Benjamini과 Lesrowitz, 1996; Kim 등, 2000). *L. brevis* FSB-1의 균체 분획물을 대상으로 마크로파지 활성화능을 검토한 결과, 전균체, 세포벽 및 세포질 획분을 1과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 대조군보다 높은 활성의 증가가 관찰되었다(Fig. 4-7). 이 결과는 강력한 면역 조절인자로 알려진 LPS의 활성화에는 미치지 못하는 결과이지만, 본 균주의 다양한 균체 성분이 마크로파지를 자극하여 활성화시킴을 알 수 있었다. 한편 균체 외 획분은 마크로파지 활성화에 거의 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 본 실험결과와는 다르지만 Kitazawa 등(2000)과 Uemura 등(2003)은 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1의 경우, 이들이 생산하는 균체 외 다당이 마크로파지의 기능을 향상시키고, 특히 이들 균주에 의해 생산된 phosphopolysaccharide가 활성의 본체이며, 이들 중 phosphate group이 마크로파지 기능 향상에 중요한 역할을 담당한다고 보고한 바 있다.

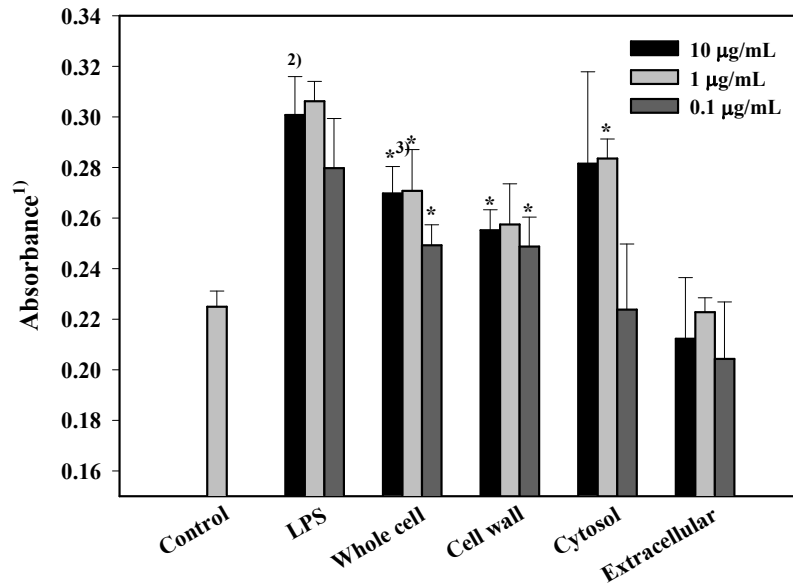


Figure 4-7. Macrophage-stimulating activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

TG-elicited macrophages were cultured with each cellular component and control. ¹⁾The macrophage-stimulating activity was measured by lysosomal phosphatase activity, and expressed as mean±SD of quadruplicate cultures. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾*, $p < 0.05$; Significant difference between control (saline only) and sample.

라. Splenocyte mitogen 활성화능

비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하며, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극을 받은 후에 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장내 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다(Kang, 2002). *L. brevis* FBS-1의 각 균체성분에 대한 splenocyte mitogen 활성화능을 측정한 결과, 전균체, 세포벽 및 세포질 획분에서 무첨가 대조군에 비해 약 150~250%의 높은 활성 증가가 관찰되었다. 특히 이들 증가된 활성은 시료농도에 따라 활성이 높아지는 농도 의존적인 경향을 보여주었다(Fig. 4-8). 한편 균체 외 획분의 경우, 마크로파지 활성화 경향과 유사하게 mitogen 활성화능도 거의 없는 것으로 나타났다.

본 실험과는 상반된 결과로 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*의 경우, 이들이 생산한 균체 외 산성 다당인 phosphopolysaccharide가 비장 림프구의 증식을 유도하고, phosphopolysaccharide가 잠재적인 B-cell dependent mitogen으로 작용하며, 그중 phosphate기가 중요한 역할을 담당한다는 결과가 발표된 바도 있다(Kitazawa 등, 1998).

한편 Wright 등(1998)은 *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103을 mouse에 viable probiotics로서 투여한 결과, T-와 B-cell mitogenesis를 향상시킨다고 보고한 바 있으며, Kitazawa 등(2003)은 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6은 splenic B cells를 유도할 수 있는 oligonucleotide를 가지고 있어서 비장을 활성화시킬 수 있다고 보고하였다. 이 결과는 향후 *L. brevis* FBS-1의 면역증진 활성물질 규명에 대한 연구의 필요성을 제기하였다.

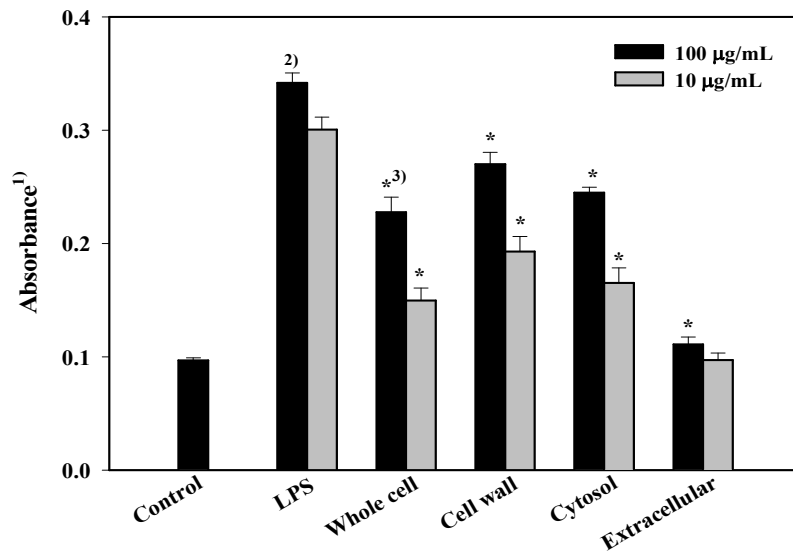


Figure 4–8. Splenocyte mitogenic activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB–1.

Splenocytes were cultured with each cellular component and control. ¹⁾Splenocyte mitogenic activity was measured by MTT assay as described in 'Materials and Methods' and expressed as mean±SD of quadruplicate cultures. ²⁾LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. ³⁾*, $p < 0.05$; Significant difference between control (saline only) and sample.

마. 보체계 활성화능

L. brevis FSB-1의 각 균체성분에 대한 보체계 활성화능을 측정한 결과, 균체 외 획분을 제외한 각 획분의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 ITCH_{50} , 100%의 매우 우수한 보체계 활성화능을 보였다(Table 4-2). 이는 보체계의 강력한 활성인자로 알려져 있으며, 본 실험에서 양성 대조군으로 사용된 구름버섯(*Coliolum versicolor*, 운지) 기원의 Polysaccharide-K(PSK)보다도 높은 활성이었다. 특히 세포질 획분의 경우, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서도 약 69%의 항보체 활성화능을 나타냄으로서 가장 높은 보체계 활성화능을 보였다. 따라서 이들 세포질 획분에 대하여 농도 증가에 따른 보체계 활성을 재차 측정한 결과, 보체계 활성이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 세포질 획분 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 100%의 항보체 활성화능을 보였으며, 양성 대조군인 PSK 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 세포질 획분 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 비슷한 항보체 활성화능을 나타냄으로서, *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분은 보체계의 강력한 활성인자임을 재차 확인할 수 있었다.

Table 4-2. Anti-complementary activities of the cellular components of *Lactobacillus brevis* FSB-1

Samples	Concentration (μg/mL)	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Samples	Concentration (μg/mL)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
Whole cell Fr.	1,000	100.0±0.0 ³⁾		1,000	100.0±0.0
	100	0.1±2.2			500
Cell wall Fr.	1,000	100.0±0.0	Cytosol Fr.		100
	100	11.9±4.0			50
Cytosol Fr.	1,000	100.0±0.0			10
	100	69.1±4.0			1,000
Extracellular Fr.	1,000	61.9±3.5	PSK		500
	100	28.1±1.7			

¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. ³⁾The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

바. 보체계 활성화 경로

보체계는 C1~C9의 활성화 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며, 외부 감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(Kwon과 Sung, 1997). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade 반응에 의하여 보체 단백질이 활성화 분자로 분해되고, 이들이 침입인자의 표면에 부착되어, 최종적으로 membrane attack complex(MAC)를 형성하여, 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다(Jung 등, 2002). 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 마크로파지와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(Jung 등, 2002). 보체계 활성화 경로는 보체의 중요성분인 C3의 활성화 방법에 따라 구분되어 진다(Kwon과 Sung, 1997). 즉 classical pathway는 면역복합체 존재 하에 C1q성분이 항체의 CH₂(IgG)나 CH₄(IgM) 영역에 결합함으로써 개시되며, 이후에 C1r, C1s들이 Ca⁺⁺존재 하에 C1qrs 복합체를 형성하고, C4, C2와 반응하여 C4a와 C2a를 유리시키고, Mg⁺⁺존재 하에 C3 convertase 활성을 갖는 C4b2b를 형성한다. Alternative pathway는 면역복합체의 관여 없이 보체가 활성화되는 경로로, 혈중 미량 생성되는 C3i에 factor B와 D가 관여하며, Mg⁺⁺존재 하에 C3 convertase(C3iBb)가 형성된다(Kim 등, 2000). 또한 lectin pathway는 mannose binding lectin(MBL), MBL-associated serine protease의 작용으로 C4와 C2를 비특이적으로 활성화 시키고 C3를 활성화한다. 따라서 활성화에 관여하는 금속이온의 존재여부에 따라 반응계를 조절하면 보체계 활성화 경로를 예측할 수 있게 된다. 보체계에 대해 높은 활성을 나타내었던 세포질 획분을 대상으로, GVB⁺⁺ 기본 반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB⁻⁻ 반응계 및 Ca⁺⁺이온만을 선택적으로 제거한 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ 반응계로 나눈 다음, 농도별로 항보체 활성화(ITCH₅₀)을 비교, 측정하였다.

Fig. 4-9에서 보는 바와 같이 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분의 경우, Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺ 이 모두 존재하는 기본 반응계에서의 활성과 비교할 때, 2가 금속이 모두 제거

된 반응계에서는 대조군에 비해 거의 완전한 활성의 감소를 관찰할 수 있었으나, Mg^{++} 이온만 존재하는 반응계에서는 활성이 상당량 유지(약 20~40% 수준)되는 결과를 보였다. 이러한 사실은 *L. brevis* FSB-1의 세포질 획분이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway의 양 경로를 모두 활성화시킬 수 있음을 의미하는 것으로, 특히 alternative pathway는 항체에 의한 면역반응이 일어나기 전에 활성화되기 때문에 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 1차적 방어기작이므로 그 의미가 크다고 할 수 있다(Whaley, 1986).

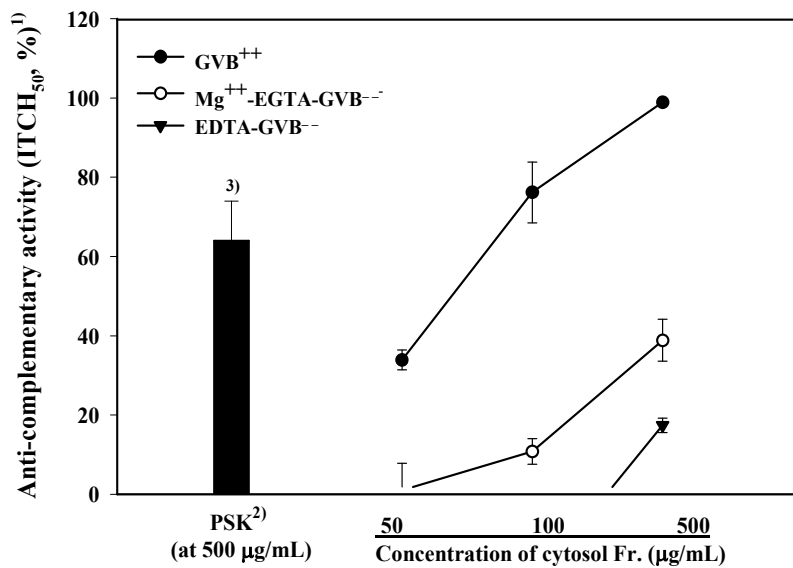


Figure 4-9. Effect of calcium and magnesium ions on anti-complementary activity of cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. ³⁾The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

사. 2차원 면역 전기영동에 의한 C3산물의 동정

Mayer법(Kabat과 Mayer, 1971)에 의한 항보체 활성화측정법은 1차 반응단계에서 시료성분의 보체계 활성화에 의한 보체의 소모정도를 측정하는 방법으로, 만일 시료 중 보체의 활성화가 아닌 특정한 저해성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 보일 수 있는 문제점을 갖고 있다(Kim 등, 2002). 따라서 *L. brevis* FSB-1의 세포질 핵분의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기인한 것인지, 혹은 시료의 보체 저해활성에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 조사하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C3a와 C3b로 분해되므로(Shin, 1999; Kang과 Shin, 2003), 시료와 정상인 혈청을 반응시킨 후 1차 전기영동을 실시하고, anti-human C3를 이용하여 2차 면역 전기영동을 수행함으로써 C3 분해산물을 동정하고자 하였다. Fig. 4-10에 나타난 바와 같이, 시료의 첨가 없이 정상인의 혈청만을 반응시킨 후 면역 전기영동한 결과 C3의 활성화가 이루어지지 않아 단일 침강선(precipitation line)이 나타나는 반면(Fig. 4-10-A), *L. brevis* FSB-1의 세포질 핵분과 혈청을 기본 반응계에서 반응시킨 경우는 C3의 활성화가 일어나 두개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4-10-B). 따라서 본 균주의 세포질 핵분의 항보체 활성은 보체계의 저해가 아닌 직접 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다.

L. brevis FSB-1의 세포질 핵분을 Mg^{++} -EGTA-GVB $^{--}$ 및 EDTA-GVB $^{--}$ 반응계에서 반응시킨 후 그 분해 산물을 관찰한 결과는 Fig. 4-10-C 및 Fig. 4-10-D항에 나타난 바와 같다. 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB $^{--}$ 반응계에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선이 관찰된 반면, Ca^{++} 이온을 선택적으로 제거한 Mg^{++} -EGTA-GVB $^{--}$ 반응계에서는 2개의 침강선이 관찰되었다. 따라서 *L. brevis* FSB-1의 세포질 핵분은 보체계의 classical pathway와 alternative pathway의 두 경로를 모두 활성화시킴을 재차 확인할 수 있었다.

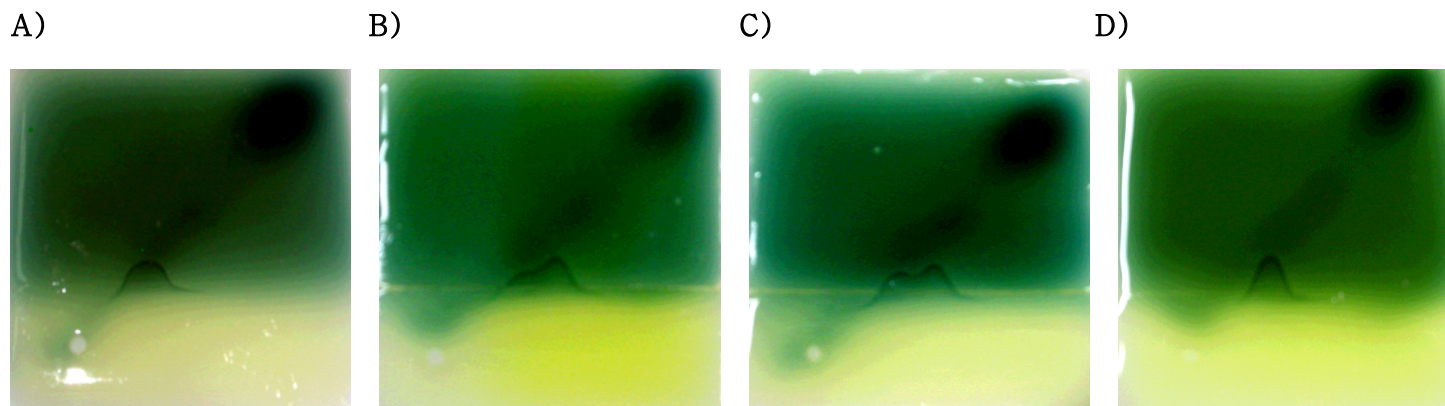


Figure 4-10. Crossed immunoelectrophoretic patterns of C3 converted by cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1.

Normal human serum was incubated without (A) or with the samples in GVB^{++} (B), Mg^{++} -EGTA- GVB^{--} (C) and EDTA- GVB^{--} (D) at 37°C for 30 min. The sera were then subjected to immunoelectrophoresis using anti-human C3 antibody to locate C3 cleavage products. The anode is to the left.

아. 보체계 활성화능의 *in vivo* 실험

1) *L. brevis* FSB-1의 세포성분의 *in vivo* 투여가 체내 complement 활성화에 미치는 영향

L. brevis FSB-1를 배양하여 균체를 파쇄한 후, 상등액을 동결건조한 활성시료는 생리식염수에 용해시킨 후, 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg, 0 mg/kg씩 각각 복강내에 주사하고, 시료 투여 후 각각 2, 4, 8, 12, 24시간 췌에 채혈하여 혈청을 대상으로 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)을 측정하였다. Fig. 4-11에 나타난 바와 같이 고농도(50 mg/kg) 투여군에서는 무투여 대조군에 비하여 보체계의 급격한 감소가 관찰되었다. 보체가는 초기 급격한 감소를 보이다가, 투여 4시간 이후를 경계로 회복되는 양상을 보여주었다. 대조군의 경우는 절대값으로 비교할 때 보체계의 감소가 있는 것으로 인정 되었지만 이는 오차 범위내로 판단되었다. 한편 저농도(25 mg/kg) 투여군에서도 비슷한 양상을 보였으며, 초기 급격한 감소를 보이다가 회복되는 특성은 고농도 투여군과 유사하였다. 이러한 결과는 보체의 활성화에 의한 것으로 이들 *L. brevis* FSB-1 유래 활성성분이 체내 보체계를 직접 활성화 할 수 있음을 시사하는 것이다. 특히 보체계가 활성화 되면 면역계 전반의 활성화도 유도한다고 보고되어 있으므로 상기 결과는 큰 의미가 있다고 사료된다.

2) Complement C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 *L. brevis* FSB-1의 세포성분의 효과

L. brevis FSB-1의 세포성분의 복강 내 투여가 C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 영향을 검토하기 위하여 5주령의 ICR mouse에 Sarcoma-180을 복강에 이식하고, 시료를 20 mg/ml 및 10 mg/ml 씩 1일 1회 3일간 투여하여, 복강 내 macrophage 중 C3-positive 형광세포의 변화를 측정하였다. Table 4-3에 제시된 바와 같이 시료 최초 투여 5일 후, 회수된 macrophage 중 complement C3의 분해산물

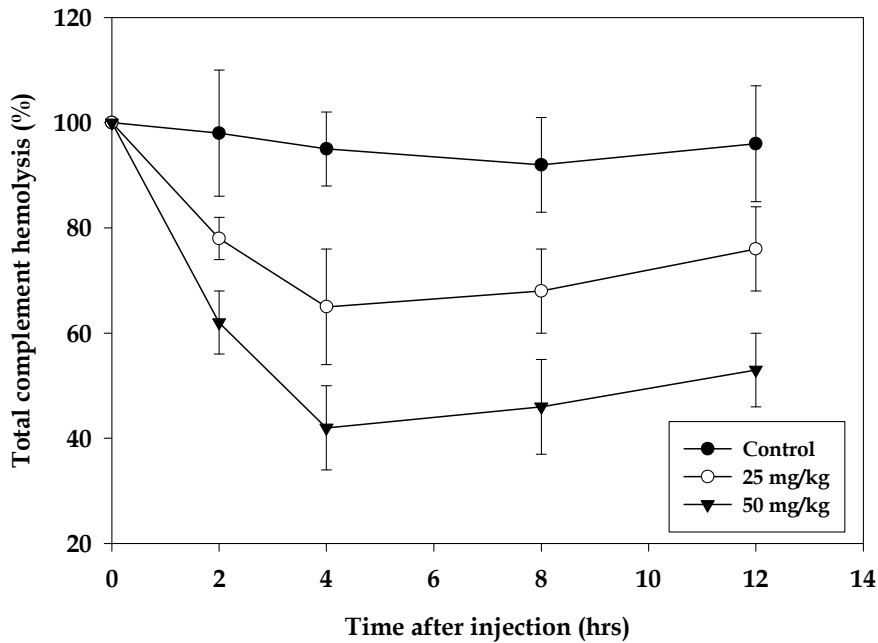


Figure 4-11. Effect of by cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1 on complement *in vivo*.

Sample or saline was injected i.p. into guinea pigs and blood for complement assay was drawn from orbital sinus. Each value represents the mean of three animals.

이 결합되어 있어 C3-positive한 형광성 세포는 무투여 대조군이 7.8%인데 반하여 10 mg/kg 투여군에서는 32.6%, 20 mg 투여군에서는 48.9%를 나타냄으로써 급격한 증가를 보였으며 이들은 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타냈다. 이러한 결과는 *L. brevis* FSB-1 유래 활성성분이 complement를 활성화하여 생성된 부산물(C3b)에 의해

macrophage를 활성화할 수 있으며, 특히 활성화된 macrophage에 의해 항암활성까지도 기대할 수 있음을 시사하는 내용으로 흥미로운 결과라 하겠다.

Mouse 복강 내 macrophage의 세포표면에는 complement C3의 분해산물과 특이적으로 반응하는 C3b receptor가 존재하고, 이들의 결합이 이루어질 경우 macrophage는 표적세포의 인식이 가능해 진다고 알려져 있다. 따라서 C3의 활성화 산물인 C3b는 C3b receptor를 경유하여 면역응답에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고되어 있다. GS-1의 복강내 투여는 C3의 활성화를 유도하여 그 결과 C3-positive 형광 세포의 증가를 유도한 것으로 판단된다. 한편 버섯유래의 다양한 항암 활성다당(β -glucan)들이 경우, 탐식능의 증가와 함께 macrophage에 C3 분해산물이 결합한다는 기존의 보고로 미루어 아마도 *L. brevis* FSB-1유래 활성성분이 숙주 방어기능을 증강시켜 종양에도 유효한 저해효과를 가질 가능성이 높다고 판단된다. 이들에 관한 실험은 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 판단된다.

Table 4-3. Effect of cytosol fraction of *Lactobacillus brevis* FSB-1 on the third component of complement (C3)-positive fluorescent cells in mice

Experimental group	Percentage of C3-positive fluorescent cell (%)
Control	7.8±3.4
Sample 10 mg/kg	32.6±7.8 ^a
20 mg/kg	48.9±13.5 ^a

ICR Female mice were injected i.p. with GS-1 for 3 days. After 3days, peritoneal macrophages were obtained from the mice. The percentage of C3-positive fluorescent cells were calculated among 200 cells. Each value represent mean±SD.

^aP<0.05, significantly different from control group.

*L. brevis*는 현재 probiotics로서 잠재성이 제시되고 있는 균주로서, 본 실험에서는 장관면역 활성화, 마크로파지 활성화 및 splenocyte mitogen 활성화능 등 다양한 면역 활성이 관찰되었고, 특히 *in vitro*와 *in vivo*에서 강력한 보체 활성화능이 관찰되었다. 따라서 향후 식품의 첨가제 및 probiotics로의 이용 가능성이 더욱 높은 것으로 여겨진다.

제 2 항 *Lactobacillus brevis* FSB-1 과 *Lactobacillus plantarum*의 exopolysaccharide (EPS) 생산능 및 면역 활성과 시작품 제작

1. 서 설

다양한 다당류(polysaccharides)들은 식물, 조류, 세균들에 의해서 생산되며, 이들 중 식물기원 다당류는 cellulose, pectin, starch가 있고, 조류기원 다당류는 agar, carrageenan, alginate가 있으며, 세균기원 다당류는 dextran, gellan, pullulan, xanthan이 있다고 보고되고 있다(Sutherland, 1998). 최근 lactic acid bacteria (LAB)는 발효식품들의 관능특성에 영향을 줄 수 있는 aromas, flavours, enzymes 등과 같은 물질들을 생산하는 것뿐만 아니라, 몇몇 LAB는 발효식품들의 물성(rheology), 조직감(texture), viscofying, sweetening, stability, water-binding agents, gelling, thickening properties 등에 영향을 줄 수 있는 exopolysaccharides (EPS)를 생산하는 것으로 보고되고 있다(Arskold 등, 2007; Harding 등, 2005; Macedo 등, 2002; Martensson 등, 2003; Desai 등, 2006). 이러한 EPS는 구조와 합성기작에 따라 heteropolysaccharides와 homopolysaccharides의 두 그룹으로 분류된다. Heteropolysaccharides는 multiple sugar type으로 구성되며 여러 종류의 glycosyltransferase enzyme들에 의해서 합성되어지는 반면, homopolysaccharides는 일반적으로 sucrose enzyme에 의해 단독의 기질인 sucrose로부터 합성되어진다. 이러한 sucrose type enzyme들은 glucose residues (glucan) 또는 fructose residues (fructan)으로 구성된 다당류를 합성하며(Arskold 등, 2007), 식품 또는 의약품산업의 첨가물로써 다양하게 응용되어왔다(Arskold 등, 2007; Harding 등, 2005; Martensson, 2003; Desai 등, 2006).

또한 EPS는 산업적인 유용성측면의 물리적인 특성뿐만 아니라 인체에 유효한 생리적 특성인 면역증진(immunity stimulation), 항궤양 활성(anti-ulcer activity), 혈 중 콜레스테롤 감소(cholesterol reduction) 등의 유용한 효과를 나타낸다고 보고되어 왔

으며, GRAS (Generally Recognized as Safe)로 인식되어 왔다(Desai 등, 2006; Martensson 등, 2003). 따라서 EPS의 생산성을 높이는 균주 개발(Desai 등, 2006)과 발효조건의 최적화작업이 요구된다고 보고되고 있다(Arskold 등, 2007). EPS를 식품산업에 응용하기 위해서는 cellular productivity가 적어도 10~15 g/L이 되어야 한다고 보고되고 있으며, 발효조건의 최적화에 영향을 줄 수 있는 인자들로는 탄소원, 질소원, 무기질, 비타민 등의 배지조성, 온도, pH 등이 있다고 보고되고 있다(Arskold 등, 2007; Macedo 등, 2002).

Martensson 등은 *Lactobacillus brevis* G-77을 이용하여 EPS의 생산능을 측정한 결과 α 와 β -glucan을 가진 EPS를 생산한다고 보고한 바 있다. 그러나 EPS의 생산에 영향을 줄 수 있는 인자들에 대한 연구는 진행되지 않았다.

Desai 등(2006)은 *Lactobacillus plantarum*을 이용하여 EPS의 생산능을 보고한 바 있으며, Kim 등(2002)은 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum*이 면역활성 증향보체활성이 매우 우수하였다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 EPS의 생산성이 높은 균주개발을 위해 제 2절 1항에서 분리된 *Lactobacillus brevis* FSB-1과 *Lactobacillus plantarum*의 EPS 생산능을 측정하였다. 또한 본 균주들을 이용하여 EPS의 생산최적화를 위해 탈지분유를 이용한 배지의 농도, 배양온도, 배양시간 등과 EPS 생산성과의 관계를 규명하였으며 EPS 생산의 최적조건을 활용하여 검은콩, 보리, 수수, 흑미, 찹쌀현미 등과 같은 다양한 곡류들을 배지에 대한 EPS 생산능을 검토하고, 생산된 EPS의 항보체활성, mitogenic activity와 cytokine activity와 같은 면역활성능을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. Exopolysaccharide(EPS) 생산을 위한 최적조건 확립

1) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 *Lactobacillus brevis* FSB-1은 경기대학교 대학원 식품미생물학 실험실에서 김치로부터 분리 및 동정하여 보관 중인 균주로서, 본 연구 제 1 절에서 대장내 점착능이 가장 우수한 균주로 선별되었으며, 제 2절 1항에서 각종 면역활성이 우수한 것으로 확인된바 있다. 본 균주는 exopolysaccharide (EPS) 생산능 및 생산된 EPS의 면역활성 측정에 사용되었다. 또한 대조균주로는 역시 본 연구 제 1 절에서 높은 면역 활성이 인정된 *Lactobacillus plantarum*을 사용하였다.

Exopolysaccharide (EPS)의 최적 생산 조건 확립을 위해 사용된 배지는 탈지분유 (Difco, St. Louis, USA)였다.

2) EPS의 생산을 위한 최적조건 분석

가) 탈지분유의 농도가 EPS의 생산에 미치는 영향

탈지분유 5, 10과 15 g을 250 mL 삼각플라스크에 넣은 후 증류수 100 mL를 가해 녹인 다음, 121°C에서 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다. 탈지분유 액체배지 100 mL에 활성화시킨 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*을 1%가 되도록 각각 접종한 후, shaking incubator(DX9, Han Young, Korea)에서 100 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 각각의 탈지분유 농도에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 각 균주 배양액에 대하여 pH, 생균수와 EPS의 생산량을 각각 측정하였다.

나) 배양온도가 EPS의 생산에 미치는 영향

가)의 조건에서 실험한 결과로부터, 즉 탈지분유의 농도에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양 후 최대의 EPS 생산량을 보이는 탈지분유의 농도를 각각 선택하였다. 선택된 최적의 탈지분유의 농도를 가진 액체배지를 (1)과 동일한 방법으로 제조한 후, *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*를 배지 100 mL에 대하여 각각 1%가 되도록 접종하였다. 배양 온도가 EPS의 생산에 미치는 영향을 측정하기 위하여 배양온도

의 조건을 30, 35와 40℃로 각각 다르게 하고, shaking incubator에서 100 rpm으로 진탕하면서 24시간 동안 배양한 후, 각 온도별 배양액에 대한 pH, 생균수와 EPS의 생산량을 측정하였다.

다) 배양시간이 EPS의 생산에 미치는 영향

나)의 결과로부터, 즉 최적의 EPS 생산량을 보이는 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양온도를 각각 선택하였다. 1)의 결과에서는 탈지분유의 최적의 농도를, 2)의 결과에서는 최적의 배양온도를 각각 선택한 다음 최적의 탈지분유 농도와 배양온도에서 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양시간을 달리하였다. 즉, *L. brevis* FSB-1의 배양시간은 0, 12, 24, 30, 36, 40과 48시간이었으며, *L. plantarum*의 배양시간은 0, 12, 24, 36과 48시간이었다. 각 균주의 배양시간에 따른 배양액의 pH, 생균수와 EPS 생산량을 각각 측정하였다.

라) 배양액의 pH와 생균수

배양액의 pH는 pH meter (950, orion Co., Ltd., USA)를 이용하여 측정하였으며, 생균수는 각각의 조건에서 배양된 배양액을 생리식염수를 이용하여 serial dilution을 실시한 후, 멸균된 MRS agar에 1 mL를 분주하여 spreading method로 37℃에서 48시간 동안 배양 후 각각 계수하였다.

마) EPS의 분리

EPS의 분리는 Levander 등(2002)의 방법에 기초하여 분리하였다. 즉 배양액 100 mL의 10%에 해당하는 trichloroacetic acid를 첨가하여 충분히 혼합한 다음 4℃, 5,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액 양의 4배에 해당하는 95% 알코올을 서서히 부은 후 4℃에서 하룻밤 동안 방치하여 침전물(EPS)을 형성시켰다. 형성된 EPS를 4℃, 5,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 증류수 100 mL에 녹여서 EPS 수용액을 제조한 후 4℃에서 냉장 보관하면서 이 후의 분석을 실시하였다.

바) EPS의 정량

EPS의 함량은 고형분 및 총당함량으로 측정하였다. 고형분함량은 A.O.A.C.법(1976)에 준하여, 즉 EPS 수용액을 105°C에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 항량의 무게를 측정하여 구하였다. 총당함량은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다(DuBois 등, 1956).

나. 곡물을 배지로 활용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 EPS 생산능

1) 사용균주 및 배지

곡물을 배지로 활용한 EPS의 생산능 검토를 위해 사용된 균주는 *Lactobacillus brevis* FSB-1이었다. 곡물배지제조를 위해 사용된 곡물의 종류는 검은콩, 보리, 검은쌀, 옥수수, 대두, 수수, 울무, 찹쌀현미가 사용되었다.

2) 배양액의 제조

각각의 곡류분말 5 g을 250 mL 삼각플라스크에 넣은 후 증류수 100 mL를 가해 녹인 다음, 121°C에서 15분간 멸균하여 EPS의 생산을 위한 배지로 사용하였다. 곡류배지 100 mL에 활성화시킨 *L. brevis* FSB-1을 1%가 되도록 각각 접종한 후, shaking incubator(DX9, Han Young, Korea)에서 100 rpm으로 진탕하면서 40°C에서 30시간 동안 배양하였다.

곡류분말 배합비에 따른 배지의 제조는 총량 5g을 100%로 하여 나누어서 비율별로 첨가한 후 이후의 절차는 위와 동일한 방법으로 배지를 제조하였다.

곡류분말 배합비에 glucose와 amylase의 처리에 따른 EPS 생산수율에 미치는 영향은 glucose의 경우 배양액 100mL에 0.5%에 해당하는 양을 첨가하였으며, amylase(당화효소)는 배양액 100mL에 0.5%를 첨가한 후 70°C에서 하룻밤동안 처리한 후 효소의 불활성화를 위해 멸균한 다음 배지로 사용하였다.

3) 배양액의 pH와 생균수

배양액의 pH는 pH meter (950, orion Co., Ltd., USA)를 이용하여 측정하였으며, 생균수는 각각의 조건에서 배양된 배양액을 생리식염수를 이용하여 serial dilution을 실시한 후, 멸균된 MRS agar에 1 mL를 분주하여 spreading method로 37°C에서 48시간 동안 배양 후 각각 계수하였다.

4) 곡류배양액으로부터 EPS의 분리

EPS의 분리는 Levander 등(2002)의 방법에 기초하여 분리하였다. 전분의 제거를 위해 배양액 100 mL의 0.5%에 해당하는 amylase를 첨가하여 충분히 혼합한 다음 70°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액 양의 4 배에 해당하는 95% 알코올을 서서히 부은 후 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 침전물 (EPS)을 형성시켰다. 형성된 EPS를 4°C, 5,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 증류수 100 mL에 녹여서 EPS 수용액을 제조한 후 4°C에서 냉장보관하면서 이 후의 분석을 실시하였다.

5) EPS의 정량

EPS의 함량은 고형분 및 총당함량으로 측정하였다. 고형분함량은 A.O.A.C.법 (1976)에 준하여, 즉 EPS 수용액을 105°C에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 항량의 무게를 측정하여 구하였다. 총당함량은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다(DuBois 등, 1956).

다. EPS의 항보체 활성

1) 정상 혈청(Normal human serum, NHS)의 조제

실험실의 건강한 성인을 대상으로 채혈하여 실온에서 30분씩 방치한 다음 혈액을 응고시킨 후 4°C, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청을 1 mL씩 나누어 -70°C 냉동고에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 보체계 활성화능 측정

보체계 활성화능은 항보체 활성으로 측정되었다. 항보체 활성은 Mayer법(Kabat과 Mayer, 1971)에 근거하여, 시료에 의해 보체를 활성화한 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거를 둔 complement fixation test를 이용하여 측정되었다. 즉, 정상인의 혈청과 500 μM Ca^{++} , 2 mM Mg^{++} 이 함유된 gelatin veronal buffered saline(GVB⁺⁺ buffer, pH 7.4, (주)일본동결건조연구소) 및 시료를 각각 50 μL 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB⁺⁺ buffer를 350 μL 씩 첨가하고 이를 10~160배까지 연속하여 희석하였다. 여기에 GVB⁺⁺ buffer 750 μL 와 양혈(Komed, Co., Ltd., Korea)과 hemolysin(Sigma Chemical Co., USA)으로 제조된 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA Cell, 1×10^8 cells/mL)를 각각 250 μL 씩 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 4°C의 phosphate buffered saline(PBS) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻은 다음, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체 활성은 50% 총보체용혈에 대한 저지율(ITCH₅₀, inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타내었다.

라. Mitogen 활성

ICR mouse(웅성, 6주령)를 치사시킨 후 비장을 적출하여 RPMI 1640-FBS 배지가 들어 있는 petri dish에 담근 후, 주사기의 고무마개와 화염멸균한 100 및 200 mesh 금속망을 이용하여 마쇄 및 여과를 실시하여 비장세포액을 얻었다. 이 세포액을 저장액 용혈법(0.2% NaCl 용액, 3 mL로 약 20초간 처리)을 이용하여 적혈구를 제거한 다음, RPMI 1640-FBS 배지로 2~3회 세척한 후, 세포수가 5.0×10^6 cells/mL가 되도록 조절하였다. 이 세포액을 microtiter plate에 90 μL 씩 분주하고 각 시료를 10 μL 씩 첨가하여 37°C, CO₂ incubator에서 3일 동안 배양하였다. 비장 림프구의 증식정도는 MTT법(Zheng 등, 2002)을 이용하여 측정되었다. 즉, 각 well의 세포배양액에 발색시약 MTT 용액(Methylthiazoletetrazolium, Sigma Chemical Co., USA) 50 μL 를 첨가

하여 CO₂ incubator에서 5시간 동안 배양하였다. 형성된 MTT-formazan 침전을 회수한 후, 0.04 N HCl/isopropanol(시약 1급) 100 μL를 이용하여 재차 용해시킨 다음, Microtiter Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Relative mitogenic activity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{negative control}}} \times 100$$

마. Cytokine 활성

Cytokine 측정은 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하였다. 분석 하루 전, anti-cytokine mAb(anti-mouse cytokine monoclonal-antibody)를 coating buffer(0.1 M Carbonate, pH 9.5)에 섞어 96 well ELISA plate(NuncTM immuno plate)에 100 μl 씩 분주하고 4°C에서 하루밤 반응시켜 well 표면에 부착시켰다. 다음 날 plate를 PBST(PBS with 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후, assay diluent(PBS with 10% FBS)를 200 μl씩 분주하고 실온에서 1시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 recombinant mouse cytokine를 연속 희석한 용액 또는 5일 간 배양한 Peyer's patch 반응 상등액인 시료를 50 μl 씩 분주하고 assay diluent를 50 μl 분주하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다. 반응 상등액을 제거하고 assay diluent를 50 μl 씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking 시킨 후, PBST로 5회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 biotinylated anti-cytokine mAb와 avidin-horseradish peroxidase의 conjugate를 assay diluent에 희석하여 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well에 존재하는 상등액을 제거하고 PBST로 7회 세척한 후 TMB substrate (3, 3',5, 5'-tetramethylbenzidine 와 hydrogen peroxide, Pharmingen) 첨가하여 30분 배양하였으며, 50 μl 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Relative cytokine activity} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{negative control}}} \times 100$$

바. 통계 처리

실험결과는 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)을 이용하여 분석하였고 Duncan's multiple range test로 유의수준 $p < 0.05$ 로 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

가. EPS의 생산을 위한 최적조건 분석

1) 탈지분유의 농도가 EPS의 생산에 미치는 영향

탈지분유의 농도에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액 pH와 생균수의 결과는 Table 5-1과 같다. *L. brevis* FSB-1은 탈지분유의 농도가 증가함에 따라 pH가 감소한 반면, *L. plantarum*은 탈지분유의 농도가 증가함에 따라 pH도 함께 증가하였다. *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액의 생균수는 탈지분유의 농도와 관계없이 비슷한 수준의 값을 보였다.

MRS broth에서 배양된 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*에 대한 각각의 배양액 pH는 탈지분유의 모든 배양액(5, 10, 15%)보다 훨씬 낮은 pH 값인 4.91과 4.08의 값을 각각 보였다. 또한 생균수도 전 농도의 탈지분유 배양액보다 높은 값인 1.1×10^9 와 6.9×10^9 cfu/mL를 각각 보였다.

탈지분유의 농도에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액 중 EPS 수용액의 고형분함량(%)과 총당함량(mg/mL)은 탈지분유의 농도가 증가함에 따라 함께 증가하는 경향을 보였으며(Table 5-2), MRS broth에서 생육한 *L. brevis* FSB-1과 *L.*

*plantarum*의 EPS 수용액의 고형분함량(%)과 총당함량(mg/mL)은 15%의 탈지분유의 EPS 수용액보다는 작고 10%의 탈지분유보다는 높은 함량을 보였다. 또한 *L. brevis* FSB-1의 15% 탈지분유 배양액의 EPS 수용액의 고형분함량(%)과 총당함량(mg/mL)은 *L. plantarum*의 15% 탈지분유 배양액의 EPS 수용액보다 높은 수준의 값을 보였으며, 이 결과는 $p < 0.05$ 수준에서 유의적인 차이를 보였다. 위의 각 균주에 따른 pH와 생균수의 결과들로 미루어 볼 때, *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*이 MRS broth에서의 cell 생육이 탈지분유에서의 생육속도보다 활발하게 진행된다는 것을 확인 할 수 있다. 그러나 대사산물로써 생산되는 EPS의 함량(고형분과 총당함량)은 MRS broth에서 생육한 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액보다 15% 탈지분유의 배양액에서 훨씬 높은 수준의 값들을 보였다. 따라서 cell의 성장과 EPS의 생산과의 관계는 반드시 비례하지는 않는다는 사실을 확인할 수 있었으며, 최적의 EPS 생산을 위한 탈지분유의 농도는 15%였다.

Table 5-1. pH and viable cell count (cfu/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *Lactobacillus plantarum* according to skim milk concentration, respectively

Strain	<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	pH	Viable cell count (cfu/mL)	pH	Viable cell count (cfu/mL)
MRS broth	4.91	1.1×10^9	4.08	6.9×10^9
5% skim milk	6.42	1.4×10^7	4.27	1.7×10^9
10% skim milk	6.28	2.0×10^7	4.79	1.9×10^9
15% skim milk	6.09	1.7×10^7	5.07	1.8×10^9

L. brevis FSB-1 and *L. plantarum* were fermented at 37°C for 24 hr with shaking at 100rpm.

Table 5-2. Dry weight (%) and total EPS (Total sugar) content (mg/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *Lactobacillus plantarum* according to skim milk concentration, respectively

Strains	<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Dry weight (%) [*]	EPS (Total sugar) (mg/mL) [*]	Dry weight (%) [*]	EPS (Total sugar) (mg/mL) [*]
MRS	0.068±0.001 ^b	0.517±0.101 ^a	0.054±0.002 ^c	0.363±0.054 ^b
5% skim milk	0.007±0.001 ^a	0.102±0.009 ^a	0.017±0.004 ^a	0.112±0.017 ^a
10% skim milk	0.040±0.007 ^a	0.367±0.043 ^a	0.031±0.001 ^b	0.289±0.020 ^b
15% skim milk	0.338±0.000 ^c	5.548±0.726 ^b	0.065±0.003 ^d	0.604±0.109 ^c

L. brevis FSB-1 and *L. plantarum* were fermented at 37°C for 24 hr with shaking at 100rpm.

* Significantly differ at $p < 0.05$; means with the same letter are not significantly different.

2) 배양온도가 EPS의 생산에 미치는 영향

EPS의 생산량이 가장 우수했던 탈지분유 15%농도에서 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*를 각 배양 온도별(30, 35, 40°C)로 배양한 배양액의 pH와 생균수를 측정 한 결과(Table 5-3), *L. brevis* FSB-1은 배양 온도에 따른 pH와 생균수의 차이가 거의 없었다. 반면 *L. plantarum*은 각 배양 온도에 따른 pH의 변화는 30°C에서 가장 높은 값인 5.10을, 35°C에서 가장 낮은 4.67의 값을 보였다. 그러나 각 배양온도에 따라 생균수는 큰 차이를 보이지 않았다. 배양온도에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum* 각각의 EPS 수용액에 대한 고형분과 총당함량은 *L. brevis* FSB-1의 경우, 배양온도가 증가함에 따라 고형분과 총당함량이 함께 증가하는 결과를 보였으나($p < 0.05$), *L. plantarum*의 EPS 수용액은 고형분과 총당함량이 35°C에서 가장 낮은 값을, 30°C에서 가장 높은 값을 보였다($p < 0.05$). 즉, *L. brevis* FSB-1의 경우와 마찬가지로 고형분함

량이 높은 것이 총당함량도 함께 높은 값을 보였다(Table 5-4). 따라서 EPS의 최대 생산량을 보이는 *L. brevis* FSB-1의 최적 배양온도는 40°C를, *L. plantarum*의 최적 배양온도는 30°C를 선택한 후 이후의 실험을 실시하였다.

Table 5-3. pH and viable cell count (cfu/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *Lactobacillus plantarum* according to fermentation temperature, respectively

Strains	<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
Temperature	pH	Viable cell count (cfu/mL)	pH	Viable cell count (cfu/mL)
30°C	5.80	2.4×10^8	5.10	2.0×10^9
35°C	5.85	1.9×10^8	4.67	2.6×10^9
40°C	5.84	1.9×10^8	4.75	1.7×10^9

L. brevis FSB-1 and *L. plantarum* were fermented at 37°C for 24 hr with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

Table 5-4. Dry weight (%) and total EPS (Total sugar) content (mg/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *Lactobacillus plantarum* according to fermentation temperature, respectively

Strains	<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Dry weight (%) [*]	EPS (Total sugar) (mg/mL) [*]	Dry weight (%) [*]	EPS (Total sugar) (mg/mL) [*]
30°C	1.439±0.018 ^a	30.148±0.787 ^a	1.176±0.025 ^c	31.195±3.311 ^c
35°C	1.601±0.031 ^b	38.100±1.874 ^b	0.123±0.006 ^a	2.091±0.064 ^a
40°C	1.855±0.039 ^c	43.719±1.402 ^c	0.800±0.014 ^b	19.591±1.433 ^b

L. brevis FSB-1 and *L. plantarum* were fermented at 37°C for 24 hr with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

* Significantly differ at $p < 0.05$; means with the same letter are not significantly different.

3) 배양시간이 EPS의 생산에 미치는 영향

배양시간에 따른 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액의 pH와 생균수 (cfu/mL)에 대한 결과는 Table 5-5와 같다. 배양시간이 증가함에 따라 *L. brevis* FSB-1과 *L. plantarum*의 배양액의 pH는 감소하는 경향을 보인 반면, 생균수 (cfu/mL)는 배양시간이 증가함과 따라 함께 증가하는 경향을 보였다. 배양시간에 따른 *L. brevis* FSB-1의 배양액 중 EPS 수용액의 고형분함량은 0시간에서 12시간까지는 감소하다가 이 후 30시간까지 지속적으로 증가하는 경향을 보이다가 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5-1). 배양시간에 따른 *L. brevis* FSB-1의 배양액으로부터의 EPS 수용액 중 총당함량도 배양시간에 따른 고형분함량의 경향과 같은 경향을 보였다(Fig. 5-3). 반면 배양시간에 따른 *L. plantarum*의 배양액 중 EPS 수용액의 고형분함량과 총당함량은 0시간에서부터 48시간까지 지속적으로 감소하는 경향을 보였다

(Figs. 5-2과 5-4). 이 결과들로 미루어 볼 때, *L. brevis* FSB-1의 경우, 초기 0시간의 배양액 중에서 측정된 고형분과 총당함량은 15% 탈지분유 속에 포함되어 있는 고형분과 당이 측정된 것으로써 배양시간 12시간까지는 *L. brevis* FSB-1의 생육을 위해 이용하여 감소하는 경향을 나타내었던 것으로 추측되며, 이 후 30시간까지는 *L. brevis* FSB-1의 생육과 더불어 대사산물로써 EPS를 꾸준히 생산함으로써 증가추세를 보이다가 다시 감소하는 경향을 보인 것으로 판단되었다. 반면, *L. plantarum*은 0시간에서 가장 높은 수준의 고형분과 EPS 함량을 보였다가 배양시간이 지남에 따라 지속적인 감소경향을 보인 것으로 보아 대사산물로써 EPS를 생산하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 5-5. pH and viable cell count (cfu/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 and *Lactobacillus plantarum* according to fermentation time, respectively

Strains	<i>Lactobacillus brevis</i> FSB-1		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	pH	Viable cell count (cfu/mL)	pH	Viable cell count (cfu/mL)
Fermentation time (hr)				
0	6.05	3.0×10^7	5.99	7.0×10^7
12	5.92	5.6×10^7	5.79	8.1×10^8
18	5.82	8.2×10^7	—	—
24	5.63	2.9×10^8	5.04	2.6×10^9
30	5.85	8.0×10^7	—	—
36	5.61	5.5×10^8	4.72	3.2×10^9
48	4.34	9.8×10^8	4.35	3.6×10^9

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

L. plantarum was fermented at 30°C with shaking 100rpm using 15% skim milk.

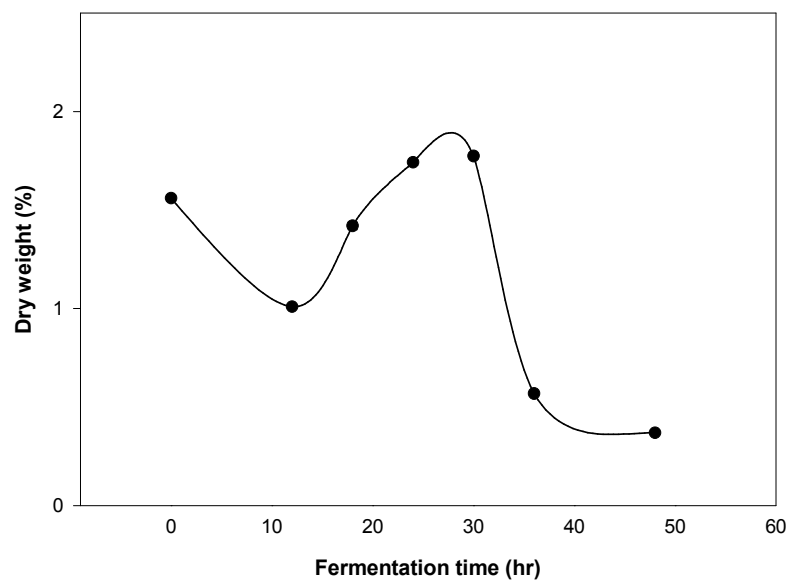


Figure 5-1. Dry weight (%) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to fermentation time.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

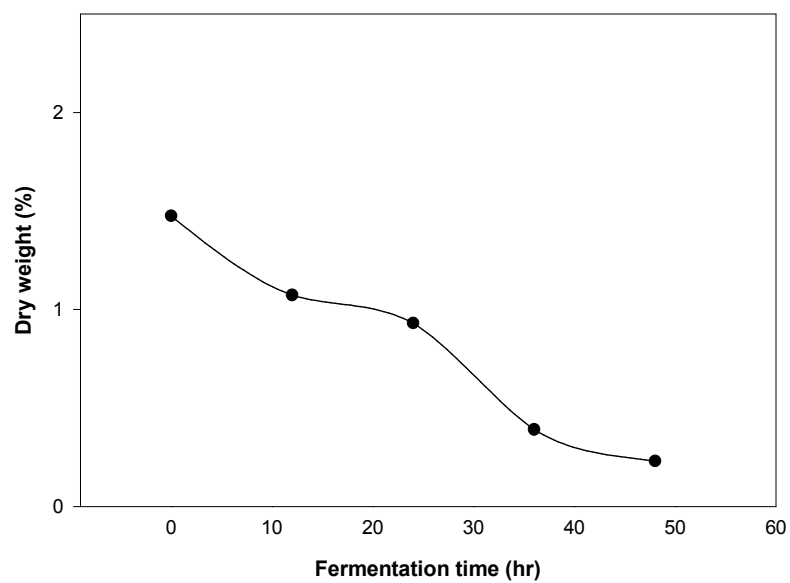


Figure 5–2. Dry weight (%) from cultures of *Latobacillus plantarum* according to fermentation time.

L. plantarum was feremtned at 30°C with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

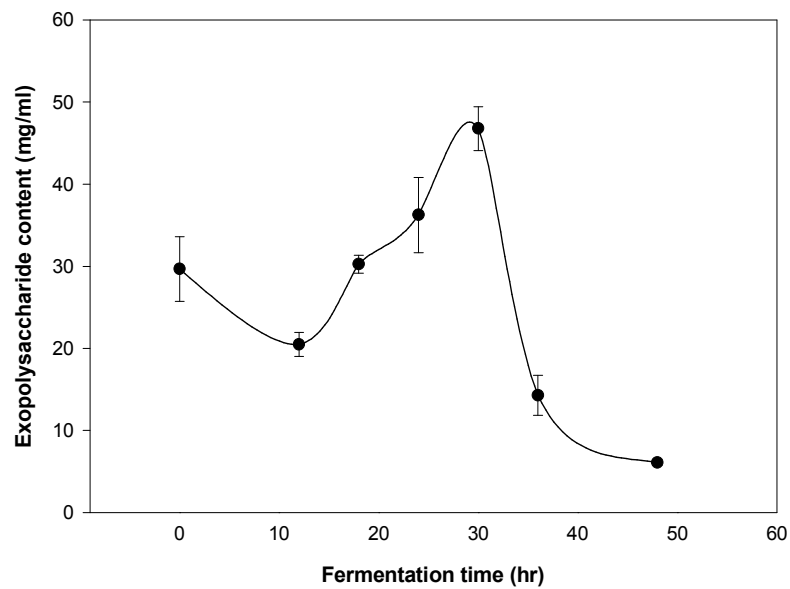


Figure 5-3. EPS (exopolysaccharide) content (mg/ml) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to fermentation time.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C with shaking at 100rpm using 15% skim milk.

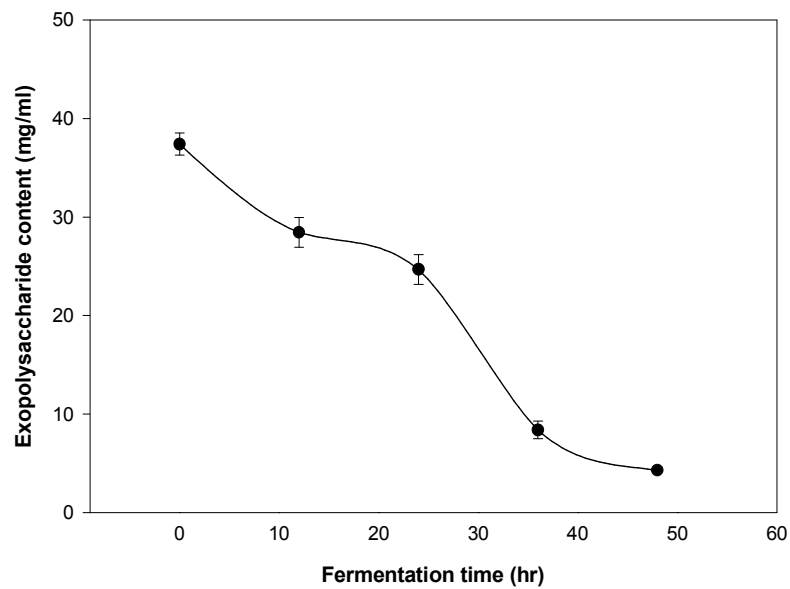


Figure 5-4. EPS (exopolysaccharide) content (mg/ml) from cultures of *Lactobacillus plantarum* according to fermentation time.

L. plantarum was fermented at 30°C with 100rpm using 15% skim milk.

4) 배양시간에 따른 EPS 수용액의 항보체 활성

배양시간에 따른 EPS 수용액 각각의 항보체 측정결과 0에서 36시간까지의 EPS 수용액은 항보체활성의 차이를 크게 보이지 않았으나, 48시간이후의 EPS 수용액은 이에 비해 높은 항보체활성을 보였다($p < 0.05$). 그러나 양성대조군인 PSK보다는 낮은 수준의 항보체활성을 보였다. 따라서 *L. brevis* FSB-1은 15% skim milk를 배지로 활용하여 배양할 경우 배양온도 40°C에서 배양시간 48시간이후에 항보체활성이 있는 EPS를 생산하는 것으로 판단되었다.

Table 5-6. Anti-complementary activity (ITCH₅₀, %) of soluble EPS fraction from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to fermentation time

fermentation time (hr)	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	fermentation time (hr)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
control	3.092±5.035 ^{b, 2)}	24	3.843±3.953 ^b
0	7.888±4.034 ^b	30	3.914±3.107 ^b
12	2.941±1.621 ^b	36	9.930±0.367 ^b
18	4.887±0.415 ^b	48	29.115±2.669 ^a
PSK ³⁾	69.099±3.992		

Fermentation condition of *L. brevis* FSB-1 was at 40°C with shaking with 100rpm using 15% skim milk, and concentrations of samples and PSK were measured at 1,000 µg/mL, respectively. ¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

나. 곡물을 배지로 활용한 *Lactobacillus brevis* FSB-1의 EPS 생산능

1) EPS의 생산능이 우수한 곡물배지의 선정

EPS의 생산능이 우수한 곡물을 선별하기 위하여 *L. brevis* FSB-1을 40°C에서 30시간 동안 배양한 후 배양액의 pH와 생균수를 측정된 결과는 Table 5-7과 같다.

검은콩, 보리, 흑미, 옥수수, 대두, 수수, 울무와 찹쌀현미 8종의 곡류분말을 배지로 활용한 결과 가장 낮은 pH를 보인 곡물은 대두였으며, 가장 높은 pH를 보인 것은 찹쌀현미였다. 반면, 배양액 중의 가장 낮은 생균수를 보인 곡물은 찹쌀현미였으며, 가장 높은 생균수를 보인 곡물은 수수였다. 이 결과로 미루어 볼 때 *L. brevis* FSB-1이 가장 잘 생육할 수 있는 곡물은 수수나 대두인 것으로 보였으며 이에 반해 찹쌀현미는 생육이 다른 곡물배지들에 비해 부적합한 것으로 판단되었다.

각 곡물종류에 따른 배양액들로부터 EPS 수용액을 획득한 후 고형분과 총당함량을 측정된 결과는 Figs. 5-5와 5-6과 같다. 다른 곡물들과 비교해 볼 때 비교적 높은 수준의 고형분 함량을 보인 곡물은 검은콩, 보리와 대두였으며, 높은 수준의 총당함량은 보인 곡물은 검은콩, 보리와 찹쌀현미였다.

면역활성측정결과 항보체활성은 다른 곡물들에 비해 대두와 울무가 높은 항보체활성을 보였다. 특히, 대두는 양성대조군인 PSK와 거의 같은 수준의 높은 항보체 활성을 보였다. 또한 검은콩, 보리, 흑미, 옥수수와 수수의 항보체 활성도 비교적 높은 수준의 항보체활성을 보였다(Tale 5-8).

Mitogen 활성 측정결과(Fig. 5-7) 비교적 보리, 대두와 수수가 높은 활성을 보였으며, 양성대조군(LPS)과 비교해 볼 때 비교적 높은 수준의 활성을 보였다. 그러나 양성대조군의 농도는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고, 각 곡물시료의 농도는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로써 농도차이를 감안할 때 높은 활성을 보였다고 보기에는 부족하였다.

Cytokine 활성측정결과(Fig. 5-8), 비교적 보리와 흑미가 높은 활성을 보였으나 양성대조군과 비교해 볼 때 낮은 수준의 활성을 보였다.

따라서 곡물을 배지로 활용하여 *L. brevis* FSB-1를 배양한 후 획득한 EPS 수용액 중의 면역활성 측정결과, 항보체활성이 우수한 것으로 판단되었다.

위의 결과들로부터 높은 수준의 EPS 생산량(고형분과 총당함량)과 비교적 면역활성이 우수한 것으로 판단된 검은콩, 보리와 찹쌀현미 3 종류의 곡류분말을 EPS 생산을 위한 곡물들로 선정하였다.

Table 5-7. pH and viable cell count (cfu/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to various grain powders, respectively

Grain powders	pH	Viable cell count (cfu/mL)	Grain powders	pH	Viable cell count (cfu/mL)
Black bean	4.22	7.2×10^8	Soybean	3.62	6.5×10^8
Barley	4.28	5.2×10^8	Millet	3.67	9.3×10^8
Black rice	3.87	3.0×10^8	Adlay	3.66	4.9×10^8
Corn	3.89	5.4×10^8	Waxy brown rice	4.49	7.2×10^7

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm.

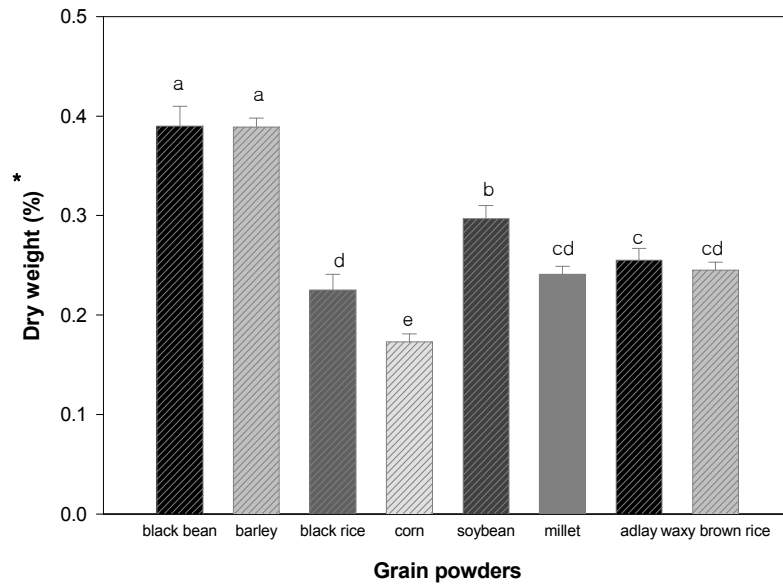


Figure 5-5. Dry weight (%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to various grain powders.

* Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

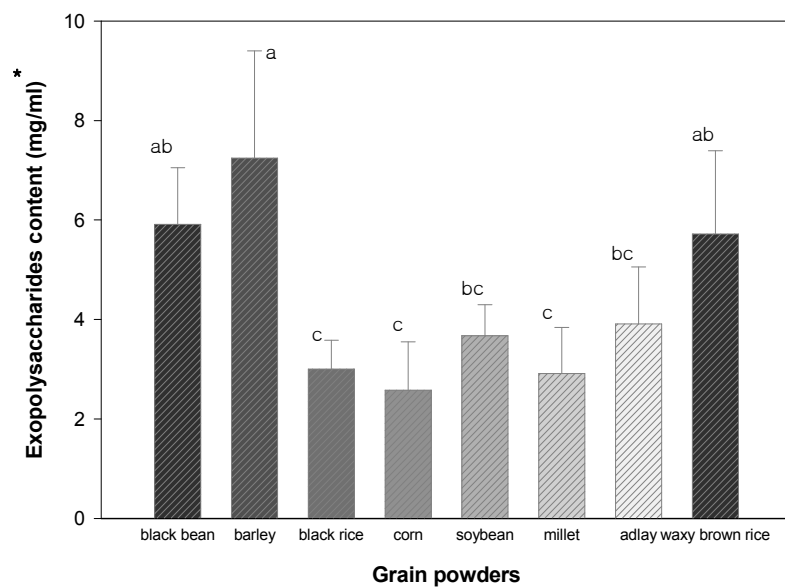


Figure 5–6. EPS (exopolysaccharide) content (mg/mL) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to various grain powders.

* Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

Table 5-8. Anti-complementary activity (ITCH₅₀, %)* of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to various grain powders

Grain powders	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Grain powders	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
Black bean	34.348±0.286 ^{d, 2)}	Soybean	66.669±1.414 ^a
Barley	37.546±1.557 ^{cd}	Millet	44.812±0.383 ^{bc}
Black rice	43.662±1.396 ^{bcd}	Adlay	51.486±7.648 ^b
Corn	38.786±0.835 ^{cd}	Waxy brown rice	24.353±7.450 ^e
PSK ³⁾	69.135±2.781		

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of grain powders and PSK were measured at 1,000 µg/ml. ¹⁾ The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

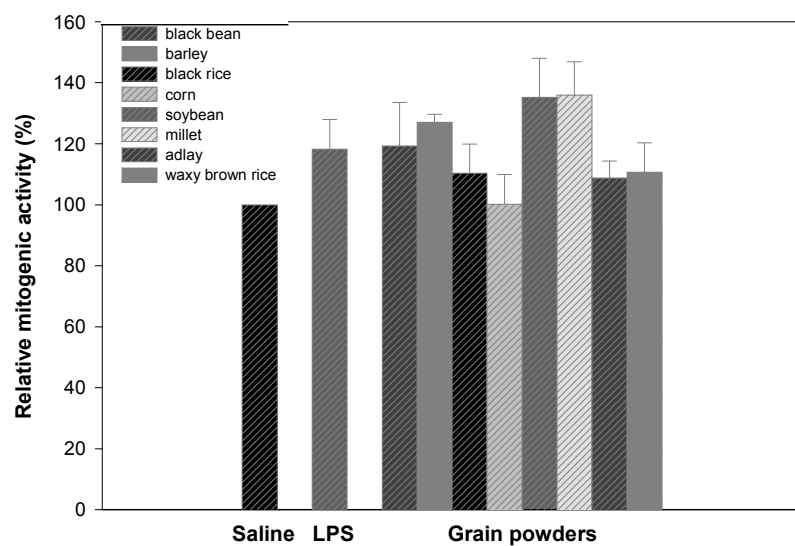


Figure 5-7. Relative mitogenic activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to various grain powders.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

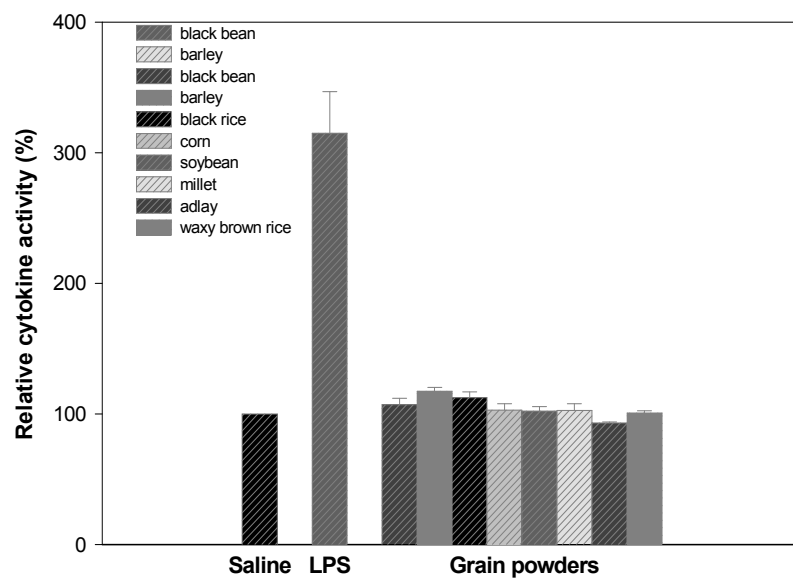


Figure 5–8. Relative cytokine activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to various grain powders.

L. brevis FSB–1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

2) EPS의 생산능이 우수한 곡물배지의 1:1 배합

EPS의 생산능이 우수한 검은콩, 보리와 찹쌀현미를 선별한 후 1:1로 배합한 배지를 대상으로 *L. brevis* FSB-1을 배양한 후 배양액 중의 pH와 생균수의 결과는 Table 5-9와 같다. 1)의 결과와 마찬가지로 비교적 낮은 pH를 보인 곡물은 검은콩과 보리로써 검은콩과 보리를 혼합한 배지에서도 낮은 pH를 보였다. 반면, 찹쌀현미를 첨가한 배지에서는 이에 비해 비교적 높은 pH를 보였다. 생균수의 결과도 검은콩과 보리를 첨가한 배지에서 비교적 높은 수준의 값을 보였다.

EPS 수용액 중의 고형분함량은 검은콩 또는 보리, 검은콩과 보리를 1:1로 배합한 배지에서 높은 함량을 보였으나(Fig. 5-9), 총당함량은 찹쌀현미와 보리를 1:1로 배합한 배지에서 높은 함량을 보였다(Fig. 5-10).

면역활성 측정결과 항보체활성은 보리가 가장 높은 수준의 활성을 보였으며, 검은콩과 보리와 찹쌀현미를 1:1로 배합한 곡물의 배지에서 비교적 높은 수준의 항보체 활성을 보였다(Table 5-10).

Mitogen 활성 측정결과 검은콩, 보리와 찹쌀현미가 비교적 높은 활성을 보였다(Fig. 5-11). 그러나 3 종류의 곡물을 1:1로 배합한 곡물에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다.

Cytokine 활성 측정결과 검은콩과 찹쌀현미가 비교적 높은 활성을 보였다. 그러나 양성대조군인 LPS에 비해 낮은 활성을 보였다(Fig. 5-12).

위의 결과들로부터 EPS 생산량은 보리가 가장 높았으며, 항보체활성은 보리와 찹쌀현미 1:1의 시료에서 상대적으로 높았다. 따라서 보리와 찹쌀현미의 비율을 여러 비율로 조정하여 EPS의 생산량과 면역활성이 우수한 보다 좋은 배합비율을 얻기 위해 이후의 실험을 진행하였다.

Table 5-9. pH and viable cell count (cfu/mL) of cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to grain mixture (1:1) after grain powders selection with predominant EPS productivity

Grain powders	pH	Viable cell count (cfu/mL)	Grain powders	pH	Viable cell count (cfu/mL)
black bean (A)	4.19	3.6×10^8	A:B	4.20	2.2×10^8
barley (B)	4.18	2.0×10^8	A:C	4.30	3.3×10^8
waxy brown rice (C)	4.39	1.9×10^8	B:C	4.28	2.0×10^8

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100 rpm.

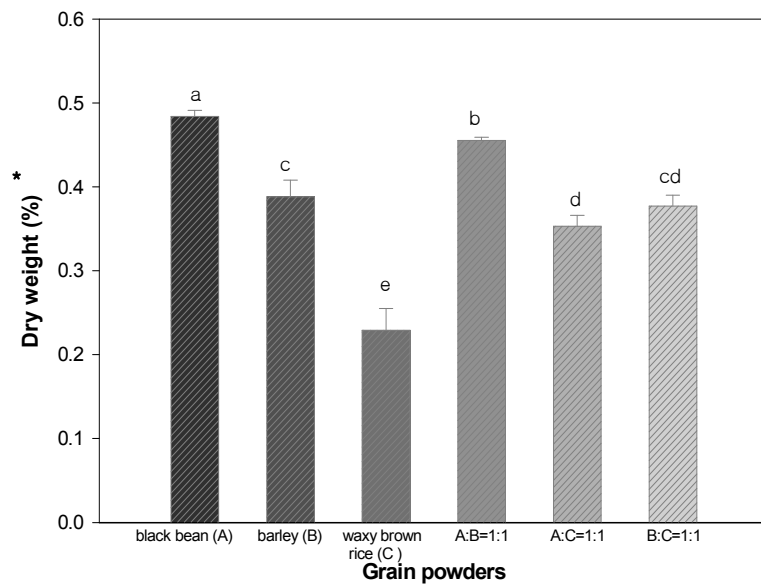


Figure 5–9. Dry weight (%) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to grain mixture (1:1) after grain powders selection with predominant EPS productivity.

* Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

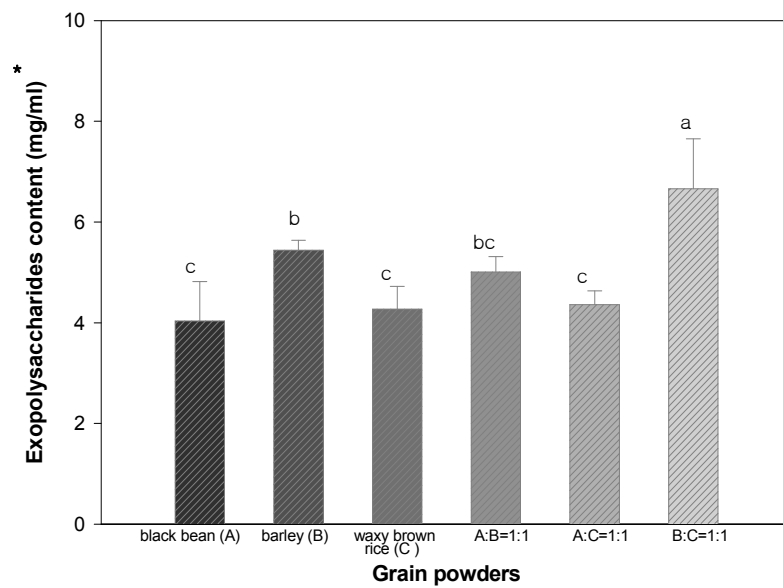


Figure 5–10. EPS (exopolysaccharide) content (mg/ml) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to grain mixture (1:1) after grain powder selection with predominant EPS productivity.

* Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

Table 5-10. Anti-complementary activity* (ITCH₅₀, %) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to grain mixture (1:1) after grain powders selection with predominant EPS productivity

Grain powders	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Grain powders	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
Black bean (A)	29.008±0.982 ^{ab, 2)}	A:B	18.717±4.800 ^c
Barley (B)	32.971±8.401 ^a	A:C	23.901±2.021 ^{ab}
Waxy brown rice (C)	23.183±1.583 ^{ab}	B:C	27.422±1.966 ^{ab}
PSK ³⁾	69.135±2.781		

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of grain powders and PSK were measured at 1,000 µg/ml. ¹⁾ The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

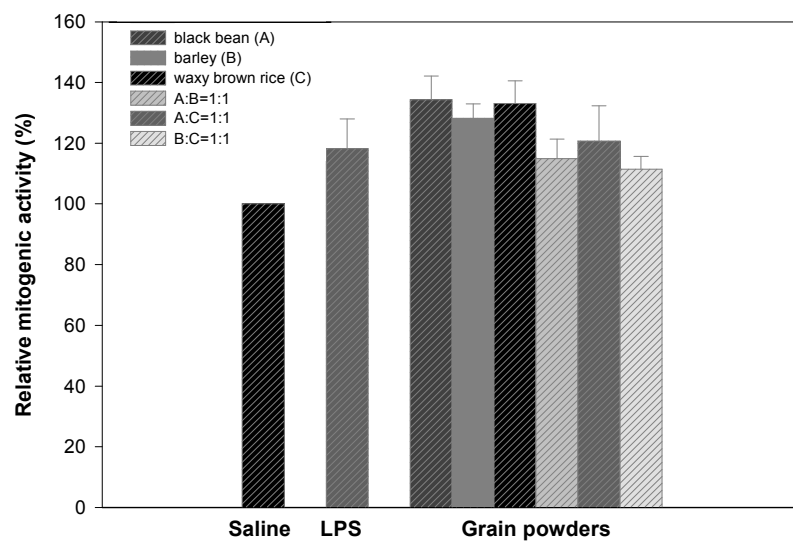


Figure 5–11. Relative mitogenic activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to grain mixture (1:1) after grain powder selection with predominant EPS productivity.

L. brevis FSB–1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

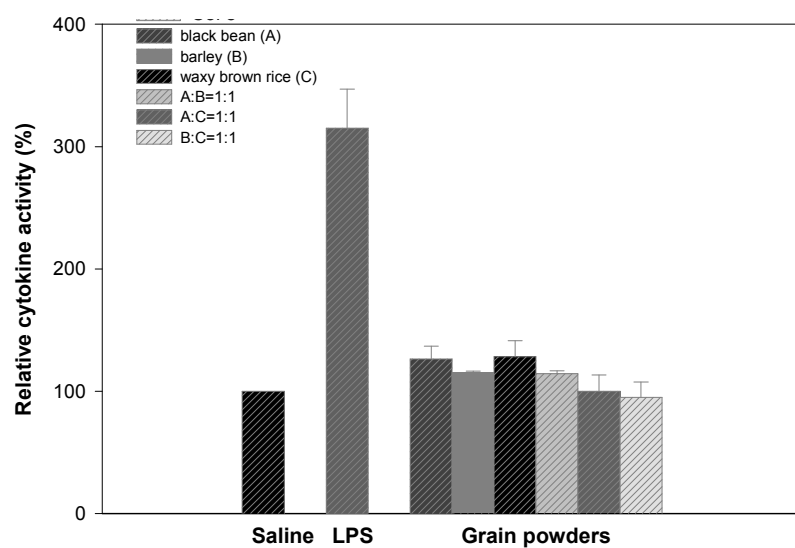


Figure 5-12. Relative cytokine activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to grain mixture (1:1) after grain powder selection with predominant EPS productivity.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

3) EPS의 생산능이 우수한 보리와 찹쌀현미의 배합비율선정

EPS 생산량이 높은 보리와 찹쌀현미의 비율을 선별하기 위하여 *L. brevis* FSB-1를 배양한 결과 배양액의 pH와 생균수 결과는 Table 5-11과 같다. 찹쌀현미의 비율이 높아질수록 pH는 증가하는 경향을 보였으며 배합비율에 따른 생균수는 큰 차이를 보이지 않았다.

보리와 찹쌀현미의 배합비율에 따른 배양액 중 EPS 수용액의 고형분함량은 보리와 찹쌀현미의 비율 1:1과 4:1이 비교적 높은 값을 보였으나 다른 비율들과도 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5-13). EPS 수용액 중의 총당함량은 보리와 찹쌀현미의 비율이 1:2일 때 가장 높은 수준의 값을 보였으며 이 값은 다른 배합비율의 EPS 수용액들에 대한 총당함량에 비해 유의적으로 높은 값의 차이를 보였다($p < 0.05$, Fig. 5-14).

면역활성 측정결과 항보체활성은 보리와 찹쌀현미의 배합비율이 3:1과 4:1이 비교적 높은 수준의 활성을 보였다(Table 5-15).

Mitogen 활성 측정결과 보리와 찹쌀현미의 배합비율이 1:1과 1:4가 비교적 높은 활성을 보였으며(Fig. 5-15), cytokine 활성 측정결과 시료들간에 활성 값의 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5-16).

위의 결과들로부터 면역활성간에는 큰 활성의 차이를 보이지 않았으므로 EPS 생산량이 가장 높은 결과를 보인 보리와 찹쌀현미의 배합비율 1:2의 배지를 최종배지로 선정하고 이후의 실험을 진행하였다.

Table 5–11. pH and viable cell count (cfu/mL) of cultures by *Lactobacillus brevis* FSB–1 according to the ratio of barley and waxy brown rice

Grain powders (barley : waxy brown rice)	pH	Viable cellcount (cfu/mL)	Grain powders (barley : waxy brown rice)	pH	Viable cell count (cfu/mL)
1:1	4.17	4.5×10^8			
2:1	4.13	3.6×10^8	1:2	4.29	3.6×10^8
3:1	4.10	4.4×10^8	1:3	4.29	3.3×10^8
4:1	4.11	3.7×10^8	1:4	4.35	3.7×10^8

L. brevis FSB–1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100 rpm.

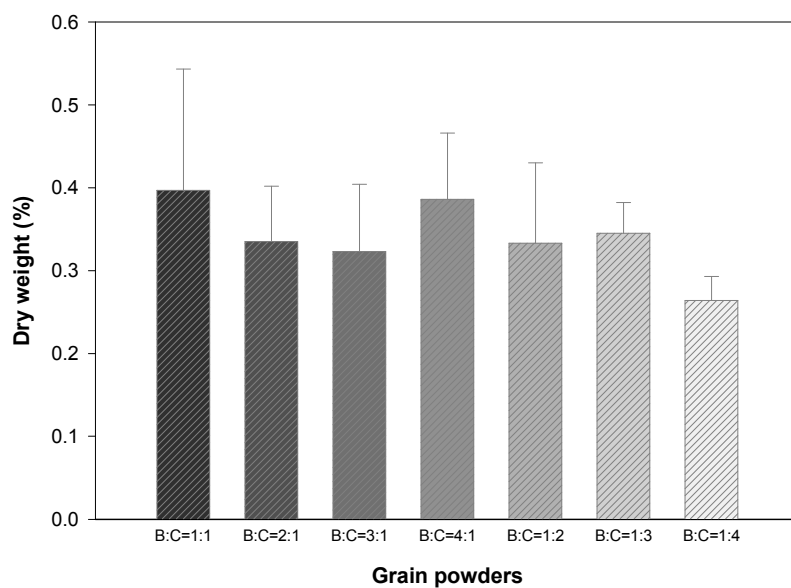


Figure 5–15. Dry weight (%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB–1 according to the ratio of barley and waxy brown rice.

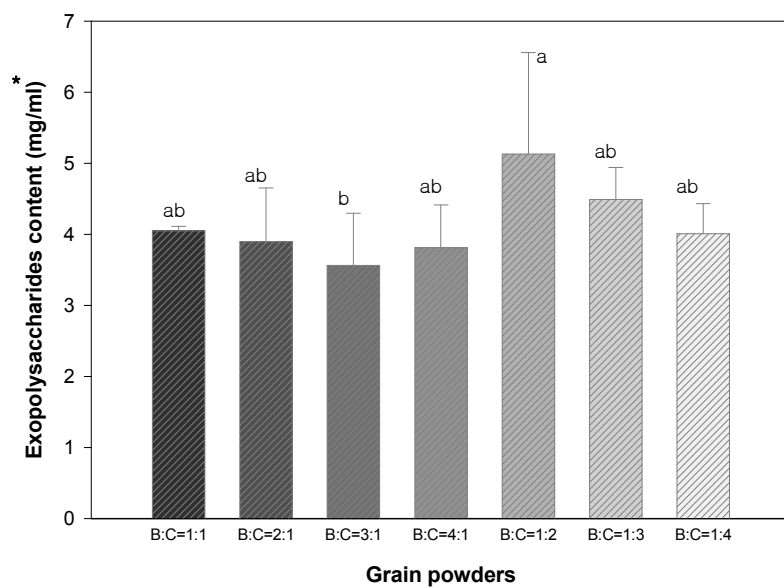


Figure 5-16. EPS (exopolysaccharide) content (mg/mL) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to the ratio of barley and waxy brown rice.

* Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

Table 5-12. Anti-complementary activity* (ITCH₅₀, %) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to the ratio of barley and waxy brown rice

Grain powders (barley : waxy brown rice)	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Grain powders (barley : waxy brown rice)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
1:1	30.026±1.376 ^{d, 2)}	1:2	30.420±0.248 ^d
2:1	39.554±0.477 ^b	1:3	32.523±0.338 ^c
3:1	42.232±0.102 ^a	1:4	29.004±0.462 ^d
4:1	41.848±1.251 ^a	PSK ³⁾	69.135±2.781

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of grain powders and PSK were measured at 1,000 µg/ml. ¹⁾ The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

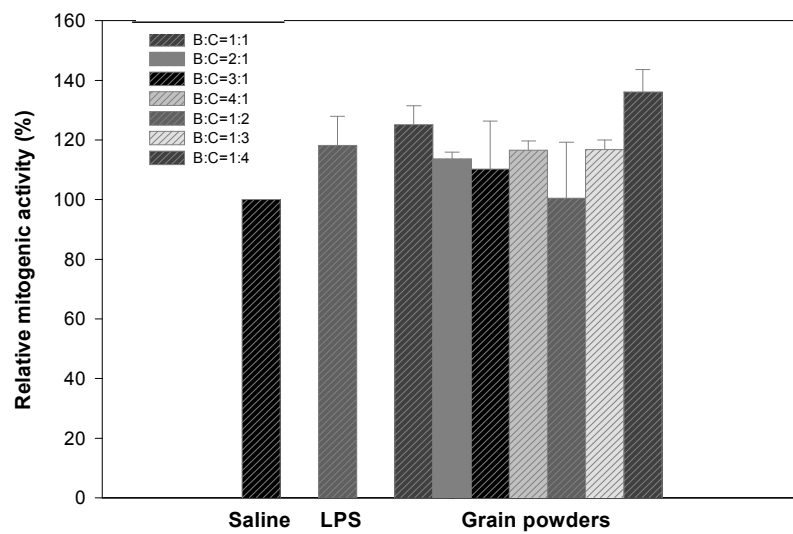


Figure 5–17. Relative mitogenic activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB–1 according to the ratio of barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB–1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

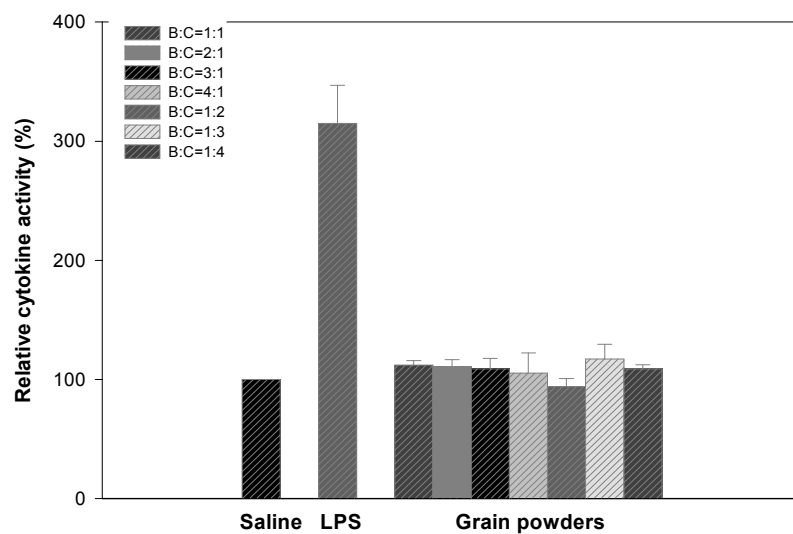


Figure 5-18. Relative cytokine activity (%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to the ratio of barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

4) EPS의 생산량이 가장 우수한 배양시간의 선정

보리와 찹쌀현미의 배합비율 1:2를 활용하여 *L. brevis* FSB-1을 배양할 때 배양시간에 따른 pH와 생균수의 변화에 대한 결과는 Table 5-13과 같다. pH는 6시간까지 급격하게 떨어진 다음 이 후부터 서서히 증가하기 시작하여 48시간까지 증가하였으며, 그 이후에는 큰 변화를 보이지 않았다. 생균수는 48시간까지 서서히 증가하는 경향을 보이다가 그 이후부터 감소하는 경향을 보였다(Table 5-13).

배양시간에 따른 EPS 수용액 중의 고형분함량은 40시간이후부터 증가하는 경향을 보이기 시작하였으며(Fig. 5-19), 총당함량은 24시간 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 54시간까지 증가하였으며 그 이후에는 다시 급격하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5-20).

면역활성 측정결과 항보체활성은 전반적으로 높은 수준의 활성을 보였다(Table 5-14). 특히 배양시간 12와 18시간에서 가장 높은 항보체 활성을 보였다.

Mitogen 활성 측정결과 전반적으로 비슷한 수준의 활성을 보였으며(Fig. 5-21), cytokine 활성 측정결과는 양성대조군인 LPS에 비해 전반적으로 낮은 활성을 보였다(Fig. 5-22). 그러나 mitogen 활성과 cytokine 활성을 비교해 볼 때 전반적으로 mitogen 활성이 높은 수준의 결과를 보였다.

위의 결과들로부터 EPS 생산량을 높이기 위해서는 보리와 찹쌀현미의 배합비율이 1:2이고 *L. brevis* FSB-1을 40°C에서 배양할 경우 배양시간은 최소 24시간 이상 최대 54시간을 초과해서는 안 된다. 또한 면역활성이 우수한 EPS의 생산을 위해서는 배양시간을 12시간에서 18시간으로 조절하는 것이 필요하다고 판단되었다.

Table 5-13. pH and viable cell count (cfu/mL) of cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to fermentation time

Fermentation time (hr)	pH	Viable cellcount (cfu/mL)	Fermentation time (hr)	pH	Viable cell count (cfu/mL)
control	5.69	-	30	4.14	4.9×10^8
0	4.59	3.6×10^7	36	4.22	4.1×10^8
6	3.78	2.0×10^8	42	4.26	4.2×10^8
12	3.83	4.0×10^8	48	4.28	4.6×10^8
18	3.99	3.7×10^8	54	4.27	3.9×10^8
24	4.06	3.5×10^8	60	4.33	2.7×10^8

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C with shaking at 100 rpm using the mixture (1:2) of barley and waxy brown rice.

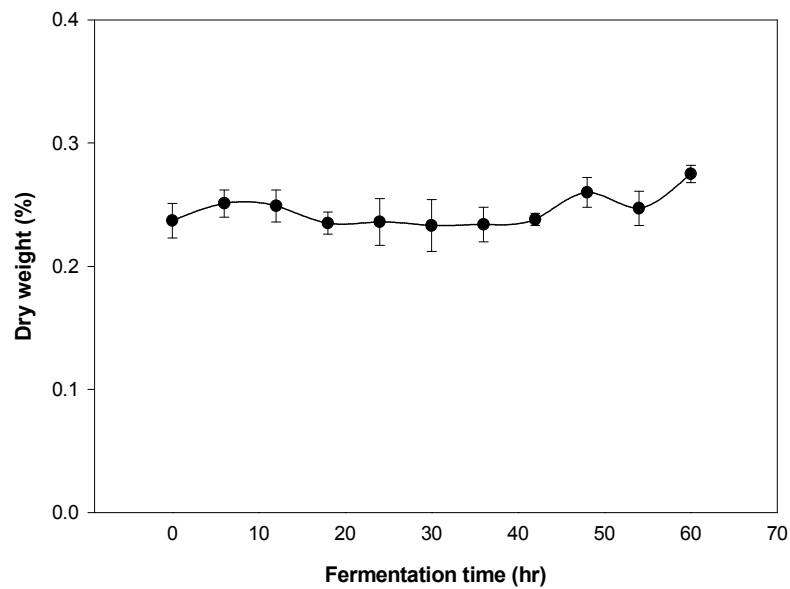


Figure 5-19. Dry weight(%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to fermentation time using mixture (1:2) of barley and waxy brown rice.

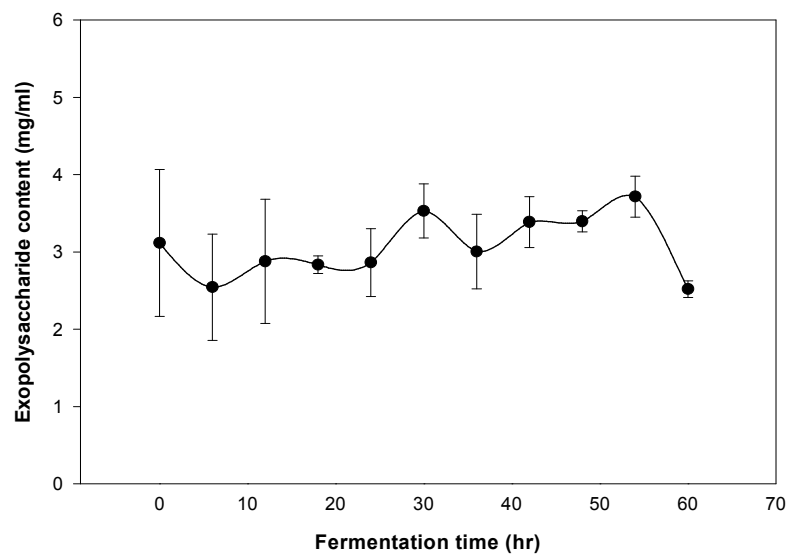


Figure 5-20. EPS (exopolysaccharide) content (mg/mL) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to fermentation time using mixture (1:2) of barley and waxy brown rice.

Table 5-14. Anti-complementary activity* (ITCH₅₀, %) of soluble EPS fraction from cultures by *Lactobacillus brevis* FSB-1 according to fermentation time using mixture (1:2) of barley and waxy brown rice

Fermentation time (hr)	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)	Fermentation time (hr)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
control	37.642±0.441 ^{f, 2)}	30	38.120±0.967 ^f
0	42.214±2.111 ^{bcde}	36	40.701±2.174 ^{cdef}
6	44.797±0.679 ^{ab}	42	41.592±0.309 ^{bcde}
12	46.568±0.210 ^a	48	40.159±2.782 ^{def}
18	46.173±0.616 ^a	54	39.324±0.707 ^{ef}
24	43.872±1.397 ^{abc}	60	42.884±1.320 ^{bcd}
PSK ³⁾	68.434±0.077		

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C with shaking at 100rpm using the mixture (1:2) of barley and waxy brown rice, and concentrations of grain powders and PSK were measured at 1,000 µg/ml. ¹⁾ The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

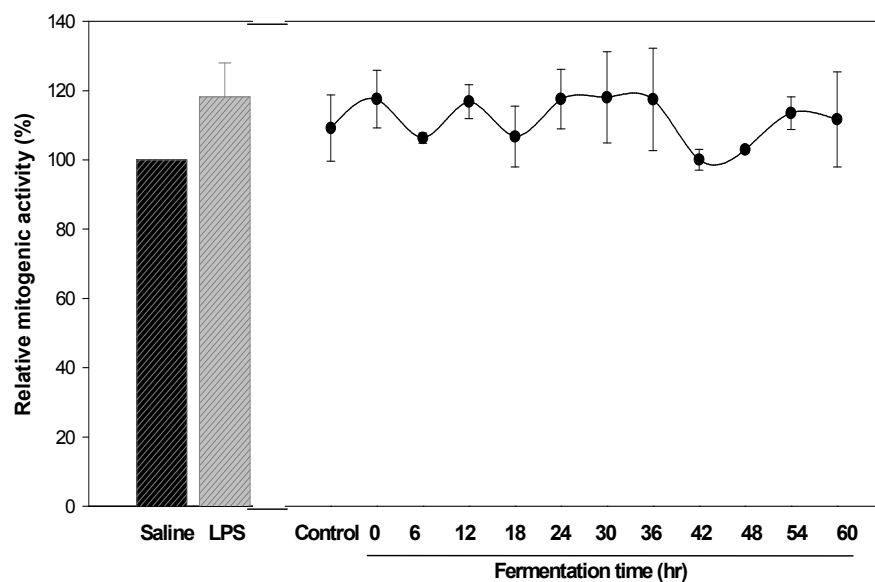


Figure 5-21. Relative mitogenic activity(%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to fermentation time using mixture (1:2) of barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

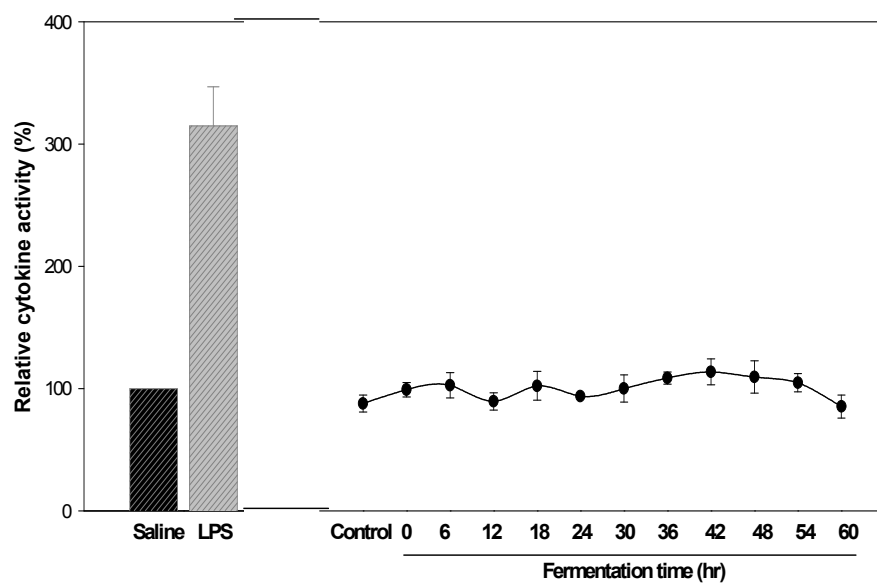


Figure 5-22. Relative cytokine activity(%) of soluble EPS fraction from cultures by *L. brevis* FSB-1 according to fermentation time using mixture (1:2) of barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

5) EPS의 생산량을 향상시키기 위해 곡물배지 제조과정 중 glucose와 amylase의 첨가효과

곡물배지(보리:참쌀현미=1:2)를 활용한 *L. brevis* FSB-1의 생육과정 중 EPS 생산수율의 향상을 위하여 배지 제조과정 중 glucose와 amylase를 각각 첨가 및 처리한 후 *L. brevis* FSB-1를 첨가하여 배양한 것과 *L. brevis* FSB-1를 첨가하지 않은 배지들에 대한 실험결과를 비교하였다. 그 결과 *L. brevis* FSB-1 배양액의 pH는 곡물만 배지로 사용한 것에 비해 곡물배지에 glucose 또는 amylase를 처리했을 때 훨씬 낮은 값을 보였다(Table 5-14). 또한 배양액으로부터 분리한 EPS 수용액 중의 고형분과 총당함량은 glucose나 amylase의 첨가 없이 곡물배지만을 *L. brevis* FSB-1으로 배양했을 때가 가장 높은 수준의 값을 보였다(Table 5-15). 이 결과로부터 곡물배지 중에 첨가된 glucose나 amylase처리에 의해 생성된 당은 EPS의 생산을 위해 사용하기 보다는 생육을 위해 주로 사용했다고 판단되었다.

그러나 면역활성 측정결과 항보체활성은 보리와 참쌀현미의 1:2배지를 amylase로 처리한 후 *L. brevis* FSB-1을 배양한 시료에서 월등하게 높은 항보체활성을 보였다(Table 5-16). Glucose를 첨가한 후 *L. brevis* FSB-1을 배양한 시료와 비교해 볼 때 *L. brevis* FSB-1는 glucose보다는 첨가된 amylase의 효소작용에 의해서 생성된 보리와 참쌀현미의 구성당들을 이용함으로써 보다 많은 항보체 활성물질을 생성하는 것으로 판단되었다.

반면, mitogen 활성과 cytokine 활성 측정결과 전반적으로 비슷한 수준의 활성을 보였으며(Fig. 5-23과 Fig. 5-24), 특히 cytokine 활성 측정결과는 양성대조군인 LPS에 비해 전반적으로 낮은 활성을 보였다. 그러나 mitogen 활성과 cytokine의 활성을 비교해 볼 때 전반적으로 mitogen 활성이 cytokine의 활성보다 높은 수준을 보였다.

위의 결과들을 종합해 볼 때 항보체 활성이 우수한 물질의 생산을 위해서는 보리와 참쌀현미를 1:2로 배합한 곡물배지에 amylase를 처리하여 *L. brevis* FSB-1이 이용할 수 있는 충분한 당을 생성시킬 수 있는 조건을 만든 다음 40°C에서 30시간 배양할 경우가 가장 높은 면역활성을 보일 수 있다고 판단되었다. 더 나아가서 *L. brevis*

FSB-1이 생육에 주로 이용하는 당의 구조와 면역활성이 높은 대사산물인 EPS의 생산을 위해 주로 이용하는 당들에 대한 종류 및 구조에 대한 보다 깊이 있는 연구가 필요하다고 판단되었다.

Table 5-15. pH, dry weight (%), and EPS (exopolysaccharides) content (mg/mL) from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 by glucose addition or amylase treatment to barley and waxy brown rice

Treatment condition	pH	Dry weight (%)	EPS (Total sugar) content (mg/mL)
B:C=1:2 (no fermentation)	5.81	0.198±0.010 ¹⁾	7.203±0.545
B:C=1:2 =1:2 (fermentation)	4.06	0.292±0.028	10.245±0.202
B:C=1:2 + 0.5% Glucose addition (no fermentation)	5.75	0.190±0.005	6.816±0.473
B:C=1:2 + 0.5% Glucose addition (fermentation)	3.27	0.214±0.022	7.584±0.564
B:C=1:2 + 0.5% Amylase addition (no fermentation)	5.32	0.204±0.019	7.673±0.228
B:C=1:2 + 0.5% Amylase addition (fermentation)	3.16	0.106±0.007	5.030±0.263

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100 rpm. ¹⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments.

Table 5-16. Anti-complementary activity* (ITCH₅₀, %) of soluble EPS fraction from cultures of *Lactobacillus brevis* FSB-1 by glucose addition or amylase treatment to barley and waxy brown rice

Treatment condition	Anti-complementary activity ¹⁾ (ITCH ₅₀ , %)
B:C=1:2 (no fermentation)	22.815±2.626 ^{bc, 2)}
B:C=1:2 (fermentation)	18.919±1.130 ^{cd}
B:C=1:2 + 0.5% Glucose addition (no fermentation)	16.948±4.725 ^{cd}
B:C=1:2 + 0.5% Glucose addition (fermentation)	16.017±2.565 ^d
B:C=1:2 + 0.5% Amylase addition (no fermentation)	27.468±0.378 ^b
B:C=1:2 + 0.5% Amylase addition (fermentation)	65.133±1.236 ^a
PSK ³⁾	69.099±3.992

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and PSK were measured at 1,000 µg/ml. ¹⁾ The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. ²⁾ The data were expressed as mean±SD of two separate experiments. ³⁾ Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coliolum versicolor* was used as a positive control. * Significantly differ at $p < 0.05$: means with the same letter are not significantly different.

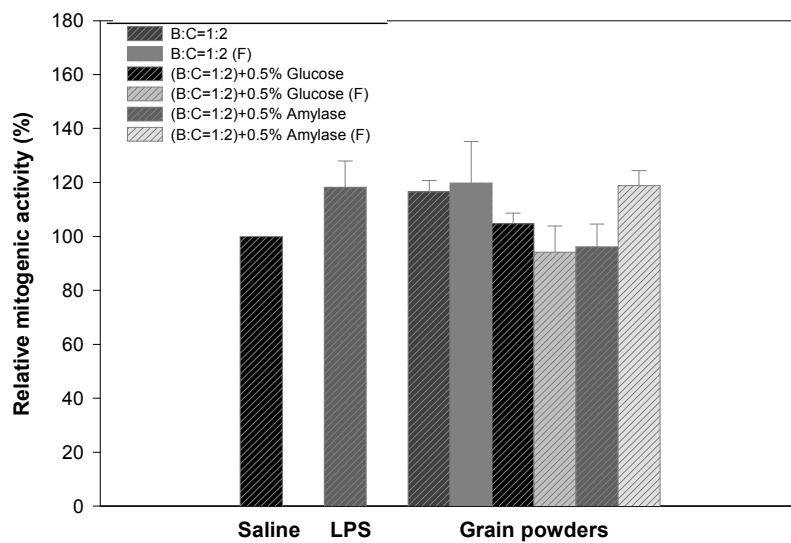


Figure 5-23. Relative mitogenic activity(%) of soluble EPS fraction from cultures of *L. brevis* FSB-1 by glucose addition or amylase treatment to barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB-1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 µg/mL and 10 µg/mL, respectively.

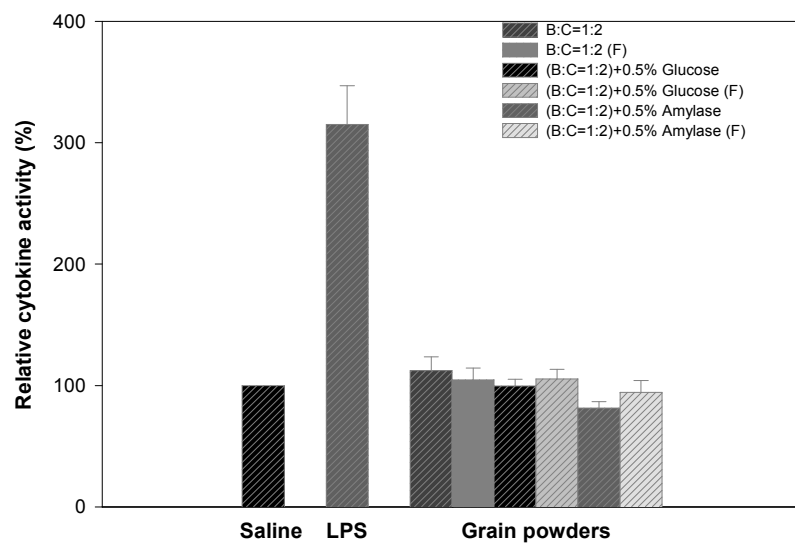


Figure 5–24. Relative cytokine activity(%) of soluble EPS fraction from cultures of *L. brevis* FSB–1 by glucose addition or amylase treatment to barley and waxy brown rice.

L. brevis FSB–1 was fermented at 40°C for 30 hr with shaking at 100rpm, and concentrations of samples by treatment conditions and LPS were measured at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

다. 실험결과를 이용한 시작품 제작

- 본 연구에서 장내 점착성과 면역활성이 우수한 것으로 판명된 *L. brevis* FSB-1 와 면역 활성이 우수한 *L. plantarum*주는 다양한 형태의 식품으로의 개발 가능성이 높은 것으로 판단되었으므로 이들을 이용한 활용 방안이 모색되었다.

[자료 1]

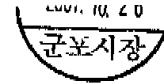
식품품목제조보고서			
보고인	① 성 명	배 송 환	② 주민등록번호 581122-
	③ 주 소		
영업인	④ 명칭(상호)	(주)새롭바이오	
	⑤ 소재지	군포시 금정동 689-6 한림벤처타운 201-1	
⑥ 식품의 유형		당류가공품	⑦ 영업신고번호 제 128 호
⑧ 제 품 명		락토바실러스 플랜타리움 배양수출물	⑨ 유통기간 제조일부터 2년
⑩ 원재료 또는 성분명 (별첨)			
⑪ 용 도 용 법 (별첨)			
⑫ 포장방법및포장단위 (별첨)			
⑬ 성 상 (별첨)			
⑭ 기 타			
<p>식품위생법 제22조 제6항 및 동법시행규칙 제25조의 규정에 의하여 식품품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2007년 10월 26일</p> <p style="text-align: right;">보고인 주식회사 새롭바이오 대표이사 배 송 환</p> <p style="text-align: left;">군포시장 귀하</p>			
<p>※ 구비서류</p> <p>1. 제조방법설명서 1부</p> <p>2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적기준 및 규격 검토서 1부(화학적 합성물이 아닌 식품첨가물과 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 또는 용기·포장에 한합니다)</p>			
<p>※ 안내</p> <p>○ 품목제조보고서는 제품생산의 개시전이나 개시후 7일 이내에 제출하여야 합니다.</p>			

1. 제품명 : 락토바실러스 플랜타넘 분해추출물

2. 식품의 유형 : 당류가공품

3. 원재료 및 성분명

① 말토덱스트린	99.5%
② 락토바실러스 플랜타넘 균체	0.5%
합 계	100%



4. 제조방법 및 설명서

생산된 포장용기에 포장한다.

5. 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없어야 한다.

6. 용도 및 용법 : 건강기능식품, 생식, 스낵, 음료, 유음료, 다류 등의 가공식품에 적당량 사용한다.

7. 포장단위 : 10kg, 20kg, 폴리에틸렌 내장 지대 또는 박스포장

8. 보존 기준 : 직사광선을 피하고 건조한 곳에 보관

9. 유통 기한 : 제조일로부터 24개월 까지

- 우선 본 연구 제 2절 1항에서 면역 활성 우수 균주로 선별된 김치유래 유산균주 *L. plantarum* 상기에 제시한 바와 같이, 균체를 분쇄하여 말토 덱스트린등과 혼합한 유산균체 당류가공품을 조제하고 2007년 10월 26일 관할 지방기관에 식품품목 제조 신고를 마쳤으며(자료 1참조), 시제품 형태로 제작하여 참여기업인 (주)새롬바이오에서 일부 예비 판매를 실시하였다.

- 동 시제품 락토바시러스 플란타넘 분해 추출물은 자료 2 - 4에 제시한 바와 같이 다양한 식품 및 건강기능식품 제조회사에 소재로 판매되어 이를 응용한 다양한 제품이 생산되고 있으며, 각 제품에서 양호한 효능을 보인다는 평가를 받고 있다.

[자료 2]

식품(식품첨가물)품목제조보고서

178-071

보고인	(1) 성 명	본 협 국	(2) 주민등록번호	570314-
	(3) 주 소			
제조업소	(4) 명칭 (상호)	㈜내추빌에프앤피		
	(5) 소재지	충청북도 청원군 모란읍 송대리 319-11		
(6) 식품의 유형	기타가공품	(7) 영업허가(신고)번호	제 178 호	
(8) 제조명	글라리 락바	(9) 유통기간	제조일로부터 2년	
(10) 원재료 또는 식재료	(별첨)			
(11) 용도 용법	(별첨)			
(12) 포장방법 및 포장단위	(별첨)			
(13) 설 사	(별첨)			
해 기 타				

식품위생법 제22조 제6항 및 농림수산물규격 제25조의 규정에 의하여 식품(식품첨가물) 품목제조사항을 보고합니다.

원 본 대 조 필

2007년 11월 14일

확인자: **신성수**

청원군청

2007년 11월 일

보고인 본 협 국 (서명:)

※ 구비서류

- 제조방법서 1부
- 식품위생검사기관이 발급한 식품종의 표시적기준 및 구성 성분서 1부 (화학적 함량분이 아닌 식품적기준과 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 또는 용기, 포장에 관한 사항)

※ 품목제조보고서는 제24조의 기시점이나 개시후 7일 이내에 제출하여야 합니다.

제조방법설명서

- 1. 제품명 : 클라라 리바
- 2. 제품의 유형 : 기타가공품
- 3. 원재료 또는 성분명

치킨지리부알	55.000 %	니카반산아미드	0.300 %
말피소르민말	17.000 %	반포텐산칼슘	0.300 %
콩콩마디주물장분말	9.900 %	비타민B1복합염	0.150 %
다시마분말	7.297 %	비타민B6복합염	0.150 %
요오우물분말	3.600 %	비타민B2	0.100 %
말크씨알주물분말	2.000 %	DL 메티오닌	0.100 %
나 시스틴	2.000 %	구아타이제	0.100 %
수산고가수분해물주물분말	1.000 %	키리넥세스	0.100 %
윤금분말	0.500 %	비타민B12순제분말	0.002 %
비타민C	0.500 %	비우현	0.001 %
		합 계	100.00 %

4. 원 산 : 고유의 색채와 향미를 가지고 이미·이취가 없어야 한다.

5. 제조방법

- 가. 원료 점검검사 - 원료를 그 기준과 규격에 적합하고 이물이 없는 것을 사용한다.
- 나. 혼합 - 원료검사 결과 적합함에 의하여 제조배합비율에 따라 혼합한다.
- 다. 혼합 - 혼합된 원료를 혼합기를 이용하여 균질하게 혼합한다.
- 라. 혼합 - 혼합된 원료를 밀정량의 권제수와 함께 혼합기로 혼합한다.
- 마. 혼합 - 혼합된 원료를 정량, 제분, 정형기를 이용하여 성형한다.
- 바. 건조 - 성형된 제품을 건조기에서 건조(수분함량 10%이하)한다.
- 사. 포장 - 포장기로 포장한다.
- 아. 포장 - 건조된 제품을 포장방법에 따라 포장한다.
- 자. 품질검사 및 단위포장 - 최종건시 결과 적합함에 의하여 포장단위별로 포장 불고한다.

6. 포장방법 및 포장단위 :

포장 단위별로 포(내면PE)포장 후 포장단위별로 박스 포장한다.

포장단위 : 1포 5.5g X (10, 30, 60, 90, 120, 150, 180포)

- 7. 용도 및 용법 : 1일 2회, 1회 1포(5.5g)씩 음과 함께 섭취하십시오.
- 8. 보존 및 유통기한 : 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하여야 한다.
- 9. 유통기한 : 제조일로부터 2년 (유통기한연장사유서 면제)

[자료 3]

[별지 제20호서식]

식품 품목 제조 보고서			
보고인	① 성 명	정 명 수	② 주민등록번호 640725-
	③ 주 소		
영업소	④ 명칭(상호)	주 식 회 사 합 미 양 햄	
	⑤ 소재지	경기도 파주시 문신읍 운천1리 18-19번지	
⑥ 식품의 유형	기타가공품	⑦ 영업신고번호	경기 파주 제49호
⑧ 재 료 명	센스라인플러스	⑨ 유통기간	제조일부러 24개월
⑩ 원재료또는성분명	(별 칩)		
⑪ 용 도 용 법	1일 2회, 1회1포, 물과 함께 섭취(식후).		
⑫ 포장방법 및 포장단위	5.5g × 14포(77g), 5.5g × 15포(82.5g), 5.5g × 20포(110g), 5.5g × 30포(165g), 5.5g × 60포(330g), 5.5g × 90포(495g) 등. 내포장재질 : 폴리에틸렌(PE)		
⑬ 성 상	감염의 과립으로 이미, 이취, 이음이 없다.		
⑭ 기 타			
식품위생법 제22조 제6항 및 용법 시험규칙 제25조의 규정에 의하여 식품(식품첨가물) 품목 제조 사항을 보고합니다. 2 0 0 7 년 11 월 30 일 보 고 인 정 명 수 (사 양 햄 양 회 사)			
파주시장 귀하		지방의료기술서기보 조성계 원본대조필 년월일 2007.11.30	
※구비서류 1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품 등의 안전성 기준 및 기타 검포제 1부(과학적 합성품이 아닌 식품 첨가물과 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 또는 용기·포장에 합합니다)			
※안내 * 품목제조보고서는 제품생산의 개시전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.			

1. 제품명 : 센스라인플러스

2. 식품의 유형 : 기타가공품

3. 원재료 또는 성분명

차전자피	58.2 %
발효소맥분말	30.9 %
효모추출물	3.6 %
락토바실러스 플랜타린 분해추출물	3.6 %
효소저리스테미아	1.6 %
다시마분말	0.8 %
함초분말	0.8 %
민삼황	0.5 %
계	100 %

4. 제조방법

- 1) 원료를 구입하여 자체 규격검사를 거쳐 적합품에 한하여 원료로 사용한다.
- 2) 원료를 #No.20 Mesh체를 이용하여 사별한다.
- 3) 사별이 완료된 원료를 혼합기를 이용하여 혼합한다.
- 4) 혼합이 완료된 원료를 과립기를 이용하여 일정하게 과립을 실시한다.
- 5) 과립이 완료된 원료를 건조기를 이용하여 건조한다.
- 6) 건조된 원료를 스틱포장기를 이용하여 스틱포장을 실시한다.
- 7) 스틱포장을 케이스에 포장하고 인색을 실시한다.
- 8) 완제품을 자가 시험한 후 적합품에 한하여 제품 창고에 입고한다.

5. 성상

찰색의 과립으로 이취, 이취, 이물이 없다.

6. 권장섭취량 및 섭취방법

1일 2회, 1회1포, 물과 함께 섭취(식후).

7. 포장방법 및 포장단위

5.5g * 14포(77g), 5.5g * 15포(82.5g), 5.5g * 20포(110g),
5.5g * 30포(165g), 5.5g * 80포(330g), 5.5g * 80포(495g) 등.
내포장재질 : 폴리에틸렌(PE)

8. 유통기한

제조일로부터 24개월 까지

9. 보관방법

고온다습한 곳이나 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관 하십시오.

유통기간설정사유서

1. 제품명 : 샌스라민플러스
2. 원료명 : 차진지피 , 박호스페르탈, 고모우츄를, 락토바실러스 플르타닐 문헌주출물, 다시마분말, 함초분말 , 인삼향 , 효소처리스테비아
3. 성분 : 고유의 색채와 향미를 가진 감색의 과립으로서 미미, 이취, 이물이 없음.
4. 보존 및 유통기간 : 고온다습한 것이나 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관.
5. 제조시험
 - 1)제조과정 : 원료 - 혼합 - 혼합 - 연한 - 과립 - 건조 - 검사 - 포장 - 제품
 - 2)제품생산에 사용되는 기계·기구류는 당해 제품 생산 전 이물, 미생물의 오염이 없도록 세척 및 살균 실시
 - 3)제품생산 과립 중 이물, 미생물의 오염이 없도록 생산 현장 종사자의 위생관리 및 생산현장의 오염원과의 분리 설치
6. 유통조건 및 유사품과의 비교
식품유통의 한 마다제품의 생산 유통기한은 24개월 이내로 설정되디 있으며 그보다슬허거나 직사광선을 피해 건조한곳에 보관하는 것을 권장하고 있음.
7. 원료
원료 및포장 미생균, 수분, 이물 등의 생물학적, 이화학적 실험을 통해 식품의 일반규격에 적합한 인공안료 제조에 사용
8. 포장재질 및 형태
본제품 원료는 과립으로 스틱포장에 용이, 밀봉되어 외부로부터 공기유입, 수분흡수, 미생발육, 이물혼입이 차단되어 한제할 저장시 안정한 상태를 유지할수 있음.
9. 유통기한 설정근거
 - 1)기준의 유통기한을 초과하지 않는 범위에서 설정.
 - 2)제품생산 전 생산에 사용되는 기계 및 기구류의 세척 및 살균을 실시하며 생산과정 중 미생물과 이물이 혼입이 없도록 위생적 작업실에서 생산 및 현장 종사자의 위생관리 실시.
 - 3)생산이 종료 후 제품이 유통관리에 의해 제품의 미생물학적 모든 지표값인 대장균군 오염여부와 생상의 적정여부를 감별하여 자기품질 검사 합격 제품만을 보관, 유통함.
 - 4)식품포장용으로 사용된 용기에 유통과정 중 인습 방지 및 미생물, 이물의 혼입을 방지하기 위해 스틱포장으로 밀봉포장 함으로써 생산 후 포장단계에서 미생물과 이물의 혼입이 없는 상태에서 적정 유통기한을 24개월로 설정함.
 - 5)유통기한 설정을 위하여 가속실험 결과 제품의 미생물 관식이 없다고 판단되어 유통기한을 24개월로 설정함.

[자료 4]

제 2004-0006-0527 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호): 제 2004-0006 호
업 소 명: 일진제약주식회사
소 재 지: 경기도 화성시 향남면 상신리 902-1
영 업 의 종 류: 건강기능식품전문제조업
제 품 명: 하나래식이섬유
(영양보충용제품)
품목 제조 조건:

건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법
시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능
식품품목제조신고를 수리합니다.

2008년 02월 12일

식품의약품안전



제조방법실명서

사자일자:2008-02-12

제품명	하나레식이섬유
제품의 유형	영양보충용제품
원료 및 배합비율	차전자피(식이섬유 90.0% 이상)(52.31%), 반효분말(밀분말 56%, 맥스프린 20.7%, 알곡에야모레제 스추출물 20.6%, 백실향 1.6%, 체제소금 1.1%)(36.92%), 효모추출분말(1.54%), 유산균분해추출분말(알로베스트린 69.5%, Lactobacillus paracasei 0.5%) (1.54%), 포스퍼리스타비아(1.15%), 당귀분말(1.05%), 허수오분말(1.05%), 강근분말(1.05%), α-아밀라아제(1.05%), 히드록시프로필베타덱스트로스(1%), 이산화규소(1%), 키리산은 합제제(맥스프린 9%, 거세농축액 2%, 이산화규소 1%)(3.6%)
제품의 형태	편한 살색의 분말.
포장재질	폴리에틸렌(PE), HDPE(고밀도폴리에틸렌), PET(폴리에틸렌테레프탈레이트), PP(폴리프로필렌), PS(폴리스티렌)
포장양형	포 포장
포장단위	6.5g * 1, 2, 6, 10, 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300포. 등
보존 및 유통기준	수분, 빛에 의해 품질에 영향을 받을 수 있으므로 직사광선을 피해 저류하고 건조한 곳에 보관하십시오. 어린이 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시오.
섭취량 및 섭취방법	1일 2회, 1회 1포(6.5g)를 충분한 양의 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	보통 제품으로 섭취 시 목에 걸리지 않도록 주의하십시오. 섭취 시 위장장애, 소화불량의 증상이 있을 경우 섭취를 중단하십시오. 개인의 신체 상태에 따라 이상 증상이 생길 경우 섭취를 중단하십시오. 섭취 전 제품에 이상이 있는 경우 섭취를 유하십시오. 특정 알러지 성분에 알레르기 체질은 위요 신분을 확인 후 섭취하십시오.
유통기간	제조일로부터 2년.
주된기능성	배변활동 원활, 체중감량에 도움, 지방흡수지하.
제조방법	1) 모든 원료는 건강기능식품안전, 식품안전, 식품첨가물용원 기준 규격에 적합한 원료를 구매하여 품질관리 후 격합한 것만 사용한다. 2) 청량성 작업에 사용하는 모든 기계 기구 및 장비는 식품용 수정 에탄올 용액으로 소독하여 건조 후에 사용한다. 3) 내용물의 조제 ① 청량성 저울에 적당한 용기(비닐백 또는 스테인레스 용기)를 사용하여 구입한 원료들을 정확히 계량한다. ② 내용물 전체 양의 20%량 난물이 에탄올(95%)을, 1%량 난물의 히드록시프로필베타덱스트로스분 첨가하여 가온 용해시켜 세팅액을 제조한다. ③ 차전자피와 반효분말을 세팅액을 이용하여 파인한 후 60℃에서 5시간 정도 건조시킨다. ④ 건조한 세팅분말과 청량성 나머지 분말 원료 함께 혼합기에 넣어 GMP로 1시간 동안 혼합한다. ⑤ 수분을 측정후 품질관리부서에 내용물 시험 의뢰한다. (품질관리항목 : 색상, 수분, 대장균 등) ⑥ 시험결과 적합 승인된 내용물은 공시 대기한다. 4) 포장 공정 ① 자동충전기를 이용하여 포에 빈제품인 분말은 충전한다. ② 알정원 보충 수게이스에 넣고 소케이스와 실명서를 내게이스에 넣어 완제품 포장을 한다. ③ 품질관리부서에 부차 후 품질관리 부서에 시험 의뢰한다. (품질관리항목 : 식이섬유보충용제품의 기준규격) 5) 일제품 출하 전 후 시험된 제품에 대하여 품질관리인의 출하 승인하에 출제한다.

- 장관집착능과 면역활성이 높았던 *L. brevis* FSB-1은 현재 균주특허를 획득하기 위하여 균주기탁을 마쳤으며 전문 변리사를 위촉 특허출원을 진행 중에 있다.
- 특허 출원이 완료 시점을 기준으로 하여 *L. brevis* FSB-1 균주를 이용한 다양한 식품 형태, 즉 제 2절 제1,2항에서 연구된 결과를 바탕으로 다양한 곡류발효물과 균체 추출물, 생균제등을 제조하여 참여기관인 새롬바이오에서 시판할 예정이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

다음은 연구계획서에서 제시한 연차별 연구개발 목표와 내용이다.

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2006)	세부과제: 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Colonic mucin-binding assay의 분석조건을 확립 - 확립된 분석방법을 활용한 장내 점착성(점착능) 우수균주 분리 및 동정 - 분리균주의 산내산성 및 내담즙성 평가 	100%
	협동과제: 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 면역활성 우수균주 분리 - 분리균주의 EPS 생산능력 확인 및 생산조건 확립 	100%
2차년도 (2007)	세부과제: 장내 점착성이 우수한 균주 개발 및 점착 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 분리 균주의 점착특성 평가를 위한 lectin 분리 - 분리된 lectin을 활용한 점착특성 및 기작 평가 - Polyclonal antibody를 활용한 균주 점착성에 대한 <i>in vivo</i> 실험 	100%
	협동과제: 면역활성이 우수한 균주 분리 및 발효 유제품 starter 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 분리균주의 면역 특성 평가 - 분리균주의 면역활성에 대한 실험 동물에 의한 <i>in vivo</i> 실험 - Starter에 의한 시제품 생산 	100%

본 연구를 통해 장내점착성과 면역 활성이 공히 우수한 *L. brevis* FSB-1와 면역활성이 강한 *L. plantarum* 균주를 선별하고 이들의 점착특성 및 면역 특성이 invitro와 , invivo 상에서 규명되었다. 이들이 생산하는 EPS의 생성조건과 곡물 발효에의 응용성이 검토되었다. 따라서 이들은 유산음료 및 곡류발효 제품의 응용에 있어 중요하게 사용될 수 있으리라 판단된다.

제 5 장 연구개발결과와의 활용계획

- 발효 유제품생산에 응용: 유제품 발효에 사용되는 젖산균은 정장작용 등 다양한 생리활성을 부여 하는데 있어서 가장 중요한 것이 장내 점착성이다. 따라서 장내 점착성이 우수한 균주와 더불어 면역활성이 우수한 균주를 활용함에 따라 젖산균 발효제품의 생리활성을 극대화할 수 있음.
- 프로바이오틱스로 활용: 발효 유제품 생산 외에 젖산균이 지니는 생리활성을 활용할 수 젖산균제제, 즉 프로바이오틱스로의 활용이 가능함.
- 기능성 식품 개발: 유산균의 생리활성을 응용한 기능성 식품의 소재로 활용이 가능함에 따라 국민건강 증진 효과를 꾀할 수 있음.
- 유산균외의 장내 유용 미생물 분리: 장내에는 유산균 이외의 다양한 세균들이 균형에 의해 장의 건강을 유지할 수 있다. 특히 장내 세균총이 탄소원으로 이용하는 단쇄지방산 (acetic acid, propionic acid, butyric acid)은 장의 건강에 중요한 역할을 한다. 이러한 단쇄 지방산중에 butyric acid는 다른 단쇄지방산에 비해 장점막의 건강을 유지하는데 매우 효과적이다. 따라서 본 연구에서 개발된 colonic mucin-binding assay를 활용한다면 butyric acid 생산성이 우수하고 장내 점착성이 뛰어난 균주의 분리가 가능함으로 정장작용을 할 수 있는 다양한 균주의 분리가 가능할 것임.
- 면역 증진 소재로의 활용: 면역활성이 우수한 유산균을 분리함에 따라 이를 대량 배양하여 면역활성 물질만을 회수함에 따라 면역증진 소재로의 개발 및 활용이 가능함.

제 6 장 참고문헌

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. W.B. Saunders, London, UK (2000)
- A.O.A.C. (Official Methods of Analysis), 12ed., Washington D.C. (1976)
- Arthur C, Ouwehand PV, Kirjavainen CS, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9: 43–52 (1999)
- Avall-Jaaskelainen S, Kyla-Nikkila K, Kahala M, Miikkulainen-Lahti T, Palva A. Surface display of foreign epitope on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5943–5951 (2002)
- Avall-Jaaskelainen S, Lindholm A, Palva A. Surface display of the receptor-binding of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive Lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2230–2236 (2003)
- Benedetti R, Massouh E, Flo J. The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. *Immunol. Lett.* 48: 109–115 (1995)
- Benjamini EG, Lesrowitz S. Immunology a short course. 3th ed. Wiley-liss, New York, USA (1996)
- Berrada N, Piaia, M, Thouvenot P. *Bifidobacterium* from fermented milks; survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409 (1991)
- Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Riva I, Di Fronzo G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr. Cancer* 28: 93–99 (1997)
- Bibiloni R, Perez PF, De Antoni GL. Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture. *Anaerobe* 5: 483–485 (1999)
- Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand

- AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 405–410 (1999)
- Bomba A, Kravjansky I, Kastel R, Herich R, Juhasova Z, Cizek M, Kapitancik B. Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* upon the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 to the intestinal mucosa in gnotobiotic lambs. *Small Ruminant Res.* 23: 199–206 (1996)
- Bouh KCS, Mittal KR. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains by using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 66: 67–80 (1999)
- Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1689–1696 (1992)
- Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kerneis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2034–2039 (1992)
- Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8: 487–490 (1998)
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1–12 (1987)
- Cowan NR, Steel KJ. *Manual of the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA. pp. 147, 161 (1984)
- Desai KM., Akolkar SK., Badhe YP., Tambe SS., Lele SS. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques. *Process Biochem.* 41, 1842–1848 (2006)

- DuBois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal. Chem.* 28, 350–356 (1956)
- Elina R, Erja M, Maria S, Merja RK, Johannes A, Airi P. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 63–74 (2003)
- Elo S, Saxelin M, Salminen S. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 154–156 (1991)
- Emma Arskold, Malin Svensson, Halfdan Grage, Stefan Roos, Peter Radstrom, Ed W.J. van Niel. Environmental influences on exopolysaccharide formation in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 159–167 (2007)
- Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 217–221 (1999)
- Fang H, Elina T, Heikki A, Salminen S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29: 47–52 (2000)
- Fernandes CF, Shahani KM. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Prot.* 53: 704–710 (1990)
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365–378 (1989)
- Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 755–773 (2003)
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 833–839 (2001)
- Gold DV, Shochat D, Miller F. Protease digestion of colonic mucin. *J. Biol. Chem.*

- 256: 6354–6358 (1981)
- Goldin BR. Health benefits of probiotics. *Brit. J. Nutr.* 80: S203–S207 (1998)
- Goodfellow M, Manfio GP, Chun J. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. pp. 25–29. In: *The Units of Biodiversity– Species in Practice*. Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (ed). Chapman and Hall, London, UK (1997)
- Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of Lactobacilli to human Caco–2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4487–4494 (1994)
- Haberer P, du Toit M, Dicks LMT, Ahrens F, Holzapfel WH. Effects of potentially probiotic lactobacilli on fecal enzyme activity in minipigs on a high–fat, high–cholesterol diet—a preliminary *in vivo* trial. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 287–291 (2003)
- Hamilton–Miller JMT. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicro. Agents* 22: 360–366 (2003)
- Harding LP, Marshall VM, Hernandez Y, Gu Y, Maqsood M, McLay N, Laws AP. Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. *Carbohydr Res.* 340, 1107–1111 (2005)
- Hay FC, Westwood OMR. Immunological manipulations *in vivo*. pp. 326–333. In: *Practical Immunology*. 4th ed. London, UK (2002a)
- Hay FC, Westwood OMR. Monoclonal antibodies: production, purification and enzymatic fragmentation. pp. 40–70. In: *Practical Immunology*. 4th ed. London, UK (2002b)
- Haza AI, Zabala A, Morales P. Protective effect and cytokine production of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from ewes' milk cheese. *Int. Dairy J.* 29: 1–10 (2003)
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison

- of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30: 43–47 (2001a)
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hosoda M, Benno Y, Salminen S. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr. Microbiol.* 43: 351–354 (2001b)
- Henriksson A, Conway PL. Adhesion to porcine squamous epithelium of saccharide and protein moieties of *Lactobacillus fermentum* strain 104-S. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2657–2661 (1992)
- Henriksson A, Szewzyk R, Conway PL. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 499–502 (1991)
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101 (1998)
- Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomed.* 5: 353–360 (1998)
- Huang Y, Kotula L, Adams MC. The *in vivo* assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1781–1787 (2003)
- Hynonen U, Westerlund-Wikstrom B, Palva A, Korhonen TK. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin- binding function in the Slp A surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* p. 3360–3367 (2002)
- Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444S–450S (2001)
- Jakava-Viljanen M, Avall-Jaaskelainen S, Messner P, Sleytr UB, Palva A.

- Isolation of three new surface layer protein genes (*slp*) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* p. 6786–6795 (2002)
- Janeway CA, Travers P, Walport M. The immune system in health and disease. Garland Publisher, New York, USA (1994)
- Jonsson H, Strom E, Roos S. Addition of mucin to the growth medium triggers mucus-binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 19–22 (2001)
- Jung CM, Kang KH. Industrial utilization and future prospect of lactic acid bacteria. *Bioindus. News(korea)* p. 16–22 (1997)
- Jung MJ. Industrial application of lactic acid bacteria. *Bioindus. News(korea)* p. 44–46 (1997)
- Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyos kaki* L. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 879–884 (2002)
- Kabat EA, Mayer MM. Complement and complement fixation. pp. 133–240. In: *Experimental Immunochemistry*. 2nd ed. Charles, C. (ed). Thomas Publisher, Illinois, USA (1971)
- Kahala M, Savijoki K, Palva A. *In vivo* expression of the *Lactobacillus brevis* S-layer gene. *J. Bacteriol.* p. 284–286 (1997)
- Kandler O, Weiss N. Regular, nonsporing gram-positive rods. pp. 1208–1260. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1986)
- Kankaanpaa PE, Salminen SJ, Isolauri E, Lee YK. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* 194: 149–153 (2001)
- Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria.

- Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* 60: 3664–3672 (1992)
- Kenji Y, Takuya M, Hiromu T, Tomokazu N, Kyoko S, Tetsuki T, Hidehiko K. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochem. Biophysic. Res. Communi.* 228: 148–152 (1996)
- Kim DS, Kim SY, Kim CC, Min CG, Park SJ, Seo YH, Yeum HS, Jung NG, Jung DC, Jung TJ, Jin JY, Han CH. *Immunological biotechnology*. 4th. ed. Lifescience, Oxford, UK (2000)
- Kim JH, Shin KS, Lee H. Chracterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 290–295 (2002)
- Kimmel SA, Roberts RF. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 87–92 (1998)
- Kim ML, Slauch JM. Effect of acetylation (O-factor 5) on the polyclonal antibody response to *Salmonella typhimurium* O-antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26: 83–92 (1999)
- Kim TH. Development of therapeutic product using lactic acid bacteria. *Bioindus. News(korea)* p. 28–35 (1994)
- Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 185–189 (1998)
- Kishi A, Kazuko U, Matsubara Y, Okuda C, Kishida T. Effect of oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *Coagulans* on interferon- α producing capacity of humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 15: 408–412 (1996)
- Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular

- phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Int. J. Food Microbiol. 40: 169–175 (1998)
- Kitazawa H, Ishii Y, Uemura J, Kawai Y, Saito T, Kaneko T, Noda K, Itoh T. Augmentation of macrophage function by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Food Microbiol. 17: 109–118 (2000)
- Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. Int. J. Food Microbiol. 85: 11–21 (2003)
- Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics. Int. J. Food Microbiol. 50: 45–57 (1999)
- Kwon MH, Sung HJ. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. Food Sci. Indus. 30: 30–43 (1997)
- Lamli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond.) 227: 680–685 (1970)
- Lee SK, Ji GE. Antimutagenic effects of bifidobacteria. Kor. J. Food Sci. Technol. 28: 4 796–799 (1996)
- Lee YK, Salminen S. The coming of age of probiotics. Trends Food Sci. Technol. 6: 241–245 (1995)
- Levander F, Svensson M, Radstrom P. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 784–790 (2002)
- Maassen CBM, Holten-Neelen CV, Balk F, Bak-Glashouwer M-JHD, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJA, Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. Vaccine 18: 2613–2623 (2000)
- Macedo MG, Lacroix C, Gardner NJ, Champagne CP. Effect of medium

- supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *Int. Dairy J.* 12, 419-426 (2002)
- Macfaddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA. pp. 36 (1984)
- Martensson O, Duenas-Chasco M, Irastorza A, Oste R, Holst O. Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36, 353-357 (2003)
- Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H, Benno Y. Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM 512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. *Curr. Microbiol.* 44: 212-215 (2002)
- Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82: 2525-2529 (1999)
- Matsuzaki T. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 133-140 (1998)
- Mellisa LC, Connie IE, Wang TN, Fumio Y, Daryl WO. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, and Streptomycin-resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. *J. Food Prot.* 56: 954-957 (1993)
- Metchinikoff E. The prolongation of life. In: *Optimistic Studies*. Wiliam Heinemann, Ltd., London, UK (1907).
- Methods for General and Molecular Bacteriology; American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994)
- Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am. Soc. Clin. Nutr.* 71: 861-872 (2000)
- Murty VLN, Downs FJ, Pigman W. Rat-colonic mucus glycoprotein. *Carbo. Res.*

- 61: 139–145 (1978)
- Nardi RD, Santos ARM, Carvalho MAR, Farias LM, Benchetrit LC, Nicoli JR. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. *Anaerobe* 5: 409–411 (1999)
- Ohara S, Watanabe T, Hotta K. Comparative study of carbohydrate portion of gastrointestinal mucins using enzyme–linked lectin–binding assay (ELLA). *Comp. Biochem. Physiol.* 116: 167–172 (1997)
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen SJ. Adhesion of four *Bifidobacterim* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 61–64 (1999a)
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkko S, Salminen SJ. The mucus bining of *Bifidobacterium lactis* Bb 12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 10–13 (2000a)
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Gronlund M–M, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic micro–organism to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* 9: 623–630 (1999b)
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9: 43–52 (1999c)
- Ouwehand AC, Niemi P, Salminen SJ. The normal fecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 35–38 (1999d)
- Ouwehand AC, Salminen SJ. The health effects of cultured milk products with viable and non–viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749–756 (1998)
- Ouwehand AC, Salminen S, Roberts PJ, Ovaska J, Salminen E. Disease–dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal

- mucosa. Clin. Diag. Lab. Immunol. 10: 643–646 (2003)
- Ouwehand AC, Tolkkio S, Kulmala J, Salminen S, Salminen E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. Lett. Appl. Microbiol. 31: 82–86 (2000b)
- Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Int. J. Food Microbiol. 64: 119–126 (2001)
- Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. Int. J. Oncol. 3: 473–476 (1993)
- Perret V, Lev R, Pigman W. Simple method for the preparation of single cell suspensions from normal and tumorous rat colonic mucosa. Gut 18: 382–385 (1977)
- Plant LJ, Conway PL. Adjuvant properties and colonization potential of adhering and non-adhering *Lactobacillus* spp. following oral administration to mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 34: 105–111 (2002)
- Playfair JHL. In immunology at a glance. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, London, UK (1987)
- Podolsky DK. Oligosaccharide structure of human colonic mucin. J. Biol. Chem. 260: 8262–8271 (1985a)
- Podolsky DK. Oligosaccharide structure of isolated human colonic mucin species. J. Biol. Chem. 260: 15510–15515 (1985b)
- Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJA. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. J. Biotechnol. 44: 183–192 (1996)
- Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Bak-Glashouwer M-JH, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J, Conway PL. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purpose. Int. J. Food Microbiol. 41: 155–167

(1998)

- Raamsdonk MV, Mei HCV, Soet JJD, Busscher HJ, Graaff JD. Effect of polyclonal and monoclonal antibodies on surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun.* 63: 1698–1702 (1995)
- Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Micro. Infect.* 4: 319–324 (2002)
- Ronka E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 63–74 (2003)
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10: 107–110 (1999)
- Saxelin M, Pessi T, Salminen S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ACTT 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 199–203 (1995)
- Shen P, Fan XR, Li GW. The SEM study. pp. 52–63. In: *Laboratory Experiments in Microbiology*. 3th ed. High Education Press, Beijing, China (1999)
- Sherwood L, Gorbach MD. Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterol.* 95: 2–4 (2000)
- Shimura K, Ito H, Hibasami H. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jpn. J. Pharmacol.* 33: 403–408 (1983)
- Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P. Mucin coating on polymeric material surface to suppress bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 17: 229–239 (2000)
- Shin KS. Potential utilization and medical activity of pectic substance. *Food Sci. Indus.* 32: 91–101 (1999)
- Shin MS, Yu KW, Shin KS, Lee H. *In vitro* bone marrow cell proliferation of cell

- wall preparation from *Bifidobacterium bifidum* SL-21. Kor. J. Food Sci. Technol. 36: 484–489 (2004)
- Sleytr UB, Sara M, Pum D, Schuster B. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. Pro. Sur. Sci. 68: 231–278 (2001)
- Slomiany BL, Murty VLN, Slomiany A. Isolation and characterization of oligosaccharides from rat colonic mucus glycoprotein. J. Biol. Chem. 255: 9719–9723 (1980)
- Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. J. Mol. Biol. 305: 245–257 (2001)
- Sutherland IW. Novel and established applications of bacterial polysaccharides. Trends Biotechnol. 16, 41–46 (1998)
- Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effects of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. Int. J. Immunopharmacol. 12: 675–684 (1990)
- Takahashi N, Saito T, Ohwada S, Ota H, Hashiba H, Itoh T. A new screening method for the selection of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria with high adhesion to human colonic mucosa. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 1434–1438 (1996)
- Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acid Res. 22: 4673–4680 (1994)
- Toba T, Virkola R, Westerlund B, Bjorkman Y, Sillanpaa J, Vartio T, Kalkkinen N, Korhonen TK. A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2467–2471 (1995)

- Tuleu C, Andrieux C, Boy P, Chaumeil JC. Gastrointestinal transit of pellets in rats: effect of size and density. *Int. J. Pharm.* 180: 123–131 (1999)
- Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26: 137–142 (1999)
- Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Chemical, physical and enzymatic pre-treatment of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 75–81 (2000)
- Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 45–51 (1998)
- Uemura JN, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T, Oda M, Saito T. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiol.* 20: 267–273 (2003)
- Umesaki Y, Setoyama H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Micro. Infect.* 2: 1343–1351 (2000)
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. *Bull. WHO* p. 53, 55–65 (1976)
- Whaley K. The complement system. pp. 1–35. In: *Complement in Health and Disease*. Whaley, K. (ed). MTP Press, Lancaster, USA (1986)
- Wright PFA, Kirjavainen PV, Ahokas JT, Salminen SJ. Effect of orally-dosed viable probiotics on mouse lymphocyte proliferation. *Toxicol. Lett.* 95: 157 (1998)
- Yoon JH, Lee ST, Park YH. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 187–194 (1998)

- Yamamoto K, Miwa T, Taniguchi H, Nagano T, Shimamura K, Tanaka T, Kumagai H. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochem. Biophysic. Res. Communi.* 228: 148–152 (1996)
- Yuki N, Watanabe K, Mike A, Tagami Y, Tanaka R, Ohwaki M, Morotomi M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faces and identification using monoclonal antibodies. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 51–57 (1999)
- Yu KW, Shin KS. Bone marrow cell proliferation activity through intestinal immune system by the components of *Atractylodes lancea* DC. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33: 135–141 (2001)
- Yasui H, Ohwaki M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J. Dairy Sci.* 74: 1187–1195 (1991)
- Yasui T, Yoda K, Kamiya T. Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133: 181–186 (1995)
- Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid β -peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neurosci.* 115: 201–211 (2002)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림 수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외 적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.