

발간등록번호

11-1543000-001700-01

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

장기능과 면역 증진을 위한
식품소재 개발 및 제품화
최종보고서

2017.4.3

주관연구기관 / 서울우유협동조합
협동연구기관 / 전북대학교
협동연구기관 / 고려대학교
협동연구기관 / 순창발효미생물산업진흥원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “장기능과 면역 증진을 위한 식품소재 개발 및 제품화”(개발기간 : 2013.11.20. ~ 2016.11.19.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 4 . 3.

주관연구기관명 : 서울우유협동조합 (대표자) 송 용 현 (인)

협동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 이 철 로 (인)

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (대표자) 고 제 상 (인)

협동연구기관명 : 순창발효미생물산업진흥원 (대표자) 정 도 연 (인)

주관연구책임자 : 하 영 식

협동연구책임자 : 김 영 훈

협동연구책임자 : 김 세 헌

협동연구책임자 : 최 윤 경

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313036-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2013.11.20. ~ 2016.11.19	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	장기능과 면역 증진을 위한 식품소재 개발 및 제품화			
	세부과제명	<p>주관: 신바이오텍스 소재를 사용한 장기능개선 및 면역증진 유제품 개발</p> <p>제1협동: 신바이오텍스 혼합소재의 장기능개선 및 면역증진 작용기작 규명</p> <p>제2협동: 장기능개선 및 면역증진을 위한 신바이오텍스 혼합소재 개발</p> <p>제3협동: 전통발효식품 유래의 토종 프로바이오텍스 균주 및 효소 자원화 기술개발</p>			
연구책임자	하영식	해당단계 참여 연구원 수	총: 69명 내부: 69명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 450,000천원 민간: 450,000천원 계: 900,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 69명 내부: 69명 외부: 명	총연구개발비	정부: 450,000천원 민간: 450,000천원 계: 900,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울우유협동조합			참여기업명 서울우유협동조합	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
장기능 개선용 신규 프로바이오텍스, 신규 프리바이오텍스 소재 개발과 기능성 연구 및 장기능 개선 최적 조성 신바이오텍스 소재 개발				보고서 면수	

		D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장기능 개선용 신규 프로바이오틱스, 탄수화물성 및 비탄수화물성 신규 프리바이오틱스 소재 개발과 기능성 연구, 그리고 장기능 개선 최적 조성 신바이오틱스 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 신바이오틱스 소재를 사용한 장기능개선 및 면역증진 유제품 개발 - 신바이오틱스 혼합소재의 장기능개선 및 면역증진 작용기작 규명 - 장기능개선 및 면역증진을 위한 신바이오틱스 혼합소재 개발 - 인체 및 전통발효식품 유래의 토종 프로바이오틱스 균주 및 효소 자원화 기술개발 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품적용이 가능한 장기능 개선 프리바이오틱스 소재 선발 ○ 인체 유래의 고기능성 프로바이오틱스 균주 선발 ○ 장기능성 신바이오틱스 개발을 위한 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 혼합소재화 완료 ○ 신바이오틱스 혼합소재의 면역증진 활성 검토 및 비교오믹분석 기술을 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명 ○ 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 및 분말제제 제조공정 개발 완료 ○ 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 2종, 신바이오틱스 소재 고농축 혼합분말제제 및 신바이오틱스 소재 고농축 캡슐 제제 시제품 제작 완료 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장기능 개선용 토종 발효미생물 유전자원 확보 및 활용 ○ 장기능 및 면역증진을 위한 시너지 신바이오틱스 적용기술 확립 ○ 장기능개선 소재의 발굴을 위해 신속하게 적용할 수 있는 고효율 <i>in vivo</i> 면역모델 시스템 구축 ○ 각종 천연물을 이용한 장기능 개선용 고부가가치 신바이오틱 제품화에 따른 새로운 표준모델 및 수익모델 창출 ○ 기술이전과 공동개발을 추진하여 안전성 등의 자료를 마련하고 기능성 인정 취득 후 다양한 장내 균총 조절 기능성 제품 상품화 <ul style="list-style-type: none"> - 장기능 개선 프로바이오틱스 소재 5건 - 장기능 개선 시너지 기능을 주는 신바이오틱스 혼합소재 3건 - 특허출원 3건 - 국제 SCI논문 6건 (JCR 학문분야 20%이내 논문 위주) - 주관기관을 통한 신바이오틱스 소재를 활용한 시제품개발 1건 ○ 장기능과 면역증진 효과를 나타내는 새로운 기능성 신소재와 연계가능 ○ 다양한 기능성 유제품의 개발과 활용 가능성을 증대시켜 고부가가치의 시장 창출 기대 				
중심어 (5개 이내)	장기능	면역증강	프로바이오틱스	신바이오틱스	발효유제품

< SUMMARY >

		D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development and functional studies of new probiotics and prebiotics for improving gut health. Development of optimum synbiotics material for improvement of gut health. – Development of dairy products with improved gut health and immune enhancement using synbiotics – Mechanism study for immune-stimulating activity and improved gut functionality using synbiotics – Development of synbiotics material for improving gut health and immune. – Development of probiotics strain derived from human body and traditional fermented food and development of enzyme recycling technology 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Screening of prebiotic substrate as food-grade for gut functionality ○ Selection of three kinds of prebiotic substrate from traditional/medicinal foods and non-carbohydrates ○ Screening of highly functional probiotic strains derived from human body ○ Completion of hybridization of probiotics and prebiotics for development of new synbiotics for improving gut health ○ Evaluation of immune-stimulating activity of improved gut functionality for synbiotics using <i>C. elegans</i> animal model ○ Development of methodology for immune-stimulating activity using <i>C. elegans</i> and selection of combination of probiotics and prebiotics for improved gut functionality ○ Mechanism study of immune-modulation pathway through synbiotics using Omics analysis ○ Finished development of trial manufactured products (2 synbiotics fermented milk, 1 synbiotics formulation and 1 synbiotics hard capsule) 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of basic plans for gut-health promoting synbiotics ○ Arrangement of scientific report for functionality of gut-health promoting probiotics and prebiotics as Post-FTA globalization. ○ Materialization of improving gut functionality using synbiotics ○ Establishment of research network for gut-health mechanism 				
Keywords	Gut health	Immune enhancement	Probiotics	Prebiotics	Fermented milk products

<Contents>

Chapter 1. Overview of the study	7
Chapter 2. Current status of technology in domestic and foreign	21
Chapter 3. Study contents and results	25
Chapter 4. Achievement and contribution to relevant fields	172
Chapter 5. Achievements of research and development and plans for utilizing research results	178
Chapter 6. Technical information and knowledge acquired for the study ...	179
Chapter 7. Security level of R&D achievement	186
Chapter 8. The current status of research installation and equipment	187
Chapter 9. Performance result of lab safety management	188
Chapter 10. Representative research achievements of R&D projects	189
Chapter 11. Other detail	190
Chapter 12. References	191

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	21
3. 연구수행 내용 및 결과	25
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	172
5. 연구결과의 활용계획 등	178
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	179
7. 연구개발성과의 보안등급	186
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	187
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	188
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	189
11. 기타사항	190
12. 참고문헌	191

1. 연구개발과제의 개요

D-03

1-1. 연구개발 목적

- 장기능 개선용 신규 프로바이오틱스, 탄수화물성 및 비탄수화물성 신규 프리바이오틱스 소재 개발과 기능성 연구, 그리고 장기능 개선 최적 조성 신바이오틱스 소재 개발
 - 신바이오틱스 소재를 사용한 장기능개선 및 면역증진 유제품 개발
 - 신바이오틱스 혼합소재의 장기능개선 및 면역증진 작용기작 규명
 - 장기능개선 및 면역증진을 위한 신바이오틱스 혼합소재 개발
 - 인체 및 전통발효식품 유래의 토종 프로바이오틱스 균주 및 효소 자원화 기술개발

1-2. 연구개발의 필요성

가. 면역질환과 건강식품

- 건강보험정책연구원이 최근 4년간 (2005-2008) 건강보험 진료비 지급자료를 분석 발표한 내용에 따르면 건강보험 실진료 환자수는 2005년 6만 6천명에서 2008년 10만 1천명으로 나타나 연평균 15.3%씩 증가하고 있는 것으로 보고되었고 국가적으로 매년 38조원의 의료비가 지출되고 있으며, 그 중 비만, 당뇨병·뇌혈관 장애, 아토피 등의 면역관련 만성질환 및 생활 습관병의 점유비율은 계속 증가하고 있어 의료비의 억제는 국가적으로 중요한 사회문제로 대두되고 있음.
- 소비자의 식생활 및 생활습관의 최적화를 위한 예방의학에 대한 관심은 농산물, 건강식품, 식품의 영양가 및 기능성에 대한 정보 욕구로 이어지고 있으며, 사회적으로 크게 요구되는 질병예방과 건강유지에 대한 소비자의 요구에 대응하여 식품의 공급단계 전 영역에 걸쳐 새로운 가치창출 모델을 만드는 것이 식품업계의 최대 실천과제임.
- 한국건강기능식품협회의 ‘향후 소비자의 기능성 선호경향’ 조사자료에 따르면 운동부족과, 서구화된 식단으로 인한 비만인구의 증가를 반영하듯이 소비자 기능성 선호경향에서도 비만에 대한 기능성제품 선호도가 38%로 가장 높게 나타났음. 그 뒤를 이어 면역력 증진 (22%), 아토피 (14%), 항노화 및 관절건강 (류마티스/11%) 등 만성질환의 기능성과 관련된 순으로 소비자 선호도가 높은 것으로 확인됨. 따라서 본 향후 고부가가치 기능성 식품 개발연구는 소비자 맞춤형/밀착형으로 만성질환을 예방하는 방향으로 특히, 면역력 증진과 관련된 소비자들의 수요를 충족시킬 수 있도록 시장 타겟을 조정하는 것이 필요함.

Table 1. 향후 소비자의 기능성 선호 경향

순위	기능성	비율(%)
1	비만	38
2	면역력 증진	22
3	아토피	14
4	항노화, 관절건강 (류마티스)	11
5	혈행 개선	5
6	위, 장 건강	3
7	항산화 작용	3
8	영양 보급	2
9	피부건강	2
계		100

<출처 : 한국건강기능식품협회 2008, 국내 상위 38개 업체 대상 조사결과>

- 특히, 이러한 특정 타겟 식품소재의 개발은 비만, 당뇨, 고지혈증 등과 같은 만성질환, 과민성 대장염, 크론병 등과 같은 면역조절 질환, 영유아 성장 이상과 같은 질병의 병인기전에 대한 근본적인 답을 찾을 수 있어, 이들 질병에 대한 혁신적 개념의 예방이 가능하여 국민 보건에 크게 기여할 것으로 판단됨.

나. 면역증강과 장 microbiota

- 인간은 여느 포유동물들과 마찬가지로 태어나기 직전까지는 무균상태를 유지하지만 출생과 더불어 주위환경에서 유래한 미생물들과 공생을 시작함. 특히 대장에는 성장과 더불어 *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Lactobacillus* species, *Enterococcus faecalis*, 그리고 *Bifidobacterium longum* 등 약 1조 마리에 해당되는 미생물들이 다양한 군집을 이루고 살게 되는데 (> 10^{12} microbial cells/g feces) 이러한 장내 미생물 집합체를 장 microbiota라고 통칭하고 있음. 각 개개인의 경우 장 microbiota를 구성하는 미생물 숫자는 인체 전체의 세포 수보다 10배나 많을 정도임.
- 학계에서는 그동안 장 미생물 군락 (microbiota)이 단지 인간과 공생하는 미생물 정도로 치부하고 있었으나, 최근 장 microbiota가 감염병 예방, 면역과정 조절, 장내 영양 흡수 등에 결정적인 역할을 한다는 사실이 최근 새롭게 규명되어진 후, 장내 microbiota에 관한 연구가 전 세계적으로 폭발적으로 증가하고 있음.

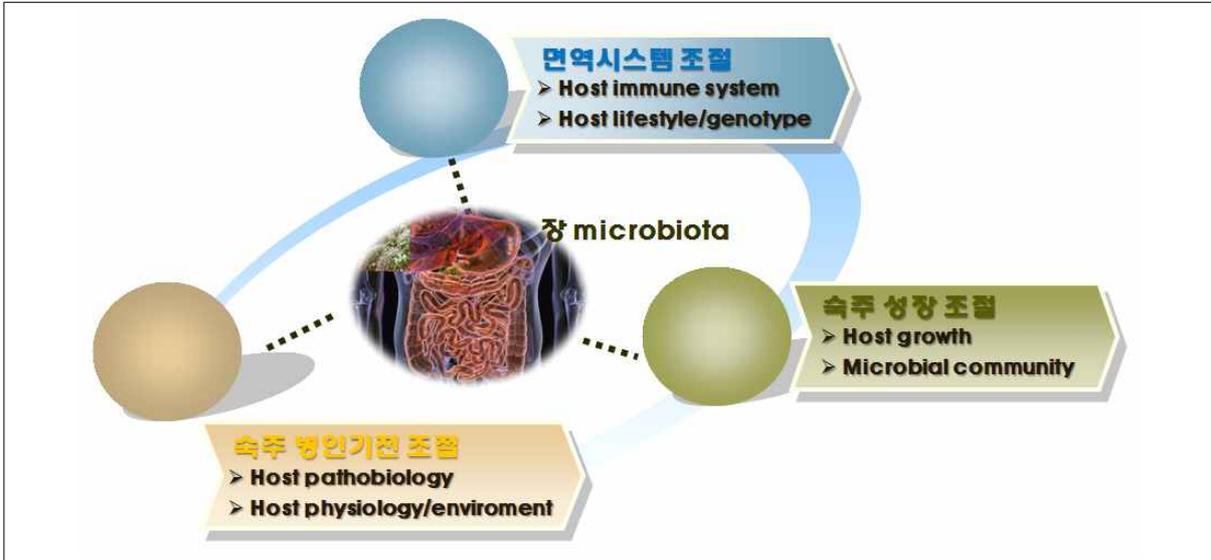


Fig. 1. 장 microbiota와 숙주간의 상호작용

- 장 microbiota는 숙주의 공생자로서 영양분의 섭취 및 세균의 침입을 막는 등 다양한 점에서 숙주인 인간에게 유용한 작용을 하기도 하나, 한편으로는 다양한 분해대사과정에 관여함으로써 독성을 유발하기도 하며, 각종 질병과 관련되는 등 인간의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음.
- 최근 연구결과에 의하면 장 microbiota 군락 변화는 장염, 아토피 등과 같은 면역관련 질병 이외에도 비만, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 고콜레스테롤증 등과 같은 대사성증후군 및 관련 질환의 병인기전과정에 매우 중요한 역할을 한다는 사실이 규명되어지고 있음 (Nature. 2007. 449:804-810; Nature. 2011. 474:327-337).
- 따라서 장 microbiota 군락 변화를 조절하면 면역관련 질병과 대사성증후군 및 관련 질병을 효율적으로 치료하고 예방할 수 있어, 인체에 유익한 장 microbiota 군락의 활성화 혹은 질병 유발 장 microbiota 군락의 활동억제를 타겟으로 하는 미생물 소재 연구가 세계적으로 주목받고 있는 중이며, 우리나라 농식품산업 발전을 위해 장 microbiota를 타겟으로 하는 발효미생물에 대한 연구가 국가적 차원에서 절실히 필요함.
- 식품섭취 및 식습관이 장 microbiota 구성에 큰 영향을 미쳐, 인간 각종 질병과 건강증진에 지대한 영향을 준다는 연구보고가 최근 지속적으로 발표되고 있음 (Nature. 2008. 455:1109-13). 특히, 발효식품의 경우 단순히 장 건강뿐만 아니라 인체의 각종 질병 예방 및 치료와 건강증진에 지대한 영향을 줄 수 있을 것으로 예측됨.

다. 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 신바이오틱스

- 프로바이오틱스(probiotics)는 사람이나 동물에게 건조세포나 발효산물의 형태로 투여

하여 숙주의 장내균총을 개선하여 좋은 영향을 주는 단일 또는 복합형태의 생균제를 의미함. 이러한 프로바이오틱스는 구체적으로 세 가지의 카테고리로 구분되어지는데, 첫째는 인체의 치료를 목적으로 하는 정장제(整腸劑), 둘째는 사료첨가제로서의 생균제(生菌劑) 그리고 셋째는 식품으로서의 유산균식품으로 나뉘어질 수 있음.

- 장 microbiota 구성원 중 유아기에는 유산균과 비피더스균을 비롯한 유용 세균이 전체 장내균총의 90% 이상을 차지하지만, 노년기가 되면 클로스트리디움(*Clostridium perfringens*)을 비롯한 부패 세균이 증가하여 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있음. 더불어 최근에는 이러한 현상이 각종 질병과 깊숙이 연관되어 있다는 사실이 알려져 많은 주목을 받고 있음.
- 최근 이러한 장 microbiota의 역할에 관한 연구 중에서 사람의 장 속에서 공생하는 세균이 비만과 직접적으로 관련되어 있다는 사실이 밝혀짐. Roesch 등은 최근의 연구에서 당뇨병과 장내미생물 균총과의 중요한 연관성을 시사했는데, 특히 당뇨병에 저항성을 지니도록 육종한 쥐의 장내미생물 분포를 조사한 결과 *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* 및 *Bifidobacterium* species 등이 당뇨병에 걸리기 쉽도록 육종한 쥐의 장내미생물 분포에 비해서 월등하게 우점화(predominant)되어 있는 사실을 밝혀냈음.
- 그러나 이러한 결과는 매우 고무적임에도 불구하고 어떻게 Lactic acid bacteria가 이러한 변화를 유도할 수 있었는지에 관해서는 불분명한 점이 많이 있으며 또한 현재까지 이러한 유산균의 기능에 관하여 유전적으로나 기능적으로 해석한 연구는 거의 전무함.
- 프로바이오틱스로서의 유산균을 이용한 기능성 성분 개발에 관한 연구는 유산균이 생성하는 박테리오신과 같은 유용성분의 개발, 생백신의 개발, 천연항균물질의 개발, 당류의 생산, 바이오에탄올 생산 등 많은 분야에서 활발하게 연구되고 있음. 최근에는 유산균을 이용하여 암·콜레스테롤 저하·체중감소 기능을 가진 CLA(conjugated linoleic acid)와 혈압조절과 신경안정 작용을 하는 것으로 알려진 GABA(gamma amino butylic acid) 및 비타민류 등과 같은 기능성 저분자물질과 고분자물질을 합성하는 연구가 활기를 띠고 있음.
- 최근 30년간 프로바이오틱스에 대한 국제 SCI(E)논문 publication을 조사한 결과 2000년 이후 급격하게 증가하기 시작하였으며 2010년부터는 매년 2000건 이상의 연구논문이 보고되는 등 프로바이오틱스에 대한 관심은 지속적으로 증대되고 있음(Fig. 2).

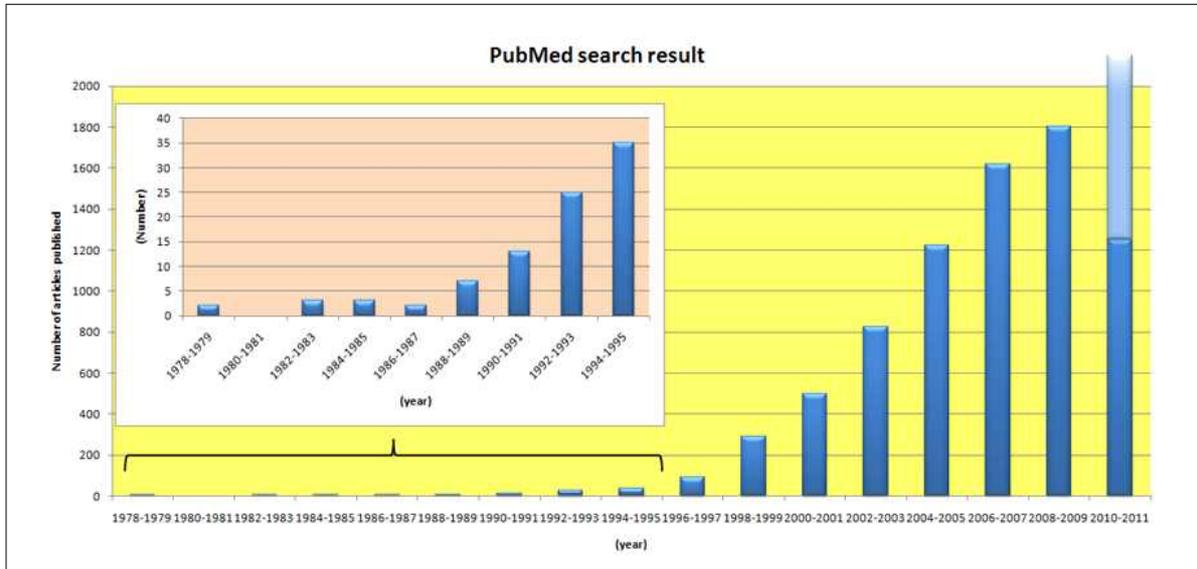


Fig. 2. 최근 30년간 프로바이오틱스 관련 논문 publication 경향

- 프리바이오틱스(Prebiotics)는 장내에 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균제에 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘함. 최근까지 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 펙틴등의 식이섬유와 non-digestible carbohydrate인 oligosaccharide (fructooligo-, galactooligo-, maltooligo-, inulooligo-)들이며, 이들은 특정균주의 선택적인 성장을 촉진하여 장관 내 미생물 균총의 성장과 증식에 관여함. 그러나 프리바이오틱스에 대한 정의에 대해서는 여러 가지 다양한 관점이 존재하고 있음.
- 협의로는 주로 비소화성 당류들이 이에 해당하지만 oligosaccharide는 또한 식중독병원균을 포함하여 non-probiotic bacteria에도 영향을 줄 수 있기 때문에 최근에는 프리바이오틱스의 개념이 좀 더 광범위한 의미로 발전되고 있는 실정임. 최근 폴리페놀 물질과 같은 비탄수화물(non-carbohydrate) 물질들도 대부분 장내 유익균은 성장이 촉진되며 유해균들은 성장이 선택적으로 억제되는 임상 연구 결과가 보고되고 있으며, 김치 중에 존재하는 Allicin성분의 경우에는 김치의 대표적 프로바이오틱스 균주인 *Leuconostocs*의 성장을 저해하지 않으면서 부패 미생물들만 선택적으로 성장을 저해 시킴으로써 프리바이오틱 기능을 한다고 알려져 있음.
- 이와 관련, 레드와인에 함유되어 있는 폴리페놀 성분들이 장내 일부 세균들의 성장을 선택적으로 향상시켜 줄 수 있는 것임을 시사한 소규모 예비임상 시험결과가 발표(미국 임상영양학회지, American Journal of Clinical Nutrition, 2012)되어 향후 폴리페놀 프리바이오틱스는 장내 미생물 성장뿐만 아니라 기능성을 갖는 생성물(루틴에서 퀘르세틴) 및 분해물도 생성(Protocatechuic acid; 항산화, 항염증, 항암)하기 때문에 한층 더 연구가 활발히 진행될 것으로 예상.

○ 페놀류에 속하는 이러한 hydrocinnamic acid들은 커피, 차, 사과, 배과류, 감자의 덩이줄기, 토마토, 시금치, 브로컬리, 복숭아 등 식물체에 섬유질의 형태로 고농도 존재함. 대부분의 섬유질은 배변을 통해서 배출이 되나 일부는 이러한 식품 속에 존재하는 섬유소로부터 hydrocinnamic acid가 효소적인 분해를 통해서 생성됨. 이러한 효소적인 분해 작용은 소장의 상피세포에서도 검출이 되나 대부분은 대장 상피세포에서 검출되어지는 것으로 판단할 때 장내 미생물이 분비하는 분해효소가 이러한 유용한 hydrocinnamic acids류를 생성하는 중요한 인자로 여겨짐. 따라서 이러한 분해효소를 대량으로 분비하는 유산균의 경우 인슐린의 분비 촉진등과 같은 메커니즘에 깊이 관여할 것으로 예상되어짐(Fig. 3).

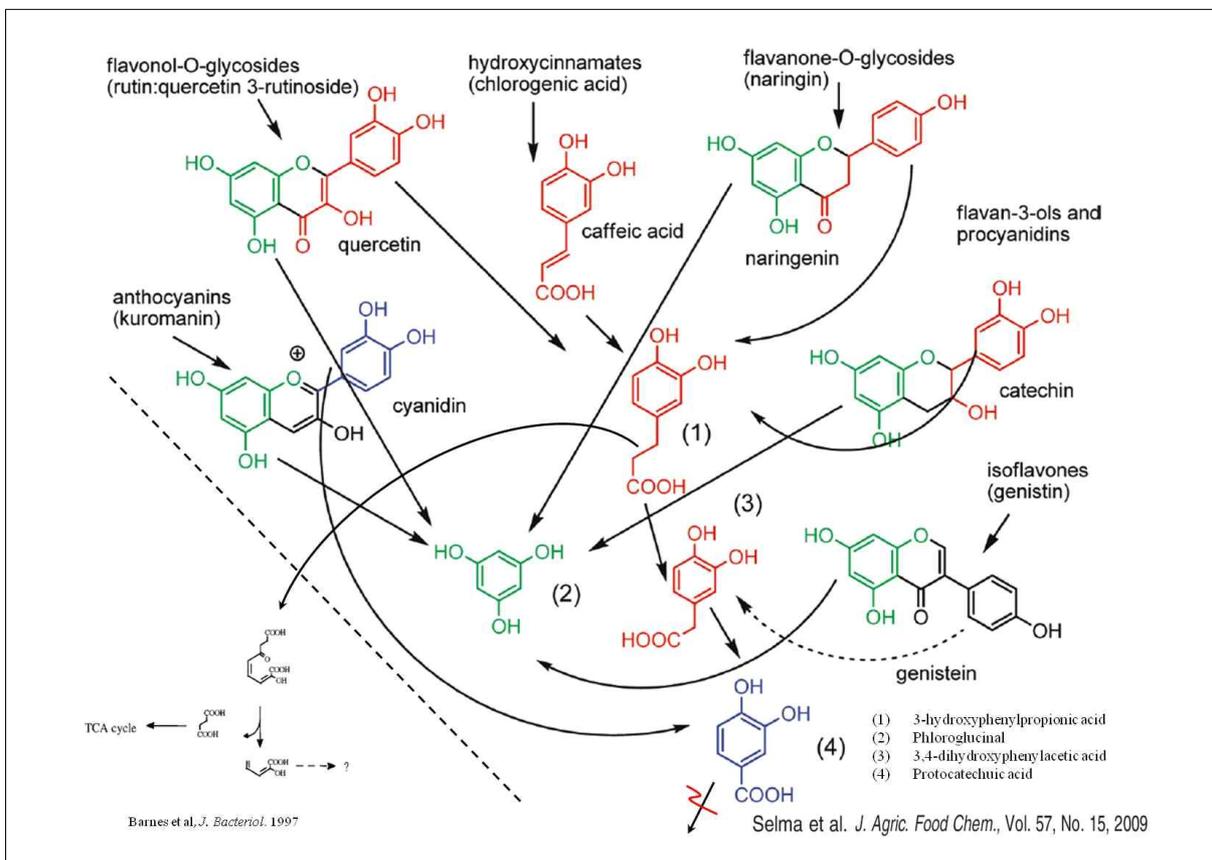


Fig. 3. 장 microbiota에 의한 주요 폴리페놀 분해 메커니즘

○ 또한 chlorogenic acid은 식이로 섭취되면 소장에 도착하여 장내 세균들에 의하여 가수분해 되고, 저분자화 되어 caffeic acid의 형태로 흡수되어지지만 대부분은 흡수되어지지 못하고 대장을 통하여 배출됨. 그러나 chlorogenic acid의 가수분해 형태인 caffeic acid은 위와 소장에서 chlorogenic acid에 비해 훨씬 잘 흡수되어 뛰어난 항산화효과를 나타내는 것으로 알려져 있음.

○ 지금까지의 연구에 의하면 quinic acid와 에스테르 결합된 caffeic acid(chlorogenic

acid)은 caffeic acid 자체로서 흡수될 때보다 더 흡수율이 적다고 밝혀졌음. chlorogenic acid과 caffeic acid은 서로 다른 메커니즘을 통하여 흡수된다는 것으로 알려져 있으며, 특히 chlorogenic acid은 인체 내에서 두 가지의 다른 흡수 메커니즘을 가지고 있음. 그중 하나는 chlorogenic acid 그대로 흡수되어 소변에서 발견되어지고, 또 다른 메커니즘에서는 바로 chlorogenic acid가 위 또는 소장에서 caffeic acid와 quinic acid로 가수분해 되어서 이것들의 형태로서 흡수되는 것임.

- 반면 caffeic acid도 인체 내에서 두 가지의 메커니즘을 가지고 있는 것으로 나타남. 그중 하나는 위에서 비이온적 상태로서 수동적 흡수가 이루어지고, 반면에 소장에서는 이온적 상태로 능동적 흡수가 이루어지는 것으로 보임. 이 연구에서 chlorogenic acid으로의 흡수율은 33%정도인 반면 caffeic acid로서의 흡수율은 95% 정도로 caffeic acid은 quinic acid가 에스테르 결합된 형태보다 세배정도 더 잘 흡수되어지는 것으로 나타남. 따라서 식품 및 식물체 속에 존재하는 고기능성 항산화성분인 chlorogenic acid와 같은 hydroxycinnamic acid를 이용한 건강기능성 식품의 제조시 인체에서의 흡수 및 작용은 효소적인 작용에 크게 의존되며 유용물질의 흡수율에 지대하게 영향을 미친다고 할 수 있음.
- Cinnamoyl esterase(EC 3.1.1.73)는 전술의 hydroxycinnamic acids에 연결되어있는 여러 종류의 당-에스테르 결합을 가수분해하는 효소로서 일반적으로 rumen, soil saprophytic micro-organism에서 발견되어지고 또한 인간과 동물의 장내미생물 세균속에서 발견되어 왔음.
- 현재까지 본 효소는 *Streptomyces olivochromogenes*나 *Pseudomonas fluorescens* 과 세균류 또는 *Penicillium pinophilum*과 *Aspergillus species*와 같은 곰팡이류에서 분리 정제되어 연구되어 왔으며 이들 효소는 기질로 작용하는 각종 당-에스테르결합 hydroxycinnamic acids의 방향족의 종류에 따라 ferulic acid와 sinapic acid의 methylester 결합에 기질특이성을 지닌 type A (FAE-III, feruloyl esterase)와 caffeic acid와 *p*-coumaric acid의 methylester 결합에 기질특이성을 지닌 type B (CinnAE, cinnamoyl esterase)로 구분되어짐.
- 현재까지 hydroxycinnamic acids에 연결되어있는 여러 종류의 당-에스테르 결합을 가수분해하는 효소인 cinnamoyl esterase에 관한 연구는 인간의 대장 속에서 발견되어지는 박테리아 유래에 대한 연구 또는 *Aspergillus niger* 또는 *A. japonicus* 등과 같은 곰팡이에 대한 연구가 주로 진행되어 있는 상태로, 당뇨병 예방 및 치료를 위한 전제하에 “특정유산균“이 대장에서 각종 식이 섬유소 성분에서 효소의 작용으로 hydroxycinnamic acids 생성에 관여하며 이를 통해 인슐린의 분비를 촉진시켜 당뇨병에 효과적인 수단으로 이용 가능할 것이라는 관점에서의 연구는 전무함. 또한 효소의 연쇄작용으로 chlorogenic acid을 caffeic acid으로 가수분해하는 유산균과 같은 프로바이오틱스로서의 food-associated bacteria 유래의 cinnamoyl esterase에 대한 효소

적인 연구는 거의 전무한 실정임. 따라서, 이러한 유산균의 성질을 이용한 당뇨병 예방 및 치료에 효과적인 유산균을 개발하고 이를 이용한 신규의 기능성식품을 개발하기 위해서는 우선 본 효소에 대한 기초적인 지식을 얻어야만 함.

- 방향성 화합물을 천연의 소재에서 효소적인 작용을 통하여 생성하도록 하는 것은 신규의 기능성 프로바이오틱스 식품의 제공뿐만 아니라 이를 응용한 고도의 흡수율을 지닌 향생물질 대체 사료 첨가물 등 그들의 잠재적인 산업적 실용성 때문에 식품영양학적으로 매우 중요함.
- 신바이오틱은 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 혼합물로서 단일제제로 혼합되어 섭취되게 됨. 신바이오틱으로써 의약품 또는 식품은 섭취되어 프로바이오틱스와 프리바이오틱스가 갖는 각각의 생리활성이 동시에 나타나며, 두 요인의 시너지 효과가 발생한다는 장점이 있음. 이러한 유용성으로 인해 최근 여러 연구들이 신바이오틱의 기능성에 대해 집중하여 그 효과들이 검증되고 있는 추세임.
- 신바이오틱스(Synbiotics)는 특정적으로 숙주에게 원하는 유익한 효과를 기준으로 프로바이오틱스를 선정하고, 프리바이오틱스는 도착 유익 장내 균총의 특정 집단을 선택적으로 증가시키도록 별도로 선택하는 상보적인 방식과 특정적으로 숙주에게 유익한 효과를 기준으로 프로바이오틱스를 선정하고, 프리바이오틱스는 선택된 프로바이오틱스의 성장과 활동을 자극하여 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 높은 친화력을 가지도록 선택하는 상승효과 방식으로 나눌 수 있음(Fig. 4).

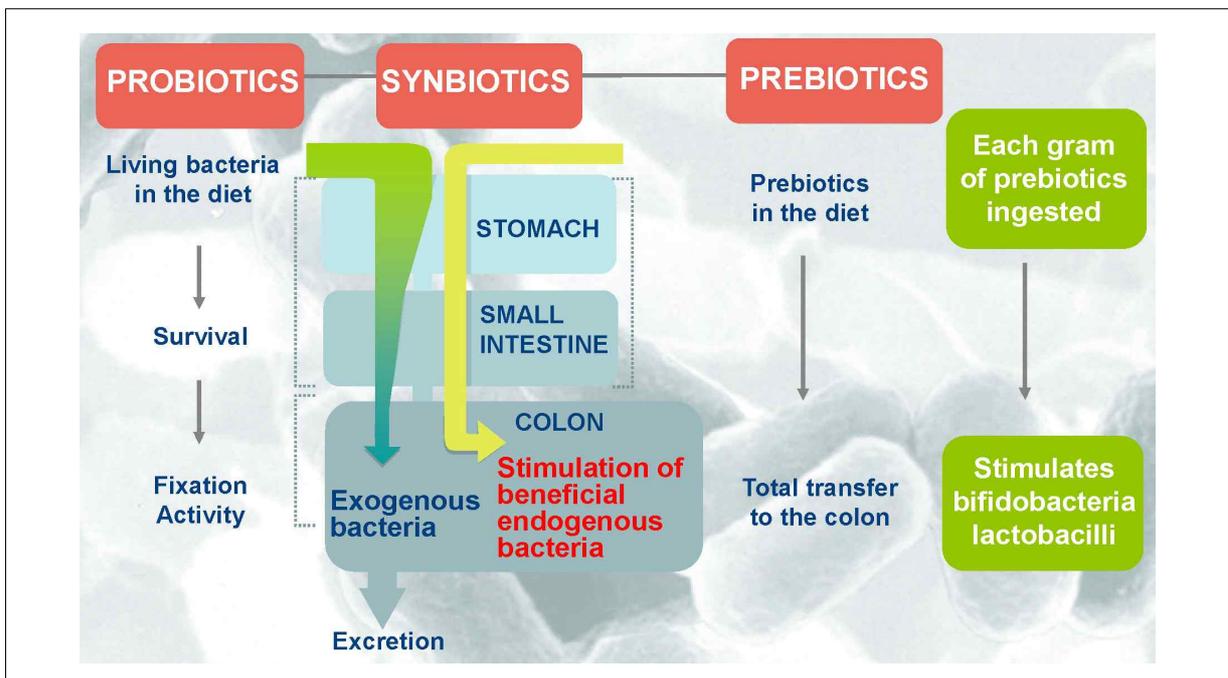


Fig. 4. 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 그리고 신바이오틱스의 유기적 연계도

- 기본적으로 프리바이오틱스는 프로바이오틱스의 장내 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 식이 내 신바이오틱스 제제를 첨가한 후 쥐에게 투여하여 분변을 관찰한 결과, 비피더스균과 락토바실러스 균 등 유용 균주의 균수가 상당 부분 증가한 형태를 보여 이를 통해 뚜렷한 장내 균총의 개선 효과가 있음을 확인한 연구결과들이 보고되어 있음. IBD와 같은 염증성 장 질환의 경우에도 특정 프리바이오틱스를 대사할 수 있는 프로바이오틱스를 처리한 결과 염증성 사이토카인의 감소 효과를 확인할 수 있어 신바이오틱스에 대한 활발한 연구가 진행되고 있는 상황이며 다양한 질병에 있어서 신바이오틱스의 접근이 이루어지고 있는 실정임.
- 하지만, 아직까지 대부분의 신바이오틱스 연구는 비소화성의 oligosaccharide을 활용한 것이 대부분이며 비탄수화물 계열의 프리바이오틱스와 프로바이오틱스의 시너지 효과를 평가한 연구는 거의 전무한 실정임. 따라서 국내의 다양한 천연식품소재를 대상으로 이에 대한 프로바이오틱스 및 non-carbohydrate 프리바이오틱스 소재 연구가 시급한 것으로 판단됨.
- 신바이오틱스는 발효유, 치즈, 건강음료, 소스, 쿠키, 빵, 이유식, 아이스크림 및 건강기능식품 등 다양한 형태로 제조되고 있으며, 신바이오틱스 시장은 계속해서 성장하는 추세임. 국내외에도 이러한 신바이오틱스 기능성을 이용한 유제품들이 개발되어 있으나, 프로바이오틱스가 갖는 생리활성과 프리바이오틱스가 갖는 생리활성의 다양한 조합을 통해서 건강기능성이 강화된 다양한 형태의 고부가가치 제품의 개발로 이루어질 수 있기 때문에, 신바이오틱스에 대한 연구는 앞으로 더욱 활발하게 이루어질 것으로 기대됨.
- 특히, 신바이오틱스를 이용한 발효 유제품은 특유의 풍미와 생성된 유산에 의한 우수한 보존성, 단백질의 부분 분해에 의한 소화 흡수성 향상 등 기호적 영양적인 우수성을 나타내며 전 세계를 통하여 엄청난 시장 규모를 형성할 것으로 예상됨.

라. 전통발효미생물을 이용한 토종 프로바이오틱스 발굴

- 미생물자원은 무한한 발굴 가능성을 지닌 자원으로써 유전체 연구 등 동물 생명공학기술의 발전과 동물 생명공학산업의 부가가치 창출역량이 신장됨에 따라 그 연구재료인 유전자를 담고 있는 미생물자원이 미래선도 자원으로 부각됨. 따라서 자원 확보 경쟁에서 우위를 점하기 위해서는 선진국 수준의 높은 기술 수준이 필요하며 이를 위해 핵심 원천기술 개발과 새로운 생물자원탐색 관련 연구 개발 투자가 필요함.
- 세계 5대 건강식품으로 선정된 김치와 콩 등을 활용한 전통발효식품에 대한 관심과 관련연구의 증가로 인해 국가적 차원의 신규 유용 토종발효미생물 자원의 확보가 필요하며, 분자생태학적 기술이 지속적으로 발달함에 따라서 기존에 발견되지 못했던 새로운 미생물의 다양성과 중요성이 발견되고 있기 때문에, 무한한 발굴 가능성을 지닌 자원

인 미생물 자원을 효율적으로 발굴할 수 있는 기술 개발이 필요함.

- 최근 해외특허 및 등록건수를 분석하였을 때 신규 미생물 유전자원 확보기술 및 탐색/분석 기술관련 분야의 연구가 다시 활발하게 연구되고 있는 것으로 보이며, 또한 특허 등고선을 통해 생명연구자원 관련 주요 연구 및 기술 분야 등을 살펴보면 확보기술 및 탐색/분석기술이 다른 연구에 비해 상대적으로 활발히 추진되고 있음을 알 수 있음 (Fig. 5).

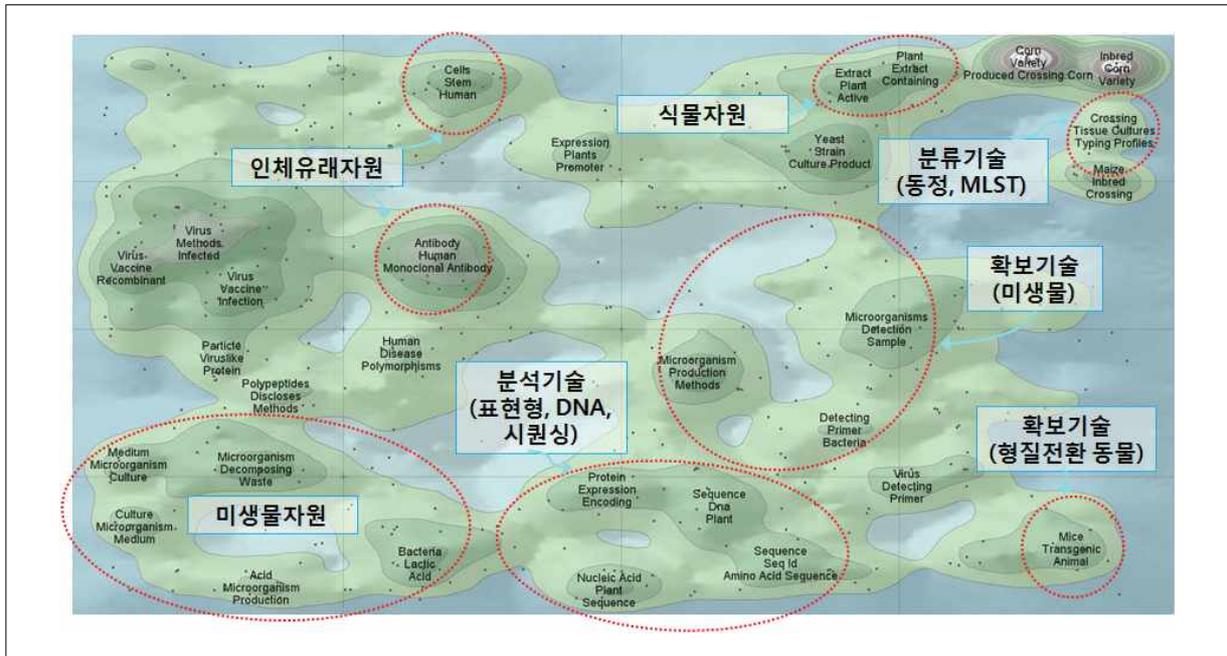


Fig. 5. 생명연구자원 해외특허 등고선

[출처: 생명공학정책연구센터, 생명연구자원(기반기술을 중심으로). 2012]

- 고부가가치 미생물자원 선점을 둘러싼 국제경쟁이 치열한 지금 국내에서는 산업적 활용성이 높은 미래 고부가 미생물자원의 발굴 및 산업화가 미비하여 대부분의 유용 물질 및 기능성 미생물을 외국에서 수입하므로 신규 고부가가치 프로바이오틱스 미생물 자원 스크리닝 기술과 미래 고부가 미생물자원의 발굴 및 DB 구축은 수입대체 효과를 증대시키고 국가 간 자원 경쟁력을 확보 할 수 있으며 향후 포스트 FTA시대를 대비한 고기능성 식품선도 핵심기술을 보유하는데 기여할 것으로 판단됨.

마. 신바이오텍스와 장면역능

- 인체는 각종 이물 및 병원체의 침입에 대항하는 숙주의 기관, 조직, 세포 및 각종 물질을 총칭하며 기능적으로는 선천성과 후천성 면역계로 분류됨. 감염원에 대하여 비특이적으로 최초의 방어를 담당하는 선천성 면역계는 macrophage, natural killer cell(NK-cell)과 같은 세포와 complement, interferon, tumor necrosis factor

(TNF- α)로 구성되며 항원 특이적인 반응을 담당하는 후천성 면역계는 T-lymphocyte 및 β -lymphocyte 등이 관여하게 됨. 이들 각 면역 구성 요소 사이에는 다양한 종류의 cytokine이 존재하여 긴밀한 상호 활성화와 엄밀한 제어가 이루어져 면역반응의 활성화와 효율화를 담당함.

- 특히 장관계 면역질환에 대해서 innate immunity와 adaptive immunity에 동시에 작용함으로써, 해당 질병에 대한 보호 및 예방에 대한 효과와 그 기작들이 연구되어 왔음. 장관계 면역질환의 대표적인 예인 염증성장질환(Inflammatory bowel disease)은 장내항원에 대한 비정상적인 면역반응으로 특징되는 다인자성 질환으로, 특히 장내 세균이 병의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각됨. IBD의 일종인 크론병 환자에서 장루를 통해 fecal diversion을 시키면 병이 호전되고, 염증성 장 질환 환자에서 항생제나 probiotics가 효과를 나타내는 등의 임상적 관찰은 장내세균과 IBD와의 연관성을 나타냄. 즉 염증성 장 질환은 숙주와 세균과의 정상적인 상호작용이 깨어짐으로서 비정상적인 점막 면역반응이 초래된 결과로 발생하는 것으로 생각되어짐.
- 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 및 신바이오틱스의 역할은 장내에 존재하는 미생물의 균형을 조절함과 동시에 병원성 미생물의 증식이나 체내 침입을 억제하는 작용을 하며, 특히 숙주의 면역 기능(선천성 및 후천성 면역 기능)을 조절하는 것임을 알 수 있음(Fig. 6).

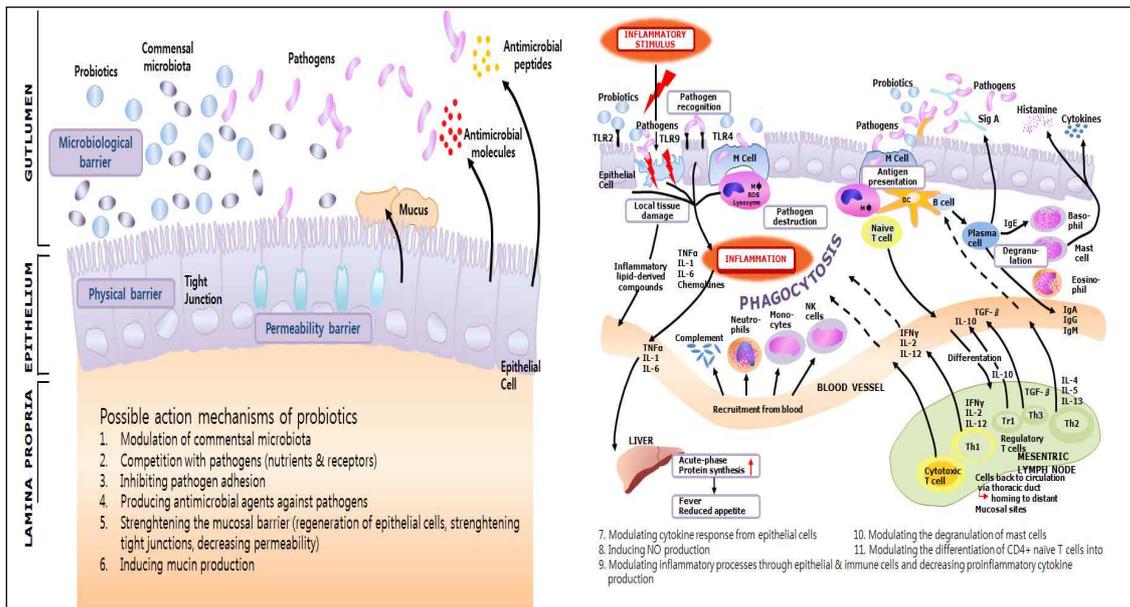


Fig. 6. Probiotics의 작용기전 (Kekkonen, R. 2008. Immuno-modulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. Ph.D thesis. University of Helsinki)

- 인간의 장점막에서 숙주의 면역계와 장내세균은 단층의 상피세포층을 경계로 마주하고 있음. PRR(Pattern Recognition Receptor)을 통해 체내로 침투하는 세균이 인지되면 여러 경로를 통해 전사조절 단백질 및 전사인자들이 활성화되고, 이의 결과로 다양한 cytokine들이 생산되어 mucosal host defense에 있어 1차적인 역할을 담당하며, 또한

T세포, B세포의 분화 및 증식을 유도하여 adaptive immunity를 활성화시킴.

- 장기능을 저하시키는 가장 대표적인 질환인 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease; IBD)은 소화관을 침범하는 원인 미상의 만성 염증성 질환에 대해 일반적으로 일컫는 용어임. 만성 염증성 장질환은 크게 2개의 군으로 나눌 수 있는데, 그 하나가 만성 비특이적 궤양성 대장염(ulcerative colitis)이며, 다른 하나가 크론씨 병(Crohn's disease) 임.
- 크론병은 궤양성 대장염 (Ulcerative colitis), 베체트 장염 (Behcet's colitis)과 함께 대표적인 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Disease)인데 염증성 장질환이란 소장이나 대장에 염증을 일으키는 질환 중 장결핵, 이질처럼 원인이 알려진 것을 제외하고, 아직 원인이 밝혀지지 않은 특발성 염증성 장질환을 말함. 15세에서 30세의 비교적 젊은 층에 호발하며, 전체적으로 볼 때 점차 증가하는 추세인데 이것은 식생활의 서구화, 특히 장기능과 면역작용과 관계가 있을 것으로 추정됨.
- 염증성 장질환의 병인은 아직 확실히 밝혀지지 않는 않지만 주로 면역 반응 이상과 관련되고, 유전 및 환경적 요인이 영향을 줄 것으로 추정됨. 일란성 쌍생아에서 함께 생길 가능성은 크론병에서 약 50%로서 궤양성 대장염보다 높음. 크론병 빈도는 흡연군에서 비흡연군보다 많고, 궤양성 대장염은 비흡연군에서 더 많음.
- 프로바이오틱스 균주들은 adaptive immunity와의 상호작용을 통해 T세포에 의해 매개되는 장내세균에 대한 비정상적이고 과도한 면역반응을 조절할 수 있음이 연구들을 통해 밝혀졌으며, 유산균의 세포벽 성분이 장관 면역활성을 높여준다는 연구 결과가 보고 됨. 최근에는 Innate immunity와 관련하여 toll-like receptors (TLRs), NOD2 등 미생물을 감지하는 "pattern recognition receptors (PRRs)"와의 상호 작용을 통해서 cytokine분비의 조절을 통한 면역질환의 완화에 대한 기저 기작들이 밝혀지고 있음. 또한, 프로바이오틱스가 질병을 일으키는 병원성 세균과 경쟁함으로써 미생물 군총의 변화를 가져올 수 있고, 인간의 임상 시험에서 궤양성 대장염, 크론병, 기타 장내 질병의 경감을 확인함.
- Toll-like receptor와 NOD 수용체 같은 PRR들은 평상시엔 점막의 항상성을 유지하는 기능을 하지만, 염증성 장질환과 같은 병적인 상황에서는 질병의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있음. Innate immunity에 대한 활발한 연구는 염증성 장 질환 병인에 대한 이해의 패러다임을 변화시키고 있으며, 향후 치료전략 수립에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각됨.
- 현재 면역반응에 대한 결과로 나타나는 다양한 염증성 장질환에 대한 치료 및 예방 방법으로는 항염증제에 주로 의존하고 있는 것이 현실이며, 그밖에도 부신피질 호르몬제, 면역억제제, 항생제 및 항산화제 등이 장관계 면역 질환에 사용되고 있음. 현재 항염증

소재로 사용되고 있는 약물은 스테로이드계와 비스테로이드계 약물이 주로 쓰이며 높은 비용과 더불어 이러한 약물의 사용으로 인한 백내장, 녹내장, 면역력 저하, 위장장애 등 심각한 부작용이 문제시 되고 있음 (Table 2).

Table 2. 염증성 장 질환 치료제

분류	성분	부작용
항염증제	메살라진, 설파살라진	복부허실, 두통, 피진, 간질환, 남성불임
부신피질 호르몬제	프레드니솔론, 부데소나이드	부신피질 부전증, 소화성 궤양, 당뇨병, 정신장애
면역억제제	아자치오프린, 사이클로스포린	효과 불분명 및 발암 우려
항생제	메트로니다졸, 시프로플록사신	효능은 인정되나 임상적 향상에 대한 효과는 불분명
항산화제	알로퓨리놀, 디메틸설폭사이드	급성과민증상, 통증 등

- 이러한 항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위하여 꾸준한 섭취를 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 체내에서 안전하다고 알려진 프로바이오틱스를 적용함으로써 면역과 관련된 염증성 장 질환을 완화하는데 도움이 될 것으로 기대됨.
- 이러한 유산균 유래의 장염증 완화 물질은 그 역가가 치료용의 의약품보다 낮다 하더라도 항상 섭취가 가능하다는 점에서 장점이 있으며 화학적 합성물질이 아닌 천연 물질이므로 안전성과 함께 가공식품 내 신속히 적용 가능함.

1-3. 연구개발 범위

가. 주관기관 : 서울우유협동조합

- 신바이오틱스 소재를 사용한 장기능개선 및 면역증진 유제품 개발
 - 신규 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스 소재의 유제품 적용 평가
 - 이화학적, 미생물학적 및 열안정성 평가
 - 선별된 신바이오틱스 소재의 고농축 발효유 및 신바이오틱스 제제 제품개발
 - Scale-up을 통한 대량생산 공정 개발
 - 발효유 제품 내 우유 단백질 유래 기능성 펩타이드 분석 및 면역활성 평가
 - 대량생산 실험을 통한 최종공정 개발
 - 기능성 신바이오틱스 소재 함량 평가
 - 기능성 표시기준 및 관련 법령 검토
 - 최종 시제품 생산

나. 제1협동기관: 고려대학교

- 신바이오틱스 혼합소재의 장기능개선 및 면역증진 작용기작 규명
 - 전통발효식품 및 천연식용식물로부터 식품적용이 가능한 장기능성 프리바이오틱스 소재 선발
 - 장기능성 신바이오틱스 혼합소재의 면역증진 활성 평가
 - 비교오믹분석 기술을 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명

다. 제2협동기관 : 전북대학교

- 장기능개선 및 면역 증진을 위한 신바이오틱스 혼합 소재 개발
 - 인체유래 고기능성 프로바이오틱스 균주 선발
 - 고기능성 신바이오틱스 혼합소재 선별
 - 신바이오틱스 혼합소재 최적화
 - 신바이오틱스 소재의 장내 딜리버리 향상기술 개발

라. 제3협동기관 : 순창발효미생물산업진흥원

- 전통발효식품 유래의 토종 프로바이오틱스 균주 및 효소 자원화 기술개발
 - 전통발효식품으로부터 토종 프로바이오틱스 소재 선발
 - 선별된 프로바이오틱스로부터 장면역증진 효소활성 특성 검토
 - 마우스모델을 이용한 신바이오틱스 및 면역증진효소의 장기능개선 효과 검증

2. 국내외 기술개발 현황

D-04

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내의 프로바이오틱스 관련 제품은 한정된 균주가 혼합되어 있는 유제품 형태이거나, 김치나 장류, 젓갈 등의 농수산물식품의 형태로 생산되어 판매되고 있음. 한국야쿠르트(주), 남양유업(주), 서울우유, 매일유업(주), 파스퇴르유업(주), 롯데햄우유(주) 등의 대기업이 유산균 발효유와 낙농발효제품을 생산하고 있다. 반면 셀바이오텍(주), (주)비피도, 파마넥스, 바이오솔루션, 선플러스 등의 바이오벤처는 유산균 중심의 프로바이오틱 스타터를 생산하고 있으며, 제일바이오(주) 등의 중소기업에서는 사료용으로 프로바이오틱을 생산·판매하고 있음.
- 프로바이오틱스 시장규모가 가장 큰 제품은 발효유 특히 액상 발효유로, 1971년부터 국내에서 생산되었으며 2003년에 시장규모가 1조원을 돌파하였다. 최근 장건강 뿐만 아니라 위장에 효과가 좋은 제품으로 제품 연구방향이 이어지고 있으며, 미용에 효과가 있는 미용발효유의 출시도 있음.

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계 프로바이오틱스 시장은 약 21조원 규모로 유럽(33%), 미국(24%), 일본(19%) 등이 76%를 차지하는 선진국 중심 시장임. 현재 세계적으로 유산균 배양기술을 보유한 회사는 덴마크의 다니스코, 크리스찬한센, 일본의 모리나가, 캐나다의 로셀 등이며 종균개발에서 완제품 생산에 이르는 경제적 규모의 일관된 생산체제를 구축한 기업은 세계적으로 5개사 정도로 추정되고 있음.
- 서유럽에서는 프로바이오틱과 항산화제가 기능성 식품 시장을 주도하고 있으며, 이에 부응한 제품들이 개발되었음. 이들이 관심을 갖는 건강요인은 면역증강, 변비예방, 콜레스테롤 저하, 암 예방, 튼튼한 뼈, 에너지 충전, 소화기 건강 등으로 프로바이오틱의 효능과 관련된 것이 많음.

Table 3. FDA와 AAFCO에서 승인된 생균제 첨가 미생물 균주

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacteroides capillosus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Streptococcus cremoires</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bacteroides suis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>

- 미국에서는 Danone, Nestle, Child-Hansen 등은 특정 균주와 개인건강을 연계한 제품을 출시하였으며, Syonny Field Farm은 6종의 프로바이오틱을 혼합한 “Nutrica”를 발매하여, 소화증진, 유당 불내증 완화, 칼슘흡수능 개선, 면역 향상, 암 예방 등을 목표로 하고 있음. 현재 미국 FDA와 AAFCO에서 승인된 생균제 첨가가능 미생물 균주의 현황은 Table 3과 같음.
- 최근 들어, 일본의 모리나가유업은 프로바이오틱스와 프리바이오틱스를 혼합한 신바이오틱스 제품을 기획하였음. 이 회사의 대표적 제품은 비피더스균 BB536에 lactulose와 lactoferin을 첨가한 “락토페린요구르트”이다. 또한 작년부터 관동지역에만 판매하기 시작한 우유형태의 음료 “락토페린플러스”가 호조를 보이고 있으며 현재 전국적으로 판매망을 넓히고 있음.

나. 관련 기술개발 현황

- 최근까지 국내외 연구기술 보고에 따르면 인체 장환경에서 장내미생물의 군집에 따른 특정화 기술은 몸 안 또는 표면에 살고 있는 미생물들에 의해 섭취되는 영양분의 대사 작용 기작 규명, 다양한 질병 및 장애에 대한 새로운 이해, 미생물체의 변화에 의한 새로운 진단법 개발, 신규 치료제 개발을 위한 단서 확보 등 새로운 과학적 사실 및 신규 실용화 연구의 중요성이 계속해서 강조되고 있음.

- 최근까지 이러한 생체 장환경에서의 장내미생물 특성을 규명하는 연구는 주로 mouse 동물모델이 사용되었음. 하지만 동물윤리에 대한 관심이 증대되면서 유럽을 중심으로 전 세계적으로 의약품이나 화장품 개발에 수행되고 있는 동물실험을 제한하는 보호법 실행이 적극적으로 논의되고 있으므로 동물실험을 대체할만한 in vitro 장생태계 대체 모델시스템 기술 개발의 필요성이 점점 중요해지고 있음.



Fig. 7. gnotobiotic animal 실험장비

- 최근 의학, 제약 및 식품 분야의 연구에 gnotobiotic animal 사용이 급증하여 많은 우수한 연구결과를 양산하여 왔으나, 최근 실험 동물의 윤리적 측면이 강조되면서 이를 대체할 만한 연구방법이 요구되고 있는 실정임. 또한, gnotobiotic 시설은 공간이 많이 차지할 뿐 아니라 유지관리에 막대한 비용이 소요되고 있음.
- 그리고 비용적인 측면에서 이러한 gnotobiotic animal 실험의 경우 다양한 실험조건의 combination에 필요한 다수의 실험개체수를 설계하기 어려우며 동일한 조건에서 다양한 실험조건을 측정하기 위한 High-throughput screening 실험 적용에는 적합하지 않음.

- 이러한 고가의 실험동물 사용에 대한 문제점을 극복하기 위해 1990년대 이후 in vitro에서 장환경을 모사하는 SHIME 기술이 개발되어 fermenter jar를 이용하여 다양한 환경적 요인들이 컨트롤되는 실험실에서 장내 세균총 및 이들의 ecosystem을 분석하는 것이 가능해졌음. 하지만 SHIME system의 이용은 편성 혐기적 조건을 완벽하게 재현할 수 없기 때문에 주로 통성 혐기 미생물이나 호기성 미생물에 제한적으로 적용되고 있는 실정임. 또한, 샘플수거와 미생물 균총 분석 등 다양한 분석기술상의 한계점으로 인해 실제 인체 장환경의 ecosystem을 직접적으로 대변하지는 못함. SHIME system에 가축의 소장을 관으로 연결하여 사용되는 방식 또한 3시간 이상 사용하기 어려우며, 여러 가지 조직들이 가지는 장점을 충분히 살릴 수 없다는 단점이 있음.



Fig. 8. SHIME 설비

- 또한, 2002년 일본 야쿠르트 연구소가 개발한 YIF-SCAN은 장내 미생물을 분석하는데 사용되는 장비로 장내 미생물에 대한 연구가 손쉬워 졌으나, 가격이 대당 1억 엔으로 보편적으로 이용하는데 한계가 있으며, 미생물 균총에 대한 분석만 가능하며 장내에서의 변화 및 숙주와의 interaction을 연구하기에는 부적절한 것으로 생각됨.

- 따라서 본 세부과제에 의해 도출된 예쁜 꼬마선충 C. elegans를 이용한 장내 유용미

생물 및 신바이오텍스 혼합소재의 장건강 기능성 탐색 기술을 발전시킨다면 mouse, pig와 같은 실험동물의 사용을 대체하여 비용을 획기적으로 절감시킬 수 있을 것으로 판단됨.



Fig. 9. YIF-SCAN 구동모습

3. 연구수행 내용 및 결과

D-05

3-1. 신바이오틱스 소재를 사용한 장기능개선 및 면역증진 유제품 개발

[주관 : 서울우유협동조합]

가. 신바이오틱스 소재의 유제품 적용 및 발효특성 평가 시스템 확립

(1) 실험 내용

(가) 신규 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스 소재의 발효유 소량제조 실험

- ① 제1협동기관에서 선발된 프리바이오틱스 신규소재(꾸찌뿌잎, 뿌잎, 감잎, 연잎 추출물)를 동결건조하여 사용하였으며, Chr. Hansen에서 제공받은 상업용 starter culture (ST-BODY-1, Lb-12)를 사용한 lab-scale의 발효유 커드제조 실험을 Fig.10과 같이 진행하였음.

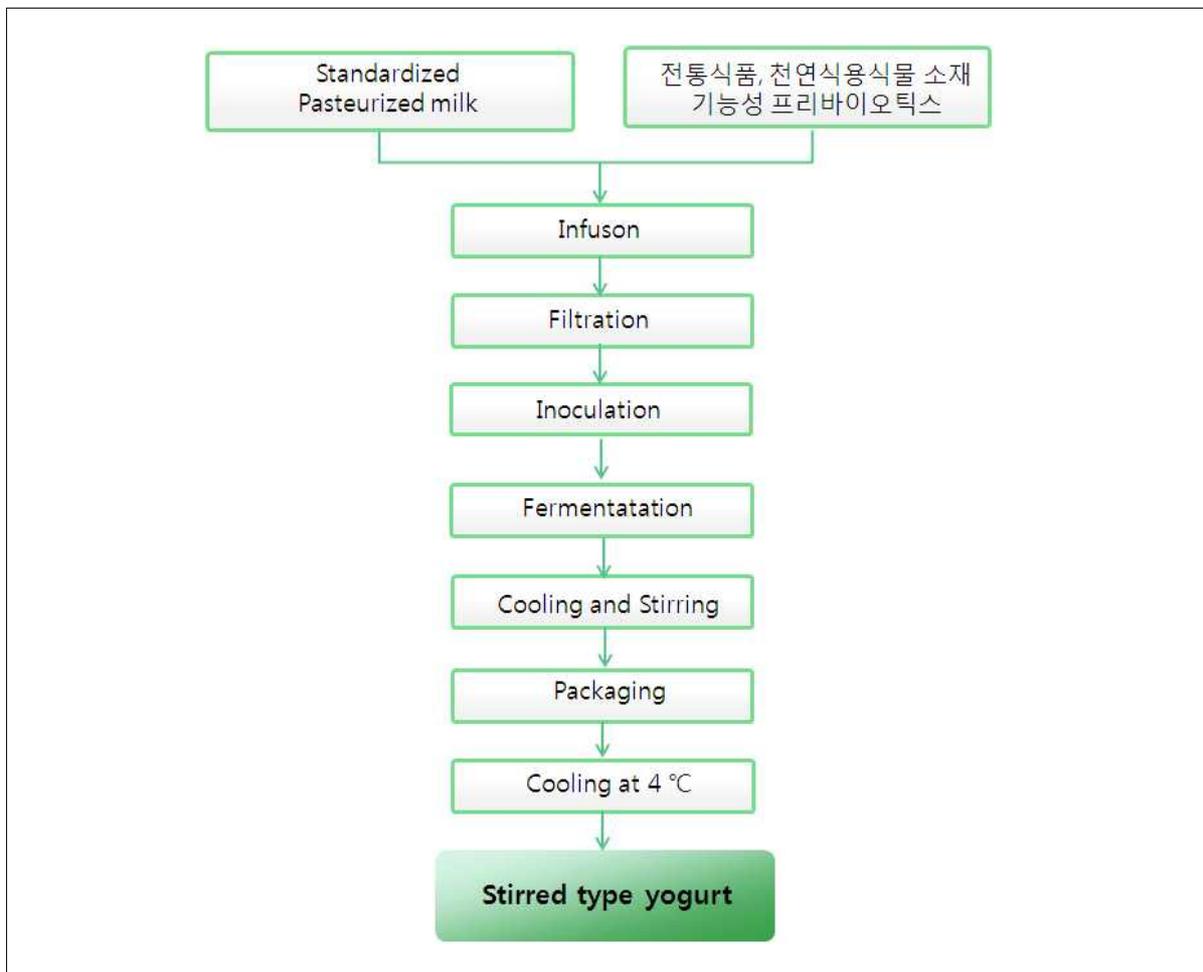


Fig. 10. 기능성 발효유 제조 공정

② 프리바이오틱스 신규소재의 종류와 첨가비율(0.2%, 0.4%), starter culture의 종류 및 첨가비율(0.0002%, 0.0004%, 0.002%)을 조정하여 최적 발효유 제조 비율을 설정하였음.

- 약 60℃로 가온한 우유에 프리바이오틱스 신규소재를 첨가하고 교반기로 1,000rpm에서 약 15분간 균질
- 95℃ 향온수조에서 약 15분간 살균
- 상온에서 cooling 후, ST-BODY-1 및 Lb-12 접종
- 41℃ 배양기에서 pH 4.5까지 배양

③ 제조한 발효액은 4℃에서 보관하며, 1주일 간격으로 저장기간에 따른 미생물학적 및 이화학적 특성을 4주 동안 비교·평가하였음.

(나) 미생물학적 발효특성 평가

① pH 및 산도 변화 측정

- 산도는 발효액 9 g과 증류수 40 mL을 섞은 후 0.1N NaOH를 사용하여 자동적정기로 분석하였음.
- 산도는 다음 계산식에 대입하여 구하였다.

$$\text{도 (\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 적정량 (mL)} \times 0.0090 (\text{젖산 계수})}{\text{발효액 샘플양 (g)}} \times 100$$

② Kinetic parameter 측정

- Kinetic parameter는 최대발효속도(V_{\max}), pH 변화속도(dpH/dt), 최대발효속도 도달시간(T_{\max}), pH 5.0 도달시간($T_{pH\ 5.0}$), 발효완료시간(T_f)을 측정하였음.
- 최대발효속도 및 pH 변화속도는 10⁻³ pH units/h로 표시하고, 나머지 parameter는 h로 표시하였음.

③ 균수 변화 측정

- 균수는 각 균종에 따른 선택배지를 사용하여 pour plate method로 측정하였음.
- *Streptococcus thermophilus* 측정을 위해 Oxoid 사의 M17 agar 배지를 사용하였으며, 35℃에서 배양하였음.
- *Lactobacillus bulgaricus*는 BD Difco 사의 MRS agar 배지를 pH 4.5(acetic acid)로 조정하여 분주하였으며, 37℃에서 혐기조건으로 배양하였음.

(다) 이화학적 발효 특성 평가

① Syneresis 변화 측정

- 제조 발효액의 물성 변화를 측정하기 위해 syneresis를 측정하였음.
- 발효액 샘플 20 g을 conical tube에 정확히 칭량하고 3,500 rpm에서 15분간 원심분

리함. 상등액의 무게를 칭량하고 다음 계산식에 대입하여 syneresis를 구하였음.

$$Syneresis (\%) = \frac{\text{상등액 무게 (g)}}{\text{효액 샘플 무게 (g)}} \times 100$$

② 유기산 변화 측정

- 발효액 제조 시 또는 저장 중 생성되는 citric acid, pyruvic acid 및 lactic acid의 함량을 분석하였음.
- 분석을 위한 시료의 전처리는 시료 5 g을 conical tube에 정확히 칭량하고 3% 메타인산 20 mL로 추출하며, 추출액은 원심분리(5,000rpm, 10 min) 후 0.45 µm 필터로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였음.
- HPLC-UV 및 Aminex HPX-87H column(300 x 7.8 mm, Bio-Rad, USA)을 사용하였고, 주입량은 20 µL, 이동상으로써 0.005 N H₂SO₄를 0.8 mL/min 유속 및 UV 210 nm에서 분리 후 분석하였음. 분석된 성분은 표준물질의 분석 데이터와 spectrum 등을 비교하여 확인하였음.

③ 향미성분 (volatile compound) 변화 측정

- 발효액 제조 시 또는 저장 중 생성되는 acetaldehyde, acetone, ethanol, 2-butanone, diacetyl, acetoin 및 acetic acid의 함량을 분석하였음.
- 발효액 샘플 10g을 정확히 칭량하여 headspace vial에 넣은 후, 완전히 밀봉함. HSS-GC/MS 및 HP-INNOWax column (60m, 0.25mm, 0.25um, Agilent, USA)을 사용하였고, 주입량은 10 µL, HSS 조건은 80°C, 60분 heating하였음. GC 조건은 He 가스를 carrier 가스로 하였으며, 주입구 온도는 220°C로 split mode(15:1)를 사용하였고, 오븐 온도는 40°C에서 5분 holding 후, 분당 10°C씩 200°C까지 올렸음. MS 조건은 Table 4에 나타내었으며, SIM mode로 분석하였음. 선택이온과 확인이온의 머무름 시간과 비를 이용하여 정성·정량분석을 실시하고 이 때 정량을 위해 선택된 이온들은 Table 5와 같음.

Table 4. MS 분석 조건

Ion source temp.	230°C
Interface temp.	270°C
Ionization energy	70eV
Ionization method	Electronic Ionization
Mass correction	PFTB A(perfluorotributylamine)

Table 5. MS SIM mode 분석 조건

Compound	Molecular weight (kDa)	Selected ions (m/z)

Acetaldehyde	44.05	29, 43, 44
Acetone	58.08	43, 58
2-butanone	72.11	43, 72
Ethanol	46.07	31, 45, 46
Diacetyl	86.09	43, 86
Acetoin	88.11	43, 45, 88
Acetic acid	60.10	43, 45, 60

(라) 관능적 특성 평가

① 패널 선정

- 전북대학교에서 식품공학을 전공으로 하는 학생 30명을 대상으로 발효유 제조 및 발효 시 생성되는 향미 성분에 대한 이론 교육을 수행한 후 테스트를 통해 패널을 선정하였음.

② 시료 준비

- 관능평가에 사용된 시료는 선발된 프리바이오틱 소재 4가지를 각각 첨가한 우유에 ST-BODY-1 0.0004% 또는 ST-BODY-1 0.0002%와 Lb-12 0.0002%를 접종하고, pH 4.6까지 발효하여 제조한 발효액으로 하였음. 제조한 발효액은 4℃에 보관하였으며, 48시간 내에 관능평가 패널에게 제공되었음.

③ 관능평가 항목 및 방법

- 평가 항목은 맛, 향, 조직감 및 종합 기호도의 네 가지 항목으로 하였고, 평가 방법은 각 항목별로 9점 척도법을 사용하여 관능적 특성을 평가하였음. 최종적으로 순위법을 사용하여 시료 중 기호도가 높은 시료 3가지를 평가하도록 하였다. 평가 항목별 세부 기준은 다음과 같으며, 관능평가는 Fig. 11과 같이 진행하였음.

1. 맛 (단맛, 신맛, 쓴맛)
2. 향
3. 조직감 (점성, 질감)
4. 전체적인 기호도

발효액 관능검사

날짜 : _____ 성별 : _____ 성명 : _____

다음 검사들의 전체적인 맛, 향, 조직감에 대해 평가해주세요.

1. 맛

단맛 싫지 않다 적당하다 매우 좋다

신맛 시지 않다 적당하다 매우 좋다

쓴맛 쓰지 않다 적당하다 매우 좋다

2. 향

부하다 적당하다 강하다

3. 조직감

원성 부하다 적당하다 강하다

질감 부드럽다 적당하다 거칠다

4. 전체적인 기호도

부호 적당하다 부호

좋아하는 검사를 순서로 순위로 적어주시시오

순위 1등 2등 3등

시료번호 _____

기타의견 _____

Fig. 11. 프리바이오틱스 소재와 starter culture에 따른 발효액의 관능평가지

(마) 기능성 평가

① 항산화 활성 평가

- DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay는 DPPH로 최초 산화를 개시한 후 시료에 의한 radical의 소거 활성을 알아보기 위한 실험임.
- 500 μM의 DPPH reagent 100 μL와 시료 100 μL를 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음..
- Ferric reducing ability of plasma(FRAP) assay는 total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridytriazine(Fe³⁺-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridytriazine(Fe²⁺-TPTZ)로 환원되는 것을 이용하는 원리임.
- Sample을 FRAP reagent와 1:30의 비율로 혼합한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화활성을 확인하고, 표준곡선을 iron(II)sulfate heptahydrate(FeSO₄·7H₂O)로 작성하여 시료의 환원력 활성 정도를 비교하였음.
- ABTS assay는 ABTS를 potassium persulphate와 반응시켜 청록색의 ABTS+ radical을 형성시켜 이를 734 nm에서 흡광도 측정 후 시료를 가하여 시료 내 항산화 물질의 농도와 비례하여 감소하는 ABTS+의 흡광도를 확인하여 항산화능을 측정하는

원리임.

② 심혈관 보호 효과 평가

- Thrombin inhibition 활성은 S.B. Zhang 등(2008)의 anti-thrombotic activity assay 를 사용하여 측정하였음.
- Thrombin은 혈액 응고의 본질인 혈액 속의 가용성 피브리노겐을 가수분해하여 불용성인 피브린으로 변화시켜 혈액을 응고시키므로 thrombin 저해율을 측정하는데 사용됨.
- 시료 및 buffer(blank), 헤파린(positive control)은 피브리노겐과 혼합하여 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, thrombin을 첨가하여 효소반응을 개시하고, 37℃, 10분 후 405nm에서 흡광도를 측정하여 헤파린 대비 저해율(%)로 나타내었음.
- HMGR reductase inhibition assay는 cholesterol synthesis 과정 중 다음 반응을 유도하는 HMG-CoA reductase 활성을 억제시켜 cholesterol 합성을 저해시키는 효과가 있는지 확인하는 실험임.
- $\text{HMG-CoA} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{mevalonate} + 2\text{NADP}^+ + \text{CoA-SH}$
- HMG-CoA와 NADPH를 기질로 하고 시료를 첨가한 후, HMG-CoA reductase 활성의 억제 정도를 NADP⁺의 흡광도를 통해 측정하였음.

(2) 실험 결과

(가) 발효액 제조 조건 설정

① 프리바이오틱스 소재 첨가량에 따른 발효액 제조 및 발효특성 평가

- 발효액 제조 배합비 설정을 위하여 프리바이오틱스 소재 첨가량과 starter culture 종류를 달리하여 발효액을 제조하였음. 전북대학교에서 선발하여 제공받은 프리바이오틱스 소재는 Fig. 3과 같음.
- 프리바이오틱스 소재 중 꾸찌뽕잎 추출물을 우유에 각각 0.2% 또는 1.0% 첨가한 후, ST-BODY-1 0.002% 또는 ST-BODY-1 0.002%와 Lb-12 0.002%를 접종하여 1시간 간격으로 pH를 측정하였음. 프리바이오틱스 추출물을 첨가하지 않은 시료를 대조군으로 하였음. Starter culture 별로 프리바이오틱스 소재의 첨가량에 따른 pH 변화는 Fig. 12와 같음.
- ST-BODY-1과 Lb-12의 복합 균주를 접종한 그룹이 ST-BODY-1 단일 균주 접종 그룹에 비해 발효 속도가 빨랐음.
- 단일균주 접종 그룹에서는 발효 5시간에서 세 가지 시료의 pH 차이가 크게 나지 않은 반면, 복합 균주 접종 그룹에서는 프리바이오틱스 소재 0.2% 첨가, 1.0% 첨가, 대조군 순서로 발효 속도에 차이를 나타냄.

- 프리바이오틱스의 첨가량에 따라 발효 균주의 생장에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 발효 속도가 비교적 높았던 0.2% 첨가량을 배합비로 하여 다음 실험을 진행하였음.

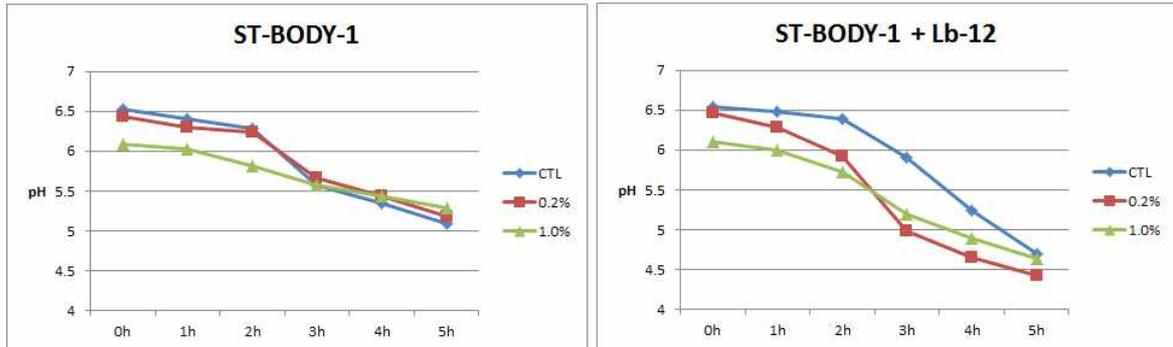


Fig. 12. 프리바이오틱스 소재 첨가량에 따른 발효액의 pH 변화

② 균주 접종량에 따른 발효액 제조 및 발효 특성 평가

- ST-BODY-1 단일 균주 접종 시(0.002%), Lb-12와의 복합 균주를 접종한 발효액 (0.002%+0.002%=0.004%)과 최종 균주 접종량에 차이가 있으므로 접종량을 동일하게 시료를 제조하였으며, pH 변화를 측정하여 발효 특성을 비교하였다. 균주 접종량에 따른 pH 변화는 Fig. 13와 같음.
- 복합 균주 접종 시, 단일 균주를 접종한 시료에 비해 발효 속도가 빨랐으며, ST-BODY-1 균주를 0.002% 접종한 시료와 0.004% 접종한 시료의 발효 속도는 차이가 없었음.
- 발효액 제조 조건을 동일하게 해주기 위해, ST-BODY-1 단일 균주 접종 발효액 제조 시 복합 균주 접종 시와 동일하게 0.004%를 접종량으로 정하였음.
- 최종 발효액 제조 조건은 프리바이오틱스 소재 0.2% 첨가, 균주 접종량 0.004%로 하였음.

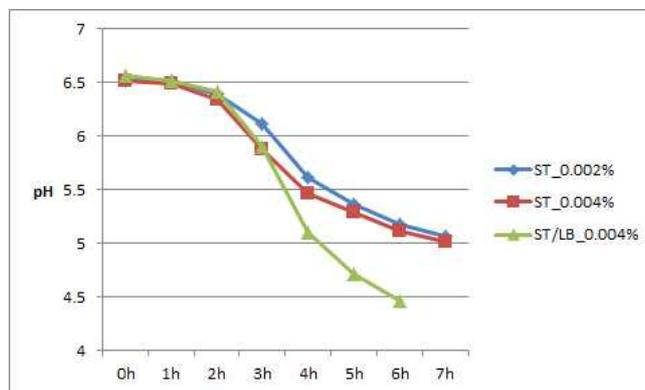


Fig. 13. 균주 접종량에 따른 발효액의 pH 변화

(나) 발효액 제조

① 발효액의 제조

- 프리바이오틱스 소재의 첨가와 종류에 따른 발효 특성 비교 평가와 발효 starter 균주 종류에 따른 발효 특성 비교 평가를 위해 설정된 발효 조건으로 발효액을 제조하였음.
- 제조한 발효액의 시료는 Table 6과 Fig. 14에 나타내었음.

Table 6. 제조한 발효액의 배합 조건

	ST-BODY-1 0.004%		ST-BODY-1 0.002% + Lb-12 0.002%
ST-1	Control (프리바이오틱스 소재 무첨가)	ST/LB-1	Control (프리바이오틱스 소재 무첨가)
ST-2	꾸찌뿌잎 추출물 0.2%	ST/LB-2	꾸찌뿌잎 추출물 0.2%
ST-3	뿌잎 추출물 0.2%	ST/LB-3	뿌잎 추출물 0.2%
ST-4	감잎 추출물 0.2%	ST/LB-4	감잎 추출물 0.2%
ST-5	연잎 추출물 0.2%	ST/LB-5	연잎 추출물 0.2%



Fig. 14. Starter 균주와 프리바이오틱스 소재별로 제조한 발효액

(다) 발효 시간별 발효 특성 평가

① 발효 시간별 pH와 산도 변화 및 kinetic parameter 측정

- 발효액은 pH 4.6을 end point로 하여 제조하였으며, 1시간 간격으로 pH와 산도를 측정하였고, 이를 통해 kinetic parameter를 구하여 발효 특성을 확인하였음 (Fig. 15, Fig. 16, Table 7).
- ST-BODY-1 단일 균주 접종 시, 프리바이오틱스 소재를 첨가하지 않은 대조군과 프리바이오틱스를 첨가한 그룹들 간의 발효 속도 차이가 거의 없는 반면, 복합 균주를 접종하여 제조한 발효액의 경우 대조군에 비해 프리바이오틱스 소재를 첨가한 그룹의 발효 속도가 유의적으로 증가하였음.

- 단일 균주 접종 시 복합 균주를 접종하였을 때보다 초반 발효 속도가 컸지만, 후반에는 복합 균주를 접종한 그룹의 발효 속도가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었음.

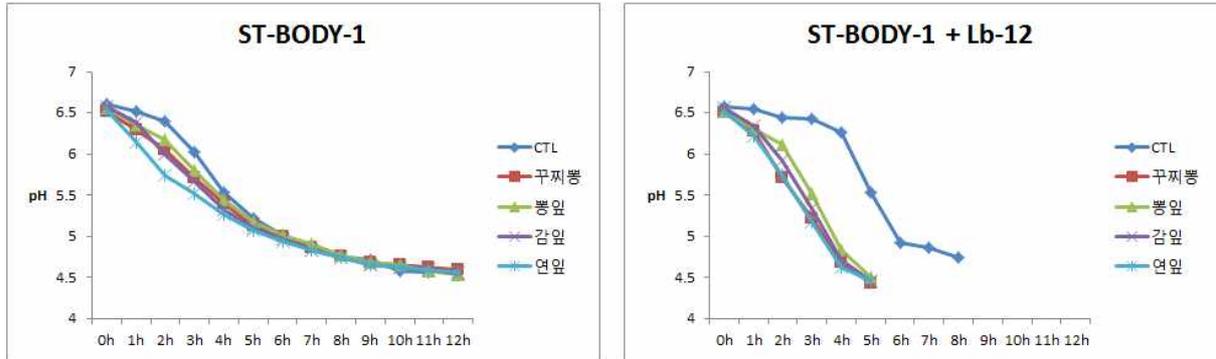


Fig. 15. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 발효 시간별 pH 변화

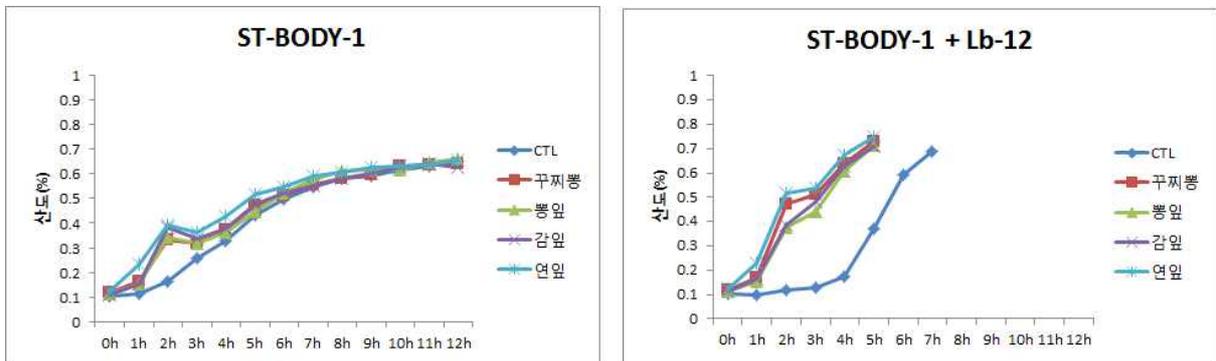


Fig. 16. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 발효 시간별 산도 변화

Table 7. 프리바이오틱스 소재와 starter 균주에 따른 발효액의 kinetic parameter

Starter 균주	프리바이오틱스 소재	V_{max} (pH units/h)	dpH/dt (pH units/h)	T_{max} (h)	$T_{pH5.0}$ (h)	T_f (h)
ST	CTL	0.49	0.49	4.0	6.0	11.0
	꾸찌뽕	0.34	0.34	3.0	6.0	12.0
	빵잎	0.37	0.37	3.0	6.0	12.0
	감잎	0.39	0.39	2.0	5.0	12.0
	연잎	0.4	0.4	2.0	5.0	12.0
ST/LB	CTL	0.72	0.72	5.0	5.5	8.0
	꾸찌뽕	0.56	0.56	2.0	3.5	5.0
	빵잎	0.68	0.68	4.0	3.5	5.0
	감잎	0.63	0.63	4.0	3.5	5.0
	연잎	0.57	0.57	3.0	3.5	5.0

② 발효 시간별 유산균수 측정

- 프리바이오틱스 소재의 첨가와 종류에 따른 starter 균주의 균수 변화를 측정하기 위해 각 starter 균주의 선택 배지를 사용하여 발효액의 발효 시간별 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 균수를 측정하였음 (Fig. 17).
- 발효액의 커드가 생성되는 지점인 pH 5.0 부근에서부터 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 균수가 급격히 증가하였음.
- 단일 균주로 발효한 경우 대조군과 프리바이오틱스 소재를 첨가한 그룹간의 *S. thermophilus* 균수 차이가 크지 않았지만, 복합 균주로 발효한 경우 *S. thermophilus*의 성장에서 프리바이오틱스 소재 첨가군에 비해 대조군은 대수기가 늦었으며, *L. bulgaricus*는 프리바이오틱스 소재 첨가군에서는 발효 전에 비해 약 2.5 log CFU/mL 증가했으나 대조군의 균수 변화는 거의 없었음.

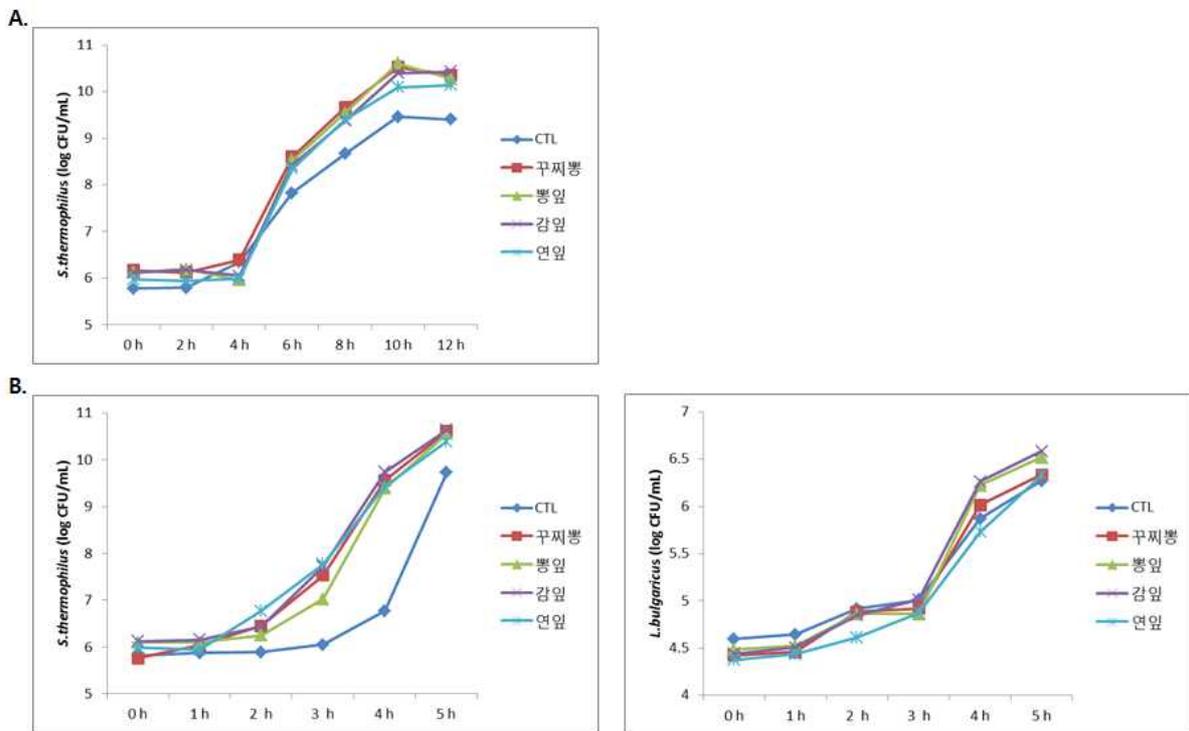


Fig. 17. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 시간별 균수 변화 (A. ST-BODY-1 단일 균주 발효액, B. ST-BODY-1과 Lb-12 복합 균주 발효액)

(라) 제조 발효액의 이화학적 특성 및 물성 평가

① 제조 발효액의 syneresis 측정

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 물성을 비교·평가하기 위해 syneresis를 측정하였음 (Fig. 18).
- 단일 균주와 복합 균주로 발효한 발효액의 대조군과 프리바이오틱스 소재 첨가군의 syneresis(%)를 비교한 결과, 프리바이오틱스 소재를 첨가했을 때 syneresis가 적게 발생하는 것을 확인하였음.
- 프리바이오틱스 소재 간 비교 시, 뽕잎과 감잎 추출물을 첨가한 발효액의 syneresis가

비교적 적게 일어난 것으로 나타났음.



Fig. 18. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 syneresis (%)

② 제조 발효액의 유기산 측정

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 이화학적 특성을 비교·평가하기 위해 유기산 분석(citric acid, pyruvic acid, lactic acid)을 진행하였음 (Fig. 19).
- TCA cycle의 초기반응물질인 citric acid의 양은 단일 균주로 발효한 발효액에 비해 복합 균주 발효액이 적었으며, 균수와 pH 및 산도 변화 결과에 따라 복합 균주 발효액의 TCA cycle이 효과적으로 일어났다고 판단됨.
- TCA cycle 최종 산물인 pyruvic acid와 lactic acid의 양은 복합 균주 발효액이 많았으며, lactic acid의 경우 프리바이오틱스 소재 첨가균이 대조균에 비해 많은 양이 생성된 것을 확인할 수 있었음.

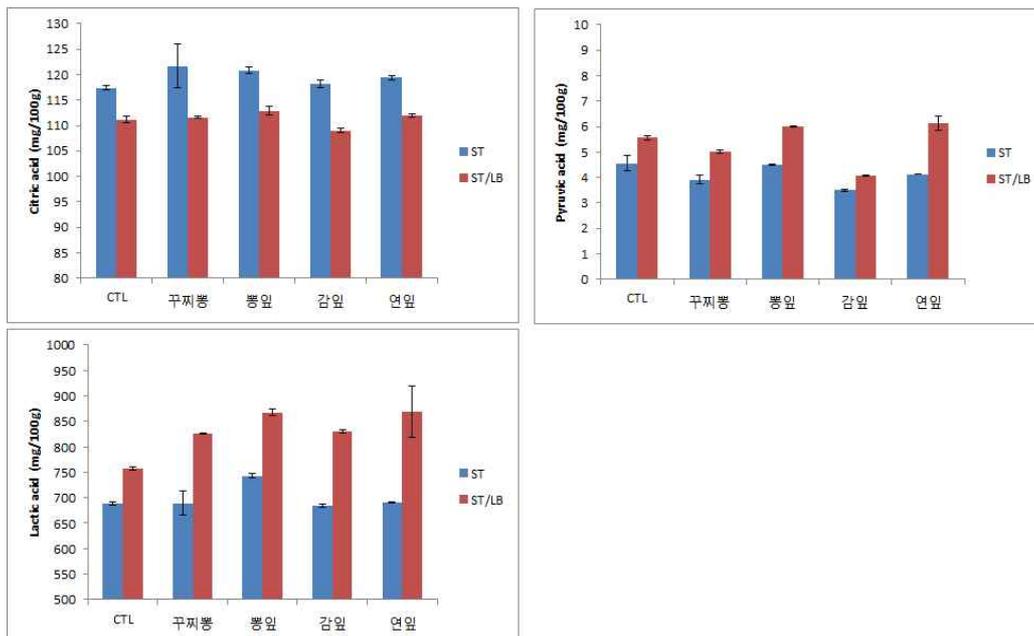
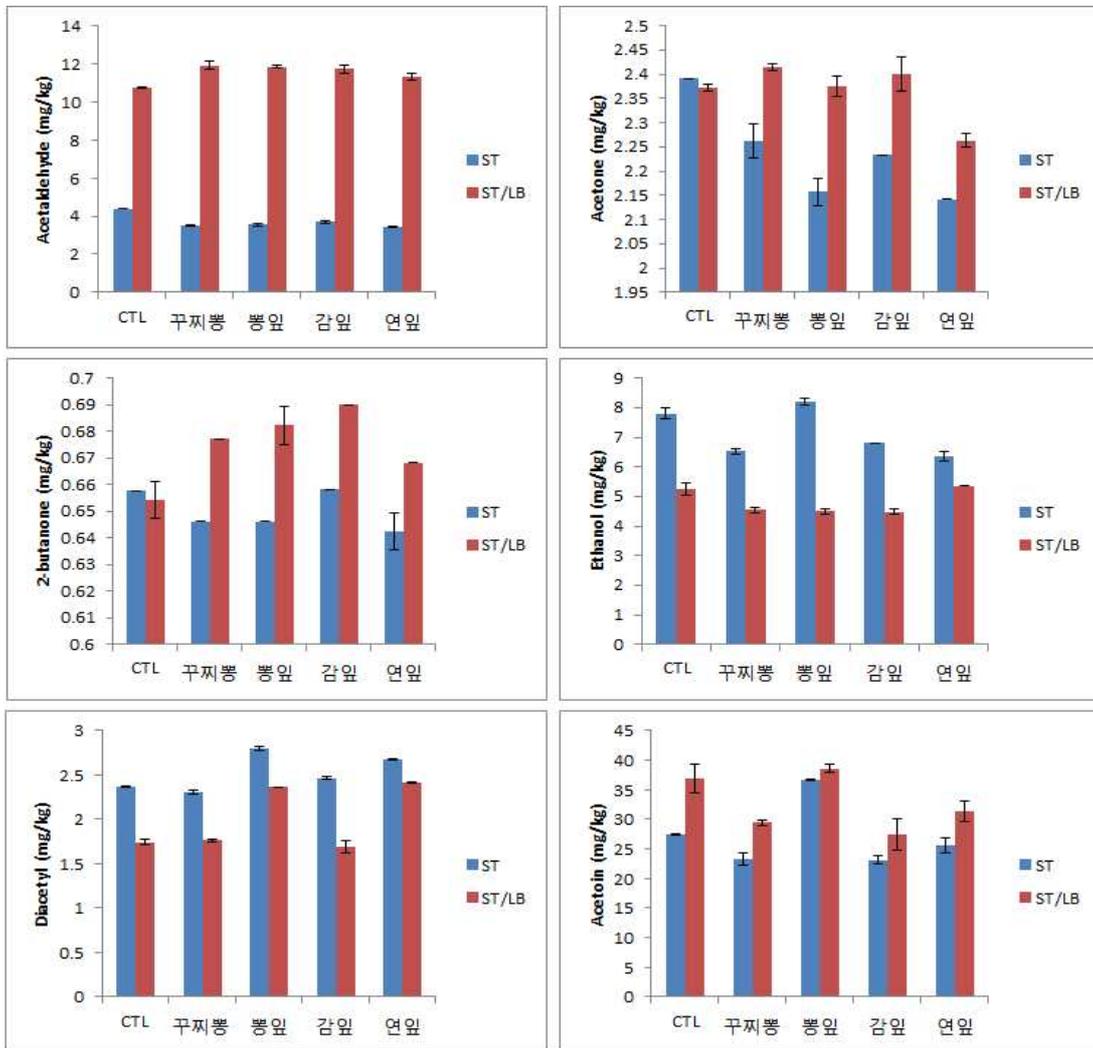


Fig. 19. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 유기산 함량

③ 제조 발효액의 향미성분 (volatile compound) 측정

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 이화학적 특성을 비교·평가하기 위해 향미성분 분석(acetaldehyde, acetone, 2-butanone, ethanol, diacetyl, acetoin, acetic acid)을 진행하였음 (Fig. 20).
- Acetaldehyde는 starter 균주와 pH의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있으며, 복합 균주 발효액이 단일 균주 발효액에 비해 acetaldehyde가 많이 생성되었다. 프리바이오틱스 소재별 차이는 없었음.
- Diacetyl, acetone 및 2-butanone은 발효액 내 함량이 매우 작은 수치였으며, 세 가지 화합물은 *L. bugaricus*와 *S. thermophilus*에 의해 생성되지 않는다는 보고가 있었음.
- Ethanol은 *S. thermophilus*에 의해 생성되는 alcohol dehydrogenase의 작용으로 acetaldehyde로부터 생성되며, 낮은 pH에서 acetaldehyde의 산화에 의해 acetic acid가 생성되는 것으로 알려져 있음. Ethanol 함량은 ST-BODY-1이 두 배로 집중된 ST-BODY-1 단일 균주로 발효한 발효액에서 더 많은 양이 검출된 것을 확인 할 수 있었다. Acetic acid는 acetaldehyde와 비슷한 양상을 나타냈음.



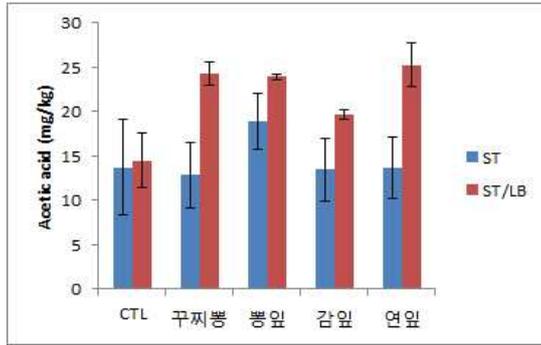


Fig. 20. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 향미성분 함량

④ 제조 발효액의 항산화 활성 평가

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 항산화 활성 평가를 위해 DPPH, FRAP, ABTS를 진행하였음 (Fig. 21).
- 대조군에 비해 프리바이오틱스 소재를 첨가한 발효액의 항산화 활성이 높았으며, FRAP과 ABTS 실험 결과, 단일 균주 발효액보다 복합 균주 발효액의 항산화 활성이 높은 것으로 나타났음.
- 프리바이오틱스 소재 간 항산화 활성의 차이를 보면, 꾸찌뽕잎 추출물, 뽕잎 추출물, 연잎 추출물, 감잎 추출물의 순서로 항산화 활성이 높았음.
- 항산화 활성은 시료 내 페놀과 플라보노이드 함량과 깊은 관련이 있으며, 제1협동 기관(전북대학교)의 프리바이오틱스 소재의 총 페놀 및 총 플라보노이드 결과 (Fig. 22)와 비교해보았을 때, 항산화 활성과 비슷한 경향을 나타내는 것으로 나타났음.

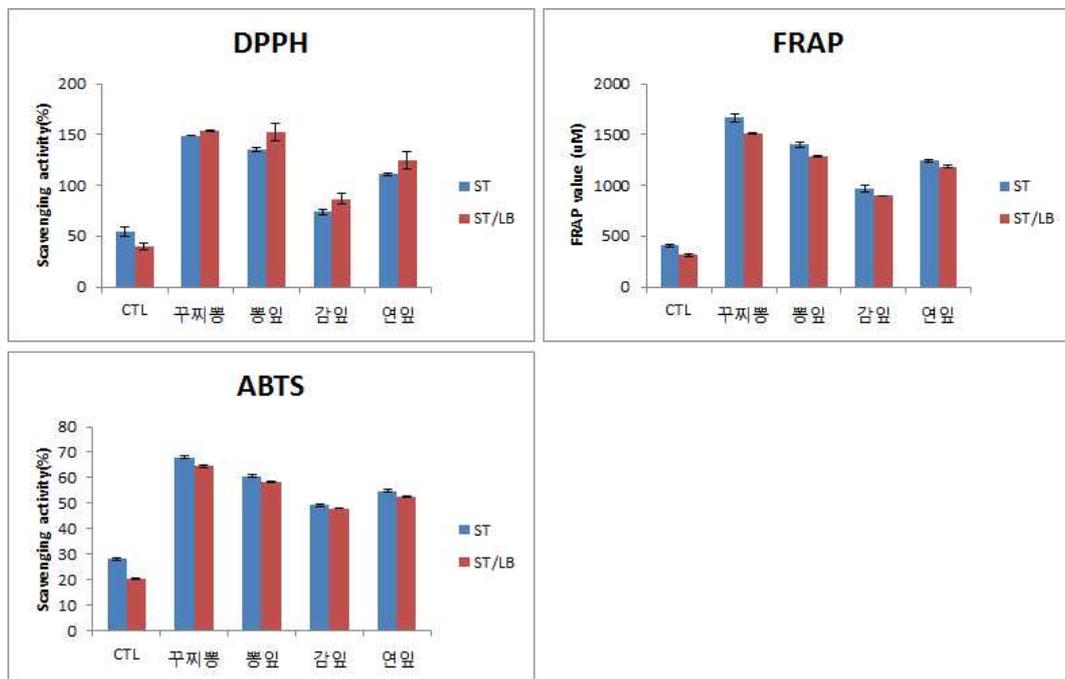


Fig. 21. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 항산화 활성 평가

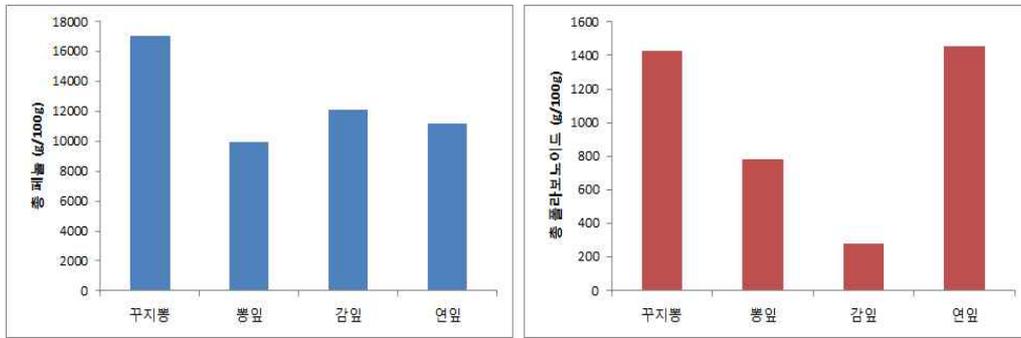


Fig. 22. 프리바이오틱스 소재의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

⑤ 제조 발효액의 심혈관 보호 효과 평가

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 심혈관 보호 효과 평가를 위해 thrombin 저해 활성과 HMG-CoA reductase 저해 활성을 측정하였음 (Fig. 23).
- Thrombin 저해 활성 평가 결과, 단일 균주 발효액의 저해 활성이 복합 균주 발효액에 비해 높았으며, 프리바이오틱스 소재 첨가에 따른 활성 증가를 확인할 수 없었음.
- HMG-CoA reductase 저해 활성 평가 결과, starter 균주별, 프리바이오틱스 소재 종류별로 활성에 차이가 있었음. 단일 균주 발효액의 경우, 대조군에 비해 감잎 추출물을 첨가한 발효액에서만 저해 활성이 증가하였고, 복합 균주 발효액의 경우에는 연잎 추출물을 제외한 나머지 소재를 첨가한 발효액에서 저해 활성이 증가하였음. 특히, 감잎 추출물을 첨가한 발효액에서 가장 큰 HMG-CoA reductase 저해 활성을 확인할 수 있었음.

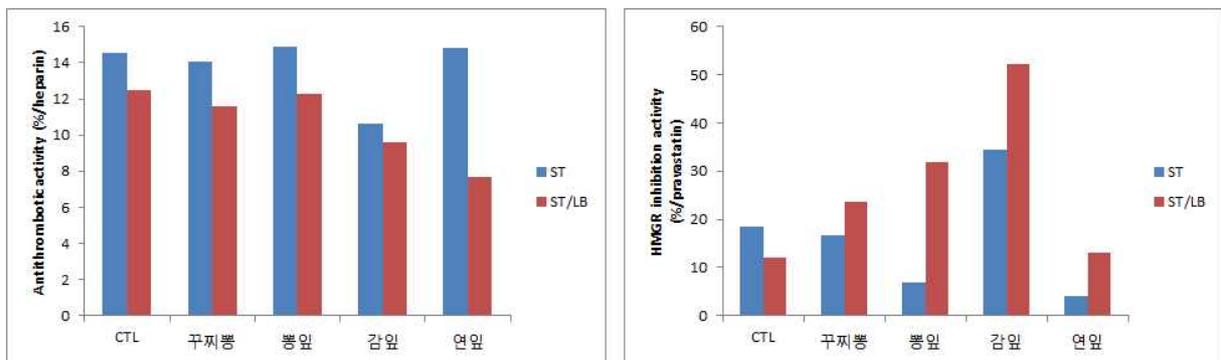


Fig. 23. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 심혈관 보호 효과 평가

(마) 발효액 제조 및 저장기간별 미생물학적 및 이화학적 특성 평가

① 발효액의 제조

- 발효 중 pH 및 산도의 변화를 세밀하게 확인하기 위해 Starter 균주 접종량을 줄이고 발효 시간을 증가시켰음.
- 단일 균주 발효액은 starter 균주로 ST-BODY-1 0.0004%를, 복합 균주 발효액은

ST-BODY-1 0.0002%와 Lb-12 0.0002%를 접종하여 발효액을 제조하였음

- 제조한 발효액은 총 4주 동안 4°C에 보관하며, 1주일 간격으로 저장기간에 따른 미생물학적 및 이화학적 특성을 평가하였음.

② pH 및 산도 변화 측정을 통한 발효특성 확인

- 발효액은 pH 4.5를 end point로 하여 제조하였으며, 1시간 간격으로 pH와 산도를 측정하였고, 이를 통해 발효 특성을 확인하였음 (Fig. 24, Fig. 25).
- ST-BODY-1 단일 균주 접종 시, 프리바이오틱스 소재를 첨가하지 않은 대조군과 프리바이오틱스를 첨가한 그룹들 간의 발효 시간은 차이가 거의 없는 반면, 발효 속도에는 큰 차이를 보였음. 복합 균주를 접종하여 제조한 발효액의 경우 대조군에 비해 프리바이오틱스 소재를 첨가한 그룹의 발효 속도가 유의적으로 증가하였다. 프리바이오틱스 소재 간 차이는 거의 없었음.
- 단일 균주 접종 시 복합 균주를 접종하였을 때보다 초반 발효 속도가 컸지만, 후반에는 복합 균주를 접종한 그룹의 발효 속도가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었음.

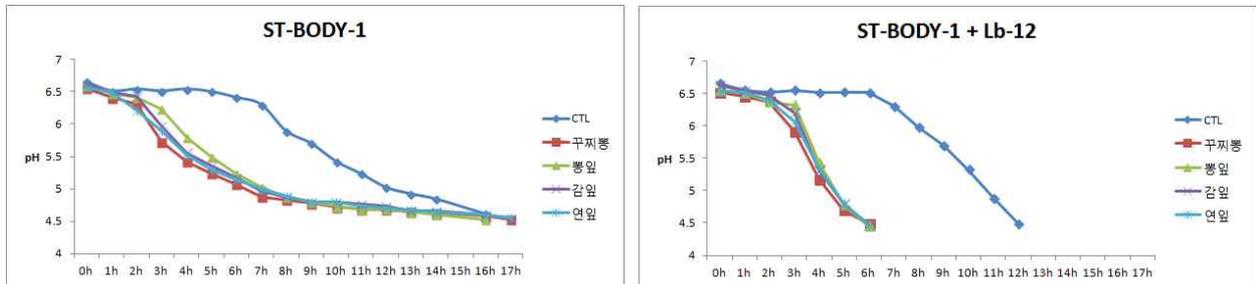


Fig. 24. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 발효 시간별 pH 변화

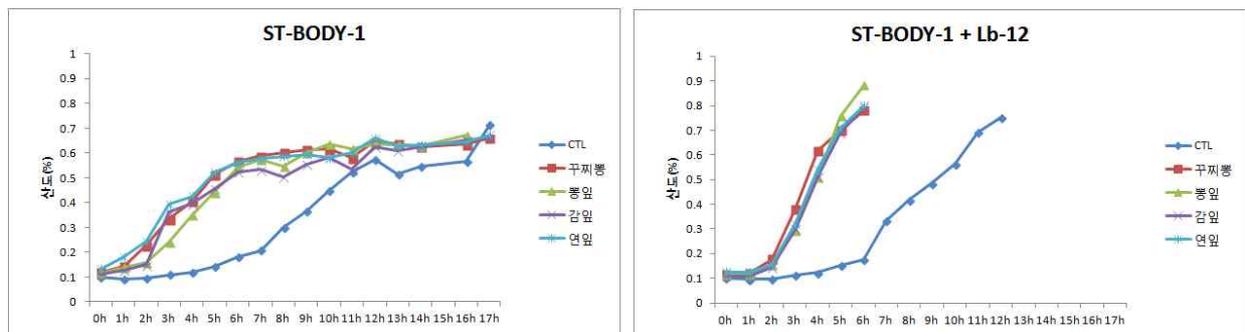


Fig. 25. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 발효 시간별 산도 변화

③ 발효액의 저장기간별 pH 및 산도 변화

- 발효액의 pH는 4.5에서 시작하여 단일 균주 발효액은 거의 변화가 없었으며, 복합 균주 발효액은 저장 2주차까지 감소하는 반면 3주차에서 pH가 약간 증가하는 것으로 나타남 (Fig. 26, Fig. 27).
- 단일 균주 발효액의 pH는 대조군의 변화가 가장 컸으며, 복합 균주 발효액은 뽕잎 추출물을 첨가한 발효액의 pH가 가장 많이 떨어짐.

- 산도 측정 결과, 저장기간별 pH의 변화와 비슷한 경향을 나타내는 것을 확인하였음.

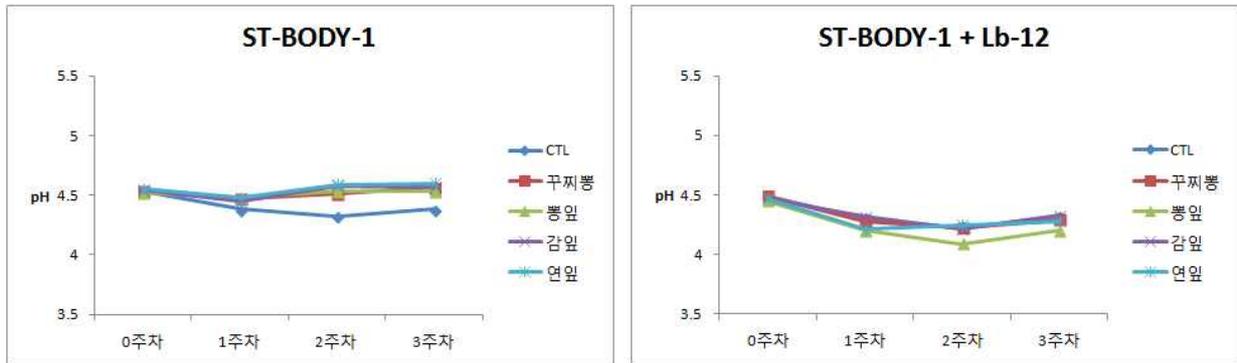


Fig. 26. 발효액의 저장기간에 따른 pH 변화

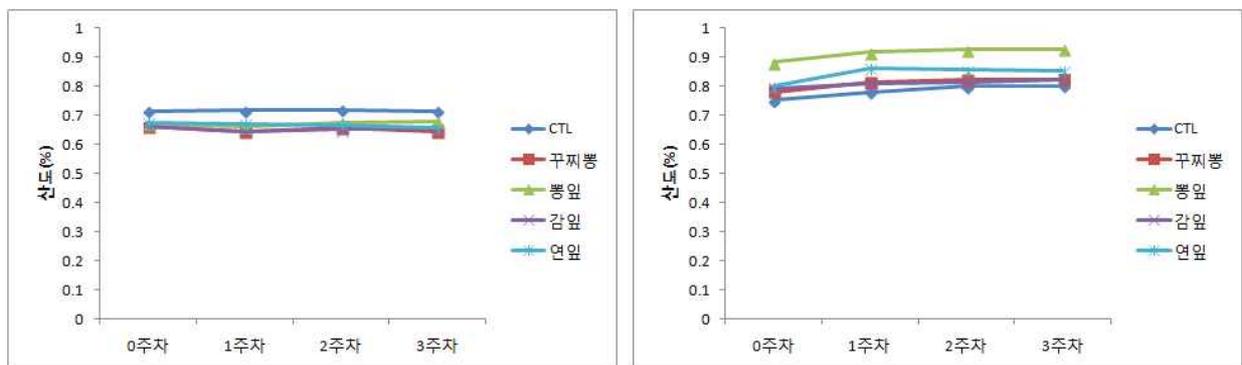


Fig. 27. 발효액의 저장기간에 따른 산도 변화

④ 발효액의 저장기간별 균수 변화

- 발효액의 저장기간별 균수의 성장 정도를 알아보기 위해, ST-BODY-1과 Lb-12 복합 균주로 발효시킨 발효액의 균수 변화를 측정하였음 (Fig. 28).
- *S. thermophilus*는 발효 전에 비해 발효가 끝난 후 3 log CFU/mL 정도 증가했으며, 저장기간에 따라 균수가 감소하지 않았음.
- *L. bulgaricus*는 발효 전에 비해 발효가 끝난 후 약 1~1.5 log CFU/mL 정도 증가했으며, 저장기간에 따른 균수의 변화는 프리바이오틱스 소재 첨가와 종류에 따라 차이가 있었음. 대조군에 비해 프리바이오틱스 소재 첨가군의 균수 증가가 컸으며, 특히 연잎 추출물과 감잎추출물, 뽕잎 추출물을 첨가한 발효액의 균수가 크게 증가했음.

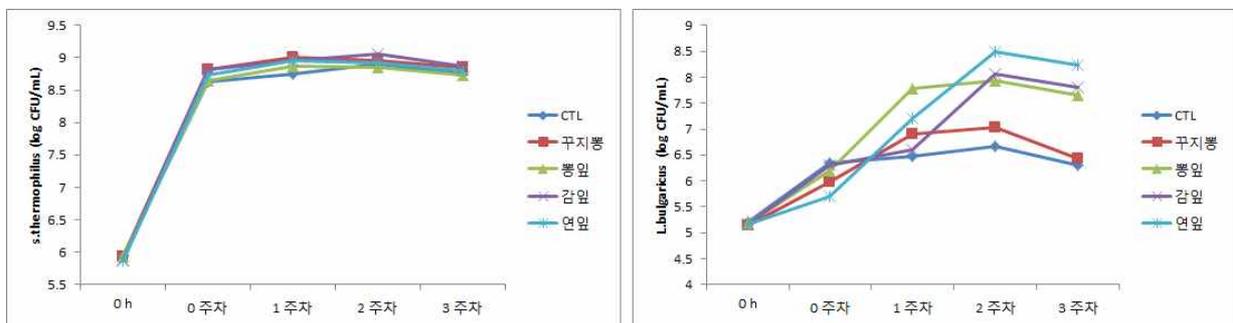
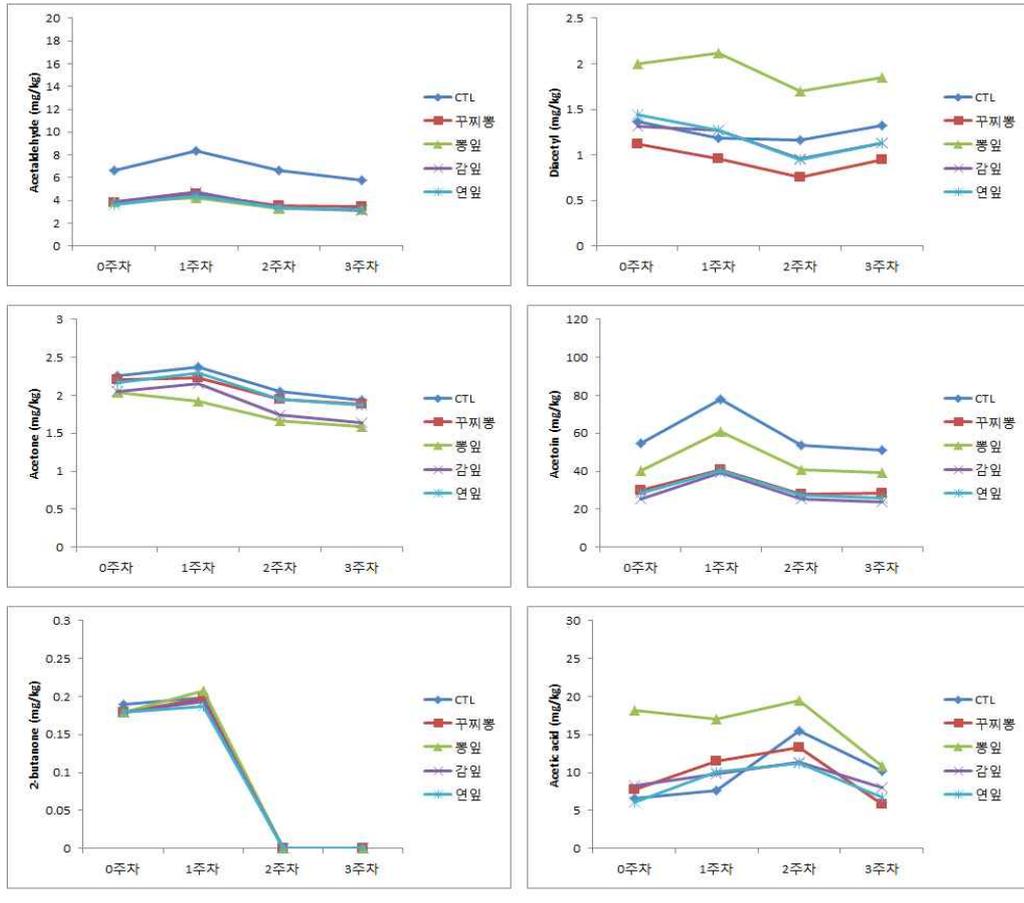


Fig. 28. 발효액의 저장기간에 따른 균수 변화

⑤ 발효액의 저장기간별 향미성분 변화

- 제조 발효액의 저장기간별 향미성분 변화를 측정된 결과는 Fig. 29과 Fig. 30에 나타냄.
- Acetaldehyde는 starter 균주와 pH의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있으며, 복합 균주 발효액이 단일 균주 발효액에 비해 acetaldehyde가 많이 생성되었음. Fig 17의 저장기간별 pH 변화와 비교해 보았을 때 acetaldehyde의 함량이 pH 변화와 비슷한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 단일 균주 발효액은 대조군이, 복합 균주 발효액은 병잎 추출물을 첨가한 발효액이 acetaldehyde 함량이 가장 높았음.
- Diacetyl, acetone 및 2-butanone은 발효액 내 함량이 매우 작은 수치였으며, 세 가지 화합물은 *L. bugaricus*와 *S. thermophilus*에 의해 생성되지 않는다는 보고가 있었음.
- Ethanol은 *S. thermophilus*에 의해 생성되는 alcohol dehydrogenase의 작용으로 acetaldehyde로부터 생성되며, acetic acid는 낮은 pH에서 acetaldehyde의 산화에 의해 생성되는 것으로 알려져 있음. Ethanol 함량은 ST-BODY-1이 두 배로 접종된 ST-BODY-1 단일 균주로 발효한 발효액에서 더 많은 양이 검출된 것을 확인할 수 있었음. Acetic acid는 acetaldehyde가 비교적 많이 검출된 복합 균주 발효액이 더 많은 양을 함유하고 있었으며, 단일 균주 발효액과 복합 균주 발효액 모두에서 병잎 추출물을 첨가한 발효액의 acetic acid 수치가 가장 높았음.



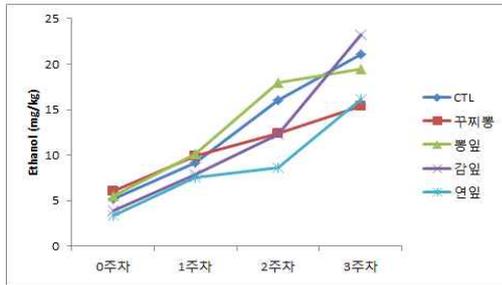


Fig. 29. ST-BODY-1 단일 균주로 발효한 발효액의 저장기간에 따른 향미성분 변화

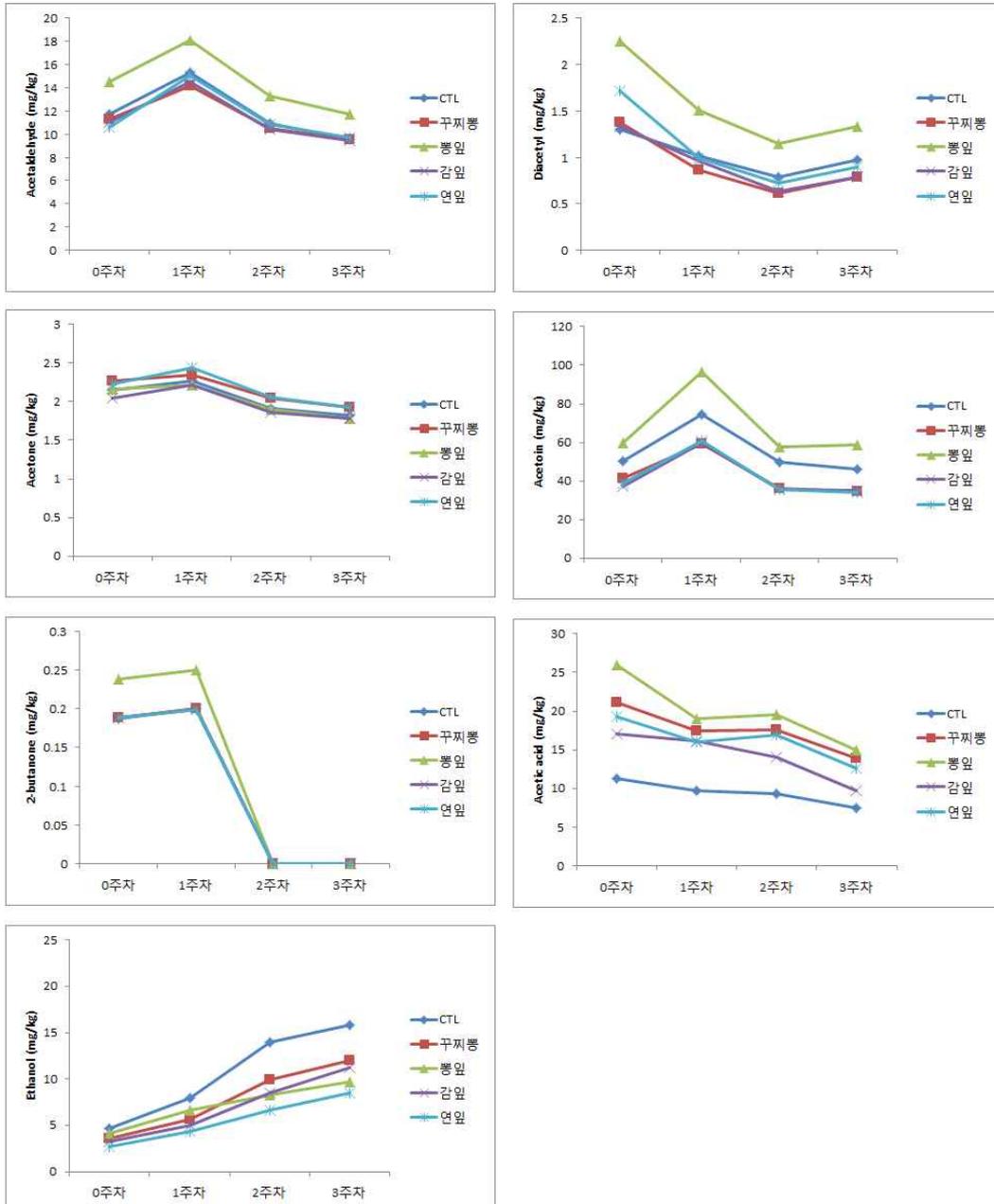


Fig. 30. ST-BODY-1과 Lb-12 복합 균주로 발효한 발효액의 저장기간에 따른 향미성분 변화

(바) 제조 발효액의 관능평가

① 발효액의 관능 평가

- 제조한 발효액의 starter 균주별, 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류별 맛, 향, 질감 및 전체적인 기호도를 비교·평가하기 위해 9점 척도법을 사용하여 훈련된 패널 18명을 대상으로 관능평가를 진행하였음 (Fig. 31).

② 관능 평가 결과

- 단일 균주와 복합 균주 발효액의 차이를 보면, 신맛 항목에서 확연한 차이를 볼 수 있었다. 복합 균주 발효액의 신맛이 비교적 강하다는 결과를 보였으며, 질감 역시 단일 균주 발효액에 비해 부드럽다는 응답이 많았음.
- 단일 균주 발효액의 경우, 전체적으로 신맛은 적당했으나 빵잎 추출물을 첨가한 발효액의 신맛이 강하다는 응답이 많았으며, 쓴맛은 프리바이오틱스 소재를 첨가하지 않은 대조군에 비해 소재 첨가 발효액이 비교적 강하다는 응답이 많았다. 점성과 질감 역시 빵잎 추출물이 다소 거칠고 점성이 높다는 응답이 있었음. 전체적인 기호도는 꾸찌빵 추출물 첨가 발효액이 가장 높았음.
- 복합 균주 발효액의 경우, 전체적으로 신맛의 수치가 높았고 특히 빵잎 추출물의 신맛과 쓴맛이 강하다는 응답이 많았으며, 향도 비교적 강하다는 결과를 나타냈음. 이 같은 결과는 복합 균주 발효액의 향미성분 분석 결과와 비교해보았을 때, 빵잎 추출물 첨가 발효액의 acetaldehyde, diacetyl, acetoin, 2-butanone 의 함량이 가장 높은 결과를 나타낸 것과 관련이 있는 것으로 사료됨.

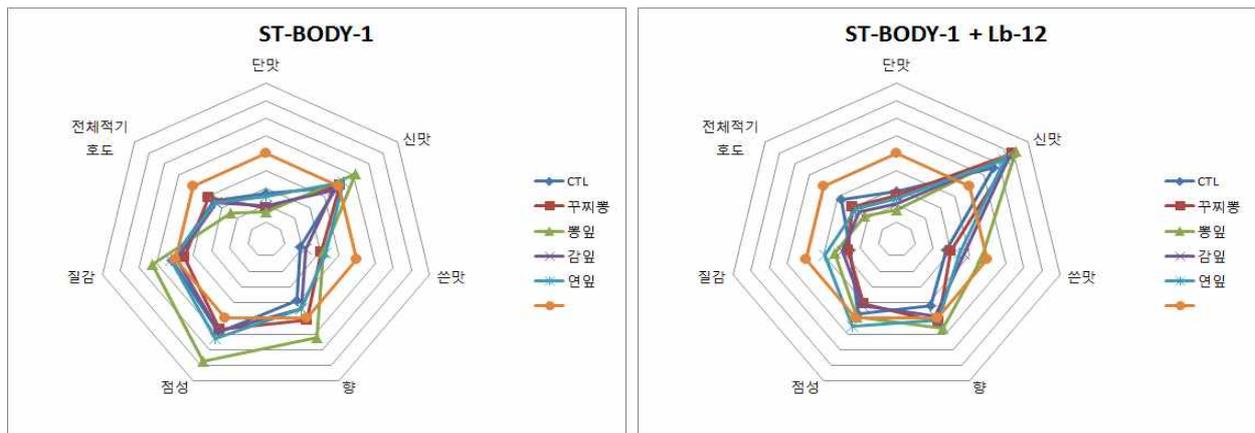


Fig. 31. 제조 발효액의 관능평가 결과

나. 신바이오틱스 소재의 유제품 적용 제조 공정 개발 및 기능성 검토

(1) 실험 내용

(가) 신규 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스 소재의 발효유 소량제조 실험

① 제1협동기관에서 선발된 프리바이오틱스 신규소재(꾸찌빵잎, 빵잎, 감잎, 연잎 추출물)를 동결건조하여 사용하였으며, 고려대학교에서 제공받은 유아 분변 분리 균주를 사용한 lab-scale의 발효유 제조 실험을 Fig.32과 같이 진행함.

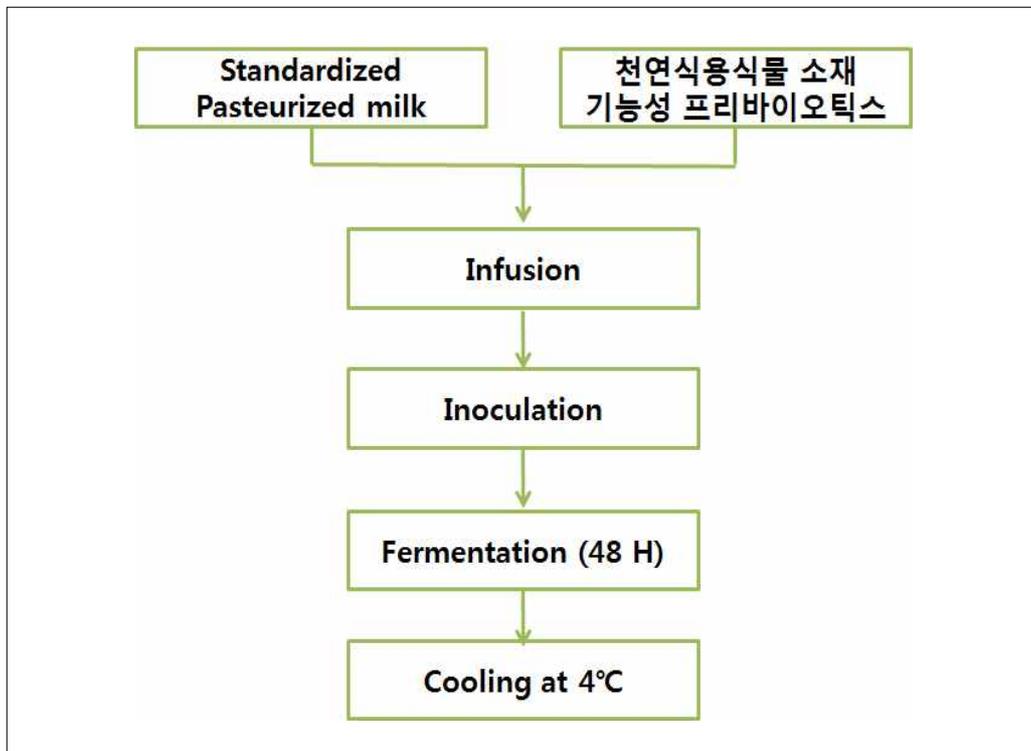


Fig. 32. 기능성 발효유 제조 공정

② 프리바이오틱스 신규소재 (꾸지뽕잎, 뽕잎)를 0.2% 첨가하고, starter culture로써 선발된 균주 19종을 3% 첨가하여 소재와 균주가 각기 다른 발효유를 제조함.

- 약 85°C로 가온한 우유에 프리바이오틱스 신규소재를 첨가하고 교반기로 1,000rpm에서 약 15분간 균질.
- 85°C 항온수조에서 약 15분간 살균.
- 상온에서 cooling 후, 유아 분변 분리 균주 접종.
- 41°C 배양기에서 48시간 배양.

③ 제조한 발효액을 동결건조하여 메탄올 추출 후, 이화학적 특성을 비교·평가함.

④ 제조한 발효액의 발효 전, 후의 미생물학적 특성을 비교·평가함.

(나) 미생물학적 발효특성 평가

① pH 변화 측정

- pH는 선발 균주를 이용한 프리바이오틱스 소재 (꾸지뽕잎, 뽕잎) 첨가 발효액의 발효 전, 후 pH를 Thermo사의 ORION STAR A211 pH meter를 이용하여 측정함.

② 미생물 동정

- 선발 균주를 동정하기 위하여, 16s DNA sequencing 및 MALDI-TOF를 이용하여 동정함.

㉓ 16s DNA sequencing

- 생화학적 방법을 사용해 DNA의 염기서열을 결정하는 과정을 통해 미생물을 동정하는 방법으로 MRS agar에 키운 미생물 콜로니를 채취하여 PCR을 통해 DNA 추출, 추출한 DNA는 PCR을 통해 증폭, 그 후 purification 단계를 거쳐 생성된 Purify extension products를 Electrophoresis (전기영동)를 통해 data 분석 및 미생물 동정.

㉔ MALDI-TOF (Matrix-assist laser desorption/ionization - time of flight)

- MALDI-TOF는 질량 분석법을 이용하여 미생물 단백질 중, 양전하를 띠는 단백질이 짧은 거리에서 정전기적으로 가속되어 질량 종속적인 속도로 비행 튜브에 도착하는 시간을 측정하여 분자량으로 변환하여 질량 및 세기의 분포를 결정하는 방법.
- Matrix solution은 Absolute Acetonitrile (ACN) 500 μ L + Deionized water 475 μ L + Trifluoroacetic acid (TFA) 25 μ L를 교반하여 제조한 후 250 μ L를 vortex 하여 완전히 녹인 후, spin down 시켜서 제조함. 미생물의 single colony를 target plate에 얇게 펴서 Matrix solution 1 μ L를 올리고 상온에서 건조한 후, MALDI-TOF를 이용하여 동정함.

(다) 이화학적 특성 및 기능성 평가

① 이화학적 특성 평가

㉓ Total polyphenol contents

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 비색 정량함. Sample 25 μ L, folin-ciocalteu's phenol reagent 62.5 μ L, 20% sodium carbonate solution 312.5 μ L 를 차례로 가하여 교반한 후 40분 방치. 반응액은 spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정. 표준 용액은 gallic acid 용액(0~100 mg)을 사용함.

㉔ Total Flavonoid

- Total Flavonoid 실험은 Flavonoid와 Metal ion이 chelate를 형성하여 특유의 발색반응을 이용하여 시료 속 flavonoid를 분석하는 원리를 이용함. 2% Aluminum (III) chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)용액은 0.2 g의 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 mL의 에탄올에 녹여서 제조함. sample 100 μ L와 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액 100 μ L 를 10분간 반응시켜 430 nm에서 측정하였음. 표준물질은 Quercetin 용액 (0~100 mg)을 이용함.

㉕ 폴리페놀류 분석

○ 시료의 전처리

- Sample을 정확히 1g 취하여 7 mL 50% ethanol containing 0.05M H₃ PO₄ in water 용액을 가하여 20분간 상온에서 초음파처리를 통해 추출한 후 5000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취함. 상등액을 0.2μm filter를 이용하여 필터한 후 LC-MS로 분석함.
- 표준용액은 Neo-chlorogenic acid, chlorogenic acid, 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid, Caffeic acid, Rutin hydrate, Quercetin-3-glucoside, Kaempferol-3-rutinoside, Kaempferol-3-glucoside를 섞어 1 mg/mL로 제조 후 10% ACN을 이용하여 10, 50, 100, 1000 μg/mL로 희석하여 사용하였으며, 표준물질의 chromatogram은 Fig. 33과 같음.

○ 분석 조건

- LC/MS/MS는 Waters사의 UPLC-Acquity Binary pump, XEVO-TQ를 이용하여 실험하였으며, 용매 A(0.1% Formic acid in water)와 용매 B(0.1% Formic acid in ACN)의 Gradient는 Table 8과 같음. MS 및 개별 물질의 분석 조건은 Table 9와 Table 10에 나타내었음. Column은 Acquity UPLC BEH C18 1.7μm (2.1x100mm)를 사용함.

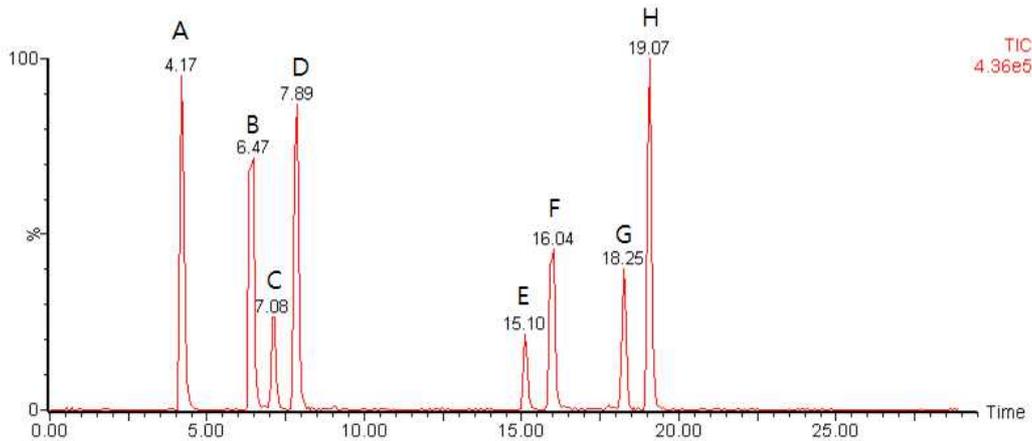


Fig. 33. 표준물질의 total ion chromatogram (TIC)

Table 8. LC/MS/MS 용매 gradient 조건

	Time (min)	%A	%B	Flow (mL/min)
1	0	92.0	8.0	0.2
2	9.8	85.0	15.0	
3	21.8	78.0	22.0	
4	23.8	60.0	40.0	
5	27.8	60.0	40.0	
6	28.2	92.0	8.0	
7	29.8	92.0	8.0	

Table 9. LC/MS/MS 세부조건

Capillary voltage (kV)	2.50
Cone voltage (V)	25
Desolvation Temperature	360
Initial collision gas energy	25
Collision Gas Flow (mL/min)	0.20
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	500
Cone Gas flow (L/hr)	0

Table 10. 개별 물질의 LC/MS/MS 분석 조건

	Compound	Mother ion (m/z)	Dau. ion1 Dau. ion2 (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	RT (min)
A	Neo-chlorogenic acid	353	191.04*	25	20	4.17
B	Chlorogenic acid	353	178.96*	25	30	6.47
C	3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	180.9	190.97 59	25	20	7.08
D	Caffeic acid	179	136.9*	25	15	7.89
E	Rutin hydrate	609.18	300*	25	40	15.1
F	Quercetin-3-glucoside	463.1	301 300*	25	25	16.04
G	Kaempferol-3-rutinoside	593.18	301 284*	25	25	18.25
H	Kaempferol-3-glucoside	447.05	285 284*	25	40	19.07
			285			

② 항산화 활성 평가

㉠ DPPH

- DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay는 DPPH로 최초 산화를 개시한 후 시료에 의한 radical의 소거 활성을 알아보기 위한 실험. 500 μM의 DPPH reagent 100 μL와 시료 100 μL를 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정함.

㉡ FRAP

- Ferric reducing ability of plasma(FRAP) assay는 total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe³⁺ -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe²⁺ -TPTZ)

로 환원되는 것을 이용하는 원리임.

- Sample과 FRAP reagent를 1:30의 비율로 혼합한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화활성을 확인하고, 표준곡선을 iron(II)sulfate heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)로 작성하여 시료의 환원력 활성 정도를 비교함.

㉞ ABTS

- ABTS assay는 ABTS를 potassium persulphate와 반응시켜 청록색의 ABTS+ radical을 형성시켜 이를 734 nm에서 흡광도 측정 후 시료를 가하여 시료 내 항산화물질의 농도와 비례하여 감소하는 ABTS+의 흡광도를 확인하여 항산화능을 측정함.

③ 면역활성 측정

㉟ cell viability 측정 (MTT assay)

- MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법. MTT formazan의 흡광도는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영함.

㊱ NO assay

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

㊲ 면역관련 Cytokine 발현량 측정

- 면역 반응을 알아보기 위하여 우유 (milk_이하 M으로 표현), 우유에 꾸지뽕잎 (Cudrania tricuspidata_이하 CT로 표현)을 첨가하여 선별 유산균 (Latobacillus gasserii 505)를 첨가하여 41°C에서 발효한 발효물 (이하 FMC로 표현)을 이용하여 쥐의 대식세포인 RAW 264.7 macrophage cells 에 24, 48 시간 treatment한 후 ELISA 를 통해 TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12의 양을 측정하였음.

(라) 관능 특성 평가

- 사내 직원 24명을 대상으로 발효유의 전체적인 맛, 신맛, 단맛, 쓴맛, 점도에 대한 기

호도 및 강도에 대한 평가를 9점 척도법을 사용하여 진행함.

(2) 실험 결과

(가) 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스 첨가에 따른 발효액의 pH측정

① pH 변화 측정을 통한 발효특성 확인

- 발효 중 pH 변화를 확인하기 위해 고려대학교에서 기탁 받은 균주 19종을 프리바이오틱스 첨가 발효유에 접종하여 0시간, 24시간, 48시간 마다 pH를 측정함.
- 프리바이오틱스 소재를 첨가하지 않은 대조군과 프리바이오틱스를 첨가한 그룹들 간 발효 시간에 따른 pH가 큰 차이를 보임. 하지만, 프리바이오틱스 소재 간 차이는 거의 없었음. (Table. 11)
- pH 4.6에 도달하는 시간이 비교적 빠른 505, 508, 524, 545, 559, 575, 589 총 7가지 균주를 선발하여 유산균 동정, 향산화 효능 평가, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 평가 실험을 진행함.

Table. 11. 선발 균주 첨가 프리바이오틱스 발효유 pH 측정

시료	0 H			24 H			48H		
	우유	꾸지뽕 잎	뽕잎	우유	꾸지뽕 잎	뽕잎	우유	꾸지뽕 잎	뽕잎
505	6.59	6.50	6.55	6.26	5.69	5.62	5.93	4.23	4.16
508	6.61	6.50	6.54	6.27	5.76	5.81	6.06	4.60	4.66
517	6.58	6.47	6.54	6.25	5.82	5.78	5.96	4.69	5.52
524	6.59	6.45	6.54	6.33	5.86	5.88	6.16	4.96	4.73
545	6.59	6.51	6.55	6.26	5.85	5.72	5.94	5.16	4.71
559	6.60	6.51	6.55	6.25	5.75	5.72	5.92	4.84	4.38
568	6.60	6.54	6.55	6.30	5.74	5.81	6.04	4.65	5.57
575	6.58	6.51	6.54	6.27	5.76	5.78	5.96	4.32	4.57
589	6.59	6.51	6.55	6.26	5.72	5.70	5.92	4.60	4.74
599	6.59	6.52	6.54	6.26	5.76	5.73	5.99	4.48	4.36
603	6.58	6.50	6.54	6.26	5.63	5.82	5.95	4.53	5.51
615	6.59	6.54	6.55	6.25	5.43	5.79	6.05	4.31	4.62
805	6.61	6.53	6.55	6.27	5.81	5.83	6.20	4.53	5.07
817	6.59	6.50	6.54	6.28	5.79	5.78	6.00	4.42	5.50
829	6.59	6.54	6.57	6.25	5.64	5.67	6.05	4.37	4.33
914	6.59	6.52	6.57	6.26	5.72	5.81	6.01	4.48	5.42
917	6.59	6.52	6.57	6.26	5.78	5.79	5.98	4.50	5.51
928	6.58	6.55	6.60	6.27	5.77	5.84	6.14	4.50	5.61

(나) 선발 유산균주 동정

- 16s DNA sequencing 이용 및 MALDI-TOF를 이용하여 기능성 프로바이오틱스 균주 7개를 동정하였음 (Table 5).

Table 12. 선발된 기능성 프로바이오틱스 균주의 동정

strain	MALDI-TOF	16s DNA Sequencing	Homology (%)
505	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
508	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
524	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
545	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
559	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
589	<i>Lactobacillus gaserri</i>	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%

- 이하, strain 번호로 균주 표현함.

(다) 균주별 프리바이오틱스 발효액의 항산화 활성

① 제조 발효액의 항산화 활성 평가

- Starter 균주와 프리바이오틱스 소재의 첨가 및 종류에 따른 발효액의 항산화 활성 평가를 위해 DPPH, FRAP, ABTS를 진행함 (Fig. 34).
- 접종 직후 발효액 보다 48시간 발효 후 발효액의 항산화 활성이 높았음. 특히 프리바이오틱스 소재로써 첨가한 꾸지뽕잎과, 뽕잎의 발효액이 우유 발효액이 항산화 활성이 4~7배 정도 높게 측정됨.
- 프리바이오틱스 소재 간 항산화 활성의 차이를 보면, ABTS, DPPH, FRAP 실험 결과 모두 꾸지뽕잎을 첨가한 발효액이 뽕잎을 첨가한 발효액 보다 항산화 활성이 높은 것을 확인함.
- 총 7개의 균주 가운데, 505, 545, 559, 575 균주가 다른 균주에 비하여 활성이 높게 나타났으며 이는 ABTS, DPPH, FRAP 모두 유사한 결과를 보임.
- 항산화 활성은 시료 내 페놀과 플라보노이드 함량과 깊은 관련이 있으며, 발효 후 프리바이오틱스 소재 첨가 발효액의 총 페놀 및 총 플라보노이드 측정 결과 (Fig. 35), 꾸지뽕잎 첨가 발효액과 뽕잎 첨가 발효액 모두 발효 전에 비해 함량이 증가하였으며, 특히 꾸지뽕잎을 첨가한 발효액에서 더 높은 함량의 총 페놀이 측정됨.
- 총 플라보노이드 함량 측정 결과, 꾸지뽕잎을 첨가한 발효액이 뽕잎을 첨가한 발효액 보다 모든 균주에서 3배 이상의 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인함.
- 총 페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과 꾸지뽕잎 추출물 첨가 발효액이 더 높은 함량을 함유하고 있었으며, 이는 항산화 측정 결과와 일치함.
- 따라서, 항산화 활성 효능이 높은 4개의 균주 (505, 545, 559, 575)를 선발하여 이후

- 농도별 향산화 활성 측정 및 생리활성 효능 실험을 진행함.
- 향산화 효과가 있는 프로바이오틱스 4종 (505, 545, 559, 575)에 대한 미생물 국제특허기탁을 완료하였음.
 - *Lactobacillus gasser* SRK505 : KCCM11766P
 - *Lactobacillus gasser* SRK545 : KCCM11767P
 - *Lactobacillus gasser* SRK559 : KCCM11768P
 - *Lactobacillus gasser* SRK575 : KCCM11769P

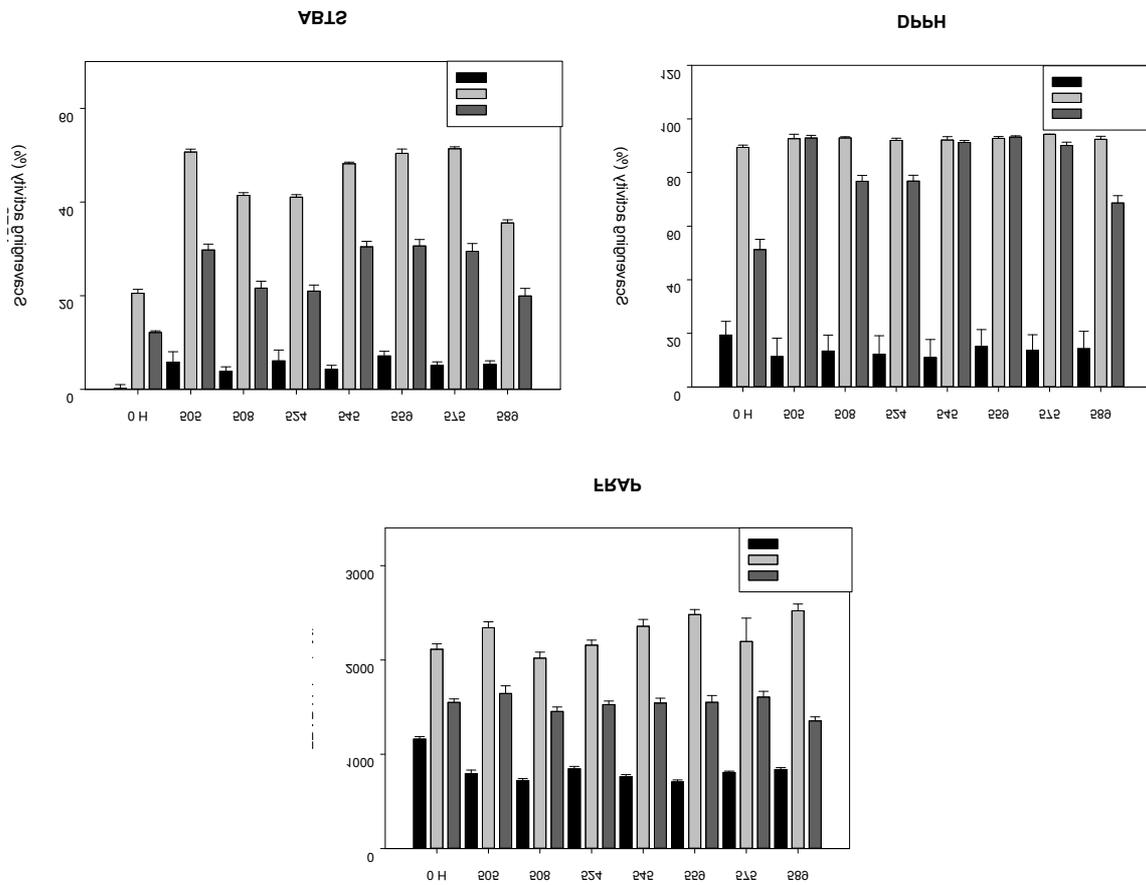


Fig. 34. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 향산화 활성 평가

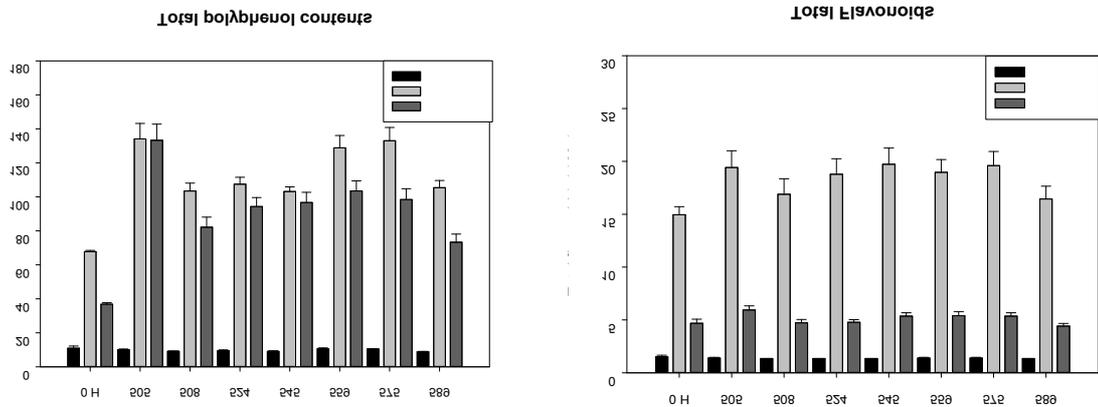
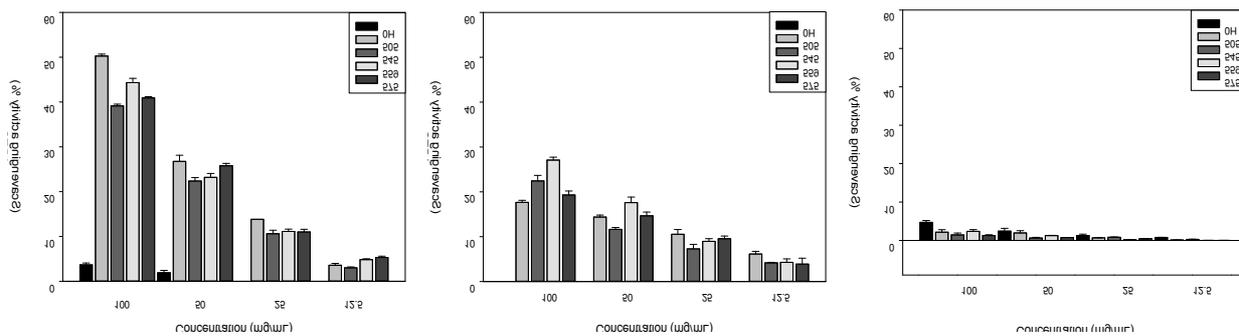


Fig. 35. 발효액의 starter 균주와 프리바이오틱스 소재별 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

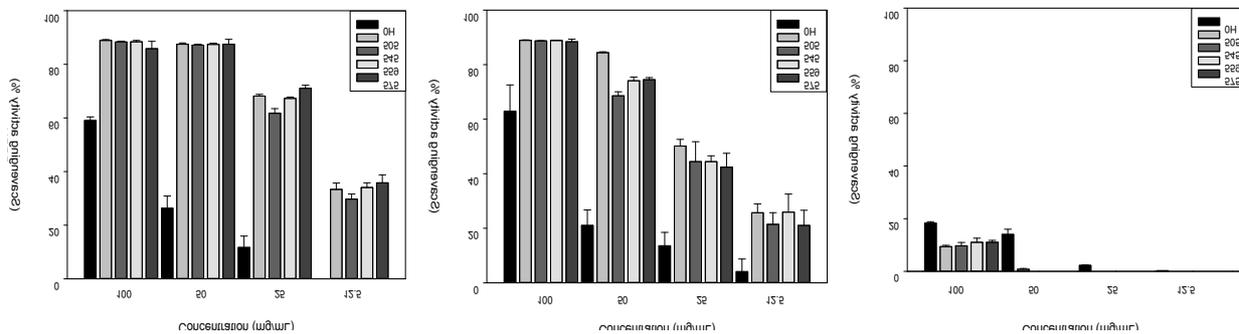
② 제조 발효액의 농도별 항산화 평가

- 선발된 균주 4종 505, 545, 559, 575을 농도별로 희석하여 프리바이오틱스 첨가 발효액의 농도별 항산화 활성 효능을 평가함 (Fig. 36).
- ABTS의 경우, 꾸지뽕잎, 뽕잎 추출물 첨가 프로바이오틱스 발효액 모두 농도 의존적으로 항산화 활성이 감소하는 것을 볼 수 있음. 꾸지뽕잎 발효액의 경우 505 균주의 항산화 활성 효과가 가장 컸으며, 뽕잎 발효액의 경우 558 균주가 항산화 활성 효과가 가장 컸음. 우유의 경우, 발효 전, 후 차이가 없었음.
- DPPH의 경우, 꾸지뽕잎 발효액의 경우, 100mg/mL 농도에서는 88% 이상, 50 mg/mL 농도에서 85% 이상의 항산화 활성을 보였으며, 뽕잎 발효액의 경우 100 mg/mL의 경우 88%, 50mg/mL의 경우 70% 이상의 항산화 활성 효과를 보임. 농도가 낮아짐에 따라 꾸지뽕잎 발효액과 뽕잎 발효액의 활성 차이가 드러나며, 꾸지뽕잎 발효액의 항산화 활성이 뽕잎 발효액에 비해 높음을 확인함.
- FRAP의 경우, 꾸지뽕잎 발효액이 뽕잎 발효액 보다 100mg/mL 농도에서 높은 활성을 보였으며, ABTS, DPPH와 달리 505, 575번의 FRAP 활성이 높은 것으로 확인 됨.
- 총 폴리페놀 과 플라보노이드 함량 측정 결과 (Fig. 37), 총 폴리페놀 함량에서 꾸지뽕잎 발효액의 505, 559, 575 균주가 발효 전 총 폴리페놀 함량의 6배 정도 높았으며, 545 균주 역시 4배 이상의 총 폴리페놀 함량이 증가함을 확인함. 뽕잎 발효액의 경우, 발효 전 보다 발효 후 총 폴리페놀 함량이 2배 이상 증가하였으며, 505, 559 균주의 총 폴리페놀 함량이 다른 균주에 비하여 상대적으로 높음을 확인함.
- 총 플라보노이드 측정 결과, 꾸지뽕잎 발효액의 발효 후 함량이 14 g/ 100g 이상으로 뽕잎 발효액에 비하여 5배 가량 높은 함량을 확인함. 특히 꾸지뽕잎 발효액의 경우, 545, 575 균주의 플라보노이드 함량이 높은 것을 확인하였고, 뽕잎 발효액의 경우, 505, 545 균주의 총 플라보노이드 함량이 높은 것을 확인함.

⊕ ABTS



⊕ DPPH



⊕ FRAP

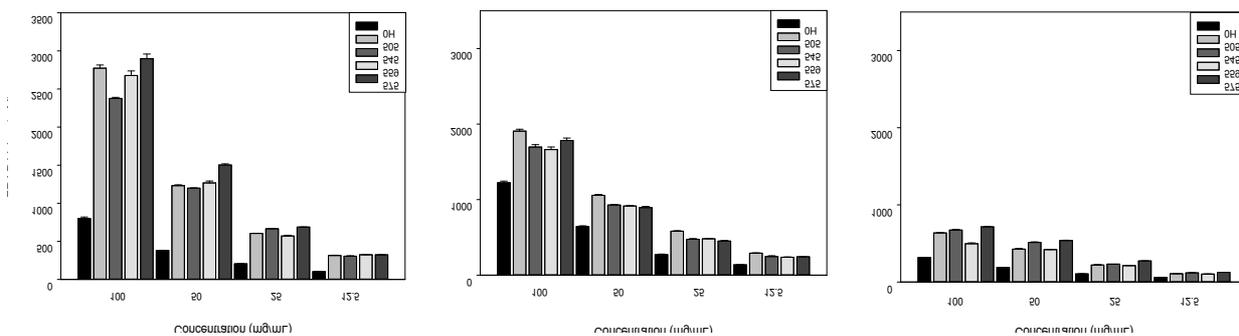
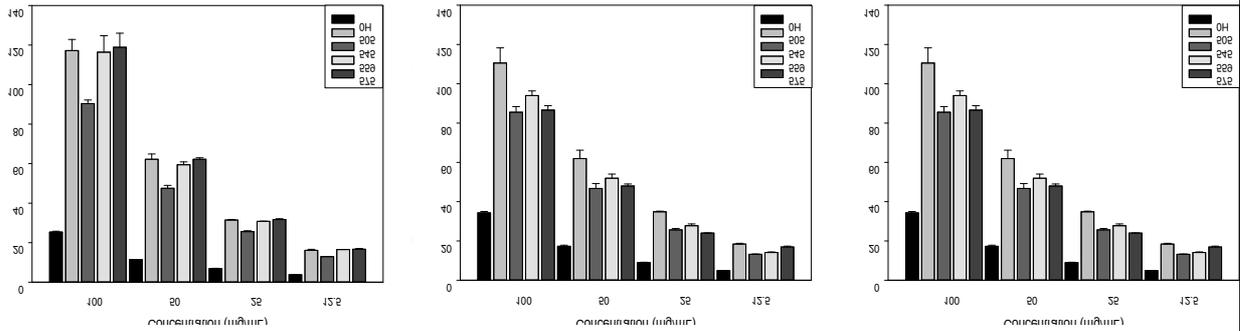


Fig. 36. 프리바이오틱스 소재 및 선발 균주에 따른 발효액의 농도별 항산화 효과

㉞ Total polyphenol contents



㉟ Total flavonoid

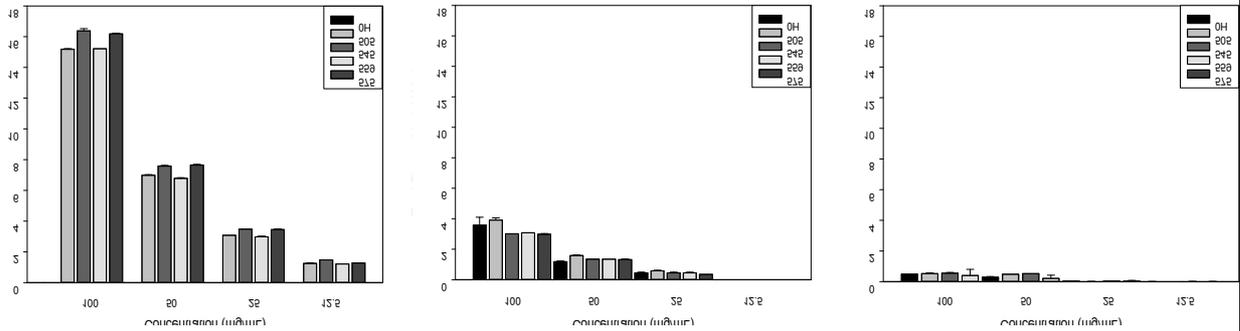


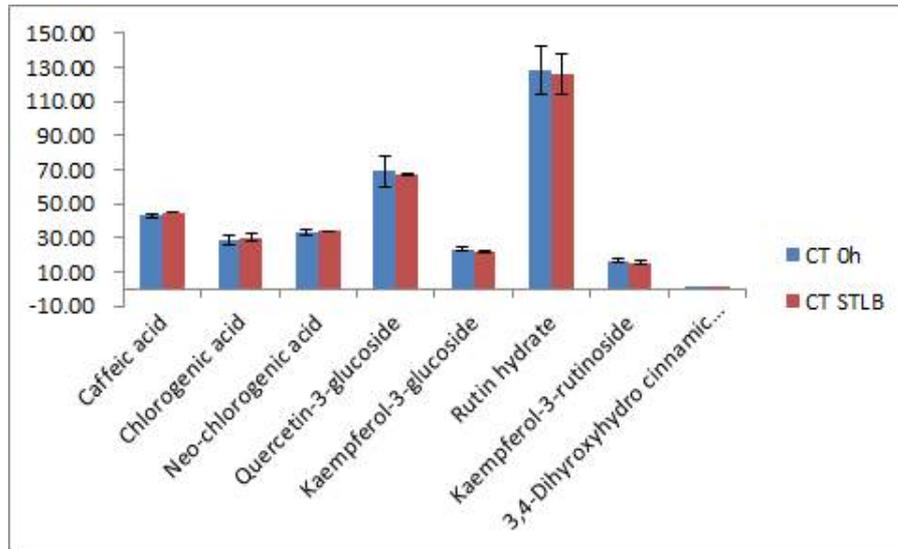
Fig. 37. 프리바이오틱스 소재 및 선발 균주에 따른 발효액의 농도별 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

(라) 프리바이오틱스 발효액의 폴리페놀류 분석

① 프리바이오틱스 소재별 발효액의 폴리페놀 분석

- 상업균주를 사용하여 발효한 꾸지뽕잎 발효액과 뽕잎 발효액의 발효 전/후 폴리페놀 함량을 측정하였음 (Fig. 38).
- 발효 전과 후에는 폴리페놀 함량에 큰 차이가 없었으며, 꾸지뽕잎 발효액에서 뽕잎 발효액에 비해 높은 Caffeic acid, Rutin hydrate, Quercetin-3-Glucoside 함량이 검출됨. 두 발효액 모두 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid는 거의 검출되지 않았음.

㉞ 꾸지뽕잎 발효액의 발효 전/후 폴리페놀 함량



㉟ 뽕잎 발효액의 발효 전/후 폴리페놀 함량

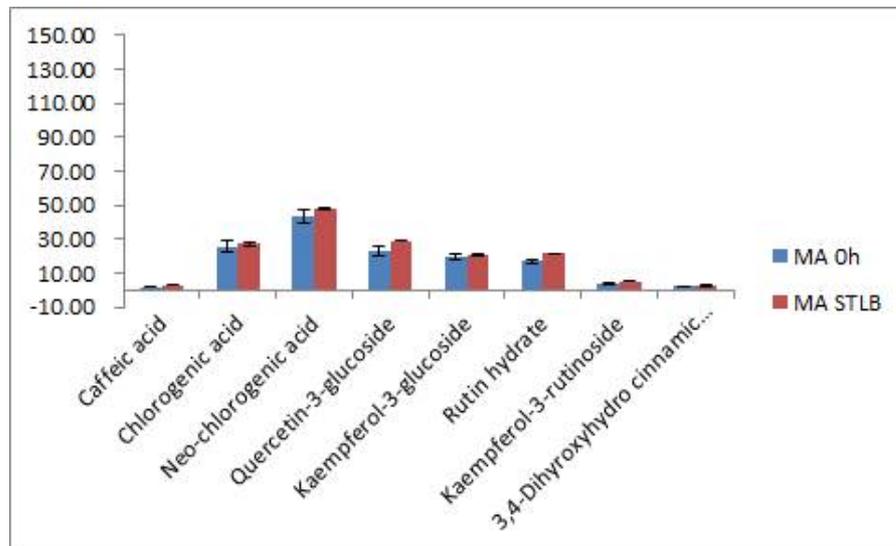


Fig. 38. 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 발효 전/후 폴리페놀 함량

㉡ 프리바이오틱스 소재 및 선발균주에 따른 발효액의 폴리페놀 분석

- 프리바이오틱스 소재에 따른 선발균주별 발효액의 폴리페놀 함량을 분석하였음 (Fig. 39).
- 선발균주 7종을 이용하여 발효한 결과, 상업균주 발효액에 비해 발효 전/후 폴리페놀 함량의 변화를 확인할 수 있었음. 꾸지뽕잎과 뽕잎 추출물 함유 발효액 모두 발효 전에 비해 caffeic acid, chlorogenic acid, neo-chlorogenic acid는 감소하였으며, 3,4-dihydroxyhydro cinnamic acid는 증가하였음. Quercetin-3-glucoside와 rutin hydrate는 균주 및 프리바이오틱스 소재별로 경향이 달랐음.

- 발효 후 프리바이오틱스 소재별 폴리페놀의 함량을 비교 분석한 결과, caffeic acid를 제외한 모든 폴리페놀 compounds는 빙잎 발효액에 비해 꾸지뽕잎 발효액에서 더 많이 검출되었음.
- 폴리페놀 분석 결과는 항산화 활성 결과와 비슷한 양상을 보였으며, 항산화 활성이 높은 꾸지뽕잎 발효액의 폴리페놀 함량이 높은 것을 확인함.

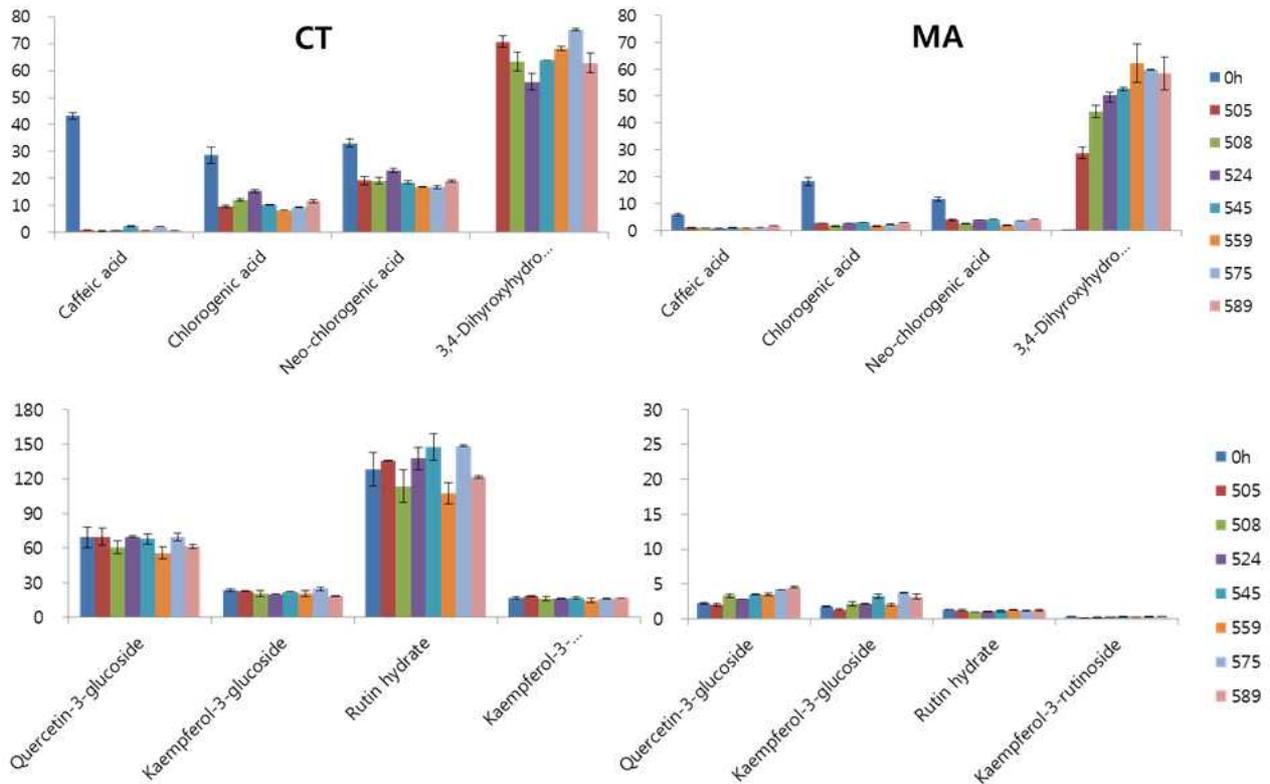


Fig. 39. 선발 균주 및 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 폴리페놀 함량

(마) 선발 균주 및 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 면역 활성

① MTT assay

- 발효 특성과 폴리페놀 함량 및 항산화 활성에 따라 선발된 균주 4종을 사용하여 발효한 프리바이오틱스 소재 첨가 발효액의 세포 독성 확인을 위하여 MTT assay를 실시한 결과 505, 545, 559, 575 균주 모두 80% 이상의 cell viability를 보였음 (Fig. 40).

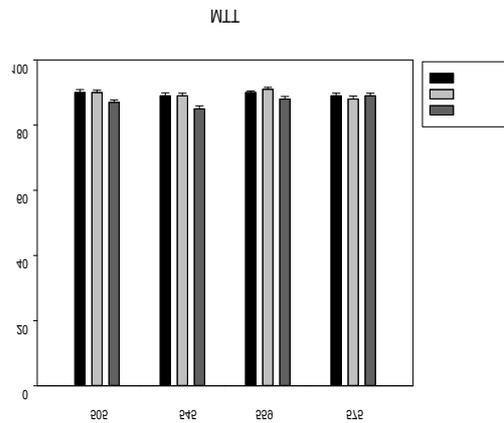


Fig. 40. 선발균주와 프리바이오틱스 소재에 따른 발효액의 세포 독성

② NO 측정 결과

- Nitric oxide (NO)는 pro-inflammatory cytokines와 더불어 macrophage가 활성화 되었을 때 생성되는 인자임. iNOS에 의해 양적 증가가 일어나며 이들의 증가는 macrophage가 항원을 제거하는데 도움을 주어 면역력을 증강시켜 준다고 볼 수 있음. FMC를 24시간 동안 처리하였을 때 NO 생성량이 M과 MC를 처리하였을 때보다 유의적으로 더 높게 발현된 것을 확인할 수 있음. 48시간 동안 샘플을 처리하였을 때는 24시간 처리하였을 때와 비슷한 경향을 나타냄 (Fig. 41).

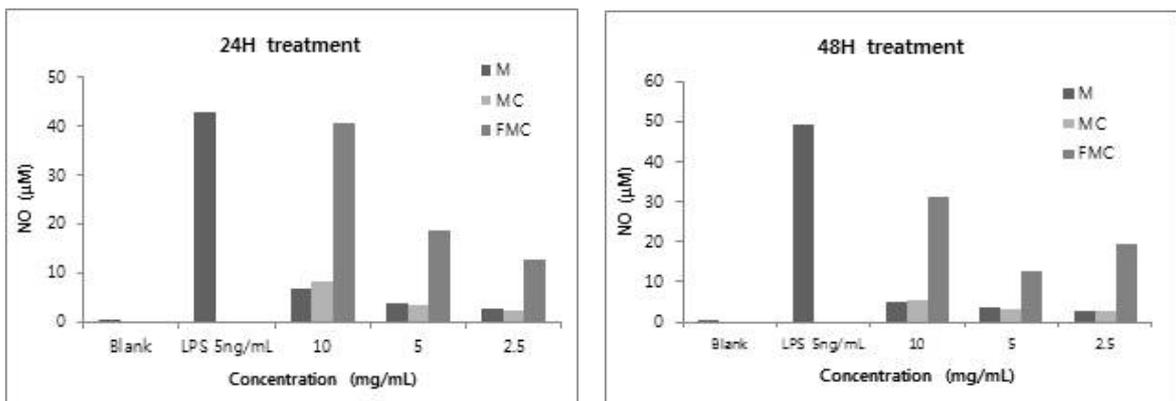


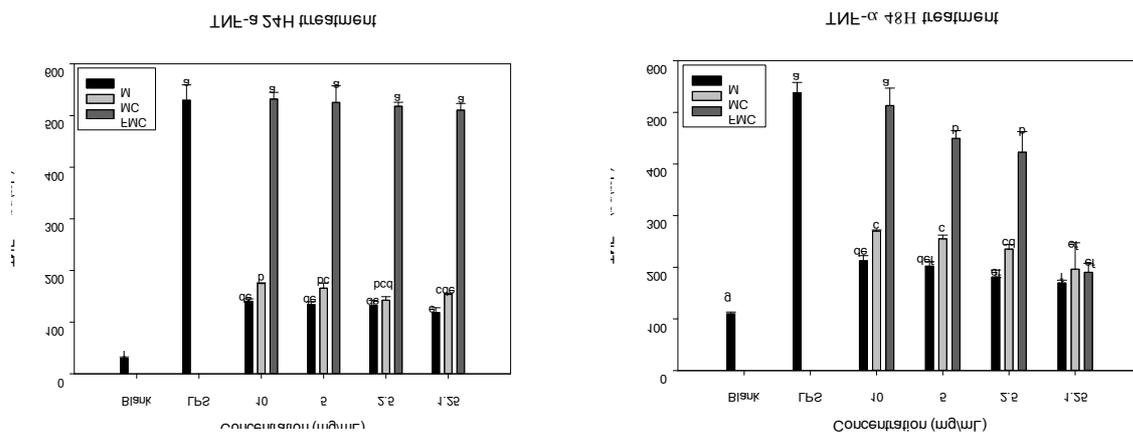
Fig. 41. 선발균주와 프리바이오틱스 소재에 첨가 발효액의 처리에 따른 Nitric oxide 생성 정도

③ 면역활성 cytokine 측정 결과

- TNF- α 는 Tumor Necrosis Factor- α 로 tumor cell 혹은 inflammation cell에서 종양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 선천성 면역반응 (innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자임. 24시간 동안 샘플을 처리하여 TNF- α 의 양을 측정한 결과 FMC의 10mg/mL에서 가장 높은 TNF- α 농도 531.92 pg/mL을 나타냈으며, MC를 처리한 경우보다 약 3배 이상의 TNF- α 발현양

을 나타내었음. 48시간 동안 샘플을 처리하였을 때도 24시간 동안 처리하였을 때와 마찬가지로 비슷한 경향을 나타내었음.

- IFN- γ 는 IL-12 cytokine의 분비량에 관여하는 cytokine으로 pro-inflammatory mechanism의 중요한 인자 중 하나임. 24, 48시간 동안 샘플을 처리한 경우, M 및 MC에서는 IFN- γ 가 발현되지 않았으나 FMC를 처리하였을 때 IFN- γ 의 발현양이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있음.
- IL-2의 경우 항암에 관한 메커니즘이 확실히 밝혀진 인자로서 pro-inflammation cytokine임. NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 사이토카인으로 썬 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 면역 반응을 유도하여, 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 살해능을 높이는 작용을 한다고 알려져 있음. FMC를 24시간 동안 처리하였을 때 LPS 5 ng/ml 을 처리하였을 때와 비슷하게 IL-2가 발현되었으며, 48시간 동안 처리하였을 때는 LPS 처리군 보다 높은 IL-2 발현양을 나타내었음.
- IL-12역시 TNF- α , IFN- γ , IL-2와 마찬가지로 Th1로서 pro-inflammation cytokine 중에 하나임. FMC를 24시간 처리하였을 때 LPS 처리군과 비슷하게 IL-12가 발현된 것을 확인할 수 있었으며, M과 MC를 처리하였을 때는 IL-12가 발현되지 않음. 또한, 48 시간 동안 FMC를 처리하였을 때 IL-12 발현양이 증가하였음
- Th1 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등이 있고 Th2 세포가 분비하는 대표적인 사이토카인으로 IL-4, 5, 10, 13이 있으며, 특히 Th1 세포가 분비하는 사이토카인이 증가할 경우 면역활성에 밀접한 관련이 있음. Th1세포가 분비하는 대표적인 사이토카인인 IL-2, IFN- γ , TNF- α 가 FME를 처리하였을 때 시간, 농도에 따라 그 발현량이 증가하므로 보아 Th1 세포의 활성화와 관련하여 면역학적인 상승작용을 나타내는 것으로 사료됨.



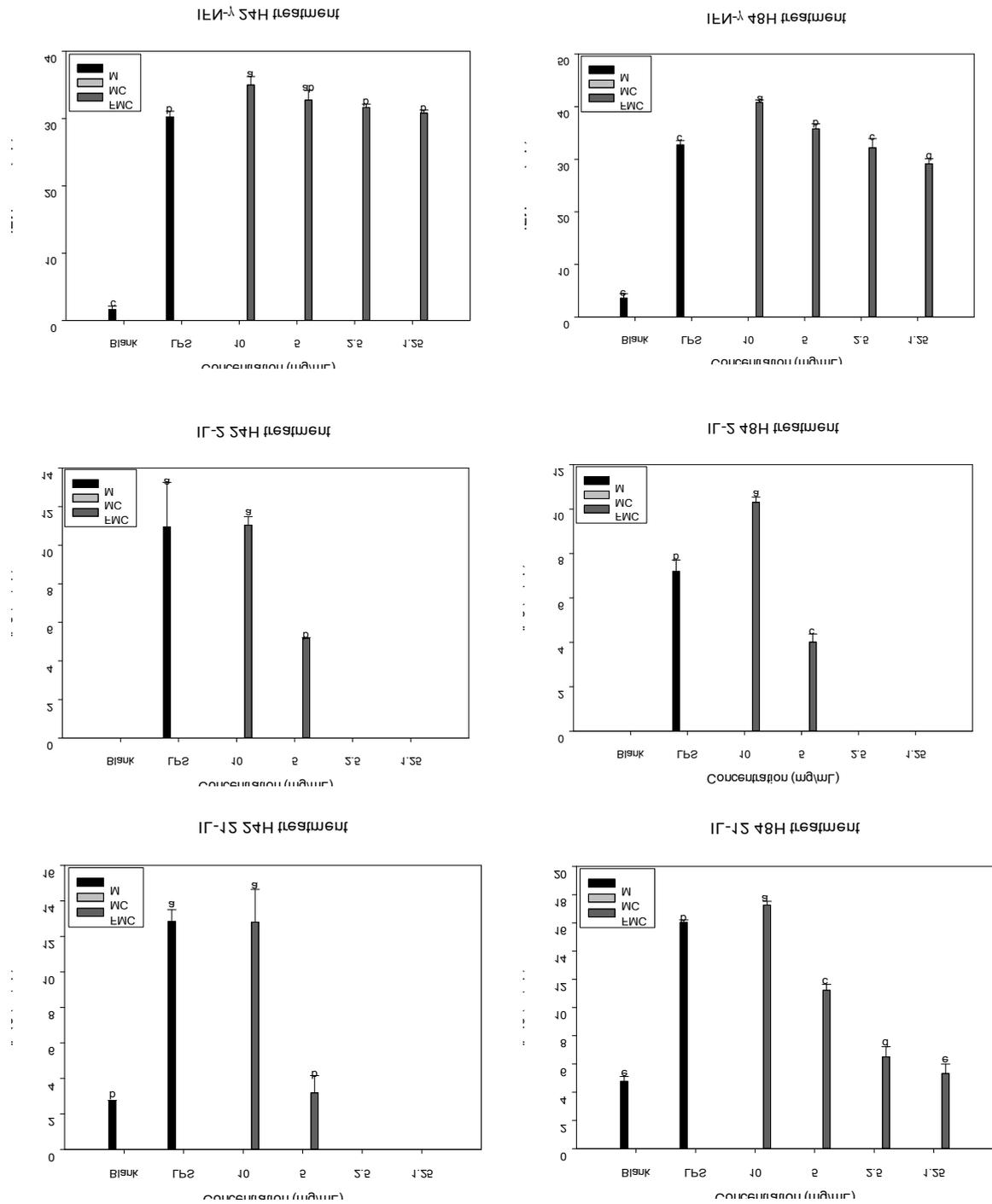


Fig. 42. 선발균주와 프리바이오틱스 소재에 첨가 발효액의 처리에 따른 면역관련 사이토카인 생성 결과

(바) 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 제조

- ① 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 제조를 위한 기초공정도 및 최적 배합비 작성
- 기능성 신바이오틱스 소재(꾸지뽕 농축액 및 유아 분변 유래 프로바이오틱스 4종)를 이용한 발효액 제조를 위한 최적 배합비 작성 (Table 13).
 - 기능성 신바이오틱스 소재(꾸지뽕 농축액 및 유아 분변 유래 프로바이오틱스 4종)를 이용한 발효액 제조를 위한 기초공정도를 확립함 (Fig. 43.).
 - 신바이오틱스 소재 첨가 발효액의 제조 방법은 다음과 같으며, 제조한 발효액은 Fig. 45와 같음.
 - 원료 (우유, 꾸지뽕 농축액, 정백당) 계량 및 교반 (무가당은 정백당 및 향 제외)
 - 향 투입 후 교반 (Fig. 44)
 - 살균 (95℃, 5분)
 - 냉각 (41-43℃로 조정)
 - 선발 프로바이오틱스 접종 (10^{10} CFU/mL)
 - 41℃ 배양 후 pH 4.4-4.5에서 배양 종료
 - 냉각 후 커드 파쇄 (Fig. 44)

Table 13. 신바이오틱스 소재 발효유 배합비

원료명	합량(%)	
	무가당 플레인	가당 플레인
우유	99	86.93
가당꾸지뽕농축액(60bx)	0.7	0.7
선별 유산균(10^9-10^{10})	0.3	0.3
배양 종균	0.2unit/L	0.2unit/L
정백당	-	12
향	-	0.07
합계	100	100

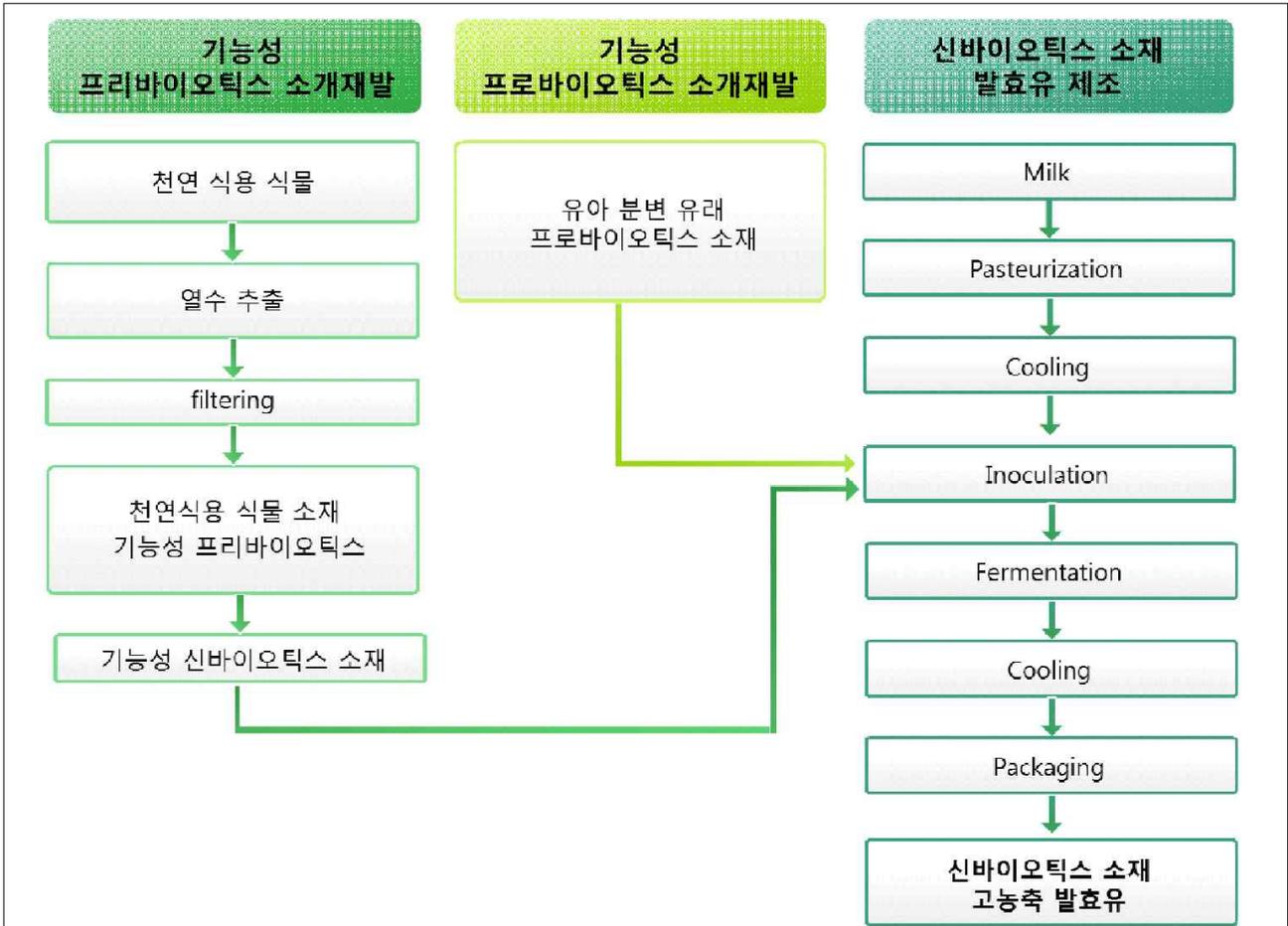


Fig. 43. 신바이오틱스 소재 발효유 기초 공정도



Fig. 44. 신바이오틱스 소재 발효유 제조 과정
(왼쪽: 교반, 오른쪽 위: 배양 직후 커드 상태, 오른쪽 아래: 커드 파쇄 후)



Fig. 45. 신바이오틱스 소재 고농축 발효유

② 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 유산균수 측정

- 제조한 신바이오틱스 소재 발효유의 배양 전/후 총 유산균수 및 선발 유산균주의 균수를 비교 측정함 (Table 14).
- 발효액 발효 후 총 유산균수는 발효 전에 비해 1.2-1.4 log CFU/mL 증가하였으며, 선발 유산균주의 배양 후 균수는 7.5-8.1 log CFU/mL 수준으로 발효 전과 비교했을 때 유지되거나 증가하였음.
- 유산균수의 증가는 천연 식용 소재 꾸지뽕잎 추출물 농축액이 프리바이오틱스로서 작용하여 유산균수를 증가시킨 것으로 사료되며, 상업 균주와 유아 분변 유래 선발 균주의 synergic effect로 인하여 총 유산균수가 증가함.

Table 14. 선발 균주를 사용한 프리바이오틱스 소재 첨가 발효유 균수 측정
(단위: logCFU/mL)

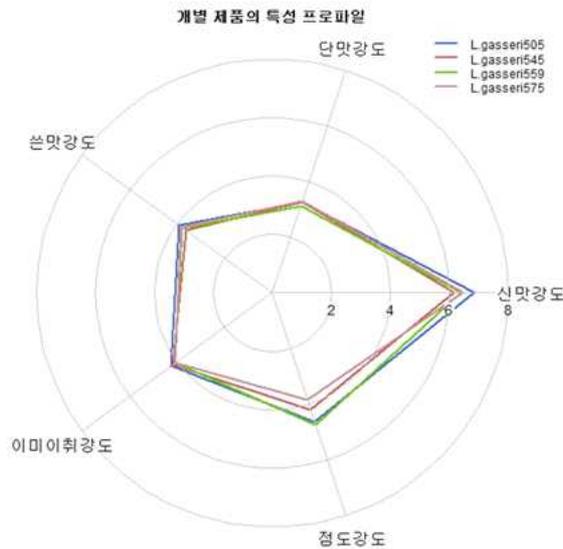
	배양 전		배양 후	
	총 유산균수	<i>L. gasseri</i>	총 유산균수	<i>L. gasseri</i>
Control	6.16	-	9.24	-
505	7.85	7.84	9.05	7.54
545	7.71	7.70	8.99	7.88
559	7.66	7.64	9.02	8.04
575	7.69	7.68	9.11	7.95

③ 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 관능적 특성 평가

- 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 4종 (선발 유산균주 4종을 사용하여 제조)을 대상

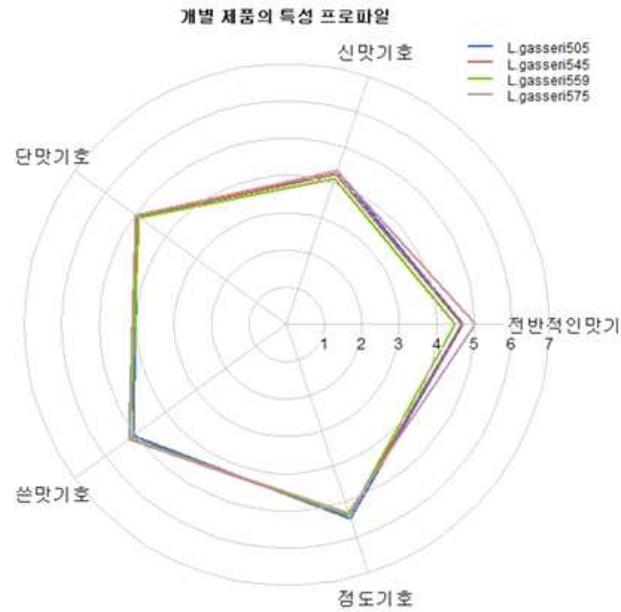
으로 제품 특성 및 기호도를 평가하였음.

- 제품의 신맛, 단맛, 쓴맛, 이미이취 및 점도 조사 결과, 단맛, 쓴맛, 이미이취의 강도는 4종의 발효유에서 비슷한 점수를 보였으며, 505균주를 사용한 발효유의 신맛이 가장 높았음. 또한 505와 559균주를 사용한 발효유의 점도가 비교적 높은 것으로 평가됨 (Fig. 46)
- 제품의 신맛, 단맛, 쓴맛, 점도 및 전반적인 맛을 대상으로 기호도 평가 결과 (Fig. 47), 발효유 4종의 단맛, 쓴맛, 점도의 기호도가 비슷했으며, 신맛의 기호도는 균주에 따라 약간의 차이를 보였음 (505, 575 > 545 > 559).
- 전반적인 맛의 기호도 역시 균주에 따라 차이를 나타냈으며, 신맛의 기호도와 유사한 경향을 보였음 (575 > 505 > 545 > 559). 신맛이 강할수록 전반적인 맛의 기호도가 올라가는 것을 확인하였으며, 점도는 전반적인 맛의 기호도에 영향을 끼치지 않은 것으로 나타남.



선별유산균	신맛	단맛	쓴맛	이미, 이취	점도
505	6.83	3.25	3.92	4.25	4.62
545	6.17	3.25	3.62	4.17	4.21
559	6.38	3.12	3.79	4.08	4.75
575	6.46	3.29	3.83	4.08	3.83

Fig. 46. 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 강도 관능적 특성



선별유산균	전반적인 맛	신맛	단맛	쓴맛	점도
505	4.71	4.33	4.92	5.08	5.46
545	4.67	4.25	4.92	5.21	5.38
559	4.50	4.12	4.88	5.17	5.38
575	5.04	4.33	5.00	5.21	5.33

Fig. 47. 신바이오텍스 소재 고농축 발효유 기호도 관능적 특성

(사) 신바이오텍스 소재 고농축 발효유 및 신바이오텍스 혼합 제제 대량생산

① 신바이오텍스 소재 고농축 발효유 대량생산

- 신바이오텍스 소재 고농축 발효유 대량생산 시험을 위해 Fig. 48의 공정과정을 통해 꾸지뽕잎 추출물 농축액을 대량생산하였음.
- 대량생산된 꾸지뽕잎 농축액과 선발 프로바이오텍스 4종을 이용하여 신바이오텍스 소재 고농축 발효유의 대량생산 시험을 위해 Table 10의 배합비와 Fig. 10의 공정과정을 통해 Pilot scale 실험을 진행하였음 (Fig. 49).



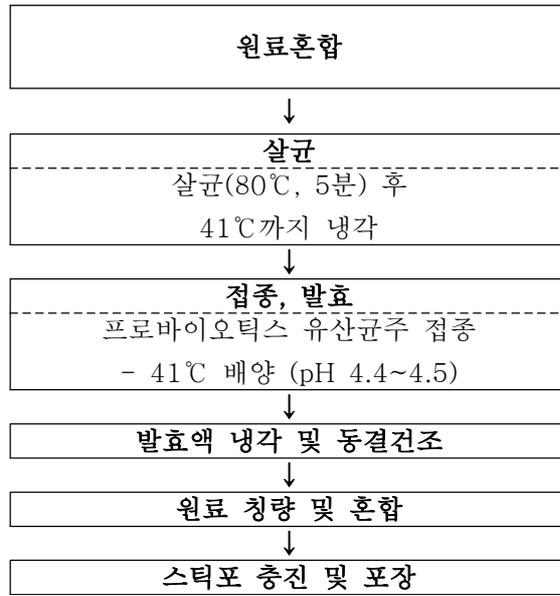
Fig. 48. 구지뽕잎 추출물 농축액 대량생산 공정



Fig. 49. 신바이오텍스 소재 고농축 발효유의 Pilot scale 제조 공정
 (왼쪽 위: 배합탱크, 오른쪽 위 발효탱크,
 왼쪽 아래: 혼합, 오른쪽 아래: 살균)

② 신바이오텍스 혼합 제제 대량생산

- 선발 프리바이오텍스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오텍스 4종을 이용하여 신바이오텍스 혼합제제 대량생산 시험을 위해 발효조와 동결건조 시스템을 사용한 Pilot scale 실험을 진행하였음.
- 신바이오텍스 혼합제제는 부형제 및 기타원료와 혼합하여 Fig 50의 공정에 따라 제조하였음.
- 동결건조하여 분말상태로 제조된 신바이오텍스 혼합 제제는 협동기관의 대장암 예방 효과 검증 동물실험에 사용하였음.



신바이오틱스 발효물
제조



신바이오틱스 발효물의
동결건조



원료 칭량



원료 혼합



스티크포 충전



용량 확인



Fig. 50. 신바이오틱스 혼합 제제 제조공정

다. 장기능개선 및 면역증진 발효유 및 신바이오틱스 제제 개발

(1) 실험 내용

(가) 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 대량 생산

- 선발 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오틱스 1종을 이용하여 신바이오틱스 고농축 발효유의 대량생산 시험을 진행함.

(나) 신바이오틱스 소재 혼합분말 및 캡슐 제제 대량 생산

- 선발 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오틱스 1종을 이용하여 신바이오틱스 고농축 발효분말 소재를 대량생산하여 해당 소재가 주원료인 혼합분말, 캡슐 제형의 혼합제제 2종의 대량생산 시험을 진행하였음.

(2) 실험 결과

(가) 신바이오틱스 소재 고농축 발효유

① 제품 특징

- 프리바이오틱스로써 페놀함량이 높은 꾸지뽕잎과 항산화 활성이 높은 선발 유산균(프로바이오틱스) 함유
- Flavor : 플레인, 라임(2종)
- 포장 및 용량 : 컵(PS) / 180 ml
- 축산물가공품의 유형 : 농후발효유

② 배합비율

Table 15. 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 2종 배합비

원료명	함량(%)	
	가당 플레인	라임
우유	86.5	75.896
탈지분유	1.5	2.4
가당꾸지뽕농축액(60bx)	1.4	1.68
선발 유산균(10^9-10^{10})	0.03	0.024
배양 종균	0.2unit/L	0.2unit/L
정백당	10.5	-
라임 당액	-	20
향료	0.07	-
합계	100	100

③ 신바이오틱스 발효유 제조 공정도

- 원료(우유, 꾸지뽕농축액, 정백당) 계량 및 교반(라임은 정백당, 향 제외)
- 향 투입 후 자재가 섞이도록 교반
- 살균(95℃, 5분)
- 냉각(41-43℃로 조정)
- 유산균(배양 종균, 선발 유산균) 접종
- 41℃ 배양 후 pH 4.4~4.5에서 배양 종료
- 냉각 후 커드 파쇄(교반 - 1,000rpm, 10분 이상), 라임맛은 당액 혼합하여 교반 진행
- 균질(30bar) 후 냉각

④ 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 보존 테스트

- 시험생산 제품을 10, 15, 20℃ 저장고에서 28일간 저장. 제품의 성상 및 풍미, 산도, pH, 유산균수 및 대장균균수 측정함.
- 시중 유통 및 저장 온도는 1~10℃로, 10℃에서는 비교적 1X10⁹ CFU/ml 정도의 유산균수를 유지하는 것으로 확인할 수 있었음. 성상이나 풍미는 저장 15일차까지는 양호한 편이나 15일 이후부터는 강한 산미 발생함.
- 20℃ 저장 시에는 산미 진행 속도가 매우 빠르므로 제품 개발 시 유통 및 저장온도에 주의해야 할 필요 있음.

Table 16. 신바이오틱스 발효유 플레인 제품 보존 테스트 결과

저장 일수	온도 (℃)	성상/풍미	T.A.	pH	대장균균	총유산균수 (BCP)	Lactobacillus (MRS)
0일	-	양호	0.73	4.47	N.D.	1.72E+ 09	1.10E+ 09
1일	10	양호	0.73	4.37	N.D.	2.00E+ 09	1.49E+ 09
	15	양호	0.75	4.36	N.D.	1.69E+ 09	1.42E+ 09
	20	양호	0.78	4.27	N.D.	1.91E+ 09	1.28E+ 09
6일	10	양호	0.81	4.33	N.D.	1.56E+ 09	1.17E+ 09
	15	양호	0.85	4.13	N.D.	1.54E+ 09	1.26E+ 09
	20	산미 강함	1.00	3.97	N.D.	1.54E+ 09	9.85E+ 08
9일	10	양호	0.81	4.40	N.D.	1.67E+ 09	1.47E+ 09
	15	양호	0.87	4.16	N.D.	1.54E+ 09	1.34E+ 09
	20	산미 강함	1.01	3.96	N.D.	1.16E+ 09	1.12E+ 09
12일	10	양호		4.19	N.D.	1.65E+ 09	1.44E+ 09
	15	양호		4.13	N.D.	1.43E+ 09	1.26E+ 09
	20	산미 강함		3.92	N.D.	1.20E+ 09	9.15E+ 08
15일	10	양호	0.86	4.23	N.D.	1.24E+ 09	1.26E+ 09
	15	양호	0.92	4.14	N.D.	1.27E+ 09	1.06E+ 09
	20	산미 강함	1.13	4.14	N.D.	3.60E+ 08	3.75E+ 08
20일	10	산미 강함	0.84	4.04	N.D.	1.61E+ 09	1.17E+ 09
	15	산미 강함	0.95	3.99	N.D.	1.21E+ 09	1.02E+ 09
	20	산미 강함	1.12	3.77	N.D.	9.50E+ 07	6.50E+ 07
23일	10	산미 강함	0.87	4.19	N.D.	1.17E+ 09	1.03E+ 09
	15	산미 강함	0.95	4.09	N.D.	6.95E+ 08	4.75E+ 08
	20	산미 강함	1.2	3.81	N.D.	5.55E+ 07	2.55E+ 07
26일	10	산미 강함	0.93	4.18	N.D.	8.00E+ 08	6.85E+ 08
	15	산미 강함	0.97	4.03	N.D.	5.30E+ 08	3.90E+ 08
	20	산미 강함	1.21	3.79	N.D.	8.65E+ 07	3.70E+ 07
28일	10	산미 강함	0.9	4.12	N.D.	7.05E+ 08	6.40E+ 08
	15	산미 강함	0.98	4.05	N.D.	4.65E+ 08	3.00E+ 08

20	산미 강함	1.22	3.82	N.D.	5.60E+07	1.90E+07
----	-------	------	------	------	----------	----------

Table 17. 신바이오틱스 발효유 라임 제품 보존 테스트 결과

저장 일수	온도 (°C)	성상/풍미	산도	pH	대장 균균	총유산균수 (BCP)	Lactobacillus (MRS)
0일	-	양호	0.86	4.42(13.6°C)	N.D.	1.53E+09	1.25E+09
1일	10	양호	0.87	4.18(19.8°C)	N.D.	1.59E+09	1.23E+09
	15	양호	0.89	4.14(20.3°C)	N.D.	1.83E+09	1.34E+09
	20	양호	0.91	4.13(20.7°C)	N.D.	1.79E+09	1.15E+09
6일	10	양호	0.91	4.17(18.8°C)	N.D.	1.59E+09	1.23E+09
	15	양호	0.95	4.11(19.5°C)	N.D.	1.55E+09	1.31E+09
	20	산미 강함	1.09	3.91(21.2°C)	N.D.	1.39E+09	1.22E+09
9일	10	양호	0.92	4.19(14.9°C)	N.D.	1.51E+09	1.04E+09
	15	산미 강함	0.96	4.14(16.4°C)	N.D.	1.55E+09	1.18E+09
	20	산미 강함	1.07	3.97(19.4°C)	N.D.	1.10E+09	8.10E+08
12일	10	양호		4.18(13.6°C)	N.D.	1.60E+09	1.15E+09
	15	산미 강함		4.09(15.0°C)	N.D.	1.69E+09	1.47E+09
	20	산미 강함		3.92(18.1°C)	N.D.	6.45E+08	5.30E+08
15일	10	양호	0.95	4.15(17.3°C)	N.D.	1.78E+09	1.20E+09
	15	산미 강함	1.01	4.10(17.8°C)	N.D.	1.48E+09	1.11E+09
	20	산미 강함	1.17	3.93(19.4°C)	N.D.	1.65E+08	1.80E+08
20일	10	산미 강함	0.96	4.04(11.8°C)	N.D.	1.29E+09	1.01E+09
	15	산미 강함	1.01	3.99(15.1°C)	N.D.	1.08E+09	9.55E+08
	20	산미 강함	1.13	3.77(19.1°C)	N.D.	1.60E+08	1.10E+08
23일	10	산미 강함	0.95	4.16(11.2°C)	N.D.	1.39E+09	1.24E+09
	15	산미 강함	1.03	4.04(15.7°C)	N.D.	6.85E+08	5.60E+08
	20	산미 강함	1.23	3.87(20.7°C)	N.D.	8.05E+07	3.50E+07
26일	10	산미 강함	0.99	4.15(17.7°C)	N.D.	1.19E+09	9.35E+08
	15	산미 강함	1.06	4.02(18.5°C)	N.D.	4.45E+08	3.90E+08
	20	산미 강함	1.25	3.87(20.1°C)	N.D.	9.25E+07	4.20E+07
28일	10	산미 강함	0.96	4.07(14.5°C)	N.D.	1.14E+09	1.01E+09
	15	산미 강함	1.06	3.99(17.3°C)	N.D.	2.75E+08	3.70E+08
	20	산미 강함	1.25	3.88(20.1°C)	N.D.	8.50E+07	3.90E+07

⑤ 사내외 관능검사

- 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 플레인, 라임 시험생산 제품 2종을 대상으로 제품 특성 기호도를 평가함. 연구소 직원 20명을 대상으로 한 1차 평가, 숙명여대 대학원생 대상 2차 평가, 고려대 대학원생 대상 3차 평가가 이루어짐.
- 발효유의 전체적인 맛, 단맛, 향, 물성, 물성에 대한 기호도 및 강도에 대한 평가 진행 (9점 척도 사용). 플레인 제품에 대한 전반적인 기호도가 높았으며 라임맛은 향이나

단맛 강하다는 의견이 있었음. 꾸지뽕잎 추출물 특유의 느낌이 약하게 있어 이미, 이취가 있다고 표현했으나 기호도에 크게 영향을 미치지 않음.

㉔ 사내 관능검사 결과(연구소 직원 20명 대상)

- 플레인 제품의 전반적인 기호도는 6.40으로 높은 편. 라임 제품은 5.60으로 플레인 대비 낮은 편이었으나 2가지 모두 평균 이상으로 평가됨 (Table 18, 19).

Table 18. 플레인 발효유 1차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	6.40	5.95	5.65	5.85	6.10	4.85	6.30	4.55

Table 19. 라임 발효유 1차 관능검사 결과

[9점 척도]

	전반적인 맛	단맛		라임 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	5.60	5.05	5.80	6.25	5.10	4.90	6.25	4.85

㉕ 사외 관능검사 결과(숙명여대 교수 및 학생 16명 대상)

- 플레인 제품의 전반적인 기호도는 7.25로 매우 높은 편. 반면 신맛이 강하고 단맛이 적은 라임 제품에 대한 기호도 떨어짐. 이미/이취에 대한 인지 부분 낮은 편으로 평가됨 (Table 20, 21).

Table 20. 플레인 발효유 2차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	7.25	6.63	6.75	5.44	6.31	9.63	6.06	3.88

Table 21. 라임 발효유 2차 관능검사 결과

[9점 척도]

	전반적인 맛	단맛		라임 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	4.81	4.13	5.13	7.19	4.88	4.69	5.63	4.06

㉖ 사외 관능검사 결과(고려대 학생 20명 대상)

- 라임 대비 플레인 제품에 대한 전반적인 맛 기호도가 높은 편. 이미/이취에 대한 인지는 라임 제품에서 두드러짐 (Table 22, 23).

Table 22. 플레인 발효유 3차 관능검사 결과

[9 점 척도]

	전반적인 맛	단맛		요거트 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	6.20	6.50	5.08	6.80	6.35	5.45	5.83	2.85

Table 23. 라임 발효유 3차 관능검사 결과

[9점 척도]

	전반적인 맛	단맛		라임 풍미		물성		이미,이취
		강도	기호도	강도	기호도	강도	기호도	
평균	5.05	4.98	5.03	6.90	4.85	5.20	5.18	4.45

(나) 신바이오틱스 소재 혼합분말 및 캡슐 제제

① 신바이오틱스 고농축 발효분말 소재 대량생산

- 신바이오틱스 소재 고농축 발효액 대량생산 시험을 위해 꾸지뽕잎 추출물 농축액 및 선발 프로바이오틱스 유산균의 대량생산 작업을 수행함.
- 신바이오틱스 고농축 발효분말 원료의 배합비 작성(Table 10.)과 제조공정을 확립함.

Table 24. 신바이오틱스 고농축 발효액 배합비율

원료명	합량(%)
우유	98.3
가당꾸지뽕잎농축액(60bx)	1.4
*유산균 분말(1×10^{11})	0.3
합계	100

* 유산균 - 장면역 기능성 유산균, *L. gasseri* 505

- 제조 방법

- ㉠ 원료유(살균유) 투입 후 교반 및 가온(60℃)
- ㉡ 가당꾸지뽕잎농축액 원료 투입 후 자재가 섞이도록 교반
- ㉢ 살균(85℃, 15분)
- ㉣ 냉각(41℃로 조정)
- ㉤ 유산균 분말 계량 및 접종(묻치지 않도록 풀어가며 진행)
- ㉥ 41℃로 일정하게 유지하여 40시간 배양(pH 3.95~4.00)
- ㉦ 커드 파쇄 후 냉각 및 충전



Fig. 51. 신바이오틱스 고농축 발효액 제조 설비 및 제품 - 배양탱크, 동결건조기

② 신바이오틱스 소재 고농축 혼합분말 제제 대량생산

- 신바이오틱스 고농축 발효 소재를 주원료로 한 혼합 분말 제제의 대량생산 시험을 진행
- 제품 특징
 - ㉠ 신바이오틱스 고농축 발효 분말을 주원료로 사용, 요구르트맛이 나는 혼합 분말
 - ㉡ Flavor : 요구르트
 - ㉢ 포장 및 용량 : PE 스틱 / 2 g *100포
 - ㉣ 제조공정 : 원료 칭량 및 투입 → 정립(20 mesh) → 혼합 → 스틱 충전 → 상자 포장

Table 25. 신바이오틱스 소재 고농축 혼합분말 제제 배합비율

원료명	합량(%)
포도당	43.9
신바이오틱스 소재(발효분말)	40
분말향	1
효소처리스테비아	0.2
구연산	1
탈지분유	5
올리고당	3
자일리톨	5
초유	0.1
이산화규소	0.8
합계	100



Fig. 52. 신바이오텍스 소재 고농축 혼합분말 제제 제조 설비 및 제품
- 혼합믹서, 스틱 충전기, 자동포장기

③ 신바이오텍스 소재 고농축 캡슐 제제 대량생산

- 신바이오텍스 고농축 발효 소재를 주원료로 한 하드캡슐 제제의 대량생산 시험을 진행
- 제품 특징
 - ㉞ 신바이오텍스 고농축 발효 분말을 주원료로 사용, 간편한 하드캡슐 알약 형태
 - ㉟ 포장 및 용량 : PE병 / 46 g(460 mg *100 캡슐)
 - ㊱ 제조공정 : 원료 칭량 및 투입 → 정립(20 mesh) → 혼합 → 캡슐 충전 → 병 포장

Table 26. 신바이오텍스 소재 고농축 하드캡슐 제제 배합비율

원료명	함량(%)
신바이오텍스 소재(발효분말)	43
유당	52
베타시클로텍스트린	2
스테아린산마그네슘	2
이산화규소	1
합계	100



Fig. 53. 신바이오틱스 소재 고농축 하드캡슐 제제 제조 설비 및 제품
- 하드캡슐 충전기, 선별기, 병포장기

3-2. 신바이오틱스 혼합소재의 장기능개선 및 면역증진 작용기작 규명

[제1협동 : 전북대학교]

가. 식품 적용이 가능한 장기능 개선 프리바이오틱스 소재 선발

(1) 실험 내용

(가) 전통식품 및 천연식용식물 원료 확보

- 전통식품 소재로는 된장, 간장, 고추장 등을 사용하였으며, 국내 특용 작물 및 자생식물 자원 약 100종(MeOH 추출물)을 소재로 확보하여 프리바이오틱스 이용 가능성을 검토하였음.

(나) 전통식품 및 천연식용식물 원료 추출

① 전통식품, 국내특용 작물 및 자생식물 자원 원료 추출

- 원료를 정확히 1 g 취하여 10 배수에 해당하는 MeOH 10 mL을 가하여 80℃에서 1시간 추출한 후, 감압여과하여 잔사와 상등액을 분리하였다. 잔사는 MeOH를 이용하여 재추출하였고, 이를 2회 반복하였음. 모아진 여액은 감압농축기(rotary evaporator RV 10 control, IKA®, Baden-Württemberg, Germany)를 이용하여 4 mL이 되도록 농축하였으며, -70℃에 저장하면서 분석에 사용하였음. 일부 자생식물 추출물들은 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행으로부터 구입하여 사용하였음.

② 원료 선별

- 확보된 전통 장류, 특용 작물과 자생식물들을 대상으로 프리바이오틱스로 이용 가능한 원료 선별을 위해 식물 추출물(MeOH 추출물)들에 함유된 총 페놀함량 분석하여 높은 페놀 화합물들을 함유하며 구입이 용이한 식물 원료를 위주로 선별하였음.

③ 선별된 국내특용 작물 및 자생식물 자원 원료 추출

- 원료 선별에 사용된 추출물은 MeOH 추출물이기 때문에 식품에 적용시키기 어려우므로, 선별된 원료에 대해 열수 추출과 40% 주정 추출을 행하였다. 잎류와 뿌리류 추출은 약 30배수에 해당하는 물을 가한 후, 100℃에서 9시간 동안 열수추출 하였음. 여과망을 통해 상등액을 분리하여 감압농축기를 이용하여 농축하였음. 열매류는 40% 주정을 이용하여 40℃에서 1시간 추출한 후, 감압여과하여 잔사와 상등액을 분리하였음. 잔사는 40% EtOH를 이용하여 재추출하였고, 이 과정을 2회 반복하였음. 모아진 상등액은 감압농축기로 완전히 농축한 후, 증류수를 이용하여 회수하였음. 농축액들은 -70℃에 저장하면서 분석에 사용하였음.

(다) 선별된 원료소재 추출물의 기능성 물질 분석

① 올리고당 분석

- 표준품인 fructose, sucrose, raffinose, stachyose는 25~250 mg%가 되도록 조제하여 HPLC 분석에 사용하였음. 선별된 식물추출물 1 mL를 syringe filter (PVDF syringe filter, Futecs, Daejeon, Korea)로 여과한 후, 10 μ L를 주입시켰음. HPLC(NS-2004 GP, Futecs, Daejeon, Korea)분석은 Aschipak NH2P-50 4E (4.6 \times 250 mm) column을 이용하여 1.0 mL/min의 유속으로 ELSD (SC, 25 $^{\circ}$ C; DT, 60 $^{\circ}$ C)를 사용하였고, column oven은 35 $^{\circ}$ C를 유지하면서 분석하였으며, 70% acetonitrile을 이용한 isocratic 방식으로 분석하였음.

② 수용성 식이섬유 분석

- 선별된 식용식물추출물 약 8.0 g을 정확히 측정하여 500 mL 비이커에 취한 후, 0.08M phosphate buffer (pH 6.0) 50 mL를 첨가하였음. 이어 0.1 mL Termamyl (heat stable α -amylase) solution을 첨가한 다음, 알루미늄 호일로 비이커를 덮어 95 $^{\circ}$ C shaking water bath에서 반응을 시켰음. 실온에서 30분간 방랭시킨 다음 0.275N NaOH 용액 10 mL 넣어 pH 7.5 \pm 0.1로 조정하고 protease 5 mg을 phosphate buffer 1 mL에 용해하여 그 중 0.1 mL를 넣고 60 $^{\circ}$ C incubator에서 30분간 반응시켰음. 반응액에 0.325M HCl 10 mL를 넣어 pH 4.0~4.6으로 조정하고 amyloglucosidase 0.1 mL를 넣은 다음 60 $^{\circ}$ C incubator에서 30분간 추가 반응을 시켰음. 반응액은 실온에서 방랭 후 95% EtOH을 용액의 4배 양인 285 mL 넣어준 후 침전물이 생기도록 실온에 30분간 방치하였음. 0.5 g의 celite를 glass filter에 담아 항량을 구한 수기를 filter funnel 위에 장착하고 78% EtOH로 celite의 표면을 균일하게 만든 후, 반응을 완료시킨 enzyme mixture를 흡인·여과 시켰다. 여과가 완료되면 여기에 78% EtOH 20 mL로 2회 세척한 뒤, 95% EtOH 10 mL로 2회 세척하고 계속해서 10 mL acetone으로 2회 세척하였음. 침전물이 담긴 crucible은 105 $^{\circ}$ C 건조기에서 하룻밤 건조시킨 후 데시케이터에서 방랭한 후 무게를 측정하였음. 두 개의 시료 중 하나는 Kjeldahl법으로 조단백질 함량을 분석하고 나머지 한 개는 525 $^{\circ}$ C에서 5시간 회화시킨 후 회분을 정량한 후 TDF 산출식에 적용하여 수용성 식이섬유 함량을 산출하였음.

③ 총 페놀 분석

- 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 비색 정량하였음. 선별된 식물추출물 0.1 mL에 증류수 6 mL, folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 차례로 가하여 교반한 후 3분 방치하였음. 여기에 20% Na₂CO₃ 포화용액을 1.5 mL씩 가하여 교반한 후 실온에서 1시간 방치하였음. 반응액은 spectrophotometer(UV-1601, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준 용액은 gallic acid 용액(0~300 mg%)을 사용하였음.

(라) 선별된 원료소재 추출물의 장내 미생물 생육 영향 분석 및 최적화

- 선별된 원료 소재 추출물에 대한 생육 조건을 분석하기 위해 선별된 식물 추출물을 MRS 배지에 1% 첨가하여 조제하였음. 여기에 유산균(*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*)을 접종하여 37°C에서 배양하였음. 식물 추출물 배지 내 미생물들의 생육 곡선을 확인하여 프리바이오틱스의 적용이 가능한 소재를 최종적으로 선별하였음.
- 올리고당에 따른 장내 미생물 생육 영향 분석의 표준물질을 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 말토올리고당으로 하며 식이섬유의 표준물질을 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴으로 하였음. 비탄수화물성 피리아이오틱스 소재인 플라보노이드 물질은 장내 *Lactobacillus*들의 성장을 촉진하는 것으로 알려진 레스베라트롤, 루틴, 퀘세틴, 카테킨을 표준물질로 하였음.

(마) 프리바이오틱스 산업적용을 위한 최적화

- 최종적으로 선별된 추출물 소재(잎류 1종, 열매류 1종, 뿌리류 1종)에 대해 입자크기, 시료대 용매비, 용매 농도를 고정한 다음 다양한 추출특성 실험을 진행하였음. 선별된 추출물들은 유산균을 포함한 GRAS 미생물, amylase, cellulase, protease, β -glucosidase, microwave 추출법 등을 이용하여 올리고당은 1~2 g/100 g, 식이섬유는 5~10 g/100 g, 페놀 화합물에 있어서는 총 플라보노이드 함량 0.4~0.5 g/100 g 또는 플라보노이드 주성분 (퀘세틴, 캄페롤) 15~20 mg/100 g이 함유되도록 하였음.

(2) 실험 결과

(가) 전통식품 및 천연식용식물 원료 선별

- 전통식품과 약 100종의 국내 특용 작물 및 자생식물 자원을 확보하여 프리바이오틱스 소재로써의 이용가능성 검토하기 위해, 추출물(MeOH 추출물)들에 함유된 총 페놀 함량을 분석하였음. 그 결과(Table 27), 함량은 추출물 100 g 당 0.5~56.1% 범위로 매우 다양하였으며, 그 중 높은 함량의 총 페놀 화합물을 함유하며 구입이 용이한 특용식물자원을 선별하였음. 잎류는 꾸지뽕잎(LE-12), 뽕잎(LE-34), 감잎(LE-41), 연잎(LE-42), 차조기(LE-51)를 선별하였으며, 열매류는 블루베리(FE-8), 복분자(FE-11), 오디(FE-18), 그리고 뿌리류는 초석잠(RE-2), 더덕(RE-3), 도라지(RE-4)를 선별하였음.

Table 27. Content of total phenolics in edible plant extracts

식용식물 추출물	총 페놀 (g/100 g)	식용식물 추출물	총 페놀 (g/100 g)	식용식물 추출물	총 페놀 (g/100 g)
1 PE-1	8.54±0.46	35 LE-30	6.47±0.21	69 FE-4	1.10±0.06
2 PE-2	13.09±0.69	36 LE-31	13.51±0.40	70 FE-5	56.13±1.05
3 KE-3	2.19±0.08	37 LE-32	10.03±0.94	71 FE-6	7.79±0.68

4	KE-4	0.13±0.01	38	LE-33	16.97±0.15	72	FE-7	2.93±0.26
5	KE-5	4.31±0.87	39	LE-34	18.64±0.31	73	FE-8	18.78±0.49
6	LE-1	12.70±0.61	40	LE-35	5.24±0.58	74	FE-9	1.54±0.26
7	LE-2	0.74±0.07	41	LE-36	9.62±0.47	75	FE-10	2.74±0.07
8	LE-3	32.66±0.95	42	LE-37	14.24±0.78	76	FE-11	10.12±0.44
9	LE-4	9.12±0.35	43	LE-38	17.43±0.21	77	FE-12	4.14±0.23
10	LE-5	5.51±0.12	44	LE-39	8.03±0.25	78	FE-13	4.70±0.20
11	LE-6	2.47±1.52	45	LE-40	6.39±0.23	79	FE-14	1.41±0.26
12	LE-7	13.99±0.15	46	LE-41	25.70±0.57	80	FE-15	2.39±0.15
13	LE-8	5.68±0.33	47	LE-42	18.20±0.87	81	FE-16	2.28±0.09
14	LE-9	7.60±0.20	48	LE-43	12.95±0.54	82	FE-17	5.29±0.13
15	LE-10	0.99±0.12	49	LE-44	8.79±0.12	83	FE-18	11.72±0.23
16	LE-11	11.01±0.13	50	LE-45	10.47±0.44	84	FE-19	2.16±0.09
17	LE-12	21.87±1.13	51	LE-46	8.56±0.37	85	FE-20	6.66±0.32
18	LE-13	4.58±0.43	52	LE-47	14.91±0.44	86	FE-21	1.14±0.07
19	LE-14	4.68±0.12	53	LE-48	10.03±0.48	87	SE-1	31.12±0.67
20	LE-15	9.56±0.38	54	LE-49	6.24±0.06	88	SE-2	8.91±0.22
21	LE-16	18.33±0.84	55	LE-50	31.31±0.64	89	SE-3	13.37±0.48
22	LE-17	5.83±0.12	56	LE-51	20.83±0.78	90	SE-4	10.31±0.19
23	LE-18	9.60±0.28	57	LE-52	15.70±0.31	91	SE-5	24.62±1.24
24	LE-19	26.26±0.83	58	LE-53	25.60±0.58	92	SE-6	20.60±1.15
25	LE-20	4.64±0.23	59	LE-54	12.10±0.59	93	SE-7	6.83±0.20
26	LE-21	14.93±0.49	60	LE-55	9.93±0.12	94	RE-1	4.62±0.36
27	LE-22	15.01±0.75	61	LE-56	3.03±0.03	95	RE-2	21.33±2.43
28	LE-23	6.91±0.37	62	LE-57	24.43±0.72	96	RE-3	12.33±0.55
29	LE-24	5.20±0.15	63	LE-58	19.41±0.96	97	RE-4	8.99±0.59
30	LE-25	5.87±0.09	64	LE-59	27.95±1.30	98	RE-5	3.58±0.26
31	LE-26	0.54±0.15	65	LE-60	5.45±0.03	99	RE-6	-
32	LE-27	18.26±0.87	66	FE-1	5.18±0.19	100	RE-7	3.76±0.10
33	LE-28	4.91±0.25	67	FE-2	4.29±0.17	101	RE-8	1.83±0.17
34	LE-29	8.58±0.35	68	FE-3	2.12±0.09			

(나) 선별된 원료소재 추출물의 기능성 물질 분석

① 원료 선별에 사용된 국내 특용작물 및 자생식물 추출물들은 MeOH 추출물로서 식품에 직접 적용시키기는 어려우므로, 선별된 원료에 대해 열수 추출과 40% 주정 추출을 행하여 그 추출물들을 이용하여 기능성 물질 분석에 사용하였음.

② 올리고당 분석

- 표준품인 fructose, sucrose, raffinose, stachyose는 25~250 mg%가 되도록 조제하여 HPLC 분석에 사용하였음. 선별된 식물추출물 1 mL을 syringe filter (PVDF syringe filter, Futecs, Daejeon, Korea)로 여과하여 HPLC 분석한 결과는 Table 2와 같음. 식용식물추출물에는 단당류인 fructose는 0.6~44.6%의 범위로 함유되어 있었고, glucose는 0.4~17.9%의 범위로 함유되어 있었음. 특히 감잎에 fructose와 glucose가 매우 높은 비율로 함유되어 있음을 확인하였음. 삼당류인 raffinose도 대

부분의 추출물에서 관찰되었으며, 그 함유 범위는 0.3~6.3% 정도였음. 사당류인 stachyose는 잎류와 열매류에서는 관찰되지 않았으나, 뿌리류 추출물인 더덕과 도라지 추출물에서 그 함량을 확인할 수 있었음.

Table 28. Content of oligosaccharides in edible plant extract

식용식물자원		올리고당 함량 (g/100 g)			
		Fructose	Glucose	Raffinose	Stachyose
잎류	꾸지뽕잎	9.25±0.28	13.74±1.12	1.24±0.03	-
	뽕잎	4.76±0.13	17.98±0.23	1.75±0.03	-
	감잎	44.69±0.60	13.66±0.12	3.29±0.15	-
	연잎	4.15±0.06	3.22±0.08	-	-
	차조기	3.46±0.01	4.18±0.10	3.54±0.01	-
열매류	블루베리	7.44±0.14	0.43±0.07	0.34±0.04	-
	복분자	0.67±0.04	4.56±0.14	1.48±0.20	-
	오디	8.97±0.08	2.34±0.05	0.46±0.05	-
뿌리류	초석잠	4.43±0.20	3.45±0.05	6.31±0.02	-
	더덕	13.08±1.48	14.26±0.75	3.35±0.14	8.54±0.38
	도라지	2.63±0.25	15.79±0.49	3.30±0.23	5.54±0.24

③ 수용성 식이섬유 분석

- 선별된 식물추출물에 함유된 수용성 식이섬유를 분석한 결과(Table 29), 추출물들에는 약 0.3~2.6%의 수용성 식이섬유를 함유함을 확인하였음. 특히 도라지추출물에서는 11%가 넘는 수용성 식이섬유가 되어 있었음.

Table 29. Content of soluble dietary fiber in edible plant extract

식용식물자원		수용성 식이섬유 함량 (%)
잎류	꾸지뽕잎	2.65±0.21
	뽕잎	1.09±0.03
	감잎	1.54±0.71
	연잎	0.92±0.02
	차조기	1.12±0.05
열매류	블루베리	0.32±0.24
	복분자	0.48±0.02
	오디	0.35±0.11
뿌리류	초석잠	0.50±0.07
	더덕	2.25±0.01
	도라지	11.42±0.84

④ 총 페놀 분석

- 잎류, 열매류, 그리고 뿌리류 추출물에 함유된 총 페놀 함량 분석 결과는 Table 30와 같음. 총 페놀 화합물 함량은 열매류인 복분자 추출물에서 27%가 넘는 총 페놀 함량을 나타내었고, 나머지 추출물들은 약 0.3~7.3% 수준의 총 페놀 화합물을 함유하고 있음을 확인하였음.

Table 30. Content of total phenolics in edible plant extracts

식용식물자원		총 페놀 함량 (g/100 g)
잎류	꾸지뽕잎	2.95±0.07
	뽕잎	3.29±0.10
	감잎	7.31±0.13
	연잎	5.50±0.20
	차조기	4.88±0.05
열매류	블루베리	0.34±0.01
	복분자	27.43±0.59
	오디	3.00±0.03
뿌리류	초석잠	1.65±0.06
	더덕	0.75±0.02
	도라지	0.65±0.02

(다) 선별된 원료소재 추출물의 장내 미생물 생육 영향 분석

- 선별된 원료 소재 추출물에 대한 생육 조건을 분석하기 위해 선별된 식물 추출물이 1% 첨가된 MRS 배지에 유산균(*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*)을 접종하여 배지 내 미생물들의 생육 곡선을 확인하였고, 접종 24시간 후의 배양액의 O.D 값들을 측정하여 Table 31에 나타내었음. 11종 식물 추출물들이 첨가된 배지 모두에서 유산균들의 생장이 매우 잘 되었으며, 특히 차조기, 블루베리에서는 MRS 배지보다 식물 추출물이 첨가된 배지에서 미생물 생장을 더 활성화시켰음. 하지만 차조기는 향이 매우 강하고, 열매류는 추출 시 주정 사용으로 인한 어려움이 있으며, 뿌리류는 낮은 페놀 함량으로 인해 소재로 적용하기에 어려움이 있을 것으로 생각되어, 잎류 4종(꾸지뽕잎, 뽕잎, 감잎, 연잎)을 선별하여 1세부(서울우유)에 제공하였음.

Table 31. The OD value of MRS broth (1% plant extract) fermented by *Lactobacillus* during 24 hours

처리구		OD 값	
		<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>
		0.805	0.814
잎류	꾸지뽕잎	0.514	0.606
	뽕잎	0.570	0.810
	감잎	0.802	0.893
	연잎	0.602	0.531
	차조기	0.960	1.117
열매류	블루베리	0.821	0.911
	복분자	0.111	0.366
	오디	0.804	0.865
뿌리류	초석잠	0.765	0.787
	더덕	0.682	0.827
	도라지	0.718	0.834

(라) 프리바이오틱스 산업적용을 위한 최적화

- 제 1세부(서울우유)의 결과를 토대로 꾸지뽕잎을 최종 소재로 선발하였고, 이 추출물에 대해 입자크기, 시료대 용매비, 용매 농도를 고정에 따른 추출 특성실험을 진행하고, 최종 선별된 추출물들을 대상으로 유산균을 포함한 GRAS 미생물, amylase, cellulase, protease, β -glucosidase, microwave 추출법 등을 적용하여 올리고당, 식이섬유, 총 플라보노이드 함량 및 플라보노이드 주성분(퀘세틴, 캠페롤)들을 분석하였다. 또한 정량적 목표로 정한 상기 화합물들의 조성에 대한 유산균들의 생육 영향에 대한 분석도 진행하여 최종 선별된 추출물 소재들의 프리바이오틱스 산업적용을 위한 최적화를 실시하였다.

나. 장기능성 신바이오틱스 혼합소재의 면역증진 활성 평가

(1) 실험 내용

(가) Cell culture system을 이용한 면역증진 활성 검토

① 면역세포, 신바이오틱스 혼합소재의 준비

- 선발된 신바이오틱스 소재의 면역세포 성장에 미치는 영향을 측정하기 위해 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 실시함. Splenocyte는 Young mice의 spleen으로부터 실험 전 매번 fresh한 상태로 분리하여 사용하며 분리된 세포는 96-well flat bottom tissue culture plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 10 ng/ml의 interleukin-2 (IL-2)가 들어있는 RPMI-1640

에 희석하여 분주함.

- 48시간 배양 후 serum-free 배지에 준비된 프로바이오틱스 균주 (1×10^9 CFU/ml)과 프리바이오틱스 소재 (1차년도에 선발된 꾸지뽕잎과 뽕잎)의 신바이오틱스 혼합소재를 농도별로 현탁한 후 각 well에 분주하고 37°C에서 배양하고 차후 분석실험에 사용함.

② Cell proliferation assay 평가

- 24시간 동안 배양한 세포를 대상으로 상등액을 모두 제거하고 3회 세척하고 20 μ l of MTT solution (2 mg/ml)을 각 well에 분주함. 1시간 배양 후 형성된 formazan crystal은 100 μ l의 DMSO로 현탁한 후 multi-well scanning spectrophotometer (ELISA reader)를 이용하여 OD 490nm에서 흡광도 측정.

③ ROS (Reactive oxygen species) 억제능 평가

- 24시간 동안 배양한 세포를 대상으로 새로운 serum free RPMI에 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 10 μ M을 첨가한 후 media를 제거한 cell에 넣어주고 37°C, 5%CO₂ 조건하에서 30분간 배양함. Fluorescence plate reader로 485nm excitation, 530nm emission wavelength에서 fluorescence와 DNA함량을 측정하여 최종적으로 일정 단위 DNA당 fluorescence세기를 표시하여 상호 비교함.

④ Interferon gamma (IFN- γ) 저해능 평가

- 3일 동안 배양시킨 세포를 원심분리를 통해 상등액만을 분리한 후 방출된 IFN- γ 함량을 ELISA를 이용하여 측정함. 5 μ g/ml의 고순도로 정제된 anti-IFN- γ antibody (BD Bioscience, no. 554409, USA)를 96-well flat bottom tissue culture에 분주한 후 4시간동안 상온에서 부착시키고 각 well은 PBS로 3회 세척한 후 1% bovine serum albumin (BSA) (in PBS)로 block시킨 후 준비된 상등액 50 μ l를 각 well에 분주함. 2시간동안 상온에서 정치시킨 후 PBS로 5회 세척을 실시하고 부착된 IFN- γ 에 biotinylated anti-IFN- γ antibody (BD Bioscience, no. 554410, USA)를 2시간 처리한 후 PBS로 5회 세척하고 준비된 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Vector, no. SA-5004, USA)와 기질(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 함께 가하고 최종적으로 100 μ l of the stop solution (3 M HCl)을 첨가하여 반응을 종료시킴. ELISA reader를 이용하여 OD 450 nm에서 흡광도를 측정하여 최종적으로 IFN- γ 함량 평가.

(나) 예쁜 꼬마선충 *C. elegans*를 이용한 면역증강 활성 검토

① *C. elegans* 모델을 이용한 장기능 및 면역증강 평가방법 확립

㉞ *C. elegans* 면역모델의 준비

- 실험조건인 25°C에서 실험의 용이함을 위해 생존을 실험에는 fer-15;fem-1

mutant를 사용함. 이 변이주는 15°C에서 부화하나 25°C에서는 부화하지 않는 특성을 가지고 있으며 부화능력 이외에 다른 phenotype의 변화는 없는 변이주로 알려져 있어 다양한 실험, 특히 면역활성 및 노화실험에 다양하게 사용되는 변이주이므로 본 실험에 사용함.

- 또한, 생존을 실험이외에 다양한 *C. elegans* 활성변화는 N2 wild-type을 이용하였음.
- *C. elegans* 배양: Nematode growth medium (NGM; Breger 1976)와 *E. coli* OP50을 사용함.

㉞ 신바이오틱스 conditioning plate의 준비

- 1차년도에 선발된 고기능성 신바이오틱스 균주를 MRS 배지에 37°C에서 18시간 동안 배양시키고 원심분리 (6,000×g, 20 min)하여 세포 pellet만 회수한 후 M8 buffer로 5회 세척하였음.
- 최종적으로 5배 농축균액을 제조한 후 NGM agar에 분주한 후 상온에서 1시간 건조시킴. 건조후 40°C에서 보관하면서 프로바이오틱스 conditioning plate로 2주간 사용함. 프리바이오틱스 소재 꾸지뽕잎의 경우 0.2% 추출물을 준비하여 프로바이오틱스 conditioning plate 제조 시 혼합하여 첨가함.

㉟ *C. elegans* 모델을 이용한 장부착능 탐색

- 선발된 신바이오틱스 균주의 *C. elegans* 장내 부착능을 측정하기 위하여 본 연구진이 확립한 방법을 이용함 (Kim and Mylonakis, 2012).
- 상기 방법을 이용하여 제조된 신바이오틱스 conditioning plate에 L4/young adult *C. elegans*를 노출시키고 24 시간 장내 부착을 유도한 후 각 처리구에서 10마리의 worm을 분리한 후 M9으로 5회 세척을 실시하고 motor pestle을 이용하여 선충을 분쇄하고 0.85% NaCl로 연속희석한 후 pH 5.0-MRS agar 배지에 도말하여 균수를 측정함.

② 고효율 in vivo *C. elegans* 모델을 이용한 신바이오틱스 장면역 활성기작 검토

㉠ 병원성 미생물-*C. elegans* 모델을 이용한 장면역 증강 검증시스템 확립

- 상기 방법에 의해 24시간동안 신바이오틱스 conditioning된 *C. elegans*를 M9 buffer로 5회 세척한 후 장염증 유발 병원균인 *S. aureus* RN6390이 분주된 NGM plate에 옮기고 25°C에서 24시간 병원균 감염을 유도함.
- 감염 후 M9 buffer로 5회 세척을 실시하고 working medium (20% BHI+ 80% M9 buffer)가 분주된 6 well plate에 감염된 *C. elegans* 선충을 30마리씩 넣어준 다음 24시간 간격으로 선충의 생존 유무를 14일간 관찰하면서 *C. elegans*의 생존율을

조사함. 흔들거나 접촉시켰을 때 이동성이 남아있는 개체를 살아있는 *C. elegans*로 간주하며 실험은 최소 3반복을 실시하였음.

㉞ qRT-PCR와 GFP-promoter assay을 이용한 면역유전자군의 발현 검증

- 기존의 문헌을 통해 규명된 기능별 면역 유전자군을 선발한 후 qRT-PCR용 primer 제작: primer3 Input (version 0.4.0) software를 이용하여 specific primer를 제작함.
- qRT-PCR 실험: SuperScriptTMIII Platinum@SYBR@Green One-Step qRT-PCR Kit와 StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용하며 실시하였고 mRNA의 발현변화를 보정하기 위해 snb gene을 internal control로 사용함.
- 또한, Caenorhabditis Genetics Center (CGC)에서 구입한 면역관련 유전자 pmk-1의 promotor에 GFP 형광단백질이 융합된 transgenic mutant worm을 이용하여 직접적인 면역증강 효과를 시각화함.

(2) 실험 결과

(가) Cell culture system을 이용한 면역증진 활성 검토

① 면역세포, 신바이오틱스 혼합소재의 준비

- 1차년도 과제수행 결과를 바탕으로 19종의 프로바이오틱스 균주, 그리고 2종의 프리바이오틱스 소재(꾸지뽕잎, 뽕잎)을 최종 선발한 후 이들의 신바이오틱스 활성을 검토함.
- 가장 먼저 선발된 2종의 프리바이오틱스 소재의 세포독성을 평가하기 위하여 꾸지뽕잎과 뽕잎 추출물을 2 ng/ml부터 2 mg/ml까지 다양한 농도로 처리한 후 세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과 cell viability는 농도에 따라 거의 차이가 없었으며 프리바이오틱스 소재를 첨가하지 않은 대조구와 통계적으로 유의하지 않은 결과를 확인하였음.
- 본 실험에 사용되는 두 종류의 프리바이오틱스 소재는 면역세포에 독성이 없는 식품소재로 사용이 가능한 안전한 것으로 판단됨 (Fig. 54).

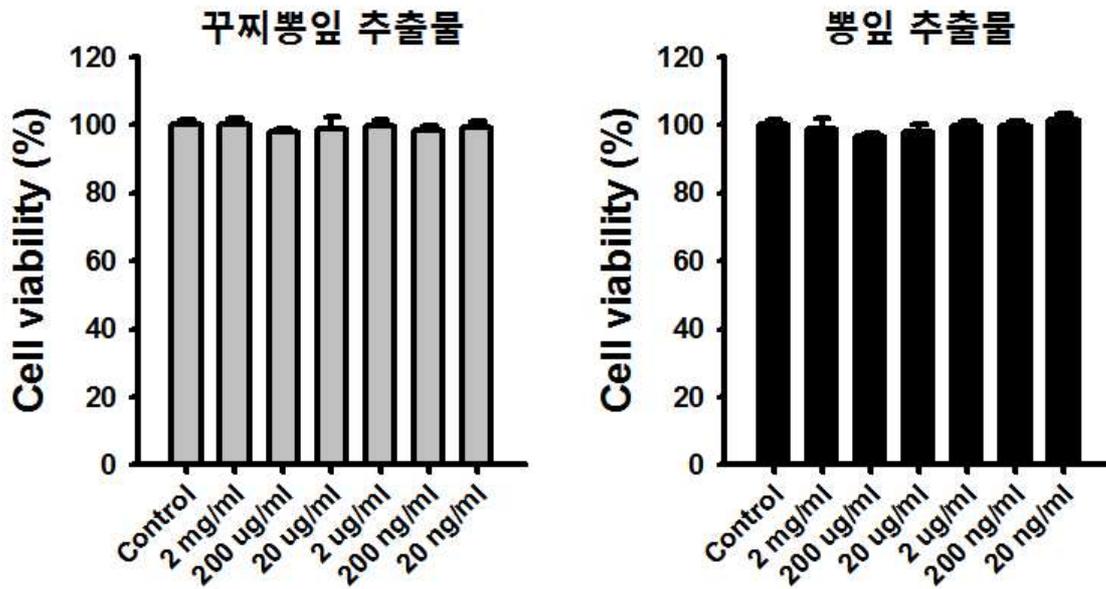


Fig. 54. 농도별 프리바이오틱스 소재 처리시 면역세포 독성평가

② 신바이오틱스 혼합소재의 in vitro 면역활성 평가

㉞ cell proliferation

- 이후 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 혼합에 따른 신바이오틱스 활성을 검토하기 위하여 cell proliferation을 먼저 실시한 결과, 예상대로 많은 종의 프로바이오틱스 처리로 면역세포의 증식을 유의적으로 활성화 시킬 수 있는 것이 관찰되었음.
- 흥미롭게도 일부 균주와 함께 처리된 프리바이오틱스의 경우 전체적으로 꾸지뽕잎 추출물이 첨가된 처리구가 뽕잎추출물보다 cell proliferation을 유의적으로 증가하였음 (Table 32, 33).
- 특히, 꾸지뽕잎 추출물의 경우 프로바이오틱스 단독처리와 비교하였을 때 505, 508, 524, 529, 542, 545, 603, 615, 805, 817, 914, 917, 928에서 신바이오틱 활성이 관찰됨.

Table 32. 프로바이오틱스와 꾸지뽕잎 추출물 신바이오틱스의 cell proliferation 결과

Control	Probiotics alone	Synbiotics (ug/ml)			Strains
		20	200	2000	
100	122.93	122.75	119.65	116.90	505
	123.80	128.05	126.27	123.28	508
	125.21	129.46	134.47	124.93	517
	126.78	129.47	123.37	122.61	524
	129.27	142.71	137.17	130.03	529
	130.89	138.60	131.74	125.91	542
	125.65	134.41	128.26	121.33	545
	114.72	117.84	118.77	112.32	559

	133.94	124.57	122.25	123.37	568
	136.14	128.51	128.20	123.26	575
	127.72	129.04	126.33	119.17	589
	130.99	128.80	135.18	126.19	599
	136.68	128.73	126.35	129.82	603
	128.35	128.42	133.20	125.20	615
	128.97	133.36	130.46	129.16	805
	124.65	126.85	128.66	124.39	817
	125.97	127.03	133.96	131.38	914
	135.99	129.01	137.22	134.50	917
	127.29	125.25	129.95	128.64	928

Table 33. 프로바이오틱스와 빵잎 추출물 신바이오틱스의 cell proliferation 결과

Control	Probiotics alone	Synbiotics (ug/ml)			Strains
		20	200	2000	
100	122.93	113.21	114.35	108.88	505
	123.80	115.95	116.40	112.53	508
	125.21	107.52	118.00	115.95	517
	126.78	118.22	112.07	111.16	524
	129.27	138.04	124.15	123.23	529
	130.89	123.23	115.03	111.62	542
	125.65	125.28	118.68	101.14	545
	114.72	101.37	98.63	85.88	559
	133.94	113.50	105.49	116.02	568
	136.14	105.95	109.15	106.18	575
	127.72	106.86	102.75	96.57	589
	130.99	103.89	107.55	106.18	599
	136.68	116.25	110.76	119.91	603
	128.35	108.92	121.51	106.18	615
	128.97	124.49	112.81	127.46	805
	124.65	107.78	114.87	111.67	817
	125.97	115.56	118.99	130.43	914
	135.99	121.28	119.99	129.06	917
	127.29	125.17	130.89	125.17	928

㉞ ROS 생성 억제능

- ROS 생성억제능의 경우 505, 508, 524, 545, 559, 575 총 6종의 프로바이오틱스 단독처리에서 통계적으로 유의한 억제능이 확인됨.
- Cell proloferation 결과와 유사하게 꾸지뽕잎 추출물에서 보다 향상된 ROS 억제능이 관찰되었으며 505, 545, 559, 575를 포함한 총 4종의 프로바이오틱스와 함께 꾸지뽕잎 추출물을 첨가한 신바이오틱스 처리구에서 상승되는 ROS 억제능이 관찰됨 (Table 34, 35).
- 특히, ROS는 면역세포의 생존 및 활성화에 영향을 미치는 활성산소종으로 이들의 소거능이 면역활성에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으므로 본 연구에서 관찰된 신바이오틱스 혼합소재는 면역세포의 활성화에 중요한 항산화활성도 보유하고 있는 것으로 판단됨.

Table 34. 프로바이오틱스와 꾸지뽕잎 추출물 신바이오틱스의 ROS 억제능

Control	Probiotics alone	Synbiotics (ug/ml)			Strains
		20	200	2000	
100	92.15	80.51	76.77	77.83	505
	88.36	77.07	72.63	74.25	508
	82.23	74.50	69.87	72.15	517
	82.95	74.19	68.92	78.78	524
	82.61	73.19	75.96	77.14	529
	79.54	70.12	77.94	76.99	542
	81.34	72.41	70.66	70.20	545
	89.03	83.30	78.72	77.41	559
	111.01	96.69	96.89	99.77	568
	98.54	91.20	85.00	90.37	575
	96.72	92.71	87.80	87.73	589
	95.30	95.20	93.84	91.20	599
	96.01	99.46	92.62	90.14	603
	99.39	102.87	99.70	97.76	615
	96.96	106.89	107.89	101.80	805
	105.22	112.16	112.5	117.90	817
	93.89	99.86	104.48	109.68	914
	92.34	100.93	100.92	96.84	917
91.80	98.41	97.62	99.10	928	

Table 35. 프로바이오틱스와 뽕잎 추출물 신바이오틱스의 ROS 억제능

Control	Probiotics alone	Synbiotics (ug/ml)			Strains
		20	200	2000	
100	92.15	88.59	91.35	94.97	505
	88.36	84.79	84.76	86.38	508
	82.23	81.06	79.88	83.66	517
	82.95	77.59	78.35	79.75	524
	82.61	74.26	75.08	74.58	529
	79.54	74.04	71.35	72.38	542
	81.34	75.94	74.92	73.90	545
	89.03	83.63	83.33	81.26	559
	111.01	87.60	87.74	89.40	568
	98.54	81.15	80.02	83.37	575
	96.72	80.11	79.54	81.77	589
	95.30	82.51	81.90	80.55	599
	96.01	81.84	79.17	79.75	603
	99.39	82.88	81.00	82.74	615
	96.96	85.63	84.80	83.95	805
	105.22	96.84	95.31	95.01	817
	93.89	94.93	101.71	104.46	914
	92.34	89.88	93.59	93.99	917
91.80	87.74	94.23	97.03	928	

Table 36. 최종 선발된 5종의 프로바이오틱스 균주와 꾸지뽕 프리바이오틱스의 신바이오틱스 활성 검토 (*p<0.05)

Cell proliferation 증가율 (% of Probiotics alone)		ROS 활성 (% of Probiotics alone)		Strains
Probiotics alone	Synbiotics (+ 꾸지뽕)	Probiotics alone	Synbiotics (+ 꾸지뽕)	
100	113.60±2.45*	100	83.30±3.24*	505
100	102.07±1.43*	100	86.86±2.48*	545
100	103.53±0.83*	100	88.41±1.93*	559
100	101.51±1.04	100	86.25±1.66*	575

㊦ IFN- γ 억제능

- 비특이적으로 19종 모든 프로바이오틱스 단독처리에 의해 IFN- γ unit이 1000배이상 감소하였으며 꾸지뽕잎 추출물과 뽕잎 추출물과 혼합한 신바이오틱스 처리에서도 거의 유의적인 차이점을 관찰할 수 없었음 (data not shown).
- 이는 대부분의 프로바이오틱스 균주에서 직접적인 면역세포와의 접촉을 통해 이루어지는 비특이적인 pro-inflammatory cytokine 억제효능작용인 것으로 판단되며 프리바이오틱스와의 동반상승 효과는 미비한 것으로 판단됨.
- 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 최종적으로 4종의 프로바이오틱스 (505, 545, 559, 575)와 1종의 프리바이오틱스 (꾸지뽕잎 추출물)을 선발하여 차후 *C. elegans*를 이용한 in vivo 면역활성 실험에 사용하였음.

(나) 예쁜 꼬마선충 *C. elegans*를 이용한 면역증강 활성 검토

① *C. elegans* 모델을 이용한 장부착능 탐색

- 최초로 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 혼합소재 처리에 따른 *C. elegans* 생체에 미치는 영향을 조사하기 위해 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 conditioning plate에 Adult *C. elegans* N2 wild-type을 노출시키고 이들의 body size와 brood size를 조사하였음.
- 예상대로 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 소재의 노출에 따른 *C. elegans* in vivo host의 생체 내 변화는 일반 먹이균주인 *E. coli* OP50와 거의 차이가 없는 것으로 관찰됨 (Fig. 55).
- 이러한 결과는 본 실험에서 사용되는 프로바이오틱스와 신바이오틱스는 *C. elegans*의 in vivo 동물생체에 영향을 주지 않는 것으로 생체에 안전한 것으로 판단할 수 있음.

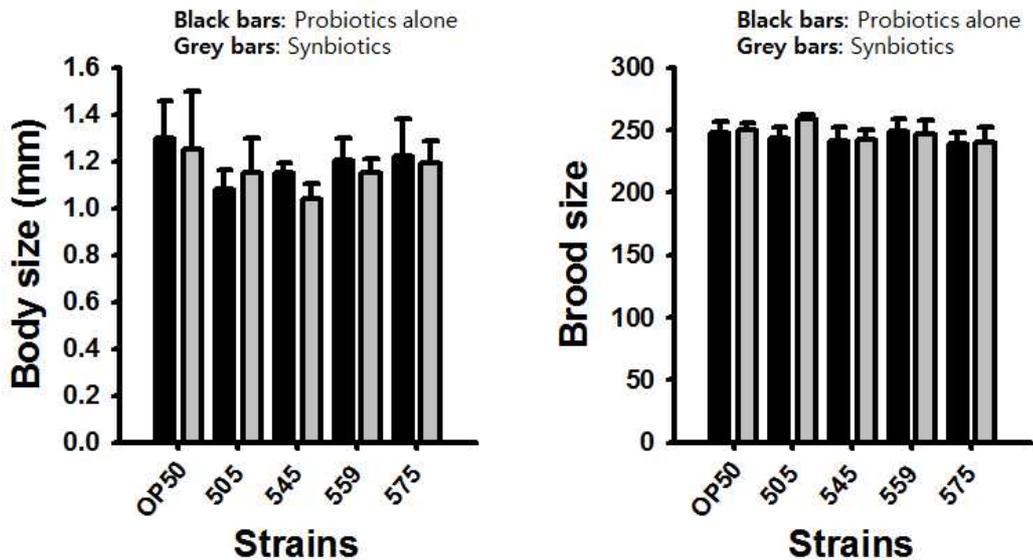


Fig. 55. 프로바이오틱스 단독처리 또는 꾸지뽕잎 추출물과의 신바이오틱스 처리에 따른 *C. elegans*의 생체변화 측정 (왼쪽: 몸길이, 오른쪽: 유충생성)

② 고효율 in vivo *C. elegans* 모델을 이용한 신바이오틱스 장면역 활성화작 검토

- 선발된 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 혼합소재 처리에 따른 동물 면역 증강반응을 관찰하기 위하여 24시간 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 또는 신바이오틱스 conditioning plate에 노출시킨 *C. elegans*를 병원성대장균인 *S. aureus* plate에 옮긴 후 생존율을 측정하였음.
- 먼저 일반 먹이미생물은 *E. coli* OP50을 이용하여 일반 먹이미생물과 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물이 0.2% 동시에 함유된 프리바이오틱스 conditioning plate에서 면역증강반응을 관찰하였음. 예상과 다르게 선발된 프리바이오틱스 꾸지뽕잎 추출물을 단독처리한 처리구에서는 대조구와 비교하였을 때 유의적인 면역증강 효과를 관찰할 수 없었음 (Fig. 56).

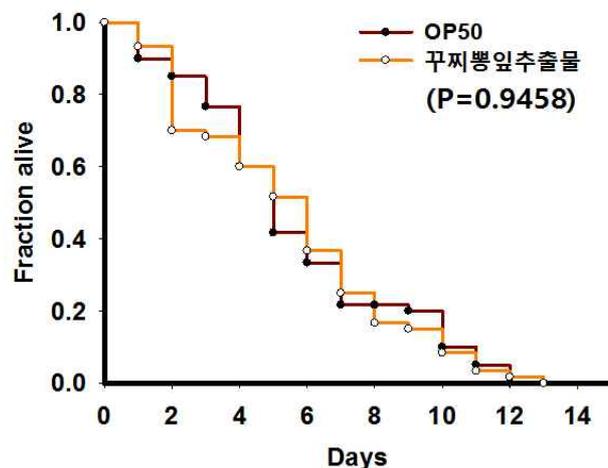


Fig. 56. 프리바이오틱스 꾸지뽕잎 추출물 처리에 따른 *C. elegans*의 *S. aureus* 감염에 대한 면역증강활성 측정

- 이후 일반 먹이미생물은 E. coli OP50를 대조구로 프로바이오틱스와 신바이오틱스 소재의 면역반응을 비교하였을 때 흥미롭게도 4종의 프로바이오틱스 단독처리 중 505와 545 두 종류의 프로바이오틱스에서 통계적으로 유의한 면역증강 반응이 관찰되었음 (Fig. 57).
- 특히, Kaplan-Meier method를 사용하여 log-rank test (STATA6; STATA, College Station, TX) 통계처리를 실시한 결과 505 균주의 경우, 꾸지뽕잎 추출물과의 신바이오틱스 혼합 처리에 따라 병원성 세균에 대한 면역능이 확연하게 증가하는 신바이오틱 활성을 확인하였음 (Fig. 4).
- 545 균주의 경우, 신바이오틱스 혼합처리가 프로바이오틱스 단독처리의 경우에 비해 오히려 낮은 면역활성이 관찰됨. 이는 2주 동안 혼합 배양 중에서 특정 프리바이오틱스 존재에 따른 발효산물의 변화에 의한 것으로 추정되며 이러한 신바이오틱스 활성화에 메카니즘 연구는 3차년도 마우스 동물실험 및 DNA microarray분석을 통해 보다 명확하게 규명될 것으로 예상됨.

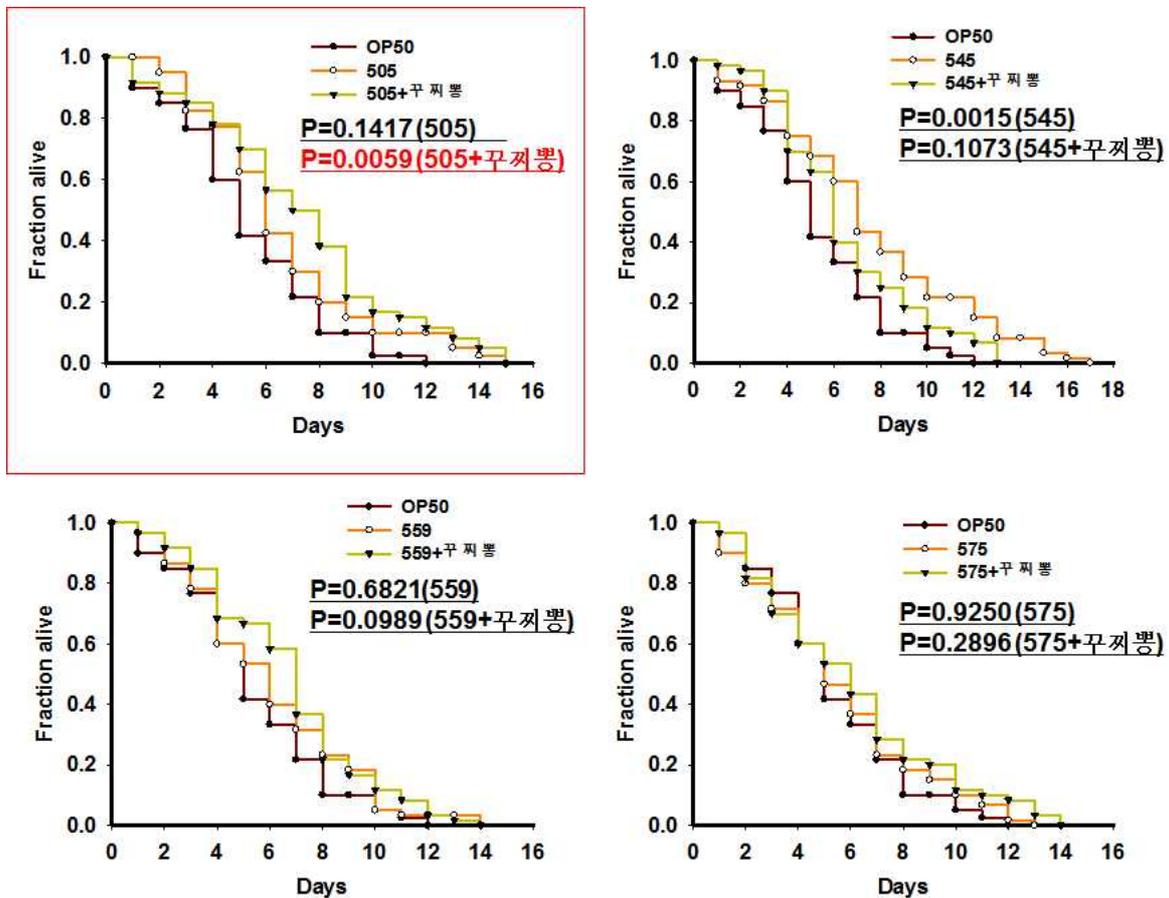


Fig. 57. 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 처리에 따른 C. elegans의 S. aureus 감염에 대한 면역증강활성 측정

③ *C. elegans* 모델을 이용한 장부착능 탐색

- 다음 실험으로써 본 연구진에 의해 확립된 방법을 이용하여 신바이오틱스 conditioning plate에 L4/young adult *C. elegans*를 노출시키고 24 시간 장내 부착을 유도하였음. 각 처리구에서 10마리의 worm을 분리한 후 motor pestle을 이용하여 선충을 분쇄하고 0.85% NaCl로 연속희석한 후 다른 균주의 오염을 최소화하기 위해 산성조건배지인 pH 5.0-MRS agar 배지에 도말하여 균수를 측정함.
- 예상대로 선발된 4종의 프로바이오틱스 균주는 모두 높은 수준의 부착능력이 관찰되었지만, 면역증강활성이 나타난 505 균주와 꾸지뽕잎 추출물의 신바이오틱스 처리에 의해서는 부착능이 증가되는 것을 확인할 수 없었음 (Fig. 58).
- 따라서 505 균주와 꾸지뽕잎 추출물의 혼합처리에 따른 신바이오틱스 면역활성 증가는 505균주가 부착되는 세균수의 증가에 기인하는 것이 아니라 505균주의 부착과 함께 꾸지뽕잎 추출물이 직접적으로 *C. elegans* 생체의 면역반응에 효과를 나타내는 것으로 추측하였음.
- 이러한 결과를 시각적으로 확인하기 위하여 Transmission electron microscopy(TEM)를 이용하여 505 균주와 꾸지뽕잎 추출물의 혼합처리에 따른 신바이오틱스 장내 부착능을 관찰하였을 때 세균수 측정 결과와 동일하게 505 균주 단독 처리의 경우 높은 부착능으로 인해 persistence가 유발되어 장관(lumen)의 확대가 관찰되었음.
- 하지만 꾸지뽕잎 추출물의 혼합 신바이오틱스 처리는 505 균주 단독처리와 비교하였을 때 큰 차이를 관찰할 수 없었음 (Fig. 5).

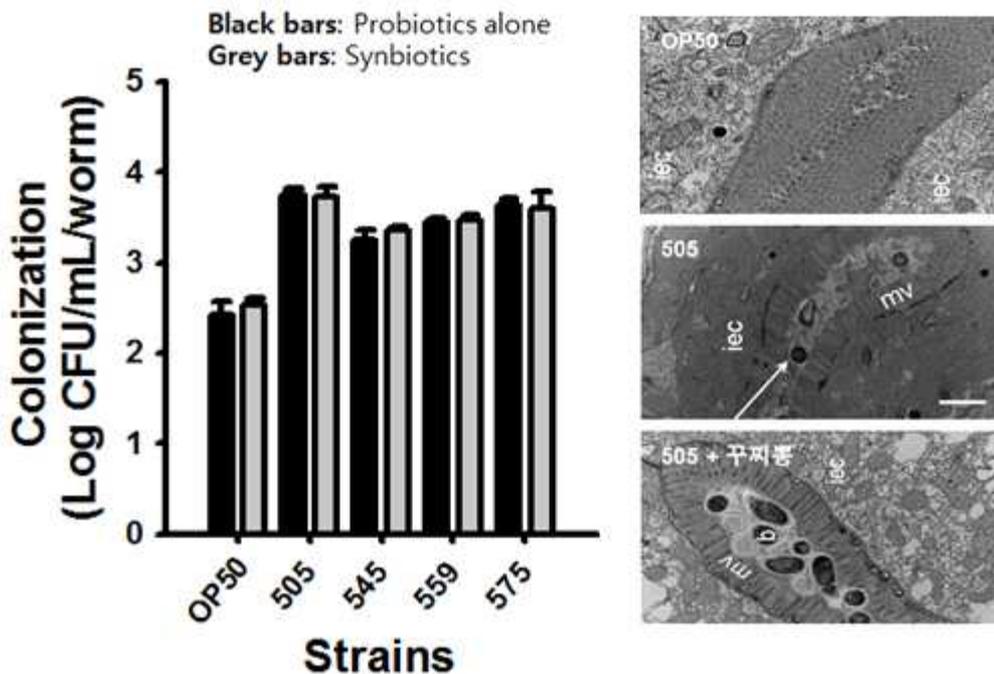


Fig. 58. 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 처리에 따른 *C. elegans*의 장내 부착능 (왼쪽: plate count, 오른쪽: TEM 사진)

④ qRT-PCR와 GFP-promoter assay을 이용한 면역유전자군의 발현 검증

- 본 연구에서는 최종적으로 면역증강 시너지활성이 나타난 505 균주와 꾸지뽕잎 추출물의 신바이오틱스 처리구를 대상으로 이들의 혼합처리와 *C. elegans* 면역증강에 중요한 역할을 하는 유전자 발현과의 상관관계를 qRT-PCR를 이용하여 평가하였음.
- 면역활성 실험과 동일한 조건으로 505 균주 단독처리와 꾸지뽕잎 추출물의 신바이오틱스 혼합처리구를 대상으로 각각의 RNA를 추출하여 이들을 대상으로 *C. elegans* 면역과 관련되는 중요한 5개의 유전자군(*cpr-1*, *thn-2*, *lys-5*, *clec-60*, *ilys-3*)의 발현변화를 측정하였음.
- qRT-PCR결과, 505 균주의 단독처리에 의해 높은 면역관련 유전자의 발현증가가 확인되었으며 통계적으로 유의하지는 않지만 꾸지뽕잎 추출물의 혼합 신바이오틱스 처리는 면역유전자 발현증가에 영향을 미치지 것으로 확인됨 (Fig. 59).
- 또한, Caenorhabditis Genetics Center (CGC)에서 구입한 면역조절 pathway 유전자인 *pmk-1*의 promoter에 GFP 형광단백질이 융합된 transgenic mutant worm을 이용하여 직접적인 면역증강 효과를 시각화한 결과, qRT-PCR 결과와 유의하게 505 균주의 단독처리에 의해 *pmk-1* pathway의 발현을 stimulation하는 것으로 확인되었으며 통계적으로 유의하지는 않지만 꾸지뽕잎 추출물의 혼합 신바이오틱스 처리도 *pmk-1* pathway stimulation 증가에 일부 영향을 미칠 수 있는 것으로 확인됨 (Fig. 60).

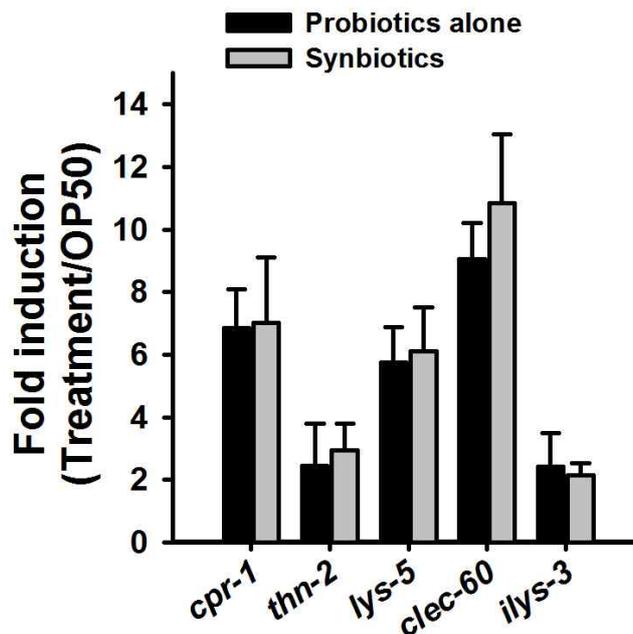


Fig. 59. qRT-PCR을 이용한 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 처리에 따른 *C. elegans* 면역관련 유전자 발현탐색



Fig. 60. PMK-1::GFP fluorescent fusion protein이 삽입된 transgenic worm을 이용한 프로바이오틱스 또는 신바이오틱스 처리에 따른 *C. elegans* pmk-1 pathway stimulation 탐색

다. 비교오믹분석 기술을 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명

(1) 실험 내용

(가) 비교오믹 분석을 위한 RNA sample 분리

- L4/young adult까지 성장시킨 예쁜 꼬마선충을 선발된 신바이오틱스 conditioning plate에 옮긴 후 24시간 25°C에서 배양시킴. 이후 M9 buffer를 이용하여 5회 세척하여 세포외부에 부착한 미생물을 제거한후 Trizol solution에 현탁시킴. 이후 motor pestle를 이용하여 예쁜 꼬마선충을 물리적으로 완전히 파쇄 (1분 파쇄, 15초 냉각을 5회 실시)한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 total RNA를 추출함. 최종 RNA를 추출한 후 Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 total RNA의 quality를 측정함. 추출된 RNA는 -80°C에 보관하며 실험직전 사용함. 대조구로 일반 미생물 먹이인 *E. coli* OP50를 사용하여 동일한 조건에서 RNA를 추출함.

(나) 비교오믹 분석결과를 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명

- 최종 추출된 RNA를 이용하여 합성된 cRNA를 정제 column을 이용해서 정제 한 후 94°C에서 20분 반응을 통해서 합성된 fragment cRNA를 준비함. 예쁜 꼬마선충의 DNA microarray를 위하여 Agilent 회사에 공급하는 Agilent Whole Genome *C. elegans* chip (4x44K)을 이용하여 최종 준비된 Fragment cRNA를 DNA microarray chip에 37°C에서 18시간 동안 hybridization 시킨 다음 washing 단계를 거친 후 fluorophore로 염색을 함하여 염색이 끝난 chip을 GenePix 4000B dual-channel confocal laser scanner (Axon Instruments, UnionCity, CA, USA)를 이용하여 스캔한 후 신바이오틱스 혼합소재 처리구의 스캔 결과와 *E. coli* OP50 대조군으로부터 얻은 스캔 결과를 서로 비교 하여서 특정 유전체의 변화 양상을 분석함. 분석된 결과를 기초로 하여 신바이오틱스 혼합소재와 *E. coli* OP50 대조군의 처리에 따른 예쁜 꼬마선충의 전사체 변화를 확인하고 신바이오틱스 혼합소재와 관련된 특정 면역증강 작용기작을 규명함.

(다) 장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원의 데이터 베이스 구축

- 본 연구결과에 의해 도출된 다양한 예쁜 꼬마선충의 장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원은 NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에 투고하여 그 유용성을 검증받고 accession number를 부여받은 후 중요 유전자원을 선별하여 최종적으로 예쁜 꼬마선충의 장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원 데이터베이스를 구축함.

(2) 실험 결과

(가) 비교오믹 분석결과를 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명

- 예쁜 꼬마선충을 숙주로 하여 최종적으로 선별된 프로바이오틱스 *Lactobacillus gasseri* 505와 프로바이오틱스 소재인 꾸찌뽕추출물을 함께 처리한 신바이오틱스 혼합소재의 장건강 기능성 메카니즘을 규명하기 위해 각각의 conditioning plate를 준비하였고 E. coli OP50를 대조구로 하여 전사체학 분석을 실시하였음. Total RNA 준비는 본 연구진에서 확보하고 있는 Kim et al.(2009)의 방법에 준하여 실시하였음.
- 실험결과 순도가 매우 높은 RNA 샘플을 확보할 수 있었으며(Fig. 61) 이들 RNA 샘플을 이용하여 Illumina HiSeq 2000 RNA-sequencing을 이용한 whole transcriptome analysis를 수행하였음.

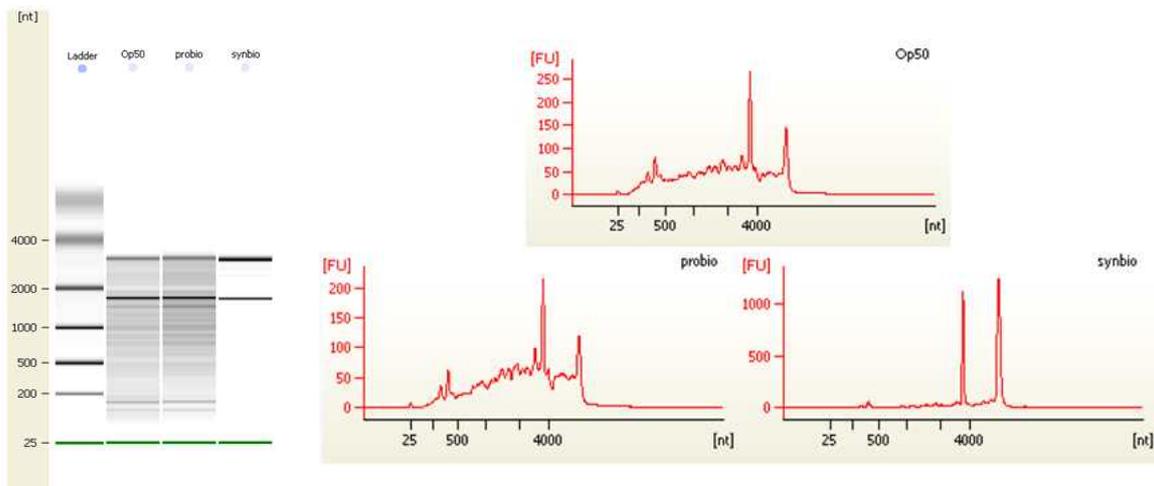


Fig. 61. 프로바이오틱스 단일처리와 신바이오틱스 혼합처리에 따른 예쁜 꼬마선충 숙주의 total RNA 관련 migration pattern(왼쪽)과 electropherogram을 이용한 peak

- 그림 62의 scatter plot 분석결과 같이 사선을 중심으로 사선위에 존재하는 유전자는 B. licheniformis 146 박테리오신의 처리에 의해 증가된 유전자의 패턴이며 사선아래에 존재하는 유전자는 B. licheniformis 146 박테리오신의 처리에 의해 발현이 유의적으로 감소한 유전자 패턴을 나타내었음.

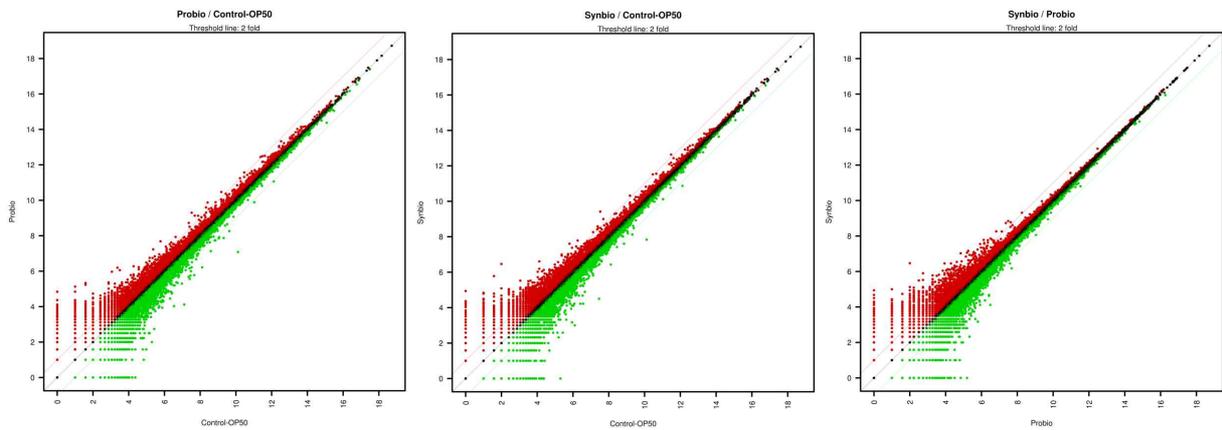


Fig. 62. E. coli OP50를 대조구로 프로바이오틱스 L. gasseri 505 단일처리와 꾸찌뽕추출물과의 신바이오틱스 혼합소재가 처리된 예쁜 꼬마선충 숙주의의 scatter plot 이미지

- 동일수준에서 replication된 RNA-sequencing 분석결과 $p < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의적인 수준에서 발현 변화한 유전자는 프로바이오틱스 단일처리의 경우 230개의 유전자와 240개의 유전자가 2배 이상 증가 또는 감소하였음. 최대 28.6배 증가한 유전자 W04C9.6(ortholog of members of the human Solute carriers family)부터 19.7배 감소한 유전자 B0353.1(uncharacterized gene) 등 광범위한 유전자들의 발현변화가 관찰되었음(Table 37, 38).
- 또한, 신바이오틱스 혼합소재 처리에 의해 30.66배 증가한 F26C11.3(mucin-2 homologue)를 포함하여 5배 이상 증가한 유전자가 288개 관찰되었으며 -38.33배 감소한 F45D11.5(uncharacterized gene)를 포함하여 240개 유전자 변화되는 것이 관찰되었음.
- 흥미롭게도 mucin-2의 경우 장상피세포를 둘러싸고 있는 점액질층을 형성하는 중요한 유전자임. Mucin은 고도로 탄수화물과 결합된 고분자의 당단백질로 생화학적, 물리적 특성이 당화되어 있는 형태와 중요한 상관관계를 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며 이들은 윤활유적 barrier로써 수화를 유지하여 장관의 기계적인 손상과 화학적인 자극으로부터 상피조직인 장내표면을 보호하는 역할과 소화운동의 윤활제 역할을 하는 것으로 연구되고 있음. 따라서 본 연구에서 신바이오틱스 혼합처리에 의해 장관에서 muc-2의 발현이 30배 이상 증가한 것이 관찰된바 신바이오틱스 혼합처리 는 장기능 개선에 중요하게 작용하는 것으로 판단되며 향후 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 판단됨.

Table 37. 프로바이오틱스 단일처리와 신바이오틱스 혼합처리에 따른 예쁜 꼬마선충 숙주의 증가된 유전자 발현변화 리스트

Gene Symbol	Probio/Control-OP50	Synbio/Control-OP50	Synbio/Probio
F26C11.3	1.000	30.667	30.667

gpa-14	0.120	3.080	25.667
T04F3.3	0.107	2.429	22.667
col-133	1.000	22.083	22.083
ZK945.7	0.088	1.735	19.667
zig-8	1.000	18.667	18.667
nas-25	0.061	1.061	17.333
F38H4.6	0.375	6.000	16.000
fipr-7	0.500	7.667	15.333
K11D2.4	0.250	3.583	14.333
F36H2.3	0.187	2.687	14.333
T22C1.8	0.187	2.687	14.333
col-165	1.000	13.333	13.333
C49C8.1	0.333	4.444	13.333
ent-3	0.136	1.818	13.333
C18G1.9	0.120	1.600	13.333
F13A7.7	0.107	1.429	13.333
clcc-183	0.055	0.727	13.333
F58F9.8	0.500	6.167	12.333
glb-23	0.500	6.167	12.333
K08E7.4	0.333	4.111	12.333
K08F9.1	0.333	4.111	12.333
F21D9.2	0.250	3.083	12.333
tctex-1	0.250	3.083	12.333
ZC155.2	0.250	3.083	12.333
ZC404.13	0.250	3.083	12.333
Y4C6A.1	0.187	2.312	12.333
ZK1248.20	0.136	1.682	12.333
ZK1251.1	0.107	1.321	12.333
T02H6.7	0.070	0.860	12.333
clcc-108	0.500	5.667	11.333
D2024.1	0.500	5.667	11.333
F02E11.4	0.500	5.667	11.333
R08C7.8	0.500	5.667	11.333
W09C3.2	0.500	5.667	11.333
clcc-158	0.187	2.125	11.333
lgc-47	0.070	0.791	11.333
clcc-263	0.176	1.912	10.833
W01C9.4	0.109	1.127	10.333
thn-5	0.500	5.000	10.000
abu-8	0.333	3.333	10.000
srz-64	0.250	2.500	10.000
srx-130	0.158	1.579	10.000
W03B1.3	0.158	1.579	10.000
ZC250.5	0.136	1.364	10.000
ZK1290.11	0.097	0.968	10.000

clec-169	0.081	0.811	10.000
F02E11.3	0.194	1.806	9.333
M03E7.3	1.000	9.000	9.000
Y57A10A.22	0.333	3.000	9.000
oac-33	0.250	2.250	9.000
Y45F10D.14	0.250	2.250	9.000
C14A6.13	0.187	1.687	9.000
C25B8.8	0.187	1.687	9.000
ZK688.10	0.187	1.687	9.000
Y48E1B.4	0.107	0.964	9.000
col-105	0.065	0.587	9.000
col-39	0.294	2.632	8.950
msh-63	0.474	4.211	8.889
F58E6.5	0.300	2.625	8.750
F22B5.4	0.194	1.677	8.667
F35B3.4	1.000	8.167	8.167
F12E12.6	1.000	8.000	8.000
F22G12.7	1.000	8.000	8.000
F42C5.5	1.000	8.000	8.000
nhr-218	1.000	8.000	8.000
spe-19	1.000	8.000	8.000
Y37F4.8	1.000	8.000	8.000
srg-13	0.500	4.000	8.000
C01G10.16	0.333	2.667	8.000
C25A1.15	0.333	2.667	8.000
F53G12.3	0.333	2.667	8.000
lgc-21	0.250	2.000	8.000
T02G5.14	0.250	2.000	8.000
wht-8	0.187	1.500	8.000
T04B2.8	0.158	1.263	8.000
B0507.9	0.136	1.091	8.000
R08A2.2	0.120	0.960	8.000
B0207.9	0.097	0.774	8.000
F19H8.5	0.097	0.774	8.000
C33E10.8	0.075	0.600	8.000
nspa-6	0.157	1.250	7.941
nspa-7	0.157	1.250	7.941
C45G9.9	0.387	2.968	7.667
C18H9.2	0.194	1.484	7.667
F58D5.7	0.169	1.229	7.286
F26F12.2	0.500	3.583	7.167
C17B7.10	0.375	2.687	7.167
C27A2.7	1.000	7.000	7.000
C33D3.3	1.000	7.000	7.000
F44F4.9	1.000	7.000	7.000

fbxa-196	1.000	7.000	7.000
glutaredoxin	1.000	7.000	7.000
K03H9.3	1.000	7.000	7.000
srd-67	1.000	7.000	7.000
sre-40	1.000	7.000	7.000
srh-240	1.000	7.000	7.000
srw-29	1.000	7.000	7.000
Y32G9A.3	1.000	7.000	7.000
ZK105.3	1.000	7.000	7.000
fipr-4	0.500	3.500	7.000
R102.8	0.500	3.500	7.000
T02E1.8	0.333	2.333	7.000
tag-212	0.333	2.333	7.000
ZK652.8	0.333	2.333	7.000
cdh-12	0.250	1.750	7.000
F18A12.2	0.250	1.750	7.000
nhr-266	0.250	1.750	7.000
Y45F10D.16	0.250	1.750	7.000
F18A12.7	0.187	1.312	7.000
F02C12.2	0.158	1.105	7.000
ceh-22	0.136	0.955	7.000
str-171	0.136	0.955	7.000
T22C1.9	0.136	0.955	7.000
F57F4.1	0.120	0.840	7.000
nhr-172	0.097	0.677	7.000
Y51B9A.5	0.097	0.677	7.000
C07E3.5	0.088	0.618	7.000
C32E8.4	0.155	1.070	6.900
dyf-11	0.353	2.353	6.667
ZK643.6	2.000	13.333	6.667
K01A2.6	0.500	3.333	6.667
Y54G2A.19	0.375	2.500	6.667
F49D11.7	0.273	1.818	6.667
Y41C4A.18	0.241	1.586	6.571
col-13	0.562	3.687	6.556
Y105C5B.18	0.562	3.500	6.222
F53F4.18	0.375	2.312	6.167
lagr-1	0.375	2.312	6.167
T01C3.5	0.316	1.947	6.167
C53D6.10	0.240	1.480	6.167
K09B11.5	0.387	2.387	6.167
fip-7	0.169	1.036	6.143
C04E12.5	1.000	6.000	6.000
C27A2.8	1.000	6.000	6.000
cutl-22	1.000	6.000	6.000

del-3	1.000	6.000	6.000
F21C3.6	1.000	6.000	6.000
F56F4.3	1.000	6.000	6.000
fbxa-195	1.000	6.000	6.000
her-1	1.000	6.000	6.000
srh-283	1.000	6.000	6.000
T24E12.6	1.000	6.000	6.000
twk-6	1.000	6.000	6.000
W05H5.3	1.000	6.000	6.000
W09C3.8	1.000	6.000	6.000
Y54G2A.24	1.000	6.000	6.000
Y73B3B.3	1.000	6.000	6.000
ZC196.3	1.000	6.000	6.000
C04E6.5	0.500	3.000	6.000
C14A4.13	0.500	3.000	6.000
C23H5.11	0.500	3.000	6.000
col-2	0.500	3.000	6.000
F59A1.6	0.500	3.000	6.000
nhr-88	0.500	3.000	6.000
srx-92	0.500	3.000	6.000
C05E7.2	0.333	2.000	6.000
clcc-185	0.333	2.000	6.000
F43C11.5	0.333	2.000	6.000
hlh-31	0.333	2.000	6.000
sra-35	0.333	2.000	6.000
T08B6.9	0.333	2.000	6.000
F38H4.5	0.250	1.500	6.000
Y43F8B.10	0.250	1.500	6.000
ZK666.8	0.250	1.500	6.000
col-123	0.187	1.125	6.000
B0564.6	0.158	0.947	6.000
D2062.6	0.158	0.947	6.000
F40F9.3	0.158	0.947	6.000
T22G5.1	0.158	0.947	6.000
ZK1307.2	0.158	0.947	6.000
M04C3.3	0.136	0.818	6.000
grd-11	0.120	0.720	6.000
F32H2.7	0.107	0.643	6.000
C08E8.11	0.097	0.581	6.000
F11D5.7	0.097	0.581	6.000
clcc-27	0.075	0.450	6.000
flp-23	0.378	2.243	5.929
F54H5.2	0.265	1.529	5.778
C35D10.11	0.261	1.494	5.717
col-12	3.222	18.333	5.690

btb-2	1.000	5.667	5.667
F42G4.2	0.480	2.720	5.667
shc-1	0.218	1.236	5.667
T28A11.17	1.000	5.667	5.667
H35N09.1	0.500	2.833	5.667
C10H11.7	0.273	1.545	5.667
F32B5.4	0.273	1.545	5.667
nmr-2	0.176	1.000	5.667
W02D7.11	0.176	1.000	5.667
dct-15	0.326	1.791	5.500
W04G3.2	0.164	0.891	5.444
fipr-27	0.095	0.516	5.444
F49F1.11	0.241	1.276	5.286
R08A2.1	0.465	2.442	5.250
flp-25	0.895	4.684	5.235
clcc-177	0.309	1.618	5.235
K05F1.8	0.429	2.214	5.167
Y71G12B.30	1.000	5.111	5.111
T22B11.1	0.321	1.643	5.111
col-168	0.184	0.939	5.111
col-7	1.667	8.500	5.100
ZK858.2	0.255	1.291	5.071
rmd-4	0.309	1.564	5.059

Table 38. 프로바이오틱스 단일처리와 신바이오틱스 혼합처리에 따른 예쁜 꼬마선충 숙주의 감소된 유전자 발현변화 리스트

xbx-7	0.102	0.025	0.250
B0353.1	0.048	0.048	1.000
ZK355.3	0.983	0.052	0.053
K02F6.6	0.164	0.055	0.333
clcc-72	0.418	0.055	0.130
C35C5.8	2.115	0.058	0.027
C03C10.5	0.261	0.065	0.250
F16G10.15	0.261	0.065	0.250
ZK686.6	0.326	0.070	0.214
osr-1	0.300	0.075	0.250
ugt-59	0.575	0.075	0.130
mab-7	0.459	0.081	0.176
gar-1	1.838	0.081	0.044
T07F8.1	0.176	0.088	0.500
F22E5.6	0.500	0.088	0.176
oac-58	0.500	0.094	0.187
F48G7.13	0.097	0.097	1.000
tag-49	0.097	0.097	1.000
tsp-11	0.097	0.097	1.000

ztf-14	0.097	0.097	1.000
nhr-257	0.194	0.097	0.500
tag-266	0.387	0.097	0.250
srn-1	0.452	0.097	0.214
K07D4.2	0.548	0.097	0.176
C54D10.4	0.645	0.097	0.150
F12E12.12	0.839	0.097	0.115
F08F3.1	1.097	0.097	0.088
twk-17	1.097	0.097	0.088
F52E1.5	1.677	0.097	0.058
ZK1010.4	0.397	0.103	0.261
F33E2.7	0.107	0.107	1.000
C10A4.1	0.214	0.107	0.500
C14A4.9	0.429	0.107	0.250
str-31	0.429	0.107	0.250
T02G5.3	0.714	0.107	0.150
lon-3	0.929	0.107	0.115
T05A6.4	1.036	0.107	0.103
F19C6.5	1.143	0.107	0.094
clcc-55	0.309	0.109	0.353
jnk-1	0.447	0.117	0.261
Y4C6B.4	0.182	0.117	0.643
clcc-28	0.120	0.120	1.000
F10A3.1	0.120	0.120	1.000
fbxa-113	0.120	0.120	1.000
fbxa-7	0.120	0.120	1.000
K09F6.7	0.120	0.120	1.000
R10F2.5	0.120	0.120	1.000
srxa-10	0.120	0.120	1.000
C14A6.6	0.240	0.120	0.500
F01F1.13	0.240	0.120	0.500
F15E11.2	0.240	0.120	0.500
psa-3	0.240	0.120	0.500
C48B6.4	0.360	0.120	0.333
fbxa-25	0.480	0.120	0.250
R09H3.1	0.480	0.120	0.250
Y75D11A.1	0.480	0.120	0.250
ZC190.9	0.480	0.120	0.250
F56C4.1	0.560	0.120	0.214
srg-39	0.560	0.120	0.214
T01B10.5	0.560	0.120	0.214
C40H1.3	0.680	0.120	0.176
glb-16	0.920	0.120	0.130
T24F1.7	1.160	0.120	0.103
Y50D7A.3	1.480	0.120	0.081

fbxa-92	1.720	0.120	0.070
ilys-3	0.307	0.129	0.420
ZC581.9	0.435	0.130	0.300
Y43F8B.9	0.755	0.136	0.181
F48F5.2	0.136	0.136	1.000
F55A4.3	0.136	0.136	1.000
oac-23	0.136	0.136	1.000
sri-46	0.136	0.136	1.000
srz-97	0.136	0.136	1.000
str-121	0.136	0.136	1.000
T19H12.6	0.136	0.136	1.000
Y60A9.1	0.136	0.136	1.000
ZK105.6	0.136	0.136	1.000
ZK1086.3	0.136	0.136	1.000
C12D5.10	0.273	0.136	0.500
F58H1.2	0.273	0.136	0.500
Y116A8C.1	0.273	0.136	0.500
srx-58	0.409	0.136	0.333
Y17G7B.13	0.409	0.136	0.333
Y2H9A.6	0.409	0.136	0.333
C39B10.5	0.545	0.136	0.250
cwp-2	0.545	0.136	0.250
str-170	0.636	0.136	0.214
Y46E12BR.1	0.636	0.136	0.214
C17D12.3	0.773	0.136	0.176
F46G11.6	0.773	0.136	0.176
srd-28	0.773	0.136	0.176
Y47H9A.1	0.773	0.136	0.176
lgc-13	0.909	0.136	0.150
ins-15	1.182	0.136	0.115
M02B1.4	1.182	0.136	0.115
C30A5.4	1.318	0.136	0.103
R04A9.1	1.455	0.136	0.094
Y102A11A.2	0.550	0.140	0.254
sre-23	0.535	0.140	0.261
Y95B8A.12	0.903	0.146	0.162
B0205.4	0.158	0.158	1.000
B0546.5	0.158	0.158	1.000
F13B12.4	0.158	0.158	1.000
F32H2.11	0.158	0.158	1.000
F40E3.3	0.158	0.158	1.000
F49C5.10	0.158	0.158	1.000
F49E10.2	0.158	0.158	1.000
nhr-149	0.158	0.158	1.000
rmd-5	0.158	0.158	1.000

sri-42	0.158	0.158	1.000
srt-74	0.158	0.158	1.000
str-169	0.158	0.158	1.000
T06E4.5	0.158	0.158	1.000
T11G6.7	0.158	0.158	1.000
W02D9.9	0.158	0.158	1.000
Y17G7B.23	0.158	0.158	1.000
Y38E10A.9	0.158	0.158	1.000
ZK355.5	0.158	0.158	1.000
ZK596.3	0.158	0.158	1.000
F08H9.3	0.316	0.158	0.500
F55G11.6	0.316	0.158	0.500
igcm-2	0.316	0.158	0.500
srv-16	0.316	0.158	0.500
T05A8.8	0.316	0.158	0.500
C25F9.8	0.474	0.158	0.333
F26D11.13	0.474	0.158	0.333
F53A9.5	0.474	0.158	0.333
hlh-4	0.474	0.158	0.333
ptd-2	0.474	0.158	0.333
T20D4.11	0.474	0.158	0.333
Y57G11B.1	0.474	0.158	0.333
ZK112.3	0.632	0.158	0.250
B0310.3	0.737	0.158	0.214
C06E4.8	0.737	0.158	0.214
F10G2.2	0.737	0.158	0.214
F25E5.2	0.737	0.158	0.214
B0334.13	0.895	0.158	0.176
C05B5.5	0.895	0.158	0.176
C55C3.1	0.895	0.158	0.176
6R55.2	1.053	0.158	0.150
R09H10.1	1.053	0.158	0.150
T27A1.3	1.053	0.158	0.150
srh-76	1.211	0.158	0.130
clec-43	1.368	0.158	0.115
lgx-1	1.368	0.158	0.115
stdh-2	1.526	0.158	0.103
Y38H6C.13	1.789	0.158	0.088
F57C12.2	1.947	0.158	0.081
clec-47	2.105	0.158	0.075
oac-34	0.243	0.162	0.667
K04C2.5	0.703	0.162	0.231
F48F5.6	1.000	0.162	0.162
H09I01.1	0.351	0.162	0.462
fbxa-30	0.352	0.171	0.486

Y34D9A.2	0.558	0.173	0.310
T22A3.6	0.588	0.176	0.300
abu-11	1.088	0.176	0.162
B0336.12	0.187	0.187	1.000
C10G11.10	0.187	0.187	1.000
C31E10.4	0.187	0.187	1.000
C50F7.3	0.187	0.187	1.000
CD4.11	0.187	0.187	1.000
cnc-5	0.187	0.187	1.000
col-56	0.187	0.187	1.000
F31F4.11	0.187	0.187	1.000
F56C3.1	0.187	0.187	1.000
grh-1	0.187	0.187	1.000
H31G24.1	0.187	0.187	1.000
ins-32	0.187	0.187	1.000
lgc-51	0.187	0.187	1.000
M6.4	0.187	0.187	1.000
nspb-12	0.187	0.187	1.000
R06B9.2	0.187	0.187	1.000
srg-66	0.187	0.187	1.000
srh-16	0.187	0.187	1.000
T03E6.2	0.187	0.187	1.000
T21E12.3	0.187	0.187	1.000
T24D8.6	0.187	0.187	1.000
unc-4	0.187	0.187	1.000
Y35H6.3	0.187	0.187	1.000
Y37A1B.7	0.187	0.187	1.000
Y48D7A.1	0.187	0.187	1.000
Y53F4B.27	0.187	0.187	1.000
Y69E1A.3	0.187	0.187	1.000
ZC15.3	0.187	0.187	1.000
ZK1025.2	0.187	0.187	1.000
ZK1025.8	0.187	0.187	1.000
Y102A11A.5	0.312	0.187	0.600
F14D2.17	0.375	0.187	0.500
F21C3.7	0.375	0.187	0.500
tsp-3	0.375	0.187	0.500
ZC13.10	0.375	0.187	0.500
B0393.4	0.562	0.187	0.333
C02E7.10	0.562	0.187	0.333
cyp-34A1	0.562	0.187	0.333
E04F6.10	0.562	0.187	0.333
nhr-119	0.562	0.187	0.333
T10G3.4	0.562	0.187	0.333
T22D1.12	0.562	0.187	0.333

Y111B2A.27	0.562	0.187	0.333
Y48G10A.6	0.562	0.187	0.333
F20D12.7	0.750	0.187	0.250
F22B3.8	0.750	0.187	0.250
F59B10.2	0.750	0.187	0.250
glb-7	0.750	0.187	0.250
mab-10	0.750	0.187	0.250
snt-3	0.750	0.187	0.250
str-4	0.750	0.187	0.250
B0024.15	0.875	0.187	0.214
F17B5.1	0.875	0.187	0.214
Y46D2A.3	0.875	0.187	0.214
Y55B1BR.1	0.875	0.187	0.214
F11C1.4	1.062	0.187	0.176
F54G8.1	1.062	0.187	0.176
thn-6	1.062	0.187	0.176
Y43D4A.6	1.062	0.187	0.176
C55C3.7	1.250	0.187	0.150
fbxa-190	1.250	0.187	0.150
inx-6	1.250	0.187	0.150
nhr-207	1.250	0.187	0.150
srh-35	1.250	0.187	0.150
str-44	1.250	0.187	0.150
C17B7.4	1.437	0.187	0.130
F07H5.8	1.813	0.187	0.103
pnc-2	1.813	0.187	0.103
fbxb-103	2.000	0.187	0.094
F09E10.6	2.125	0.187	0.088
cyp-13A7	2.312	0.187	0.081
F32D8.15	3.687	0.187	0.051
C10G8.3	0.452	0.194	0.429
srt-1	0.548	0.194	0.353
srt-2	0.548	0.194	0.353
F14D7.14	0.645	0.194	0.300
T13F2.12	0.645	0.194	0.300
osm-12	0.935	0.194	0.207
F45D11.5	1.581	0.194	0.122
nhr-7	2.677	0.194	0.072
grl-18	0.435	0.196	0.450
dod-20	0.696	0.196	0.281
spp-9	0.386	0.196	0.509

(나) 장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원의 데이터 베이스 구축

- 본 연구결과에 나온 유전자원은 일반 연구자들도 쉽게 확인할 수 있도록 NCBI소속 하의 GEO website에 deposit을 준비중에 있음. 향후 다른 whole transcripome analysis결과도 함께 series로 link하여 다양한 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 그리고 신바이오틱스 혼합처리에 의한 세균/숙주(C. elegans 및 animal model)의 발현변화 패턴으로 대규모 데이터베이스 구축을 연구기간 내에 완료할 예정임.

3-3. 장기능개선 및 면역증진을 위한 신바이오틱스 혼합소재 개발

[제2협동 : 고려대학교]

가. 인체 유래의 고기능성 프로바이오틱스 균주 분리

(1) 실험 내용

- 산후조리원 2곳에서 15명의 지원자를 대상으로 태어난지 7일 이내의 초유를 섭취한 영유아의 분변을 각각 수거하여 시료로 사용함. 수거한 분변 시료는 4°C에서 신속하게 실험실로 이동시킨 후 바로 분리실험을 실시함.
- *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*을 중심으로 우점 프로바이오틱스를 분리함.
- 영유아 분변 및 전통발효식품군에서 채취한 시료를 잘 혼합한 후 2.5~5.0 g을 10배 부피의 pH 7.0 완충용액에 넣어 잘 혼합한 후 희석용 완충용액으로 희석하여 분리용 샘플을 준비함. *Lactobacillus*: BCP-MRS 배지 (MRS containing 0.05% L-cystein and 0.005% BCP) 이용하였으며, *Bifidobacterium*: MRS-NNLP 배지(Table. 39)를 이용함.

Table 39. 프로바이오틱스 순수분리를 위한 선택배지와 배양조건

미생물군	선택배지	배양조건
<i>Bifidobacterium</i> spp.	MRS-NNLP * agar	Anaerobic, 48 h, 37°C
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS-pH 5.0 agar	Anaerobic, 48 h, 37°C

* NNLP: 0.05% L-cystein, 150 mg/L nalidixic acid, 100 mg/L neomycin sulfate, 3.0 g/L lithium chloride, 200 mg/L paromomycin sulfate

(2) 실험 결과

- 이를 통하여 1,200개 균주를 분리함.

나. 장 건강과 관련된 기능성 검증

(1) 실험 내용

(가) 내산성의 확인

- 분리된 프로바이오틱스 균주의 위장에서의 생존능력을 평가하기 위해 아래와 같은 실험방법을 통해 이를 검증함 (Fig. 63).
- MRS에 pH 2.5가 되도록 HCl을 첨가하여 121°C에서 15분간 autoclave하여 산성

MRS배지를 제조함. 배지를 충분히 식힌 후, 여기에 pepsin을 섞어주어 농도가 1000unit/L가 되도록 함. 여기에 분리한 균주를 1% (W/v) 접종함. 이 접종액을 펩톤수에 희석하여 MRS agar plate 배지에 도말한 후, 48시간동안 배양함. 접종액을 37`C에서 3시간동안 배양, 펩톤수에 희석하여 MRS agar plate 배지에 도말한 후, 37`C에서 48시간동안 배양함. 처음 접종액을 도말한 배지와 배양액을 도말한 배지에 나타난 콜로니의 수를 세어 각각의 CFU를 측정하여 전과 후의 CFU변화를 측정함.

- 실험에 사용된 1,200개 균주 중 원래 균수보다 증가하거나 CFU 0.5log 미만의 감소를 보이는 균주 67종을 선발하여 이후의 기능성 검증에 사용함.

(나) 내담성의 확인

- 분리된 프로바이오틱스 균주의 담즙에서의 생존능력을 평가하기 위하여 아래와 같은 실험방법을 통해 이를 검증함 (Fig. 64).
- MRS에 oxgall을 0.3%가 되도록 첨가한 후 121`C에서 15분간 autoclave하여 담즙성 MRS배지를 제조함. 여기에 분리한 균주를 1%(W/v) 접종함. 이 접종액을 펩톤수에 희석한 후, MRS agar plate 배지에 도말하여 48시간동안 배양함. 1% 접종액을 24시간 동안 37`C에서 배양한 후 펩톤수에 희석, MRS agar plate배지에 도말하여 48시간동안 배양함. 접종액과 배양액의 콜로니 수를 세어 CFU를 측정하여 전과 후의 변화를 측정함.
- 내산성 실험을 거친 67개 균주를 대상으로 실험을 진행하였으며, 원래 균수보다 증가하거나 5 log 미만의 감소를 보이는 균주를 선발함. 실험에 사용된 67개 균주는 모두 내담성을 나타냄.

(다) Bactreriocin 항균능의 측정

- 분리한 프로바이오틱스 균주의 항균능을 측정하기 위하여 아래와 같은 실험방법을 통하여 이를 검증함.
- 프로바이오틱스 항균능에 민감한 *L. delbruekii sup. lactis* ATCC 4797을 지시균으로 1%접종한 MRS agar를 MRS agar plate배지위에 부어 double layered 배지를 만듦. 여기에 positive control로는 pH7로 조정된 *Lactobacillus gasserii* SF균의 상등액을 사용하여 분리된 프로바이오틱스 균주의 live cell 현탁액과 pH7로 조정된 상등액을 하나의 plate안에 4개의 점을 찍어 각각의 점에 점 접종함. 48시간동안 배양한 후 plate안의 *L. delbruekii sup. lactis* ATCC 4797이 억제된 원이 있는지 확인함.
- 내산성 실험을 거친 67개 균주를 실험에 사용하였으며 모든 균주의 live cell 현탁액과 상등액 모두 박테리오신 항균능에 음성을 나타냄.

(라) 장 부착능의 측정

- 분리한 프로바이오틱스 균주가 장세포에 부착되는 정도를 측정하기 위하여 아래와 같은 실험방법을 통하여 이를 검증함.
- HT 29 세포는 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640(Thermo, USA)배지를 이용하여 5% CO₂존재 하에 37°C에서 배양시켰다. 세포수는 well당 1.0*10⁵ cell/ml의 수가 되도록 12well에 분주하였고 격일로 배지를 교환하며 완전하게 monolayer를 형성할 때까지 배양하여 실험에 사용함. 유산균이 부착능력을 확인하기 위하여 완전monolayer를 형성한 HT-29세포는 25°C의 PBS buffer를 이용하여 6회 세척하고 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 1640배지에 현탁한 후 0.5ml을 첨가함. 선발된 균주를 1*10⁹ CFU/ml의 농도가 되도록 RPMI에 현탁한 다음 0.5ml을 monolayer를 형성한 HT-29 위에 접종하고 5% CO₂존재 하에 37°C에서 2시간 배양함. 배양이 완료된 후 부착되지 않은 유산균이 제거와 세척에 따른 부착능력을 확인하기 위해 3분씩 200rpm의 속도로 교반하면서 PBS buffer를 사용하여 6회 세척을 실시함. 세척이 완료된 후 0.2% Trypsin-EDTA를 분주하여 부착된 세포를 떼어내고 peptone수를 사용하여 연속희석법으로 MRS agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간동안 배양하여 균수를 측정함. 양성 대조군으로는 *Lactobacillus rhamnosus GG*를 사용하여 이와 비슷하거나 높은 장 부착능을 나타내는 균주를 선발함.
- 내산성 실험을 거친 67개 균주에 대하여 장 부착능 실험을 진행하였으며 positive control로 사용된 *Lactobacillus rhamnosus GG*균과 비슷하거나 그 이상의 부착능을 보이는 32개 균주를 선발함.

(마) 콜레스테롤 저해능의 측정

- 분리한 프로바이오틱스 균주의 콜레스테롤 저해능을 측정하기 위하여 아래와 같은 실험방법을 통하여 이를 검증함.
- MRS에 0.2% taurocholic acid와 0.2% thioglycolate를 첨가하여 121°C에서 15분간 autoclave하여 MRS-THIO배지를 제조함. 여기에 cholesterol micelle (cholesterol 1mg/ml in 0.4 mM sucrose solution)을 1% 접종하여 cholesterol의 농도가 100ug/ml이 되도록 함. 여기에 선별된 균주를 1%(W/v)접종한 이후, 37°C에서 18시간 배양한 후, 배양 상등액에서 cholesterol을 정량하여 감소한 cholesterol의 양을 확인하였으며, 이때 cholesterol의 저해능이 나타나지 않은 대조군으로는 균을 접종하지 않은 MRS-THIO배지를 사용함. 배양 이후 11,000rpm에서 15분간 원심분리하여

얻은 상등액 2ml에 95~97% ethanol 3ml과 50% KOH 2ml을 첨가하여 60`C water bath에서 10분간 처리함. 상온에서 냉각한 후, hexane 5ml을 첨가하여 콜레스테롤을 추출하고, hexane층을 분리하여 60`C 온도에서 hexane을 기화시켜 제거함. hexane을 제거한 튜브에 *o*-phtalaldehyde (0.55mg/1ml acetic acid) 4ml을 첨가한 후, 황산 2ml을 첨가하여 발색시킨 다음, spetrophotometer를 이용하여 파장 550nm에서 흡광도 값을 측정함. 측정한 값과 미리 준비한 cholesterol stantard curve를 이용하여 cholesterol의 양을 정량함.

- 콜레스테롤 저해능은 % reduction rate로 계산하였으며 계산식은 아래와 같음.

$$\%cholesterol\ reduction\ rate = \left(\frac{control\ cholesterol - sample\ cholesterol(ug)}{control\ cholesterol(ug)} \right) \times 100$$

- 장부착능 실험에서 선별된 32개 균주에 대해서 콜레스테롤 저해능 실험을 실시함. 실험에 사용된 32개 균주 모두 최소한의 저해능을 나타냄. 이중 효과가 뛰어난 19개 균주를 최종적으로 선발함. (43121의 경우, 콜레스테롤 저해효과가 있는 프로바이오틱스 균주 (*Lactobacillus acidophilus*)로서 양성 대조균으로 사용된 균주임)

(2) 실험 결과

- 분리된 프로바이오틱스 균주의 위장에서의 생존능력은 Figure1과 같음.

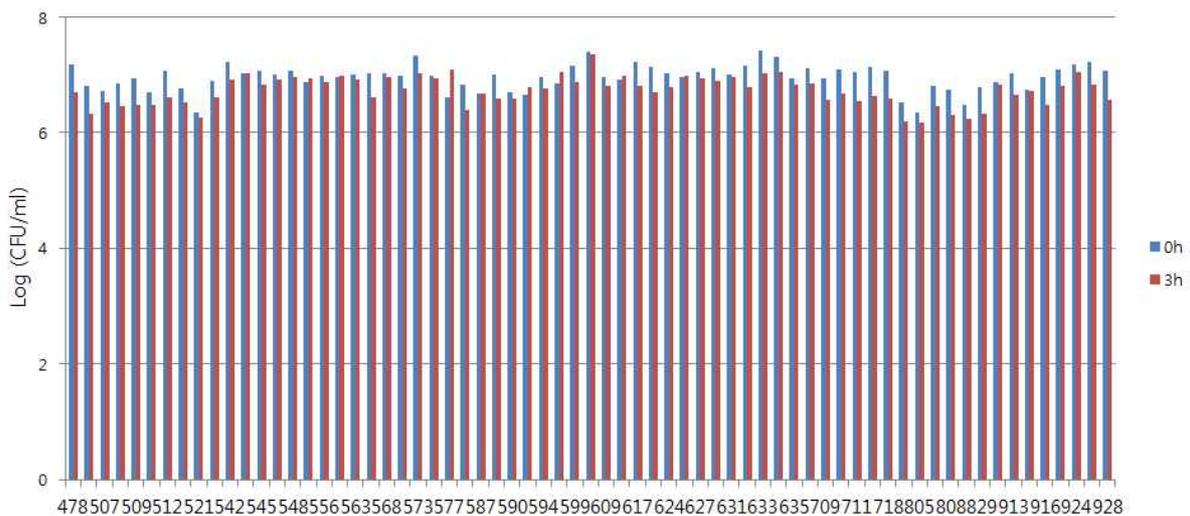


Fig. 63. 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 내산성

- 분리된 프로바이오틱스 균주의 담즙에서의 생존능력은 Figure2와 같음.

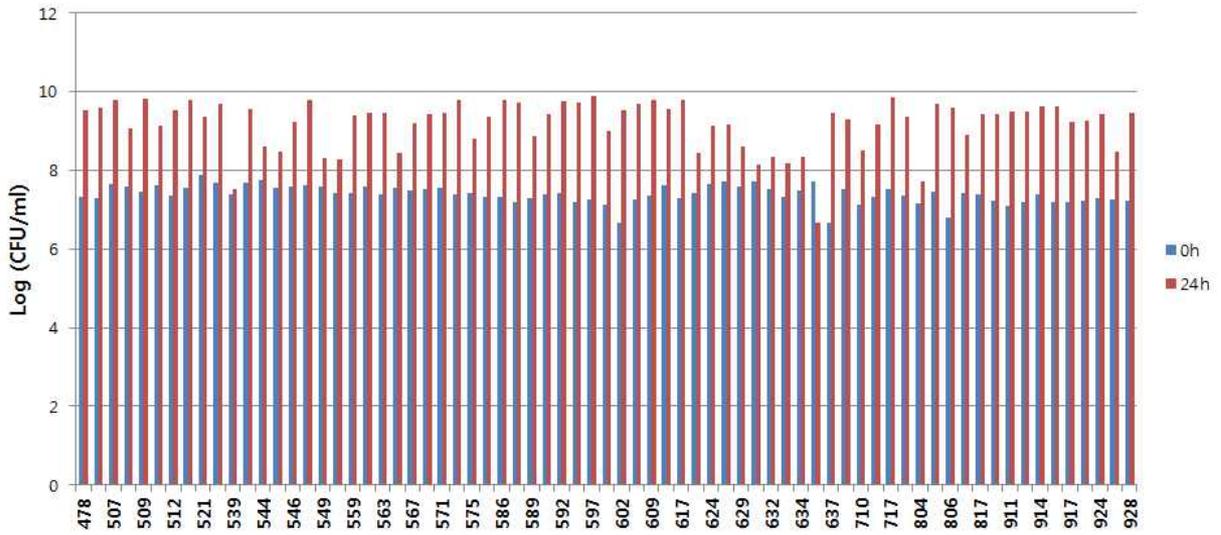


Fig. 64. 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 내담성

Table 40. 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 항균능력

478	-	548	-	590	-	631	-	808	-
501	-	549	-	592	-	632	-	817	-
507	-	556	-	594	-	633	-	829	-
508	-	559	-	597	-	634	-	911	-
509	-	563	-	599	-	635	-	913	-
510	-	564	-	603	-	637	-	914	-
512	-	568	-	609	-	709	-	916	-
517	-	571	-	615	-	710	-	917	-
521	-	573	-	617	-	711	-	924	-
524	-	575	-	623	-	717	-	927	-
542	-	577	-	624	-	718	-	928	-
544	-	586	-	626	-	804	-		
545	-	587	-	627	-	805	-		
546	-	589	-	629	-	806	-		

- 프로바이오틱스 균주가 장세포에 부착되는 정도는 Fig. 65와 같음.

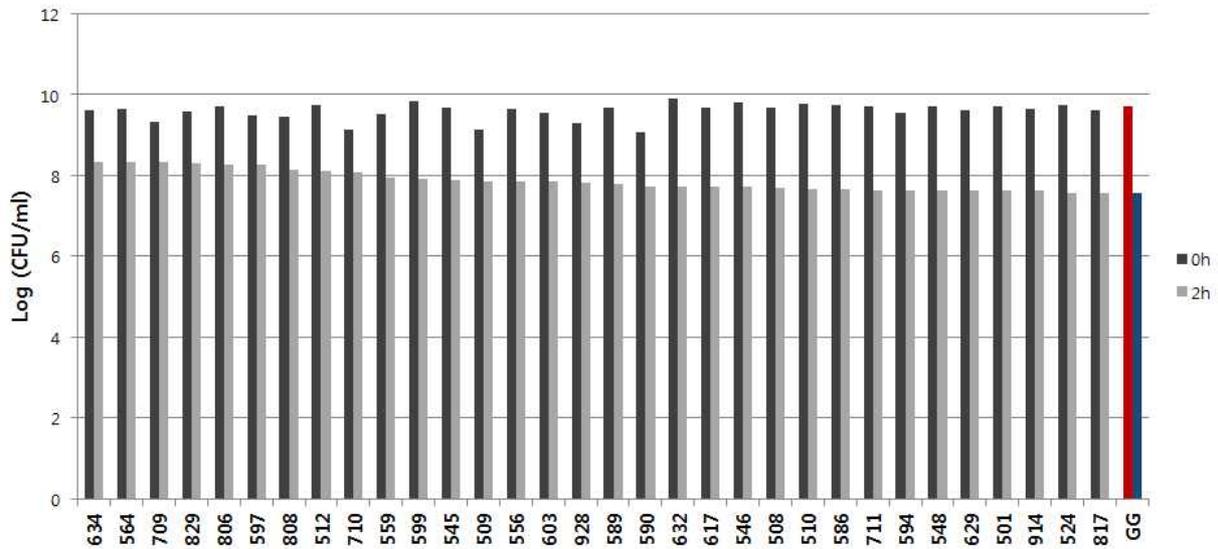


Fig. 65. 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 장 부착능

- 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 콜레스테롤 저해능은 Fig. 66과 같음.

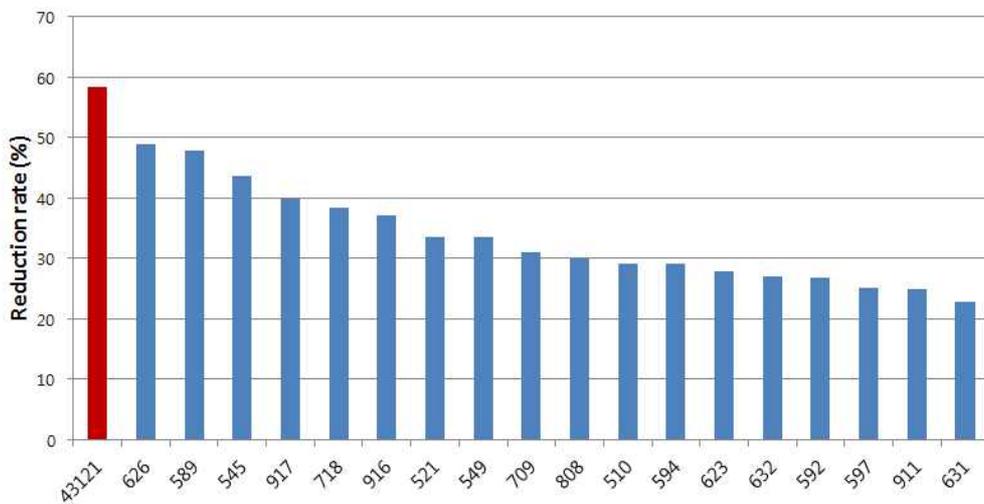


Fig. 66. 영유아 분변에서 분리한 유산균주의 콜레스테롤 저해능

- 위 실험을 기준으로 선발된 균주 19종을 대상으로 16r rDNA를 분리하여 16s rDNA의 상동성을 분석하여 선발된 균주를 동정하였으며 결과는 Table 41과 같음.

Table 41. 최종 선발된 기능성 프로바이오틱스 균주의 동정

strain	sequence result (Genus, species)	Homology(%)
505	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
508	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	89%
517	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
524	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
542	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
545	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	91%
559	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	81%
568	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
575	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
589	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	81%
599	<i>Lactobacillus criptatus</i> ST1	88%
603	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	84%
615	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
805	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
817	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
829	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
914	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%
917	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
928	<i>Lactobacillus gaserri</i>	99%

다. 신바이오틱스 소재개발을 위한 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 소재의 선발

(1) 실험 내용

(가) 프리바이오틱스 이용능 평가

- 1차년도 과제로 영유아 분변에서 분리하여 프로바이오틱스 스크리닝을 통해 선발된 프로바이오틱스를 대상으로 제2협동 기관에서 선발된 신규 프리바이오틱스 소재와의 신바이오틱스 활성을 측정하기 위해 프로바이오틱스 선발용 Minimal media (Table 42)를 제조한 다음 프리바이오틱스 소재를 2.0%로 첨가하여 고체배지(agar)를 제조하고 균주를 점적종(spot inoculation)한 다음 37℃에서 24시간 배양 후 bromocresol purple에 의한 색변화(보라색 → 노란색)를 관찰하여 1차적으로 프로바이오틱스 이용능을 평가함.

Table 42. 프리바이오틱스 선발을 위한 최소배지 조성

Ingredients	Amount
Prebiotics	20g
Peptone	10g
Yeast extract	5g
Tween 80	1g
Diammonium citrate	2g
Sodium acetate 3H ₂ O	5g
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.1g
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05g
Dipotassium phosphate	2g
Bromocresol purple	0.17g
Distilled Water to make	1000ml

(나) 프리바이오틱스 소재 선발 및 최적 첨가비율 설정

- 1차년도에 선발된 프로바이오틱스의 프리바이오틱스의 농도에 따른 성장능력을 평가하기 위하여 다음 방법을 통해 검증함.
- 최소배지 (Table 43)에 0.1%, 0.2%, 0.5% 농도로 선발된 프리바이오틱스를 첨가한 후 121℃에서 15분간 autoclave하여 프리바이오틱스 이용능 평가 배지를 제조함. 배지를 충분히 식힌 후, 선발된 균주를 1%(W/V) 접종. 이 접종액을 37℃에서 12시간동안 배양. 배양 시작 이후 매 2시간마다 배양액을 펌프수에 희석하여 MRS agar plate 배지에 도말하여 37℃에서 48시간동안 배양. 매 시간마다 접종액을 도말한 배지의 콜로니의 수를 세어 각각의 CFU를 측정하여 12시간동안의 CFU변화를 측정함.

Table 43. 균주 선발을 위한 최소배지 구성

Ingredients	Amount
Prebiotics	0.5, 0.2, 0.1g
Peptone	10g
Tween 80	1g
Diammonium citrate	2g
Sodium acetate 3H ₂ O	5g
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.1g
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05g
Dipotassium phosphate	2g
Distilled Water to make	1000ml

(다) 최적 신바이오틱스 혼합소재 최적화

- 프리바이오틱스의 최적복합비율을 설정하기 위하여 혼합물 실험 설계 및 분석(design and nalysis of experiments with mixtures) 기법들을 사용함. 혼합물 실험법은 반응

표면방법론(response surface methodology, RSM)에 속하는 방법으로 실험에서의 요인들인 여러 구성성분들의 수준 값들, 즉 비율들의 합이 '1' 이어야 하는 제약조건 하에서 실험을 설계하고 분석하여 혼합물의 최적 구성비율을 찾아내는 방법임.

- 선발 프로바이오틱스에 대하여 최대의 성장효과를 나타낼 수 있도록 2종의 프리바이오틱스 성분(x1 :프리바이오틱스 1, x2 : 프리바이오틱스 2)으로 이루어진 프리바이오틱스 혼합물의 최적 구성성분 비율을 찾기 위한 혼합물 실험설계를 실시함. 실험계획은 Simplex Lattice Design (degree 3)를 사용하여 Full Cubic Model에 적용시킴.
- 최적화 실험은 모두 11개의 시행으로 이루어져 있으며 실험설계는 single blend point 2개 (각 1반복), double blend point 9개(각 1반복)로 이루어져 있음(실험설계는 통계 software인 Minitab(2000)의 Stat > DOE > Mixture > Create Mixture Design 기능을 이용하여 구축함). 반응변수 Y는 24시간 배양후의 생균수를 접종시의 생균수로 보정한 순수한 성장 증가분의 log 값으로 함.

(2) 실험 결과

(가) 프리바이오틱스 이용능 평가

- 영유아 분변에서 분리한 프로바이오틱스 능력을 갖춘 선발 균주 19종의 프리바이오틱스 소재 이용능을 평가한 결과, 감잎 추출물을 제외한 3가지 프리바이오틱스 소재의 높은 이용능이 확인됨 (Table 44).
- 꾸지뽕잎, 연잎 추출물을 첨가한 최소배지에서 선발균주의 성장능력을 측정함.

Table 44. 선발된 유산균주의 프리바이오틱스 이용능력

	꾸지뽕잎	뽕잎	감잎	연잎
505	o	o	x	o
508	o	o	x	o
517	o	o	x	o
524	o	o	x	o
542	o	o	x	o
545	o	o	x	o
559	o	o	x	o
568	o	o	x	o
575	o	o	x	o
589	o	o	x	o
599	o	o	x	o
603	o	o	x	o
615	o	o	x	o
806	o	o	x	o
817	o	o	x	o
829	o	o	x	o

914	o	o	x	o
917	o	o	x	o
928	o	o	x	o

(나) 프리바이오틱스 소재 2차 선발 및 최적 첨가비율 설정

- 초기 생균수와 비교하였을 때, 연잎 추출물의 함량이 증가할수록 높은 성장률을 보임 (Fig 67).

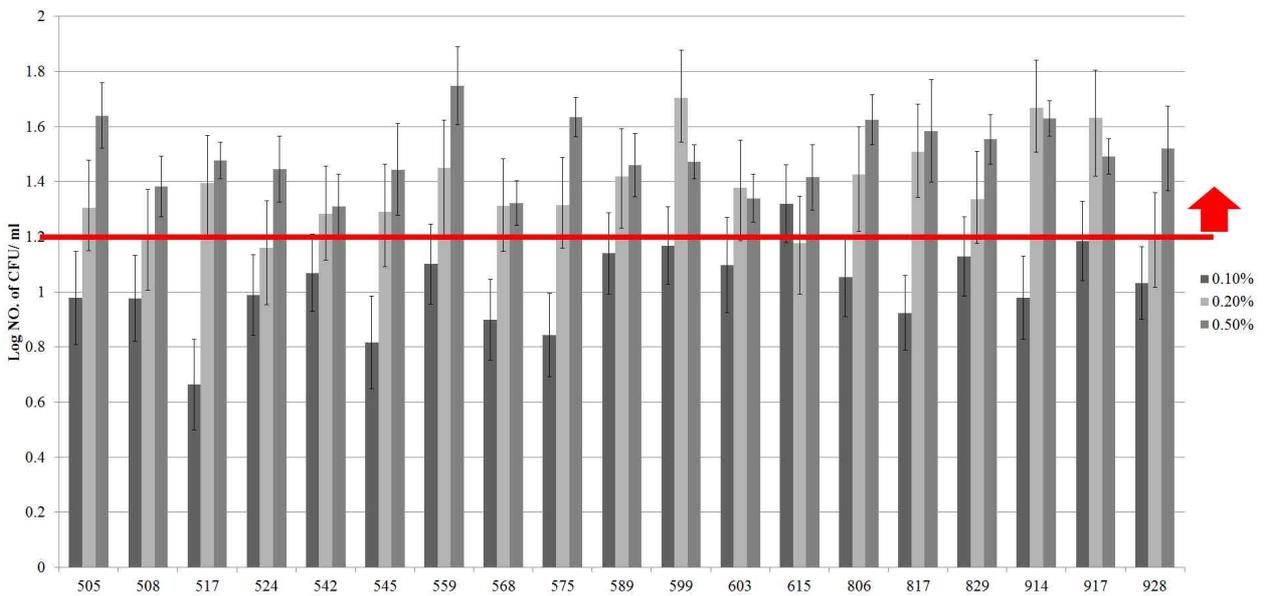


Fig. 67 연잎추출물을 첨가한 최소배지에서의 유산균주의 최대성장량

- 연잎추출물 0.1% 첨가 배지에서는 초기 균수에 비해 0.65-1.35 logCFU/mL 정도 균수가 증가함.
- 연잎 추출물을 0.2% 이상 첨가한 결과, 모든 균주에서 1.0 logCFU/mL 이상의 균주 성장률을 보였으며, 성장률에 따라 고성장 균주를 선발하였음 (Table 45).

Table. 45. 연잎 추출물 배지에서의 균수 성장률에 따른 고성장 유산균주 분류

	0.20%	0.50%
High	559,914,917	559,505,575,914,806
Medium	817,559,806,589,517,603, 829,575,568,505,545,000	817,829,928,917,517,599,589
Low	508,928,615,524	524,545,615,508,603,000,000

- 초기 균수와 비교한 결과, 균주에 따라 최적 프리바이오틱스 첨가 농도가 달랐음 (Fig. 68).

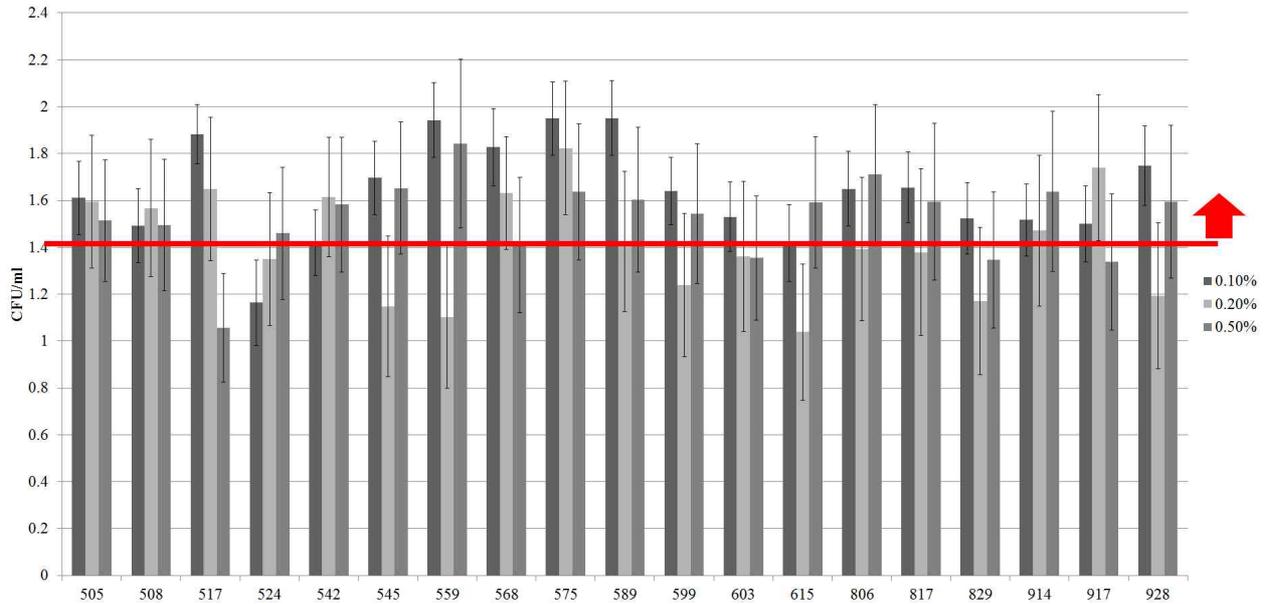


Fig. 68. 꾸지뽕잎 추출물 0.1%첨가 최소배지에서의 유산균주의 성장변화곡선

- 1.0 logCFU/ml 이상의 유의적인 성장을 보이는 균주의 성장률에 따라 고성장 균주를 선발한 결과는 Table 46 에 나타내었음.

Table 46. 꾸지뽕잎 추출물 첨가 배지에서의 균주 성장률에 따른 고성장 유산균주 분류

	0.10%	0.20%	0.50%
High	589,575,559,517,568, 928,545,817,806,599, 505	575,917,517,568,542	559,806,545,914,575, 000
Medium	603,829,914,917,508, 542,615	505,508,914,589,806, 817,603,524,599	817,928,615,542,599, 505,508,524,568,603,8 29,000
Low	524	928,829,545,559,615	517

- 연잎 추출물과 꾸지뽕잎 추출물 첨가 최소배지에서 높은 수준의 성장률을 보이는 505, 517, 545, 559, 575, 806, 817 균주 7종을 최종 선발 균주로 하였으며, 향후 신바이오틱스 복합제제 제조를 위한 발효균주로 사용하였음.

라. 신바이오틱스 혼합소재의 장내 딜리버리 향상기술 개발

(1) 실험 내용

(가) 하이브리드 분체 복합화 설정

- 신규 프리바이오틱스 소재로 선정된 꾸지뽕잎 추출물과 신규 프로바이오틱 유산균주인 *Lactobacillus gassri* 505 균주를 이용하여 발효한 신바이오틱스 소재 혼합분말을 사용하여 하이브리드 분체 복합화 실험을 수행하였음.
- 신바이오틱스 소재 혼합분말을 캡슐화하기 위하여 core 물질로서 코코넛 오일을 사용하였으며, shell을 둘러싸는 물질로서 Alginate, whey protein concentrate (WPI)를 사용하여 캡슐화를 진행하였음. 세부 실험 조건은 아래 표와 (Table 47) 같음.

Table 47. 신바이오틱스 혼합분말 캡슐화 조건

제조 공정	
Core	1. 59% (유산균주 + distilled water) + 40% 코코넛 오일 + 1% PGPR (유화제) 혼합 후 교반기를 통해 60℃, 1500 rpm 에서 30 min 예비 교반 2. 호모믹서를 통해 약 8000 rpm에서 1 min 교반
Alginate	1. 2% alginate + distilled water 혼합 2. 4℃에서 overnight 후 사용
Shell	1. 11% WPI + distilled water 혼합 후 4℃에서 overnight 2. pH 7로 조정 후 78℃ water bath에서 45 min 겔화 반응 3. 4℃에서 overnight 후 사용

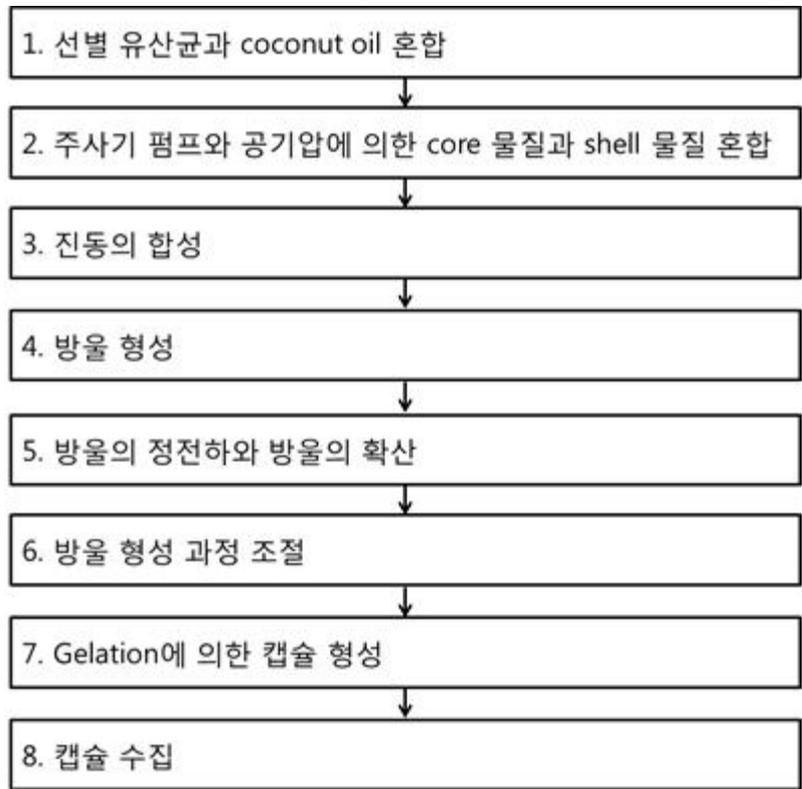
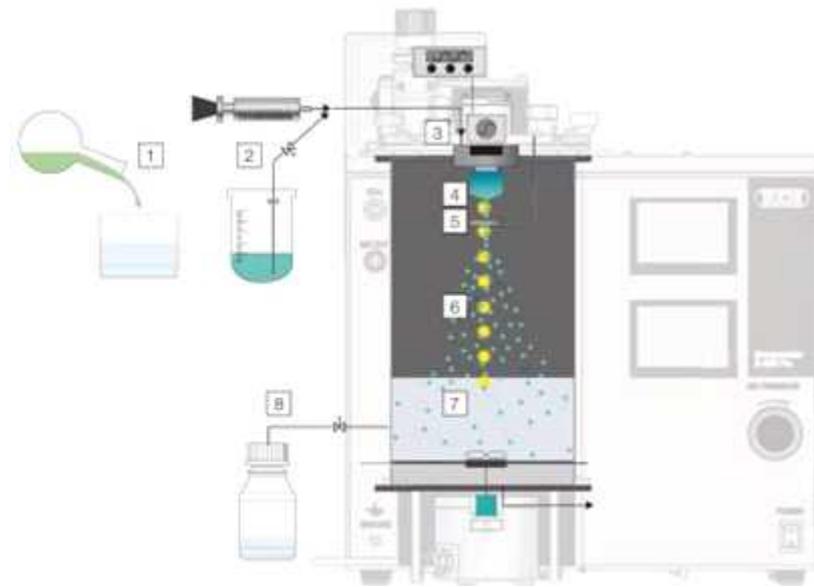


Fig. 69. 신바이오틱스 혼합분말 캡슐화 과정

① Encapsulator 기기 조건

② Encapsulator 기기 조건

- 신바이오틱스 소재 혼합분말을 캡슐화하기 위한 encapsulator 기기의 세부 조건은 아래 표와 같음 (Table 48)

Table 48. Encapsulator 기기 조건

Encapsulator	
Frequency	800 Hz
Electrode	1500 V
Core size	0.2 mm
Shell size	0.4 mm
Pressure	300~400 mbar
Syringe	5 mL/min

Ⓢ Buffer 용매

- Alginate: 0.1M CaCl₂

- WPI, MRP: pH4.6 0.5M Na-acetate

(나) 장내 딜리버리 모델시스템 개발

- 하이브리드 분체 복합화를 통해 제조된 신바이오틱스 소재 캡슐의 장내 산성 조건에서의 내산성 및 안정성을 측정하기 위해 인체 장내 딜리버리 모델시스템을 적용하여 확인하고자 하였음. 기존의 프로바이오틱스로 이용 가능한 균주를 선별하는 내산성, 내담즙성 시험이 인체의 환경을 완전히 반영하지 못하므로 이를 보완하기 위하여 인체의 내장과 유사한 모델을 개발하여 본 연구과제를 통해 개발된 신바이오틱스 소재 캡슐의 생체이용율을 확인하고자 하였음.
- 인체 내에서 생존 가능한 신바이오틱스 소재 캡슐의 안정성을 파악하기 위해 인체의 내장과 유사한 인체장모델 시스템을 설계하기 위하여 Simulated salivary fluid (SSF), simulated gastric fluid (SGF), 및 simulated intestinal fluid (SIF)는 아래 표와 같이 제조하였으며 (Table 49), 위장과 소장의 기능을 시험할 수 있는 2단 모델 (two stage model)로 설계하였음 (Fig. 70).

Table 49. 인체 장모델 시스템 제조를 위한 용액 제조 조건

	Stock. conc	SSF (mL)	SGF (mL)	SIF (mL)
KCl	3.73g / 100mL	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	6.8g / 100mL	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	8.4g / 100mL	6.8	12.5	42.5
NaCl	11.7g / 100mL	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	3.05g / 100mL	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	4.8g / 100mL	0.06	0.5	-

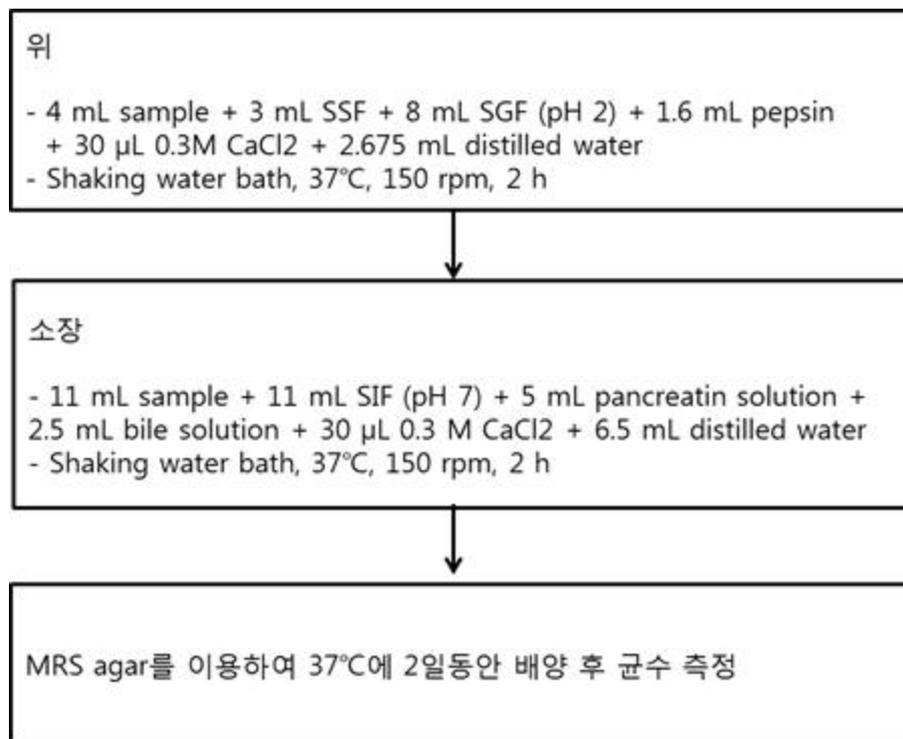


Fig. 70. *in vitro* digestion model

(2) 실험 결과

- 캡슐화한 신바이오틱스 혼합 소재와 *L. rhamnosus* GG의 인체 장내 모델시스템에서의 균수는 아래의 그림과 같음 (Fig. 71). 캡슐화 된 GG의 초기 균수는 control, alginate 및 WPI, 에서 각각 8.85, 8.63 및 8.72 Log CFU/mL 이었음. 소화 기관 중 가상의 위에서 소화 과정을 마친 후, 캡슐화 되지 않은 control의 경우 6.58 Log CFU/mL 이었다. 반면 캡슐화 된 GG의 균수는 alginate 및 WPI에서 각각 7.60 및 7.65 Log CFU/mL 이었음. Control에 비해 실험군에서 약 1 Log CFU/mL이 높은 것을 확인 할 수 있었음. 소화 기관 중 가상의 소장에서 소화 과정을 마친 후 GG의 균수는 캡슐화 되지 않은 control의 경우 5.30 Log CFU/mL 이었음. 반면 캡슐화 된 GG의 균수는 alginate, WPI에서 각각 6.40, 6.47 Log CFU/mL 이었음. Control에 비해 실험군에서 약 1 Log CFU/mL 이상 높은 것을 확인 할 수 있었음. 가상의 소화 과정을 마친 GG 유산균은 캡슐화 된 GG가 캡슐화 되지 않은 GG에 비해서 실험군 모두에서 약 1 Log CFU/mL이 높은 것을 확인 할 수 있었음.
- 캡슐화된 신바이오틱스 혼합소재의 초기 균수는 control, alginate, WPI에서 8.31, 8.17, 8.04 Log CFU/mL 이었음. 소화 기관 중 가상의 위에서 소화 과정을 마친 후, 캡슐화 되지 않은 control의 경우 6.43 Log CFU/mL 이었음. 반면 캡슐화 된 5R06의 균수는 alginate, WPI에서 각각 7.03, 7.39 Log CFU/mL 이었음.

- 소화 기관 중 가상의 소장에서 소화 과정을 마친 후 5R06의 균수는 캡슐화 되지 않은 control의 경우 5.22 Log CFU/mL 이었음. 반면 캡슐화 된 5R06의 균수는 alginate, WPI에서 각각 6.69, 6.61 Log CFU/mL 이었음. Control에 비해 실험군에서 약 1 Log CFU/mL 이상 높은 것을 확인 할 수 있었음. 가상의 소화과정을 마친 5R06 유산균은 캡슐화 된 신바이오틱스 혼합소재가 캡슐화 되지 않은 신바이오틱스 혼합소재에 비해서 실험군 모두에서 약 1 Log CFU/mL이 높은 것을 확인 할 수 있었음 . 따라서 캡슐화가 소화 과정 중 유산균을 보호 할 수 있음을 확인하였음.
- 신규 프리바이오틱스 소재인 꾸지뽕잎 추출물과 프로바이오틱스 *L. gasseri* 505 유산균주의 혼합 신바이오틱스 소재를 인체의 장관과 유사한 인체 장 모델 시스템을 이용하여 안정성을 테스트한 결과 control 그룹에 비해 캡슐화를 진행하였을 때 생존율이 향상 되었음을 확인하였음.

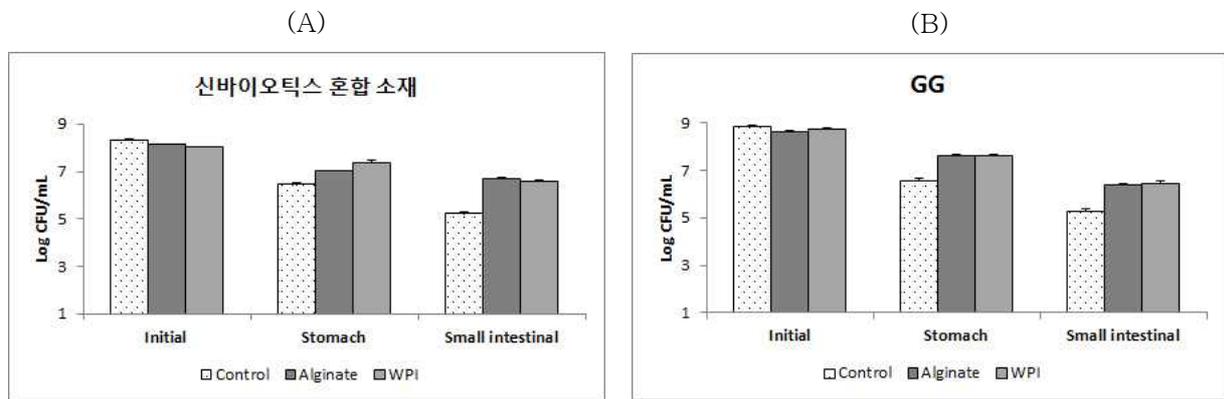


Fig. 71. 인체 장내 모델시스템에서의 캡슐화한 신바이오틱스 혼합소재의 안정성 평가 결과

3-4. 전통발효식품 유래의 토종 프로바이오틱스 균주 및 효소 자원화 기술개발

[제3협동 : 발효미생물산업진흥원]

가. 전통발효식품 및 인간 장내로부터 cinnamoyl esterase (CE) 활성 보유 유산균 분리

(1) 전통발효식품 유래 토종 프로바이오틱스 균주 순수 분리

- 전통발효식품 젓갈 23종 (꼴뚜기젓 5개, 창란젓 5개, 낙지젓 6개, 가라비젓 6개, 굴젓 1개), 장아찌 6종 (고추 2개, 깻잎 2개, 마늘 2개)은 전라북도 소재 시장 및 지역 마켓에서 판매중인 전통적으로 제조된 제품으로 구입하였으며, 과 3개월이내에 항생물질 투여가 없었던 정상인 여성 두명 (23, 27세)의 분변은 전북대학교 병원을 통한 지원자로부터 채취한 후 유산균 분리 균주의 시료로 사용하였음. 각각의 샘플(1 g)을 무균적으로 50 mL Falcon tube에서 9 mL 펌톤수를 사용하여 연속적으로 희석한 후, 각각 100 μ L씩 CaCO₂가 함유된 MRS agar 배지와 유산균 선택배지(LAMVAB)에 도말하였다. 37°C에서 48h동안 배양 후, 생성된 콜로니 (colony) 주위에 투명한 환이 생성되는 균주를 1차적으로 유산균으로 선정하였음. 그 결과 젓갈 유래 190개(꼴뚜기젓 42개, 창란젓 44개, 낙지젓 38개, 가라비젓 31개, 굴젓 35개), 장아찌 유래 110개(고추 95개, 깻잎 14개, 마늘 1개) 및 인간 분변 유래 200개 (23개 105개, 27세 95개)의 유산균 유사 균주를 분리할 수 있었음.

(2) 전통발효식품 유래 면역증진효소 cinnamolyesterase (CE) 활성 보유 프로바이오틱스 균주 분리

- 1차 유산균 분리 배지를 통해 얻어진 인간 분변 유래 200균주 및 전통발효식품인 장아찌 유래 110 균주 및 젓갈 유래 190 균주를 대상으로 식품중에 함유된 고기능성 폴리페놀성분 중 면역증진 및 당뇨병 개선에 관련된 것으로 알려진 저분자 페놀성분의 생전환효소인 CE 활성보유 유산균의 분리를 간편. 신속한 EtFA(Ethyl ferulate) Assay를 이용하여 실시하였음. EtFA Assay의 결과, 그림 1에서 보여지듯 Bromocresol green 0.005%(w/v)이 함유된 0.1%(w/v) ethyl ferulate MRS plates에 도말된 분리된 유산균을 37°C, 72시간 배양한 뒤 CE 활성에 의해서 나타나는 투명환 (clear zone or halo)이 생성된 균주는 젓갈유래 30균주, 장아찌 유래 23균주 및 인간 유래 27균주로 전체 분리된 균주의 약 20 %에 해당되는 균주에서 목적하는 CE 활성을 확인할 수 있었음.

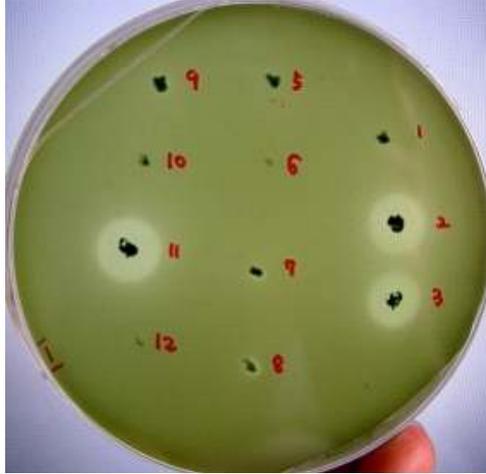


Fig. 72. 전통 발효 식품 및 인간 분변 유래의 유산균 유래 cinnamoyl esterase 활성 보유 유산균 스크리닝

(3) 전통발효식품 유래 분리 유산균 유사 균주의 CE효소활성 비교 분석

- 1, 2차 스크리닝 결과 선별된 유산균 유사 균주를 대상으로 CE 효소의 주요 기질인 chlorogenic acid을 이용하여 CE 효소 활성을 최종 확인하기 위하여 TLC 및 HPLC를 이용한 정성적 정량적 분석을 실시하였음. CE 효소활성의 주요 기질인 chlorogenic acid의 생전환 여부를 확인을 위해 chlorogenic acid가 2mM 함유된 5 mL의 MRS 액체배지에 분리된 균주를 각기 접종 후, 37°C에서 72 시간 동안 정지 액체배양하였다. 배양이 완료된 후, 0.1% ascorbic acid (w/v, Sigma, USA) 및 2.5 mL ethyl acetate를 첨가하여 20분간 원심분리(8,000 rpm)하여 얻어진 상층액을 TLC 및 HPLC 분석을 실시하였음. 표준물질로서 chlorogenic acid와 caffeic acid는 필요한 농도구배별로 메탄올에 녹여 -20°C에 냉동보관하여 사용하였음. CE 활성의 결과 chlorogenic acid으로부터 생성된 caffeic acid 성분의 정성적 확인을 위한 TLC 분석은 silica gel TLC 판(Merck, TLC aluminium sheet, silica gel 60F254)에 분리여과된 각각의 상층액 약 15μL씩 점적하고 toluene/ethyl acetate/formic acid(50:40:10, v/v/v)의 이동상으로 전개시킨 뒤 자연 건조 후 UV 365 nm에서 분석하였음.

Table 50 . HPLC 분석조건

Instrument	Waters 1515 Binary HPLC Pump
Detector	ELSD 800 (Alltech)
Column	inersil [®] ODS-3V, 5μm, 4.0×150 mm (GL Sciences Inc. Japan)
Mobile Phase	0.5% formic acid : MeCN = 3 : 1
Drift tube Temp.	80°C
Column Temp.	40°C

Flow Rate	1 mL/min
Injection Vol.	20 μ l

- CE 활성의 결과 chlorogenic acid으로부터 생성된 caffeic acid 성분의 정량적인 분석은 ELSD (Alltech ELSD 800, Nicholasville, KY, USA)를 장착한 HPLC를 이용하여 분석하였음. HPLC의 분석조건은 표1에 나타난 바와 같으며, 표준시료는 chlorogenic acid과 caffeic acid을 위의 시료의 전처리 과정과 동일하게 처리하여 얻어진 면적값에 의한 응답인수를 통해 표준곡선의 기울기 값을 검정하여 각 시료의 표준농도로 하였음.
- 그림 2(A)의 결과에서 TLC를 이용한 분석은 표준물질 및 미생물 반응액 모두에서 목적하는 반응생성물인 caffeic acid가 Rf 0.64에서 분석되었으며 공급된 기질인 chlorogenic acid의 Rf는 0.05으로서 정성적으로 확인가능 하였으나 농도에 따른 미세한 차이는 확인하기 어려웠음. 그러나, Fig. 73 (B)에서 보여지듯 HPLC 분석을 실시하였을 경우 표1의 조건하에서 보여지듯 chlorogenic acid과 caffeic acid의 RT값이 각각 2.5, 3.8으로 분리가능 하였으며 정량적으로도 분석 가능함을 확인할 수 있었음 (Fig. 73(B)).

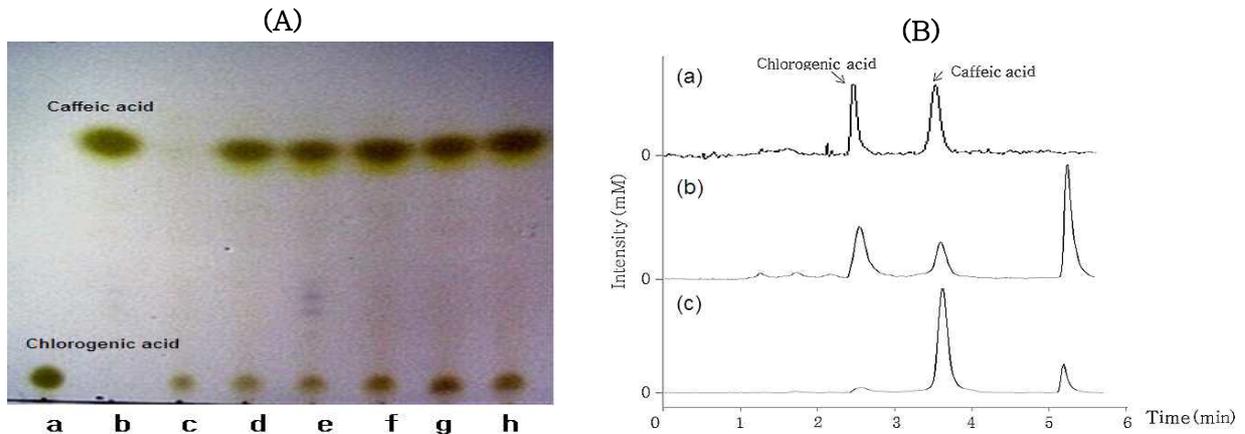


그림 73. Chlorogenic acid와 caffeic acid의 TLC (A), HPLC 크로마토그램(B). 크로마토그램에서 (b)와(C)는 각각 인간 분변에서 분리된 F 34, F46 균주의 크로마토그램.

- HPLC를 이용한 CE 효소 활성을 정량적으로 분석한 결과, Fig. 74에서 보듯이, 본 연구에서 주어진 조건하에서 caffeic acid 생성량이 0.2 mM 이상이 되는 균주는 총 43 개 (젓갈 17개, 장아찌11, 인간분변 15개) 균주였으며, 인간 분변으로부터 분리된 유산균은 평균 0.5 mM의 caffeic acid를 생성하여 젓갈 (0.4 mM), 장아찌 (0.3 mM)에서 분리된 유산균보다 높은 수준을 나타냄. 또한 가장 높은 caffeic acid 생성량을 보인 균주는 인간 분변에서 분리한 F46 (0.8 mM)이었음. 특히, 동물성 발효식품인 젓갈

에서 유래한 짓갈의 경우 식물성 발효식품인 장아찌에서 유래한 균주와 유사한 CE 활성을 보였으며, 일부 J701, J704 및 J705의 경우 2배이상 높은 CE 활성을 나타내었음.

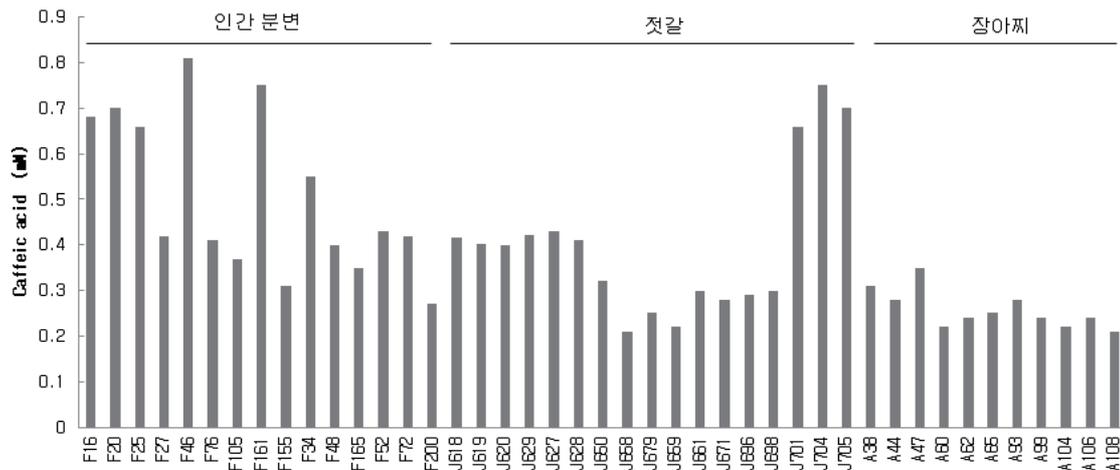


Fig. 74. 짓갈, 장아찌, 인간 분변에서 분리한 유산균의 CE 효소활성.

(왼쪽부터 인간분변으로부터 분리된 15개의 CE 효소활성 보유균주, 짓갈로부터 분리된 17개의 CE 효소활성 보유균주, 장아찌로부터 분리한 11개의 CE 효소활성 보유균주)

나. CE 선택 균주의 16S rRNA sequence 동정

(1) 16S rRNA sequence 동정

- 최종적으로 선발된 각 균주의 16S rRNA sequence 분석을 통한 CE 고활성 선택 균주의 동정을 실시하였음. 동정을 위한 PCR 증폭은 200μM의 dNTP, 1.0μM의 각 primer, 1x PCR buffer, 2.5U Taq DNA polymerase, 그리고 3μL DNA template로 구성된 50μL reaction buffer에서 이루어졌음. PCR반응은 27F Primer(5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') 1490R primer (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT C-3')를 이용하였고 다음과 같은 조건에서 PCR machine(pTC-150 minicycler, MJ Research Co., USA)사용하여 이루어졌음(denaturing at 95°C for 2min: 30cycles of 95°C for 60sec, 54°C for 30sec and 72°C for 60sec, and a final extension at 72°C for 5min). PCR 증폭된 DNA는 정제 후, ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였음.
- 분석된 16S rRNA 유전자의 염기서열을 GenBank BLAST 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 상동성 분석한 결과, 인간분변에서 분리한 F16과 F161는 *Lactobacillus acidophilus*와 각각 100%와 99.9%의 상동성을 보이는

것으로 나타났으며, F20, F25, F27, F46, F76, F105는 *L. acidophilus* NCFM과 각각 99.5%, 99.1%, 99.8%, 99.5%, 99.3%, 99.1%의 상동성을 보였다. 한편 F34는 *Weissella viridescens*와 99.3%와 F48, F155, F165는 *W. salipiscis*와 99.7%, 98.7%, 99.8%를, F52, F72는 *W. confusa* 각각 99.6%의 상동성을 보였음. 유일하게 F200는 *Enterococcus durans*와 99.3%의 상동성을 보였다음 (Table 51). 또한 젓갈로부터 분리된 J618, J619, J620, J629는 *Lactobacillus casei*와 모두 99% 이상의 상동성을 나타냈으며, J627, J628과 J650은 *L. paracasei*와 99.3, 99.4, 99.6%의 상동성을 보였다. J658과 J679는 모두 *L. plantarum*과 99.5% 상동성을 나타내었고, J659, J661과 J671은 *L. pentosus*와 그리고 J696, J698은 *L. brevis*와 상동성을 보였음. J701, J704과 J705 는 *L. alimentarius*로 동정되어 동물성 발효식품인 젓갈의 경우 비교적 다양한 *Lactobacillus*가 CE활성을 보유하고 있음을 알 수 있었음.

- 반면, 짬아찌로부터 CE 활성 보유 균으로 분리된 11균주는 모두 *L. sakei*로 동정되었음. 지금까지 CE 활성 유산균은 주로 인간 또는 동물 장내 미생물에서 분리되어진 *L. gasseri*, *L. acidophilus* 및 *L. johnsonii* (Couteau 2001, Lai 2009, Wang 2004) 및 유제품에서 분리된 *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* (Simone, 2008) 등이 주로 알려져 있으나, 발효식품에서 유래한 유산균에 대한 보고는 전무함. 특히, 본 연구에서 처음으로 시도한 젓갈과 같은 동물성 발효식품 유래의 유산균의 경우 CE 활성을 지닌 유산균의 분포가 비교적 다양한 반면, 장아찌와 같은 식물성 식품유래의 유산균은 *L. sakei*에 한정됨으로써 특이적인 양상을 보였다. 젓갈은 주로 어패류를 이용한 발효식품으로서 이들의 장내에는 섭취된 영양분을 분해하기 위한 여러 가지 효소를 분비하는 미생물이 많이 분포하고 있기 때문에 CE 활성 보유 유산균도 다양하게 분리됐을 것이라 사료되며, 반면에 마늘이나 깻잎 등의 식물을 발효시킨 장아찌는 원재료 자체의 항균활성이 강하기 때문에 생존력이 강한 소수의 미생물만이 우점했을 것으로 생각됨. *L. sakei*는 NaCl에 대한 강한 내성을 가지고 있다고 알려져 있으며 (Leroy. 1999), 우리나라에서는 주로 김치에서 분리되었고 김치의 발효 후기에 우점한다고 알려져 있음(이광희, 2011).

Table 51. cinnamoyl esterase 활성 보유한 젓갈, 장아찌 및 인간 장내 유산균으로부터 분리한 균주의 16S rRNA sequence 동정 결과

Origin	No. of strains	16Sr DNA sequencing		
		Genus	species	homology (%)
Human Fece	F16	Lactobacillus	acidophilus	100
	F20		acidophilus NCFM	99.9
	F25		acidophilus NCFM	99.1
	F27		acidophilus NCFM	99.8
	F46		acidophilus NCFM	99.5

	F76		acidophilus NCFM	99.3
	F105		acidophilus NCFM	99.1
	F16		acidophilus	99.9
	F155	Weissella	saipiscis	98.7
	F34		viridescens	99.3
	F48		saipiscis	99.7
	F165		saipiscis	99.8
	F52		confusa	99.6
	F72		confusa	99.6
	F200	Enterococcus	durans	99.3
Jeot-gal	J618	Lactobacillus	casei	99.5
	J619		casei	99.2
	J620		casei	99.7
	J629		casei	99.7
	J627		paracasei	99.3
	J628		paracasei	99.4
	J650		paracasei	99.6
	J658		plantarum	99.5
	J679		plantarum	99.5
	J659		pentosus	99.3
	J661		pentosus	99.1
	J671		pentosus	98.7
	J696		brevis	99.3
	J698		brevis	99.7
	J701		alimentarius	99.8
	J704		alimentarius	99.6
	J705		alimentarius	99.6
Jang-a-jji	A38	Lactobacillus	sakei	99.3
	A44		sakei	99.5
	A47		sakei	99.2
	A60		sakei	99.7
	A62		sakei	99.7
	A65		sakei	99.3
	A93		sakei	99.4
	A99		sakei	99.6
	A104		sakei	99.5
	A106		sakei	99.5
	A108		sakei	99.3

. CE 최적 활성 조건 및 기질 특이성

(1) CE 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

- 전통발효식품 및 인간분변에서 분리 선택된 CE 고활성 유산균의 CE 활성에 미치는 인자를 확인하고 영향을 평가하기 위하여 최적활성조건 및 기질 특이성을 검토하였음.
- 검토에 사용된 균주는 가장 높은 CE 활성을 보인 *L. acidophilus* F46 (LA-F46) 균주를 이용하여 실시하였음. 우선 CE 활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 기질인 chlorogenic acid (0.05%, v/v)가 첨가 된 Lactobacilli MRS (pH 7.0, Difco) 배지에 LA-F46을 1% (v/v)을 접종 한 후 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C의 온도에서 72시간 배양 한 후 CE 활성을 살펴 보았음.
- 그 결과 F46균주는 37°C에서 가장 높은 bioconversion rate(43.6%)을 나타냈으며 45°C의 고온에서는 급격하게 활성이 감소됨을 확인할 수 있었음.
- 또한 CE 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 기질인 chlorogenic acid (0.05%, v/v)가 첨가 된 Lactobacilli MRS를 pH 4에서 pH 9의 범위로 조정하여 LA-F46을 1% (v/v)을 접종 한 후 37°C에서 72시간 배양 하였음.
- LA-F46 균주는 37°C에서 3일간 배양 후 알칼리 영역에서 bioconversion rate 46.7%를 나타내며 가장 높은 활성을 보였음. 일반적으로 유산균은 pH 중성 부근에서 최적의 활성을 나타내는 반면에 본 연구의 결과는 초기 pH가 중성보다 높을 때 최적의 활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었음.
- 일반적으로 유산균은 성장과 동시에 젖산을 생성함에 따라 배지의 pH가 4~4.5로 낮아지기 때문에 일부의 효소의 경우 단백질의 변성으로 낮은 pH에서 활성을 나타내지 않은 것으로 사료됨.

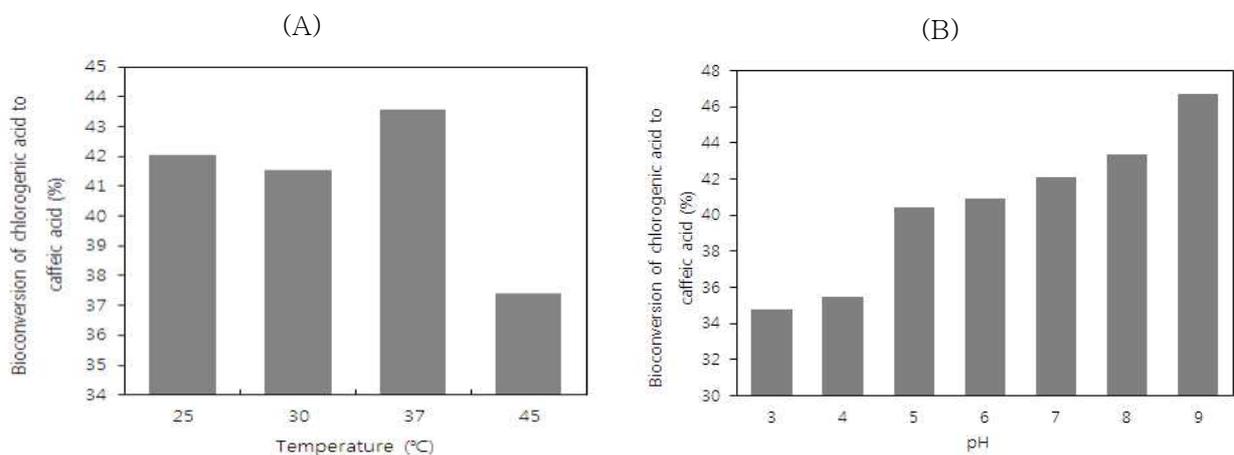


Fig. 75. 온도에 따른 F46의 CE 활성 비교(A), pH에 따른 F46의 CE 활성 비교(B) CE 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 기질인 chlorogenic acid (0.05%, v/v)가 첨가 된 Lactobacilli MRS를 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 각각의 배지를 pH 4에서 pH 9의 범위로 조정하여 전배양한 선택 유산균을 1% (v/v) 접종 한 후 37°C에서 72시간 배양 하였다.

(2) 각종 hydroxycinnamic acids 기질에 대한 분리 균주의 효소활성 비교분석

- 기질 특이성을 평가하기 위하여 37°C에서 72h 배양한 LA-F46 액체배양액을 원심분리하여 (4°C, 7000rpm, 20min) 균체를 회수하였음. 회수된 LA-F46 균체를 phosphate buffer (50mM, pH 7.4)를 이용하여 세 번 세척 후 동일 완충액에 현탁하여 4°C에서 초음파분쇄기(30min; 30sec play, 30sec stop, 500W, Cole-Parmer)로 균체를 파쇄하였음. 원심분리 (10,000 rpm, 5min) 후 얻어진 조효소액에 반응기질로 선 Hydroxycinnamic acids류에 속하는 4개의 기질 Methyl ferulate (MFA), methyl caffeate (MCA), methyl p-coumarate (MpCA) 및 chlorogenic acid를 1 mM을 ethanol에 녹인 후 반응완충액 (50mM phosphate buffer, pH 7.4)에서 37°C, 10min 반응시켰음.
- 반응종료후 각 기질에 대한 활성을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, Fig. 75와 같이, 가장 높은 활성은 chlorogenic acid (1.96 nKat/mL)를 기질로 이용했을 때 나타났으며, 그 다음으로는 MCA (1.55 nKat/mL), MpCA (1.38 nKat/mL) 순이었음. 그러나 MFA (0.75 nKat/mL) 와 MSA (0.50 nKat/mL)를 기질로 이용했을 때에는 비교적 낮은 활성 수준을 보여주었음.
- Crepin등의 분류에 의하면 CE는 기질 특이성 및 amino acid sequence에 따라 MFA, MSA 및 MpCA만이 분해가능한 경우 Type A로, MFA, MpCA, MCA만이 분해가능한 경우는 Type B로 그리고 네가지 기질을 모두 분해할 수있으면 Type C 또는 D로 분류가능하다고 알려져있는데, 본 연구에서 분리된 대표적인 고활성 CE 유산균인 LA-F46은 네가지 기질에서 모두 분해활성을 보여 Type C 또는 D에 속할 것으로 사료됨.
- 반면에 Couteau (2001)연구에서 인간 분변으로부터 CE효소 활성 보유균으로 분리된 *L. gasseri*, *B.lactis*, *E.coli*의 기질특이성 실험결과 Type B에 해당되었으며, Maria (2013)에서 보고된 *L.plantarum* 또한 Type B에 속하였음. 따라서 LA-F46의 CE는 기존에 밝혀진 유산균의 CE와는 다른 특성을 보이며, 더 깊이있게 이해하기 위해서는 이 효소를 분리 정제하여 amino acid sequence, 분자량 등의 특성을 파악할 필요가 있음.

. CE 활성 보유 유산균의 프로바이오틱스로서 적합성 검토

- 한편, CE활성 보유 유산균의 프로바이오틱스로서 잠재적 적합성을 살펴보기 위해 젓갈과 장아찌에서 분리한 25개 균주에 대해 프로바이오틱스로서 갖춰야할 기본적인 특성을 검토하였음.

(1) 내산성 및 내담즙성

- 생균제용으로 개발된 프로바이오틱스 균주들은 일반적으로 충분한 생리활성기능을 발휘하기 위하여 공복시 장내 위장의 강산성 조건 (pH 3.0)하에서 위장을 통과하여 소장내로 도달 생존해야하기 때문에 내산성 및 내담즙성을 기본적으로 필요함. 발효식품에서 분리한 CE 고효성 유산균의 내산성을 확인하기 위하여 pH 1.5, 2.0 및 7.0으로 각각 조절한 MRS broth에 각 유산균을 접종한 후 2시간 동안 37°C에서 정치 반응시켰음.
- 생균수 (CFU/mL)를 측정하여 CE 고효성 유산균의 내산성을 확인한 결과, pH 7.0에서 배양한 대조구에 비해 *L.paracasei* J628, *L.brevis* J696, *L.sakei* A65 균주는 가장 낮은 pH인 2.0에서 60%이상 생존율을 나타냈음(Table 52).
- 또한 본 연구에서 분리된 모든 CE 고효성 유산균주는 pH 3.0에서 85% 이상의 생존율을 보여 상당한 내산성을 가지고 있는 것으로 확인되었음(data not shown).
- 이러한 내산성의 결과는 내담즙성에서도 확인할 수 있었는데, Bacto oxgall (Difco)의 농도를 0.5, 1, 3% (w/v)가 되도록 각각 첨가한 MRS agar에서 37°C, 24h 동안 배양하여 CE 고효성 유산균의 내담즙성을 측정한 결과, CE 고효성 유산균의 생존율 [(실험구의 Log지수값/대조구의 Log지수값)X100]은 oxgall을 3% 첨가한 경우 *L.casei* J618 (77.5%)을 제외한 모든 CE 고효성 유산균에서 80%이상의 생존율을 나타냈음. CE 고효성 유산균은 담즙에 의한 부분적인 생육저해를 받는 것으로 여겨지나, 3% 첨가에서도 80%이상의 생존율을 보여 상당한 내담즙성을 지닌 것으로 사료됨에 따라 잠재적인 면역증가 프로바이오틱스로서의 기능함이 가능할 것으로 사료됨.

Table 52. 젓갈, 장아찌 분리균주의 내산성 및 내담즙성

Origin	Species Strains	mean counts (log CFU/mL)					
		Initial		pH tolerance		Concentrations of oxgall (%)	
		pH 7.0	pH 2.0	survival rate (%)	3%	survival rate (%)	
<i>Jeot-gal</i>	<i>L.casei</i>						
	J618	11.37	4.13	36.35	8.82	77.53	
	J619	10.72	4.49	41.91	8.76	81.75	
	J620	9.33	4.98	53.40	7.69	82.48	
	J629	10.86	2.94	27.06	9.46	87.17	
	<i>L.paracasei</i>						
	J627	10.06	3.31	32.91	8.14	80.87	
	J628	10.42	6.29	60.39	8.96	85.99	
	J650	9.28	5.34	57.57	8.27	89.11	
	<i>L.plantarum</i>						
	J658	9.51	4.90	51.54	9.46	99.42	
	J679	9.01	3.72	41.35	8.97	99.63	
	<i>L.pentosus</i>						

	J659	10.03	3.60	35.92	9.63	95.95
	J661	9.50	4.93	51.93	9.39	98.84
	J671	9.16	4.48	48.86	8.77	95.73
	L.brevis					
	J696	9.26	6.24	67.38	9.17	99.12
	J698	10.01	5.02	50.14	9.27	92.62
<i>Jang-a-jji</i>	L.sakei					
	A38	8.67	3.33	38.41	8.70	99.19
	A44	8.78	4.10	46.70	7.26	82.69
	A47	7.87	3.43	43.58	7.00	88.95
	A60	8.41	3.50	29.73	8.30	98.69
	A62	8.64	3.85	44.56	8.89	99.54
	A65	8.48	5.50	64.86	7.10	83.73
	A93	8.45	3.79	44.85	7.26	85.92
	A99	8.34	3.44	41.25	7.10	85.13
	A104	8.19	4.21	51.40	8.01	97.80
	A106	8.14	4.25	52.21	8.30	99.51
	A108	8.60	3.37	39.19	8.32	96.74
	L.rhamnisus GG	8.14	3.44	42.32	7.23	88.82

(2) 항균활성

- CE 고활성 유산균의 잠재적 프로바이오틱스로서의 가능성을 확인하기 위하여 항균활성을 실시하였음. 본 연구에서 사용한 병원성세균은 KCTC (한국생명공학연구원 생물자원센터)에서 분양받은 *Stapylococcus aureus*, *S. epidermidis*와 KACC (한국농업미생물자원센터)에서 분양받은 *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Stapylococcus xylosus*, *B. vallismortis* 등 총 8종을 사용하였음.
- 항균활성은 18시간 배양한 각각의 지시균주 (10^{6-7} CFU/mL)를 Nutrient agar (Difco)에서 배양 후, CE 고활성 유산균 배양 상등액 60uL를 멸균된 disc (8 mm, Yoyo Roshi Laisha, Japan)에 접종하여 48시간 배양한 후 생성된 억제환의 직경 (mm, diameter)을 측정함으로써 평가하였음.
- CE 고활성 유산균 상등액은 접종 전에 pH 7.0으로 조절하였으며, 대조구는 균을 접종하지 않은 MRS broth를 동량 사용하였다. 항균활성 실험 결과 (Table 53) 25개의 CE 고활성 유산균은 모두 *S. xylosus*에 대해서 높은 항균력을 보였으며, 장아찌에서 분리된 대부분의 *L. sakei* 균주는 식중독 균으로 알려진 *S. aureus* 및 *E. coli*와 같은 병원성 세균에 대하여 대체적으로 항균활성을 보였음.
- 그 밖에도 *L. sakei*는 그람 양성(*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *S. xylosus*, *B. vallismortis*)과 음성균(*P. aeruginosa*, *P. putida*, *E.coli*)에 대한 광범위한 항균 스펙트럼을 보였음.
- 또한, 젓갈로부터 분리된 *L.pentosus* J659는 모든 지시균에 대하여 저해능을 보인 반

면 같은 종인 *L.pentosus* J661, *L.pentosus*J671은 *S. epidermidis*, *P. putida*, *B. vallismortis*에 대한 항균활성을 가지고 있지 않아 흥미로운 양상을 보였음. 이들 병원성 세균이 억제되는 기작은 생성되는 젖산과 pH 저하 그리고 bacteriocin으로 잘 알려진 항균 펩타이드 등 항균물질의 생성 등 여러 요인이 관련될 것으로 여겨지나 정확한 항균기전 규명에 대한 추가적인 실험이 요구되어짐.

Table 53. Agar disc-diffusion assay에 의한 항균활성 측정

Origin	strains	S. aureus	S. epidermidis	P. aeruginosa	P. putida	B. cereus	E. coli	S. xylosus	B. vallismortis	
Jeot-gal	L.casei	J618	-	++	±	-	±	-	++	-
		J619	±	++	±	-	±	-	+	++
		J620	-	++	±	-	±	-	++	-
		J629	-	+	±	-	±	-	++	-
	L. paracasei	J627	±	+	±	-	+	-	++	-
		J628	-	-	±	+	+	-	++	-
	L. plantarum	J650	-			+	±	-	+	+
		J658	-	+	+	-	±	±	+	++
	L. pentosus	J679	-	+	+	-	±	±	+	-
		J659	±	±	±	±	±	+	+++	+
	L.brevis	J661	±	-	±	-	±	+	+++	-
		J671	±	-	±	-	±	+	+++	-
	L.rhannusis	J696	±	±	±	-	±	-	+++	-
		J698	±	±	±	-	±	-	+++	-
Jang-a-jji	L.sakei	A38	+	+	±	+	+	+	+	+
		A44	±	++	±	+	±	+	+	±
		A47	±	±	±	±	-	-	+	±
		A60	±	+	-	-	±	±	++	±
		A62	+	±	±	-	+	±	+	+
		A65	±	±	±	-	+	±	+	±
		A93	±	±	±	-	+	±	+	++
		A99	±	±	±	±	±	-	+	-
		A104	+	±	±	±	+	+	++	+
		A106	++	+	+	±	+	+	++	+
	A108	++	+	+	±	++	+	++	+	
L.rhannusis	GG	±	±	±	±	±	±	++	±	

-: <0 mm, ±:0-4 mm, +: 4-8 mm, ++: 8-12 mm, +++: >2 mm.

Antibacterial zone = diffusion diameter

마. 시나모일 에스터라아제(CE) 고활성 우수 균주 선발 및 CE 활성 최적 조건 설정

(1) CE 활성 우수 유산균주 선발 및 CE 활성 최적 조건

- 전통발효식품 (젓갈, 장아찌)과 인간분변 유래 CE 보유 유산균 (젓갈:14개, 장아찌:11

개, 인간분변 15개) 중에서 활성이 높은 5개의 유산균을 CE 유전자 제공 후보 균주로서 선발함.

- 후보균주로 선발된 CE 활성 우수 균주는 *L. acidophilus* F16, *L. acidophilus* NCFM F46, *L. acidophilus* NCFM F161, *L. acidophilus* F155, *W. viridescens* F34 로서 *L. acidophilus* 종이 우세하였음.
- 5개의 후보 유산균주의 CE 활성 최적 배양조건을 설정하기 위해 온도, pH, 배양 일수에 따른 영향을 확인함.

(가) 온도의 영향

- 유산균주의 CE 활성 최적 온도를 검토하기 위하여 0.05% (v/v) 클로로제닉산이 첨가된 Lactobacilli MRS (Difco)을 pH 7.0로 조정된 배지에 활성 유산균을 1% (v/v) 접종한 후 25°C, 30°C, 37°C 및 45°C의 각기 다른 온도에서 72시간 배양한 후 활성을 비교함.
- 온도를 제외한 나머지 배양 조건은 동일하게 실시함으로써 일정하게 유지하였고 활성 측정은 배양 후 추출액에 대하여 HPLC-ELSD 방법을 이용하여 카페인산의 생성량으로 CE 활성을 측정함.
- 선발된 균주 5종의 온도에 따른 CE 활성 결과는 Fig. 76과 같음.
- F46, F155, F161 균주는 37°C 배양 후 각각 43.6%, 37.4%, 43.0%의 전환율 (클로로제닉산의 카페인산으로의 전환율)을 나타내면서 최적의 활성을 보인 반면 F16과 F34 균주는 25°C 배양 후 각각 41.3%와 40.4%의 활성을 나타내면서 상대적으로 낮은 온도에서 최적 활성을 나타냈음. 선발된 5 균주 중에서 **F46 균주가 37°C에서 3일간 배양 후 43.6%**를 나타내며 제일 높은 효소활성을 보였음.

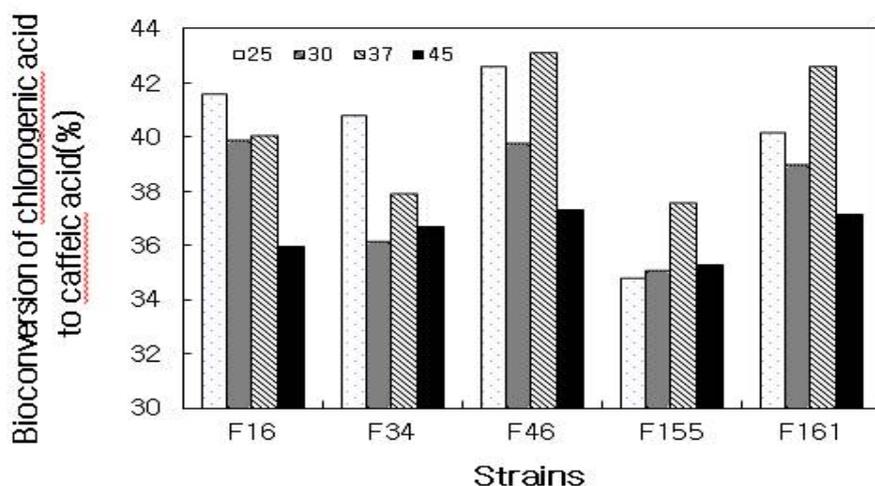


Fig. 76. 온도에 따른 선택된 유산균의 CE 활성.
각 유산균에 의한 클로로제닉산의 카페인산으로의 생전환율

(나) pH의 영향

- 유산균주의 CE 활성 균주의 pH 영향을 검토하기 위하여 0.05% (v/v) 클로로제닉 산이 첨가된 MRS (Difco)를 1N NaOH와 1N HCl을 사용하여 각각의 배지를 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 및 pH 9로 조정함.
- 전배양 유산균주를 1% (v/v) 접종 한 후 37°C에서 72시간 배양 한 후 활성 측정은 배양 후 추출액에 대하여 HPLC-ELSD 방법을 이용함.
- 선정된 5 균주의 pH에 따른 CE 활성은 Fig. 77에서 보이는 것처럼 F16, F34, F46, F161은 초기 pH가 9일 때 각각 42.5%, 41.8%, 46.7%, 45.6%로 가장 높은 전환율을 나타냈으나, 반면 F155 균주는 초기 pH 8에서 40.6%로 가장 높은 전환율을 나타내었고, 최종적으로 선발된 5 균주 중에서 F46 균주는 37°C에서 3일간 배양 후 가장 높은 43.6%의 활성을 보였음.
- 일반적으로 유산균은 pH 중성 부근에서 최적의 활성을 나타내는 반면에 본 연구의 결과는 초기 pH가 중성보다 높을 때 최적의 활성을 나타내는 것을 관찰하였음.

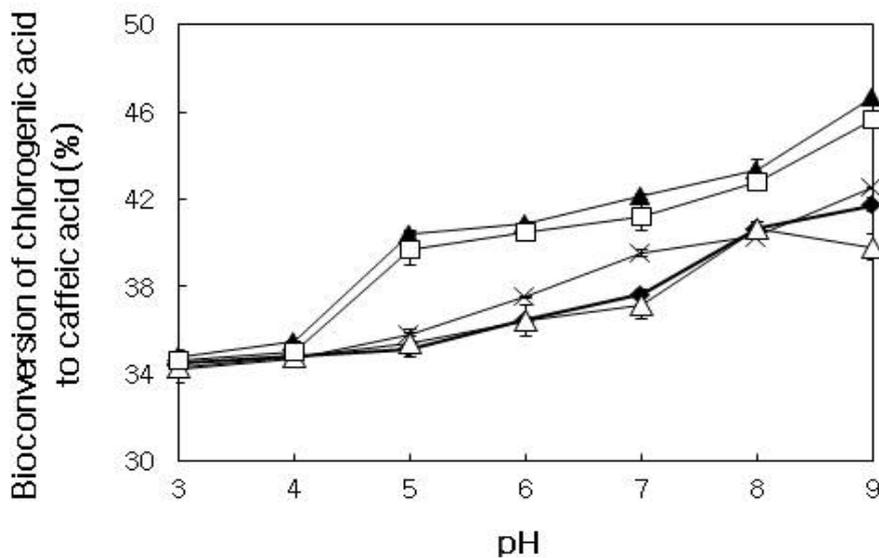


Fig. 77. 온도에 따른 선택된 유산균의 CE 활성.

각 유산균에 의한 클로로제닉산의 카페인산으로의 생전환율
F46 (▲), F16 (X), F34 (◆), F161 (□), F155 (△)

(다) 배양일수에 따른 영향

- 유산균의 CE (CE) 활성 균주의 배양일수에 따른 활성 변화를 검토하기 위해 6일간 배양하였고 24시간마다 샘플링함.
- 0.05% (v/v) 클로로제닉산이 첨가된 유산균 배지 (pH 7.0, Lactobacilli MRS, Difco)에 유산균을 1% (v/v) 접종 후 37°C에서 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6일 동안 배양함.
- 각각의 추출액에 대하여 HPLC-ELSD 방법을 이용하여 기질의 변화를 관찰하였음.

- 각각의 유산균의 배양일수에 따른 CE 활성은 Fig. 74에서 보여지듯 F46 균주의 경우 3일간 배양한 배양액에서 48.1% 전환율로 제일 높은 전환율을 관찰할 수 있었음.
- F34와 F155 역시 3일간 배양 후 각각 37.5%와 37.1%로 가장 높은 전환율을 보였음. 한편 F16은 배양 2일 후 38.1%로 가장 높은 전환율을 보였으며, F161 균주의 경우 배양 4일 후 41.4%로 가장 높은 전환율을 보였음.
- 결론적으로, 동일조건(37°C, pH 7, 72 h)에서 F161의 46.2%, F16의 42.5%, F34의 37.7%와 F155에서 37.2%의 활성과 비교 시 F46 균주는 48.1%의 전환율을 나타내 가장 높은 CE 활성을 보였음 (Fig. 78).

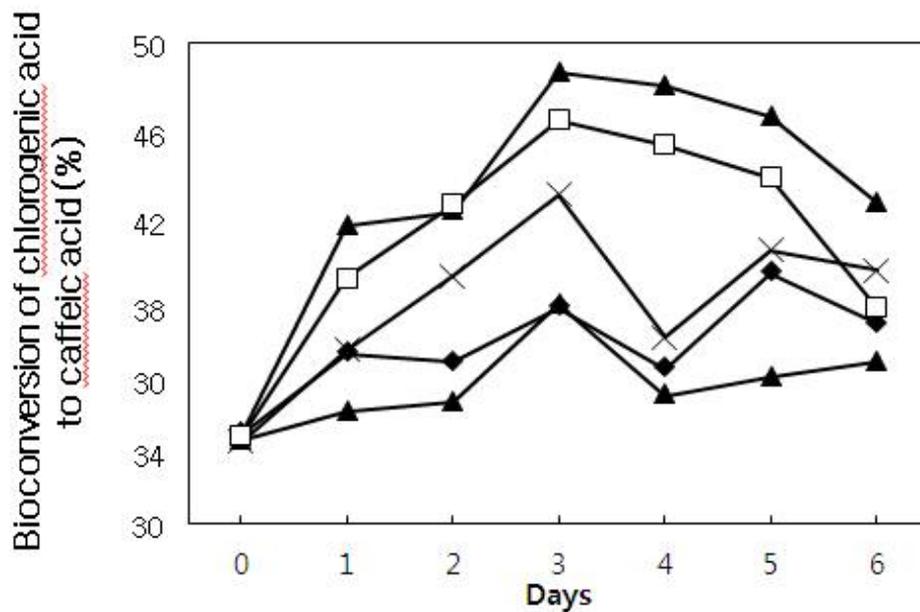


Fig. 78. 배양일수에 따른 선택된 유산균의 CE 활성. 각 유산균에 의한 클로로제닉산의 카페인산으로 생전환율
F46 (▲), F16 (X), F34 (◆), F161 (□), F155 (△)

바. CE 유전자 획득 및 효소 특성 분석

(1) CE 유전자 클로닝

- *L. acidophilus* NCFM F46 (LA-F46) 유래의 CE 유전자를 얻기 위해 전 게놈 서열이 공개된 *L. acidophilus* NCFM (GenBank: CP000033.3)의 α/β 가수분해효소 유전자 정보를 이용하여 프라이머를 제작함.
- 발현벡터로의 삽입을 위하여 4개의 제한효소 (BamHI, EcoRI, NdeI, XhoI)의 서열을 N-말단과 C-말단에 추가한 총 4 개의 프라이머를 제작함 (Table 54).
- PCR 반응은 Taq DNA polymerase (Roche Applied Science)를 사용하여 95°C에서

1분, 54°C 에서 30초, 72°C에서 1분의 반응을 27회 반복함. PCR반응의 결과 CE 유전자로 추측되는 약 700bp정도의 총 4개의 DNA 단편 (A, CEacidoN andCEacidoX; B, CEacidoB and CEacidoX; C, CEacidoB and CEacidoE;and D, CEacidoN and CEacidoE)을 얻음. 이들 단편을 각각 BamHI, EcoRI, NdeI, XhoI 제한효소로 처리하고, pET-21a 또는 pET-28a 발현벡터에 삽입하여 총 4개의 재조합 발현벡터 (A, pET28a-CEacido 1; B, pET28a-CEacido 2; C, pET21a-CEacido 3; and D, pET21a-CEacido 4)를 구축함 (Fig. 79).

- 유전자 분석을 위해 HT-Gene Analyzer (Bioneer, Korea)를 이용하여 염기서열을 결정한 결과 247개의 아미노산을 코딩하는 741 bp의 CE 추정 유전자 (cef46)를 얻었으며, 38%의 GC 함량을 가지고 있었음.

Table 54. CE PCR 증폭용 프라이머 염기서열

프라이머	Nucleotide 서열
CEBamN	AAAAAGGATCCATGTCTCGCATTACAATTGAG
CEEcoRC	AAAAAGAATTCTTAAAACGTTGCAGGTTTTAAAAA TTGC
CENdeN	AAAAC TCGAGAAATAGGGGCTTCAAAAATTC
CEXhoC	AAAAC TCGAGAAATAGGGGCTTCAAAAATTC

The restriction enzyme site is underlined.

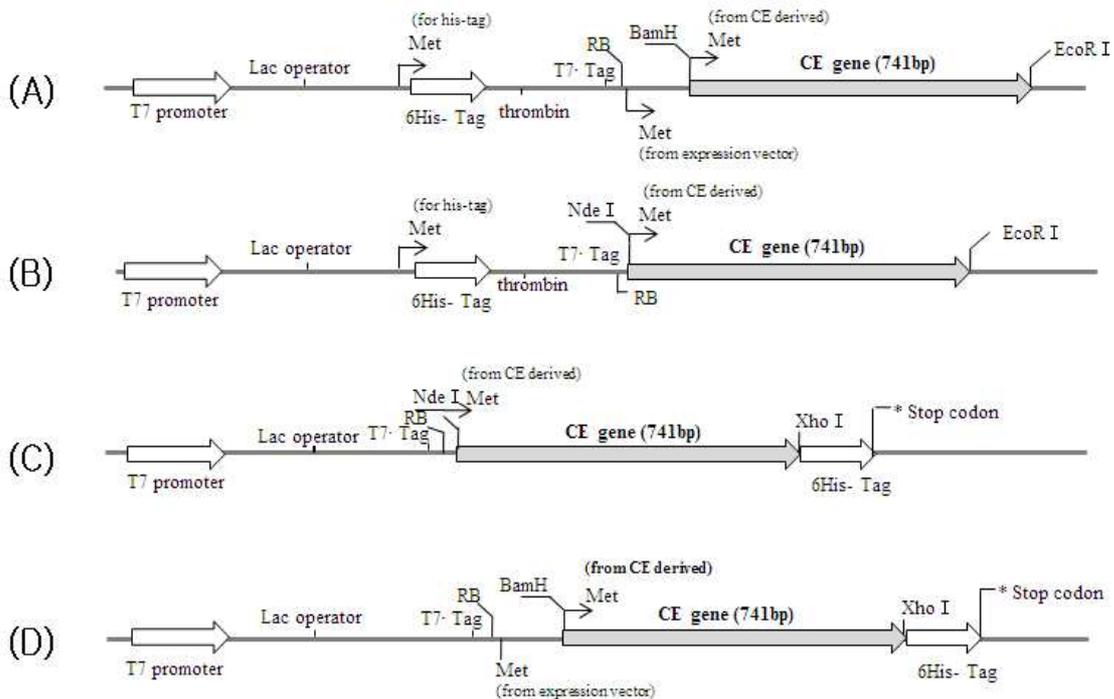


Fig. 79. *L. acidophilus* NCFM F46 (LA-F46) 유래

CE 고발현을 위한 벡터 구축.

(A): pET28a-CEacido 1, (B): pET28a-CEacido 2, (C): pET21a-CEacido 3, (D):
pET21a-CEacido 4

(2) *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE 유전자 형질전환 대장균의 대량 발현 최적 조건

- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 CE 유전자가 삽입된 4개의 발현벡터를 사용하여 *E. coli* BL21(DE3)을 형질 전환시켜 재조합 대장균을 각각 획득하였음.
- 각각의 4개의 형질전환 대장균을 액체배지 (LB, 100g/mL ampicillin)에 접종하여 37°C에서 진탕배양함. 배양액의 흡광도(600nm)가 0.8에 도달한 후, 최종농도가 1mM 이 되도록 IPTG를 첨가하여 목적하는 재조합 CE 유전자의 발현을 유도하였으며, 이후 CE효소의 발현량이 최대가 될 때까지 15시간 동안 배양함.

(3) 재조합 CE 염기서열 분석

- LA-F46유래 재조합 CE 유전자를 기존의 다른 유산균 유래 CE 아미노산 서열과 비교한 결과 *Lactobacillus jonnosonii* LJ0536 (NP 965719.1)와 비교적 낮은 70%의 가장 높은 상동성을 보였으며, *L. plantarum* WCFS1 (52%, YP 004890534.1), *L. fermentum* (50%, AGW21364.1) 그리고 *L. jonnosonii* LJ1228 (49%, NP 965083.1)순으로 확인됨.
- 지금까지 CE는 아미노산 서열 상동성과 기질특이성을 기초로 하여 네가지 타입(A-D)으로 분류할 수 있는데 A는 대부분 리파아제의 아미노산 서열과 높은 상동성을 보이며, B는 아세틸 자일라 에스터라아제 패밀리 I 과 그리고 타입C와 D는 탄나아제, 자일라나아제와 각각 상동성을 보이는 것으로 알려져 왔음. 하지만, 본 연구에서 분리한 *L. acidophilus* NCFM F46에서 분리된 재조합 CE cef46은 네 가지 어느 타입으로도 분류할 수가 없음을 확인하였음.
- 이러한 결과는 CE의 기능성 분류가 대부분 곰팡이 유래의 CE를 기준으로 했기 때문으로 사료됨. 그러나 cef46은 모든 CE에서 공통적으로 보이는 CE 모티프가 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었음. 즉, CE 유전자 패밀리에서 촉매 부위의 아미노산으로 알려진 Ser106, His225, Asp197를 확인하였으며 또한 일반적으로 α/β 가수분해효소의 슈퍼패밀리 및 두 개의 전형적인 세린 에스터라아제에서 보여지는 보존 서열 (G-X-S-X-G)를 포함하고 있었음.
- 그러나 본 연구에서 얻은 *L. acidophilus* NCFM F46에서 분리된 재조합 CE cef46의 모티프(G-H-S-Q-G)은 Shin and Chen (2007)이 분류한 G-X-S-X-G 모티프의 근접성에 근거하여 분류한 네 가지 타입의 모티프로 분류하기가 어려웠음. 더욱이 이러한 결과는 이미 알려진 네 종류의 유산균 유래 CE의 모티브 염기서열인 (G-H-S-Q-G)와 정확하게 일치함을 확인하였으며 유산균 유래의 CE의 경우 기존의

다른 종에서 유래한 CE와는 다른 새로운 타입으로 분류되어야 할 것으로 여겨짐 (표 6).

- *L. acidophilus*의 경우 CE의 활성과 아미노산의 염기서열이 보고되어있으나 이들의 N-말단 아미노산 서열(A R V E K P R K V I L V G D G A V G S T, Wang, 2004)을 비교분석한 결과, *L. acidophilus* NCFM F46에서 분리된 재조합 CE cef46 서열인 (M S R I T I E R D G L T L V G D R E E P)는 상동성 (20%)이 매우 낮음을 알 수 있었음.
- 특히 Wang (2004)의 논문에서 알려진 *L. acidophilus*에서 유래한 CE는 락테이트 디하이드로나아제와 매우 높은 상동성을 보이는 것으로 확인됨.
- 이러한 결과는 본 연구의 결과 획득된 *L. acidophilus* NCFM F46에서 분리된 재조합 CE cef46는 신규의 CE로 보여짐. 따라서 LA-F46으로부터 얻어진 CE 유전자는 BanH1, EcoR1 제한효소 사이트가 포함된 CEBamN 과 CEEcoRC 프라이머 (Table 55)와 함께 PCR을 통해 증폭되었으며, N-말단에 His6-tag서열이 있는 pET-28a에서 발현되었으며, *E. coli* BL21(DE3)를 통해 형질전환 재조합체를 얻었음 (Fig. 79A, pET28a-CEacido1).

Table 55. CE의 아미노산 서열 상동성, 하이드록시시나믹산에 대한 기질 특이성 및 모티프에 따른 분류^b

타입	효소 이름	서열 유사도	N-말단 서열	기질 특이성	NCBI GenBank accession no.
A	<i>Aspergillus awamori</i> FAEA		(147) -ALTVTGHSLGASLAAL- (162)		BAA92937
	<i>Aspergillus tubingensis</i> FAEA	Lipase	(147) -ALTVTGHSLGASLAAL- (162)	MFA, MSA, MpCA	CAA70511
	<i>Aspergillus niger</i> FAEA		(147) -ALTVTGHSLGASMAAL- (162)		CAA70510
B	<i>Penicillium funiculosum</i> FAEB	CE family1 acetyl	(129) -KVYMTGSSSGAIMTNV- (144)	MFA, MpCA, MCA	CAC14144
	<i>Neurospora crassa</i> FAEB	xylan esterase	(129)-RVYVMGTSSGGMMTNV- (144)		CAC05587
C	<i>Aspergillus nidulans</i> AN1772.2	Chlorogenase	(182) -TSYYLGCSTGGRQGFK- (197)	MFA, MSA, MpCA, MCA	XM654284
	<i>Aspergillus niger</i> FAEB	esterase, tannase	(178) -YSYYLGCSTGGRQGYQ- (193)		AJ309807
	<i>Talaromyces stipitatus</i> FAEC		(184) -KSYYLGCSTGGRQGFK- (199)		AJ505939
D	<i>Penicillium funiculosum</i> FAEA		(205) -QIYSMGWSYGGAMSIA- (220)	MFA, MSA, MpCA, MCA	CAC85738
	<i>Neurospora crassa</i> FAED	Xylanase	(150) -LVFSTGFSYGGGMSFS- (165)		XP956228
	<i>Pseudomonas</i>		(229) -SLVINGGSNGNYTVSL- (244)		Ferreia et

	fluorescence XYLD			al. (1993)
	Clostridium thermocellum FAE	(947) -HRGFGGFSMGGLTTWY-	(962)	EAM45408
	Lactobacillus johnsonii LJ0536	(99) -NIYLVGHSQGGVVASM-	(114)	NP_965719
	Lactobacillus johnsonii LJ1228	(99) -HIYLVGHSQGGVVASM-	(114)	NP_965083
E	Lactobacillus plantarum WCFS 1 esterase	a/β hydrolas e	(99) -HIVLAGHSQGGVVASM-	(114) Specie-dep endent 4
	Lactobacillus fermentum CE	(99) -EILVGHSGGGVVASM-	(114)	AGW21364.1
	Lactobacillus acidophilus F46 CE	(99) -NIFLVGHSGGGVVASM-	(114)	KJ598803

(4) *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE 유전자 고 발현 및 재조합 CE 정제

- CE 유전자가 삽입되어 구축된 발현벡터 pET28a-CEacido 1를 이용하여 대장균 *E. coli* BL21(DE3)의 형질전환 재조합체를 얻은 후, LB (100g/mL ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양함.
- 배양액의 흡광도(600nm)가 0.8에 도달한 후, 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 대량 발현을 유도하였으며, 이후 CE효소의 발현량이 최대가 될 때까지 15시간 동안 배양함.
- SDS-PAGE 결과 pET28a-CEacido1는 Fig. 80(A)의 1번 레인에서 보여지듯 기대보다 낮은 CE 발현을 보여주었으며, 고 발현을 시키기 위하여 C-말단에 종결코돈이 없는 pET28a 뿐만 아니라 C-말단에 종결코돈이 있는 pET21a 발현벡터, 그리고 CE 유전자 증폭 프라이머에 제한효소를 달리하여 총 네가지 벡터를 구축하였고, 그 발현량을 비교하였음 (Fig. 80A).
- 결과, C-말단의 6 His-tag 서열과 함께 제한효소 NdeI과 XhoI를 사용한 CE 유전자 단편이 포함된 pET21a-CEacido3에서 가장 높은 CE 발현을 확인하였음 (Fig. 80A).
- 이러한 결과는 아마도 pET21a-CEacido3에서 C-말단His6-tag 서열이 재조합 CE의 입체특이적 변화에 영향을 미친 결과로 사료됨.
- 정제된 효소를 얻기 위하여 원심분리(3000 × g, 15 min, 4°C)로 회수한 균체는 lysis buffer (50mM 인산염완충액)에 현탁하고, 20초씩 7번 초음파 분쇄 (Sonic and materials Inc., USA) 함.
- 원심분리 후 불용성 침전물을 제거하고 얻어진 상층액을 Ni-sepharose (TM HP) 크로마토 컬럼을 부착한 FPLC (Bioread, 280nm, 0.5mL/min, 25°C)를 이용하여 정제하고자함.
- 컬럼의 고정상에 부착 후, 세척완충액 (50 mM 인산염완충액, 300 mM NaCl, 2 mM imidazole, pH 7.0)로 충분히 세척한 후, 최종적으로 용출액 (50 mM 인산염완충액,

300 mM NaCl, 150 mM imidazole , pH 7.0)를 0.5mL/mim 속도로 용출시켜 정제된 효소 7.2 mg을 회수함.

- 활성 분획은 황산암모늄 침전법으로 농축 후 최적 완충액(50 mM PBS, 4°C)으로 투석하여 이후의 실험에 사용하였음.
- 정제된 CE의 대략적인 분자량 및 정제 정도는 SDS-PAGE (12%(w/v), Mini-protean II (Bio-Rad, USA) 전기영동을 이용하여 분석함. 분리된 효소 단백질은 염색액 (Coomassie brilliant blue R-250)으로 염색한 후, 다시 탈색액 (20% methanol, 10% acetic acid)을 처리하여 확인함. 효소 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정함.
- Fig. 80에서 보여지는 것처럼 SDS-PAGE 결과 약 27.4 kDa의 분자량이 검출되었으며, 유전자 상동성 검색프로그램인 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih/blast>)를 통해 확인하였음.

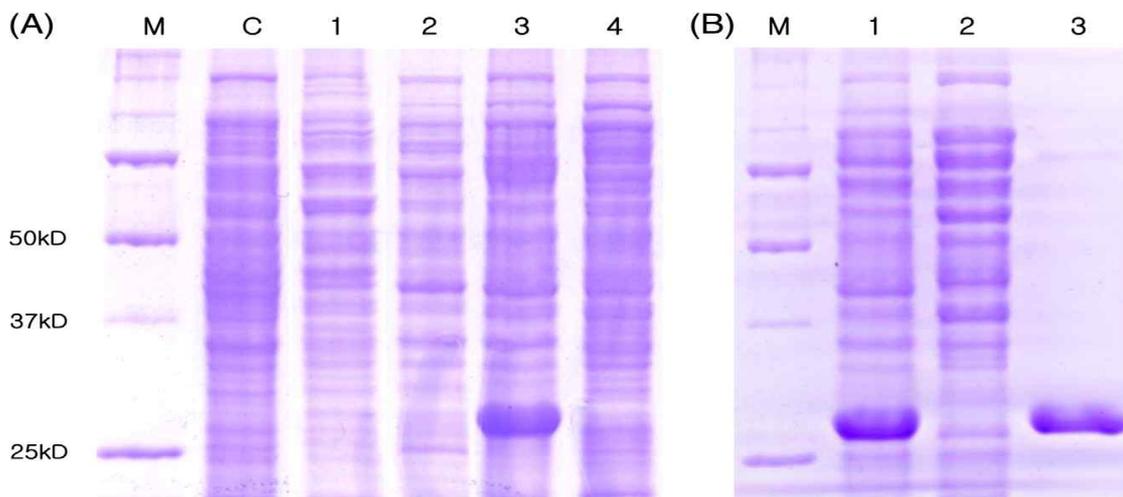


Fig. 80. (A) 다양하게 구축된 발현벡터에서의 CE 효소 발현량: Lanes: M, 분자량 마커(kDa); C, CE 유전자를 삽입하지 않은 pET21a 벡터; 1, pET28a-CEacido 1; 2, pET28a-CEacido2; 3, pET21a-CEacido 3; 4, pET21a-CEacido 4. (B) Ni-sepharose에 의해 정제된 사나모일 에스테라아제 Lanes: M, 분자량 마커(kDa); 1, E. coli BL21(DE3)의 조효소액; 2, CE를 제외한 단백질; 3, 정제된 CE

- pET21a-CEacido3를 이용하여 형질전환된 재조합 대장균에서 발현된 대장균 배양액에 포함된 조효소액로부터 정제된 재조합 CE는 조효소액 보다 68.98배 증가된 특이 활성을 보였음 (표7).
- 정제된 재조합 CE의 분자량은 Fig. 80B에서처럼 27.4 kDa으로 확인되었으며, 정제수율은 43.92%였음 (표7).
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE (cef46, *L. acidophilus* NCFM F46)는 이전에 유산균 *L. johnsonii*에서 보고된 CE LJ0536 (Lai, 2011) 그리고 *L.*

*acidophilus*의 IFO 13951 (Wang, 2004) 의 각각의 분자량 31 kDa, 36 kDa로서 cef46 (27.4 kDa)보다 다소 큰 분자량을 보였는데 이는 최근에, *L. plantarum* WCFS1 (Esteban-Torres, 2013)으로부터 분리되어 보고된 새로운 페룰로일 에스터라아제의 효소의 분자량인 28kDa과 비슷함을 확인할 수 있었음.

- 그러나 *L. plantarum* WCFS1의 페룰로일 에스터라아제의 아미노산 서열과는 52%의 낮은 상동성을 보여주었으며, 또한 *L. plantarum* WCFS1의 페룰로일 에스터라아제는 기질로서 클로로제닉산을 이용하였을 때 활성을 거의 나타내지 않았다는 점에서 본 연구에서 분리한 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE와는 큰 차이를 보이고 있음을 확인함.
- pET21a-CEacido3이 포함된 *E. coli* BL21 (DE3)의 비활성은 660.00 U/mg으로 pET28a-CEacido1 (155.06 U/mg)보다 4배 증가하였음 (Table 56).

Table 56. 발현 벡터 구축에 따른 CE 발현양 비교

Expression vectors	Steps	Total protein (mg) ^a	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification factor
pET28a-CE_3	crude extract	1130.80	10820.00	9.57	100	1
	Ni-sepharose	7.20	4752.00	660.00	43.92	68.98
pET21a-CE_1	crude extract	205.00	1000.00	4.88	100	1
	Ni-sepharose	1.34	207.00	155.06	20.70	31.79

(5) *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 pH, 온도의 영향 및 pH, 열 안정성

- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 pH에 의한 영향을 확인하기 위해 pH 3.0-9.0 범위에서 CE의 활성을 측정함.
- 각 완충용액은 pH 3.0-6.0 (50 mM citrate buffer), pH 6.0-8.0 (50 mM phosphate buffer), pH 8.0-9.0 (50 mM Tris-HCl buffer)를 사용하였으며, 10 mM의 클로로제닉산 기질이 함유된 각각의 버퍼의 조건에서 10분간 반응 후 HPLC-ELSD (Bedford, MA, USA)를 이용하여 카페인산 생성량을 정량적으로 분석하여 CE 활성을 측정함.
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 pH 7.5에서 가장 높은 상대 활성을 보였으며, pH 7.0-8.0범위에서도 80%이상의 상대 활성을 나타냈음 (Fig. 81A).
- 그러나 pH 9.0의 강염기 조건에서는 48%로 활성이 감소하였으며, pH 5.0이하의 산성 부근에서는 드라마틱하게 감소하였음.

- 이러한 결과는 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 산성보다는 알칼리성에서 비교적 높은 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었으며, 이는 현재까지 알려진 대부분의 유산균 유래의 CE와 동일한 특성으로 사료됨 (Lai, 2011).
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 pH 안정성을 확인하기 위하여 각각의 pH 3.0-6.0 (50 mM citrate buffer), pH 6.0-8.0 (50 mM phosphate buffer), pH 8.0-9.0 (50 mM Tris-HCl buffer)의 완충액을 사용하였으며, 4℃에서 2 시간 반응 시킨 후 CE의 잔존 활성을 측정함.
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 pH 7.0에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, pH 5.0-8.0범위에서도 비교적 높은 활성을 보임. 또한 pH 4.0, 9.0에서도 70%의 활성이 남아있었음 (Fig. 81A).
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 온도에 의한 영향을 확인하기 위해 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60℃ 범위에서 CE 활성을 측정하였으며 10 mM의 클로로제닉산 기질이 함유된 50 mM 인산버퍼 (pH 7.5)에서 10분간 반응 후 HPLC-ELSD (Bedford, MA, USA)를 이용하여 생성된 카페인산을 정량적으로 분석하여 CE 활성으로 측정함.
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 예상보다 높은 50℃에서 가장 높은 CE 활성을 보였으며 40-55℃ 범위에서도 높은 활성(78, 68%)을 유지함을 알 수 있었음 (Fig. 81B).
- 지금까지 보고된 *L. johnsni*의 재조합 CE (Lj0536)는 pH 7.8, 20℃에서 가장 높은 상대 활성을 가지고 있어 상대적으로 낮은 온도에서 최적활성을 나타내는 반면 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 경우 상당히 열안정성이 높은 단백질로 보여짐.
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 반응속도를 최적 조건 (pH 7.0, 37℃)에서 측정한 결과 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 Michaelis menton 상수 (K_m)값은 2.89 mM이었으며 최대반응속도 (V_{max})는 1250 mol/min-1mg-1임을 확인하였음.

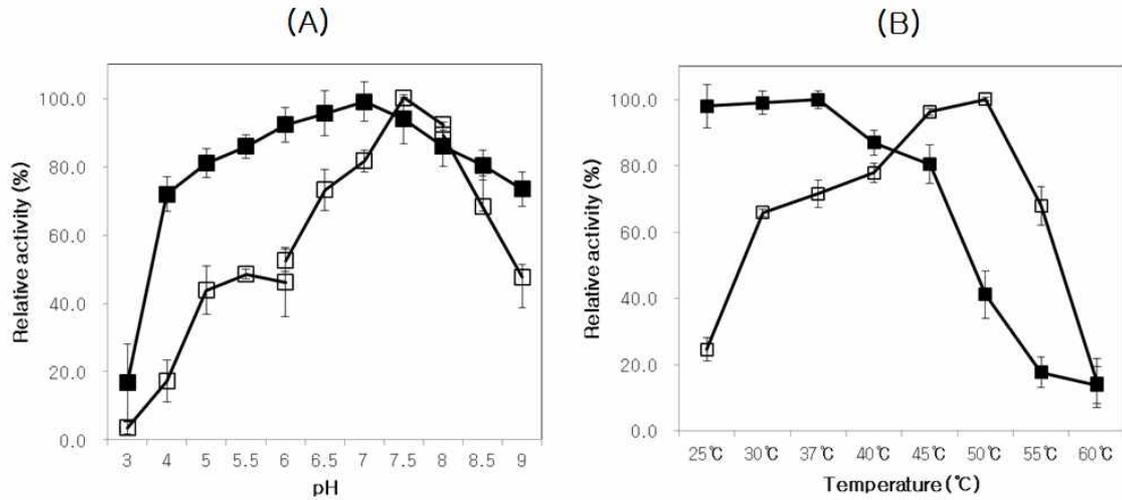


Fig. 81. 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 (A) pH에 대한 영향 (□) 및 pH 안정성 (■) (B) 온도에 대한 영향 (□) 및 열 안정성 (■)

(6) *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 금속 이온 및 유기용매 영향

- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 금속이온 저해 효과를 6개의 금속이온 (CaCl₂, MgCl₂, CuSO₄, MnSO₄, KCl, NaCl)과 유기용매 EDTA, DMSO, EtOH을 사용하여 확인하였음.
- 각각의 금속이온은 1과 5 mM의 농도에서 검토하였으며, DMSO 와 EtOH의 경우 1과 5%의 농도가 되도록 첨가한 50 mM 인산염 완충액(pH 7.5)을 이용하였음.
- 정제된 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE를 37°C에서 10분 반응 시킨 후 CE 활성을 측정함 (Table 57).
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 1 mM의 낮은 농도에서는 CuSO₄를 제외한 다른 금속에서는 CE 활성에 영향이 없었으나, 5 mM의 높은 금속 농도에서는 CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MnSO₄에 의해 각각 75.9, 55.4, 59.8, 73.8%로 CE 활성이 감소하였으며, 5 mM의 KCl, MgSO₄, NaCl는 CE 활성을 90%이상 유지시켰음.
- 5% 첨가한 EtOH은 효소활성에 영향을 미치지 않았으나, 동일 농도의 DMSO는 영향을 미치지 않았음.

Table 57. *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 금속이온 및 유기용매에 대한 영향

Metal	Relative activity (%)	
	1mM	5mM
CaCl ₂	98.3 ± 0.1	75.9 ± 0.9

CuSO ₄	93.6 ± 5.2	55.4 ± 0.8
FeSO ₄	113.0 ± 0.3	59.8 ± 0.9
KCl	120.7 ± 0.2	92.8 ± 1.1
MgSO ₄	110.8 ± 0.1	97.2 ± 1.0
MnSO ₄	106.6 ± 0.3	73.8 ± 1.0
NaCl	118.0 ± 0.9	101.7 ± 1.0
EDTA	106.5 ± 1.4	89.7 ± 0.7
EtOH (1%)	98.8 ± 0.2	75.2 ± 0.6
DMSO (1%)	115.0 ± 0.4	93.5 ± 1.0
Control	100 ± 0.6	100 ± 0.5

(7) *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 기질 특이성

- 현재까지 CE (cinnamoyl esterase, CE; EC 3.1.1.42)는 클로로제네이트 하이드로라아제 (chlorogenate hydrolase; EC 3.1.1.42) 또는 페룰로일 에스터라아제 (feruloyl esterase, FAE; EC 3.1.1.73)로 기질 선호도의 차이에 의존적으로 혼용되어 사용되어 왔음.
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 기질특이성을 측정하기 위해 클로로제닉산 외 4종류의 하이드록시시나믹산 (MFA: 메틸 페룰레이트, MCA: 메틸 카페에이트, MSA: 메틸 시나페이트, MpCA: 메틸 파라 쿠마레이트)를 이용하였으며, 37°C에서 10분 반응 시킨 후 CE 활성을 비교 분석함.
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE는 클로로제닉산 (1.96 nKat/mL) > MCA(1.55 nKat/mL) > MpCA (1.38 nKat/mL) > MFA (0.75 nKat/mL) > MSA (0.50 nKat/mL)의 순으로 기질특이적 친화도를 나타냈음 (Fig. 82).
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 기질특이성은 *L. plantarum* WCFS1의 FAE (Lp 0796)와 비교 시 4개의 하이드록시시나믹산 (MFA, MCA, MSA, MpCA)에 대한 기질특이성은 높았으나 클로로제닉산에 대한 기질특이성은 매우 낮음을 알수 있었음.
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 경우 검토한 4개의 기질에 대해 모두 가수분해능을 보이기 때문에 CE (또는 FAE) 분류기준상 C 또는 D에 속함 (표2).
- 그러나, N-말단 아미노산 서열 상동성에서 *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE (α/β 가수분해 효소)는 C (클로로제나아제, 탄나아제)와 D (자일라나아제)와 일치하지 않음.
- 이러한 결과는 곰팡이 유래의 CE (또는 페룰로이 에스터라아제)에 기초를 둔 기능적 분류가 유산균 유래의 CE의 생화학적 특성을 설명하기에는 충분치 않으며, 유산균 유래 CE에 대한 연구가 더 필요하다고 사료됨.
- *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 클로로제닉산에 대한 기질 전환능을

확인하기 위하여 시간에 따른 카페인산 생성량으로 확인함.

- 60분 동안 효소반응을 실시한 결과 공여한 기질의 95.3%에 해당하는 약 9.5mM 클로로제닉산이 본 효소에 의하여 점차적으로 분해되어 카페인산 8 mM이 생성되어짐을 확인함 (Fig. 83).
- 클로로제닉산과 카페인산의 생리학적 중요성은 장내 흡수와 이후의 타겟 조직과의 상호작용을 위한 생체 이용률에 의존적임. 최근 많은 연구는 쥐와 인간에서 이들의 흡수 메카니즘에 초점을 두고 있으며, 이러한 연구에서 카페인산은 클로로제닉산보다 더 효율적으로 흡수된다고 보고되고 있음. 따라서 CE 활성화에 의해 강화된 카페인산은 장내에 흡수되어 생체이용률을 증가시키고 이것은 숙주에도 유익한 효과를 제공할 것으로 사료됨.

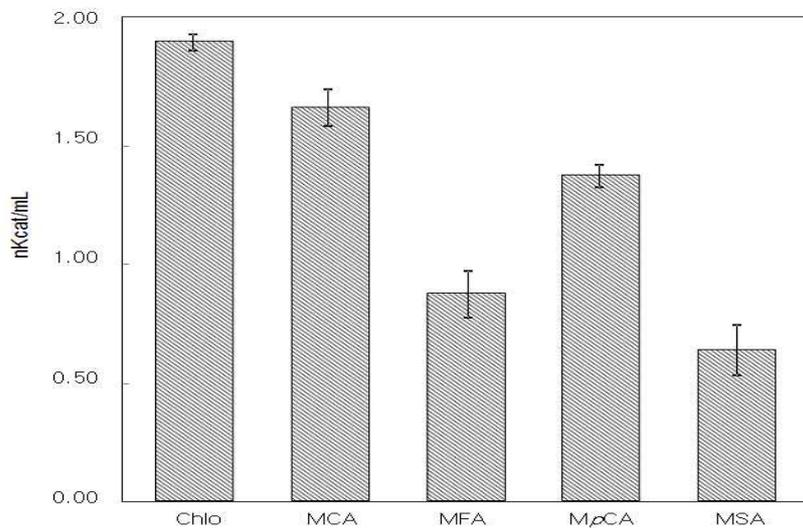


Fig. 82. *L. acidophilus* NCFM F46 유레 재조합 CE의 기질 특이성 클로로제닉산 (Chlo), 메틸카페인산(MCA), 메틸 페루레이트(MFA), 메틸 파라 쿠마레이트 (MpCA), 메틸 시나페이트(MSA)

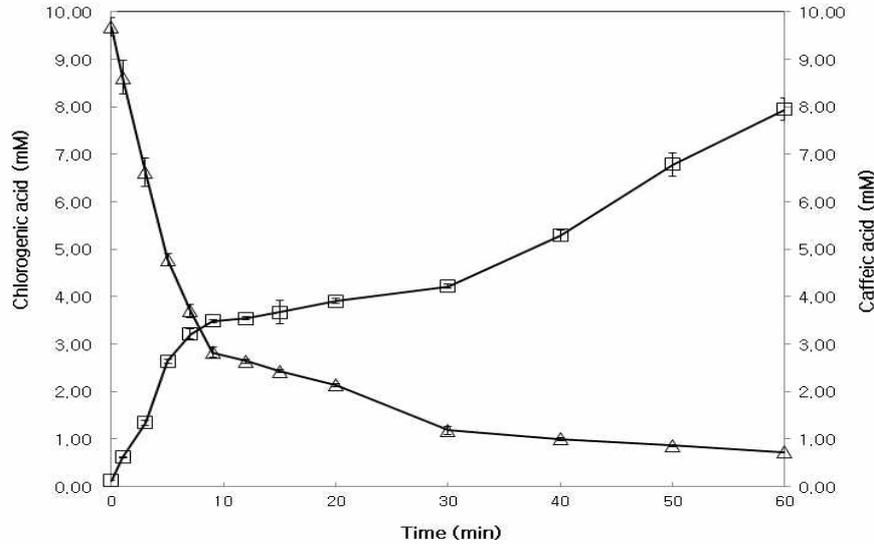


Fig. 83. *L. acidophilus* NCFM F46 유래 재조합 CE의 클로로제닉산의 전환율
 CE 활성은 10 mM 클로로제닉산을 이용하여 37°C에서 60분간 측정

. 시나모일 에스테라아제 활성 보유 유산균의 프로바이오틱스로서 적합성 검토

(1) 인간 장내 부착능

- 분리된 유산균의 인간 장내 상피세포를 이용한 장내 부착능을 검토하였음. 실험에 사용한 인체 결장암 세포주 Caco-2 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 분양 받아 사용하였음. Caco-2세포는 10% FBS (Hyclon, USA)와 1% 스트렙토마이신/페니실린 (10,000 IU/mL, Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyxlone, USA)에서 37°C, 5% CO₂/95% air 조건에서 배양하였d.a. 장내 부착능 실험은 24 well tissue culture plate에 5 X 10⁵ cell/well로 주입한 후 격일로 배지를 바꿔주었으며 세포가 완전하게 단일층을 형성할 때까지 14일 동안 분화시켜 사용하였음. 부착실험 1시간 전에 세포는 인산염완충액(pH 7.2)으로 3회 세척 한 후 항생제와 FBS가 들어 있지 않는 DMEM 배지와 함께 열처리 (110°C, 15분)된 유산균 (10⁸⁻⁹ CFU/mL)을 접종하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 2시간 반응하였음. 반응 후 부착하지 못한 균을 제거하기 위해 인산염완충액(pH 7.2)으로 3회 세척한 다음 재현탁 한 후 희석하여 MRS 평판배지에서 생균수를 측정하였음.

$$[\text{부착율}(\%)] = (\text{살아있는 세포수} / \text{초기 세포수}) \times 100$$

- 실험 결과 *L. paracasei* JBCC10650 (12.3%), *L. curvatus* JBCC47 (11%), *L. curvatus* JBCC60 (14%), *L. curvatus* JBCC93 (14%)는 양성 대조균으로 상업적으로 많이 사용되어지는 *L. rhamnosus* GG (10.1%)보다 높은 부착율을 보여주었음. 또한 *L. plantarum* JBCC10658 (9.6%) *L. pentosus* JBCC10659 (9.8%), *L. curvatus*JBCC65 (8%), *P. pentosaceus* JBCC104 (9%), *P. pentosaceus* JBCC106 (8%)균주에서도 비교적 높은 부착율을 확인할 수 있었음. 한편 *L. sakei* 2 균주에서

는 부착능이 거의 없었으며, *L. curvatus*종은 JBCC38 (1%)를 제외하곤 모두 높은 부착능을 보여주었음 (Fig. 84).

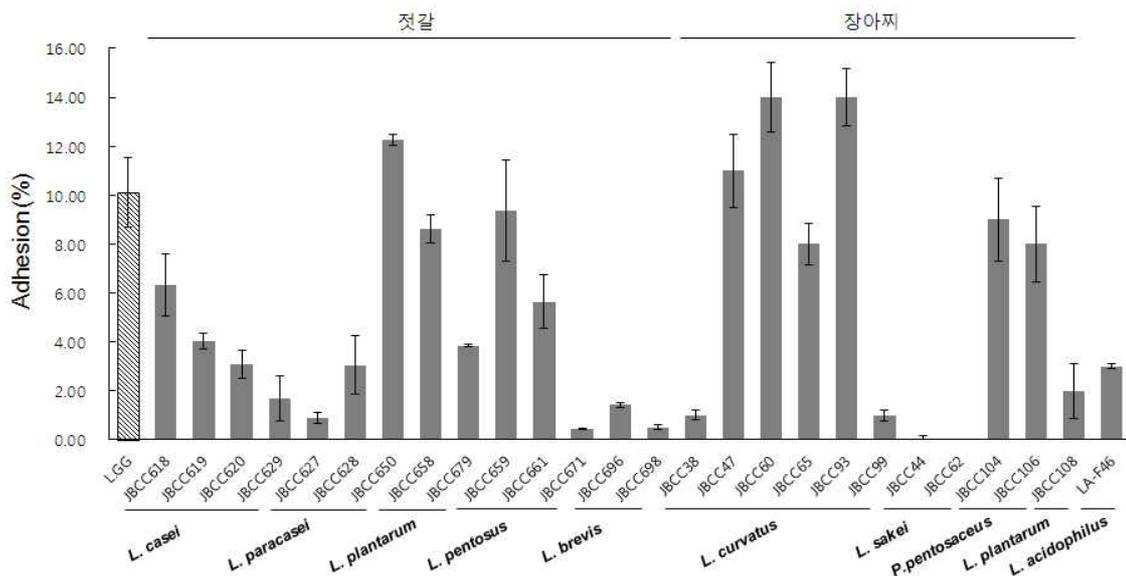


Fig. 84. 전통발효식품(젓갈, 장아찌)로부터 분리한 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균의 Caco-2 cell에 대한 부착능

(2) 면역 조절 특성

(가) 세포 독성 (MTT분석)

- 분리한 유산균의 면역 조절 능력을 측정하기 전에 RAW 264.7세포에 대한 유산균의 세포독성을 확인하였음. RAW 264.7세포(5×10^5 cells/mL)을 96-well 평판에 분주한 뒤 2시간 안정화시킨 후 열처리 (110°C, 15분)된 유산균 (1×10^9 CFU/mL), 양성대조군 LPS (1ug/mL) 및 음성대조군 (DMEM 배지)을 각각 처리한 뒤 48시간 동안 배양하였음. 세포독성은 EZ-CYTOX kit (daellab, Korea)를 이용하여 측정하였음. 배양 후 배지를 제거한 후 Ez-Cytox 5uL를 각 well에 첨가 한 후 2시간 반응 (37°C, 5% CO₂)시켰음.
- 540nm에서 흡광도 측정한 결과 LPS 처리군의 값이 1인 것과 비교하였을 때 분리된 26개 유산균 모두 음성대조군(3.9)과 유사한 세포 성장을 보여 실험에 사용된 유산균에 의한 세포독성은 관찰되지 않았음 (Fig. 85).

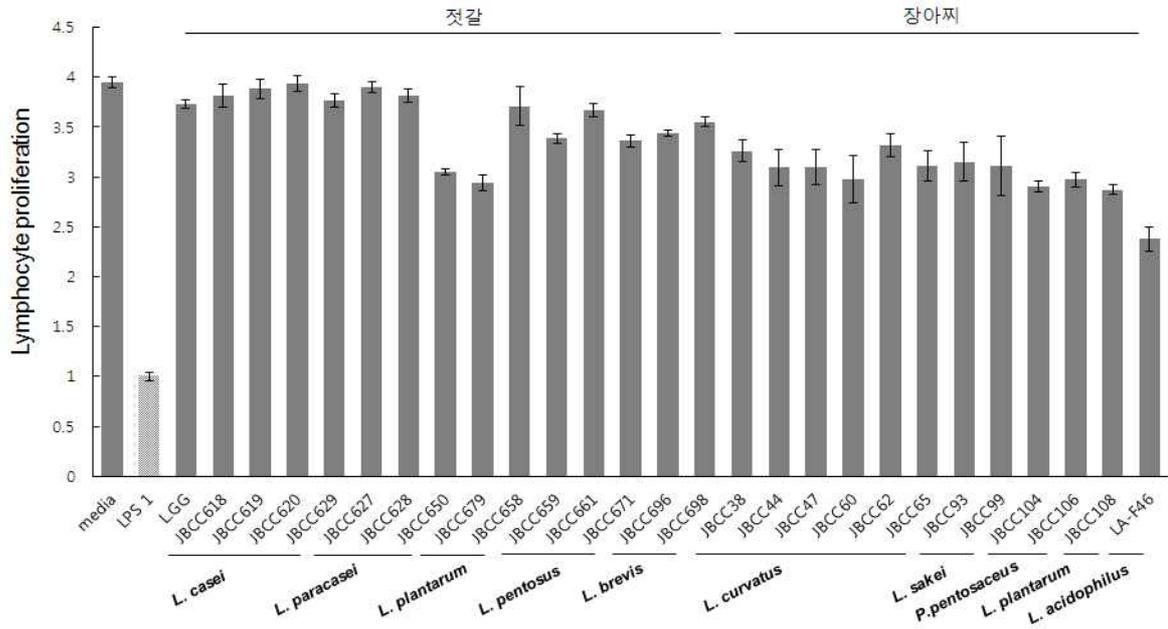


Fig. 85. Raw 264.7 세포에서 MTT 분석을 이용한 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균의 세포 독성

(나) 일산화질소(Nitric Oxide, NO)생성

- 사이토카인 및 LPS 같은 내독소에 의해 생성되는 NO 생성량을 측정함으로써 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균의 면역에 대한 효능을 확인해보고자 하였음.
- 일산화질소 생성량은 RAW 264.7세포(5×10^5 cells/mL)을 96-well plate에 분주 한 뒤 2시간 안정화시킨 후 열처리 (110°C, 15분)된 유산균 (1×10^9 CFU/mL), 양성대조군 LPS (1ug/mL) 및 음성대조군 (DMEM 배지)을 각각 처리하여 48시간 동안 배양하였음. 그 후 배양액을 회수하여 Griess reagent system (Promega, USA)를 사용하여 NO를 측정하였d.a. 96-well plate에 배양액 50 μ L를 넣고 Griess reagent I 용액 (NED)과 II 용액(Sulfanilamide)을 동량으로 섞어 넣고 10분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도 측정하였음.
- 그 결과 Fig. 86에서 보여주듯이, 배지만 처리한 음성 대조군에서는 3.2 uM이었으나, 대식세포의 활성화를 유도하는 물질로 알려진 *E. coli*의 LPS(1ng/mL)를 양성 대조군으로 사용하였을 때 21 uM의 높은 NO가 생성되어 음성대조군 대비 약7배 증가함을 확인할 수 있었음.
- 이러한 결과는 면역효과가 우수한 것으로 알려진 *L. rhamnosus* GG (L.GG)의 NO 생성량(18.5 uM)에 비해서도 상당히 높은 생성량을 나타냄을 확인할 수 있었음. *L. casei* 4 종 (JBCC618, 619, 620, 629)은 평균 10 uM의 NO로 분리된 26 개의 유산균주 중에서 가장 낮은 생성량을 나타내었음.

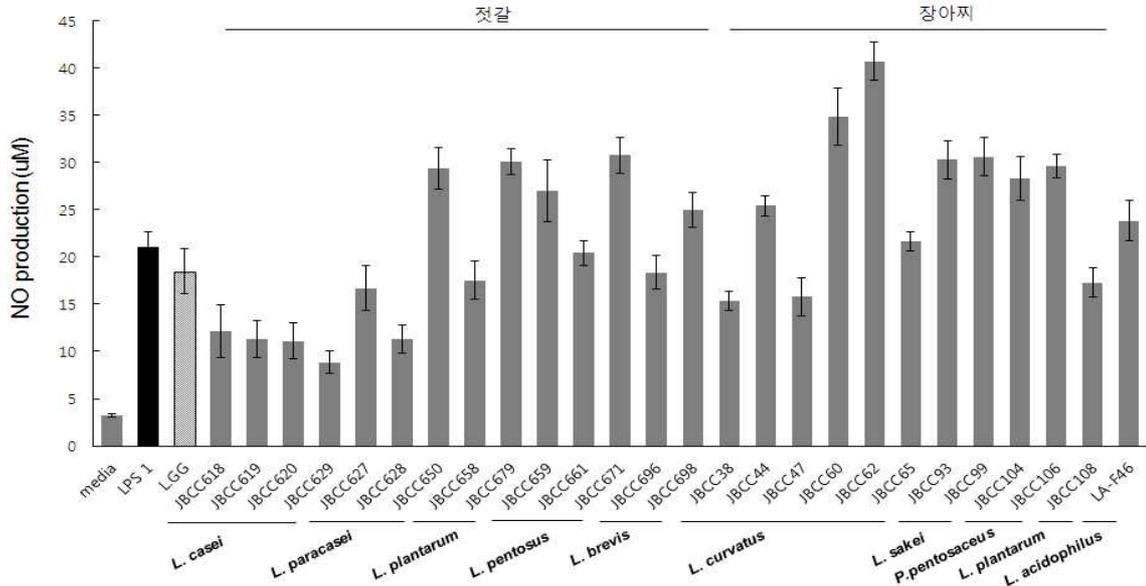


Fig. 86. Raw 264.7 세포에서 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균의 NO 생성능

(다) ELASA를 이용한 TNF- α , IL-6 생성

- 열처리된 유산균체 산물이 대식세포의 TNF- α , IL-6 생산에 미치는 영향을 조사하기 RAW 264.7 (5×10^5 cells/mL)을 96-well plate에 분주 한 뒤 2시간 안정화 시킨 후 110°C 에서 15분간 열처리된 유산균 (1×10^9 CFU/mL), 양성대조군 LPS (1ug/mL) 및 음성대조군 (DMEM 배지)을 각각 처리한 뒤 24시간 동안 배양한 후 상등액 50 μL 를 취하여 염증반응을 유발하여 면역작용을 하는 염증반응을 유도하는 사이토카인 중 대표적인 TNF- α , IL-6를 ELASA kit (BD OptELA™)를 이용하여 측정하였음.
- 그 결과 양성 대조군으로 LPS 1ug/mL첨가 시, TNF- α 의 다량 분비를 유도하였음 (Fig. 87A). 젓갈 및 장아찌에서 분리한 유산균의 TNF- α 생성은 *L. paracasei* JBCC 650, *L. pentosus* JBCC 661, JBCC 671, *L. curvatus* JBCC 38 에서 LPS 처리한 것 (329 ng/mL)보다 높은 생성량을 보였으며, *L. casei* JBCC618, *L. paracasei* JBCC628, *L. curvatus* JBCC 60, *L. curvatus* JBCC 65, *L. sakei* JBCC 62는 LPS 와 비슷한 수준으로 유도되었다. *L. curvatus* JBCC 47 (94 ng/mL)는 분리한 유산균 중에서 TNF- α 를 가장 적게 생성하였으며, *L. curvatus* JBCC99 *P. pentosaceus* JBCC104, *P. pentosaceus* JBCC106, *L. plantarum* JBCC108 면역활성 유산균으로 알려진 *L. rhamnosus* GG (153 ng/mL)과 유사한 생성량을 보였음. IL-6 또한 양성 대조군으로 LPS 1ug/mL첨가 시 120 ng/mL의 다량 분비를 유도하였다 (Fig. 87B).
- 이와 대조적으로 열처리 유산균 처리군 및 *L. rhamnosus* GG 에서는 5-22.8 ng/mL 의 범위에서 IL-6를 분비하여 LPS보다 매우 적게 유도되었으나 거의 생성되지 않은 음성 대조군(0.007 ng /mL)보다는 유도되었음을 알수 있었음.

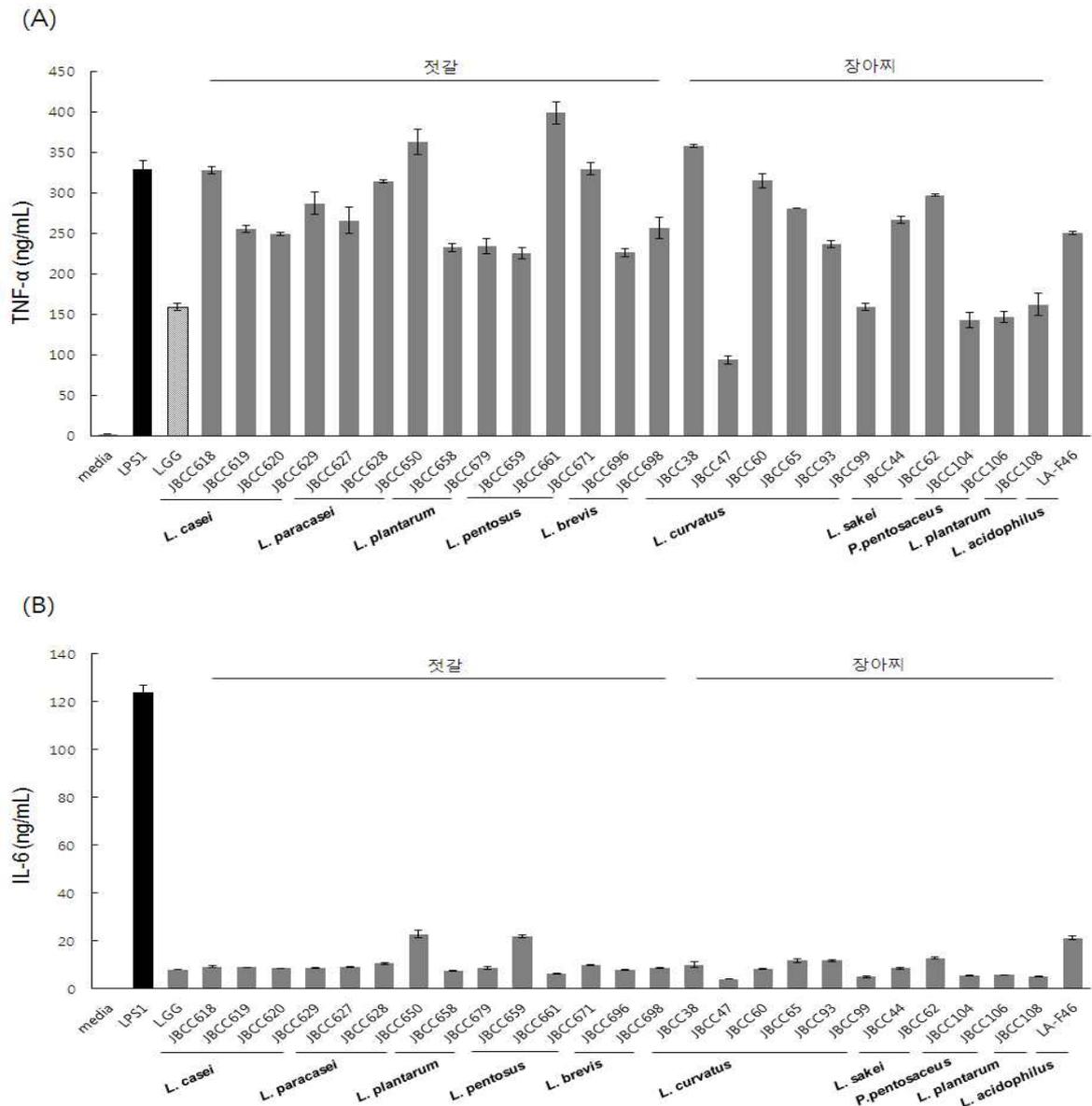


Fig. 87. Raw 264.7 세포에서 TNF- α (A), IL-6(B) 생성의 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균의 영향

(라) RT-PCR을 이용한 사이토카인 발현 측정

- 유산균 처리 후 RAW264.7에서 사이토카인 생성을 효과적으로 조절하는 것을 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 위와 동일하게 유산균을 처리한 후 원심분리를 통해 얻은 세포의 RNA는 NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel)를 이용하여 분리하였음. 추출된 RNA는 농도를 측정 후 1ug을 ReverTraAce qPCR RT Master Mix kit (TOYOBO)를 이용하여 oligo-dT 프라이머로 cDNA를 합성하였음. cDNA를 1:5로 희석한 후 Table 58의 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였음. GAPDH를 항존 유전자로 사용하여 표준화하고 델타델타 CT값으로 계산하였음.

Table 58. 본 연구에 사용된 사이토카인 유전자 프라이머 서열

No.	Gene		Primer sequences	Size (bp)
1	GAPDH	F	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTAC-3'	122
		R	5'-TCAGTGGGCCCTCAGATGC-3'	
2	COX-2	F	5'-CTCAGCCATACAGCAAATCCTT-3'	101
		R	5'-GTCCGGGTACAATCGCACTTAT-3'	
3	iNOS	F	5'-CCAGCCTGCCCTTCAAT-3'	104
		R	5'-ATCCTTCGGCCCACTTCCT-3'	
4	IL-1b	F	5'-TGACGGACCCAAAAGAT-3'	122
		R	5'-GTGATACTGCCTGCCTGAAG-3'	
5	IL-6	F	5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAGAG-3'	107
		R	5'-TCATTTCCACGATTTCCCAGAG-3'	
6	TNF- α	F	5'-AGGCACTCCCCAAAAGATG-3'	122
		R	5'-CACCCCGAAGTTCAGTAGACAGA-3'	
7	IL-10	F	5'-GCTGGACAACATACTGCTAACCGACTC-3'	141
		R	5'-TCCTTGATTTCTGGGCCATGCTTCTCT-3'	
8	IL-12	F	5'-CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG-3'	121
		R	5'-CTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC-3'	
9	TGF- β	F	5'-GCTACCATGCCAACTTCTGTCTG-3'	106
		R	5'-GAAGCGCCCGGGTTGTGTTGGTTGTAG-3'	

- 시나모일 에스테라아제활성 보유 유산균에 의한 대식세포 (Raw 264.7)의 사이토카인 생성을 측정 한 결과, 실험에 사용된 유산균 중에서 세 개의 유산균 *L. paracasei* JBCC650, *L. pentosus* JBCC659, *L. pentosus* JBCC671는 염증성 사이토카인인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6을 동시에 강하게 유도함으로써 면역 촉진성 기능을 가지는 유산균일 가능성이 있을 것으로 사료됨(Fig. 88).
- 최근에 IL-12, IL-10의 생산 및 임상적 효능을 유발에서 생균제의 효과 사이의 관계가 주목 받고 있음. 일반적으로 IL-12 생성을 강하게 유도하는 균주는 염증 예방에 효과적이라고 예상되며, 내재적 면역 시스템의 활성화를 통해 암 위험을 낮춰주고 Th1/Th2 balance의 조절을 통해 알레르기 반응을 저해시킨다고 알려져 있음 (Murosaki et al., 2000). IL-10은 TGF- β 와 더불어 대표적인 항염증성 사이토카인이며, IL-10은 염증 초기의 Th2세포에서 분비되어 Th1세포의 IFN- γ 분비를 억제하며, 여러 가지 다른 세포의 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 항염증 작용을 한함. 따라서 IL-10의 생성을 증가시키는 유산균의 경우 강력한 항염증성 기능을 가질 수 있음. 테스트된 균주 중에서 *L. casei* 4 균주 모두 IL-10와 TGF- β 를 음성 대조군 (media) 및 양성 대조군 LPS와 비교하여 강하게 유도되었으며, 동시에 IL-12을 생성

하였음.

- 흥미롭게도 이 균주는 염증 반응에 의해 합성되는 iNOS 및 COX-2 생성을 감소시켜 항염증성 기능을 가지는 유산균일 가능성이 높음. 특히 이중에서도 *L. casei* JBCC619는 높은 항균활성과 함께 IL-10, TGF- β 및 IL-12를 강하게 유도하여 염증성면역 장애의 조절에 치료적으로 유용할 것으로 사료됨. *L. casei*는 이전 연구에서도 항염증성 사이토카인의 분비를 촉진한다고 알려져 있음 (Shida et al., 2006).

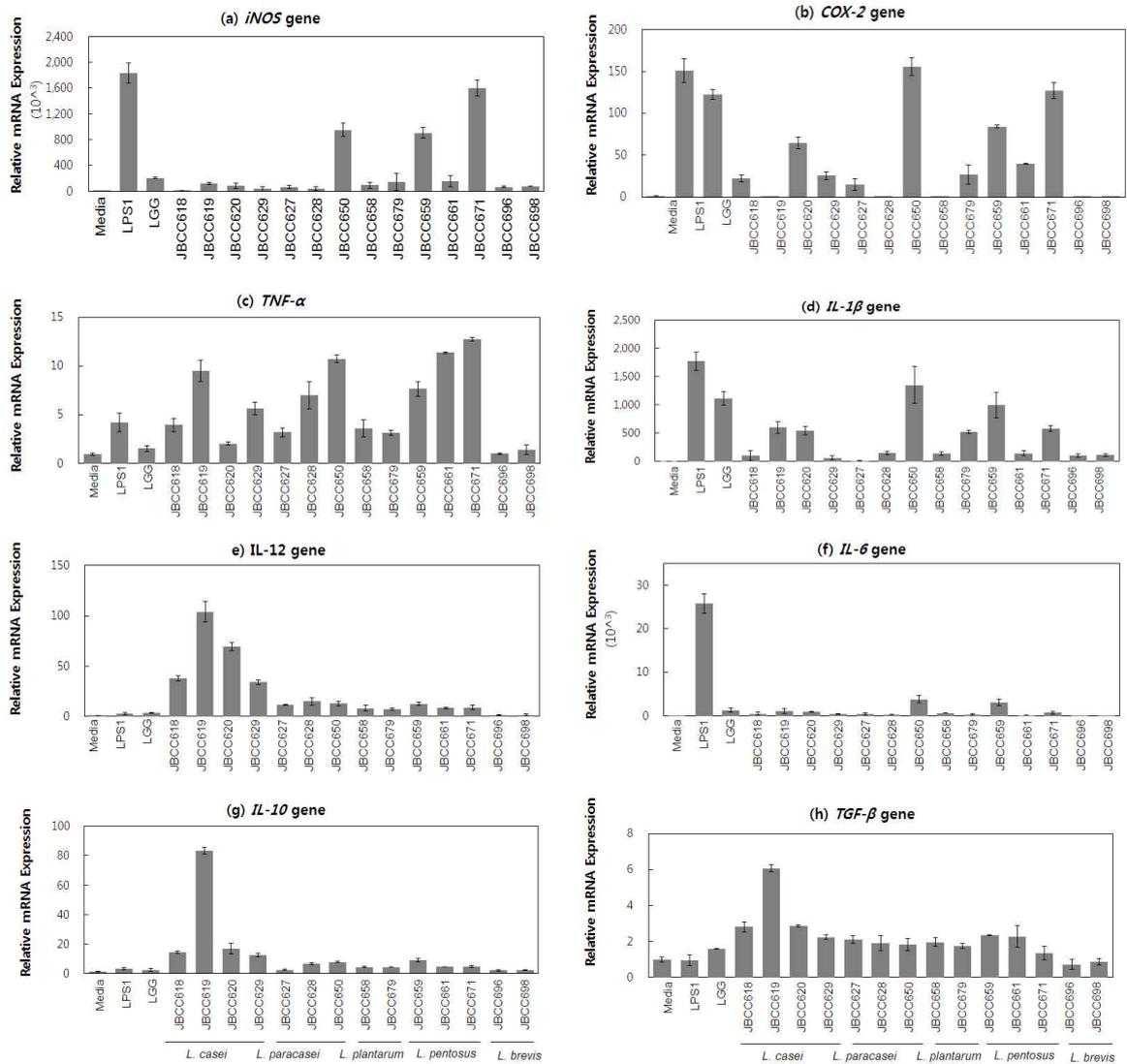


Fig. 88. Raw 264.7 세포에서 사이토카인 생성의 시나모일 에스테라제활성 보유 유산균의 영향 (a) iNOS, (b) COX-2 (c) TNF- α , (d) IL-1 α , (e) IL-6, (f) IL-12, (g) IL-10 and (h) TGF- β

아. 마우스 모델을 이용한 신바이오틱스 혼합물의 장기능 개선 및 면역증진 효과 검증

(1) 실험내용

(가) 쥐 model을 이용한 실험디자인 설계

- 본 실험에서는 30마리의 수컷 C57BL/6계 검정쥐 마우스를 Samtaco(한국)에서 구입하여 사용하였음. 1주일간 AIN-76 식이를 기본으로 한 Normal 식이로 적응시킨 후, 10마리씩 6개 그룹으로 분류하여 10주간 실험하였고 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였음. 실험 동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였음.
- 그룹 1은 대조구로 정상 식이(Normal diet, ND)와 PBS, 그룹 2는 Colorectal Cancer 대조군으로서, 1주일간 적응 기간을 가진 후 Azoxymethane(AOM)을 복강투여 하고 음수에 Dextran Sodium Sulfate(DSS) 2.5%와 PBS, 그룹 3은 Azoxymethane(AOM)을 복강투여 하고 음수에 Dextran Sodium Sulfate(DSS) 2.5%와 선발된 probiotics (L.gasseri 505 10⁸CFU/ml), 그룹 4는 Azoxymethane(AOM)을 복강투여 하고 음수에 Dextran Sodium Sulfate(DSS) 2.5%와 L.gasseri 505와 꾸찌빵 추출물이 함유된 비발효유(1500mg/kg/day), 그룹 5는 Azoxymethane(AOM)을 복강투여 하고 음수에 Dextran Sodium Sulfate(DSS) 2.5%와 꾸찌빵 추출물이 함유된 L.gasseri로 발효한 발효유(1500mg/kg/day), 그룹 6은 양성 대조군으로서, Azoxymethane(AOM)을 복강투여 하고 음수에 Dextran Sodium Sulfate(DSS) 2.5%와 Astaxanthin(200ppm/day)를 처리하였음(Table 59).
- 실험 기간은 총 10주로 실험군은 1주간의 적응기간을 가진 후 실험 시작일에 Azoxymethane(AOM)을 10mg/kg로 복강투여하여 발암을 유도한 후, 10주간 샘플들을 처리하여 진행하였음(Fig 89). 이것은 샘플들이 대장암의 예방효과와 치료효과를 동시에 확인해 볼 수 있는 디자인으로써 고부가가치의 기능성을 파악해 볼 수 있음.

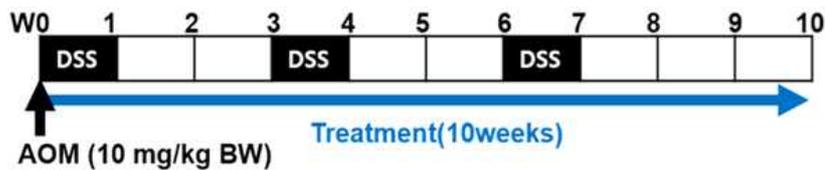


Fig 89. 실험 기간 및 처리 시기 모식도

Table 59. 실험 그룹 별 디자인

그룹	AOM/DSS	Treatment
N (n=8)	-	PBS
C (n=8)	+	PBS
505 (n=8)	+	<i>Lactobacillus gasseri</i> 505
505CT (n=8)	+	<i>Lactobacillus gasseri</i> 505 + 꾸찌뽕 추출물 (비발효)
F-505CT (n=8)	+	<i>Lactobacillus gasseri</i> 505 + 꾸찌뽕 추출물 (발효)
PC (n=8)	+	Astaxanthin

(나) 발효유 제조

- 선발된 균주(*L.gasseri* 505)를 10⁸ CFU/ml 접종하고 꾸찌뽕 추출물을 첨가하여 비발효(0시간) 혹은 발효(40시간) 후 동결건조를 진행하였음.

(다) 체중변화 측정

- 체중은 일주일 간격으로 일정한 시간에 디지털 계량기를 사용하여 측정함.

(라) 분변 샘플링

- 분변은 실험 시작일, 5주차, 10주차로 총 세 차례에 걸쳐 샘플링 한 후 -70℃에서 냉동 저장, 보관하며 실험에 사용함.

(마) 대장 길이 및 대장 내 종양 개수와 크기 측정

- 실험이 종료되고 모든 실험동물의 대장을 적출하여 길이를 측정하여 비교하였음. 또한 대장을 종으로 절단하여 종양의 개수와 그 크기를 측정하였음.

(바) 대장 조직에서 전염증, 항염증, 항산화, 종양 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- -70℃ 냉동고에 보관해 놓았다가 고르고 잘게 다지고 으갠 0.2g 대장 조직을 Trizol 을 이용하여 RNA를 추출하였음. 최종 RNA 농도는 NanoDrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.,Wilmington, USA)을 이용하여 측정하였으며 최적의 RNA sample을 이용하기 위해 260nm와 280nm에서 측정된 O.D. 값의 ratio를 가지고 RNA의 purity가 1.8에서 2.1사이에 있는 sample만 사용하였음. cDNA는 cDNA synthesis kit(LeGene Biosciences, San Diego, DA, USA)에 의해 합성되었고 85℃에서 5분간, 45℃에서 50분간 incubation되었음.
- Real-time PCR은 KAPA SYBR Fast qPCR kit (Kapabiosystem)을 사용하여 Step

One Plus™ Real-Time PCR System으로 수행하였음. GAPDH를 housekeeping gene으로 하여 target 유전자의 발현정도를 정량하였음. Target 유전자는 Table 60 과 같음.

Table 60. Oligonucleotide primer sequences

Primer	Sequence (5'-3')		Annealing Temp.
TNF- α	Forward	5'-CTGAACTTCGGGGTGATCGG-3'	62.0°C
	Reverse	5'-GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3'	
IL-4	Forward	5'-GGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3'	61.5°C
	Reverse	5'-GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT-3'	
IL-10	Forward	5'-CTTACTGACTGGCATGAGGATCA-3'	60.5°C
	Reverse	5'-GCAGCTCTAGGAGCATGTGG-3'	
MUC2	Forward	5'-ATGCCACCTCCTCAAAGAC-3'	55.5°C
	Reverse	5'-GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA-3'	
TFF3	Forward	5'-TAATGCTGTTGGTGGTCCTG-3'	63.5°C
	Reverse	5'-CAGCCACGGTTGTTACTACTG-3'	
p53	Forward	5'-CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT-3'	60.5°C
	Reverse	5'-AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG-3'	
p21	Forward	5'-CCTGGTGATGTCCGACCTG-3'	61.5°C
	Reverse	5'-CCATGAGCGCATCGCAATC-3'	
Bax	Forward	5'-AGACAGGGGCCTTTTTGCTAC-3'	61.5°C
	Reverse	5'-AATTCGCCGGAGACTCG-3'	
IL-1 β	Forward	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	57°C
	Reverse	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'	
IL-12	Forward	5'-TACTTACCCTCCAACCTCCC-3'	55°C
	Reverse	5'-GACCCATTTACATCTACTC-3'	
i-NOS	Forward	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	64.5°C
	Reverse	5'-GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
IFN- γ	Forward	5'-AGCCCTATTACAGCACAG-3'	56.5°C
	Reverse	5'-TTCTAACAACAAGTATCCC-3'	
IL-6	Forward	5'-AAGTCGGAGGCTTAATTACACATGT-3'	56°C
	Reverse	5'-CCATTGCACAACCTCTTTTCTCATTC-3'	
ZO-1	Forward	5'-AGGACACCAAAGCATGTGAG-3'	53.5°C
	Reverse	5'-GGCATTCTGCTGGTTACA-3'	
Occludin	Forward	5'-TCTGCTTCATCGCTTCCTTAG-3'	56°C
	Reverse	5'-GTCGGGTTCACTCCCATTA-3'	

COX-2	Forward	5'-GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCT-3'	58.5°C
	Reverse	5'-GCTCCTGCTTGAGTATGTCG-3'	
Bcl-2	Forward	5'-GCTACCGTCGTGACTTCGC-3'	60.5°C
	Reverse	5'-CCCCACCGAACTCAAAGAAGG-3'	
GAPDH	Forward	5'-GACGGCCGCATCTTCTTGT-3'	58.5°C
	Reverse	5'-CAGTGCCAGCCTCGTCCCGTACAA-3'	

(사) 대장 조직의 병리조직학적 분석

- Mouse로부터 적출하여 10% formaldehyde에 고정한 대장조직은 ethanol에서 탈수하고 xylene에서 세척한 후 paraffin block을 제조함. 5 μ 두께로 박절하고 slide glass에 올려 Harris' hematoxylin에 2분 30초 동안 정치시킴. 물로 세척 후 차례로 acid alcohol, ammonia water에서 2-3번 담구고, 물에 옮겨서 10분 동안 정치시킴. Eosin-phloxine으로 상온에서 2분 동안 염색함. 염색된 slide를 95% alcohol, xylene에서 차례로 옮겨서 염색되지 않은 염료를 제거하고, slide 건조 후 광학현미경으로 100배의 배율에서 관찰함.

(아) 분변에서 Immunoglobulin A 량 측정

- -70°C 냉동고에 보관해 놓았던 분변을 100mg씩 정량하여 PBS 1ml에 다지고 으갠 후 6,400g, 4°C 조건에서 15분간 원심분리 실시함. 상등액을 7,200g, 4°C 조건에서 10분간 원심분리 실시함. Mouse IgA ELISA Kit (KOMA BIOTEC.)를 이용하여 상등액의 IgA 양을 측정함.

(자) 통계 처리

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

(2) 실험 결과

(가) 체중변화

- 10주간의 체중변화는 Figure 8에 나타내었음. 최종(10주차) 체중에 있어 정상 그룹(29.94 \pm 1.00g)에 비하여 AOM/DSS 대조군(24.40 \pm 0.63g)의 체중은 유의적으로 감소하였음. *L.gasseri* 505(24.93 \pm 1.99g), 505CT(24.43 \pm 1.09g)를 처리한 그룹에서는 AOM/DSS 대조군과 유의적 차이가 없었음. 반면에, F-505CT(26.56 \pm 0.67g)를 처리

한 그룹은 AOM/DSS 대조군에 비해 효과적으로 체중이 증가한 것을 확인할 수 있었음.

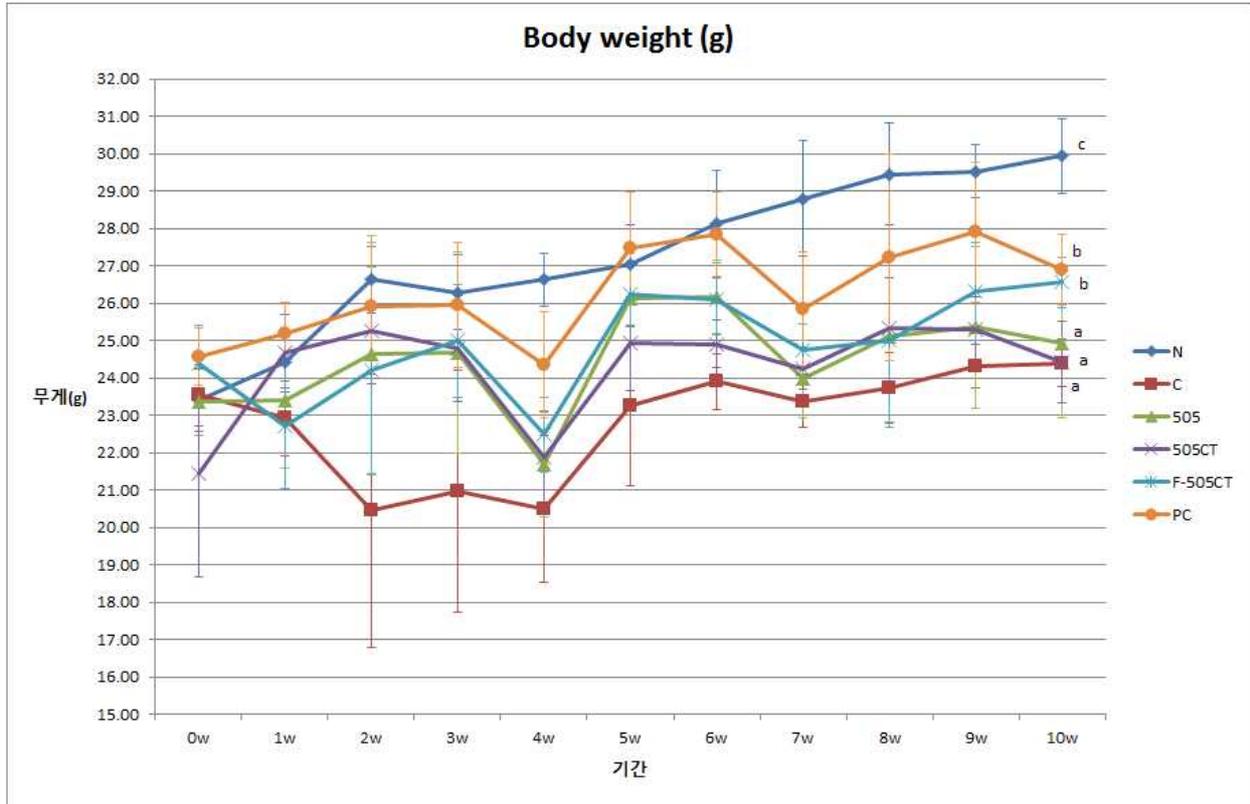


Fig. 90. 체중변화

(나) 대장 길이 및 대장 내 종양 개수와 크기 측정

- 종양 발현 정도를 알아보기 위해 대장 길이 및 대장 내 종양 개수와 크기를 측정함. 대장 길이는 그룹 별 대표 이미지(Fig. 91)와 평균 길이로 나타내었음(Fig. 92). 그룹 별 평균 길이를 비교해보았을 때, 유의적 차이는 나타나지 않았음.



Fig. 91. 그룹 별 대표 대장 이미지

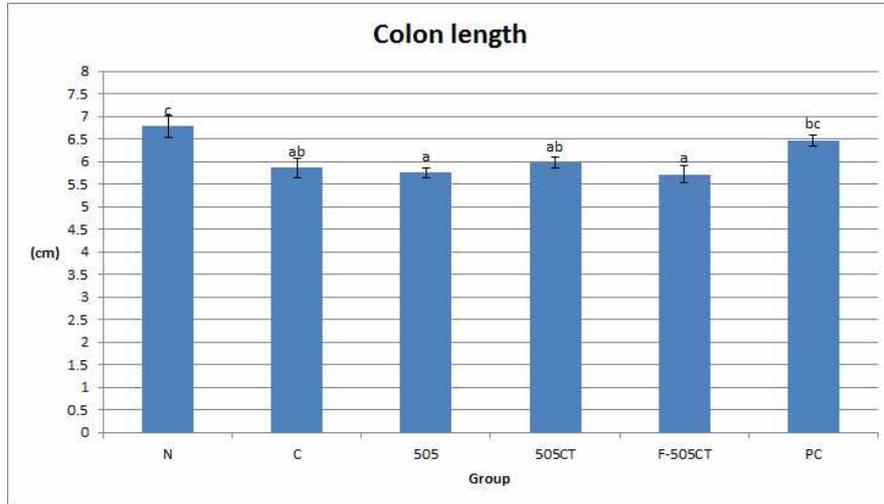


Fig. 92. 그룹 별 평균 대장 길이

- 실험 동물의 종양 크기별 총 개수는 Fig. 93에 나타내었음. AOM/DSS 대조군의 총 종양 개수에 비해 L.gasseri 505와 505CT, F-505CT, Astaxanthin을 처리한 그룹에서 모두 줄어드는 경향을 보임. 또한 종양의 크기도 직경 3mm를 기준으로 그 크기가 3mm 이상인 종양의 개수가 AOM/DSS 대조군에 비해 모든 그룹에서 감소한 경향을 보였고, 특히 F-505CT이 Astaxanthin과 같은 수준으로 가장 많이 감소한 것을 알 수 있음.

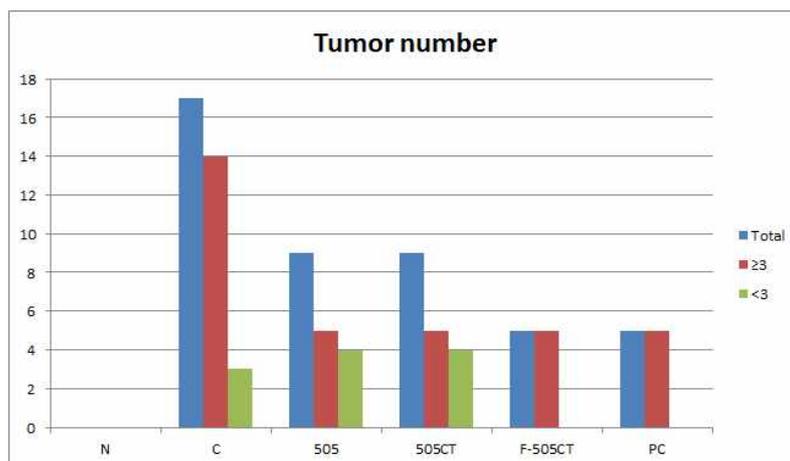


Fig. 93. 그룹 간 총 종양 개수와 종양 크기(3mm 기준 이상/미만)별 종양 개수

(다) 대장 조직에서 전염증, 항염증, 항산화 및 종양 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- 대장 조직에서 전염증, 항염증 및 항산화 관련 사이토카인의 mRNA 발현을 알아보았음. 전염증과 관련한 유전자로는 TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, 항염증 관련 유전자는 IL-4, IL-10, IFN- γ , 항산화 관련 유전자로는 i-NOS, tight junction 관련 유전자로는 ZO-1, occludin, MUC2, TFF3, 종양 억제 유전자로는 p53, p21, Bax, Bcl-2의

발현 정도를 각 그룹 사이에서 비교하였음.

- 대장에서 염증 조절을 담당하는 TNF- α 는 종양괴사인자로서 대식세포 등에서 생산되는 사이토카인임. 그 결과 B세포 자극 인자로 과잉 생산으로 면역 이상증, 염증성 질환, 종양의 발증과 관련이 있는 IL-6의 발현을 유도함.
- IL-12는 세포 면역을 자극하는 능력으로 인해 전염병 및 암 모델에서 강력한 백신 보조제로 사용될 수 있음. IL-12는 대식세포에서 생성되는 전염증성 사이토카인으로 T 세포 및 NK세포에 의한 INF- γ , IL-4 생산의 조절을 담당함(Amy K. Wesa et al., 2001).
- IL-10은 주로 Th2세포에서 생산되는 사이토카인으로 Th1세포의 IFN- γ 생성을 대식세포를 통해 억제하고 B세포의 생존율을 높이고 비만세포의 증식을 촉진함.
- 본 연구에서 전염증 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현은 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS 대조군에 비해 감소하는 경향성을 보였으며 특히, IL-1 β 발현에서 Astaxanthin 그룹과 F-505CT 그룹에서 유의적으로 감소하는 결과를 보임(Fig. 94).

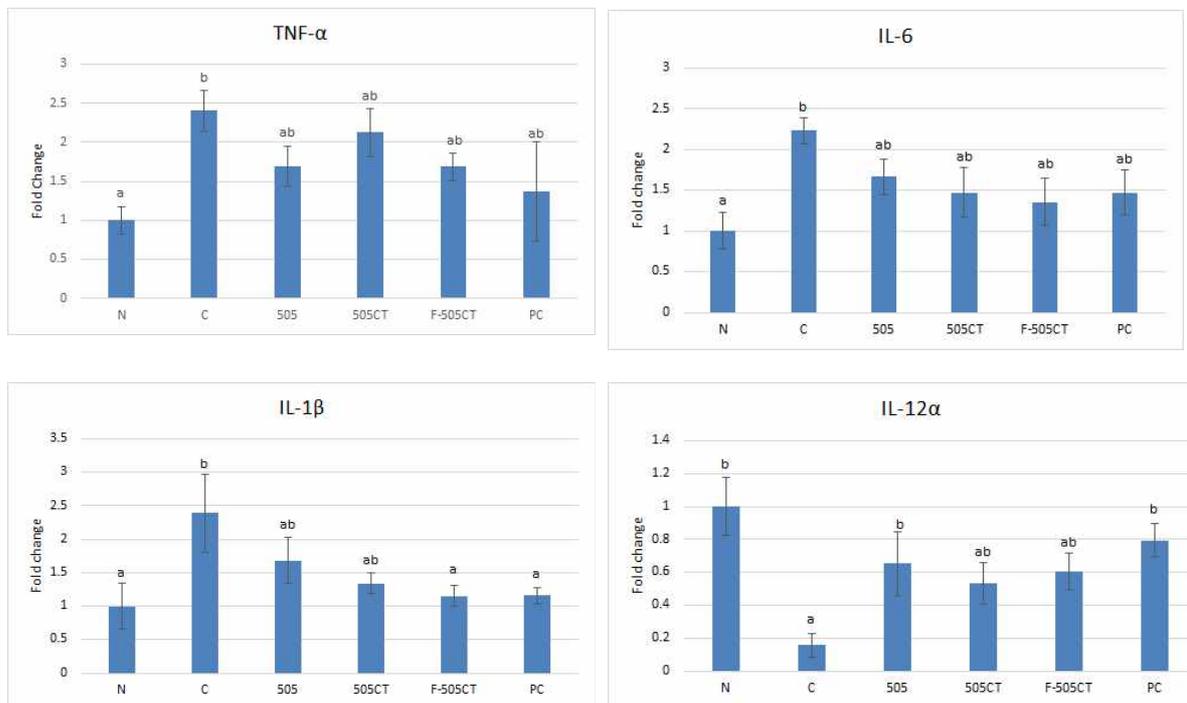


Fig. 94. 전염증 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- 본 연구에서 항염증 사이토카인인 IL-4, IL-10의 발현은 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS 대조군에 비해 증가하는 경향성을 보였으며 INF- γ 의 발현에서는 경향성과 유의적 차이를 보이지 않았음(Fig. 95).

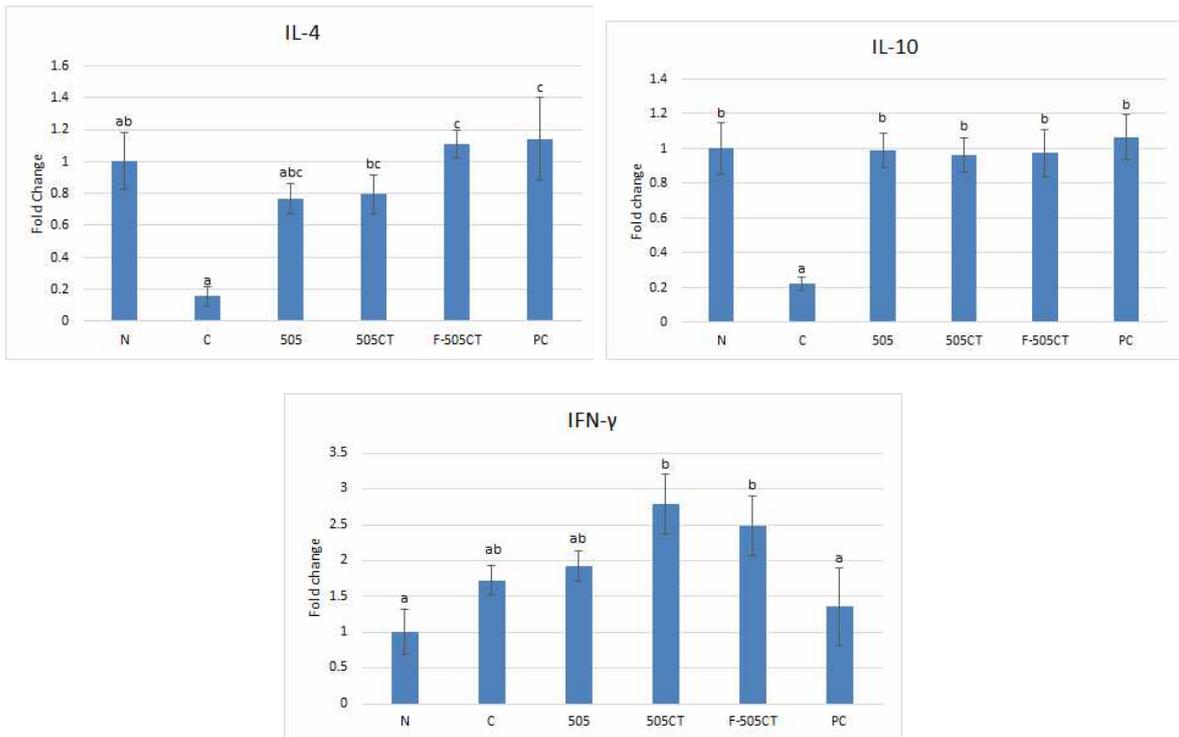


Fig. 95. 항염증 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- 산화스트레스란 체내에서 산화 촉진물질(pro-oxidant)과 산화 억제물질(anti-oxidant) 사이의 균형이 깨어져 산화촉진 쪽으로 기울어 가는 교란 상태로 잠재적인 산화 손상을 야기시킬 수 있는 상태를 의미하며 이는 세포에 치명적인 손상을 주는 것으로 알려져 있음(Reed, 1990). 또한 산화적 스트레스에 의해 DNA가 손상을 입으면 염기서열에 문제가 발생하므로 다른 유전정보가 전달되어 돌연변이를 유발시키고 세포를 병들게 하여 암을 유발시킬 수도 있음(Lovlin et al., 1987).
- 외부의 자극에 의해 형성되는 inducible NOS(iNOS)는 칼슘에 비의존적으로 과량의 NO를 생성시킴. 대식세포에 lipopolysaccharide나 TNF- α , IL-1 β 같은 염증성 사이토카인을 처리하면 NF- κ B가 핵으로 이동되어 전사됨으로서 iNOS효소가 발현되어 최종적으로 과량의 NO가 형성됨.
- iNOS에 의해 생성된 NO radical은 주로 이중, 삼중 결합으로 구성된 세포막의 인지질, DNA의 염기서열 그리고 여러 지질이나 단백질 부분을 공격하게 되며, 산화적 손상으로 기능장애와 돌연변이가 유발된 비정상 세포는 스스로 사멸하려는 Apoptosis를 진행하려고 하게됨. 하지만 돌연변이세포임에도 불구하고 세포사멸이 일어나지 않고 면역시스템 또한 이를 발견하지 못하고 성장을 계속하게 되면 종양이 되고 나중엔 암이 되어 결국 인체에 큰 피해를 끼치게 됨. (이양자 et al., 1998)
- 본 연구에서 항산화 관련한 단백질인 iNOS의 mRNA 발현을 측정한 결과, 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS

대조군에 비해 증가하는 경향성을 보였으며 특히, F-505CT 그룹과 Astaxanthin 그룹에서 유의적으로 감소되게 측정되었음(Fig 96).

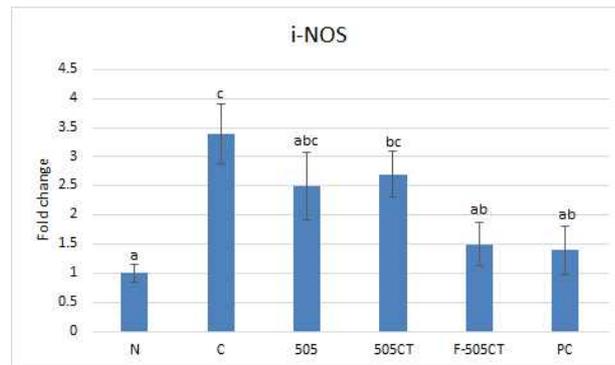
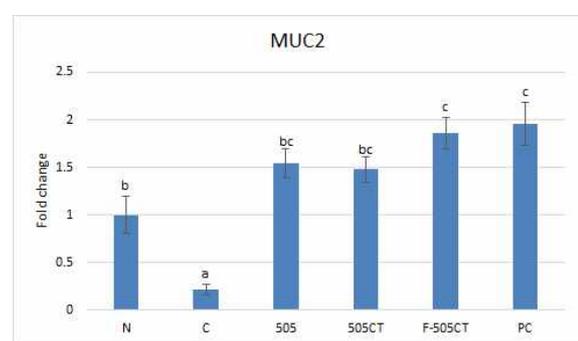
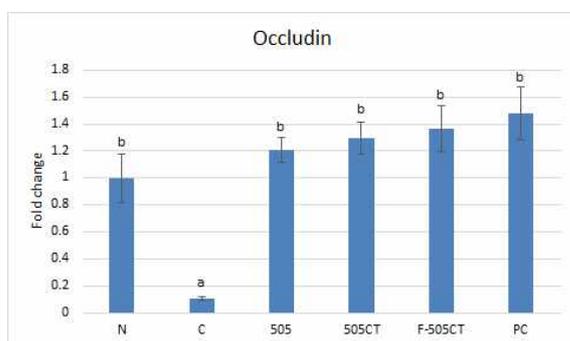


Fig. 96. 항산화 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- Tight junction 단백질의 접착분자인 occludin과 세포질의 특정 단백질인 ZO-1은 서로 결합하여 상피세포나 내피세포의 시트를 구성하는 세포사이의 장벽을 형성하고 유지하는데 필수적인 단백질임.
- MUC2와 TFF는 뮤신 단백질계로 장점막 표면에서 분비됨. MUC2는 장점막의 보호와 유지에 관여하며 불활성화 될 경우 종영 형성이나 발암유도를 유발하는 것으로 알려져 있음(Anna Velcich et al., 2002). TFF는 장 상피 세포를 활성화시키고 defensin과 같은 방어 관련 펩타이드의 생산을 유도함으로써 면역 체계에 적극적으로 참여하는 것으로 알려져 있음.
- 본 연구에서 장세포 및 장점막 관련한 단백질인 occludin, ZO-1, MUC2, TFF3의 mRNA 발현을 측정한 결과, 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS 대조군에 비해 증가하는 경향성을 보였으며 특히, F-505CT 그룹과 Astaxanthin 그룹에서 유의적으로 감소되게 측정되었음(Fig 15).



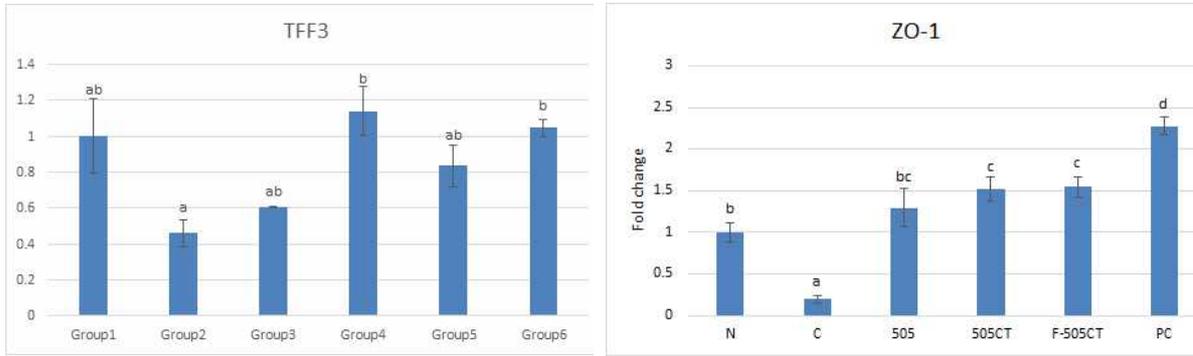


Fig. 97. 장세포 및 장점막 관련 사이토카인의 mRNA 발현

- 여포성 림프종에 나타나는 세포성 암유전자인 Bcl-2는 다른 암유전자와는 달리 여러 조건 하에서 유도되는 세포사를 억제시키는 기능이 있음. 이때 Bax는 Bcl-2 단백질과 헤테로 이합체를 형성하고 Bcl-2의 세포사 억제기능을 소멸시킴.
- 종양 억제 유전자로 알려져 있는 p53, p21 유전자는 세포분열이 과도하게 진행되어 종양을 형성하는 것을 막고 p53이 p21로 신호를 전달하면 p21이 cyclin과 cdk가 결합하는 것을 막아 세포분열을 막는 효과를 가져옴. p53유전자의 변이 및 결손은 인간 암종에서 가장 흔한 유전자 이상의 하나이며, 암 환자에서 이 유전자의 그 단백질의 발현은 암 생존율의 감소와 관련된다고 알려져 있음.
- 본 연구에서 종양 관련한 단백질인 Bax, p53, p21의 mRNA 발현을 측정된 결과, 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS 대조군에 비해 감소하는 경향성을 보였으며 특히, F-505CT 그룹과 Astaxanthin 그룹에서 유의적으로 증가되게 측정되었음(Fig 16).
- COX-2(Cyclooxygenase-2)는 프로스타글란딘(prostaglandins) 분자들의 생산을 담당하는 효소로 프로스타글란딘은 염증을 촉진 시킴. COX-2 활성을 차단 할 때, 염증은 감소되고 COX-2는 염증 조직에서만 활성화 됨. 소화관에서 조직 수선과정에 관여하여 이 위치에서의 종양 발달에 중요한 역할을 함.
- 본 연구에서 Bcl-2와 COX-2의 mRNA 발현을 측정된 결과, 정상 그룹과 AOM/DSS 대조군 간 유의적인 차이를 보였고 나머지 모든 그룹에서 AOM/DSS 대조군에 비해 증가하는 경향성을 보였음(Fig. 98).

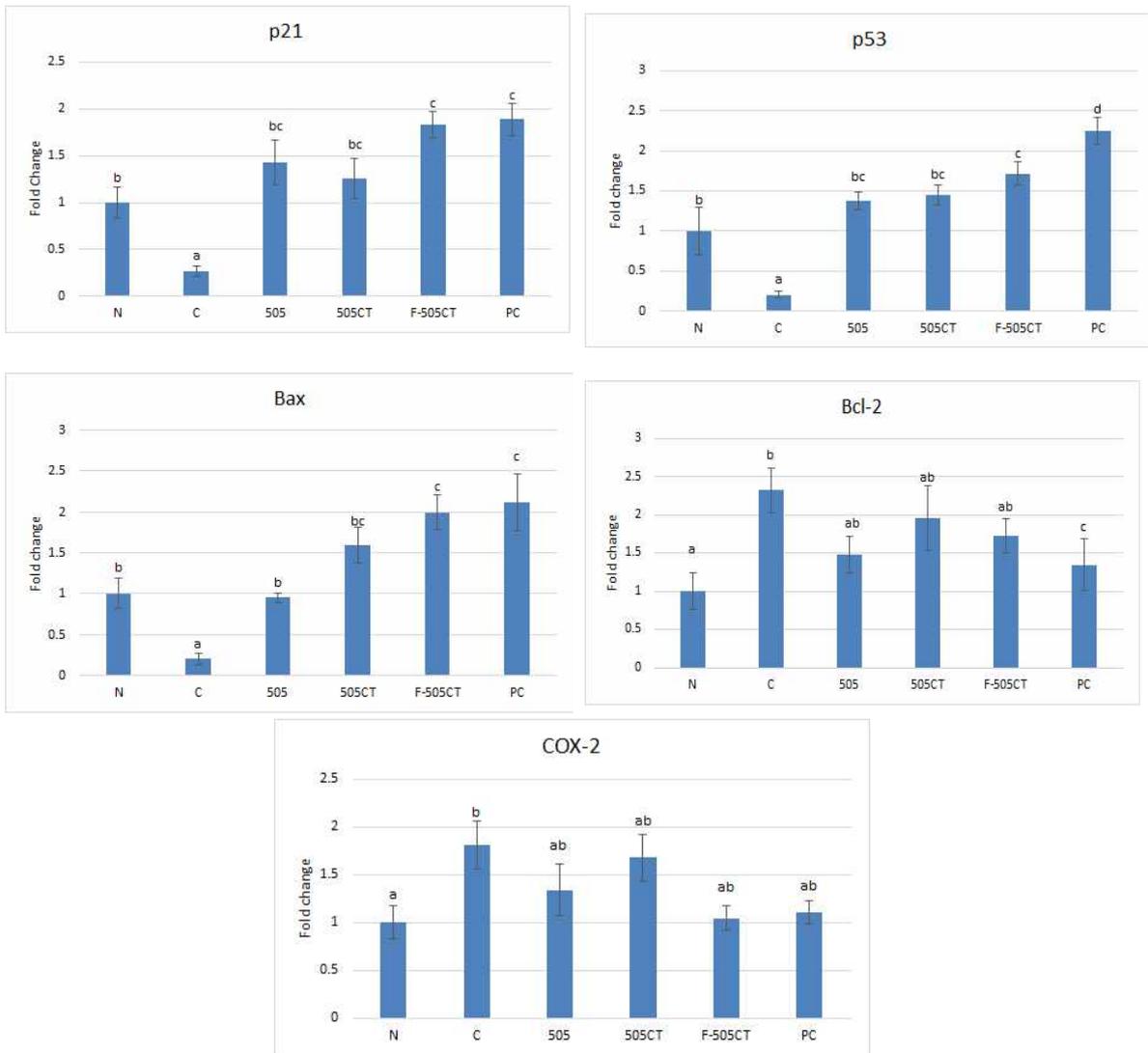


Fig. 98. 종양발현 관련 사이토카인의 mRNA 발현

(라) 대장 조직의 조직병리학적 분석

- 본 연구에서 신바이오틱스 혼합물이 대장 조직에 미치는 영향을 조직병리학적으로 분석하기 위해 H&E 염색을 진행하였음.

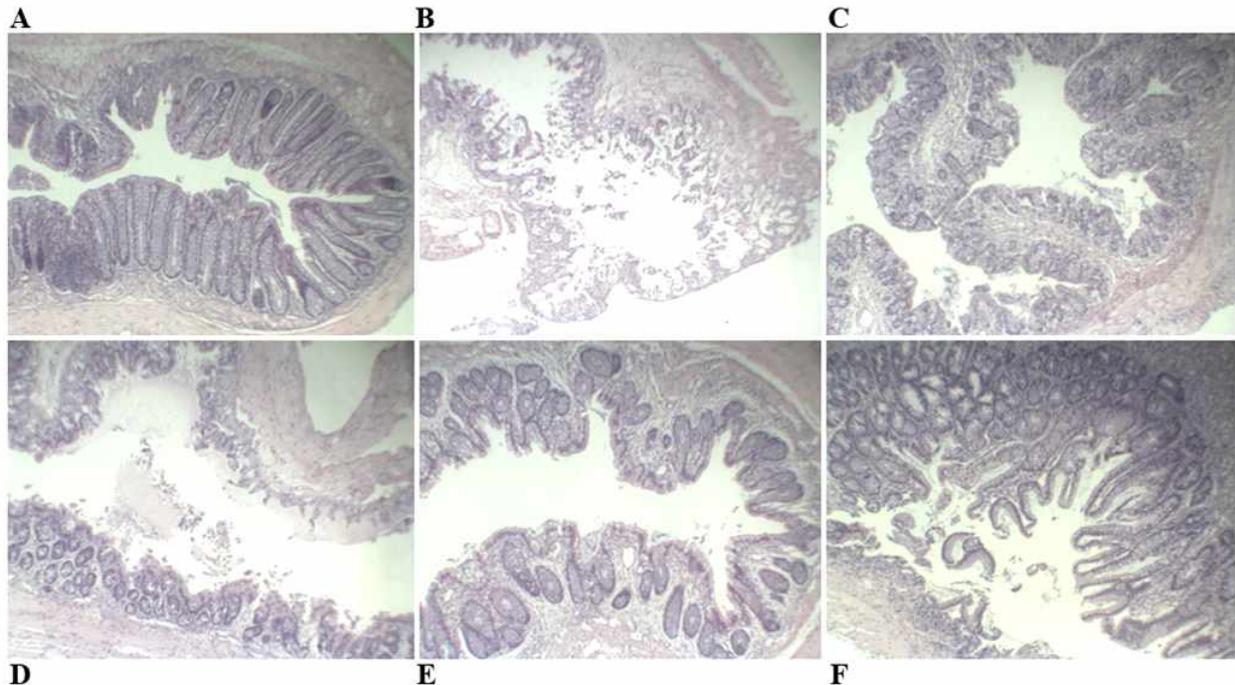


Fig. 99 각 그룹별 대장 조직의 H&E 염색

(A) Normal (B) AOM/DSS control (C) L.gasseri 505 (D) L.gasseri 505 + CT (Non-F) (E) L.gasseri 505 + CT (F) and (F) Astaxanthin group.

- 대장 조직의 H&E 염색 결과, 정상그룹에 비해 AOM/DSS 대조군에서 장벽이 파괴된 것이 관찰되었고 이는 암의 유발로 인해 장벽세포와 장점막에 부정적인 영향을 끼친 것으로 볼 수 있음. 반면에, 나머지 처리 그룹들에서는 AOM/DSS 대조군에 비하여 정상 그룹과 유사한 수준으로 대장 조직이 개선된 것을 관찰할 수 있고 특히, F-505CT 그룹이 가장 크게 개선을 나타낸 것으로 광학 현미경 상에서 관찰할 수 있음(Fig 99).

(마) 분변 내 Immunoglobulin A 함량 측정

- 분변 내 면역글로블린 A 함량을 알아보기 위해 Mouse IgA ELISA kit를 사용하여 0 주차, 5주차, 10주차로 나누어 분석하였음 (Fig. 100). 0주차 분변 내 IgA 농도는 정상그룹 $4.11 \pm 0.05 \text{mg/g}$, AOM/DSS 대조군은 $3.93 \pm 0.07 \text{mg/g}$, 505그룹은 $3.84 \pm 0.04 \text{mg/g}$, 505CT 그룹은 $3.96 \pm 0.04 \text{mg/g}$, F-505CT그룹은 $4.15 \pm 0.06 \text{mg/g}$ 이고 Astaxanthin그룹은 $4.08 \pm 0.05 \text{mg/g}$ 의 결과를 나타내었고 각 그룹간 유의적인 차이를 보이지 않음.

- 5주차 분변 내 IgA 농도는 정상그룹 $3.97 \pm 0.05 \text{mg/g}$, AOM/DSS 대조군은 $2.09 \pm 0.03 \text{mg/g}$, 505그룹은 $2.13 \pm 0.04 \text{mg/g}$, 505CT 그룹은 $1.60 \pm 0.04 \text{mg/g}$, F-505CT그룹은 $2.06 \pm 0.06 \text{mg/g}$ 이고 Astaxanthin그룹은 $2.81 \pm 0.05 \text{mg/g}$ 의 결과를 나타내었고 정상그룹에 비해 나머지 모든 그룹에서 유의적인 감소가 나타났으며 특히, 505CT 그룹에서 가장 많은 감소가 일어남.

- 10주차 분변 내 IgA 농도는 정상그룹 $3.40 \pm 0.33 \text{mg/g}$, AOM/DSS 대조군은 $1.85 \pm 0.05 \text{mg/g}$, 505그룹은 $2.99 \pm 0.04 \text{mg/g}$, 505CT 그룹은 $2.32 \pm 0.03 \text{mg/g}$, F-505CT그룹은 $3.14 \pm 0.05 \text{mg/g}$ 이고 Astaxanthin그룹은 $3.42 \pm 0.04 \text{mg/g}$ 의 결과를 나타내었고 특히, F-505CT 그룹과 Astaxanthin 그룹에서 정상그룹과 유의적 차이가 없었고 이것은 IgA의 농도가 가장 개선되었다는 것을 알 수 있음.
- 분변 내 IgA 농도를 시기별로 비교해보면, 정상그룹은 시기별 유의적 차이가 거의 나타나지 않았고, AOM/DSS 그룹에서는 5주차, 10주차에서 각각 점진적으로 유의적인 감소가 일어난 것을 알 수 있음. 나머지 네 그룹에서는 모두 5주차에 유의적인 감소가 일어나고 10주차에 유의적인 증가가 일어나 개선 효과가 있었다는 것을 알 수 있음 (Fig 19).

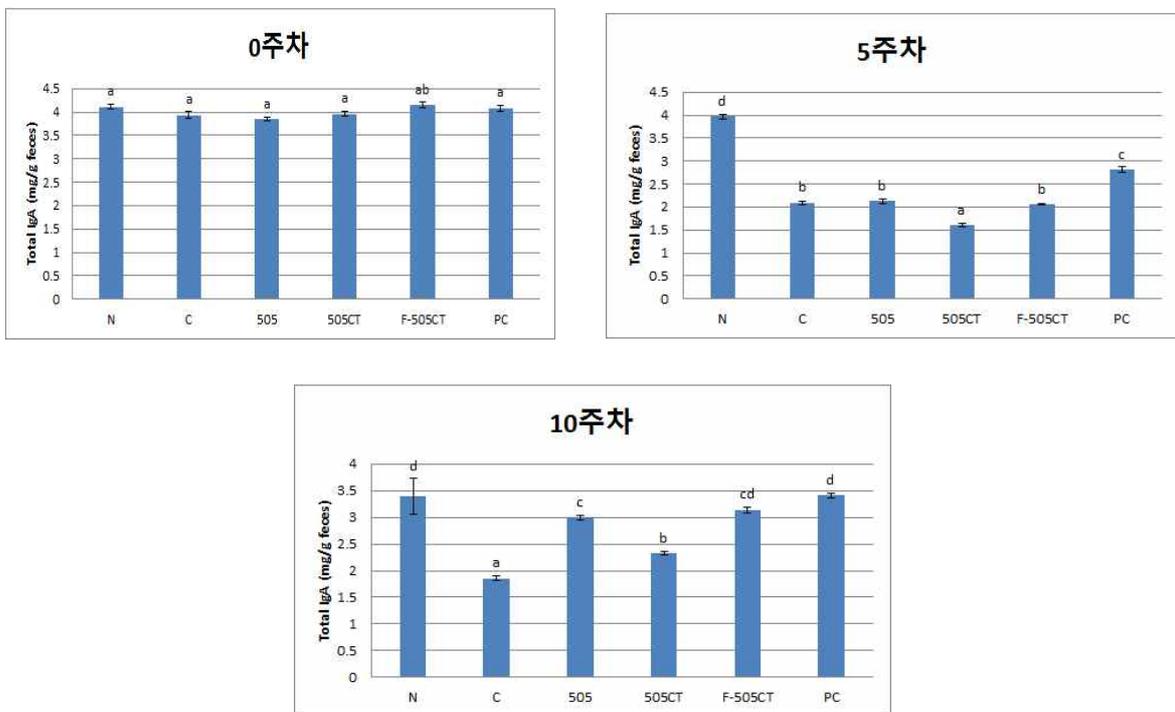


Fig. 100. 각 그룹별 분변 내 IgA 농도

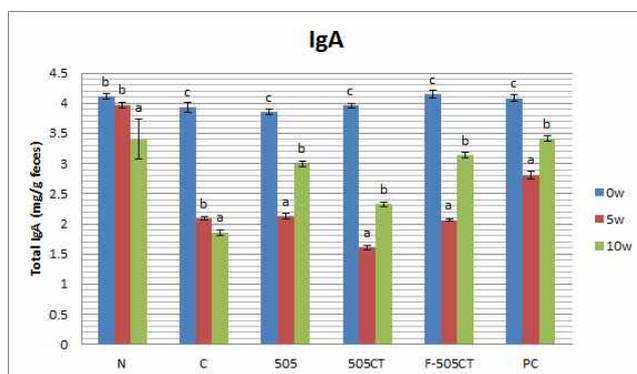


Fig. 101. 그룹 당 시기별 분변 내 IgA 농도

3-5. 연구개발 성과

가. 논문게재 및 학술대회 발표

(1) 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명 / 발행기관	게재일	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Effects of temperature and supplementation with skim milk powder on microbial and proteolytic properties during storage of cottage cheese	Journal of Microbiology and Biotechnology	오남수	24(6)	대한민국	2014.06.28	SCIE
2	Conversion of flavonols kaempferol and quercetin in mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaf using plant-fermenting <i>Lactobacillus plantarum</i>	Journal of Food Biochemistry	이남근, 정용섭	39(6) 765-770	영국 / Wiley	2015.08.28	SCI
3	Comparison of Total RNA Isolation Methods for Analysis of Immune-Related microRNAs in Market Milks	Korean Journal for Food Science of Animal Resource	오상남, 김영훈	35(4) 459-465	대한민국 / 한국축산식품학회	2015.08.31	SCIE
4	The Synergic Anti-Inflammatory Impact of <i>Gleditsia sinensis</i> Lam. and <i>Lactobacillus brevis</i> KY21 on Intestinal Epithelial Cells in a DSS-Induced Colitis Model	Korean Journal for Food Science of Animal Resource	고지훈, 김세현	35(5): 604-610	대한민국 / 한국축산식품학회	2015.10.31	SCIE
5	Enhanced Microbial, Functional and Sensory Properties of Herbal Yogurt Fermented with Korean Traditional Plant Extracts	Korean Journal for Food Science of Animal Resource	정재연, 이지영	36(1)	대한민국 / 한국축산식품학회	2016.02.28	SCIE
6	Improved functionality of fermented milk is mediated by the synbiotic interaction between <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract and <i>Lactobacillus gasseri</i> strains	Applied Microbiology and Biotechnology	오남수	100(13)	미국/sp ringer	2016.03.21	SCI
7	Protective effect of D-tagatose and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG in dextran sulfate	Food Microbiology (투고진행중)	오상남, 김영훈	-	영국/ Elsevier	-	SCI

	sodium-induced colitis mouse model						
8	The growth kinetics and metabolic and antioxidant activities of the functional synbiotic combination of Lactobacillus gasseri 505 and Cudrania tricuspidata leaf extract	Applied Microbiology and Biotechnology	이지영, 오남수	100(23)	미국/springer	2016.10.28	SCI
9	Enhanced immune response of C. elegans are mediated by the combination of probiotic bacteria and Korean traditional prebiotics substrate	Korean Journal for Food Science of Animal Resource (투고진행중)	손석준, 김영훈	-	대한민국 / 한국축산식품학회	-	SCIE

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015년도 (사)한국유가공기술과학회 제 74차 정기심포지엄 및 학술대회	손석준	2015.05.14	서울우유 중앙연구소 (안산)	대한민국
2	2015년도 제47차 (사)한국축산식품학회 정기학술대회 및 정기총회	박미리	2015.05.22	전주 국립축산과학원	대한민국
3	2015년 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회	오남수	2015.06.03	부산 벅스코	대한민국
4	2015년 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회	오상남	2015.06.03	부산 벅스코	대한민국
5	Probiotic potential of Lactobacillus strains with cinnamoyl esterase isolated from Korean traditional Jeotgal	김종희	2015.08.25	평창	대한민국
6	Probiotic and Immunological Potential of Lactobacillus sp. with Cinnamoyl Esterase Activity from a Traditional Korean Fermented Food, Jangajji	윤용근	2015.08.24	평창	대한민국
7	Probiotic Properties of Lactobacillus sp. With Cinnamoyl Esterase Activity from Korean Traditional	윤용근	2015.02.17	링컨	뉴질랜드

	Fermented Food, Jangajji				
8	2016년 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회	이지영	2016.08.17	대구 엑스코	대한민국
9	2016년 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회	오상남	2016.08.17	대구 엑스코	대한민국
10	<i>Lactobacillus gasseri</i> strains and <i>Cudrania</i> <i>tricuspidata</i> leaf extract (CT) fermented milk prevents against azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colorectal cancer	김윤정	2016.11.28	대만	대만

(3) 포상 및 수상 실적

종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
학술대회 발표상	구두발표	장려상	윤용근	2015.08.26	한국식품영양 과학회
학술대회 발표상	우수 구두발표상	표창장	손석준	2015.05.14	(사)한국유가공 기술과학회
학술대회 발표상	최우수 구두발표상	표창장	박미리	2015.05.22	(사)한국축산식 품학회

나. 특허 출원

출원명	출원번호
식물 추출물을 포함하는 프리바이오틱스, 발효유 및 이의 제조 방법	102015141275
유아 분변에서 분리한 균주 및 이를 이용한 항산화 및 면역 강화 기능을 갖는 발효유의 제조방법	1020160007223
유아 분변에서 분리한 균주 및 이를 이용한 항산화 기능을 갖는 발효유의 제조방법	1020160007248

다. 기타 실적

(1) 홍보 실적

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문	의학신문 (http://www.bosa.co.kr/)	신 항노화 미생물 찾아 원리 규명 “전북대 박미리, 예쁜꼬마선충 이용 수명연장과 면역증강 밝혀”	2015.06.05

(2) 타 연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도
1	산업기술거점기관 지원사업	한국형 유용균주 산업화 기반구축 (C. elegans를 이용한 유용미생물 및 발효산물 탐색기술 포함)	정도연	산업통상자원 부	2015
2	국가농업 R&D 어젠다 연구개발사업	다산성 모돈과 자돈 사료내 영양소 조절을 통한 번식 및 건강성 향상 연구 (모돈의 장건강 및 면역증강 영양성분 중 prebioitcs과 장내미생물의 상관관계 분석내용 포함)	송민호	농촌진흥청	2015
3	전통문화연구개발 사업	한국형 글로벌 장건강 프로젝트(장건강 유용미생물 선발을 위한 스마트 애니멀 플랫폼 실용화기술 개발 포함)	정도연	미래창조과학 부	2016

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

4-1. 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2013)	[주관] 서울우유협동조합 신바이오텍스 소재의 유제품적용 검토 및 발효특성 평가 시스템 확립	신규 프리바이오텍스 및 프로 바이오텍스 소재의 유제품 적 용 평가	100	-프리바이오텍스 소재 배합비에 따 른 발효유 제조 소량배합 실험 -프로바이오텍스 소재 starter culture 적용 실험 -이화학적 발효 특성 평가 -미생물학적 발효 특성 평가 -소재 첨가에 따른 관능특성 평가 -상업용 프리바이오텍스 및 starter culture와의 비교 평가
		프리바이오텍스 소재 개발을 위한 전통식품 및 천연식용식 물 원료 확보	100	- 전통식품 소재 및 식품이용 가능 식 물 자원 확보 및 데이터 구축 완료 (약100종)
	[제1협동] 전북대학교 식품적용이 가능한 장기능 개선 프리바이오텍스 소재 선발	전통식품 및 천연식용식물로 부터 프리바이오텍스 소재 분 리 및 분석	100	- 특용 작물 자원인 빵, 꾸지뽕, 연 잎, 감잎, 차조기, 블루베리, 복분 자, 오디, 초식잠, 더덕, 도라지, 삼 채뿌리 선발 - 올리고당, 식이섬유, 페놀화합물 함량 분석 완료
		전통식품 및 천연식용식물로 부터 분리된 올리고당, 식이섬 유, 페놀화합물에 대한 장내 미생물 생육 영향 분석	100	- 인체유래 <i>Lactobacillus</i> spp.의 선 발된 식물추출물에 대한 생육 영향 분석 및 최적화 - 프라바이오텍스 산업적용을 위한 최적화
	[제2협동] 고려대학교 인체 유래 고기능성 프로바이오텍스 균주 선발	인체 유래 고기능성 프로바이 오텍스 균주 분리	100	-산후조리원에서 영유아 분변 수집 - <i>Lactobacillus</i> 와 <i>Bifidobacterium</i> 을 중심으로 우점 프로바이오텍스 분리
		장 건강과 관련된 기능성 검 증	100	-내산성/내담즙성, 콜레스테롤 저 해능, 항균 박테리오신 생산능 분 석
	[제3협동] 순창발효미생물 산업진흥원 전통발효식품으로 부터 토종 프로바이오텍스 균주 선발	전통발효식품 젓갈 및 장아찌 그리고 인간 분변으로부터 CE활성을 가진 유산균 선발	100	-젓갈로부터 190 유산균을 분리하 였으며 그중 CE 활성 보유균 130 strains을 선발함. -장아찌로부터 110 유산균을 분리 하였으며 그중 CE 활성 보유균 92 strains을 선발함. -인간분변로부터 200 유산균을 분 리하였으며 그중 CE 활성 보유균 15 strains을 선발함.
		CE 활성 보유 유산균의 프로	100	-젓갈과 장아찌에서 분리한 25개

		바이오틱스로서 적합성 검토		<p>균주에 대해 프로바이오틱스로서 갖춰야할 기본적인 특성 검토</p> <ul style="list-style-type: none"> -내산성 및 내담즙성 -항균활성
2차년도 (2014)	<p>[주관] 서울우유협동조합 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 제조공정 개발 및 기능성 검토</p>	선발된 신바이오틱스 소재의 고농축 발효유 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 제조 공정 연구 - 발효유 제품 유형에 따른 제조 실험 - 제품의 기초배합비 및 기초공정도 작성
		Scale-up을 통한 대량생산 공정 개발	90	<ul style="list-style-type: none"> - Pilot-scale의 발효유 신제품 생산 실험 - 저장기간과 조건에 따른 제품의 미생물학적 및 이화학적 및 관능 특성 평가
		발효유 제품 내 우유 단백질 유래 면역활성 기능성 평가	95	<ul style="list-style-type: none"> - 제품 내 단백질 및 펩타이드 분석 - 항산화 활성 검토(FRAP, DPPH, ABTS assay) - 면역활성 측정 (RAW 264.7 세포를 이용한 NO assay, TNF-α의 활성화 측정, 면역 관련 바이오마커인 사이토카인의 발현 측정)
	<p>[제1협동] 전북대학교 장기능성 신바이오틱스 혼합소재의 면역증진 활성 평가</p>	Cell culture system을 이용한 in vitro 면역증진 활성 검토	100	<ul style="list-style-type: none"> - 면역세포, 신바이오틱스 혼합소재의 준비 - Cell proliferation assay 평가 - ROS (Reactive oxygen species) 억제능 평가 - Interferon gamma (IFN-γ) 저해능 평가
		예쁜 꼬마선충 C. elegans를 이용한 in vivo 면역증강 활성 검토	100	<ul style="list-style-type: none"> - C. elegans 모델을 이용한 장부 착능 탐색 - 병원성 미생물-C. elegans 모델을 이용한 장면역 증강 검증시스템 확립 - qRT-PCR와 GFP-promoter assay을 이용한 면역유전자군의 발현 검증
		신바이오틱스 소재개발을 위한 프리바이오틱스 (prebiotics)의 선발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 항염증 기능을 중심으로 프리바이오틱스 선발 - 프리바이오틱스 이용능을 기준으로 프로바이오틱스 선발
<p>[제2협동] 고려대학교 신바이오틱스 혼합소재의 장내 덜리버리</p>	프리바이오틱스의 2차 선발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효능을 중심으로 프리바이오틱 	

향상기술 개발	및 최적 첨가비율 설정		스 선발 - 생균수 증가량을 기준으로 프리 바이오틱스 선발
	반응표면 방법론에 따른 최적 복합비율 설정	80	- 반응표면 반응론에 의하여 도출한 복합비율로 생육영향분석 및 비율 최적화 진행중
[제3협동] 발효미생물 산업진흥원 마우스모델을 이용한 신바이오틱스의 장기능개선 및 면역증진 효능검증	시나모일 에스터라아제 활성 우수 균주 선정	100	- 전통발효식품 (장아찌, 젓갈)과 인간 장내 미생물에서 분리된 시나모일 에스터라아제 활성 유산균 중 시나모일 에스터라아제 고활성 유산균 5종 선택 - 시나모일 에스터라아제 고활성 유산균 5종의 시나모일 에스터라아제 활성 최적 조건 설정 - 최적 조건하 시나모일 에스터라아제고활성 <i>L. acidophilus</i> F46 균주 최종 선택.
	시나모일 에스터라아제 목적 유전자 획득 및 대량 발현 최적 조건 설정	100	- 유전정보를 활용한 면역증진효소 시나모일 에스터라아제 고활성 유산균 유래 시나모일 에스터라아제 효소 유전자의 클로닝 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전정보를 활용한 프라이머 제작 ▪ PCR을 통한 목적 유전자 획득 ▪ 선발 균주 유래 목적 효소 유전자 단편의 발현 클로닝 ▪ 형질전환된 재조합 대장균에서 목적 효소 최적 발현 조건 설정
	재조합 시나모일 에스터라아제 유전자의 효소 정제 및 아미노산 유전자 분석	100	- 면역증진효소 시나모일 에스터라아제 효소의 분리 정제 및 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> ▪ His-Taq 서열을 이용한 효소 정제 ▪ SDS-PAGE를 이용한 분리된 효소 정제 확인 및 분자량 측정 ▪ BLAST로 아미노산서열 비교
	재조합 시나모일 에스터라아제 효소의 활성 및 생화학적 특성	100	- 면역증진효소 시나모일 에스터라아제 효소의 생화학적 특성에 관

				<p>한 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH와 온도의 안정성 ▪ 최적 pH와 최적 온도 ▪ 반응속도 특성 ▪ 금속이온 및 유기용매 저해 영향 ▪ 하이드록시시나믹산에 대한 활성 비교
3차 년도 (2015)	<p>[주관] 서울우유협동조합</p> <p>장기능 개선 및 면역증진 기능성 발효유 및 신바이오틱스 제제 제품개발</p>	대량생산 실험을 통한 최종공정 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - Pilot scale test를 통한 현장시험 공정 개선안 도출 - 현장 대량시험을 통한 최종 제조 공정 완성 - 제품 관능 개선
		기능성 신바이오틱스 소재 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 신바이오틱스 소재 함량 평가 - 기능성 신바이오틱스 소재의 함량에 따른 이화학적, 미생물학적 및 관능 특성 평가
		기능성 표시기준 및 관련 법령 검토	100	<ul style="list-style-type: none"> - 원가표 작성 및 디자인 표기사항 검토 - 외부관능검사[초점그룹인터뷰(FGI) 및 소비자 기호도조사]를 통한 제품 마케팅 활용방안 도출 - 본사 디자인팀 및 마케팅팀과의 광고 및 제품 출시방향 확정 - 디자인/표기사항 개발의뢰 및 기능성 표시기준 및 관련 법령 검토
		최종 시제품 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효유 1종 및 신바이오틱스 제제 1종 이상 시제품 생산
	<p>[제1협동] 전북대학교</p> <p>비교오믹분석 기술을 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명</p>	비교오믹 분석결과를 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 면역증강 작용기작 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> - 비교오믹 분석을 위한 RNA sample 분리 - 신바이오틱스 혼합소재와 E. coli OP50 대조군의 처리에 따른 예쁜 꼬마선충의 전사체 변화를 확인하고 신바이오틱스 혼합소재와 관련된 특정 면역증강 작용기작 규명
<p>장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원의 데이터 베이스 구축</p>	장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원의 데이터 베이스 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> - NCBI Gene Expression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)에 투고하여 그 유용성을 검증받고 accession number를 부여받은 후 중요 유전자원을 선별하여 최종 	

			적으로 예쁜 꼬마선충의 장기능 및 면역증강 관련 중요 유전자원 데이터 베이스 구축
	[제2협동] 고려대학교 신바이오틱스 혼합소재의 장내 덜리버리 향상기술 개발	하이브리드 분체복합화를 통한 신바이오틱스소재의 장내 덜리버리 향상기술 개발	100 - 하이브리드 분체복합화 설정 - 신바이오틱스 분체의 입도 분석 - 주사전자현미경에 의한 신바이오틱스 분체의 구조적 특성 관찰 - 장내 덜리버리 활성을 위한 내산성 및 장용성 측정 - 신바이오틱스 분체 복합화 처리 후 모델 생균제의 활성 및 면역증진 활성 측정
	[제3협동] 발효미생물산업진흥원 마우스모델을 이용한 신바이오틱스의 장기능 개선 및 면역증진 효능검증	마우스모델을 이용한 신바이오틱스 혼합소재의 장기능 개선 및 면역증진 효과 및 대장암 예방효과 검증	100 - 8주령의 female BALB/c mice 를 in vivo 실험에 사용함 - 장기능 및 면역관련 유전자 발현 변화 측정: IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , GAPDH 발현 분석 - 조직학적 변화 측정 (Histological evaluation): hematoxylin and eosin (H&E) 이 중염색을 실시함.

4-2. 관련분야 기여도

- 프리바이오틱스는 장내에 서식하고 있는 미생물들의 성장과 활력에 선택적으로 작용하여 숙주에게 유익한 영향을 주는 비소화성 식품 성분들을 총칭하는 물질로서 생균체에 기질로 작용하여 궁극적으로는 숙주의 건강을 향상시키는 기능을 발휘하는 물질을 일컫음. 최근까지 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 펙틴 등의 식이섬유와 fructooligo-, galactooligo-, maltooligo-, inulooligo-saccharide 등의 난소화성 올리고당류 등이 프리바이오틱스 소재로서 알려져 왔음. 하지만 본 연구과제를 통해서 식물추출물에서 유래한 꾸지뽕잎 추출물의 프리바이오틱스 소재로서의 새로운 가능성에 대해 발견하였으며 프리바이오틱스로서의 효과뿐만 아니라 본 연구과제를 통해 선별해낸 프로바이오틱스 유산균주와 신바이오틱스 상호작용을 나타낼 수 있는 신소재를 개발하였음.
- 따라서 장기능 개선용 신규 프리바이오틱스, 프로바이오틱스 소재를 국내 자생 천연자원 및 토종 미생물 유전자원으로부터 확보 하였으며 장기능 개선용 신바이오틱스 제품화를 통해 고부가가치 시장창출을 기대할 수 있음.
- 현재까지의 C. elegans를 포함하는 생체대체모델의 경우 대부분 인간 유전자와의 상동성을 매개로 일부 질병과 관련된 메카니즘 연구에만 일부 활용되고 있을 뿐 아직까지 농축산업 분야에서 농업형 스마트애니멀 생체모델로서의 활용도는 전무한 실정임.

- 다른 기술 선진국과 비교하였을 때 국내에서 스마트애니멀을 이용한 고효율 식품신소재 발굴 플랫폼 기술은 초기 개념정립 단계라고 판단됨.
- 따라서 인체 조직은 마이크로미터 단위의 초고밀도 구조를 가지고 있기 때문에 본 기술에서는 스마트애니멀을 완벽하게 인간의 생체기관과 대응하는 미세 기술전략이 아닌 생체 시스템의 조직 또는 생체 자체의 종합적인 시스템을 핵심기술 플랫폼으로 in vitro가 아닌 빠르고 신속하게 in vivo에서 직접적으로 고기능성의 식품신소재를 스크리닝 하는 기술을 확립하는데 기여하였다고 판단됨.
- 본 연구 결과를 바탕으로 장기능 개선, 면역 조절 및 대장암 예방 효능을 지니는 신바이오틱스 혼합소재를 포함한 유제품을 개발하여 유가공 산업의 부가가치 상승 기대.

5. 연구결과의 활용계획

D-07

5-1. 연구결과의 활용계획

- 최근 강화되고 있는 동물복지의 측면에서 마우스를 이용한 in vivo 실험의 한계점을 극복할 수 있는 새로운 in vivo 모델로써 본 기술과제에서 제안하는 농업형 스마트애니멀 모델은 다량의 샘플을 신속정확하게 한꺼번에 활성을 측정할 수 있는 HTS의 적용이 가능한 고효율의 생체모델 시스템으로 발전이 가능함.
- 이러한 기술은 정부출연연구소에서 보유하고 있는 다양한 기능성 라이브러리 자원에 활용되어 향후 한국생명공학원 산하 한국식물추출물은행 (<http://extract.pdrc.re.kr/extract/f.htm>), 해외생물소재허브센터 (<http://www.ibmrc.re.kr/>)과 한국화학연구원 산하의 합성 화합물은행 (http://www.chembank.org/introduce/introduce_02.html)에서의 10,000여종의 다양한 식물 유래 기능성 추출물 또는 합성 화합물 라이브러리를 이용하여 우리나라 고유의 만성질환 예방을 위한 식품소재 발굴 표준화 기법으로 활용이 가능함.
- 또한, 농업형 스마트애니멀 생체시스템 개발은 향후 의학분야와 융복합되어 다양한 만성질환 관련 질환의 치료 및 예방을 위한 약동성 모의 실험, 약물처리에 따른 장내 미생물 군집 검사 등 다양한 high-throughput 바이오신약 기술 개발에 신속하게 적용이 가능하여 다양한 만성질환 치료와 예방에 관련된 국제 의료기술 선도에 연계될 수 있음.
- 본 연구과제를 통하여 식물추출물 유래 신규 프리바이오틱스 소재 및 인체 유래 프로바이오틱스 소재를 개발하였으며, 더 나아가 면역활성 및 장기능 개선의 시너지 효과를 나타낼 수 있는 신규 신바이오틱스 소재를 개발하였음. 향후, 인체적용시험을 통한 기능성 검증 및 개별인정형 원료의 획득을 추진할 계획임.

5-2. 기술이전을 통한 사업화 실시

- 본 연구과제의 수행결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체 사업화를 위하여 기술실시 계약 체결을 추진 중임
- 현재 신바이오틱스 소재 고농축 발효유 2종, 신바이오틱스 소재 고농축 혼합분말 제제 및 신바이오틱스 소재 고농축 캡슐 제제의 시제품 제작을 완료하였으며, 출시 예정 제품의 스케일업을 통한 대량생산 재실험을 진행하여 최적화된 공정을 완성할 계획임. 또한, 유통·저장 중의 안정성 및 안전성 연구 및 외부관능검사[초점그룹인터뷰(FGI) 및 소비자 기호도조사]와 제품의 스토리텔링을 통한 마케팅 방안 설정할 예정임.
- 국내 프로바이오틱스 제품은 장기능 및 소화 개선 등의 효과를 지니는 제품에 초점이 맞추어 지고 있으며, 이를 확대하여 장기능 개선, 면역 조절 및 대장암 예방 효능을 나타낼 수 있는 기능성 유제품의 개발을 통해 유제품의 활용 가능성을 증대시켜 고부가가치의 시장을 창출할 것으로 사료됨.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

- 전세계적으로 마우스 실험동물을 이용함에 있어 윤리적인 문제가 이슈화됨에 따라 이들을 대체 할 수 있는 대체실험동물의 발굴 및 매뉴얼 제작에 많은 노력을 기울이고 있음. 대표적으로 미국의 ‘ICCVAM’ (<http://iccvam.niehs.nih.gov/>), EU의 ‘ECVAM’ (<http://ecvam.jrc.it/>), 일본의 ‘JACVAM’ (<http://jacvam.jp/index.html>), 그리고 캐나다의 ‘헬스 캐나다’ (Health Canada) ’에서 장기적으로 동물복지향상 및 실험동물 대체를 위한 효율적인 생체모델의 구축 등 다각도의 연구가 진행 중에 있음.
- 최근 2차원 평면세포주 및 마우스 동물모델을 이용한 식품신소재의 발굴기술의 한계로 인해 특정 타겟 기관의 생체 조직 특성을 모방한 생체대체 모델이 각광을 받고 있으며, 높은 비용과 노동력이 필요한 신약 및 건강기능성 소재발굴 과정의 효율성을 개선할 수 있다는 기대를 받고 있음.
- 현재까지 전세계적으로 *C. elegans*를 포함하는 스마트애니멀의 경우 대부분 초기배아 분화/발생연구와 특정 감염질환 메카니즘 연구에 적용되고 있을 뿐 아직까지 식품분야에서 대규모 식품유래 물질을 대상으로 만성질환을 예방할 수 있는 고기능성 신소재 개발을 위해 동물모델로써 고효율 스크리닝 시스템을 구축하고 관련된 핵심소재를 개발하고자 하는 연구는 전무한 실정임.
- 현재 국내기술력 현황을 미국이나 유럽 등에 비교했을 때 생체대체 동물모델의 시스템 구현의 측면에 있어서는 비슷한 수준의 기술을 보유하고 있으나 단순히 의학 분야에서 생체 유사 시스템의 개발 자체에 초점이 맞춰져 있으며, 농축산관련 바이오 식품소재의 관점에서 실질적인 질병과 관련된 연구가 연계되어 이루어지지 못하고 있는 실정임.
- 국내에서 *C. elegans*를 이용하여 유산균의 면역증강을 검토한 연구결과가 일부 보고 되고 있으나 아직까지 다양한 식품신소재 라이브러리를 대상으로 장기능개선을 위한 위한 고기능성 신바이오틱스 식품소재 개발을 위해 대규모로 스마트애니멀이 사용된 기술은 보고된 바 없음.
- *C. elegans*를 포함하는 생체대체모델을 이용한 국내외 주요 연구현황

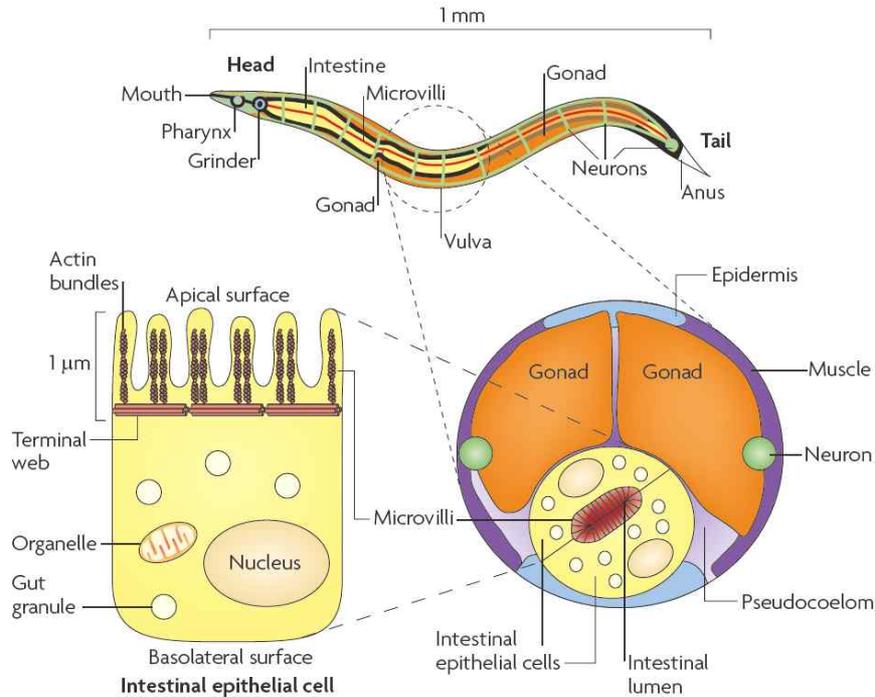
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Harvard Medical School/MGH (USA)	<i>C. elegans</i> 를 이용한 인체 장환경 유사모델의 검토	다양한 병원성 미생물의 감염에 따른 장환경의 유전자 변화와 이들의 장환경 부착과 관련된 중요 유전자 및 관련 면역 기작 연구
Centre de Génétique Moléculaire (France)	<i>D. melanogaster</i> 를 이용한 미생물과의 공생관계 연구	<i>D. melanogaster</i> 장관내 존재하는 장 microbiota의 존재에 따른 특이적 면역메카니즘을 분석하고 특히 Toll-like receptor(TLR)의 중요성을 검토함.
Institut Pasteur (France)	Zebra fish를 이용한 <i>E. coli</i> 비병원성 균주의 기능성 검증	Zebra fish <i>in vivo</i> 모델을 이용한 병원성/비병원성 <i>E. coli</i> 의 감염기전을 연구하고 이들의 특징적인 기능성 여부를 검토함
전북대학교	<i>C. elegans</i> 를 이용한 유산균의 면역증강효능 연구	<i>C. elegans</i> 장관모델을 이용하여 유산균주의 부착능력을 검토하고 이들의 중요 면역관련 메카니즘에 유산균이 일부 관여한다는 것을 규명함.

서울대학교	<i>D. melanogaster</i> 를 이용한 장 microbiota 연구	<i>D. melanogaster</i> 장관내 존재하는 장 microbiota를 규명하고 이들의 존재와 초파리 수명과의 상관관계를 분석함.
국립암센터	Zebra fish를 이용한 발암 기전 연구 및 암모델 동물 개발	Zebra fish 암모델을 이용한 발암유전자 및 발암 억제유전자의 <i>in vivo</i> 기전 연구

○ 연구수행을 통해 수집된 국내외 연구개발 현황

(1) *C. elegans* (예쁜 꼬마선충)

- *C. elegans* (예쁜 꼬마선충)는 동물로서의 많은 특성들을 지니며 배양 및 보존이 간편하며 투명한 몸체를 통한 관찰이 용이하며 유전학적 연구를 위한 다수의 mutant 및 knock-down 방법이 확립되어 있음. 특히, 한 세대가 한 달 이내로 매우 짧은 특성을 가지고 있어 마우스와 비교하였을 때 노화연구에 보다 적합한 모델인 것으로 판단됨.

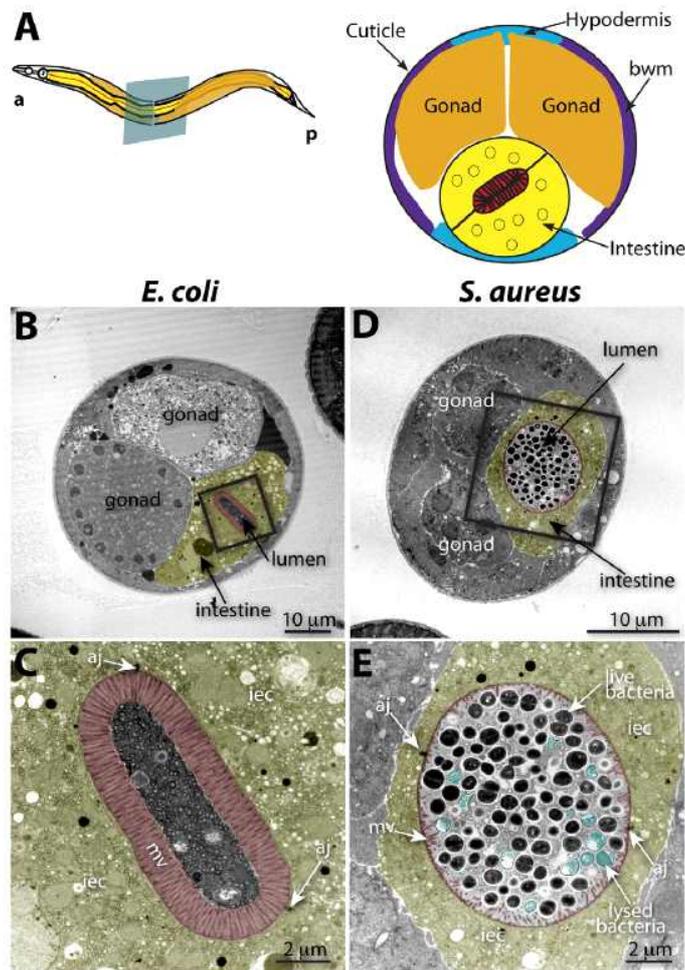


<예쁜 꼬마선충의 전체외관과 장구조 도식화>

- 최근 병원성 세균의 모델뿐만 아니라 질병에 대한 모델로의 가능성이 제기되면서 세계 최대 제약회사인 Pfizer는 high-throughput *C. elegans* killing assay를 개발하여 알츠하이머 발병의 주요 원인인 amyloid-beta peptide 생성에 관련된 presenilin의 기능을 저해하는 물질을 screening한 바 있어 여러 제약회사들이 추가적으로 *C. elegans*를 이용할 것으로 예상됨.
- *C. elegans*의 경우는 공히 사람 유전자들과 많은 부분 상동 유전자를 보유하고 있는 것으로

로 나타남 특히, 이미 알려진 사람의 질병 관련 유전자들을 조사한 결과에 의하면 거의 대부분 *C. elegans*에도 존재함이 밝혀짐. 이러한 보고는 사람의 질병 관련 유전자의 기능 및 원인 분석을 위해서 선충을 이용한 모델 시스템을 사용하는 것에 대한 논리적 근거를 제공함. 이는 *C. elegans*에서의 활성산소에 대한 반응은 사람에서도 비슷한 기전으로 작용할 가능성이 높음을 의미함. 특히 여러 가지 면에서 한국적 연구 환경을 고려할 때 좀 더 단순하고 분석의 기간이 짧은 선충 시스템을 이용하는 연구가 일정 부분 장점을 가진다고 판단됨.

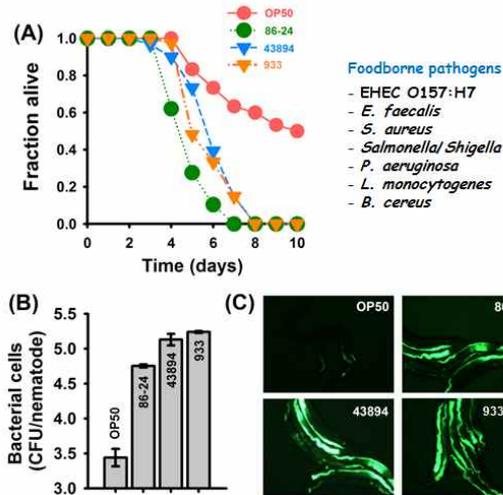
- 최근 Harvard Medical School/MGH의 Ausubel 교수팀과 Mylonakis 교수팀은 surrogate in vivo *C. elegans* 생체대체모델의 장관을 이용하여 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*, 그리고 *Candida albicans* 등 다양한 병원성 미생물의 감염에 따른 장환경의 유전자 변화와 이들의 장환경 부착과 관련된 중요 유전자 및 관련 면역 pathway에 대한 연구를 진행함.



<병원성 미생물 감염시 *C. elegans*의 장관변화의 전자현미경 사진>

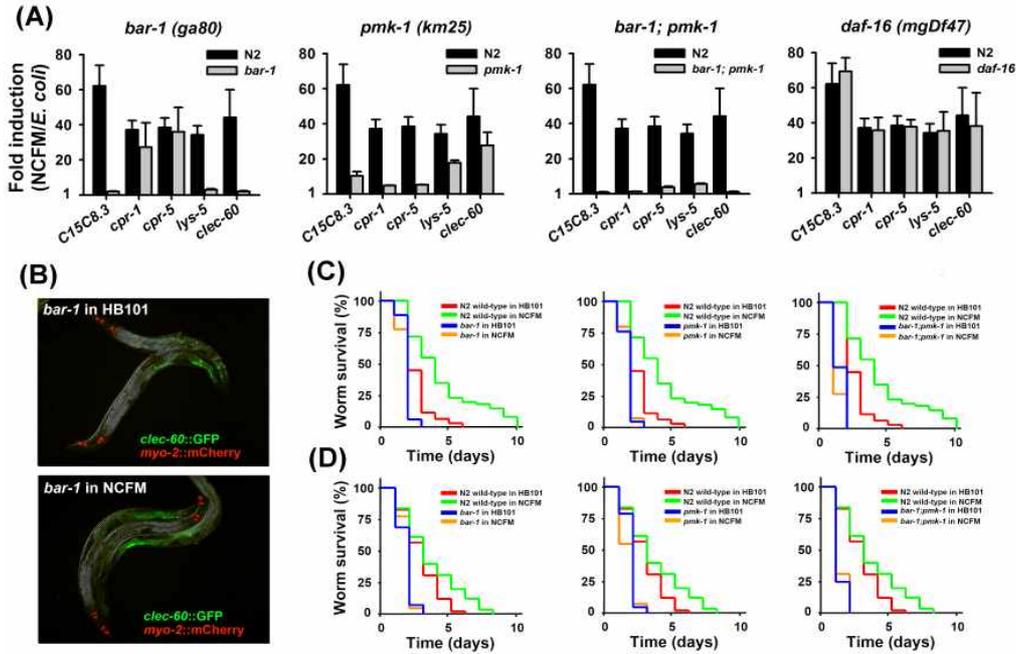
- 이러한 국제적 연구추세에 발맞추어 국내에서의 전북대 김영훈 교수팀은 예쁜 꼬마선충을 인간 장환경의 대체모델로 사용하여 직접적으로 in vivo에서 *Salmonella* spp., *Shigella*

spp. *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* 등 다양한 병원성 미생물의 감염 모델을 확립하였음. 이러한 연구결과는 장관내 병원성 미생물 유래의 면역능 저하기작에서 다양한 식품신소재의 면역증강 소재의 선발에 신속하게 적용이 가능함.



<예쁜 꼬마선충을 이용한 장출혈성 대장균 O157:H7의 병원성 기작 검토>

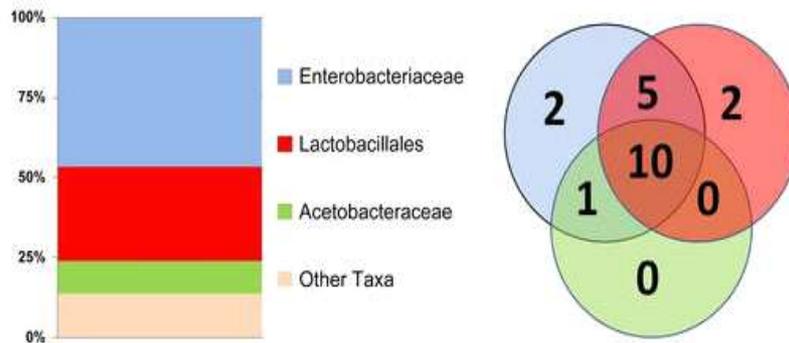
- 또한 본 협동과제 연구팀인 김영훈 교수팀은 인체 유래의 프로바이오틱 균주 같은 유용미생물의 처리에 따른 병원성 미생물의 감염에 대한 예쁜 꼬마선충의 선천면역 및 면역증강 효능을 연구 중에 있음. 최근 이러한 연구결과를 종합하여 발효유 제조에 사용되는 스타터인 *L. acidophilus* NCFM의 면역처리를 통해 *E. faecalis*와 *S. aureus*와 같은 Gram positive bacteria에 대해 특이적으로 면역증강을 유도하여 수명연장이 나타나는 것을 실험적으로 증명하였음 (Kim and Mylonakis, 2012, Infection and Immunity). 이러한 연구결과는 장수식품군에서 분리되는 장수관련 미생물의 분리 동정에 신속하게 적용이 가능할 것으로 판단됨.



<예쁜 꼬마선충-미생물의 상호작용을 이용한 장수식품유래 유용미생물 선발>

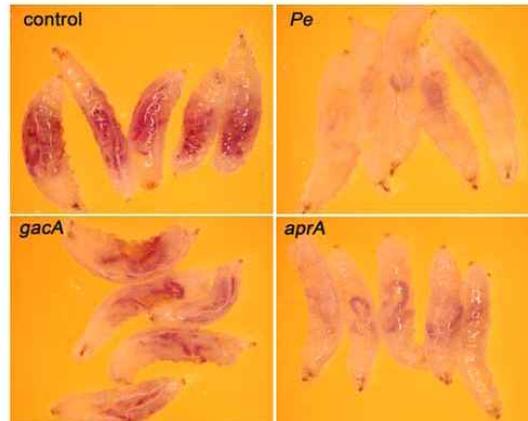
(2) D. melanogaster (초파리)

- Drosophila 초파리는 1910년대에 미국의 모르간 박사가 모델 실험동물로 사용한 이래의 생명과학 분야에서 가장 중요한 실험동물 모델로 사용되어 포유동물 및 인간의 생명현상 이해에 핵심적인 단서들을 제공하고 있음. 초파리는 다른 실험동물에 비해 크게 장소와 비용이 요구되지 않으며, 짧은 세대교번과 많은 자손을 낳기 때문에 인간의 난치성 질병 대한 시간적, 자본적 노력이 적게 들며, 빠른 결과도출에 유리함.
- 인간 질병 유전자와 약 70%의 상동성 갖고 있고, 유전정보가 모두 알려져 있는 초파리를 이용하여 보다 빠르게 암 발생 관련 유전자 탐색 및 메커니즘 구명을 통한 효과적인 치료법 개발 가능함. 이처럼 모델 실험동물로 초파리의 중요성이 전 세계적으로 인식되어, 2000년에 초파리의 전 게놈의 해독이 완료되어 초파리를 이용한 실험이 더욱 용이해졌음.
- 초파리는 10일~14일정도로 단기간에 행해지는 세대교대와 더불어 뛰어난 생식능력이 있고, 초파리 장내 microbiota 구성 미생물 종류가 20여종 이내로 단순하여 in vivo 생체 system screening approach에 매우 적합함.



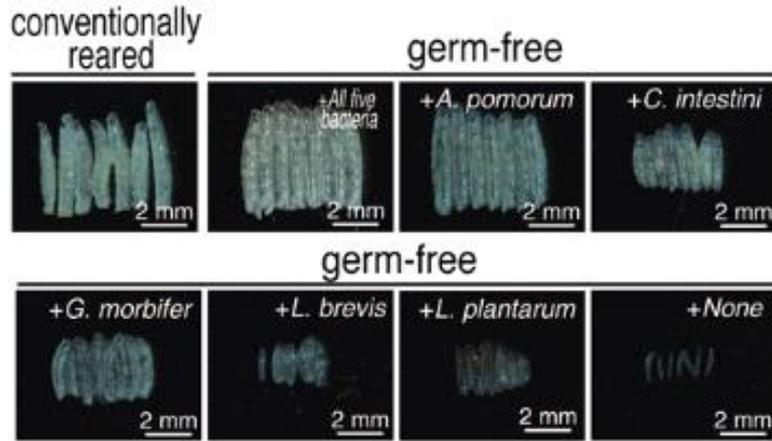
<초파리 장 microbiota를 구성하는 미생물 종류>

- 최근 Centre de Génétique Moléculaire의 Lemaitre 교수팀은 *D. melanogaster* 생체대체 모델의 장관을 이용하여 *Pseudomonas aeruginosa*의 병원성 유전자가 결손된 mutant를 스크리닝하여 중요 유전자 및 관련 면역 pathway에 대한 연구를 진행함.



<초파리 장관내 *P. aeruginosa* 감염시 중요 유전자 결손에 의한 병원성 메카니즘 규명>

- 국내의 경우 서울대 이원재 교수팀은 *Acetobacter pomorum*같은 장내 상재균의 존재가 초파리에서 insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS)를 조절하고 developmental rate, body size, energy metabolism, 그리고 intestinal stem cell activity와 같은 다양한 숙주 항상성 유지에 영향을 준다고 보고하였음.



<초파리 장관내 다른 미생물과는 다르게 *A. pomorum*의 존재시 초파리의 정상적인 성장과 발달이 이루어지는 것을 규명함>

- 최근에는 초파리를 모델을 이용하여 암치료 (tumor suppressor)를 발굴하려는 연구가 계속되고 있음. 형질전환 초파리를 이용하여 종양억제 (tumor suppressor)나 종양괴사 (tumor necrosis)에 관련된 유전자 발굴, 기능분석 및 치료제 개발하거나 초파리를 이용한 세포사멸 (programmed cell death) 연구를 통해 암세포를 조절하는 유전자 및 물질을 인간에게 적용하는 연구 수행하고 있음.
- 현재 국외적으로 다양한 대학 및 연구센터, 다국적 제약회사들이 초파리로부터 활발한 연구를 통해 암 생성 유전자 동정에 나서고 있으며, 이를 둘러싼 특허 및 선점을 통해 엄청난 경제파급효과 기대하고 있으며 국내에서는 KAIST에서 초파리 유전자 라이브러리를 구축하였고, 형질전환 초파리를 제작 배포하고 있으며, 원자력병원, 방사선보건연구원, 충북대 등에서도 초파리를 암, 당뇨, 비만, 뇌질환 등 각종 난치병 질환의 질병 모델로 삼는 등 활발한 연구에 매진하고 있음. 하지만 아직까지 초파리 모델을 기능성 식품소재 발굴을 위한 HTS 생체모델로 접근한 연구는 전무한 실정임.

7. 연구개발결과의 보안등급

	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

8.

등록한 연구시설·장비 현황

					D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		D-11
<input type="radio"/> 해당 사항 없음		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	D-12			
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Conversion of flavonols kaempferol and quercetin in mulberry (<i>Morus alba</i> L.) leaf using plant-fermenting <i>Lactobacillus plantarum</i>	전북 대학교	참여 저자	Journal of Food Biochemistry / 영국	0.832	2015.08.25	○	SCI
2	논문	Improved functionality of fermented milk is mediated by the synbiotic interaction between <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract and <i>Lactobacillus gasseri</i> strains	서울우 유협동 조합/ 전북대 학교	주저자/ 교신저자	Applied Microbiology and Biotechnology / 미국	3.376	2016.03.21	○	SCI
3	논문	The Synergic Anti-Inflammatory Impact of <i>Gleditsia sinensis</i> Lam. and <i>Lactobacillus brevis</i> KY21 on Intestinal Epithelial Cells in a DSS-Induced Colitis Model	고려 대학교	교신 저자	Korean Journal for Food Science of Animal Resource / 대한민국	0.393	2015.10.31	○	SCIE
4	논문	Properties of recombinant novel cinnamoyl esterase from <i>Lactobacillus acidophilus</i> F46 isolated from human intestinal bacterium	순창발 효미생 물산업 진흥원	교신 저자	Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic / 네덜란드	2.189	2015.03.07	○	SCI
5	논문	The growth kinetics and metabolic and antioxidant activities of the functional synbiotic combination of <i>Lactobacillus gasseri</i> 505 and <i>Cudrania tricuspidata</i> leaf extract.	서울우 유협동 조합	교신저자	Applied Microbiology and Biotechnology / 미국	3.376	2016.10.28	○	SCI

11. 기타사항

		D-13
<input type="radio"/> 해당사항 없음		

12. 참고문헌

D-14

- Velcich, Anna, et al. "Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2." *Science* 295.5560 (2002): 1726-1729.
- Wesa, Amy K., and Anne Galy. "IL-1 β induces dendritic cells to produce IL-12." *International immunology* 13.8 (2001): 1053-1061.
- Neufert, Clemens, Christoph Becker, and Markus F. Neurath. "An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression." *Nature protocols* 2.8 (2007): 1998-2004.
- Hong, Young-Shick, et al. "¹H NMR-based metabonomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model." *Archives of pharmacal research* 33.7 (2010): 1091-1101.
- Hosono, Kunihiro, et al. "Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial." *Cancer prevention research* 3.9 (2010): 1077-1083.
- Volate, Suresh R., et al. "Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin)." *Carcinogenesis* 26.8 (2005): 1450-1456.
- Lee, Hyun Ah, et al. "Dead nano-sized *Lactobacillus plantarum* inhibits azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer in Balb/c mice." *Journal of medicinal food* 18.12 (2015): 1400-1405.
- Cheng, Kunrong, et al. "Divergent effects of muscarinic receptor subtype gene ablation on murine colon tumorigenesis reveals association of M3R and zinc finger protein 277 expression in colon neoplasia." *Molecular cancer* 13.1 (2014): 1.
- Irving, Amy A., et al. "The utility of *Apc*-mutant rats in modeling human colon cancer." *Disease Models and Mechanisms* 7.11 (2014): 1215-1225.
- Wargovich, Michael J. "Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals." *Journal of Korean medical science* 16.Suppl (2001): S81.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.