

발간등록번호

11-1541000-001337-01

녹두의 신규 항염증 성분과 사포닌  
발효수식을 이용한 염증완화 유제품개발

Development of functional dairy products containing novel  
anti-inflammation components and active saponins from mung bean

연구기관

고려대학교 생명공학부

국민대학교 식품영양과

명가유업주식회사

농림수산식품부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “녹두의 신규 항염증 성분과 사포닌 발효수식을 이용한 염증완화 유제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 전 태 훈

연 구 원 : 김 세 헌

연 구 원 : 이 석 준

연 구 원 : 김 상 훈

연 구 원 : 한 지 혜

연 구 원 : 배 준 범

연 구 원 : 김 선 희

연 구 원 : 나 만 흠

협동연구기관명 : 국민대학교

협동연구책임자 : 임 지 영

연 구 원 : 박 형 렬

연 구 원 : 전 지 경

연 구 원 : 전 소 연

연 구 원 : 이 지 혜

연 구 원 : 홍 성 현

연 구 원 : 김 성 규

협동연구기관명 : 명가유업주식회사

협동연구책임자 : 서 재 경

연 구 원 : 최 철 호

연 구 원 : 최 선 관

연 구 원 : 이 재 형

연 구 원 : 정 일 중

# 요 약 문

## I. 제 목

녹두의 신규 항염증 성분과 사포닌 발효수식을 이용한 염증완화 유제품개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

포유동물에서 면역체계는 선천성 면역계(innate immunity)와 후천성 면역계(adaptive immunity)로 구성되어 있고 이중 후천성 면역계는 척추동물에서만 발견되는 면역체계로서 항원에 특이적인 T 림프구와 B 림프구에 의해 매개된다. 즉 이들 수용체에 특이항원이 결합하면 림프구의 세포분열(clonal expansion)이 일어나고 면역반응이 초래된다. 반면에 선천성 면역계는 미생물의 침입을 받을 때 신속히 반응하는 전초기지 역할을 하며 후천성 면역계를 활성화 시키는 역할을 한다. 염증 반응에 의해 매개 되는 대표적인 질환은 1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease) 같은 자가면역질환이나 장기이식 시 면역세포에 의한 거부반응, 넓게는 전신성 세균 감염증 등으로 나뉜다. 염증 반응은 과거에는 T 림프구에 의해 매개되는 비정상적이고 과도한 면역반응이 주된 원인으로 알려졌으나, 최근 toll-like receptors (TLRs), NOD2 등 미생물을 감지하는 "pattern recognition receptors (PRRs)"가 발견되면서 선천성 면역계의 중요성에 관심이 집중되고 있다. 또한 그에 따른 iNOS 또는 COX-2의 억제에 의한 염증 반응 억제 방법의 개발도 모색되고 있다. 최근에는 여러 염증 관련 매개체들이 다양한 질병의 원인이 되거나 밀접하게 관련이 되어 있음이 밝혀짐에 따라, 천연물로부터 항염증 효능을 가진 물질을 활용하여 질병의 예방이나 치료에 이용하려는 노력이 지속적으로 시도되고 있는 실정이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 녹두 추출물과 프로바이오틱 균주를 이용한 염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 우선 다양한 용매를 이용하여 녹두 추출물을 분획하였으며, 분획한 물질을 선천성 면역계에 속하는 대식세포주인 생쥐 J774 세포주와 후천성 면역계에 속하는 T 림프구 세포주인 생쥐 RMA 세포주를 대상으로 처리 한 후, 세포 증식, 세포사멸, cytokine 분비능의 변화를 통하여 면역 조절 효능을 검증하였다. 그 후 장염증 동물모델을 통해, 녹두 추출물 투여 시 변화하는 생쥐의 면역세포 및 염증성 cytokine의 분비능을 살펴봄으로써 그 효능을 고찰하였다. 또한 녹두추출물과 프로바이오틱 균주가 함유된 면역 조절 기능성 식품소재를 개발하고자 하였다.

따라서 연구개발의 범위는 다음과 같다.

제 1 절 녹두 추출물 제조 및 활성성분의 분리 정제

- 제 1 항 녹두추출물의 제조 및 활성 성분의 확인
- 제 2 항 녹두추출물의 생리활성 효과 측정
- 제 3 항 제조과정 중 유효항염증 성분의 활성 변화조사

제 2 절 녹두 발효를 위한 균주 검색 및 발효조건 설정

- 제 1 항 녹두 발효 균주 검색 및 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성 측정
- 제 2 항 선발 유산균주의 기본 프로바이오틱스 능력 확인
- 제 3 항 선발 유산균주의 안전성, 동결 저항성, 대두사포닌 분해능력 측정
- 제 4 항 유산균주를 이용한 녹두 발효물 제작

제 3 절 녹두 추출물과 발효물의 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

- 제 1 항 녹두 추출물, 발효물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 2 항 녹두 추출물, 발효물의 T 림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 3 항 녹두 사포닌의 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 4 항 장 염증 동물모델에서 녹두 추출물, 발효물의 항염증 효과 검증

제 4 절 선발된 균주와 녹두추출물을 이용한 복합발효기술 확립

- 제 1 항 녹두 추출물 함유 유제품의 제조
- 제 2 항 제조 성분에 따른 발효특성 차이 확인
- 제 3 항 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 관능적 특성

#### IV. 연구개발 결과 및 성과활용 계획

주로 사용되고 있는 항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위한 방법으로는 일상적인 섭취가 가능한 식품을 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 과거부터 현재까지 주된 식재료로 사용되던 녹두와 체내에서 안전하다고 알려진 프로바이오틱스 소재를 활용하여 염증 완화여부를 탐색하였다. 즉, 이들 녹두 추출물 및 프로바이오틱 균주에서 항염증 효과가 뛰어난 물질을 탐색한 뒤 세포수준, 동물모델에서 검증을 실시하였다. 추출된 녹두 항염증 물질과 균주 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191은 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 염증을 완화하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 물질이 함유된 유제품 제조를 위하여 녹두 추출물과 균주의 발효능을 탐색하였으며, 항염증 활성을 갖는 녹두추출물이 포함된 유제품을 제조하였다. 또한 녹두 특유의 풀냄새를 향미성분을 이용한 마스킹을 통해 소비자가 거부감을 느끼지 않는 방안을 모색하였다. 결론적으로, 항염증 활성이 있는 녹두 추출물 및 Probiotic 균주 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191이 포함된 유제품 제조를 통하여 염증관련 질환을 완화하는 식품소재 개발하였다.

# Summary

## I. The Title

Development of functional dairy products containing novel anti-inflammation components and active saponins from mung bean

## II. The Necessity and the Purpose of Research & Development

Several human diseases including some autoimmune diseases, organ transplantation rejection and systemic infection are mainly associated with an inflammatory response. Since inflammatory responses are caused by the activation of both innate immune cells and adaptive immune cells, controlling the activity of immune cells is the critical step to prevent or treat diseases associated inflammatory responses. The purpose of this study is the identification of anti-inflammatory effect of mung bean extract and probiotics. Also, we will develop anti-inflammatory food based on the ingredient from mung bean extract to relieve from the inflammatory responses.

## III. The Contents and the Range of Research & Development

We will screen an anti-inflammatory activity from the mung bean extract and probiotics strains according to the established analytic protocols. According to these protocols, we will verify the anti-inflammatory effect from the mung bean extract and probiotics strains in cellular level and animal models based on inflammatory responses. In details, we will monitor the efficacy of an anti-inflammatory activity from mung bean extract and probiotics strains by characterizing the phenotypic changes of immune cells such as macrophage (J774 cell line) and T lymphocyte (RMA cell line) after treatment of appropriate reagents. Criteria checked on phenotypic changes will be included in cell proliferation, cell death and cytokine productions from macrophage and T lymphocyte. After the identification of anti-inflammatory effects from appropriate reagents, we will treat these reagents in animal disease model (inflammatory bowel disease model) to confirm the effects of these reagents. Further, we will develop dairy products using the extract of mung bean and probiotics to relieve from the inflammatory responses.

## IV. The Results of Research & Development

We screened an anti-inflammatory activity from the mung bean extract and probiotics strains by monitoring the phenotypic changes of immune cells such as macrophage (J774 cell line) and T lymphocyte (RMA cell line) after treatment of appropriate reagents. As a result, both mung bean extract and *Lactobacillus salivarius* E4191 strain have an anti-inflammatory effect by decreased proliferation and decreased cytokine production of macrophage and T lymphocyte. Further, we treated these reagents in animal disease model (inflammatory bowel disease model) to confirm the effects of these reagents. Results clearly showed that the treatment of mung bean extract has an anti-inflammatory effect. Based on these results, we developed dairy products using the extract of mung bean and probiotics to relieve the inflammatory symptoms through a food which is possible to intake daily.



# CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	10
Chapter 2. Current research trends.....	14
Chapter 3. Results.....	23
1. Mung bean extract manufacturing and purification of the active ingredient.....	23
2. Screening of probiotic strains which have the ability to ferment mung bean and establishment of method to ferment mung bean.....	51
3. Measurement of an anti-inflammatory activity from mung bean extract and fermented product .....	65
4. Establishment of fermentation technology using selected strains and mung bean extract .....	97
Chapter 4. Achievement and contributions.....	108
Chapter 5. Further plan.....	110
Chapter 6. Current research data in foreign country.....	112
Chapter 7. References.....	113

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제 1 절	연구개발의 목적.....	10
제 2 절	연구개발의 필요성.....	10
제 3 절	연구개발의 범위.....	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	14
제 1 절	국내 염증성 질환 관련 연구 현황.....	14
제 2 절	국의 염증성 질환 관련 연구 현황.....	19
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과.....	23
제 1 절	녹두 추출물 제조 및 활성성분의 분리 정제.....	23
제 1 항	녹두추출물의 제조 및 활성 성분의 확인.....	23
제 2 항	녹두추출물의 생리활성 효과 측정.....	30
제 3 항	제조과정 중 유효항염증 성분의 활성 변화조사.....	40
제 2 절	녹두 발효를 위한 균주 검색 및 발효조건 설정.....	51
제 1 항	녹두 발효 균주 검색 및 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성 측정.....	51
제 2 항	선발 유산균주의 기본 프로바이오틱스 능력 확인.....	57
제 3 항	선발 유산균주의 안전성, 동결 저항성, 대두사포닌 분해능력 측정.....	59
제 4 항	유산균주를 이용한 녹두 발효물 제작.....	63
제 3 절	녹두 추출물과 발효물의 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석.....	65
제 1 항	녹두 추출물, 발효물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석.....	65
제 2 항	녹두 추출물, 발효물의 T 림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석.....	77
제 3 항	녹두 사포닌의 항염증 활성 측정 및 기전분석.....	87
제 4 항	장 염증 동물모델에서 녹두 추출물, 발효물의 항염증 효과 검증.....	90

제 4 절 선발된 균주와 녹두추출물을 이용한 복합발효기술 확립.....	97
제 1 항 녹두 추출물 함유 유제품의 제조.....	97
제 2 항 제조 성분에 따른 발효특성 차이 확인.....	97
제 3 항 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 관능적 특성.....	99
<b>제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....</b>	<b>108</b>
제 1 절 녹두의 신규 항염증 성분과 활성형 녹두 사포닌의 분리 정제.....	108
제 2 절 녹두 추출물 또는 발효물을 함유한 염증완화 기능성 유제품의 개발.....	108
제 3 절 녹두 추출물과 발효물의 항염증 활성 및 기전 분석.....	109
<b>제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획.....</b>	<b>110</b>
제 1 절 추가 연구의 필요성.....	110
제 2 절 타 연구에의 응용.....	110
<b>제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....</b>	<b>112</b>
<b>제 7 장    참고문헌.....</b>	<b>113</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

자가 면역 질환의 하나로 알려진 염증성 장질환은 소화관을 침범하는 원인 미상의 만성 염증성 질환이다. 본 질환을 치료하기 위한 방법으로서 약물치료가 행해지고 있는데 이러한 약물치료는 두통, 간질환, 부신피질 부전증 및 통증 유발 등의 문제를 가지고 있다. 따라서 이러한 부작용과 높은 비용을 대체하는 항염증 소재의 도입이 요구되는 실정이다.

본 연구에서는 녹두로부터 분리한 신규 항염증 성분과 프로바이오틱 균주를 이용한 녹두 사포닌의 발효수식을 이용한 면역조절을 통한 장염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 추출 분리한 녹두 사포닌의 항염증 활성을 이미 알려진 대두 사포닌의 항염증 활성과의 비교를 위해 대식세포 (J774 cell line)와 T 림프구 (RMA cell line)를 대상으로 세포 수준에서의 면역 조절 효능을 검증, 또한 동물 모델을 통해 숙주의 면역세포 및 염증성 cytokine의 분비를 살펴봄으로써 그 효능을 고찰하는 것이 그 목적이다. 또한 녹두로터 신규 항염증 성분 추출 방법의 최적화, 신규 항염증 성분의 분리 정제, 이를 이용하여 프로바이오틱 균주와 녹두추출물의 복합발효를 이용한 면역 조절 기능성 식품소재 개발하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

염증성 장질환은 장에 발생하는 원인 불명의 만성적인 염증을 뜻한다. 염증성 장질환은 크게 2개의 군으로 나눌 수 있는데, 그 하나가 만성 비특이적 궤양성 대장염(ulcerative colitis)이며, 다른 하나가 크론씨 병(Crohn's disease)이다. 넓은 의미로는 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염 등을 포함하기도 한다. 염증성 장질환의 원인은 장질환의 원인은 아직까지 알려지지 않고 있으나 이 질환들이 유전 및 환경적 영향을 받으며 면역학적 이상에 의해 매개된다는 사실은 분명하다 (김유선, 2009). 아직까지 염증성 장질환을 완치시키는 방법은 알려져 있지 않지만 병의 경과에 미치는 인자에 대해서는 상당한 연구가 진척되고 있으며 염증을 가라앉히기 위한 여러 가지의 약물이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 대부분의 약물치료들은 두통, 간질환, 부신피질 부전증 및 통증 유발 등의 부작용을 가지고 있다.

다음 표는 염증성 장질환에 사용되는 약물과 그 부작용을 나타낸 것이다.

분 류	성 분	부 작 용
항염증제	메살라진, 설파살라진	복부허실, 두통, 피진, 간질환, 남성불임
부신피질 호르몬제	프레드니솔론, 부대소나이드	부신피질 부전증, 소화성 궤양, 당뇨병, 정신장애
면역억제제	아자치오프린, 사이클로스포린	효과 불분명 및 발암 우려
항생제	메트로니다졸, 시프로플록사신	효능은 안정되지만 임상적인 향상에 대한 유용성을 불분명
항산화제	알로푸리놀, 디메틸설폭사이드	급성 과민증상, 통증유발

염증성 장질환은 처음에 서양에서 주목을 받아왔다. 유병률이 인구 10만 명당 250명에 달한다. 이에 비해 우리나라에서 인구 10만 명당 유병률은 19.8명으로 크게 우려할만한 수준 아니나, 해마다 유병률이 증가추세에 있다(양석균, 2002; 장병익, 2007). 또한 염증성 장질환인 궤양성 대장염과 크론씨 병은 희귀성 난치병으로 분류되었으며 젊은 층에서 (15-35세 경) 호발하며, 흑인종이나 황인종보다 백인종에서 흔하고, 특히 유태인에서 발생빈도가 높다고 한다(진유태 등, 2003).

현재 항염증 소재로 사용되고 있는 약물은 높은 비용과 부작용의 문제를 가지고 있으며, 꾸준히 섭취하여 증상을 완화하거나 예방하는 항염증 소재 도입이 요구되고 있다.

사포닌은 sapo에서 유래된 어원으로 식물체에 함유하고 당부분 “Sugar” (glycone), 비당부분 “non-Sugar” (aglycone)로 구성되어 있는 배당체이며, 예전에는 비영양물질로 알려졌으나 최근 다양한 생리학적 활성과 약리학적 활성을 나타낸다. 특히 항균(anti-fungal), 항박테리아(anti-bacterial), 항염증성(anti-inflammatory), 항산화성(anti-oxidant), 항암성(anti-cancer)이 보고되어 있다. 현산과 일종인 버바스코사포닌 A는 급성/만성염증을 억제한다고 알려져 있다(Bermejo Benito, 1998). Haridas 등은 Acacia victoria로부터 추출된 트리테르페노이드(triterpenoid) 사포닌의 일종인 avicins이 종양세포 성장을 억제시키고 세포사멸을 유도하고 또한 iNOS, COX-2와 같은 염증성 전구물질 생성을 저해함을 보고하였다(Haridas *et al.*, 2001). 진세노사이드-Rb2는 인삼 자궁내막암세포에서 분비되는 MMP-2 활성을 억제시키고 그 결과 기저막에 종양세포의 침윤성을 저해한다는 것이 보고되었다(Fujimoto *et al.*, 2001). 이들 연구들은 사포닌이 염증성 전구물질 생성과 암세포 전이를 조절함으로써 항염증성 및 항암효과를 가지고 있음을 시사하고 있다.

대두의 사포닌 함량은 0.50-0.56/100g dry matter으로 매우 높은 편이며, 식물 사포닌 중 손쉽게 식용으로 이용 가능하다. 대두 사포닌은 혈청 콜레스테롤 저하 및 면역증가에 대한 효과뿐만 아니

라 항암활성을 나타낸다고 알려져 있다. 최근 대두 사포닌은 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 유도된 I $\kappa$ B의 분해 억제와 COX-2, Protein Kinase C(PKC) 발현을 억제하고, 또한 aflatoxin-DNA adduct의 형성을 저해 시킨다는 것이 보고되었다(Jun *et al.*, 2002).

Probiotics는 적당한 양을 섭취하였을 때 건강에 도움이 되는 살아있는 균(live organism)으로 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제재라 할 수 있다. Probiotics는 대부분 포도당이나 유당을 분해하여 다량의 유기산(젖산)을 생성하는 균주를 포함하는데 대표적인 미생물 속으로는 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* 속 등이 있다. 이러한 probiotics는 몸에 이로울 역할을 하는데 유산균이 생성하는 젖산은 음식물의 부패를 막는다. 즉, 유해균이 감염이나 성장을 억제해 음식물이 상하는 것을 막는 것이다. 또한 소화관에서는 유해균의 성장을 억제하고 소화관의 운동을 촉진시켜 배변을 돕는다.

지금까지 알려진 probiotics의 효능을 간단하게 정리하면 다음과 같다. 장내 유해균을 억제하고, 소화 작용을 촉진하며 설사 및 변비 개선에 효과가 있다. 또한 유당을 소화시키지 못하여 발생하는 유당불내증을 개선하고 콜레스테롤 저하 및 비타민 합성 효과가 있다. 이들의 건강증진 작용의 기작으로는 장내 영양성분에 대한 유해세균과의 경쟁 및 항균 물질 분비에 의한 유해균을 억제한다. 유기산 생성으로 인한 장 관내 pH를 저하시키며, 유해균의 장 상피세포로의 부착을 방지한다. 또한 유해균의 독소 생성 억제 및 독소를 무독화 시키며 장관내 면역기능 활성화에도 기여한다. 이 중 면역기능 조절에서는 염증을 매개하는 신호전달 물질의 조절하여 염증성 장질환을 완화시킬 수 있다는 보고가 많이 있다.

항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위하여 꾸준한 섭취를 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 체내에서 안전하다고 알려진 녹두추출물 소재와 probiotics를 이용하여 장염증 완화물질을 탐색하는 것이 요구된다. 이들 녹두추출물 소재와 probiotics에서 항염증 효과가 뛰어난 물질을 탐색하여 장염증 완화 기작을 설명하고 동물 또는 인체에 적용할 수 있다면 꾸준히 염증관련 장 질환을 완화하는데 도움이 될 것이다.

따라서, 본 연구는 현재까지 보고된 바 없는 녹두에 존재하는 항염증 성분의 규명과 녹두 사포닌 조성, 발아, 발효 과정 중에 일어나는 변화를 이해하는 데 중요한 학술적 가치가 있다. 또한 녹두추출물 소재와 probiotics의 항염증 효과를 세포 수준 및 동물실험을 통하여 확인함으로써 기능성 항염증 식품소재로써 과학적이고 객관적인 자료의 제시가 가능할 것이다.

## 제 3 절 연구개발의 범위

### 제 1 절 녹두 추출물 제조 및 활성성분의 분리 정제

- 제 1 항 녹두추출물의 제조 및 활성 성분의 확인
- 제 2 항 녹두추출물의 생리활성 효과 측정
- 제 3 항 제조과정 중 유효항염증 성분의 활성 변화조사

### 제 2 절 녹두 발효를 위한 균주 검색 및 발효조건 설정

- 제 1 항 녹두 발효 균주 검색 및 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성 측정
- 제 2 항 선발 유산균주의 기본 프로바이오틱스 능력 확인
- 제 3 항 선발 유산균주의 안전성, 동결 저항성, 대두사포닌 분해능력 측정
- 제 4 항 유산균주를 이용한 녹두 발효물 제작

### 제 3 절 녹두 추출물과 발효물의 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

- 제 1 항 녹두 추출물, 발효물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 2 항 녹두 추출물, 발효물의 T 림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 3 항 녹두 사포닌의 항염증 활성 측정 및 기전분석
- 제 4 항 장 염증 동물모델에서 녹두 추출물, 발효물의 항염증 효과 검증

### 제 4 절 선발된 균주와 녹두추출물을 이용한 복합발효기술 확립

- 제 1 항 녹두 추출물 함유 유제품의 제조
- 제 2 항 제조 성분에 따른 발효특성 차이 확인
- 제 3 항 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 관능적 특성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 염증성 질환 관련 연구 현황

#### 1. 염증성 질환 관련 발병 인자에 대한 연구

암(Cancer), 즉 악성종양(malignant tumor)은 신체의 정상세포가 발암성 바이러스(oncogenic virus), 방사선 또는 화학적 발암원(chemical carcinogen)으로 인하여 DNA의 손상이 일어나고, 손상된 DNA를 가진 세포가 증식을 계속하여 주변의 조직이나 장기에 침윤(invasion) 혹은 멀리 떨어진 곳으로 전이(metastasis)될 수 있는 상태를 말한다. 암세포의 전이에는 여러 가지 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있으며 그 중에서 특히 염증성 cytokine들은 암의 전이를 촉진시킨다. 염증은 세포손상이 가해졌을 때 자극이나 손상인자를 제거하기 위한 생체방어로서 염증성 면역세포(대식세포, T 림프구 등), 혈관 내피세포, 염증단백질이 복잡하게 관여하는 과정이다. 정상상태의 염증은 상처 치유와 관련하여 보통 자가 제한적이고 신체의 항상성을 유지하는데 중요하지만, 계속되는 자극으로 인한 염증상태는 동맥경화 및 특정 암의 발생 및 진행을 촉진시키는 작용을 한다.

염증성 cytokine으로 알려져 있는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 염증의 주요한 매개자이고 정상대식세포에서 생성, 분비되며 세포 사멸, 신생혈관 형성, 혈전을 유발한다. TNF- $\alpha$ 는 염증성 병변과정에서 발현정도가 증가되며, 특히 암 촉진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. 또한 TNF- $\alpha$ 는 호중구 백혈구를 활성화 시켜 과산화수소 생성을 증가시킴으로 내인성 암 촉진제의 기능도 한다. 그리고 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)은 CC 케모타인 계열로 염증 또는 감염 부위에 대식세포의 유인작용에 기여할 뿐만 아니라 혈관내피세포에 견고한 부착을 유도하여 염증뿐만 아니라 암세포 전이에 중요한 작용을 한다.

#### 2. 염증성 질환과 대두의 항염증 성분

암을 예방하는 방법으로 안전한 화학물질을 이용하여 정상세포가 암세포로 변화하는 다단계 발암과정(multi-stage carcinogenesis)을 억제하거나 지연하는 화학적 암 예방(chemoprevention)에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 여러 역학 연구에서 제시된 증거들에 의하면 대두 섭취는 암 발생과 반비례하며 특히 유방암, 대장암, 식도암, 전립선암의 발생을 낮춘다고 보고되어 있다. 대두에 존재하는 항암성분으로 isoflavones, bowman-birk typsin inhibitor(BBI), phytic acid, 사포닌이 있다. 특



히 이소플라보노이드 성분 중 genistein은 세포사멸(apoptosis)과 세포주기(cell cycle) 조절에 관여하는 유전자의 변형을 유도하여 암세포 증식을 저해하고 또한 혈관신생, 암전이를 강력히 억제시킴으로써 발암과정에 대한 지연 또는 억제한다고 알려져 있다.

### 3. 사포닌의 항암, 항염증 효과

사포닌은 sapo에서 유래된 어원으로 식물체에 함유하고 당부분 “Sugar”(glycone), 비당부분 “non-Sugar”(aglycone)로 구성되어 있는 배당체이며, 예전에는 비영양 물질로 알려졌으나 최근 다양한 생리학적 활성과 약리학적 활성을 나타낸다는 것이 보고되었다. 특히 항균(anti-fungal), 항박테리아(anti-bacterial), 항염증성(anti-inflammatory), 항산화성(anti-oxidant), 항암성(anti-cancer)이 보고되어 있다. 현산과 일종인 버바스코사포닌 A는 급성/만성염증을 억제한다고 알려져 있다. Haridas 등은 *Acacia victoria*로부터 추출된 트리테르페노이드 (triterpenoid) 사포닌의 일종인 avicins 이 종양세포 성장을 억제시키고, 세포사멸을 유도하며, 또한 iNOS, COX-2와 같은 염증성 전구물질 생성을 저해함을 보고하였다(Haridas *et al.*, 2001). 진세노사이드-Rb2는 인삼 자궁내막암세포에서 분비되는 MMP-2 활성을 억제시키고 그 결과 기저막에 종양세포의 침윤성을 저해한다는 것이 보고되었다(Fujimoto *et al.*, 2001). 이들 연구들은 사포닌이 염증성 전구물질 생성과 암세포 전이를 조절함으로써 항염증성 및 항암효과를 나타냄을 시사하고 있다.

대두의 사포닌 함량은 0.50-0.56/100g dry matter으로 매우 높은 편이며, 식물 사포닌 중 손쉽게 식용으로 이용 가능하다. 대두 사포닌은 혈청 콜레스테롤 저하 및 면역증가에 대한 효과뿐만 아니라 항암활성을 나타낸다고 알려져 있다. 최근 대두 사포닌은 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 유도된 I $\kappa$ B의 분해 억제와 COX-2, Protein Kinase C(PKC) 발현을 억제하고, 또한 aflatoxin-DNA adduct의 형성을 저해 시킨다는 것이 보고되었다(Jun *et al.*, 2002).

### 4. 염증성장질환의 정의 및 병인

크론씨 병과 궤양성 대장염으로 잘 알려져 있는 염증성 장질환은 재발과 호전을 반복하는 만성적 질병으로 위장관에 염증을 일으키는 원인 불명의 질환이다. 현재까지 인정되고 있는 병태생리를 보면 흡연이나 식이와 같은 환경적 요인, 유전적 요인 또는 세균 감염 등이 그 원인으로 제시되고 있으며, 유전학적 소인이 있는 사람이 원인 혹은 유발 인자에 노출되어 장점막에 염증 및 면역반응이

초래되고 이 반응이 소멸되지 않고, 비정상적으로 지속 증폭되어 만성적인 조직 손상을 일으키는 상태로 이해되고 있다(김태호 등, 2003).

현재까지 명확한 병태생리는 알려져 있지 않지만 가능한 원인들로는 환경적 요인, 세균감염에 의한 면역조절기능의 결함, 유전적 인자 등이며 각 인자들이 단독 또는 복합적으로 관여할 수 있다. 잘 알려져 있는 환경적 요인으로는 식습관의 서구화, 도시지역 거주, 위생 상태가 좋은 경우 등이며, 흡연을 하는 사람들에서 많이 발생함이 입증되었다. 특히 세균 감염과 위생 관련성 면에서 위생 상태가 좋지 않은 경우 염증성 장질환을 예방하는 것으로 알려져 있다. 서구화된 사회에서 염증성 장질환의 유병률이 증가하는 것은 위생상태의 개선으로 기생충의 감염이 감소된 것과 연관이 있을 것으로 생각된다.

## 5. 염증성장질환의 진단

### 가. 혈청학적 진단

대변에서 calprotectin과 lactoferrin은 염증상태의 호중구에서 유리된다. Calprotectin은 궤양성 대장염의 치료 중 재발 및 관해를 평가할 수 있는 비침습적 표지자로서 이용이 가능하다. C-reactive protein (CRP)은 임상에서 염증성 장질환의 치료 반응 표지자로서 널리 이용된다. 특히 크론씨 병에서 많이 이용되는데, 크론씨 병 활성 지수 (Crohn's disease activity index), 혈중 아밀로이드, IL-6, calprotectin과 상호 연관성이 높은 표지자이다.

Perinuclear antineutropilic antibody (pANCA), anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA)중 전자는 궤양성 대장염, 후자는 크론씨 병의 진단에 유용한 표지자로서 이용된다. 또한 불확정 대장염의 원인 질환을 감별진단 하는 데 도움을 줄 수 있고, 질환의 임상적 표현형, 임상양상에 따라서 다른 의미를 가지고 유용하게 이용된다. 질환이 발현되기 전 이 표지자가 검출될 경우 염증성 장질환을 예견하는 표지자로서 가능성이 있을 수 있다.

장내 세균에 대한 항체인 anti-OmpC IgA (directed against outer membrane porin C or *E.coli*)와 anti-I2 (directed against *Pseudomonas fluorescens*)는 크론씨 병의 환자에서 발현되며, 이 경우 오랜 기간 심한 질환을 가지면서 수술을 받는 경우가 많다. 이 중 전자는 크론씨 병 가족력이 있으나 크론씨 병이 없는 경우에도 증가하는 경우가 있으므로 면역표지자로서의 역할을 기대할 수 있

다. 또 다른 세균 표지자인 flagellin에 대한 항체의 경우도 합병증이 많은 경우 및 pANCA 양성인 크론씨 병의 경우 많이 검출된다.

#### 나. 내시경

내시경은 만성 염증성 장질환의 진단, 침범 부위 정도, 질병의 활성도, 합병증의 발생여부를 평가할 수 있는 방법이다. 최근에는 초음파내시경, 확대내시경, 색소내시경 및 캡슐 내시경의 발달로 소장을 포함한 전 장관의 점막 및 조직의 깊은 곳까지를 잘 관찰할 수 있어 진단 및 치료에 많은 정보를 제공하여 주고 있다. 또한 내시경은 암 발생 및 전암 단계를 찾아낼 수 있는 유일한 방법이다. 그 중 색소내시경은 색소를 대장 내에 주입한 후 점막의 형태변화를 관찰하는 것으로 주로 메틸렌블루, 인디고카민 등이 사용 된다. 또한 색소를 주입한 뒤 확대내시경을 이용해 점막주름의 형태를 관찰하면 임상경과 및 이형성증 등의 전암 단계 병변의 진단율을 높일 수 있다. 형광내시경은 5-aminolevulinic acid(5-ALA)를 이용하여 이형성증을 진단하기 위하여 사용된다. 캡슐내시경은 소장의 크론씨 병 진단에 enteroclysis에 비해 진단율이 더 좋은 것으로 알려져 있다.

### 6. 염증성장질환의 치료 동향

가. Aminosalicylate : 궤양성 대장염의 초기 치료 및 유지요법에 가장 많이 사용되고, 재발방지에 효과적인 약물이다. 제형에 따른 연구결과로 대장의 세균에 의하여 분리된 두 개의 prodrug인 올살라진의 경우는 궤양성 대장염의 초기치료 및 유지요법에 좋은 약제로 사용할 수 있다. 또 다른 발살라자이드의 경우도 메살라진보다 효과는 좋고, probiotics 재제와의 혼합사용 시 단독 치료보다 효과가 좋다.

나. Corticosteroid : 스테로이드는 심한 궤양성 대장염이거나, 5-ASA제제의 투여에도 효과가 없는 경우 치료 관해를 목적으로 사용한다. 정맥 투여는 주로 심한 경우, 경구투여는 주로 중등도 이상에서 관해를 목적으로 사용한다. 사용기간은 단기간 사용을 원칙으로 하며 장기간 사용 시 많은 부작용이 발생한다.

다. Immunomodulators : 궤양성대장염에서면역억제제 치료는 아직까지 명확히 확립되지 않았다. 적응증은 초기 치료보다는 스테로이드에 의존성이 있거나, 5-ASA 제제 치료에 효과가 없거나, 또는 아주 심한 염증성 장질환의 경우 등이다.

라. Biological agents : 현재 염증성 장질환의 염증은 이에 관계하는 염증매개체와 cytokine의 역할이 강조되고 있다. 따라서 염증 및 면역반응을 전반적으로 억제하는 치료가 두 질환에 공통적으로 사용되고 있으나 이들 약제의 효능은 일부 제한적이며, 일부는 치료에 불응하게 되어 새로운 치료법에 대한 모색이 있었다. 1998년에 들어 염증성장질환의 병인에 중요하게 관여하는 TNF- $\alpha$ 를 봉쇄하기 위한 전략으로 이에 대한 이성 단클론항체인 infliximab이 개발되고 FDA에서 공인되면서 생물학적 치료에 새로운 장을 열었다. 단 3회의 주사로 임상적 호전뿐만 아니라 점막의 손상을 치유하는 효과가 보고되고, 관해유도 및 관해 유지에도 효과적이었다는 연구 결과가 보고되면서 이약물의 사용이 폭발적으로 증가하고 있고, 현재 국내에서도 심한 상태이면서 누공성 크론씨 병의 경우 보험 적용이 되어 국내에서도 좋은 치료성적이 보고되고 있다. Infliximab (Remicade TM), Adalimumab 등이 대표적이다.

마. 기타 치료법: Leukocytapheresis (LCAP)가 유용한데, 이는 말초 백혈구를 제거하여 염증을 조절하는 시도로 80년대부터 일본에서 주로 연구가 진행되었다. 최근에도 효과 및 안정성 면에서 염증 연구가 진행되고 있다. 장내 기생충이 과도한 면역 반응을 방지할 수 있다는 사실에 근거해 porcine whipworm으로 알려진 *Trichuris suis* egg를 이용한 임상연구들도 있다.

최근 염증성 장질환의 병태생리와 새로운 치료법에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 분자생물학의 괄목할 만한 발전으로 최근 infliximab 이외 각종 최신 생물학제제의 개발 및 유효한 임상연구 성적이 보고되고 있다. 갑작스런 많은 연구결과의 발표는 치료에 한계를 느끼는 환자와 임상 의사에게는 희망적인 빛이 되기도 하지만 약물의 선택하는 입장에 있어서는 혼란스럽기까지 하다. 아무리 우수한 효과가 있다고 하더라도 경제적인 면, 장기투여에 따른 안정성 혹은 부작용, 치료 효과의 소실 등 이에 따르는 문제가 아직 많다고 할 수 있다. 향후 이들 약제의 도입과 동시에 국내 임상연구가 이루어져 한국인에서 적합한 약제의 선택이 중요할 것으로 생각하며, 환자의 입장에서 기존에 비해 훨씬 수월하게 복용할 수 있으면서 경제적이고, 또한 치료효과도 우수한 생물학적 제제의 등장이 있을 것으로 생각한다.

## 제 2 절 국외 염증성 질환 관련 연구 동향

### 1. 염증성 전구물질에 대한 연구 동향

염증상태에서 증가하는 prostaglandins (PGs), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 들은 염증성 질환의 발병기전에 매우 잘 알려진 염증성 전구물질에 중요한 매개자일 뿐만 아니라 많은 종양조직에서도 발견되는 분자이다. COX는 COX-1와 COX-2 두 종류가 있으며 아라키돈산에서 프로스타글란딘을 생합성하는데 관여하는 효소이다. COX-1은 혈관 항상성, 신장혈류의 조절 등의 생리학적기능을 위한 PGs 합성을 위해 거의 모든 세포에서 일정하게 발현되는 반면 COX-2는 정상 조직에서 발현되지 않고 cytokine, 성장인자, 종양유전자에 의해 유도된 염증성 병변과정과 암 진행과정에서 많이 발현된다. 또한 COX-2는 세포사멸과 관련된 Bcl-2, Akt 활성을 촉진시켜 암 세포사멸(apoptosis)를 억제하는 한편, 혈관신생(angiogenesis)과 전이에 관여하는 MMP-2, angiogenic factors 등의 발현을 증가시켜 암의 진행을 촉진시킨다. COX-2에 의해서 생성되는 PGE2는 염증반응, 면역반응, 신생혈관 형성을 촉진시켜 암 발생에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다(Sano *et al.*, 1995). Pan 등에 의하면 COX-2의 강력한 저해제인 비스테로이드성 항염증제(NSAID : nonsteroidal anti-inflammatory drugs)와 COX-2 선택적 저해제인 NS398는 PGE2 생성을 억제할 뿐만 아니라 세포막 기질 분해효소의 일종인 MMP-2의 생성을 억제하여 줌으로써 폐암 전이를 저해 또는 예방함을 발표하였다(Pan *et al.*, 2001). 또한 Fu 등은 위암 모델에서 COX-2 선택적 저해제로 알려진 celecoxib에 의해 종양의 발생이 현저히 감소하여 항암효과가 나타난다고 보고하였다(Fu *et al.*, 2004).

Inducible NO synthase (iNOS)는 COX-2와 다른 경로로 발생하지만 염증을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 효소로써 강력한 염증성 전구물질인 NO (nitric oxide)를 생산하기 위해 L-아르기닌의 산화적 탈아미노 반응을 촉매한다. NO는 낮은 농도에서는 신체 어디에서나 존재하고 건강의 유지에 중요한 역할을하며 혈관을 넓히고 혈액순환을 개선하나 높은 농도에서는 순환 shock을 일으키고 세포사멸을 유도한다(Achike *et al.*, 2003). iNOS는 NO의 생성을 통해 세포 돌연변이화로 유전자의 변이를 야기시켜 암화과정의 개시자로서 작용할 뿐만 아니라 암 발생 촉진 및 진행에 주요 역할을 하는 염증성 전구물질의 생성 및 COX-2 발현의 조절에 관여한다(Surh *et al.*, 2001).

암과 관련된 염증성 전구물질(PGE2, iNOS, COX-2)들은 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)와 같은 전사조절인자에 의해서 발현이 조절된다고 알려져 있다(Surh *et al.*, 2001). NF- $\kappa$ B는 유도성 전사인

자의 일종으로 염증과 암을 포함한 다양한 병리학적 상태와 관련된 특이적 표적 유전자의 발현을 조절한다. 전사인자인 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 Rel 단백질(Rel A, p65, p50, p52, c-Rel, v-Rel, and Rel B)의 아단위로 구성된 이성이량체(heterodimer)나 동성이량체(homodimer)를 이루면서 I $\kappa$ B라는 저해단백질(inhibitory protein)이 부착되어 불활성상태로 존재한다. 그러나 NF- $\kappa$ B 경로를 촉진하는 lipopolysaccharide (LPS), 염증성 cytokine, 산화적 스트레스(ROS)와 같은 다양한 세포외 신호를 주면 I $\kappa$ B가 분해되어 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 세포질에서 핵 내로 이동(translocation)을 유도하여 DNA와 결합하게 되면서 염증성 전구물질을 생성한다. Suh 등은 전립선암의 진행에서 혈관신생인자 Interleukin-8 (IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF)와 침윤/전이인자 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), urokinase-type plasminogen activator (uPA), uPA receptor에 관련된 유전자의 발현을 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되어 암을 억제한다고 보고하였다(Suh and Rabson, 2004). NF- $\kappa$ B가 DNA와 결합하여 염증성 전구물질 생성을 증가시켜 정상세포가 변형된 형태의 세포(transformed cells)로 바뀌면서 MMPs 분비를 유도하여 세포외막기질(extracellular matrix : ECM)을 파괴시키면서 변형된 세포의 전이를 촉진시킨다.

Matrix metalloproteinase (MMP) 들은 단백질의 막 부착 형태와 분리된 형태인 zinc endo-proteinase 들로써 암 전이, 염증, 혈관신생을 포함한 많은 생리학적 과정에 중요한 역할을 한다. MMP 들의 주요 특성은 extra-cellular matrix (ECM)의 성분을 선택적으로 파괴하여 암세포가 조직에 침윤하도록 도와준다. 지금까지 20 여 가지 이상이 발견되었으며 그 중에서도 상피세포와 내피세포를 포함한 대부분 세포에서 지속적으로 발현하는 72 kDa의 단백질인 MMP-2 (gelatinase B)와 결합조직세포 촉진 또는 대식세포와 혈중 호중구를 포함한 염증성 세포에 의해 생성되는 92 kDa의 단백질인 MMP-9 (gelatinase A)은 조직 재구성에 중요한 역할을 한다. MMP-2와 MMP-9는 기저막의 주요 구성 성분인 tipe IV collagen을 선택적으로 파괴시키면서 전이와 침윤에 용이하게 하므로 다양한 악성 종양조직에서 그 발현이 현저히 증가한다고 보고되어 있다(Hornebeck *et al.*, 2002).

MMP-2는 membrane type1-MMP (MT1-MMP)와 tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (TIMP-2)에 의해 조절된다 (Seiki, 2003). MT1-MMP는 signal peptide, propeptide, catalytic domain, linker-1 (hinge), trans-membrane domain, 20개 아미노산의 짧은 세포질 말단으로 구성된다 (Itoh *et al.*, 2004). MT1-MMP는 분비 과정동안 signal peptide가 signal peptidase에 의해 제거되고 proprotein convertases에 의해 propeptide가 활성형태로 세포 표면에서 발현된다. 활성화된 MT1-MMP는 TIMP-2에 의해 저해되어 pro-MMP-2의 상태를 조절하는 역할을 한다 (Seiki, 2003). MT1-MMP는 동맥경화, 관절염, 류마티스염, 염증, 혈관신생, 상처 치료, 암의 전이/침윤 같

은 다양한 병태생리학적 과정에 관여한다. 특히 MT1-MMP는 특정 암에서 현저하게 발현되고 이러한 과발현은 in vitro, in vivo에서 암 세포의 이주, 침윤, 전이를 증진시킨다. TIMPs는 조직내에서 catalytic site에 부착하여 MMPs의 효소적 활성을 조절하는 주요한 내재인자로서 지금까지 4가지 TIMPs가 밝혀졌다 (Seiki and Yana, 2003). 특히 TIMP-1은 거의 모든 활성화된 MMPs를 저해할 수 있는 반면에 TIMP-2는 MMP-2의 주요 저해자로서만 작용한다. 세포 표면에서 pro-MMP를 활성화하기 위해 적어도 MT1-MMP의 두 분자가 매우 근접해야만 하고 이 근접된 두 분자의 Hemopexin-like domains의 사이에 상호작용을 통해 homophilic MT1-MMP 복합체를 형성하여 활성화된다. 이 복합체는 catalytic domain 부위에 TIMP-2의 N-terminal과 결합하여 MT1-MMP의 작용이 조절된다 (Itoh *et al.*, 2004). MT1-MMP/TIMP-2 복합체는 TIMP-2의 C-terminal과 pro-MMP-2의 hemopexin-like domain 부위와 결합하여 활성화된 MT1-MMP에 의해 pro-MMP-2가 활성화된 형태로 변하게 된다. TIMP-2는 MT1-MMP와 같이 MMP-2의 활성을 조절하여 특정 암 전이의 진행을 저해하는 것으로 보고되었으며 TIMP-2 결여 마우스에서는 암전이가 증가됨이 밝혀졌다 (Sounni *et al.*, 2003).

## 2. 장 염증 평가에 분변 표지자의 유용성

염증성 장 질환 환자에서 염증을 시사하는 분변 표지자는 lactoferrin (Lf), calprotectin (Cal), polymorphonuclear neutrophil elastase (PMN-e)와 혈청 C-reactive protein (CRP) 등이 있다. 또한 내시경을 통하여 활동 염증이 있는 염증성 장 질환과 활동성 염증이 없는 염증성 장 질환 및 과민성 장 증후군으로 나눌 수 있다. 결국 이 들을 종합하여, 궤양성 대장염의 질병 활성화도 지수(colitis activity index, CAI) 및 크론씨 병 활성화도 지수(Crohn's disease activity index, CDAI)를 나타낼 수 있다.

## 3. 영양과 염증성 장 질환

크론씨 병과 궤양성 대장염으로 대표되는 염증성 장 질환 환자들에서 영양결핍은 매우 흔한 현상이다. 최근 영양에 대한 관심이 증가하면서 염증성 장 질환에서도 그 원인으로서는 또한 일차치료법으로서의 영양의 중요성을 입증하는 많은 연구 결과들이 축적되고 있다. 이러한 연구 결과들은 현재 염증성 장질환의치료에 사용되고 있는 약물치료가 부작용의 가능성과 함께 근본적인 원인을 교정하지 못한 채 증상만 치료함으로써 재발방지에 도움이 되지 못하고 있고, 수술적 치료 역시 수술 후 크론씨 병 환자의 50~90%가 재발을 경험하고 있는 상황에서 매우 희망적인 결과들로 인식되고 있다.

영양학적인 요소들이 염증성 장질환의 원인으로서 중요한 역할을 한다는 명백한 증거는 현재까지 없다. 그러나 여러 역학적 연구조사에서 많은 영양학적 요소들이 염증성 장질환의 발생과 밀접하게 연관되어 있음이 밝혀지고 있다. 우선 영국에서는 자당(sucrose)의 과다섭취와 저 섬유식이 크론씨 병의 위험 인자로 보고되고 있다. 특히 일주일에 두 번 이상의 fast food을 섭취한 경우 크론씨 병과 궤양성 대장염의 발생위험도가 각각 3.4배, 3.9배 증가한다는 보고가 있다. 이태리에서는 정제된 탄수화물(refined carbohydrates)의 과다섭취가 염증성 장 질환 전반에 걸쳐, 고단백질 섭취는 궤양성 대장염의 위험인자로 보고되었으며, 식이섬유는 염증성 장질환의 발생에 명확한 영향이 없는 것으로 보고하고 있다. 또한 이스라엘에서도 자당의 과다섭취가 염증성 장 질환, 동물성 지방 또는 콜레스테롤의 과다섭취가 궤양성 대장염의 발병과 연관이 있는 것으로 보고되고 있다. 한편 일본에서는 1966년에서 1985년 사이에 일본에서 총 지방, 동물성지방, 동물성 단백질, 우유단백질의 섭취량 증가와 함께 n-3 불포화지방산의 섭취량 감소가 크론씨 병의 증가와 강력한 연관관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 한편 채소와 과일은 방어 효과를 갖는 것으로 시사되고 있다. 식이항원(food allergen)은 염증성 장 질환의 원인으로서 중요한 역할을 하지 않는 것으로 보고되고 있다.

영양결핍은 소장을 침범한 크론씨 병 환자들에서는 흔하나 대장에 국한된 염증성 장 질환 환자들에서는 비교적 드물다. 영양결핍은 체중감소, 성장장애, 빈혈, 피로, 골다공증, 설사, 부종, 근 경련, 세포면역장애 또는 상처치유 지연 등의 임상양상으로 나타날 수 있다. 특히 청년기(adolescents) 염증성 장 질환 환자들의 약 1/3에서는 성장 장애가 관찰되고, 체중감소는 크론씨 병 환자의 65~75% 궤양성 대장염에서는 18~62%에서 관찰되며, 빈혈은 염증성 장 질환 환자의 85%까지 보고되고 있다. 빈혈의 원인으로서는 철 결핍이 20~40%이다. 적혈구내엽산농도(erythrocyte folate level)의 감소는 궤양성 대장염 환자의 27% 크론씨 병 환자의 9%에서 관련되어 있다. 크론씨 병에서는 말단 회장의 병변이나 절제에 의한 비타민 B12 결핍이 빈혈의 원인이 될 수 있다. 수용성 비타민이 결핍되는 경우는 드물지만 지용성 비타민은 소화와 흡수장애에 의해 결핍될 수 있다. 비타민 D 결핍은 스테로이드 사용과 연관된 골감소증 발생에 기여한다. 그러나 혈액 검사 상 비타민들의 혈중농도는 흔히 낮게 측정되어도 임상양상으로 나타나는 경우는 드물다. 아연(zinc)은 염증성 장 질환 환자에서 가장 흔히 결핍되는 미소 무기질(trace mineral)이며 셀레늄(selenium) 결핍이 관찰되나 이에 따른 근 병변이나 심근병변 등의 결핍 증상들은 드물다. 구리(copper)와 몰리브덴(molybdenum)의 결핍이 드물게 보고되고 있으나 이는 장기간 부적절한 중심 정맥 영양법을 받은 환자들에서만 관찰된다.



# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 녹두 추출물의 제조 및 활성성분의 분리 정제

### 제 1 항 녹두추출물의 제조 및 활성 성분의 확인

#### 1. 녹두추출물 제조 조건의 설정

마쇄된 시료(녹두, 대두) 100 g을 cellulose thimble (Whatman, Maidstone, England)에 넣고 환류 냉각추출 장치에 거치한 후 1000 mL의 hexane, ethylacetate, absolute ethanol, 증류수를 이용하여 순차적으로 용매추출을 실시하였다. 각 용매의 추출은 4시간 동안 지속하였으며 추출 후 시료로부터 남아있는 용매를 휘발시켜 제거한 후 thimble에 다시 시료를 충전 하여 다음 용매의 추출을 실시하였다. 증류수를 이용한 열수추출은 95℃에서 1시간 동안 실시하였으며 추출 후 1,764 x g에서 10분간 원심분리하고 Whatman No. 1 filter paper로 진공 여과하여 추출물을 준비하였다. Ethylacetate와 ethanol 추출물은 감압회전농축기로 농축 후 동결 건조하여 분말시료를 제조하였다.

표 1에 나타난 바와 같이 특히 hexane에 의하여 추출되는 성분의 수율은 녹두와 대두 간에 가장 뚜렷한 차이를 보였으며 이는 두류에 포함된 지방함량 차이에 기인하였다. ethylacetate 및 ethanol 추출물의 수율 역시 대두가 높은 것으로 나타났으며 대두가 녹두와 비교하여 상대적으로 많은 인지질을 함유하기 있기 때문으로 생각된다. 열수추출물에는 대두의 경우 단백질이 주성분이었으며 녹두의 경우에는 상당량의 전분이 추출되는 것으로 나타났다. 각 추출물의 세포독성과 항염증활성을 분석한 결과 에탄올추출물이 세포 독성이 낮은 반면 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었으며 이후 항염증 성분의 추출에는 모두 ethanol 추출물을 이용하여 실시하였다.

표 1. 순차적 용매 추출법에 의한 대두 및 녹두 추출물의 수율변화.

Solvent	Yield (%)	
	Mungbean	Soybean
Hexane	1.80	28.6
Ethylacetate	1.75	4.2
Ethanol	1.10	1.9
Water	15.7	15.8

일반적으로 추출 시 사용하는 용매의 비율을 증가시키면 추출물의 수율이 증가하는 경향을 나타내나 많은 양의 용매를 사용하는 경우 추출 후 용매를 휘발시키는데 많은 시간이 필요하며 경제적으로도 바람직하지 않다. Hexane 추출을 이용하여 녹두의 지방을 제거한 후 시료와 추출용매의 비율을 변화시키면서 에탄올추출물의 수율을 조사한 결과 표 2와 같이 시료:용매 비율을 1:5에서 1:10으로 증가시킨 경우 추출물의 수율은 약 26% 정도 증가한 반면 1:20으로 증가 시킨 경우 수율의 증가는 약 6% 정도 증가하였다. 따라서 에탄올 용매추출물의 제조를 위하여 적합한 시료:용매의 비율은 1:10으로 결정하고 연구를 진행하였다.

표 2. 시료에 사용된 용매 비율에 따른 수율변화.

Sample : ethanol (100%, v/v)	Yield (%)
1 : 5	0.87
1 : 10	1.10
1 : 20	1.17

또한, 추출용매인 에탄올의 농도를 80-100%로 변화시키며 추출수율의 변화를 측정한 결과 ethanol의 농도에 따른 추출수율 변화는 뚜렷한 경향을 나타내지는 않았으며 80%와 100%에서 1.05-1.10으로 유사하였다.

## 2. 녹두추출물의 분리 및 항염증 활성분석

녹두 에탄올 추출물을 methylene chloride로 평형이 유지 된 silica gel (230-400 mesh, Fischer Scientific) column (25 x 50 mm)에 loading하고 메탄올의 함량을 단계적으로 증가시키며(0, 10, 20, 50, 100% methanol) 녹두추출물의 용출을 실시하였다. 녹두에탄올 추출물은 그림 1a와 같이 5개의 peak로 분리되었으며 각 분획(I-V)의 회수율은 각각 11, 6, 5, 56, 22%로 나타났다. 또한, 각 분획의 성분은 chloroform/methanol/water (65:35:10, lower phase)를 전개용매로 사용하여 황산용액(10%, v/v)을 분무 후 회화시켜 spot을 확인하였다(그림 1b).

각 분획의 항염증 활성을 측정하기 위한 대식세포(J774) 배양은 Lee et al. (2011)의 방법으로 실시하였으며 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출하였다. mRNA 발현량을 분석하기 위한 RT-PCR(Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction)은 95°C에서 5분간 pre-denaturation,

35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)로 진행하였으며 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. Internal control로는 *Gapdh* mRNA 전사체를 사용하였으며 음성대조군으로는 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 3과 같다.

(a)

(b)

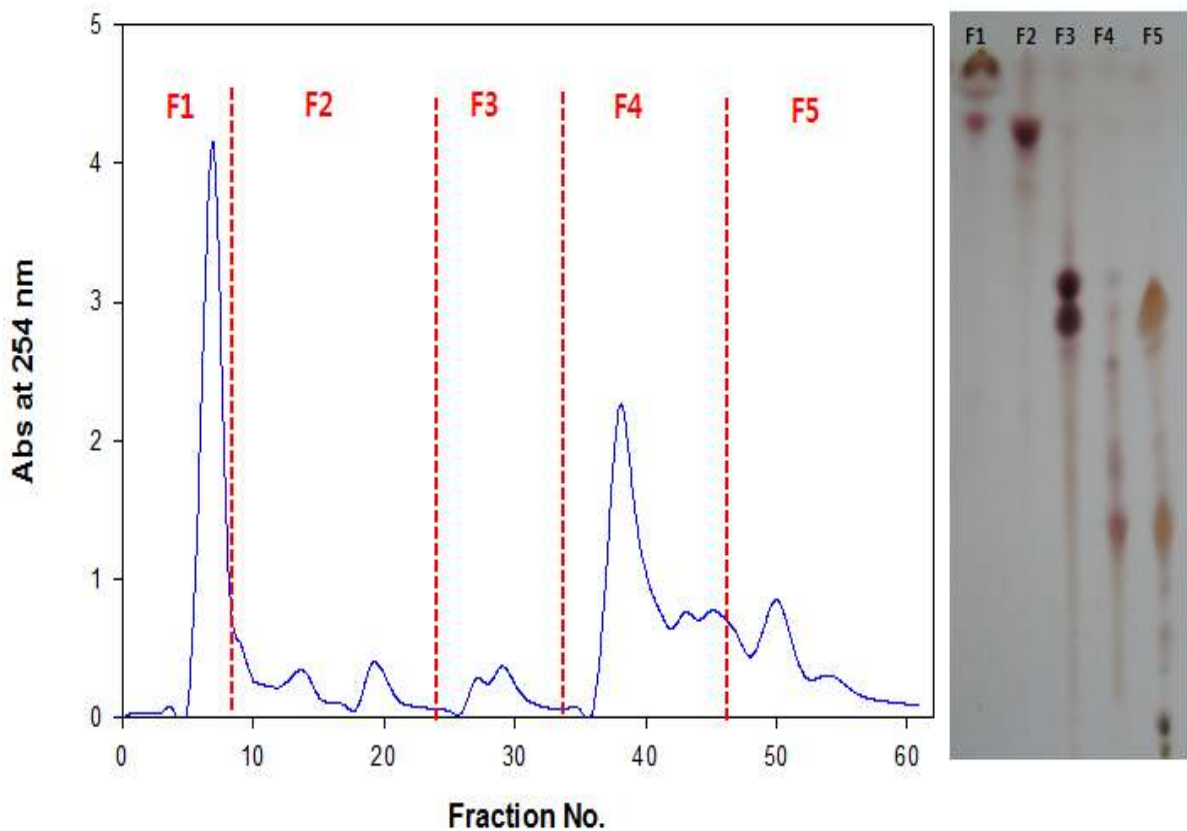


그림 1. Flash column chromatography (a) 및 TLC (b)에 의한 녹두에탄올 추출물의 분리. F는 각각의 분획을 나타냄.

표 3. 녹두 에탄올 추출물의 대식세포 항염증 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

Gene	Genebank	Sequence		Product size
IL-1 $\beta$	NM_008361.3	F	CCA GGA TGA GGA CAT GAG CAC C	358 bp
		R	ATC CAC ACT CTC CAG CTG CAG G	
IL-6	NM_031168.1	F	ACC GCT ATG AAG TTC CTC TCT GC	561 bp
		R	TAG CCA CTC CTT CTG TGA CTC CA	
IL-12 $\beta$	NM_008352.2	F	CTG CCA CAA AGG AGG CGA GAC TC	389 bp
		R	CAT ATT TAT TCT GCT GCC GTG CTT C	
TNF- $\alpha$	NM_013693.2	F	GAC GTG GAA CTG GCA GAA GAG G	502 bp
		R	TGA CGG CAG AGA GGA GGT TGA C	
iNOS	NM_010927.2	F	CAA GTA CGA GTG GTT CCA GGA GC	314 bp
		R	CTG TGT GGT GGT CCA TGA TGGTC	
Gapdh	NM_008084.2	F	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
		R	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

그림 2에 나타난 바와 같이 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS는 Fraction III에서 현저히 감소하였다. 또한, Lee et al. (2011)의 방법으로 측정한 propodium iodide 염색이나 MTT 분석에서도 Fraction 3은 세포독성을 나타내지 않았다(그림 3).

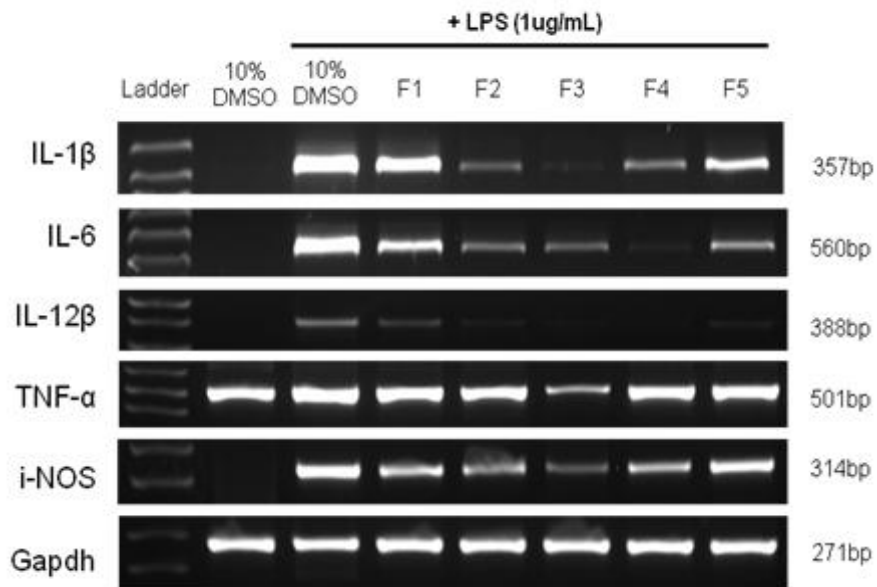


그림 2. 녹두 에탄올 추출물(3.7mg/mL)의 첨가가 LPS로 유도된 J774 대식세포의 염증성 전사인자 발현에 미치는 효과.

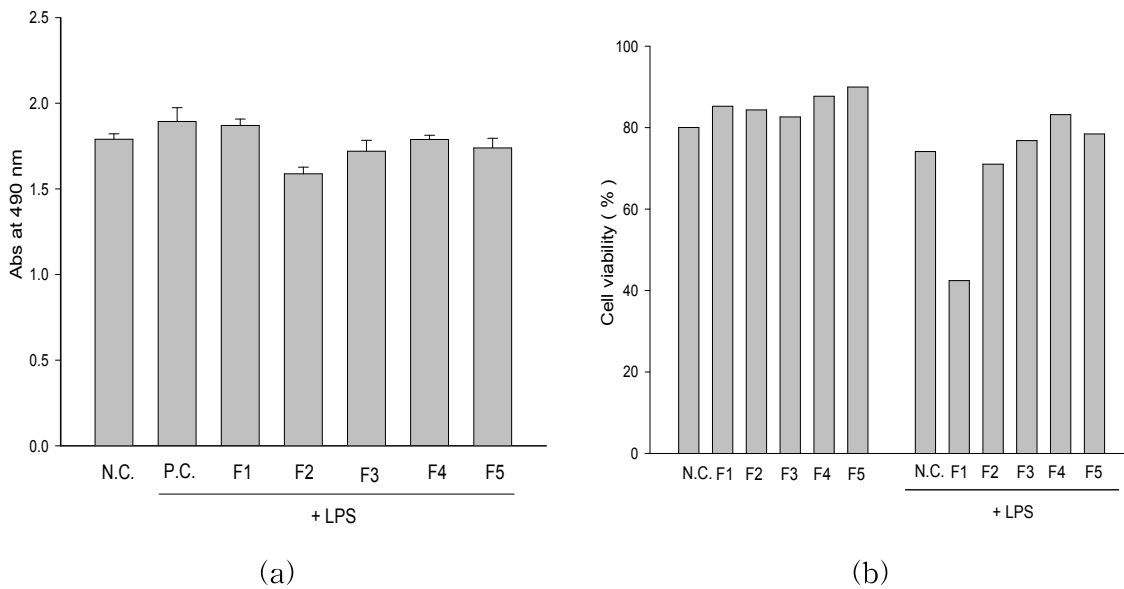


그림 3. 녹두 에탄올 추출물의 첨가(3.7 mg/mL)가 J774 대식세포의 생존성에 미치는 효과. (a) Propidium iodide staining, (b) MTT assay,  $1 \times 10^5$ /well

염증은 복잡한 반응으로서 cytokine, cyclooxygenase-2 (COX-2)나 prostaglandin과 같은 다양한 매개인자에 의하여 조절되며 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS 등이 대식세포에서 분비되는 대표적인 염증성 cytokine이다(Pan et al., 2009). 이들 중 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 만성염증 질환으로의 진행에 중요한 역할을 담당하며 스스로 염증반응을 개시시킴은 물론 다른 염증성 cytokine의 발현을 증가시킨다. Apte and Voronov (2002)은 높은 농도의 IL-1 $\beta$ 는 염증과 관련된 조직의 손상이나 종양으로의 진행과 관련이 있다고 하였으며 간에서 합성되는 C-reactive protein은 IL-6에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 보고되었다(Yudkin et al., 2000). C-reactive protein이 심혈관계 질환의 위험성과 높은 상관관계를 보이는 신뢰성 있는 생체대리지표(biomarker)임을 고려할 때 녹두에탄올 추출물은 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 심혈관계 질환의 위험성을 줄일 수 있는 잠재성을 가지고 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한, Mannon et al.(2004)의 연구 결과에 따르면 IL-12 발현의 감소가 Crohn's disease와 같은 염증성 장질환을 완화시킬 수 있는 현실적인 전략임을 제시하고 있다.

염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase(NOS)에 의하여 합성된다. NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS(iNOS)의 세가지 형태가 있으며 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성은 병리학적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 자체로도 독성을 나타낼 수 있지만 superoxide radical과 반응하여 과산화질산염(peroxynitrite)를 형성하는데 이것이 가

장 반응성이 높은 고반응 질소종이 된다. NO, 고반응산소종, 고반응질소종의 과량생산은 DNA, 지방, 단백질, 탄수화물 등의 손상을 초래하여 정상적인 세포 기능을 훼손하고 염증반응을 상승시키게 된다(Darley-Usmar et al., 1995).

### 3. 항염증 활성 분석의 phenolic profile 분석

Kwon et al. (2007)은 30 여종의 식물성 식품자원의 에탄올 추출물을 제조하고 염증반응에 관여하는 다양한 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. 녹두 및 녹두의 발아형태인 숙주나물의 에탄올 추출물은 함께 비교 된 두류, 두류유래식품, 식물 뿌리류, 잎채소 류, 해조류, 버섯류, 견과류 및 종실류 30 여종 중 LOX, phospholipaseA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) COX-2 등 여러 가지 염증 효소계의 활성을 전반적으로 억제하였으며 PLA<sub>2</sub>의 억제 활성이 매우 강하여 비선택적 저해제인 indomethacin과 유사하였다. 또한 LOX 및 COX의 기질인 arachidonic acid 생성을 억제함으로써 염증반응 초기단계에서 항염증 작용을 개시할 수 있는 것으로 보고하였다. 그러나 이들의 보고에서는 녹두 에탄올 추출물에 존재하는 유효성분에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

본 연구에서 항염증 활성이 확인 된 Fraction 3의 phenolic profile을 조사하기 위하여 Lee et al. (2008)의 방법과 Yao et al. (2008)의 방법으로 활성 분석의 phenol과 flavonoid profile을 각각 분석하였다. **그림 4**에 제시한 바와 같이 활성분석의 주요 성분으로서 gallic acid와 vitexin (isovitexin)이 확인되었다. 녹두의 종피와 종자분말 100 g에는 각각 1.2와 0.5 mg의 gallic acid가 존재하는 것으로 보고된 바 있다(Sosulski and Dabrowski, 1984). Gallic acid는 항산화활성은 물론 human THP-1 monocyte를 이용한 연구에서 hyperglycemia에 의하여 유도된 염증매개 유전자의 발현을 억제하였다고 보고하였으며(Kuppan et al., 2010), human mast cell에서 확인된 염증성 유전자 발현의 감소 효과는 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B와 p38 mitogen-activated protein kinase에 의존적이라고 하였다(Kim et al., 2006). 또 하나의 유효 성분으로 확인된 vitexin(apigenin-8-C- $\beta$ -glucopyranoside)과 isovitexin (apigenin-6-C- $\beta$ -glucopyranoside)은 녹두 종자에 각각 50 mg/g 정도 존재하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2008). Yao et al. (2008)는 2형 당뇨병(KK-A<sup>y</sup> mice)에 녹두에탄올 추출물을 경구투여 한 경우 포도당 대사의 유의적인 개선이 관찰되었다고 하였으며 녹두에탄올 추출물 안에 존재하는 vitexin과 isovitexin의 함량은 각각 45.66과 34.26 mg/kg 이었다고 보고하였다.

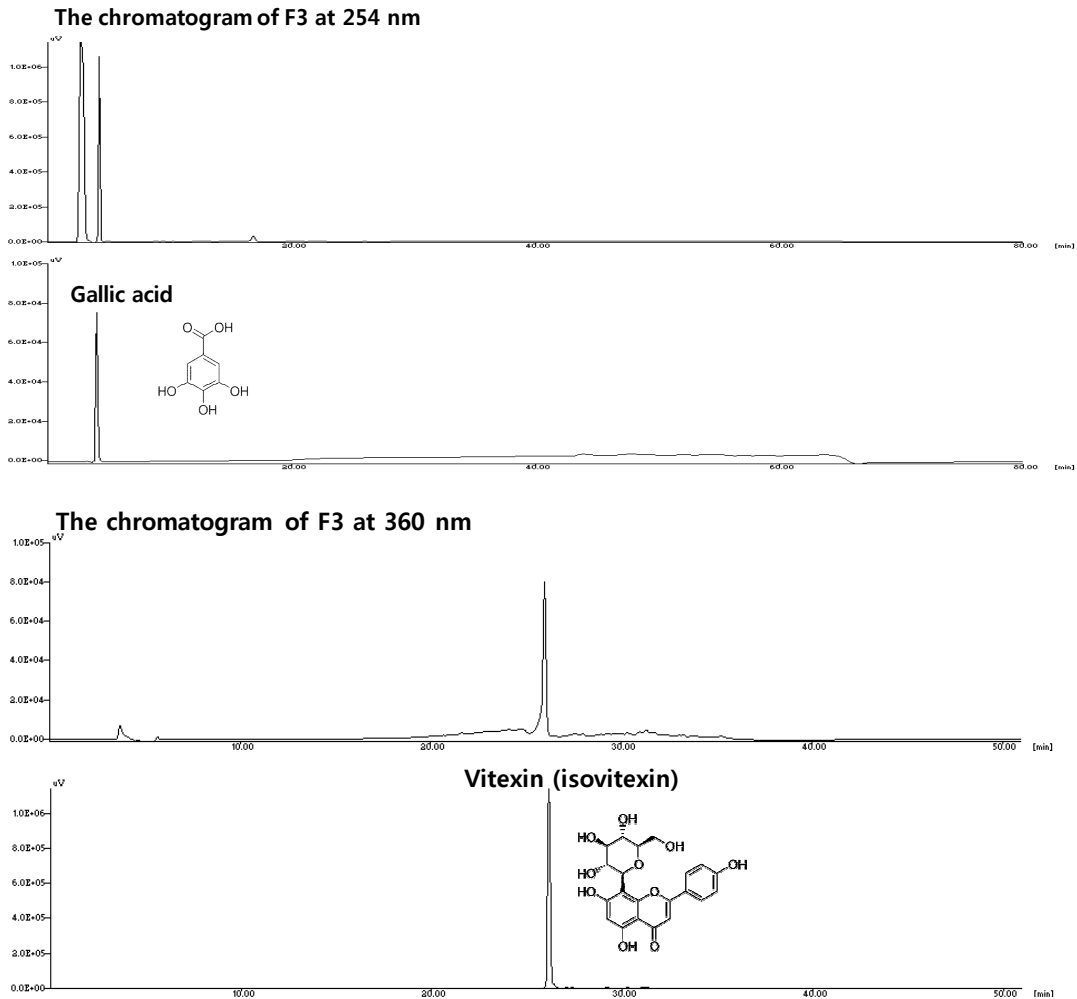


그림 4. 녹두 에탄올 추출물의 항염증 활성분획에 존재하는 유효성분의 phenolic profiles.

대체 의학에 따르면 녹두의 삶은 즙을 마시면 열을 내리고 혈압을 낮추는데 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있으며 여드름이나 피부질환에도 효과가 있어서 한방화장품의 소재로도 활용되고 있다. 한편 녹두의 생리활성에 관한 연구는 매우 제한적으로서 국내에서는 녹두의 이소플라본 함량과 항산화 및 혈전용해 활성이 조사되었으며(Oh et al., 2003; Kim et al., 2007) 녹두 나물 생즙이 카드뮴에 의한 흰 쥐 간 손상의 회복에 미치는 영향이 보고된 바 있다(Choi et al., 1998). 해외에는 녹두의 에탄올 추출물이 백내장, 동맥경화, Alzheimer's disease의 질환과 관련이 있는 진행성 당화 종말 생성물(advanced glycation end products)의 생성을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다(Peng et al., 2008). 그러나 녹두에탄올 추출물이 염증성 cytokine에 미치는 영향은 보고된 바 없으며 그 유효성분 또한 본 연구에서 처음으로 구체적으로 확인되었다.

## 제 2 항 녹두추출물의 생리활성 효과 측정

### 1. 녹두 사포닌의 효율적 분석 조건 설정

다양한 식물에 존재하는 사포닌은 그 조성이 서로 다르며 상이한 food matrix안에 존재하기 때문에 모든 식품으로부터 공통적으로 사포닌 함량을 측정할 수 있는 방법은 존재하기 힘들다. 녹두의 사포닌은 같은 콩과식물인 대두와 유사한 사포닌 조성을 가질 것으로 판단되어 시판 중인 대두사포닌(Wako Chemical Co., Japan)을 구입하고 acetone과 증류수로 각각 3회 세척하여 정제한 후 표준품으로 사용하였다.

대두사포닌 표준품을 TLC로 관찰한 결과 isoflavone이나 sterol 등의 불순물은 관찰되지 않았으며 약 6개의 spot( $R_f=0.09, 0.14, 0.17, 0.23, 0.28, 0.53$ )이 확인되었다. HCl(2 M)/Ethanol 용액을 이용하여  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 가수분해 시킨 후에는  $R_f$  값의 뚜렷한 증가가( $R_f=0.29, 0.67, 0.80, 0.82, 0.93$ )가 나타났으며, 이 결과는 HCl(2 M)/Ethanol 용액을 이용한 가수분해에 의하여 당 부분이 사포닌으로부터 분리되고 sapogenin으로 전환됨으로써 소수성이 증가하기 때문에 일어난 변화로 설명할 수 있다(그림 5). 따라서, diethyl ether/증류수 분획 후 diethyl ether층을 회수함으로써 당의 혼입 없이 sapogenin만을 회수할 수 있었다.

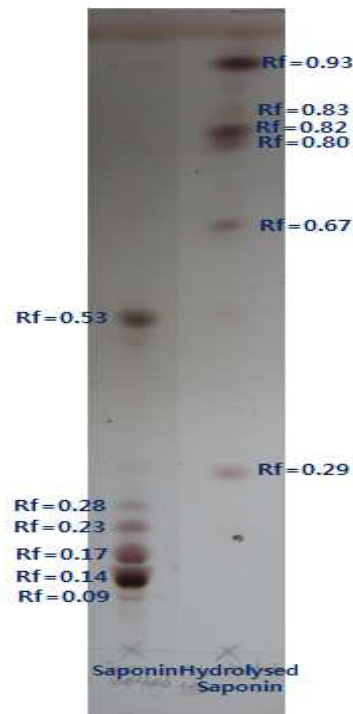


그림 5. 가수분해 전후 대두 사포닌 표준품의 TLC 변화.



Uematsu et al.(2000)은 yucca 추출물 시료를 HP-20 resin에 loading하여 흡착시킨 후 MeOH의 농도를 0-100%까지 단계별로 증가시키며 시료를 용출시켜 사포닌 함량을 측정 할 수 있는 분광학적 방법을 보고하였다. 각 용출물은 앞서 언급한 산 분해조건에서 sapogenin으로 전환시켰으며 *p*-anisaldehyde와 황산을 첨가한 반응용액과 반응시켜 430 nm에서 흡광도를 측정하고 standard saponin으로 작성한 표준곡선으로 사포닌의 함량을 산출하였다.

위 방법의 적용 가능성을 검토하기 위하여 탈지 녹두를 80% methanol(MeOH)로 추출 후 butanol과 증류수로 분획하여 butanol층을 회수하여 녹두조사포닌 추출물을 제조하고 동일한 방법으로 정량을 실시하였다. 그 결과 **그림 6**에 나타난 바와 같이 HP-20 resin으로부터 용출된 녹두사포닌 추출물은 용출된 MeOH의 농도와 관계없이 일정량의 사포닌을 함유하고 있었으며 다만 높은 MeOH 농도에서 용출된 sapogenin은 대부분 Rf가 높은 부분을 함유하였다.

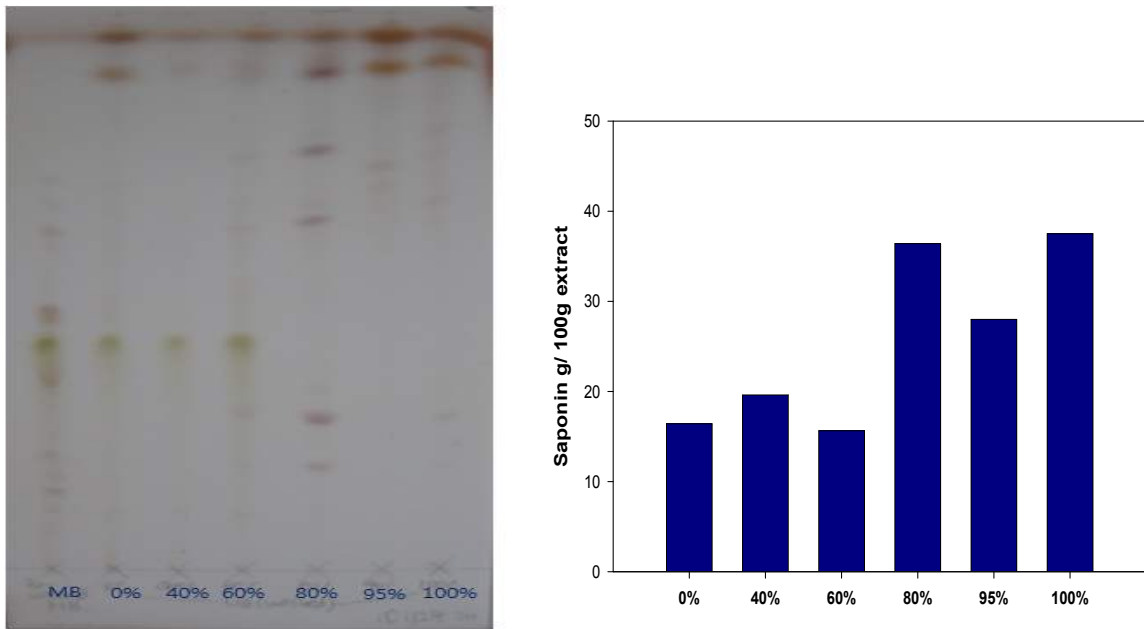


그림 6. HP-20 chromatography를 이용한 녹두사포닌의 분리.

사포닌의 정량과정에서 sapogenin으로의 전환 없이 측정이 가능한 방법으로 Dini et al.(2009)의 방법의 적용가능성을 검토하였다. Dini et al.(2009)의 방법에서는 발색을 위하여 *p*-anisaldehyde대신 vanillin용액(8%, in ETOH)과 황산(72%)의 혼합물을 사용하였으며 정제 된 대두사포닌 표준품을 이용하여 544 nm에서 작성한 표준곡선은 **그림 7**과 같이 높은 linearity를 나타냈다( $R^2=0.99$ ).

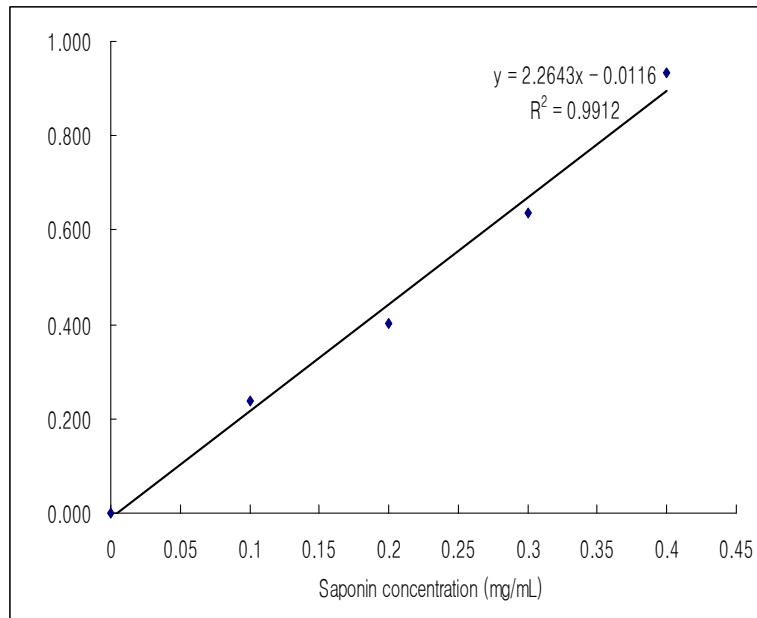


그림 7. Vanillin 발색법을 이용한 사포닌 정량 표준곡선.

위의 방법을 토대로 탈지 대두 및 녹두에 존재하는 사포닌의 함량을 측정한 결과는 그림8과 같다. 탈지대두에 존재하는 사포닌의 함량은 22-25 mg/g로 보고되어 본 연구 결과보다 약간 높았으나 (Fenwick and Oakenfull, 1981), 사포닌 함량은 실제적으로 품종, 재배조건, 일조량 등에 따라 큰 차이를 보일 수 있다. 녹두에 존재하는 사포닌의 함량은 4.31 mg/g으로 대두가 녹두에 비하여 약 4.5 배의 많은 사포닌을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

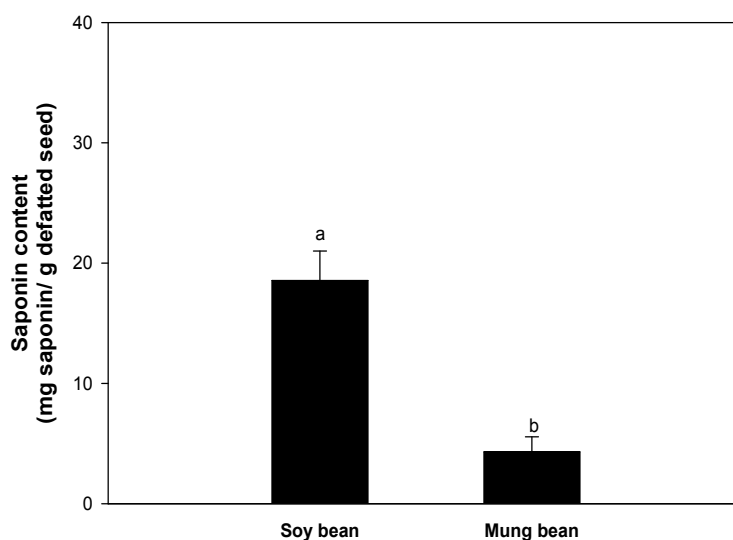
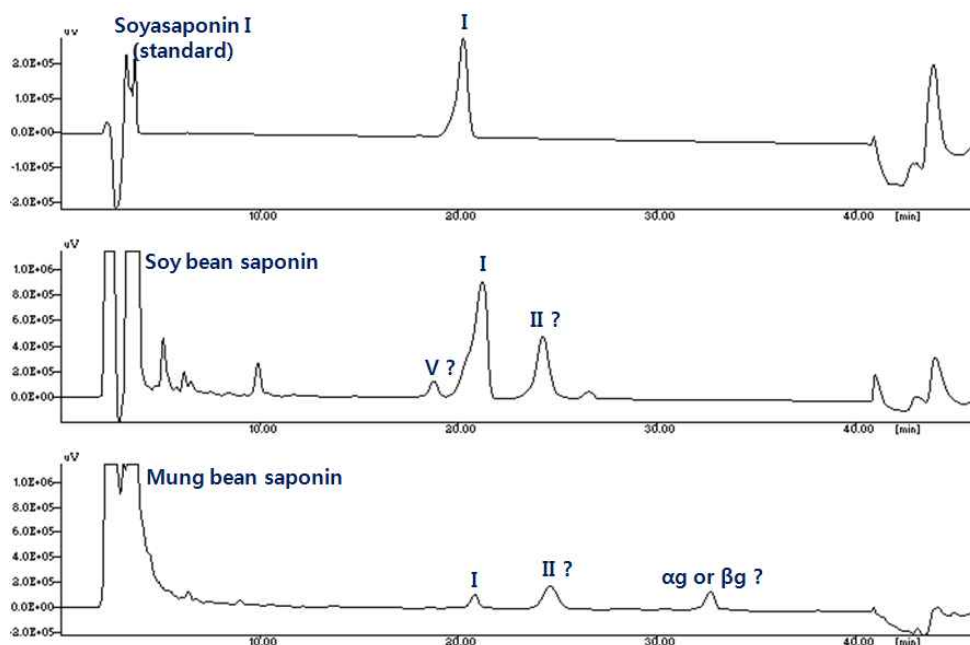


그림 8. Vanillin 발색법을 이용한 탈지대두와 녹두의 사포닌 함량.

## 2. HPLC를 이용한 녹두 사포닌의 정량

HPLC를 이용한 녹두사포닌의 정량은 두 가지 검출시스템 HPLC/UV와 HPLC/ELSD의 결과를 비교하여 적절한 방법을 조사하고자 하였다. HPLC에 의한 녹두 사포닌의 정량은 HiQsil C18w column (4.6 x 250 mm, KYA Tech. Co., Tokyo, Japan)을 장착한 Jasco HPLC system(Jaco, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, UV와 ELCD 두 개의 서로 다른 검출시스템을 사용하여 결과를 비교 분석하였다. UV 검출기를 사용한 분석은 Hu et al. (2002)의 방법에 따라 205 nm에서 측정하였으며, ELSD 검출기를 사용한 분석은 Lin and Wang (2004)의 방법과 동일하게 실시하였고 사포닌 정량을 위한 standard는 SH grade(HPLC용) soyasaponin I을 Chromadex(Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC/UV의 측정에서는 동일한 시료에서 soyasaponin I을 포함하여 3종의 peak가 확인되었으며 retention time이 일정하게 유지된 반면(그림 9a). HPLC/ELSD 측정 결과 녹두사포닌의 주성분으로 soyasaponin I만이 확인되었으며 시료의 반복 측정 시 peak의 retention time이 단축되어 peak의 동정에 일부 장애요인으로 작용하였다(그림 9b). Soyasaponin I을 표준 물질로 이용하여 작성한 HPLC/UV와 HPLC/ELSD의 표준곡선은 그림 10과 같다. 표준곡선은 모두 높은 linearity를 나타냈으며( $R^2 > 0.99$ ). 녹두조사포닌 추출물을 HPLC/UV와 HPLC/ELSD로 반복 측정한 결과 녹두에 존재하는 soyasaponin I의 함량은 탈지 녹두 g 당 각각  $0.202 \pm 0.003$ 과  $0.168 \pm 0.019$  mg로 나타났다(표 4). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 HPLC/UV를 이용한 사포닌의 정량 방법이 해상도, 재현성 등의 측면에서 우수한 것으로 판단된다.

(a) HPLC/UV



(b) HPLC/ELSD

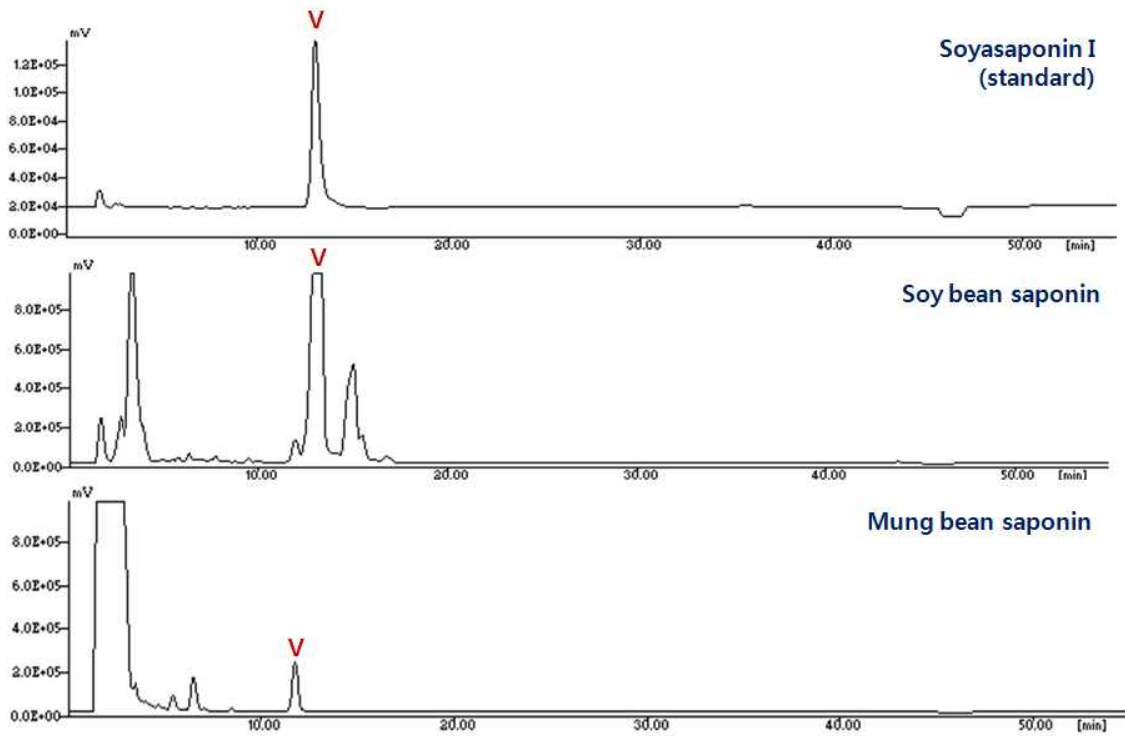


그림 9. HPLC/UV (a)와 HPLC/ELSD (b)에 의한 녹두의 사포닌 profile.

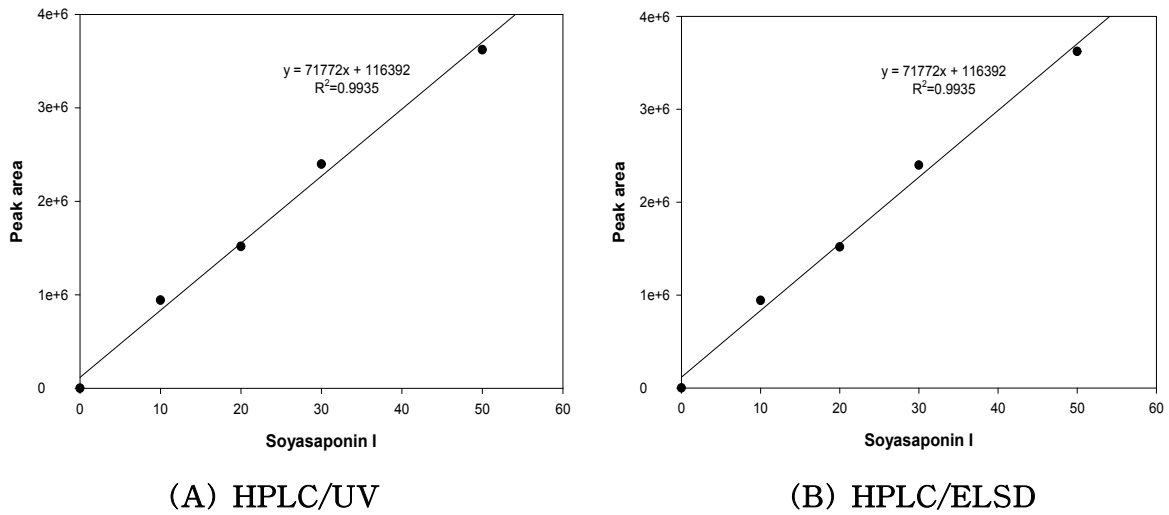


그림 10. 녹두사포닌 정량을 위한 HPLC/UV (A)와 HPLC/ELSD (B) 표준곡선.

표 4. HPLC/UV와 HPLC/ELSD로 정량한 녹두 soyasaponin I 함량.

Soyasaponin I mg/ g defatted mung bean		
	HPLC/UV	HPLC/ELSD
1	0.206	0.146
2	0.199	0.182
3	0.199	0.185
4	0.202	0.157
Average	0.202	0.168
SD	0.003	0.019

대두 사포닌과는 달리 녹두 사포닌의 함량 및 구조는 현재까지 명확하게 동정되지 않고 있다. Waller et al.(1999)에 따르면 녹두 사포닌은 몇 개의 triperpenoid(C30 pentacyclic) 배당체의 혼합물로 본 연구 결과에 유사하게 soyasaponin I을 주성분이라고 하였으며, soyasaponin III, 3-O-[ $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucurono pyranosyl] sorphradiol이 발견되었다고 보고하였다. 대두의 사포닌은 aglycone 구조에 따라 group A와 group B soyasaponins으로 분류된다. Acetyl group이 없는 group B soyasaponin은 soyasaponins의 주성분으로서 I, II, III, IV, V로 구분되며 일부는 환 구조의 22번 탄소 위치에 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy- 6-methyl-4H- pyran-4-one(DDMP) 잔기와 결합되어 존재하고 있다. DDMP-saponin은 또 soyasaponin aa,  $\beta$ a,  $\beta$ g,  $\gamma$ g,  $\gamma$ a로 세분되며 (Guclu-Ustundag and Mazza, 2007). Zhang et al.(2009)은 사포닌의 추출조건(추출온도)이나 알칼리 가수분해 등에 따라 DDMP-saponin은 soyasaponins I이나 soyasapoin III으로 전환된다고 보고하였다.

### 3. 녹두 사포닌의 분해에 따른 변화

사포닌은 항균, 항곰팡이, 항종양, 항암, 항염증 등 다양한 기능이 알려져 있으나 그 구조와 생물학적 활성과의 상관관계에 대한 연구는 제한적이다(Kang et al., 2010). Gurfinkel and Rao(2003)의 연구에 따르면 전반적 사포닌의 구조나 sapogenin에 연결된 당의 길이, 수, 당의 종류 등이 사포닌의 생물학적 활성을 유의적으로 변화시킬 수 있다고 하였다.

실제 발효과정 중 녹두 사포닌에서 일어나는 변화는 발효 과정에 함께 존재하는 다양한 성분들의 영향으로 정확하게 측정하기 어렵기 때문에 효소 및 산의 처리에 의한 사포닌의 변화를 관찰하였다.  $\beta$ -glucosidase에 의한 사포닌의 분해는 예비실험을 통하여 설정하였으며 sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.5)에 용해된 6 unit/mL 농도의  $\beta$ -glucosidase 1 mL을 사포닌 용액(0.1%/30% ETOH, 50 mL)에 첨가하여 35°C에서 1시간 동안 진행하였다. 가수분해 반응은 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (1 mL)을 첨가하여 종료시켰으며 분해된 sapogenin과 당은 diethyl ether와 증류수 분획을 통하여 회수하였다. 산에 의한 가수분해는 염산(2 M)을 이용하여 90°C에서 3시간 동안 반응시켰으며 반응 후 효소 처리와 동일한 방법으로 분획하여 회수 하였다.

그 결과 **그림 11**에 나타난 결과와 같이 대두 및 녹두 사포닌은  $\beta$ -glucosidase 및 산의 첨가에 의하여 분해가 일어났으며  $\beta$ -glucosidase 처리 시 일어나는 사포닌의 분해에서는 산에 의하여 일어나는 가수 분해와 비교하여 중간 정도의 비극성을 가지는 다양한 분해물을 생성하였다. 이와 같은 결과를 근거로 할 때  $\beta$ -glucosidase 생산 능력이 우수한 균주를 이용하여 녹두의 발효를 실시하는 경우 녹두 사포닌의 분해를 일으켜 생물학적인 활성의 변화를 일으킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다.



그림 11.  $\beta$ -Glucosidase와 산가수분해에 의한 녹두사포닌의 분해.

효소와 산에 의한 분해 후 회수 된 녹두사포닌 (sapogenin)을 동일한 농도로 보정하여 항산화 활성의 변화를 측정하였다. 항산화 활성은 DPPH(Blois et al., 1958)와 ABTS(Van den Berg et al., 1999)에 의한 radical 소거능과 ferric 이온의 환원능력(Benzie and Strain, 1996) 및  $\beta$ -carotene-linoleic acid bleaching assay(Taga et al., 1984)으로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 대두와 녹두 사포닌은 동일한 농도에서 차이를 나타내지 않았다. 효소나 산의 처리 시에는 대두는 DPPH 소거 활성에 큰 변화가 관찰되지 않은 반면 녹두의 경우 분해 전과 비교하여 항산화 능력이 현저히 향상되었다. 또한, 동일한 가수분해 조건에서 대두 사포닌과 비교하여 유의적으로 높은 항산화 활성이 관찰되었다(그림 12). ABTS 라디칼 소거 활성의 경우 대두 사포닌이 녹두 사포닌 보다 라디칼 소거능이 우수한 것으로 측정되었으며, 특히  $\beta$ -glucosidase 처리에 의하여 대두 및 녹두 사포닌의 항산화 활성이 2배 이상 상승하였다(그림 13). Ferric ion 환원능력으로 평가한 녹두 사포닌의 항산화 활성은 효소나 산의 가수분해에 의해 현저히 증가한 반면 대두 사포닌은 ABTS 소거능으로 측정된 항산화 활성의 경우와 동일하게  $\beta$ -glucosidase 처리만이 항산화 활성의 증가를 나타냈다(그림 14).

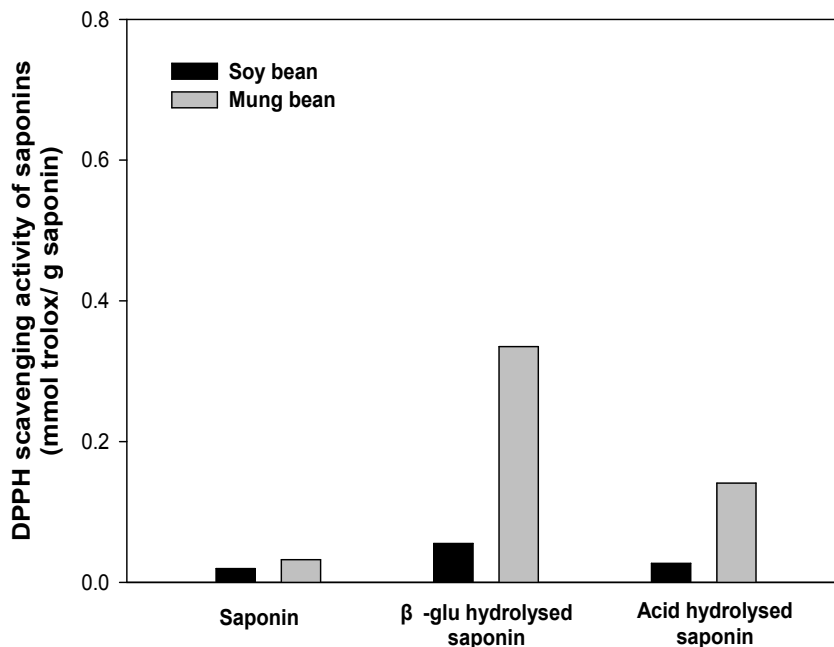


그림 12.  $\beta$ -Glucosidase와 산가수분해에 의한 녹두사포닌의 DPPH radical 소거능 변화.

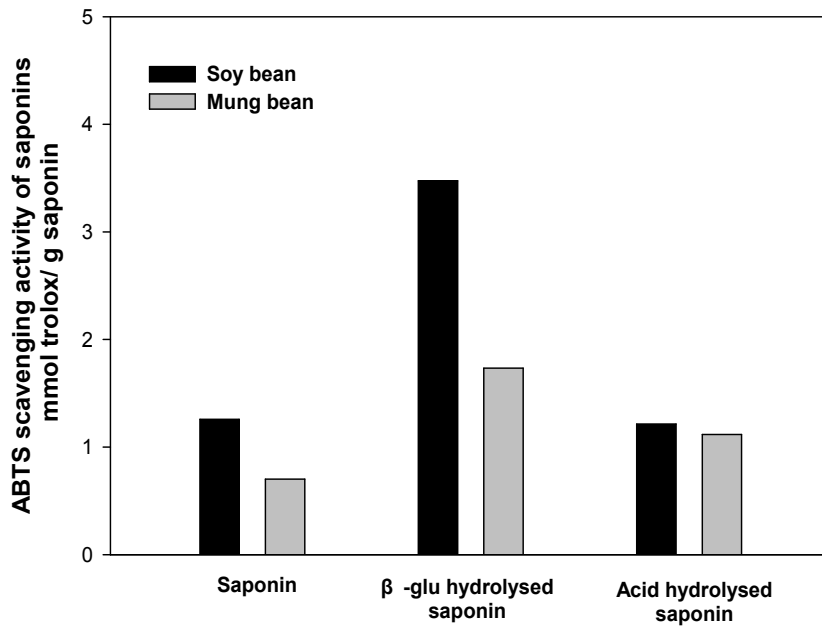


그림 13.  $\beta$ -Glucosidase와 산가수분해에 의한 녹두사포닌의 ABTS radical 소거능 변화.

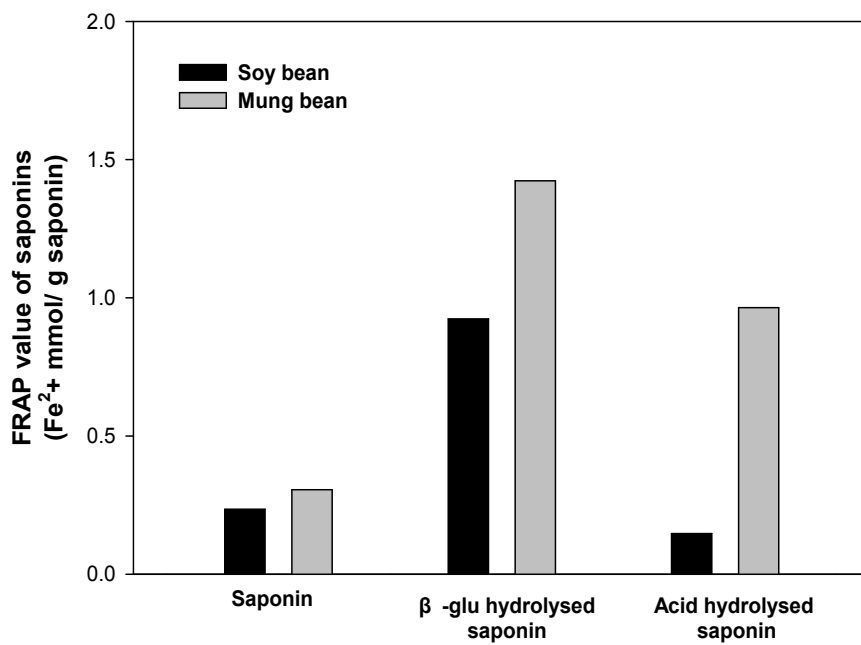


그림 14.  $\beta$ -Glucosidase와 산가수분해에 의한 녹두사포닌의 FRAP 환원능 변화.



$\beta$ -carotene/linoleic acid 시스템의 산화에 의한  $\beta$ -carotene의 탈색 정도로 평가한 대두와 녹두의 항산화 활성의 경우에도 다른 항산화 측정 방법과 유사한 결과를 보였다. 가수분해 전의 사포닌은 사포닌을 첨가하지 않은 대조구와 탈색의 진행 속도가 유사한 반면  $\beta$ -glucosidase 처리로 준비된 대두 및 녹두 사포닌은 뚜렷한 산화 억제 효과가 나타났다. 항산화 활성의 순서는  $\beta$ -glucosidase 처리 녹두 사포닌 >  $\beta$ -glucosidase 처리 대두 사포닌 . 산 분해 녹두 사포닌 > 산 분해 대두 사포닌으로 확인되었다(그림 15). DPPH 라디칼 소거활성으로 측정된 사포닌의 항산화 활성의 경우 soyaaponin I은 농도 의존적으로 라디칼을 소거하였으며 soyaaponin I의 IC<sub>50</sub> value는 70.2  $\mu$ M로서  $\alpha$ -tocopherol의 52.1  $\mu$ M에 필적할 수준으로 보고된 바 있다(Lee et al., 2010). Yoshiki and Okubo (1995)는 대두 사포닌 중 DDMP 사포닌만이 SOD (superoxide dismutase) 17.1 unit에 해당하는 라디칼 소거능을 가진 반면 DDMP 잔기를 가지지 않는 사포닌의 경우 라디칼 소거능을 가지지 않는다고 하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때  $\beta$ -glucosidase 처리에 의한 사포닌의 분해는 대두와 녹두 모두에서 유의적인 항산화 활성의 증가를 일으킬 수 있는 것으로 판단된다.

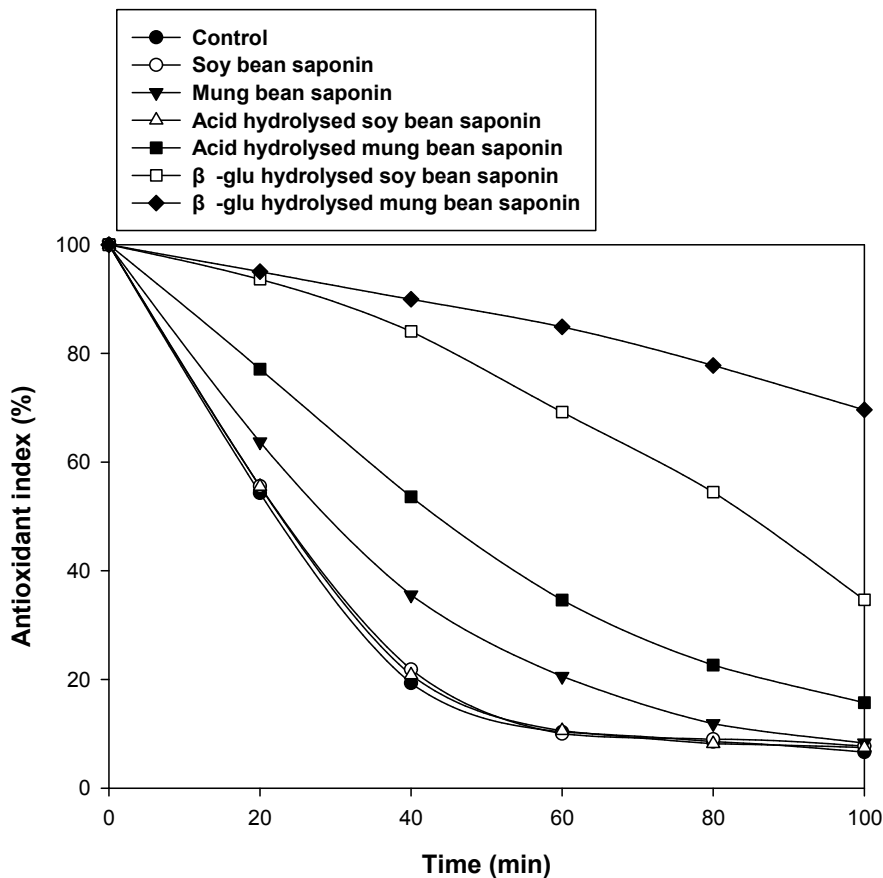


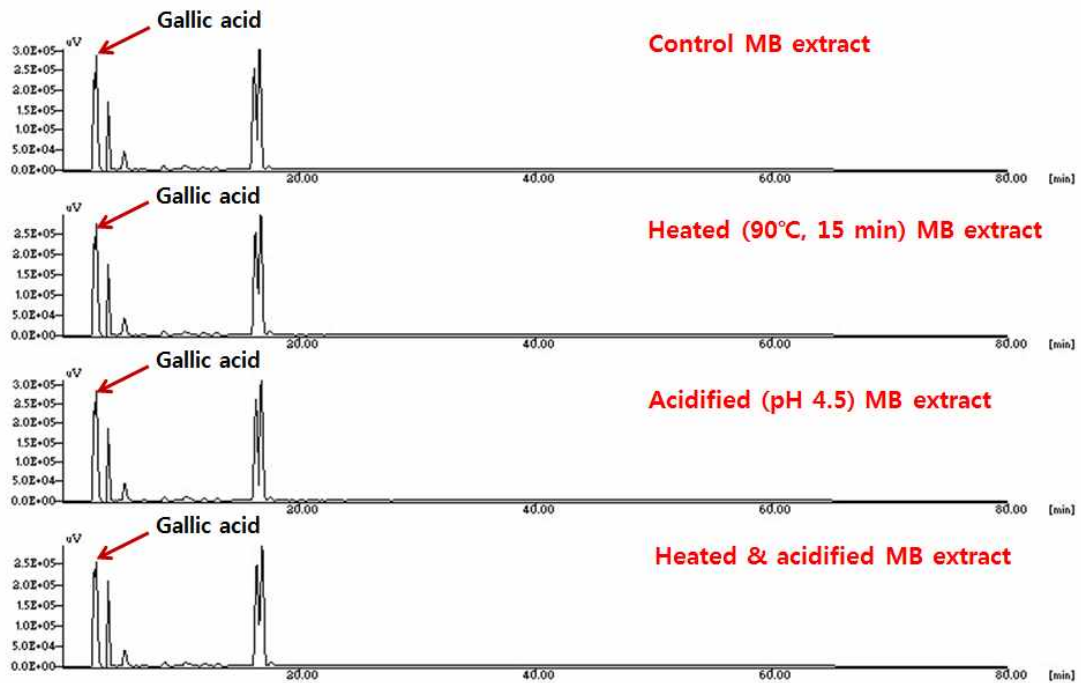
그림 15.  $\beta$ -Glucosidase와 산가수분해에 의한 녹두사포닌의  $\beta$ -carotene/linoleic acid 산화 억제 효과.

### 제 3 항 제조과정 중 유효항염증 성분의 활성 변화조사

#### 1. 가열 및 pH 저하에 의한 유효항염증 성분의 정량적 변화

본 연구의 최종 목표인 염증완화 기능성 요구르트의 개발을 위하여 가공 공정 중 일어나는 항염증 성분의 활성 변화를 조사하였다. 요구르트의 제조과정 중 활성 성분의 변화를 일으킬 수 있는 공정은 살균과 관련된 열처리 공정과 발효 시 산도의 증가에 따른 낮은 pH이다. 살균공정 시 일어나는 변화는 녹두추출물 분말(1%, w/v)을 증류수에 용해시킨 후 90°C에서 15분간 가열하여 측정하였으며 발효과정 중 일어나는 변화는 동일한 시료의 pH를 4.5로 조정하고 6시간 동안 방치한 후 유효성분의 변화를 측정하였으며, 살균과 발효 과정의 복합처리구는 열처리 후 pH를 4.5로 조정하여 제조하였다.

유효성분은 연구 결과 항염증 성분으로 확인 된 gallic acid와 vitexin을 기준으로 하였으며 각 처리구에서 일어나는 유효성분의 정량적 변화를 관찰한 결과 **그림 16**과 **그림 17**에 제시한 바와 같이 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.



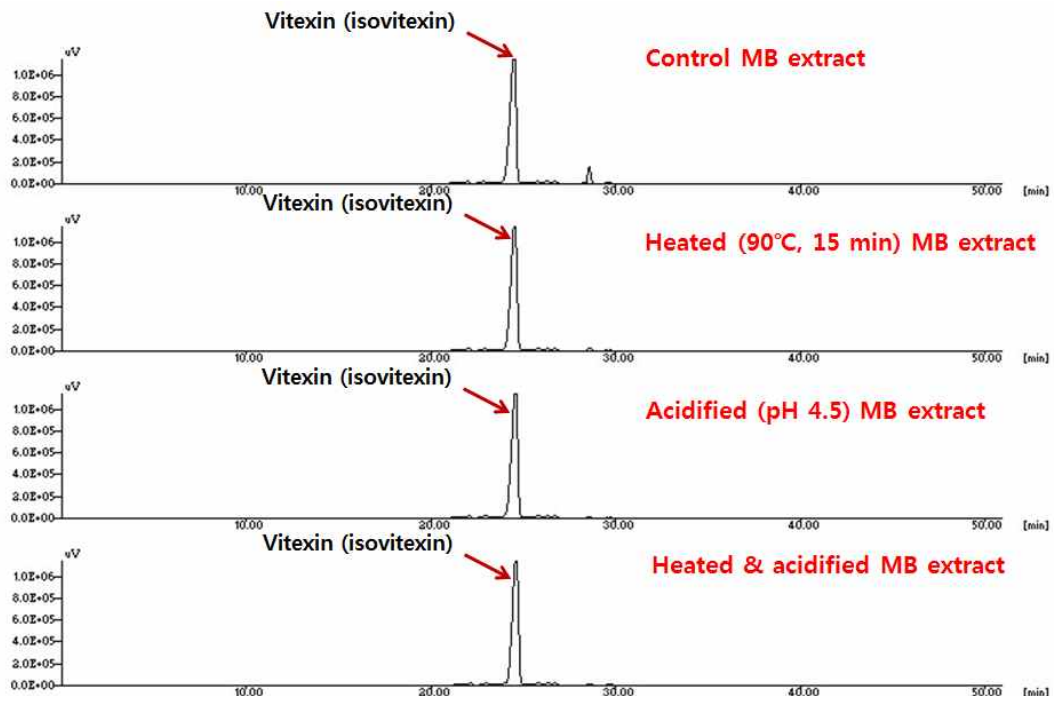


그림 16. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두 항염증 유효성분의 변화 크로마토그램. MB, mung bean (녹두)

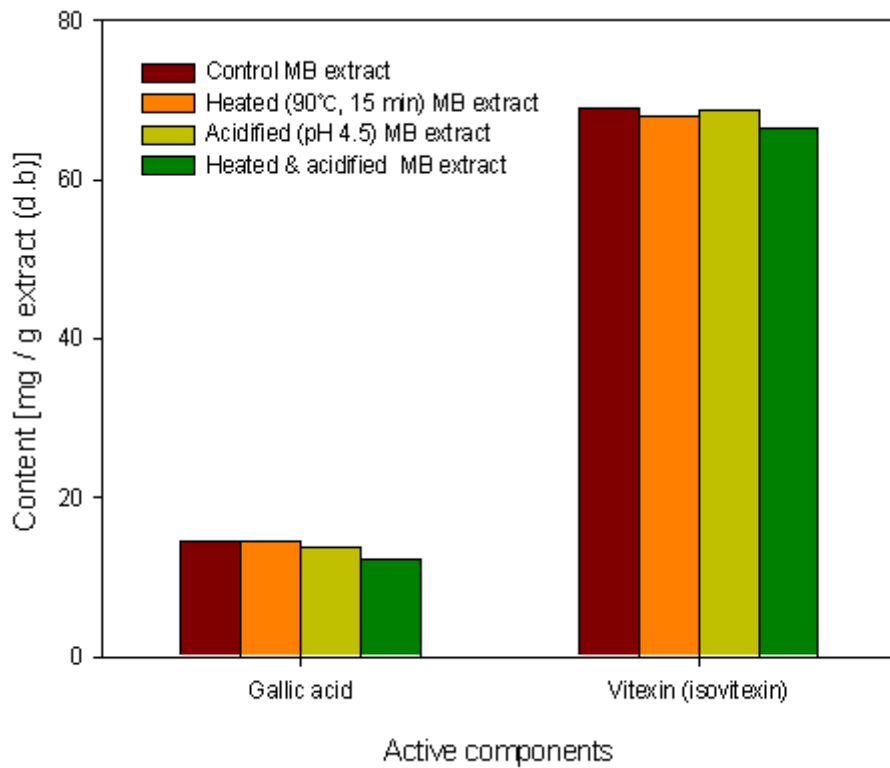
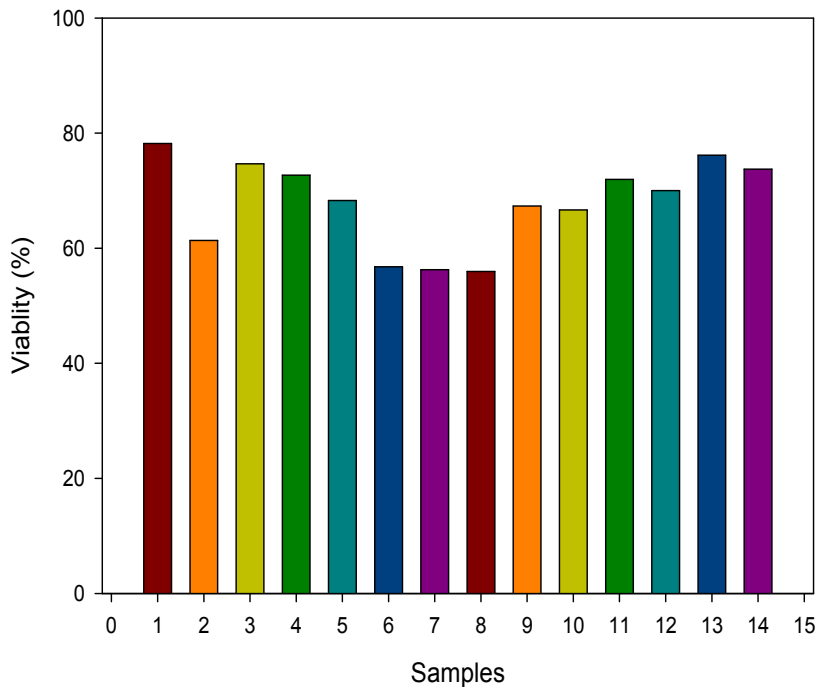


그림 17. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두 항염증 유효성분의 변화.

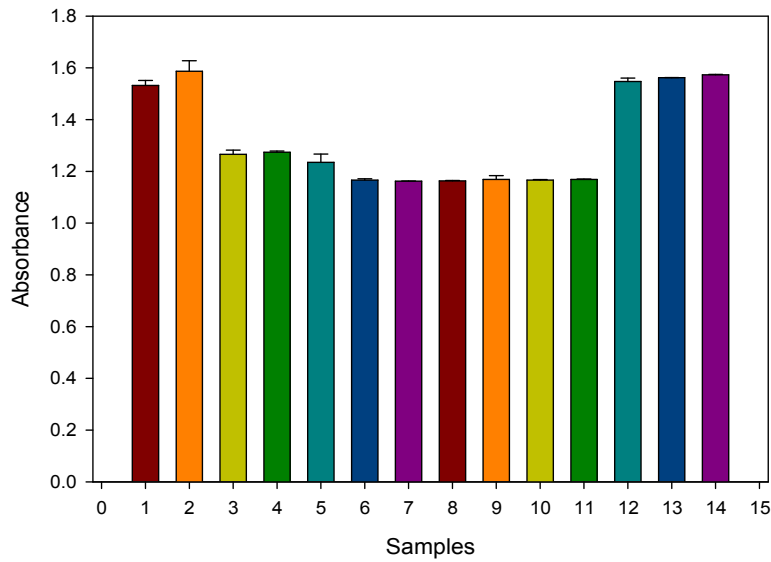
녹두주정추출물에 존재하는 유효 항염증 성분의 함량은 건조중량을 기준으로 vitexin (isovitexin) 69 mg/g, gallic acid 14.5 mg/g으로 나타났으며 가장 큰 함량 변화가 관찰된 가열과 pH 저하 복합 처리구의 경우에도 vitexin은 96%, gallic acid는 90% 이상이 함량이 유지되는 것으로 나타났다.

## 2. 가열 및 pH 저하에 의한 항염증 활성의 변화

위에서 언급한 동일한 시료를 이용하여 세포독성과 항염증 활성 변화를 측정하였다. pI staining 과 MTT assay로 분석한 결과 시료는 모든 처리구에서 대식세포의 사멸을 일으키지 않았으며 대식 세포의 증식에도 영향을 미치지 않았다(그림 18). 각 시료의 항염증활성을 측정한 결과 항염증 활성은 모든 처리구에서 농도의존적 변화를 나타냈으며 모든염증성 cytokine의 발현량을 유의적으로 감소시키는 한편 처리구에 따른 항염증 활성의 유의적 변화는 관찰되지 않았다(그림 19). 항염증 활성을 나타내는 유효성분인 vitexin과 gallic acid의 함량변화, 항염증 활성의 변화 결과를 근거로 할 때 가열이나 pH 저하 등의 가공공정은 항염증 활성의 열화를 일으키지 않았다.



(a) Propidium iodide staining



(b) MTT assay

그림 18. 가열 및 pH 저하가 녹두추출물의 세포독성에 미치는 효과. 1: No stimulation, 2: LPS stimulation (1 mg/mL), 3: Control (200 ug/mL), 4: Control (100 ug/mL), 5: Control (50 ug/mL), 6: Heated (200 ug/mL), 7: Heated (100 ug/mL), 8: Heated (50 ug/mL), 9: Acidified (200 ug/mL), 10: Acidified (100 ug/mL), 11: Acidified (50 ug/mL), 12: Heat & acidified (200 ug/mL), 13: Heat & acidified (100 ug/mL), 14: Heat & acidified (50 ug/mL). Cell line: J774 ( $2 \times 10^5$ /well).

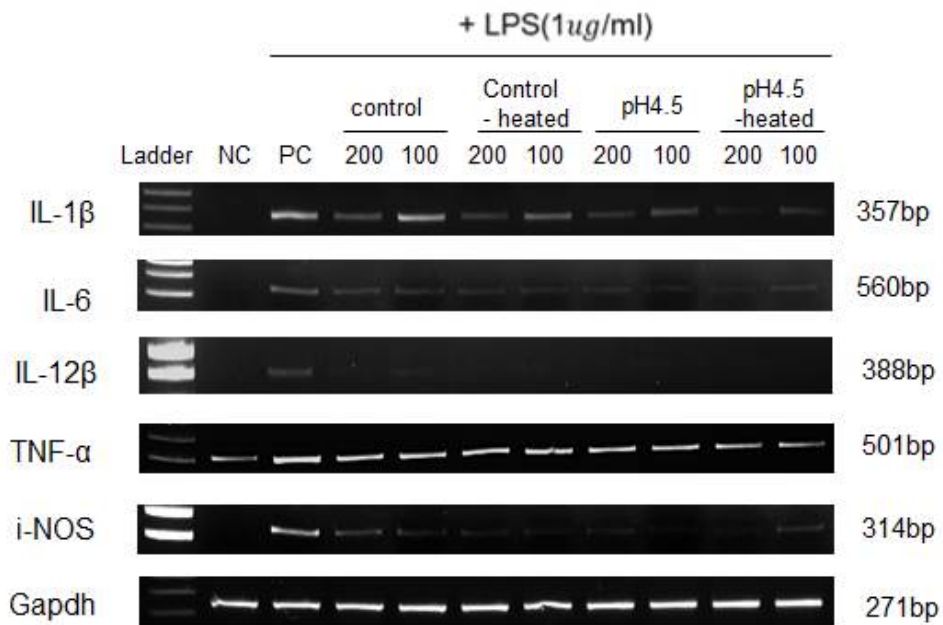


그림 19. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두추출물의 항염증 활성 변화를 RT-PCR로 측정. RT-PCR에 사용된 primer set은 표 3에 명기되었음.

### 3. 가열 및 pH 저하에 의한 항산화 활성의 변화

Free radical은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 세포소기관을 파괴하므로 라디칼에 의한 산화적 손상을 일으키게 되며, 산화적 손상은 노화는 물론 당뇨나 면역질환과 같은 질병의 원인을 제공한다. 앞서 언급한 녹두추출물의 가열 및 pH 저하가 항산화 활성의 변화에 미치는 영향을 측정하였다. DPPH라디칼 소거능으로 평가한 항산화활성은 가열 및 pH 저하 복합처리에 의하여 항산화 활성이 감소하는 경향을 나타냈으나(그림 20), ABTS 라디칼의 소거능으로 평가한 항산화활성은 가열이나 pH 저하에 의하여 영향을 받지 않았으며 가열 및 pH 저하 복합처리 시 오히려 항산화 활성이 증가하였다(그림 21). 이와 같은 차이에 대하여 Mathew and Abraham (2006)은 항산화 성분과 반응하는 두 가지 라디칼의 반응 양식이 서로 다르며 라디칼의 stereoselectivity가 그 원인이 될 수 있다고 하였으며 Wang et al. (1998)도 두 가지 라디칼에 대한 소거 활성이 일치 하지 않을 수 있음을 보고하였다.

항산화제가 산화되며 3가의 철을 2가의 철로 환원시키는 능력을 평가하는 ferric 환원능이나 linoleic acid가 산화되면  $\beta$ -carotene의 탈색을 일으키는 정도를 평가하는  $\beta$ -carotene bleaching assay로 평가한 항산화활성의 평가에서도 가열이나 pH 저하 혹은 복합처리가 항산화 활성을 유의적으로 변화시키지 않았다 (그림 22, 그림 23).

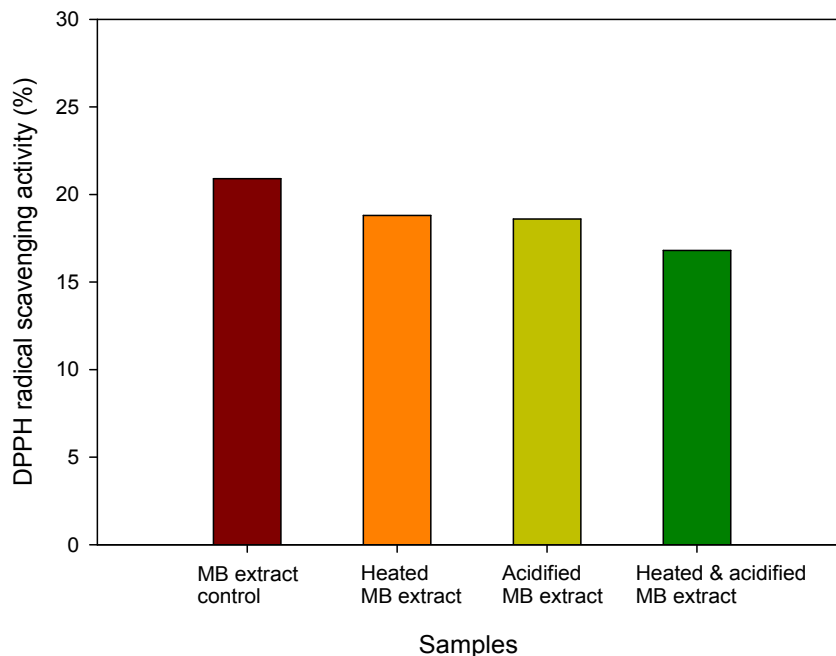


그림 20. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두추출물의 DPPH 라디칼 소거능 변화.

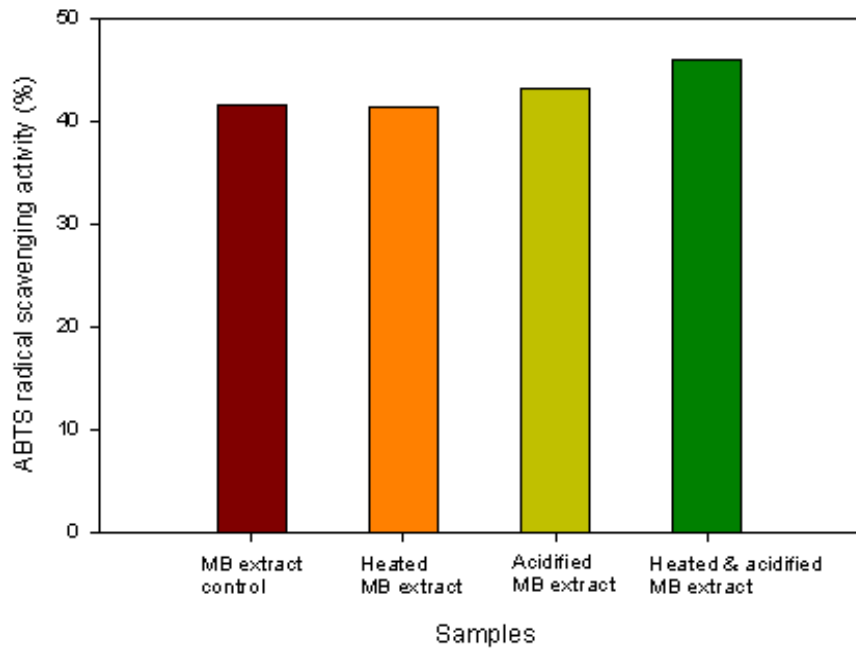


그림 21. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두추출물의 ABTS 라디칼 소거능 변화.

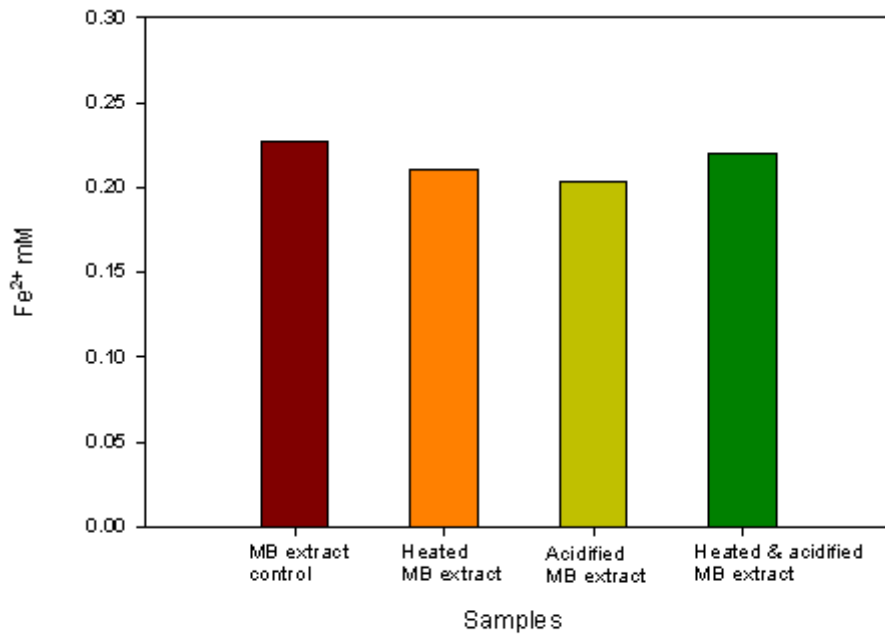


그림 22. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두추출물의 FRAP 환원능 변화.

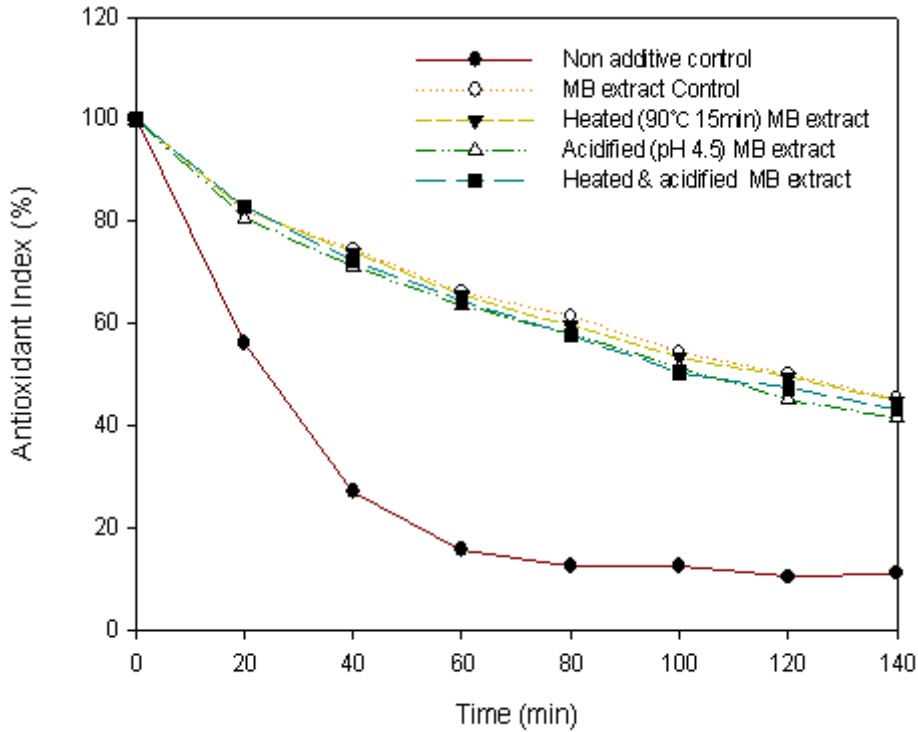


그림 23. 가열 및 pH 저하에 의한 녹두추출물의  $\beta$ -carotene/linoleic acid 산화 억제 효과.

Xu et al. (2007)은 citrus 과피에 존재하는 phenolic 항산화 성분을 구조에 따라 분류하고 가열 처리에 따른 항산화 활성의 변화를 조사하였다. Gallic acid와 같은 free phenolic acid와 vitexin과 같은 flavanone glycoside는 가열처리(90°C/120°C, 30, 60, 90분)에 의하여 함량이 변하지 않았으며 ABTS나 FRAP 환원능으로 평가한 항산화 활성 역시 가열의 강도가 증가할수록 증가하는 결과를 보여 본 연구와 동일한 경향을 나타냈다.

#### 4. 녹두추출물의 첨가가 요구르트 품질 특성에 미치는 영향

동물모델을 이용한 항염증 평가에서 유의적인 염증 개선 효과를 보였던 녹두추출물 첨가량인 0.3%를 기준으로 녹두추출물 함유 염증 완화 기능성 요구르트를 제조하였다. 요구르트 믹스는 우유 98%, 포도당 2%를 기준으로 하였으며 녹두 추출물의 함량을 믹스의 중량대비 각각 0.1, 0.2, 0.3% 첨가하여 제조하였다. 요구르트 믹스는 stirrer (NZ1200 stirrer, EYELA)를 이용하여 내용물을 잘 혼합한 후 90 °C에서 15분간 살균을 실시하였으며 40 °C까지 냉각한 후 유산균을 접종하였다. 요구

르트 스타터는 ABT 5 (Chr. Hansen, Denmark)를 이용하였으며 항염증 기능성 균주인 E4191를 혼합하여 40°C에서 배양하였으며, 배양 완료 후 커드를 분쇄한 후 냉장 저장하였다.



녹두추출물의 첨가가 발효 특성에 미치는 효과를 관찰한 결과 pH 변화(그림 24), 적정산도(그림 25), 생균수(그림 26)에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

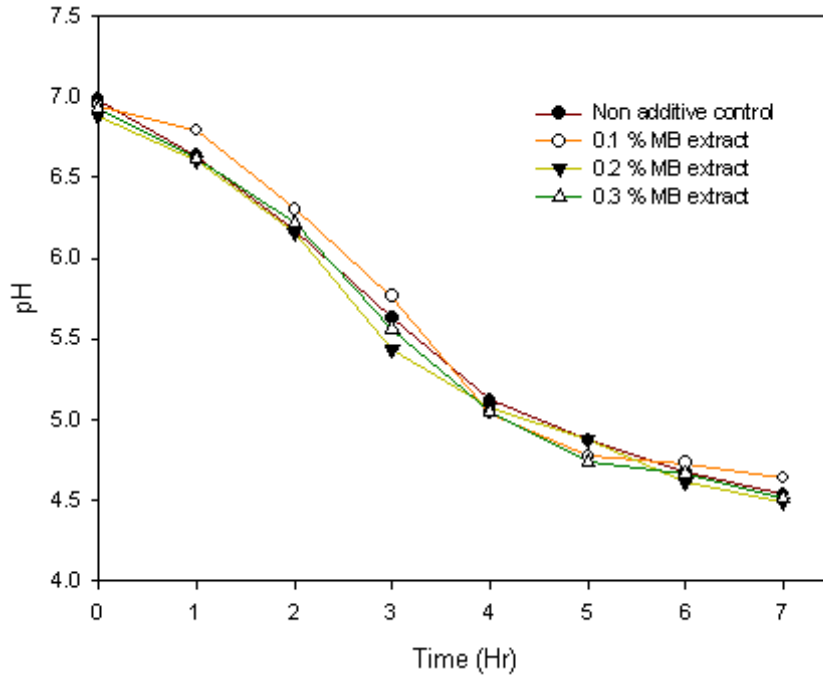


그림 24. 녹두추출물을 첨가가 요구르트의 pH 저하 속도에 미치는 영향.

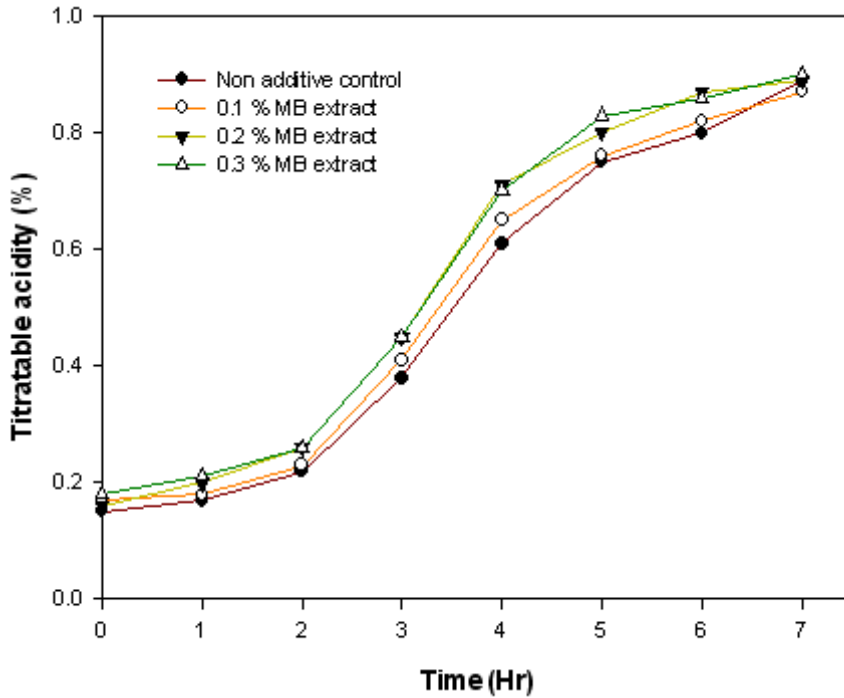


그림 25. 녹두추출물을 첨가가 요구르트의 적정산도 변화에 미치는 영향.

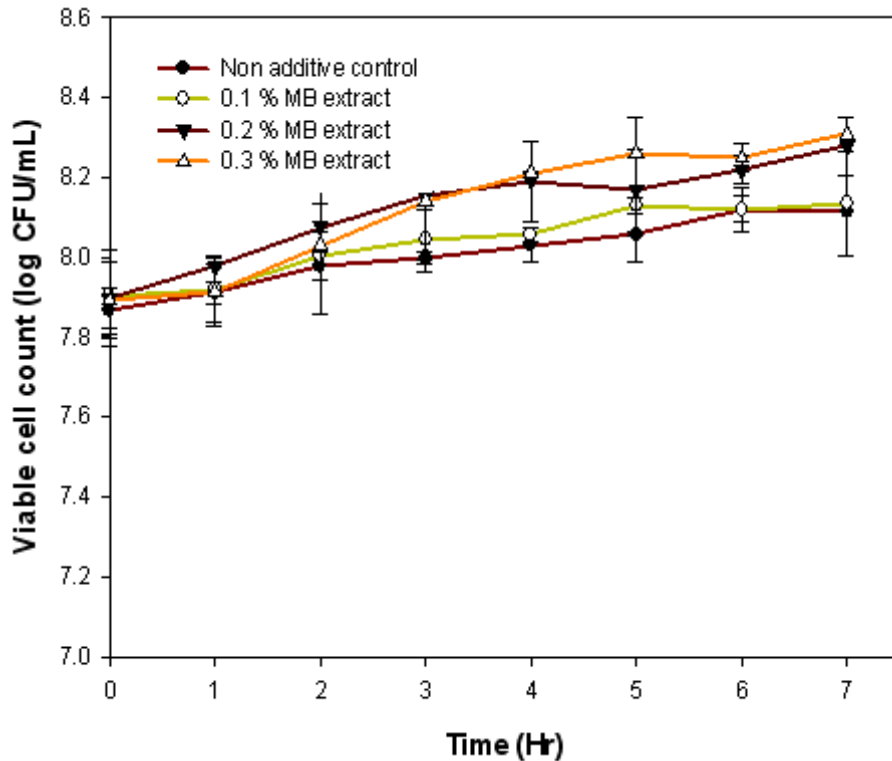


그림 26. 녹두추출물을 첨가가 요구르트의 생균수에 미치는 영향.

요구르트 제조에 있어서 산의 생성은 접종 된 유산균에 의하여 유당이 유산으로 전환됨으로써 개시되며 우유고형분 이외에 기능성 성분을 첨가한 경우 유산균의 성장속도에 영향을 미치거나 성장을 저해함으로써 산의 생성에 영향을 미칠 수 있다. 아직 충분한 연구가 진행되지는 않았으나 phenolic compounds의 종류에 따라 starter culture에 대하여 다른 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

Appel polyphenol 추출물(0.75%, w/w)을 요구르트 제조에 첨가한 경우 대조구에 비하여 starter의 성장이 증가시킨다고 하였으나 apple extract 성분 중 하나인 chlorogenic acid는 *Streptococcus*의 성장을 증가시키는 반면 *Lactobacillus* colony는 유의적인 감소를 초래하였다(Sun-Waterhouse et al., 2011). 이 같은 변화는 polyphenol compounds의 항균 활성과 연관이 있으며 polyphenol compounds의 구조나 첨가 방법(시기)에 따라 그 효과는 차이를 보일 수 있다. 또한 첨가되는 phenolic acids의 함량이 증가하게 되면 이들 자체가 pH를 감소시키는 효과를 나타내므로 조직감에 바람직하지 않은 영향을 미칠 수 있다. 녹두추출물(0.3%, w/v)의 경우 pH는 5.9 정도로 pH에 큰 영향을 미치지 않았다.

발효의 종료 시점은 적정산도가 0.7-0.8%에 도달하는 7시간으로 결정하였으며 발효의 종료 후 시료 100 mL를 각각 취하여 20°C에서 점도를 측정하였다. 각 시료를 5회 측정한 점도의 평균값은 표 5와 같으며 최종요구르트의 점도 역시 녹두추출물의 첨가 농도에 의해 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

표 5. 녹두추출물을 첨가가 요구르트의 점도에 미치는 영향.

Viscosity of yoghurt containing MB extract			
Control	0.1 %	0.2 %	0.3 %
1.86	2	1.94	1.98

## 5. 녹두추출물의 첨가 요구르트의 저장 중 유효성분의 변화

앞서 서술한 방법으로 녹두추출물 0.3%를 첨가하여 염증완화 기능성 요구르트를 제조하고 저장 후 유효성분의 변화를 조사하였다. 일반적인 요구르트의 저장기간을 고려하여 제조 당일과 냉장 저장 14일 후 요구르트 시료를 동결 건조하여 준비하였다. 요구르트로부터 유효성분의 추출을 위하여 시료 2g을 취하여 acid ethanol (10 mL 10M HCl/60 mL 80% 에탄올)에 용해시키고 1시간 동안 sonication을 실시하였으며 원심분리 상정액으로부터 유효성분의 함량을 측정하였다.

그 결과 그림 27과 같이 저장 후 유효성분의 변화를 측정한 결과 gallic acid의 함량은 저장 후 오히려 약간 증가하는 경향을 나타냈으며 vitexin의 함량은 저장 종료 후 2.6 에서 2.4 mg으로 감소함으로써 약 초기 존재량의 약 92% 잔존하였다. 이 같은 결과를 근거로 할 때 염증완화 기능성 요구르트의 정상적인 유통기간동안 유효성분의 감소는 문제가 되지 않을 것으로 판단되며 0.3% 녹두추출물을 첨가할 경우 80 g 요구르트(고형분 함량 12%)를 기준으로 할 때 유효성분은 약 gallic acid 5 g, vitexin(isovitexin) 23 mg을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

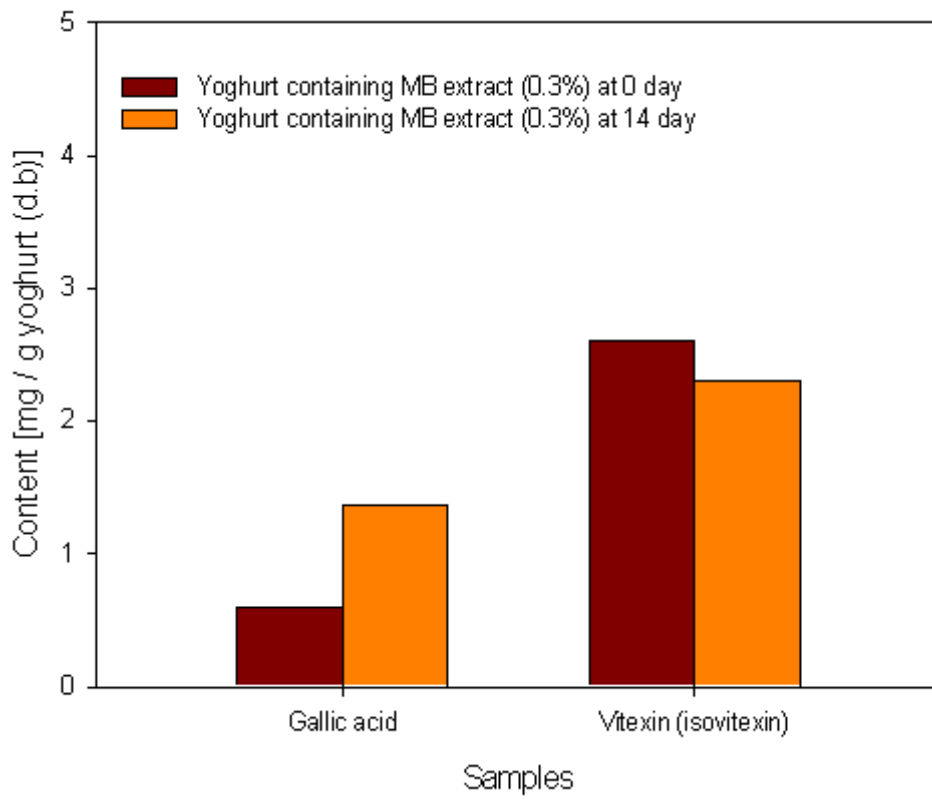


그림 27. 녹두 추출물 함유 기능성 요구르트의 저장 기간 중 유효성분 변화.

## 제 2 절 녹두 발효를 위한 균주 검색 및 발효조건 설정

### 제 1 항 녹두 발효 균주 검색 및 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성 측정

#### 1. 프로바이오틱스의 선정

본 연구팀이 보유하고 있는 기본적 probiotics 능력, 내산성, 내담즙성, 콜레스테롤 저하능력이 있는 한국, 이집트 아기 분변과 김치에서 분리한 API kit, DNA sequencing을 이용하여 strain identification 된 유산균주 43종과 김치에서 분리한 strain identification 되지 않은 유산균주 2종을 본 연구에 적용하였다.

표 6. 실험에 사용된 균주 목록.

#### <Identification by API kit>

##### isolates from Kim-chi(10)

*L. salivarius* SWW308  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SKR310  
*L. fermentum* QWW311  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KFM402  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* MSK408  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KDK410  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KDK411  
*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SRK414  
*L. curvatus* KFP419  
*Leuconostoc paramesenteroides* KJP421

##### <NOT Identification>

##### isolates from Kim-chi

K54  
L60

#### <Identification by DNA sequencing>

##### isolates from Korean infant feces(27)

*Lactobacillus gasseri* OCS1  
*Lactobacillus gasseri* OCS2  
*Lactobacillus gasseri* OCS3  
*Lactobacillus gasseri* OCS5  
*Lactobacillus gasseri* OCS6  
*Lactobacillus gasseri* OCS9  
*Lactobacillus gasseri* OCS10  
*Lactobacillus gasseri* OCS11  
*Lactobacillus gasseri* OCS12  
*Lactobacillus gasseri* OCS16  
*Lactobacillus gasseri* OCS20  
*Lactobacillus gasseri* OCS23  
*Lactobacillus gasseri* OCS24  
*Lactobacillus* sp. 24DCCH01MX OCS25  
*Lactobacillus gasseri* OCS29  
*Lactobacillus gasseri* OCS30  
*Lactobacillus gasseri* OCS32  
*Lactobacillus gasseri* OCS36  
*Lactobacillus gasseri* OCS37  
*Lactobacillus gasseri* OCS39  
*Lactobacillus johnsonii* strain MH8 OCS41  
*Lactobacillus gasseri* OCS42  
*Lactobacillus gasseri* OCS44  
*Lactobacillus fermentum* strain IMAU70162 KM13  
*Lactobacillus fermentum* strain IMAU70086 KM29  
*Lactobacillus gasseri* KY21  
*Lactobacillus fermentum* KY210

##### isolates from Egyptian infant feces(5)

*Lactobacillus fermentum* strain IMAU70162 E11  
*Lactobacillus fermentum* strain IMAU70162 E30L  
*Lactobacillus fermentum* strain IMAU70162 E432L  
*Lactobacillus fermentum* strain SFCB2-3 E464L  
*Lactobacillus* sp. C56 E4191

표 6처럼 다양한 근원에서 분리한 유산균주를 MRS 배지에서 3회 계대 배양하여 활력을 높인 후 최종 MRS 배지에서 18시간 배양하여 녹두 발아 및 발효를 위한 균주 screening을 위한 실험에 사용하였다.

## 2. 녹두 발효를 위한 균주 검색

### 가. 프로바이오틱스의 $\beta$ -glucosidase activity 측정

p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside (pNPG)를 기질로 하여 흡광도를 측정하여  $\beta$ -glucosidase activity를 측정하였다. 우선 3 차 계대 배양하여 활력을 최고로 높인 유산균 균액을 1 ml 따서 e-tube에 옮기고, 이것을 6000 rpm에서 2 분간 원심분리를 하여 균체를 가라앉히고 상등액을 100  $\mu$ l 취하였다. 250 mM sodium citrate buffer (pH4.5) 90  $\mu$ l와 10 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) 10  $\mu$ l와 앞에서 취한 균상등액 100  $\mu$ l를 혼합하여 37°C인공배양기에서 10분 동안 반응시킨 뒤 차가운 100 mM sodium carbonate buffer 1 ml을 첨가하여 반응을 멈추게 한 후 405 nm로 O.D. 값을 측정하였다. 이때 standard로 p-nitrophenol을 이용하여  $\beta$ -glucosidase 1 unit을 pNPG에서 pNP 1  $\mu$ M을 1분 동안 생산 하는데 필요한 양으로 정의하고 표준곡선을 잡았다. 양성 대조군으로 1 unit의  $\beta$ -glucosidase를와 음성대조군으로 균을 접종하지 않은 MRS 배지를 사용했다.  $\beta$ -glucosidase activity는 1 회 실험에 3 반복 기준으로 총 5회 실험을 하여 실험결과의 유의성을 확인하였다(그림 28). 그 결과 308, E11 등 6개의 균주를 제외하고는 약간의  $\beta$ -glucosidase activity를 가진 것을 확인하였으며, 이중 상위 5개 균주의 하위 2개 균주를 가지고 사포닌 분해 능력을 측정하는데 사용하였다.

## 3. 녹두 내 사포닌 함유 배지 제조

사포닌 분해 능력 측정 배지 제조를 위한 사포닌 멸균 방법 설정을 위해 soybean 사포닌 1%를 증류수에 녹여 filtering 전, 후와 autoclave 후를 HPLC와 TLC로 찍어 비교 분석하였다. TLC로 사포닌 층 확인 시 standard로 crude standard soyasaponin과 함께 비교를 실시하였다. 실험 결과, filtering을 하면 사포닌이 많이 걸려져서 사포닌 밴드가 줄어드는 것을 확인하였는데. 그에 반해 filtering 하지 않은 샘플과 121°C, 15분간 autoclave를 한 샘플은 crude standard 대두 사포닌과 비슷한 밴드를 나타내는 것을 확인하였다(그림 29). 또한 HPLC로 사포닌 층 확인 실험 결과, autoclave 전, 후로 peak가 거의 비슷한 양상을 보이며, 2번 peak가 약간 증가하였을 뿐, 거의 일치하는 것으로 확인하였다. 이

실험도 마찬가지로 crude standard 대두 사포닌과 비교해 보았을 때, autoclave 전, 후 샘플 모두 standard와 비슷한 peak를 나타내는 것을 확인하였다(그림 30).

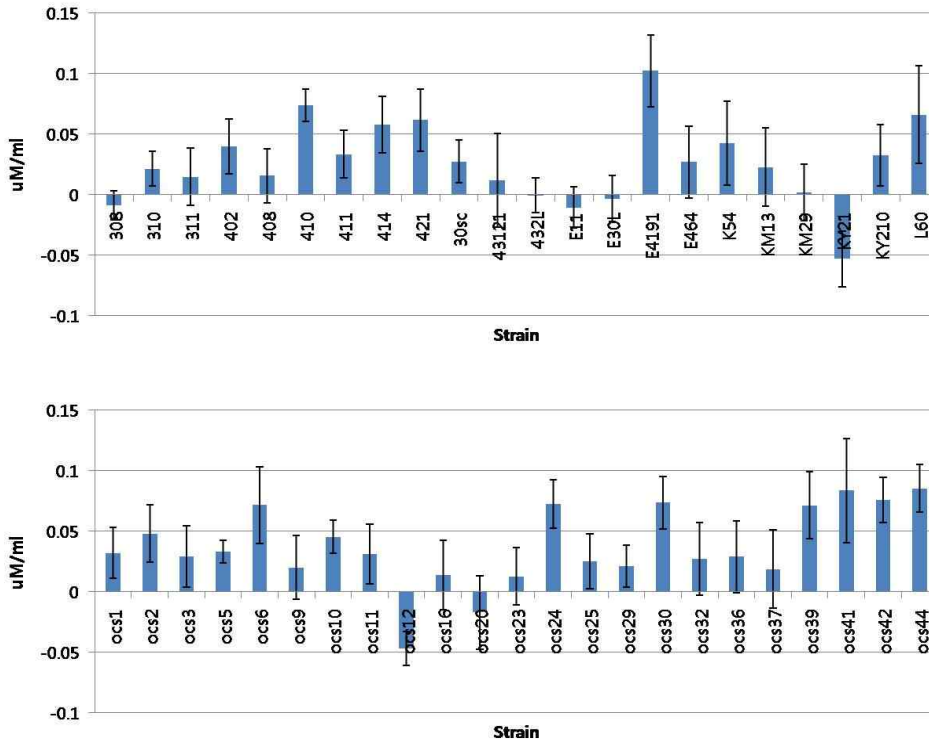
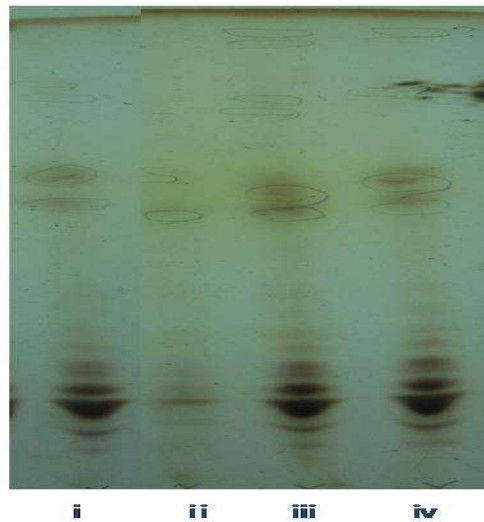


그림 28. 프로바이오틱스의  $\beta$ -glucosidase activity 측정.



- i : crude standard soya saponin**
- ii : 1% standard saponin(filtered)**
- iii: 1% standard saponin(not filtered)**
- iv: 1% standard saponin(autoclave)**

그림 29. TLC를 이용한 사포닌 층 확인.

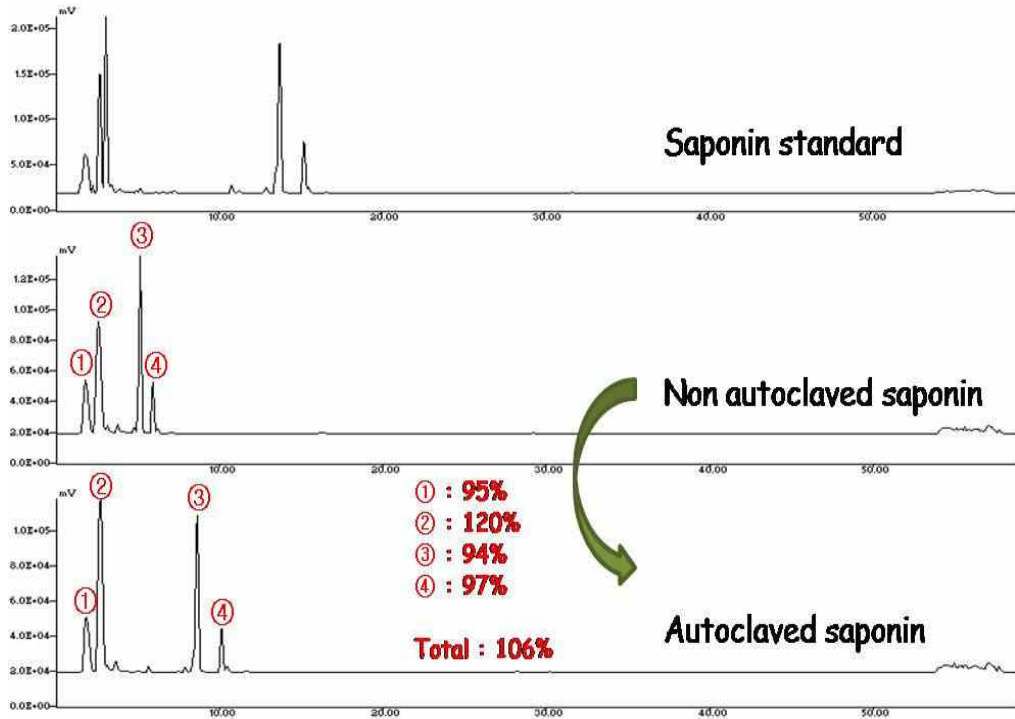


그림 30. HPLC를 이용한 사포닌 층 확인.

#### 4. 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성 측정

염증완화 기능성 유제품 개발을 위해 유산균주와 녹두를 small-scale의 다양한 배합비의 구성을 통하여 확립하였다. 녹두 성분에 의한 균주의 생육 및 활성을 측정하기 위하여 희석평판법에 의한 생균수를 측정하였다. 이 때 균주를 접종하지 않은 배지를 대조군으로 하여 생육, 활성비교 및 오염여부를 확인하며, 녹두 성분에서 잘 자라지 않은 균은 선발균주에서 배제 하였다. 또한, 온도, 배양시간, pH, 초기 접종균수 등 배양조건을 조정하여 녹두 추출물 함유 배지 내 균주의 최적 발효조건을 확립하였다.

그 후 복합 발효물을 만들기 위해, 녹두 무게를 기준으로 10배의 물을 첨가한 뒤, 30초간 10회 분쇄를 한 뒤 90℃에서 20분 동안 살균을 하였다. 유산균 배양이 가능 하도록 녹두 분쇄물에 amylase라는 당화효소를 첨가하여 60℃에서 2시간 반응 시킨 다음 80℃에서 20분간 처리함으로써 효소를 불활성화 시켰다. 효소를 처리하여 당화시킨 녹두 분쇄물에 선발 균주를 1% 접종 하여 37℃ 인공배양기에서 24시간 발효시켰다 (그림 31).



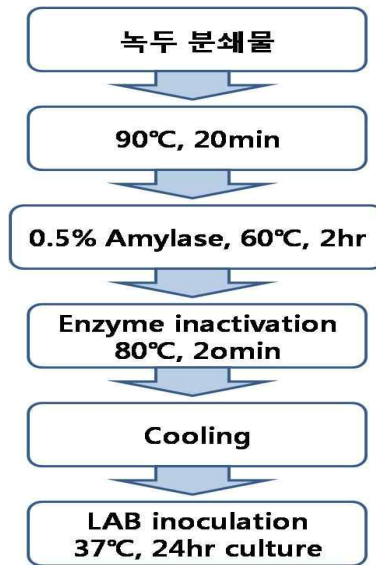


그림 31. 녹두 발효를 위한 공정

## 5. 프로바이오틱스를 이용한 녹두 발효 검증

발효물의 유산균 생균수와 pH를 측정하여 발효 진행을 확인하였다. 발효물을 peptone수를 이용하여 연속희석법으로 MRS agar와 PCA (plate count agar)에 평판 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 균수를 측정하고, 다른 균에 의한 오염여부를 확인함. 또한 당이용능을 pH를 측정함으로써 확인하였다. 실험 결과, 43121을 제외한 모든 유산균주가 녹두 추출물에서 발효가 잘 되는 것을 확인하였다(표 7).

표 7. 다양한 프로바이오틱스를 이용한 녹두 발효 검증.

	308	310	311	402	408	410	411	414	419	421	432L	43121
pH	3.48	3.49	3.35	3.76	3.49	3.7	3.33	3.4	3.45	3.28	3.45	3.73
생균수 (log CFU/ml)	8.93	9.39	9.62	8.83	9.04	8.89	9.19	9.20	9.25	9.30	9.36	6.53

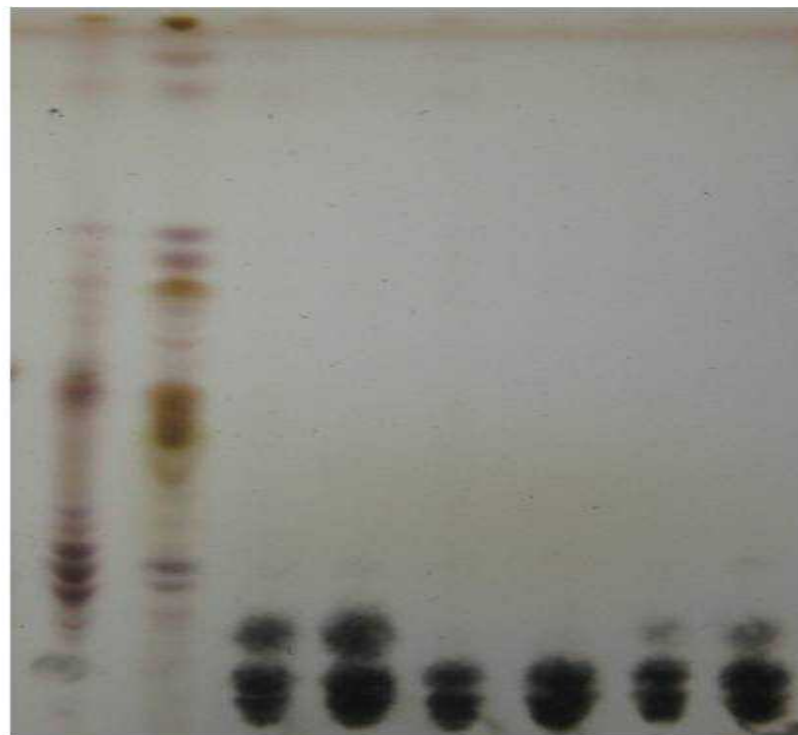
	KY21S	K54	E11	E30L	E4191	E464	KM13	KM29	KY210	KY21L	L60	30SC
pH	3.43	3.37	3.51	3.44	3.28	3.47	3.48	3.45	3.4	3.46	3.38	3.44
생균수 (log CFU/ml)	8.74	9.29	9.03	9.36	9.15	8.85	9.19	9.26	9.05	9.14	9.28	8.53

	OCS 1	OCS 2	OCS 3	OCS 5	OCS 6	OCS 9	OCS 10	OCS 11	OCS 12	OCS 16	OCS 20	OCS 23
pH	3.59	3.43	3.41	3.48	3.45	3.49	3.42	3.71	3.69	3.62	3.6	3.57
생균수 (log CFU/ml)	8.20	8.27	8.78	8.27	8.45	8.04	8.84	8.57	8.65	8.79	8.49	8.48

	OCS 24	OCS 25	OCS 29	OCS 30	OCS 32	OCS 36	OCS 37	OCS 39	OCS 41	OCS 42	OCS 44
pH	3.64	3.62	3.55	3.65	3.62	3.57	3.56	3.62	3.83	3.61	3.64
생균수 (log CFU/ml)	8.26	9.36	8.43	8.53	8.67	8.87	8.89	8.49	7.24	8.60	8.43

## 6. 녹두 발효물에서의 사포닌 층 확인

녹두의 사포닌 조성 및 발아, 발효 과정 중에 일어나는 변화를 이해하기 위하여, 녹두사포닌의 함량 및 순도에 대한 자료를 얻기 위하여, 유산균 녹두 발효물을 만들어 발효물과 상등액 각각을 TLC를 이용하여 사포닌 층을 확인하였다(그림 32).



**SB MB a b c d e f**

**SB : soybean saponin extract**  
**MB : mungbean saponin extract**  
**a : control mungbean**  
**b : control mungbean 상등액**  
**c : 421+mungbean 발효**  
**d : 421+mungbean 발효 상등액**  
**e : OCS3 mungbean 발효**  
**f : OCS3 mungbean 발효 상등액**

그림 32. 녹두 발효물에서의 사포닌 층 확인.

## 제 2 항 선발 유산균주의 기본 프로바이오틱스 능력 확인

### 1. 프로바이오틱스의 내산성 측정

선발한 2 유산균주 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain MH8 KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균 주를 MRS 배지에서 37°C, 18시간동안 배양시키고 원심분리(8,000xg, 10min) 하여 유산균 주를 침전시켰다. 그 후 다시 멸균 saline (0.85% NaCl)으로 2회 세척 후 균체현탁액을 대조구 배지와 인공위액에 각각 약  $10^6$  cfu/ml 수준으로 접종시키고 37°C에서 3 시간 배양시킨 후, 배양 전, 후의 생존균수를 측정하였다. 인공위액은 1N HCl을 사용하여 배지의 pH를 2.5로 조정하고 pepsin을 1000 unit/ml 되도록 첨가한 다음 멸균시켜 사용하였으며  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , L-cystein HCl, Tween 80 등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 희석하여 총 균수를 측정하였다. 3시간 이후의 내산용액으로 부터의 생존수를 log값으로 변환시켰을 때, 0.5 log이하로 균수가 감소하거나 원래의 균수에 비하여 성장을 보인 경우 내산능력을 가진 것으로 평가하였다. 내산성 실험 결과, **그림 33**에서 보이는 것과 같이 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191 및 KU41 두 균주 모두 pH 2.5에서 3시간이 지나도 사멸되지 않았다. 생존수는 0.5 log 이하로 감소하지 않았으며 이는 약 95% 이상의 생존율을 보였다.

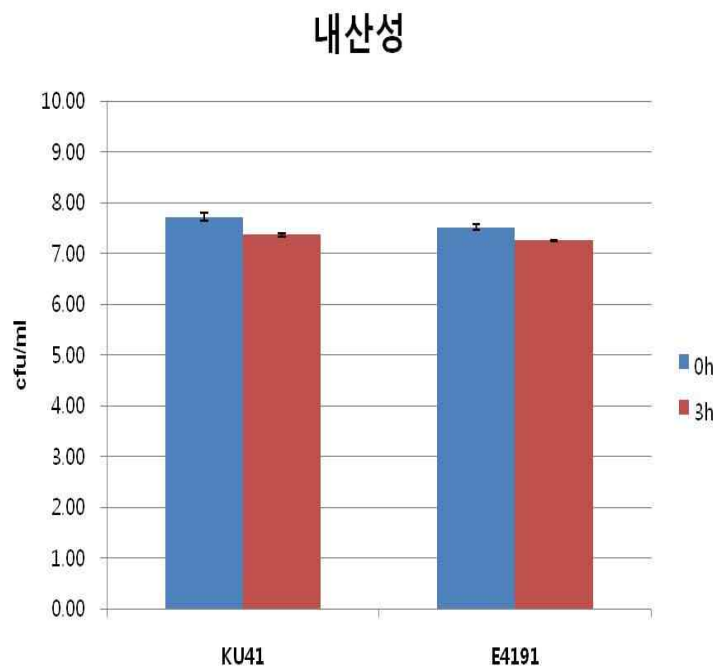


그림 33. 선발된 유산균주의 기본 probiotics 능력 중 내산성 실험.

## 2. 프로바이오틱스의 내담즙성 측정

선발한 유산균주 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain MH8 KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 MRS 배지에서 37°C, 18시간동안 배양시키고 원심분리(8,000xg, 10min) 하여 유산균주를 침전시켰다. 그 후 다시 멸균 saline (0.85% NaCl)으로 2회 세척 후 균체현탁액을 대조구 배지와 인공내담배지에 각각 약  $10^6$  cfu/ml 수준으로 접종시키고 37°C에서 배양시키면서 24 시간 배양시킨 후, 배양 전, 후의 생존균수를 측정하였다. 인공 내담 배지는 oxgall을 0.3% 함유시킨 MRS 배지를 제조하여 멸균시켜 사용하였다. 내산 능력 평가 기준과 마찬가지로, 24시간 이후의 내담용액으로 부터의 생존수를 log값으로 변환 시켰을 때, 0.5 log이하로 균수가 감소하거나 원래의 균수의 비하여 성장을 보인 경우 내담능력을 가진 것으로 평가하였다. 담즙에 대한 내성 측정 실험 결과, **그림 34**에서 나타나는 것과 같이 KU41의 경우 담즙에서의 생존균수가 log 1.4 정도 떨어진 반면, E4191의 경우 log 0.9 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이에 따라 담즙에 대한 생존율이 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191, KU41 각각 82, 112%의 생존율을 나타내었다.

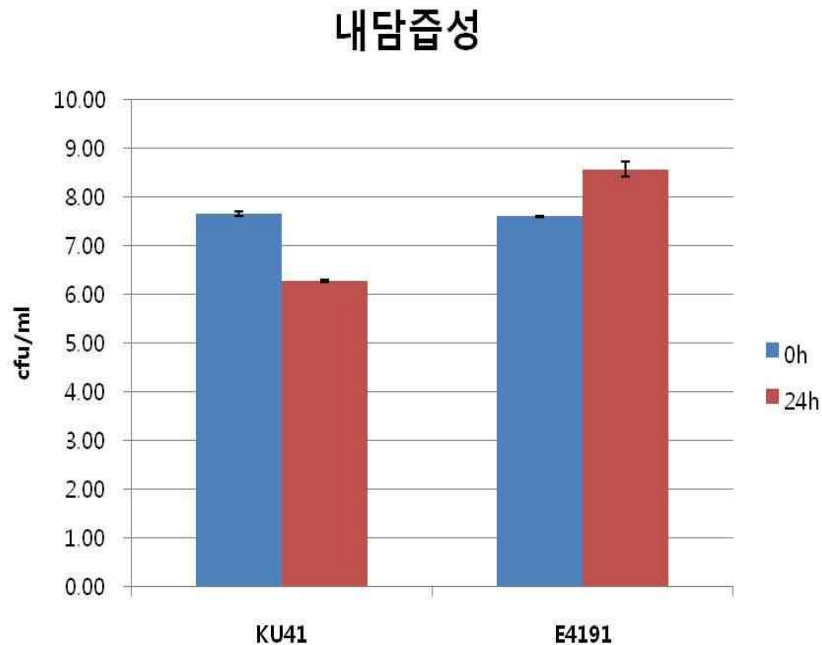


그림 34. 선발된 유산균주의 기본 probiotics 능력 중 내담즙성 실험.

### 제 3 항 선발 유산균주의 안전성, 동결 저항성, 대두사포닌 분해능력 측정

#### 1. 대두사포닌 분해능력 측정

$\beta$ -glucosidase 효소 활성이 높은 상위 5개 균주 *Lactobacillus* KU41, KU44, 410, KU42, E4191와 하위 2개 균주 *Lactobacillus* KU12, KY21를 가지고 유산균의 대두 사포닌 분해능력을 측정하는데 사용하였다.

##### 가. 균준비

유산균의 대두 사포닌 분해 능력을 측정하기 위해 선정된 7개의 유산균은 사포닌 분해능력 측정 실험에 사용하기 전, TY broth (pH 6.8)에 1% 글루코스(glucose)를 첨가한 배지에서 3회 이상 계대하여 활력을 높였다. TY broth의 조성은 다음과 같다; 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% Tween 80, 0.002% L-cysteine HCl.

##### 나. 균 현탁액 및 crude enzyme 준비

TY 배지에서 3차 계대하여 활력을 높혀 놓은 유산균 현탁액 1 ml을 글루코스(glucose)가 첨가된 1 L의 TY 배지에 접종하여 30 °C에서 24 시간 배양하였다. 그 후, 원심분리(3,000×g, 20 분, 4 °C)하여 균을 모은 후, 모은 균체는 McIlvaine buffer (pH 5.0)로 2번 세척한 뒤, McIlvaine buffer 10 mL에 현탁하였다. 이후 균 현탁액을 초음파분쇄기(UP200s Ultraschallprozessor, Dr Hielscher; 20 kHz, 0.5 cycle, 90% amplitude)를 이용하여 파쇄하고, 원심분리(17,500×g, 10 분, 4 °C)하여 상등액을 모았다. 이렇게 모은 상등액은 crude enzyme 용액으로 사용하였다.

##### 다. 유산균 또는 유산균 crude enzyme에 의한 대두 사포닌 분해능력 확인

10 ml의 crude enzyme 용액 또는 TY배지에 3차 계대하여 활력을 높힌 유산균 현탁액 10 ml과 20 ml의 0.5% 대두 사포닌 용액을 혼합하여 24 시간 배양하였다. 배양 후, 원심분리(1,000×g, 20 분)하여 균을 제거한 뒤, 동량의 n-부탄올(butanol)을 첨가하였다. 이후 상기 혼합액의 윗층(n-butanol 층)은 HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용한 대두 사포닌 분해 능력을 측정하는데 사용하였다. 대두 사포닌 분해 능력은 샘플의 반응 전(사포닌을 함유한 배지에 균

을 집중하지 않은 대조군) soyasaponin Bb의 peak 면적(A)과 반응 후 soyasaponin Bb의 peak 면적(B)을 HPLC로 측정된 후, 하기의 수학적식을 이용하여 사포닌 분해 능력을 계산하였다.

<수학적식>

$$\text{사포닌 분해능력(\%)} = 100(A-B)/A$$

라. HPLC 분석

HPLC를 이용한 사포닌 분해측정은 YMC PACK ODS-AQ column을 이용한 LC-CA 모델을 사용하였다. 전개용매로는 acetonitrile : isopropanol : water : acetic acid : EDTA를 34 : 6 : 60 : 0.1 : 0.01(v/v/v/v/g)의 비율로 사용하였으며, flow rate는 0.5 ml/min으로 설정하였다. 20  $\mu$ L의 샘플을 컬럼(column)에 주입하고 대두 사포닌을 UV detector를 이용하여 205 nm에서 측정하였다. B그룹 사포닌의 분해는 HPLC방법(Shiraiwa et al., 1991)을 이용하여 검출하였다.

대두 사포닌 분해능력의 HPLC 분석 결과, 표 8에서 보이는 것과 같이 7개 프로바이오틱스의 soyasaponin Bb의 분해율은 56%에서 100%로 나타났다. 이 중 락토바실러스 존소니이 (*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191이 가장 높은 분해율(100%)을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, crude enzyme를 이용한 대두 사포닌 분해능력 측정 결과 가장 높은 분해율을 나타낸 유산균 락토바실러스 존소니이 (*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191의 균 현탁액을 이용하여 위와 같은 방법으로 대두 사포닌 분해능력을 측정하였다. 그 결과, 표 9에서 나타는 것과 같이 2번 peak가 control에 비해서 균을 접종한 것에서 peak가 하나도 나타나지 않은 것으로 보아 두 균주에서 모두 soyasaponin Bb 의 분해능력이 100%라고 할 수 있다.

표 8. crude enzyme을 이용한 대두사포닌 분해능력 측정 결과.

	① peak area	② peak area	① Hydrolyzing activity	② Hydrolyzing activity
Control	10182525	108894661		
KU12	4091515	127014	59.82	88.34
KU41	0	0	100	100
KU44	442991	13268124	56.49	87.82
410	718040912	17175328	-605.17	84.23
KY21	4073145	11922802	59.99	89.05
KU42	3733645	0	63.33	100
E4191	0	0	100	100

표 9. 균 현탁액을 이용한 대두사포닌 분해능력 측정 결과.

	① peak area	② peak area	① Hydrolyzing activity	② Hydrolyzing activity
Control	453159.25	488738.85		
KU41	1476715.21	0		100
E4191	367044.70	0	18.4	100

## 2. 용혈 현상 검사

용혈(hemolysis)이란 적혈구가 붕괴되어 헤모글로빈이 혈구(血球) 밖으로 용출하는 현상이며, 여러 가지 원인으로 인해 발생한다. 그 중 미생물에 의한 용혈이 가능하며, 이러한 용혈 현상을 일으키는 물질들은 용혈성 연쇄구균 독소(streptolysin S 및 O), 파상풍 독소(tetanolysin), 포도상구균 독소( $\alpha$ -용혈소)등이 있다. 용혈은 혈액한천배지 상에서 나타나는 유형에 따라  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  세 유형으로 나뉜다.  $\alpha$ -용혈은 집락을 둘러싼 배지의 헤모글로빈이 메트헤모그로빈으로 환원되어 배지가 녹색으로 변하며, 현미경으로 관찰시 적혈구의 막은 정상이고,  $\gamma$ -용혈은 용혈 현상이 없으며 배지의 색깔 변화도 없다. 이와는 달리,  $\beta$ -용혈은 적혈구가 완전히 용해되어 집락 주변이 투명한 무색이다.  $\beta$ -용혈은 적혈구가 완전히 용해되어 집락 주변이 투명한 무색이다.  $\beta$ -용혈이 미생물의 병원성과 관련을 가지며 선별된 유산균이  $\beta$ -용혈 현상을 보이는지 여부를 판단하였다.

### 3. 젤라틴 액화 반응 검사

세균이 병원성을 갖게 되는 중요한 이유 중 하나는 세포 침입능력에 관계한다. 세포에 침입을 하려면 단백질 분해 능력을 가지고 있어야 하며, 단백질 분해 능력을 조사하는 한 가지 방법으로 젤라틴 액화 현상 여부를 판단한다. 기본 MRS배지에 beef extract, peptone, gelatine을 첨가한 변형 젤라틴 영양 배지(MRS gelatin nutrient culture medium) 배지를 이용하며, 측정 대상 유산균을 젤라틴 영양 배지에 1% 접종하여 37 °C에서 18 시간 동안 배양한 다음 냉장 보관하여 배지의 응고 여부를 관찰함으로써 젤라틴 액화 반응을 측정하였다.

### 4. 유해 대사산물(암모니아) 생성 확인

장내 미생물이 생성하는 유해 대사산물로 알려진 암모니아의 생성 여부는 선별된 유산균의 안전성을 평가하는 중요한 지표가 된다. 과도한 암모니아의 체내 축적은 이를 처리하기 위해 간과 신장에 무리를 주며 이상을 일으킬 수 있고, 특히 간염환자의 경우 혼수상태를 유발하기도 한다. Urea agar base 배지를 이용하며, 대상 미생물이 urease를 생성하면 urea가 분해되어 배지의 pH가 높아지게 된다. 높아진 pH에 의해 지시약으로 사용되는 phenol red는 황색에서 적색으로 변한다.

앞에서 기술한 세 가지의 안전성 실험 결과는 표10에 기술되어 있으며, 실험에 사용된 두 가지 균주(KU41과 E4191)은 모두 안전성을 가지는 것으로 나타났다.

표 10. 선별된 유산균주의 안전성 실험 결과

평가 항목	KU41	E4191
용혈현상	α	α
암모니아 생성	-	-
젤라틴 액화	-	-

### 5. 동결 저항성 검사

선별된 유산균주는 최종 생산물의 특성상 동결 저항성을 가져야 하므로 동결에 대한 활력의 변화를 조사하였다. 선별된 유산균주 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191를 MRS배지에서 37°C, 18시간 배양하여 활력을 높힌 후, MRS agar를 사용하여 생존균수를 측정한 뒤, -78°C의 deep freezer에서 15시간동



안 급속냉동 및 해동시킨 후 생존균수를 측정하였다.  $-78^{\circ}\text{C}$ 의 deep freezer에서 15시간 급속냉동 후 생존균수를 log값으로 변환 시켰을 때, 0.5 log이하로 균수가 감소하거나 원래의 균수의 비하여 변화를 보이지 않은 경우 동결저항성을 가진 것으로 평가하였다. 실험 결과, **그림 35**에서 보는 것과 같이 E4191의 경우 생존균수가 약 log 1.8 정도 감소한 반면, KU41의 경우 원래의 균수와 큰 차이를 보이지 않는 것을 확인하였다.

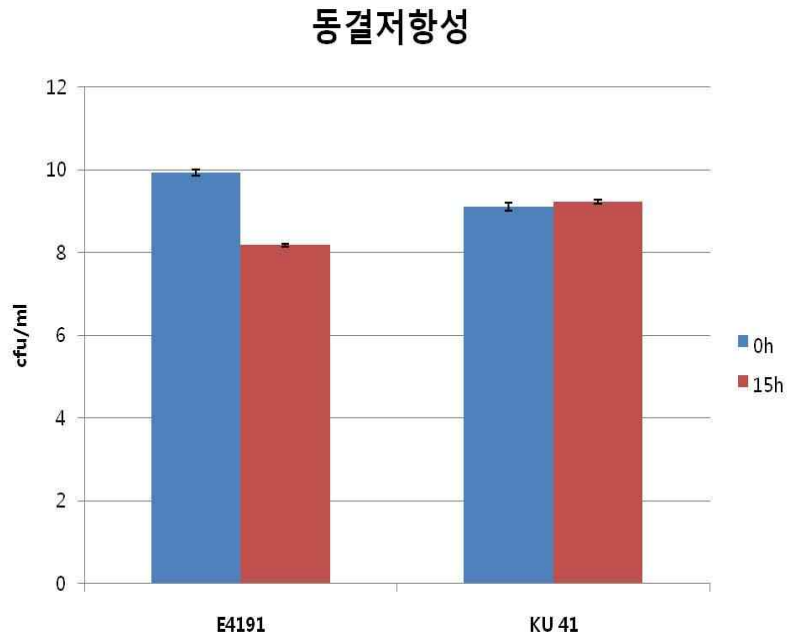


그림 35. 선발된 유산균주의 동결저항성 실험

#### 제 4 항 유산균주를 이용한 녹두 발효물 제작

염증완화 기능성 유제품 개발을 위해 1차년도에서 선발한 유산균, *Lactobacillus johnsonii* strain MH8 KU41과 *Lactobacillus salivarius* E4191과 녹두를 이용하여 복합 발효물을 만들었다. 우선 복합 발효물을 만들기 위해, 녹두 무게를 기준으로 10배의 물을 첨가한 뒤, 30초간 10회 분쇄를 한 뒤  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 살균을 했다. 유산균 배양이 가능 하도록 녹두 분쇄물에 amylase라는 당화효소를 첨가하여  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응 시킨 다음  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 처리함으로써 효소를 불활성화 시켰다. 또는 유산균 생장에 이용 가능하도록 2% glucose와 0.5% yeast extract를 녹두 분쇄물에 첨가하여  $90^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 살균을 하였다. 효소를 처리하여 당화시킨 녹두 분쇄물 또는 2% glucose와 0.5% yeast extract를 첨가한 녹두분쇄물에 선발 균주를 1% 접종 하여  $37^{\circ}\text{C}$  인공배양기에서 24시간 발효시켰다. 최종 발효물은 4000rpm, 30분간 원심분리 한 뒤, 상등액의 pH를 7.2로 조정한 뒤 freeze-dry하여 시료로 사용하였다(**그림 36**). 그 후, 발효물의 유산균 생균수와 pH를 측정하여 발효 진행 및 오

염여부를 확인하였다. 발효물을 peptone수를 이용하여 연속희석법으로 MRS-agar, PCA (plate count agar)에 평판 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 균수를 측정하였다. 또한 당이용능을 pH를 측정함으로써 확인하였다. 이 때 균주를 접종하지 않은 배지를 대조군으로 하여 생육, 활성비교 및 오염여부를 확인하였다.

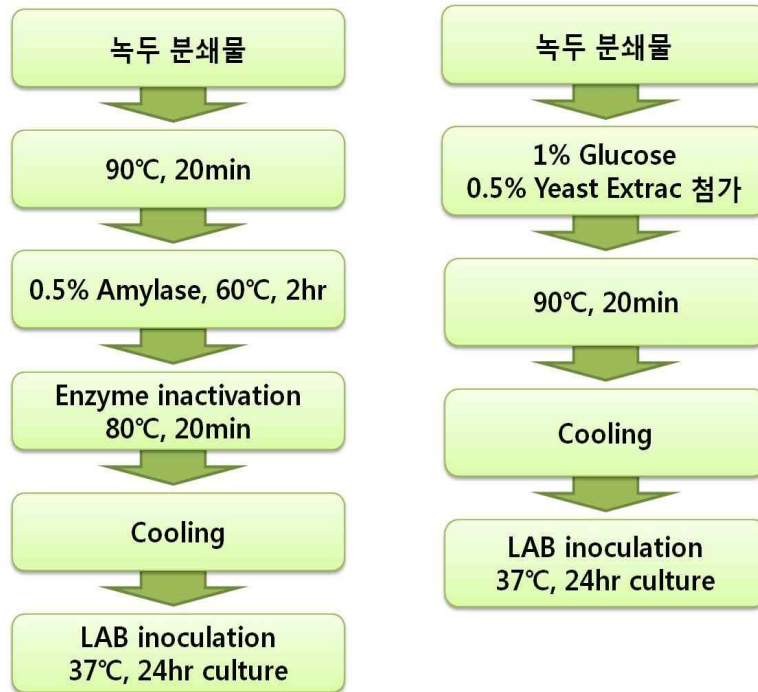


그림 36. 녹두 발효를 위한 공정

### 제 3 절 녹두 추출물과 발효물의 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

#### 제 1 항 녹두 추출물, 발효물의 대식 세포 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

##### 1. 녹두 추출 방법에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

녹두 추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 대식세포주인 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 그 후 녹두 추출물 샘플(표 11)을 용매인 10% DMSO에 녹여 최종 농도 50 mg/ml (0.1 % DMSO)로 첨가하여 48시간동안 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1 ug/ml)와 같이 배양하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였다. LPS는 염증 유발 물질로 TLR (Toll-like receptor) signaling에 의해 대식세포에서 주요 proinflammatory cytokine의 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이 때 cell viability 측정은 유세포 분석기에 나타난 PI<sup>high</sup> 세포는 세포 사멸이 일어난 것으로 간주 하였고, PI<sup>low</sup> 세포는 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과 그림 37에서 보는 것 같이 모든 분획에서 대식세포의 세포 사멸은 일어나지 않았다.

표 11. 녹두 추출물 분리 시 서로 다른 용매 비율에 따른 샘플.

녹두 추출 sample	분리 방법
1차 sample	Et-OH
2차 sample A	Ethylacetate 80% Me-OH
2차 sample B	95% ethanol
2차 sample C	Me-OH (water partition)
2차 sample D	Me-OH (Butanol partition)
2차 sample E	H <sub>2</sub> O

세포 배양 후 RNA 수준에서 전사량을 측정하기 위해 각 세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 함. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 12에 명시하였다.

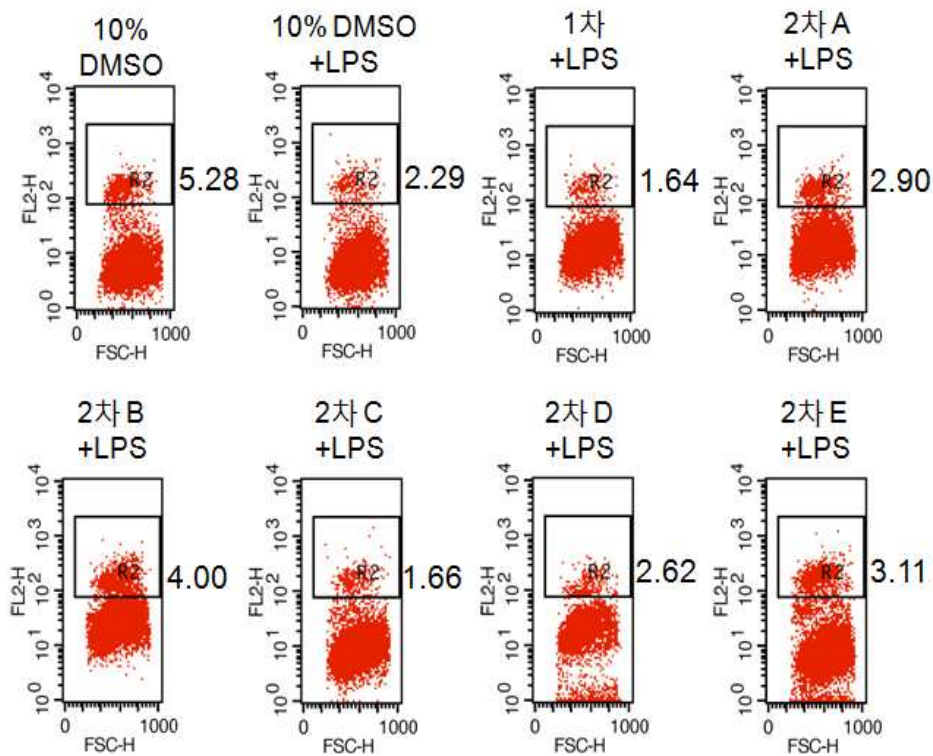


그림 37. 녹두 추출물 분리 시 서로 다른 용매 비율에 따른 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

표 12. 녹두 추출물의 대식세포 항염증 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

Gene	Genebank	Sequence		Product size
IL-1 $\beta$	NM_008361.3	F	CCA GGA TGA GGA CAT GAG CAC C	358 bp
		R	ATC CAC ACT CTC CAG CTG CAG G	
IL-6	NM_031168.1	F	ACC GCT ATG AAG TTC CTC TCT GC	561 bp
		R	TAG CCA CTC CTT CTG TGA CTC CA	
IL-12 $\beta$	NM_008352.2	F	CTG CCA CAA AGG AGG CGA GAC TC	389 bp
		R	CAT ATT TAT TCT GCT GCC GTG CTT C	
TNF- $\alpha$	NM_013693.2	F	GAC GTG GAA CTG GCA GAA GAG G	502 bp
		R	TGA CGG CAG AGA GGA GGT TGA C	
iNOS	NM_010927.2	F	CAA GTA CGA GTG GTT CCA GGA GC	314 bp
		R	CTG TGT GGT GGT CCA TGA TGGTC	
Gapdh	NM_008084.2	F	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
		R	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

그 결과 그림 38의 결과처럼 에탄올 추출물이 세포 독성이 낮은 반면 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었으며 이후 항염증 성분의 추출에는 에탄올 추출물을 이용하여 실시하였다.

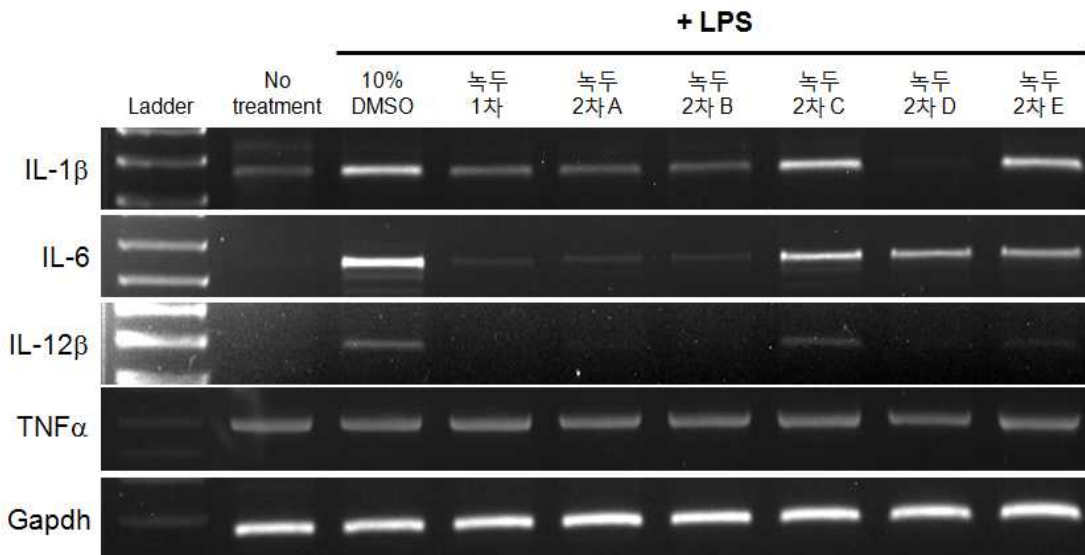


그림 38. 녹두 추출물 분리 시 서로 다른 용매 비율에 따른 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

## 2. 녹두 에탄올 추출물의 대식세포 항염증 활성 측정

만들어진 서로 다른 분획의 에탄올 추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 1 차적으로 F1 분획, F2 분획, F5 분획이 세포 독성이 낮은 반면 대식세포 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(그림 39와 그림 40).

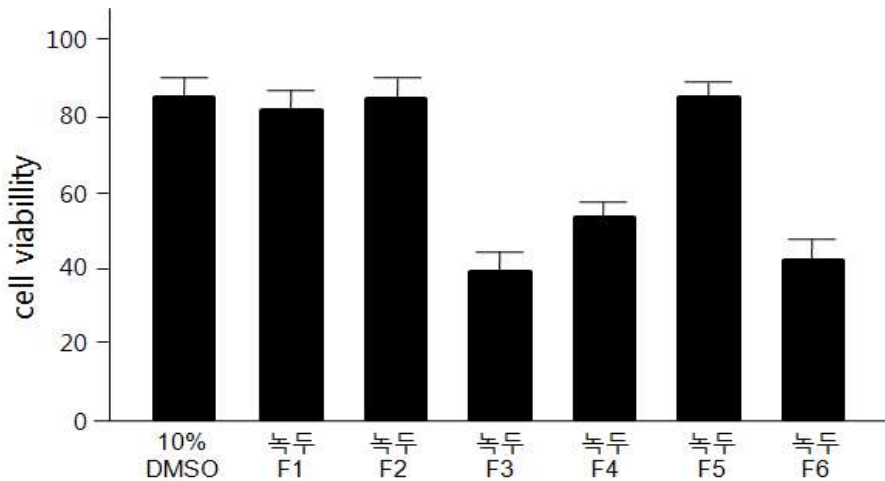


그림 39. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

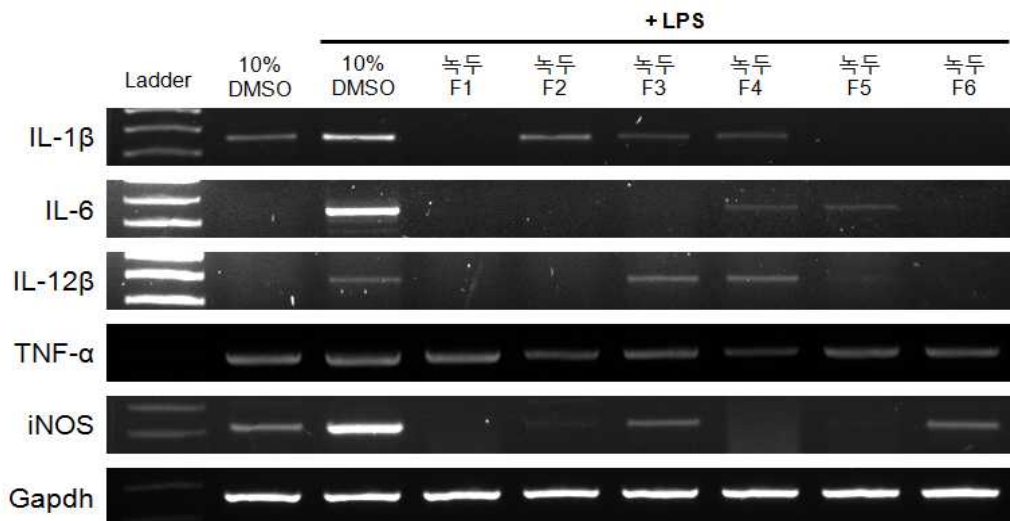


그림 40. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

F1 분획, F2 분획, F5 분획이 대식세포 활성화 시 분비되는 주요 proinflammatory mediator의 mRNA 전사를 억제하는 원인이 세포 증식(cell proliferation)을 억제하기 때문인가를 고찰하기 위해 대식세포 배양 시 F1 분획, F2 분획, F5 분획을 첨가하고 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 우선 생쥐 J774 cell 을 6 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 했다. 그 후 F1 분획, F2 분획, F5 분획을 첨가하고 48시간동안 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1ug/ml)와 같이 배양하였다. 세포 배양 후 만들어진 MTT 용액 20  $\mu$ l를 넣고 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 4 시간 동안 더 배양하였다. 4 시간 후 MTT 반응을 중단시키기 위해 세포 배지를 제거하고 DMSO 200  $\mu$ l를 넣고 흡광도 490 nm에서 상대적인 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 F1 분획과 F2 분획은 대식세포의 세포 증식에 아무런 영향도 안 끼치는 것으로 나타났고, F5 분획은 대식세포의 세포 증식을 감소시키는 것으로 나타났다(그림 41).

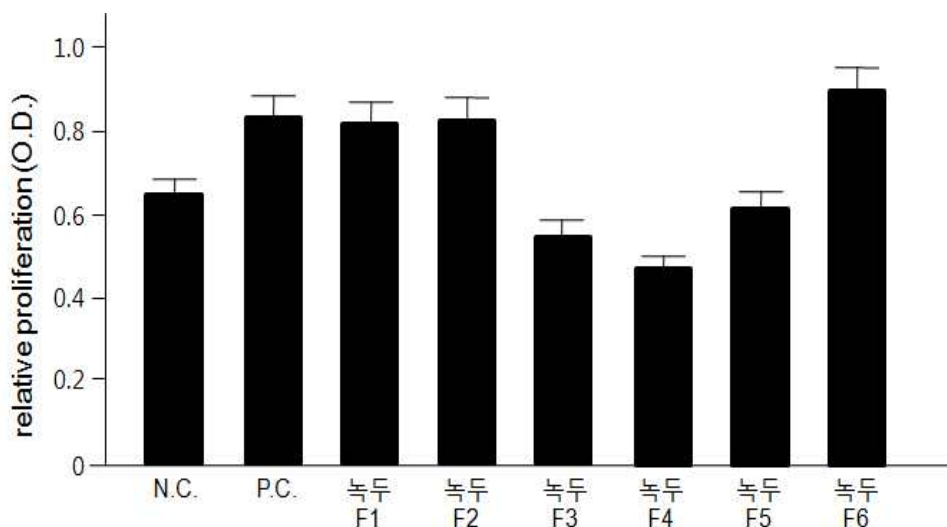


그림 41. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 대식세포 세포 증식 평가. N.C.는 LPS를 처리 안 한 음성 대조구이며 P.C.는 LPS만을 처리 한 양성 대조구.

그 후 F1 분획, F2 분획, F5 분획을 다시 세분화하여 분획화 하였다. 우선 F1 분획, F2 분획, F5 분획에서 얻어진 각각의 분획이 대식세포 cell viability에 미치는 영향을 측정한 결과 F1a, F1c, F5a, F5c, F5d는 대식세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다(그림 42).

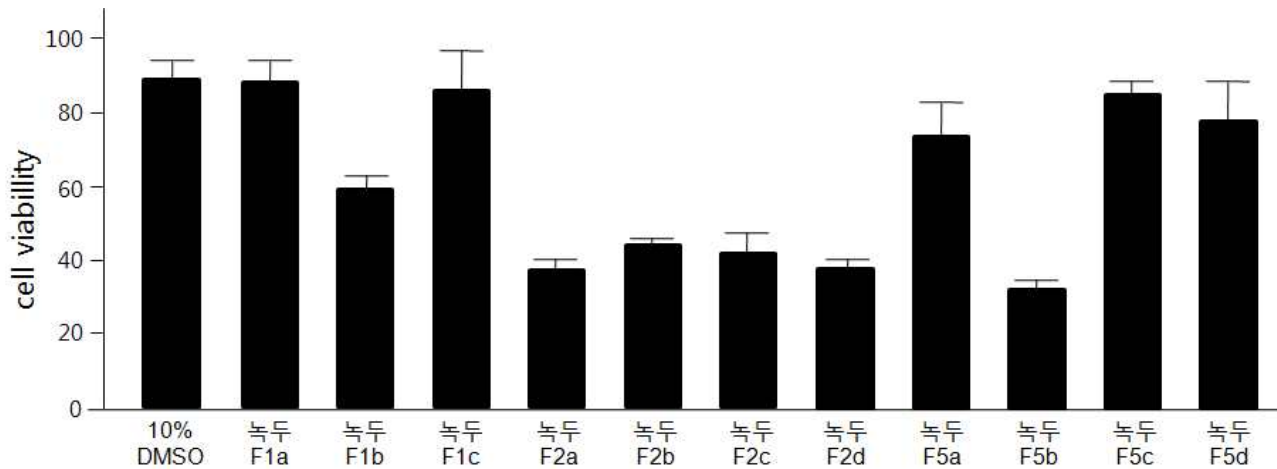
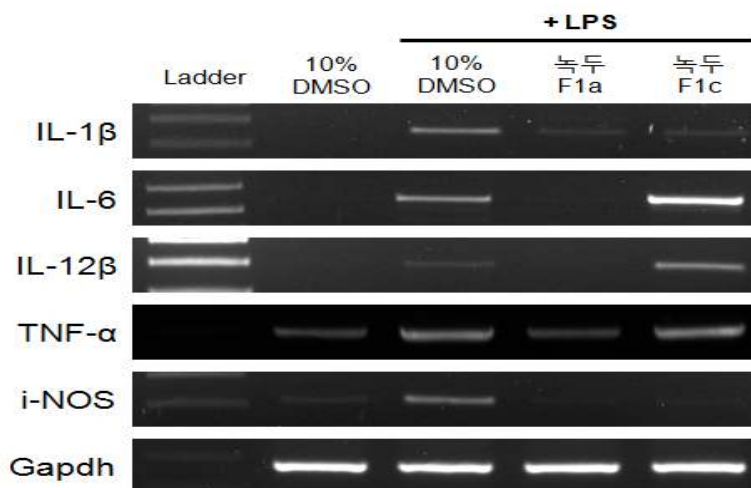


그림 42. F1 분획, F2 분획, F5 분획에서 만들어진 서로 다른 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정.

따라서 F1a, F1c, F5a, F5c, F5d를 대식세포에 처리한 후 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 F1a 분획이 세포 독성이 낮은 반면 대식세포 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(그림 43). 그 후 F1a 분획이 대식세포 활성화 시 분비되는 주요 proinflammatory mediator의 mRNA 전사를 억제하는 원인이 세포 증식을 억제하기 때문인가를 고찰하기 위해 대식세포 배양 시 F1a 분획을 첨가하고 위에 기술한 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 F1a 분획은 대식세포의 세포 증식을 감소시키는 것으로 나타났다(그림 44).

(가)





(나)

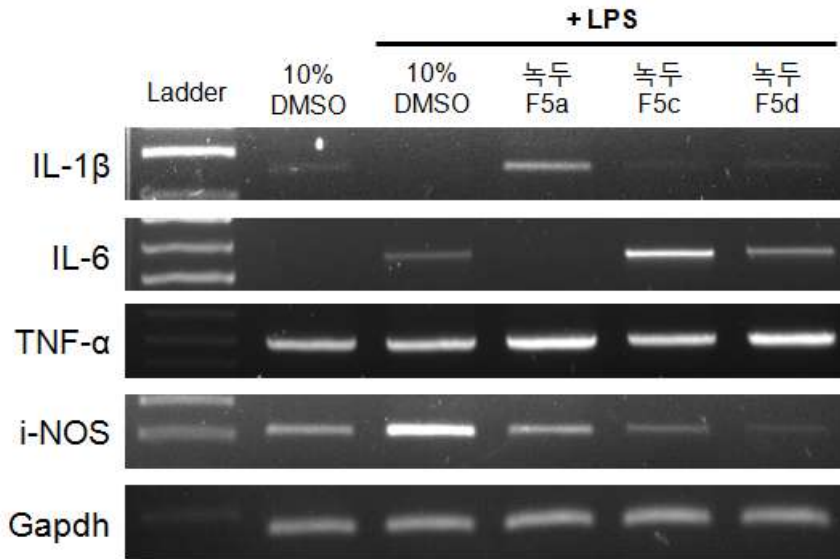


그림 43. F1 분획, F2 분획, F5 분획에서 만들어진 서로 다른 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가.

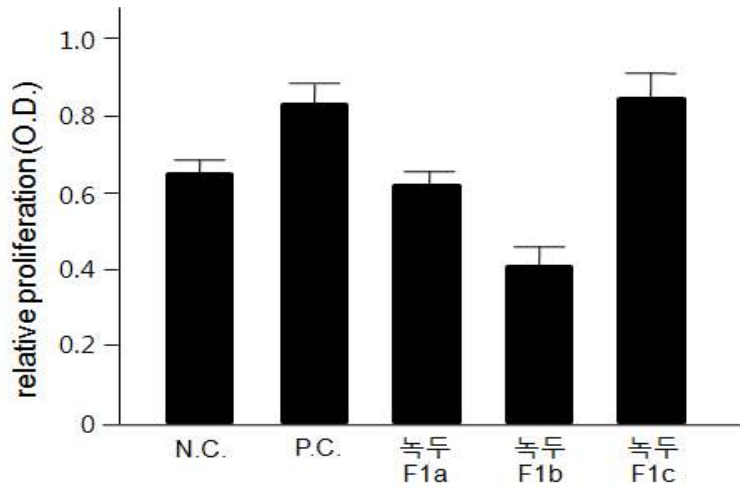


그림 44. 녹두 에탄올 추출물의 F1 분획 샘플의 대식세포 세포 증식 평가. N.C.는 LPS를 처리 안 한 음성 대조구이며 P.C.는 LPS만을 처리 한 양성 대조구임. 녹두는 LPS와 각 각의 분획을 처리한 샘플.

### 3. 녹두 발효에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

선발한 유산균주인 락토바실러스 존소나이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용하여 녹두를 발효 한 후, 녹두 발효물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 대식세포주인 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 그 후 준비한 녹두 발효물 샘플을 용매인 10% DMSO에 녹여 최종 농도 250  $\mu\text{g/ml}$ 과 500  $\mu\text{g/ml}$  (0.1 % DMSO)로 첨가하여 48시간동안 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1  $\mu\text{g/ml}$ )와 같이 배양하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였다. LPS는 염증 유발 물질로 TLR (Toll-like receptor) signaling에 의해 대식세포에서 주요 proinflammatory cytokine의 발현을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이 때 cell viability 측정은 유세포 분석기에 나타난 PI<sup>high</sup> 세포는 세포 사멸이 일어난 것으로 간주 하였고, PI<sup>low</sup> 세포는 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과 **그림 45**에서 보는 것 같이 모든 분획에서 대식세포의 세포 사멸은 일어나지 않았다.

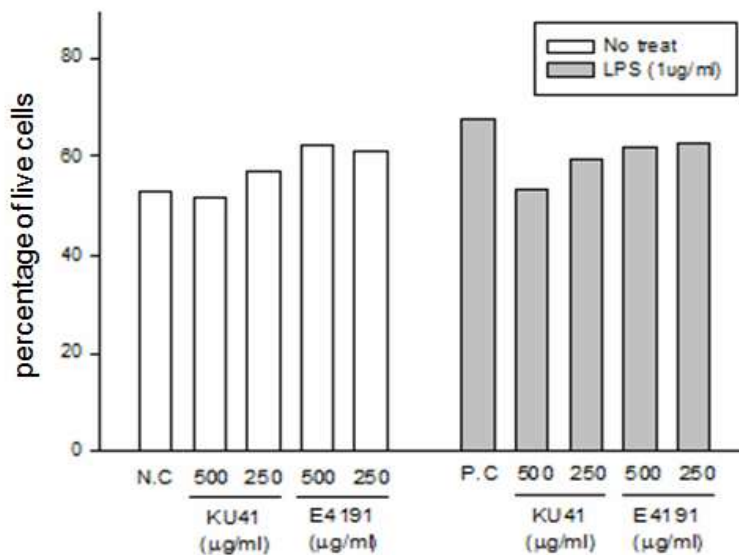


그림 45. 녹두 발효물 처리 시 대식세포 cell viability 변화 측정. N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., LPS를 첨가 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지.

세포 배양 후 mRNA 수준에서 전사량을 측정하기 위해 각 세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 그 후, 세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여

mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 하였다. *Gapdh* mRNA 전사체는 internal control로써 사용되었고, 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포에 10% DMSO를 처리하여 비교하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 12와 동일하다. 그 결과 그림 46의 결과처럼 녹두 발효물이 세포 독성이 낮은 반면 IL-1 $\beta$ 에 의한 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

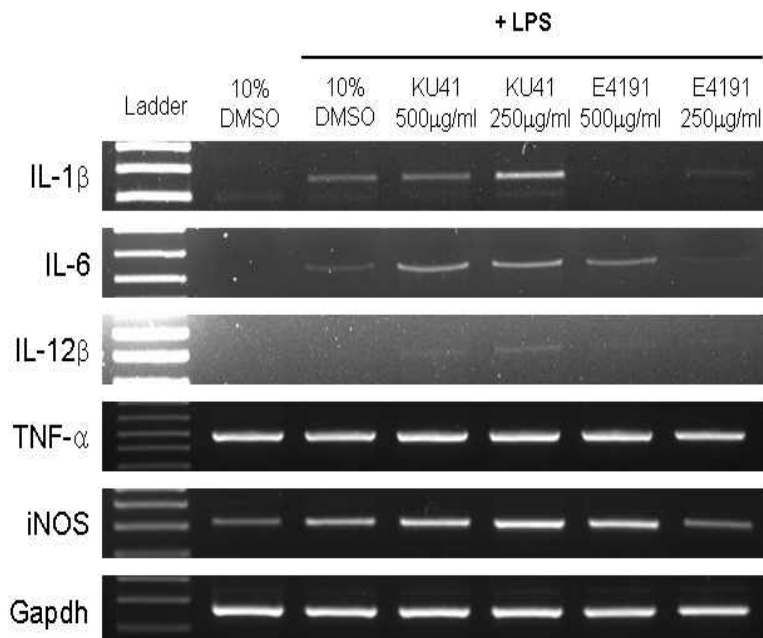


그림 46. RT-PCR을 이용한 녹두 발효물의 대식세포 항염증 작용 평가.

#### 4. Glucose 첨가 후 녹두 발효에 따른 대식세포의 항염증 활성 측정

선발한 유산균주인 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain MH8 KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용해 녹두 발효 시 carbon source로 glucose를 첨가 후 녹두 발효를 시행하였다. 그 후 녹두 발효물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 glucose 첨가 전과 비교하여, glucose 첨가 후 녹두 발효물의 샘플에서는 대식세포의 cell viability가 줄어드는 것으로 나타났으며(그림 47), 또한 대식세포 염증반응에 아무런 효과를 안 보이는 것으로 확인되었다(그림 48).

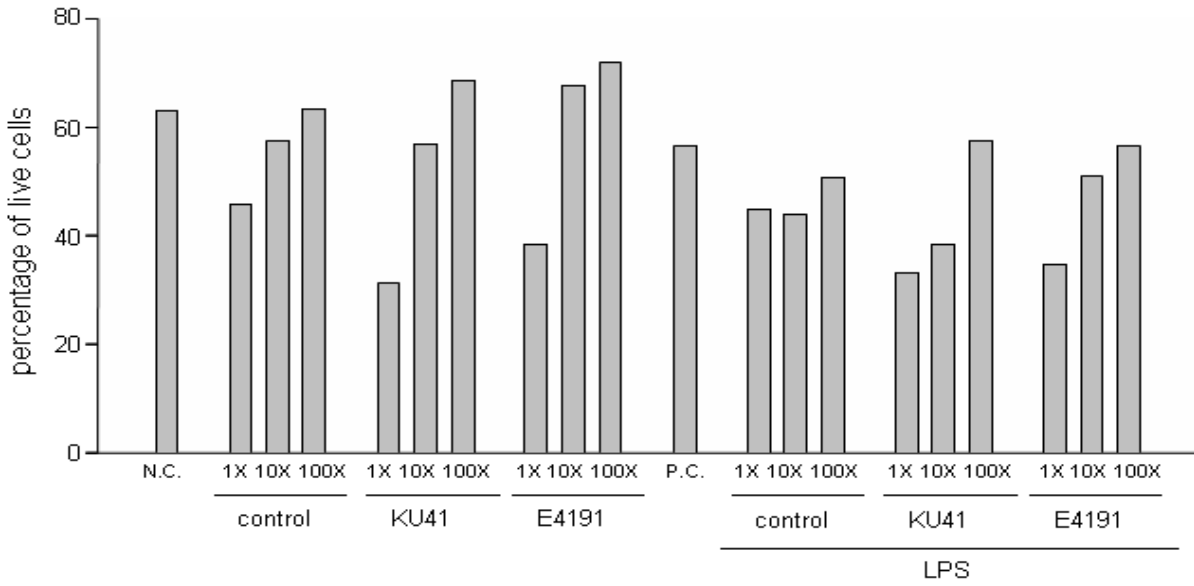


그림 47. Glucose를 첨가 한 배지에 녹두 발효 후 녹두 발효물 샘플의 대식세포 cell viability 변화 측정. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., LPS를 첨가 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. 1X는 500 µg/ml의 발효물.

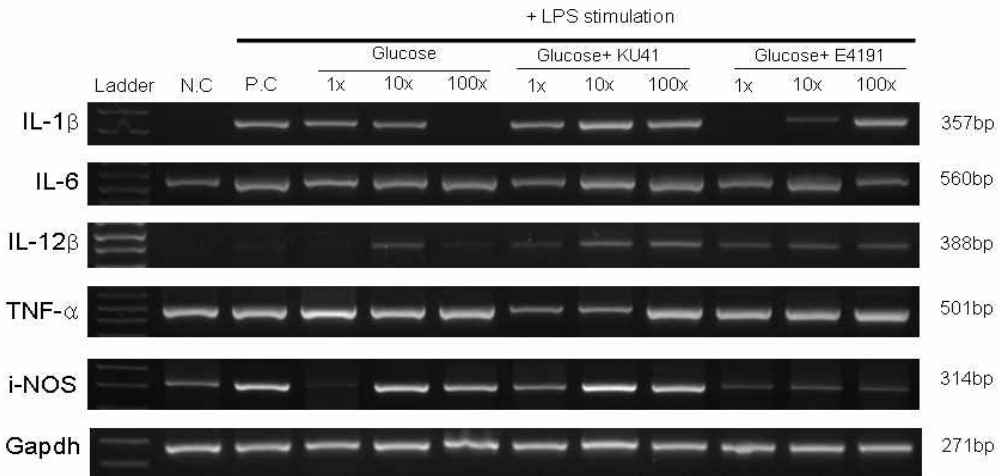


그림 48. Glucose를 첨가 한 배지에 녹두 발효 후 녹두 발효물 샘플의 대식세포 항염증 작용 평가. N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., LPS를 첨가 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. 1X는 500 µg/ml의 발효물.

## 5. 녹두 추출물의 발효 후 대식세포의 항염증 활성 측정

선발한 녹두 추출물과 선발한 유산균주인 락토바실러스 존소나이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용한 녹두 추출물의 발효 후 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 녹두 추출물의 발효 후 샘플에서는 대식세포의 cell viability에 영향을 안 미치는 것을 알 수 있었으며(그림 49), 대식세포 염증반응에도 아무런 효과를 안 보이는 것으로 확인되었다(그림 50).

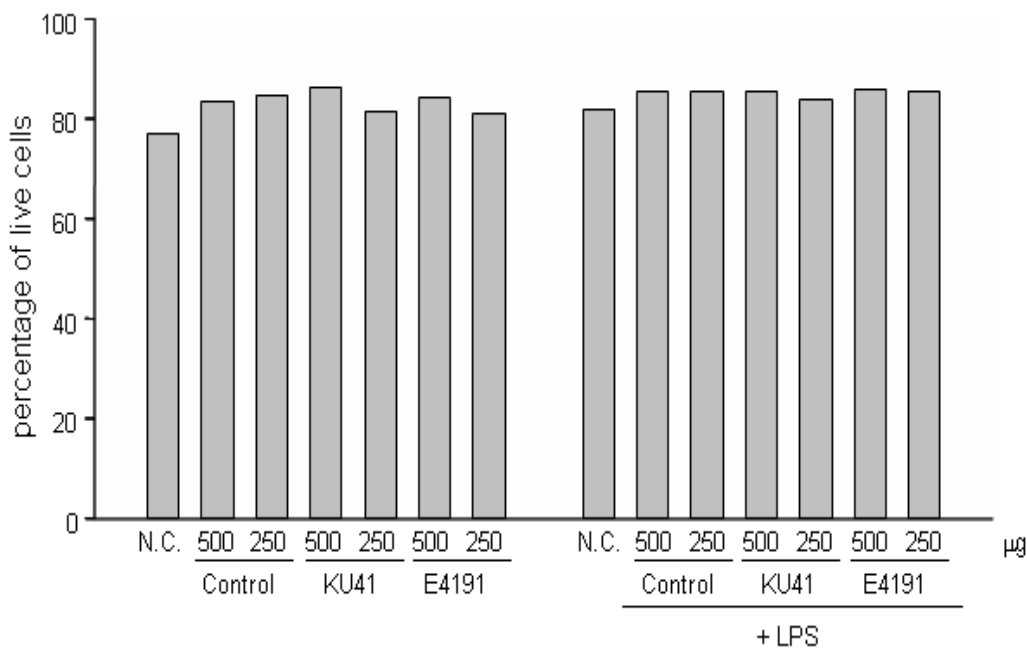


그림 49. 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 대식세포 cell viability 변화 측정. N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지. µg은 µg/ml을 나타냄

또한 녹두 추출물의 발효 후 샘플이 대식세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 우선 생쥐 J774 cell을 6 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 하루 동안 배양하여 세포가 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 함. 그 후 녹두 추출물의 발효 후 샘플을 첨가하고 48시간동안 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 LPS (lipopolysaccharides) (1µg/ml)와 같이 배양하였다.

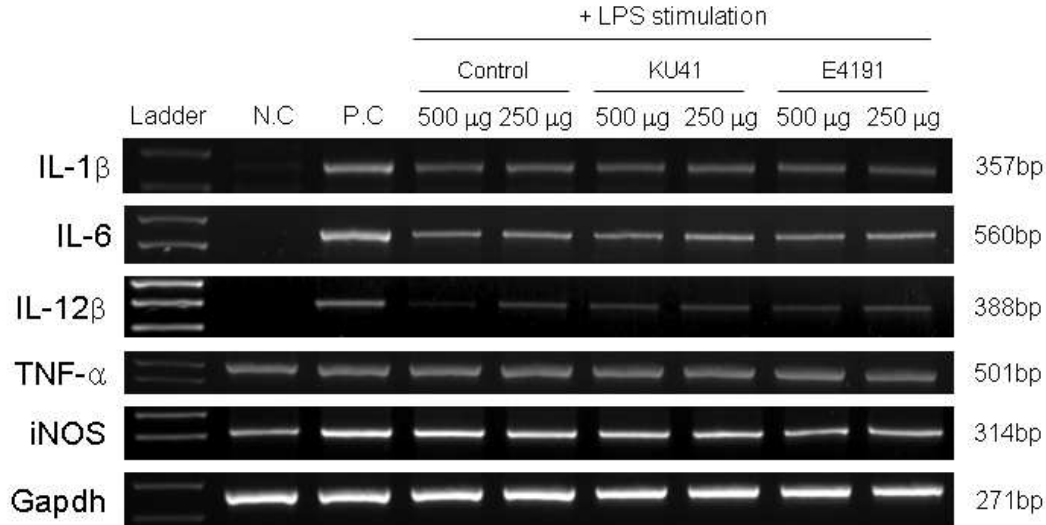


그림 50. RT-PCR을 이용한 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시, 대식세포 항염증 작용 평가. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., LPS를 첨가 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. µg은 µg/ml을 나타냄.

세포 배양 후 만들어진 MTT 용액 20 µl를 넣고 95% air + 5% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 4 시간 동안 더 배양하였다. 4 시간 후 MTT 반응을 중단시키기 위해 세포 배지를 제거하고 DMSO 200 µl를 넣고 흡광도 490 nm에서 상대적인 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 녹두 추출물의 발효 후 샘플은 대식세포의 세포 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 51).

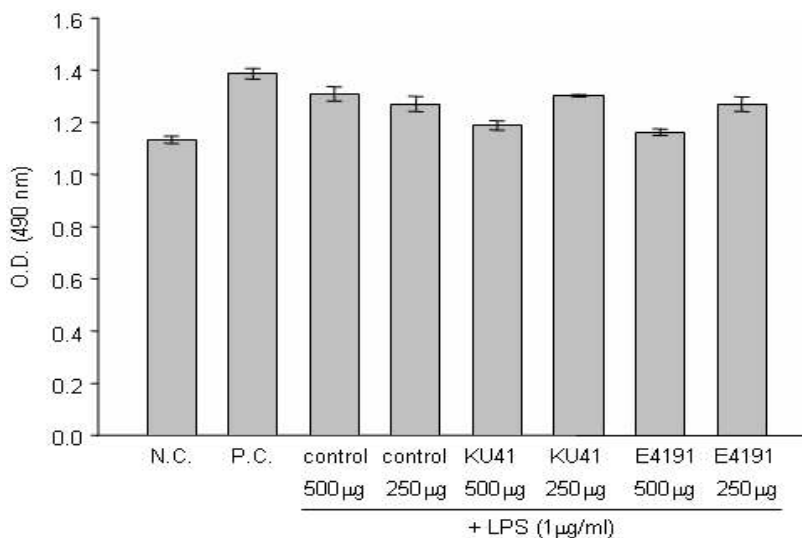


그림 51. 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 대식세포의 세포 증식 평가. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., LPS를 첨가하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., LPS를 첨가 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. µg은 µg/ml을 나타냄.

## 제 2 항 녹두 추출물, 발효물의 T 림프구 내 항염증 활성 측정 및 기전분석

### 1. 녹두 에탄올 추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정

만들어진 서로 다른 분획의 에탄올 추출물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 T 림프구에서 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 이 때 사용되어진 T 림프구는 생쥐 RMA cell을 사용하였으며 6 well plate에 각 well 당  $2 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 대식세포 항염증 측정 방법과 동일한 조건으로 배양기에서 배양하였다. 이 때 T 림프구의 활성을 증진시키기 위해 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1  $\mu$ g/ml)을 세포 배양 시 첨가하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였고, IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 발현양을 RT-PCR과 ELISA assay로 측정하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 13에 명시하였다. 그 결과 대식세포의 결과와 마찬가지로 1차적으로 F1 분획, F2 분획, F5 분획이 세포 독성이 낮은 반면 T 림프구 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(그림 52, 그림 53, 그림 54).

표 13. 녹두 추출물의 T 림프구 항염증 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

Gene	Genebank	Sequence		Product size
IL2	NM.008366.2	F	TGG AGC AGC TGT TGA	308 bp
		R	CAC CAC AGT TGC TGA	
IFN- $\gamma$	NM_008337.2	F	CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC ACT GC	433 bp
		R	AAC AGC TGG TGG ACC ACT CGG AT	
Gapdh	NM_008084.2	R	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
		F	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

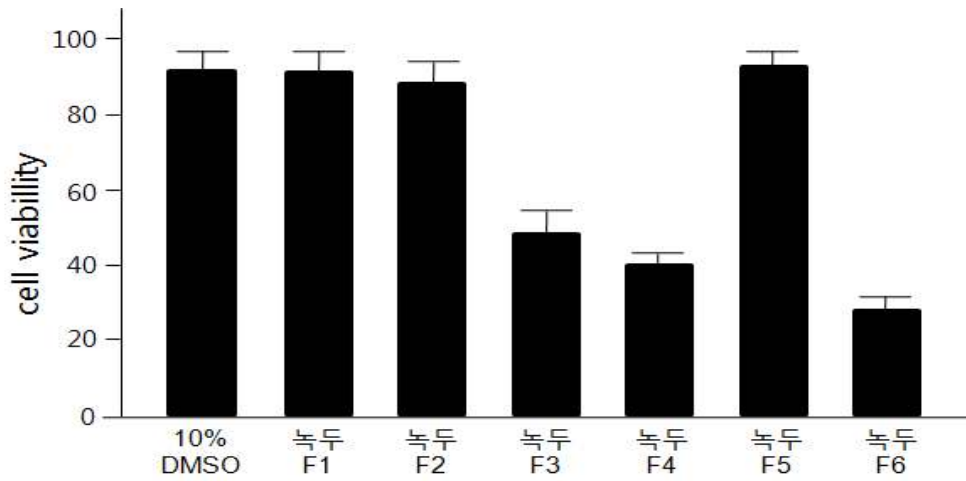


그림 52. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정.

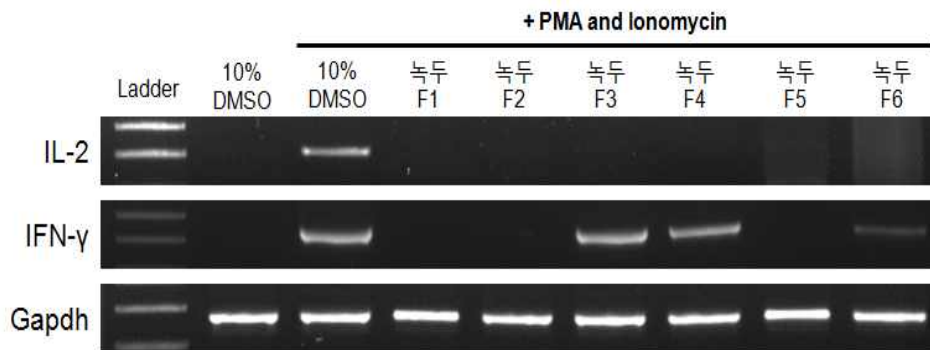
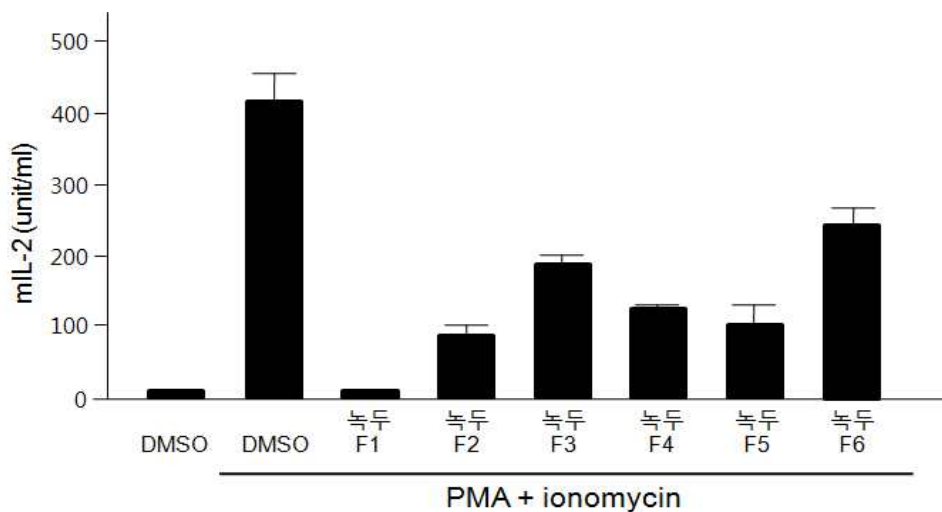


그림 53. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가.

(가)





(나)

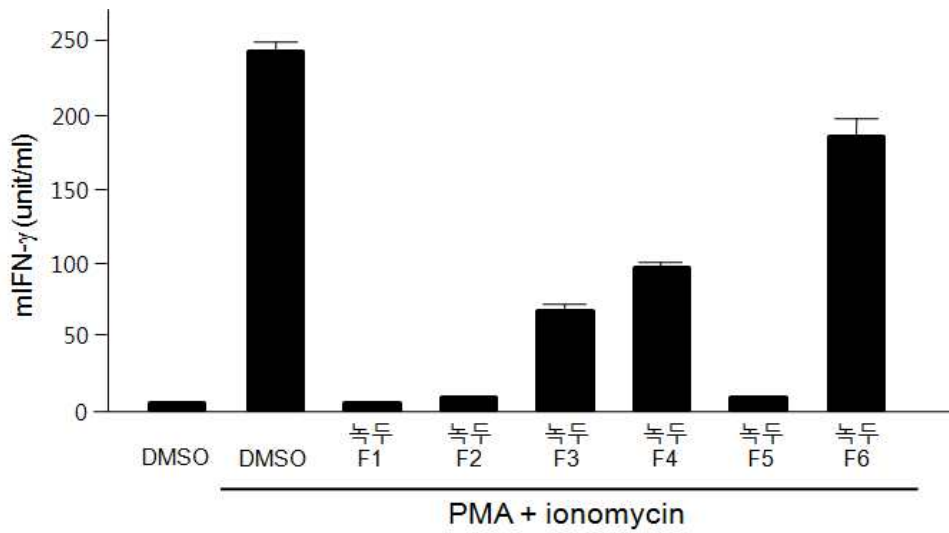


그림 54. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가. DMSO는 최종 농도 0.1%의 용매로 사용.

그 후 F1 분획, F2 분획, F5 분획을 다시 세분화하여 분획 화 하였다. 우선 F1 분획, F2 분획, F5 분획에서 얻어진 각 각의 분획이 T 림프구 cell viability에 미치는 영향을 측정한 결과 F1c, F5c, F5d는 T 림프구에 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다(그림 55).

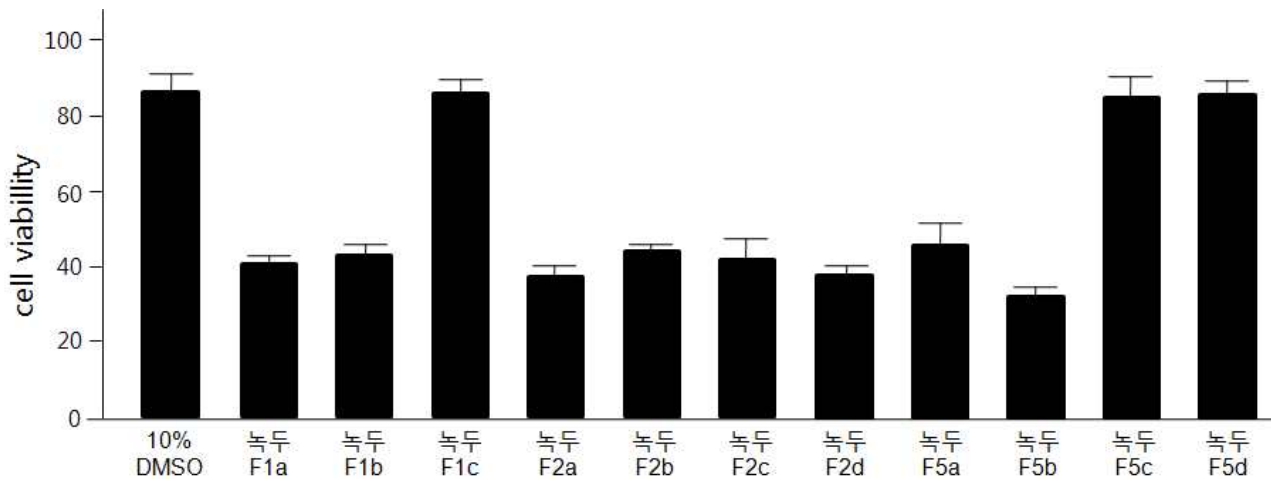
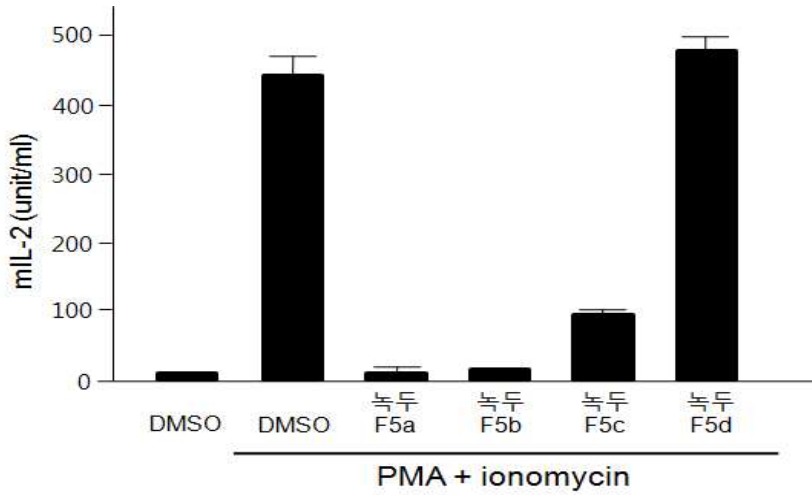


그림 55. F1 분획, F2 분획, F5 분획에서 만들어진 서로 다른 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정.

따라서 F1c, F5c, F5d를 T 림프구에 처리한 후 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 F5c 분획이 세포 독성이 낮은 반면 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다(그림 56). 그 후 F5c 분획이 T 림프구 활성화 시 분비되는 주요 cytokine의 분비를 억제하는 원인이 세포 증식을 억제하기 때문인가를 고찰하기 위해, T 림프구 배양 시 F5c 분획을 첨가하고 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 F5c 분획은 T 림프구의 세포 증식을 감소시키는 것으로 나타났다(그림 57).

(가)



(나)

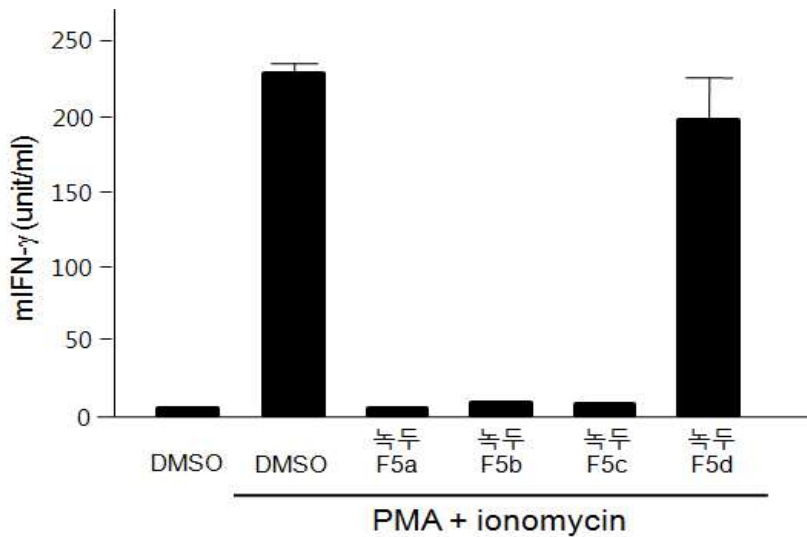


그림 56. 녹두 에탄올 추출물의 서로 다른 분획 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가. DMSO는 최종 농도 0.1%의 용매로 사용하였음.

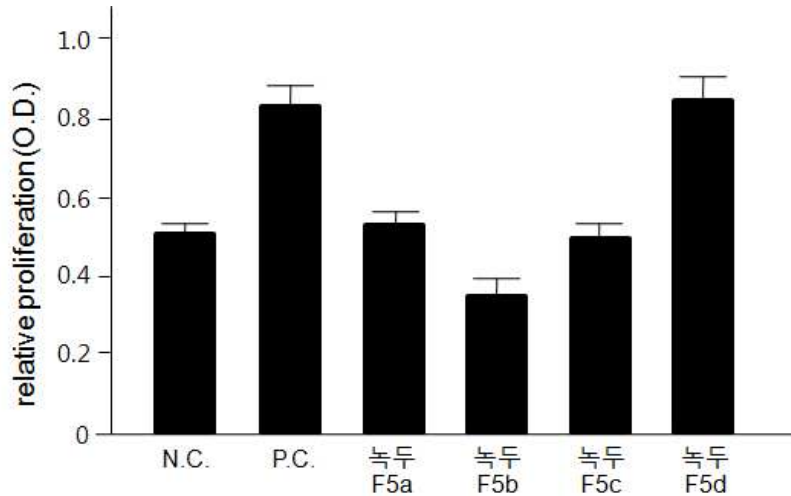


그림 57. 녹두 에탄올 추출물의 F5 분획 샘플의 T 림프구 증식 평가. N.C.는 PMA와 ionomycin을 처리 안 한 음성 대조구이며 P.C.는 PMA와 ionomycin을 처리한 양성 대조구임. 녹두는 PMA와 ionomycin을 처리하고 또한 각 각의 분획을 처리한 샘플.

## 2. 녹두 발효에 따른 T 림프구의 항염증 활성 측정

선발한 유산균주인 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용하여 녹두를 발효 한 후, 녹두 발효물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 T 림프구에서 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 이 때 사용되어진 T 림프구는 생쥐 RMA cell을 사용하였으며 6 well plate에 각 well 당  $2 \times 10^5$  cells씩 seeding하고 대식세포 항염증 측정 방법과 동일한 조건으로 배양기에서 배양하였다. 이 때 T 림프구의 활성을 증진시키기 위해 PMA (10 ng/ml)와 ionomycin (1  $\mu$ g/ml)을 세포 배양 시 첨가하였다. 그 후 PI staining과 유세포 분석기(flow cytometry)로 cell viability를 측정하였고, cytokine의 발현양을 RT-PCR과 ELISA assay로 측정하였다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 13과 동일하다. 그 결과 그림 58, 그림 59와 그림 60의 결과처럼 녹두 발효물이 세포 독성이 낮은 반면 IFN- $\gamma$ 에 의한 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

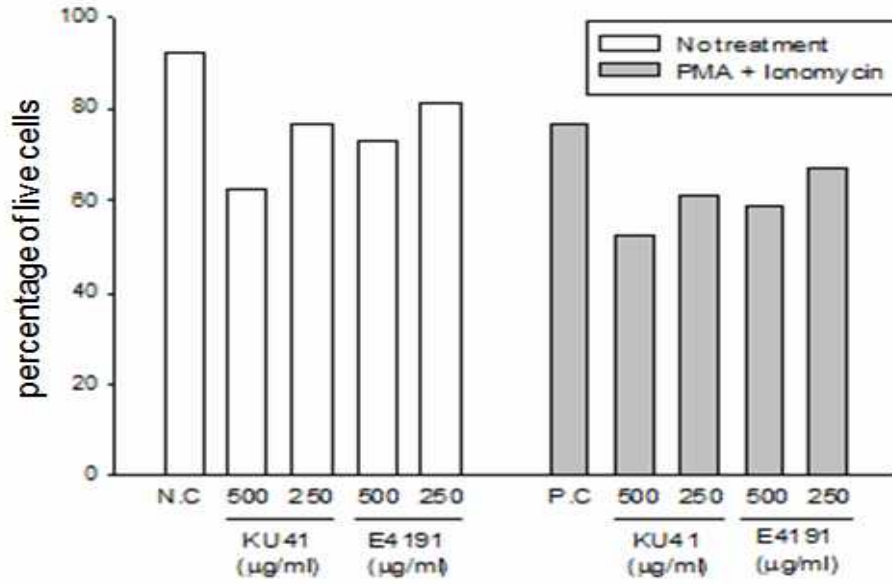


그림 58. 녹두 발효물 처리 시 T 림프구 cell viability 변화 측정. N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지.

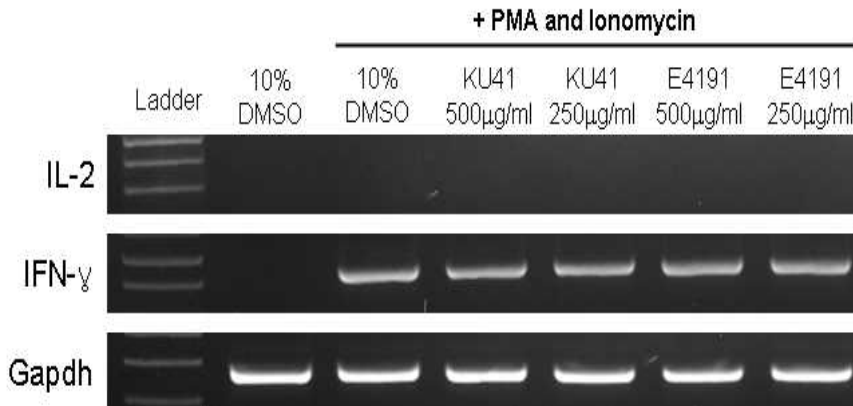


그림 59. RT-PCR을 이용한 녹두 발효물의 T 림프구 항염증 작용 평가.

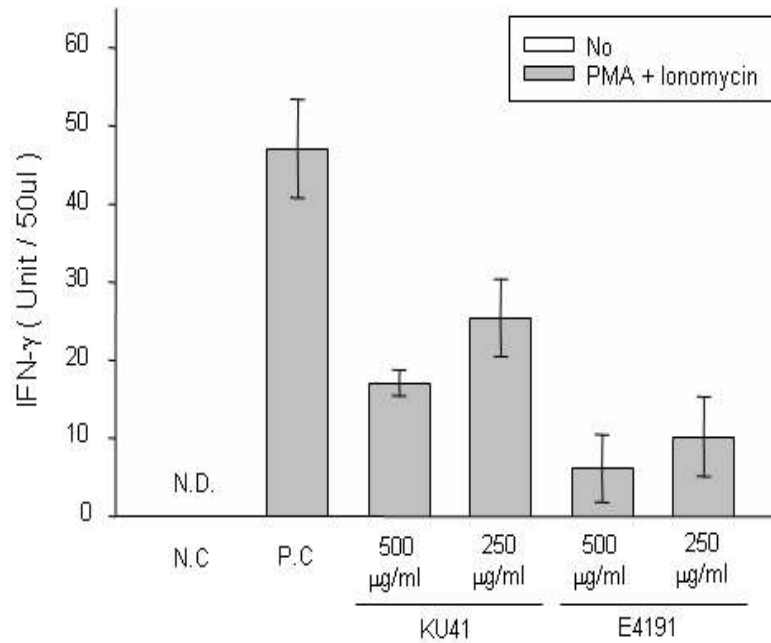


그림 60. 녹두 발효물의 T 림프구 IFN- $\gamma$  분비능 억제. N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. N.D., 측정 불가능.

### 3. Glucose 첨가 후 녹두 발효에 따른 T 림프구의 항염증 활성 측정

선발한 유산균주인 락토바실러스 존소나이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용해 녹두 발효 시 carbon source로 glucose를 첨가 후 녹두 발효를 시행하였다. 그 후 녹두 발효물 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 glucose 첨가 전과 비교하여, glucose 첨가 후 녹두 발효물의 샘플에서는 T 림프구의 cell viability가 줄어드는 것으로 나타났으며(그림 61), 또한 T 림프구 염증반응에 아무런 효과를 안 보이는 것으로 확인되었다(그림 62).

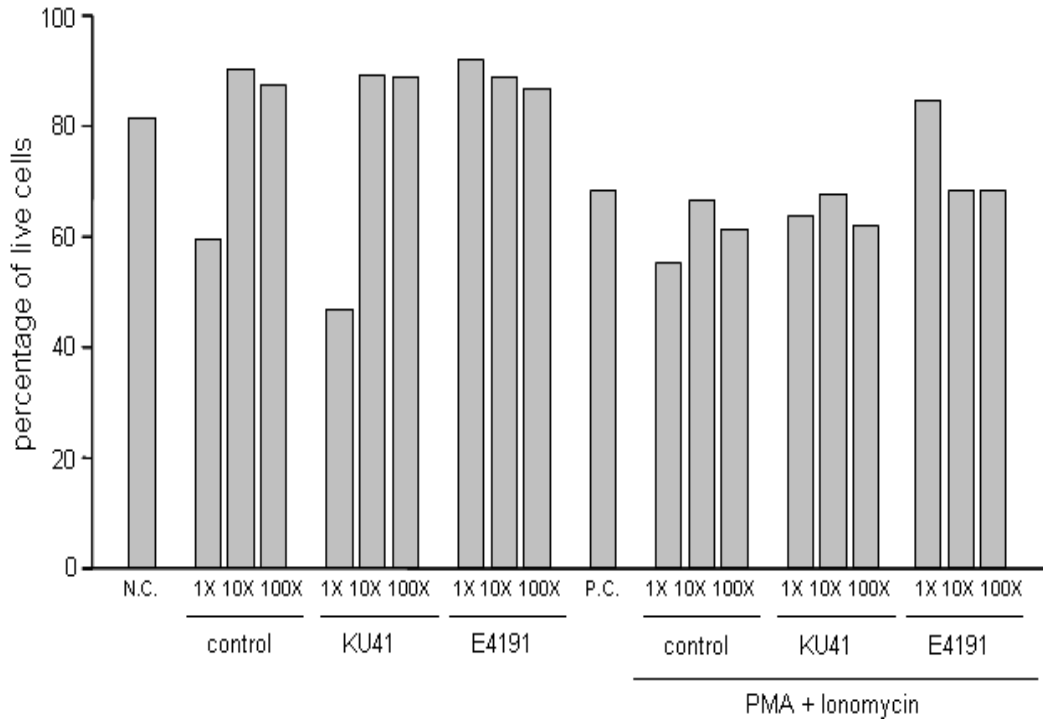


그림 61. Glucose를 첨가 한 배지에 녹두 발효 후 녹두 발효물 샘플의 T 림프구 cell viability 변화 측정. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어 준 배지. 1X는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 발효물.

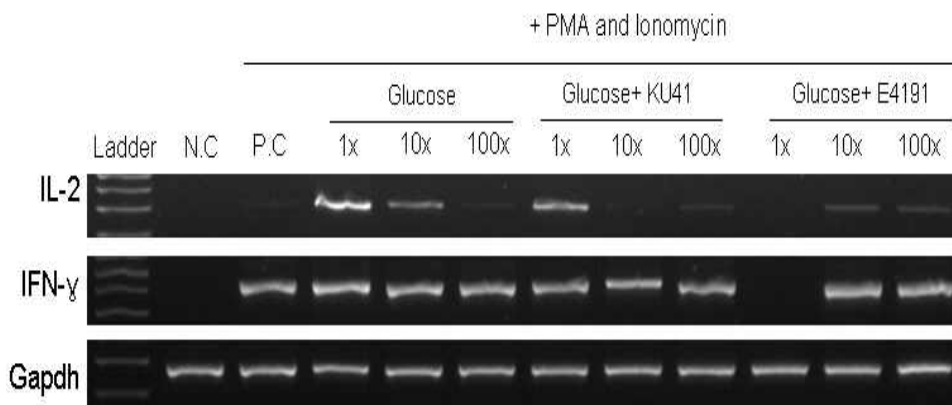


그림 62. Glucose를 첨가 한 배지에 녹두 발효 후 녹두 발효물 샘플의 T 림프구 항염증 작용 평가. N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. 1X는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 발효물.

#### 4. 녹두 추출물의 발효 후 T 림프구의 항염증 활성 측정

선발한 녹두 추출물과 선발한 유산균주인 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용한 녹두 추출물의 발효 후 샘플의 항염증 활성을 측정하기 위해 위에 기술된 방법으로 각 각의 cell viability와 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 녹두 추출물의 발효 후 샘플에서는 T 림프구의 cell viability에 영향을 안 미치는 것을 알 수 있었으며(그림 63), T 림프구 염증반응에도 아무런 효과를 안 보이는 것으로 확인되었다(그림 64).

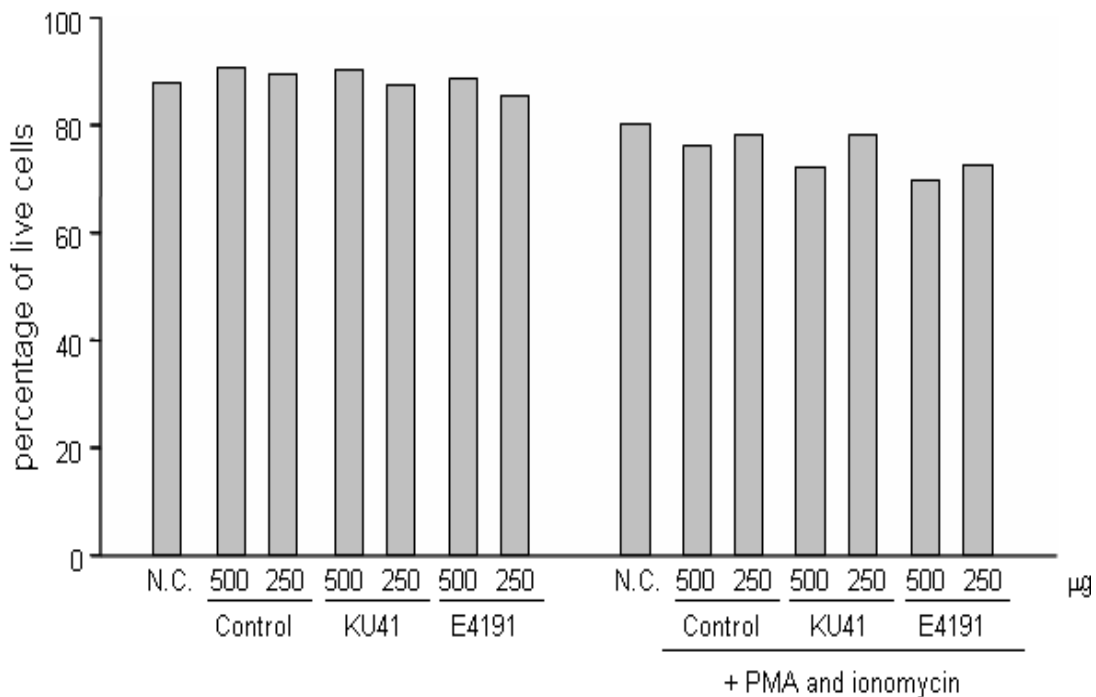


그림 63. 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 T 림프구 cell viability 변화 측정. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지. N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. µg은 µg/ml을 나타냄

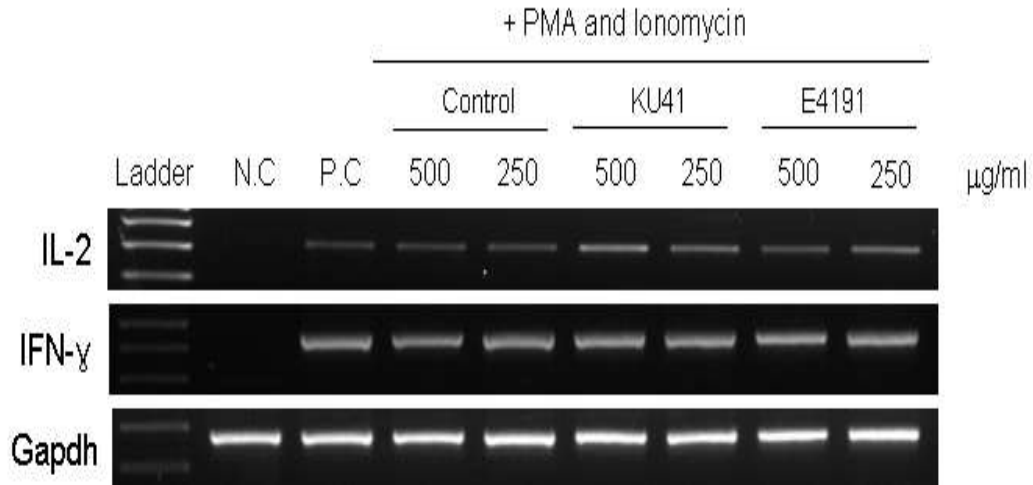


그림 64. RT-PCR을 이용한 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 T 림프구 항염증 작용 평가. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지.

또한 녹두 추출물의 발효 후 샘플이 T 림프구의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위해 위에 기술한 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과 녹두 추출물의 발효 후 샘플은 T 림프구의 세포 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 65).

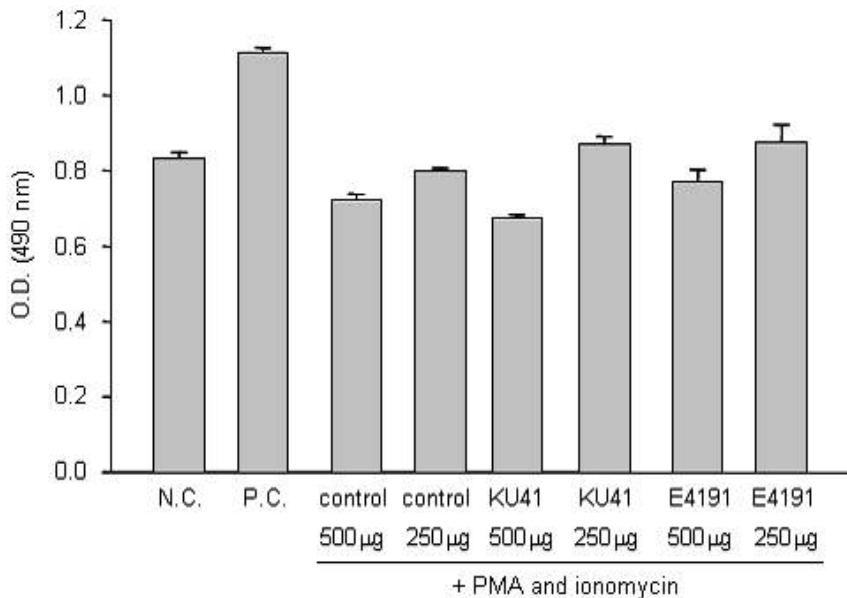


그림 65. 녹두 추출물의 발효 후 샘플 처리 시 T 림프구의 세포 증식 평가. Control, 유산균주를 안 넣어준 배지, N.C., T 림프구를 stimulation 하지 않고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지. P.C., T 림프구를 PMA와 ionomycin으로 stimulation 하고 녹두 발효물을 안 넣어준 배지



### 제 3 항 녹두 사포닌의 항염증 활성 측정 및 기전분석

분리한 녹두 사포닌의 항염증 활성을 이미 알려진 대두 사포닌의 항염증 활성과 비교하여 어떤 차이가 있나 고찰하였다. 이 때 사용되어진 면역세포는 대식세포(J774 cell)과 T 림프구(RMA cell)이다. 분석 결과 대두 사포닌과 녹두 사포닌은 대식세포와 T 림프구의 viability에 영향을 주지 않으며(그림 66), 녹두 사포닌의 항염증 활성은 대두 사포닌의 항염증 활성과 유사하여 대식세포의 cytokine 분비와 세포 분열에는 영향을 미치지 않지만 (그림 67과 그림 68), T 림프구의 세포분열에 영향을 주어 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 분비능 억제에 효과가 있음이 밝혀졌다(그림 69와 그림 70).

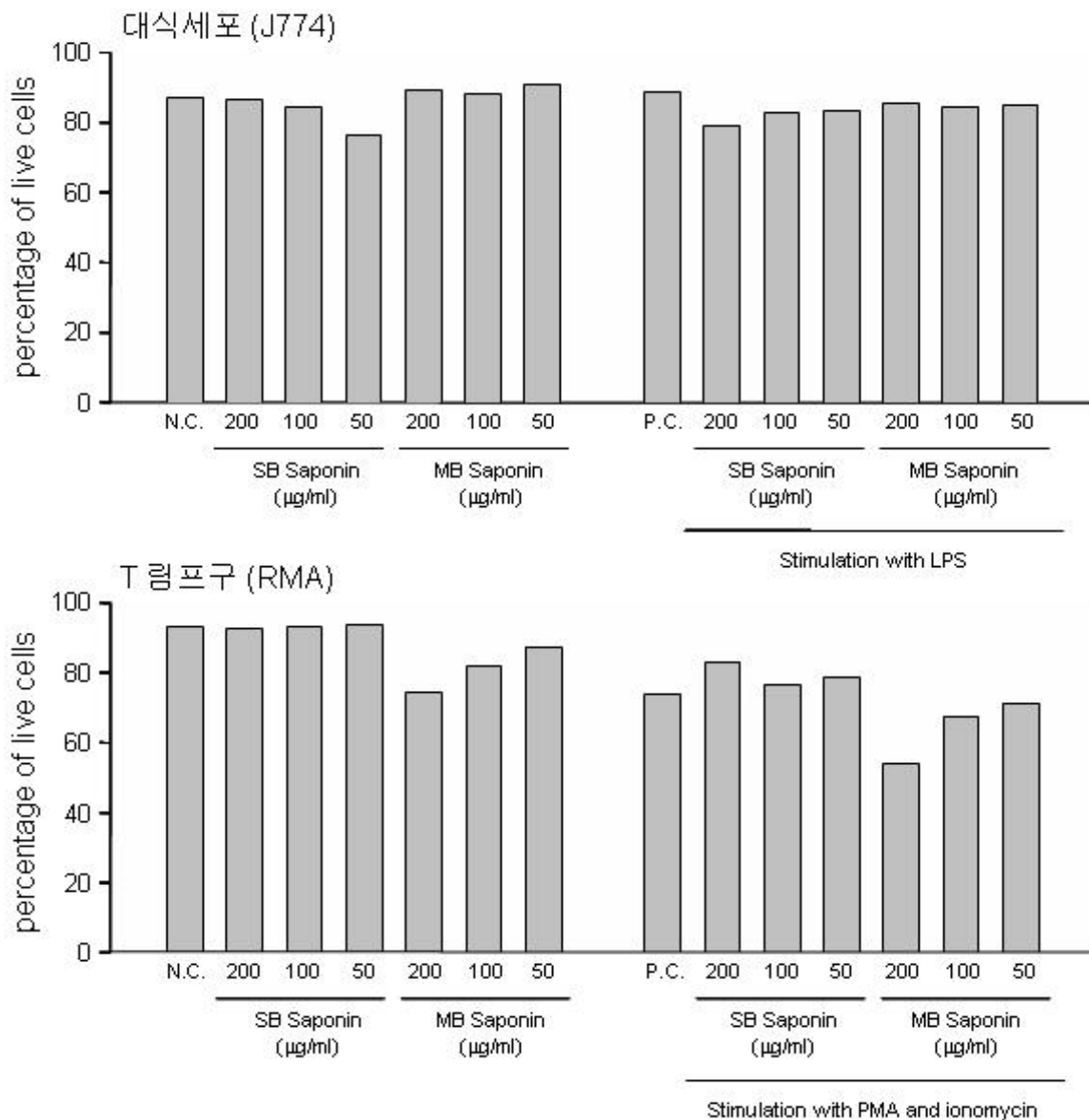


그림 66. 녹두 사포닌과 대두 사포닌이 대식세포와 T 림프구의 cell viability에 미치는 영향 측정. N.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포와 T 림프구를 stimulation 하기 전의 cell viability 측정.

P.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포와 T 림프구를 stimulation 한 후의 cell viability 측정. SB, soy bean (대두), MB, mung bean (녹두).

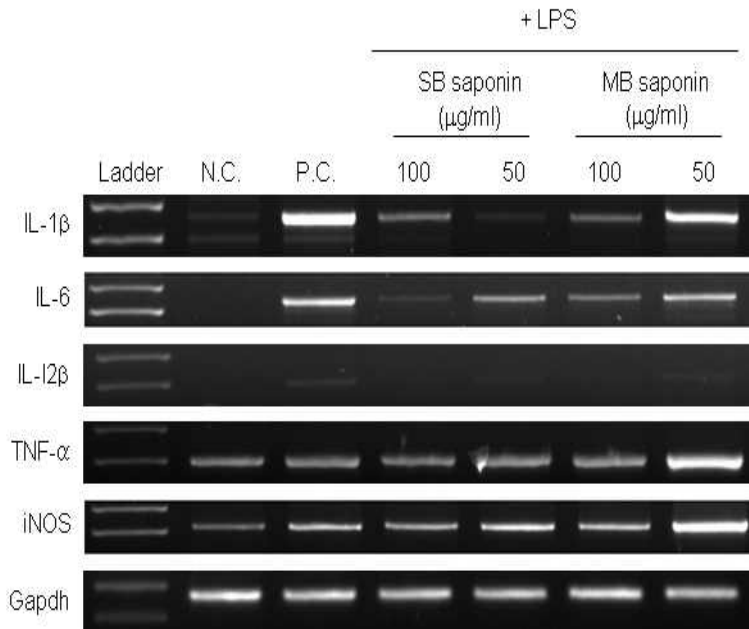


그림 67. RT-PCR을 이용한 녹두 사포닌과 대두 사포닌이 대식세포의 활성화에 미치는 영향 측정. N.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포를 stimulation 하기 전의 mRNA transcript를 RT-PCR로 측정. P.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포를 stimulation 한 후의 mRNA transcript를 RT-PCR로 측정. SB, soy bean (대두), MB, mung bean (녹두).

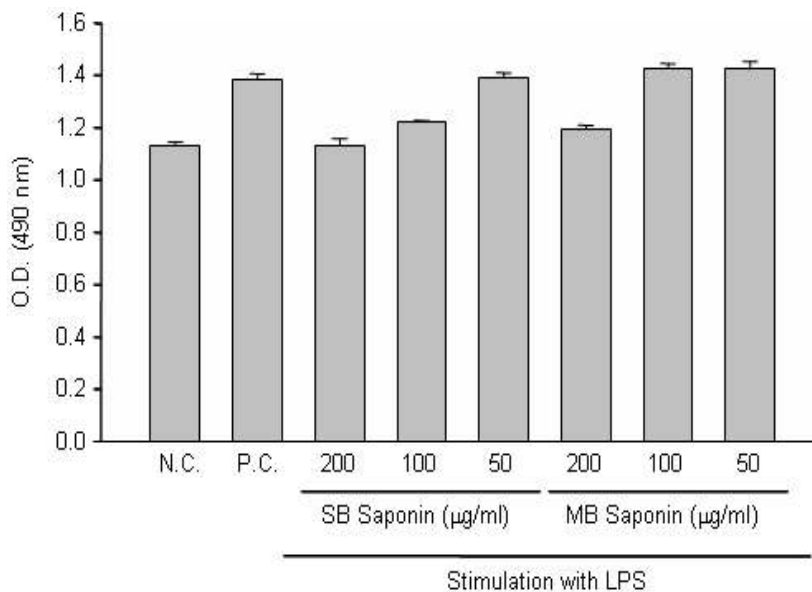


그림 68. 녹두 사포닌과 대두 사포닌이 대식세포의 세포 분열에 미치는 영향 측정. N.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포를 stimulation 하기 전의 세포 분열 측정. P.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포를 stimulation 한 후의 세포 분열 측정. SB, soy bean (대두), MB, mung bean (녹두).

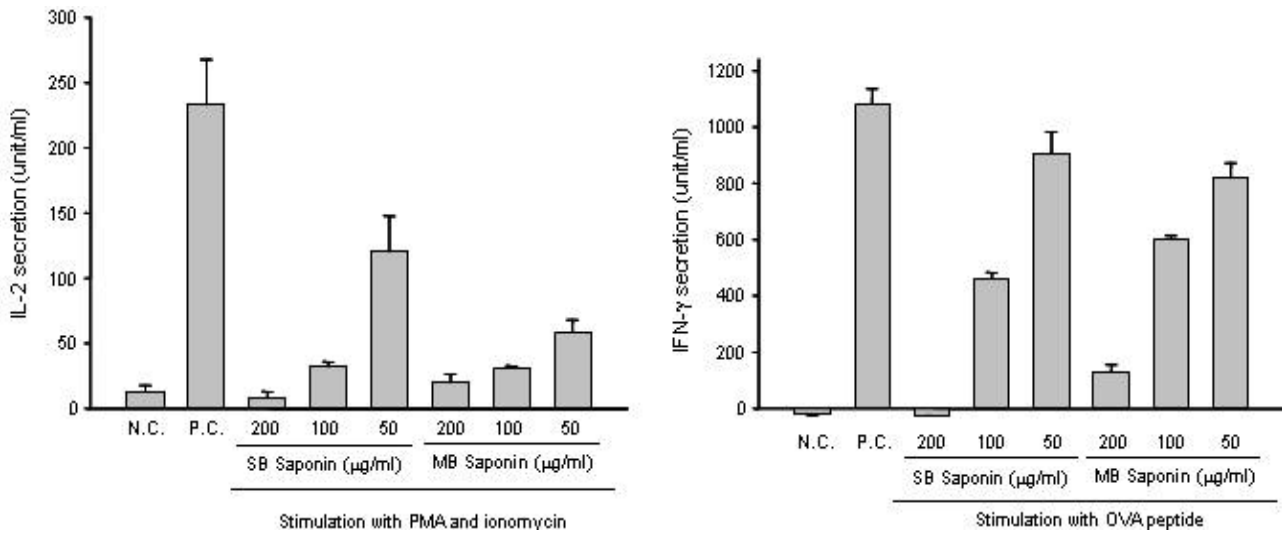


그림 69. 녹두 사포닌과 대두 사포닌이 T 림프구의 cytokine 분비에 미치는 영향 측정. N.C., 사포닌을 처리하지 않고 T 림프구를 stimulation 하기 전의 cytokine 분비를 측정. P.C., 사포닌을 처리하지 않고 대식세포와 T 림프구를 stimulation 한 후의 cytokine 분비를 측정. SB, soy bean (대두), MB, mung bean (녹두).

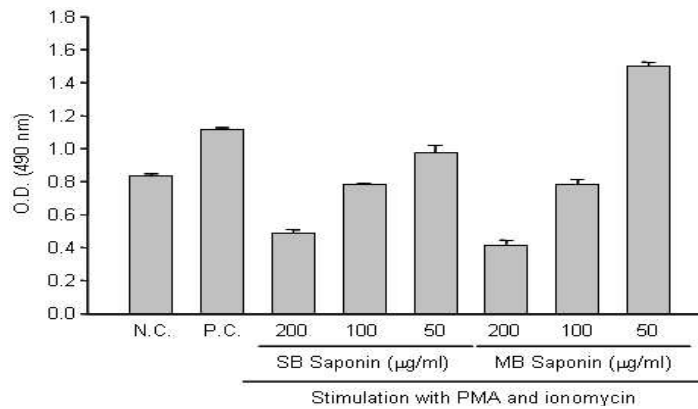


그림 70. 녹두 사포닌과 대두 사포닌이 T 림프구의 세포 분열에 미치는 영향 측정. N.C., 사포닌을 처리하지 않고 T 림프구를 stimulation 하기 전의 세포 분열 측정. P.C., 사포닌을 처리하지 않고 T 림프구를 stimulation 한 후의 세포 분열 측정. SB, soy bean (대두), MB, mung bean (녹두).

## 제 4 항 장염증 동물모델에서의 녹두 추출물, 발효물의 항염증 효과 검증

항염증효과가 있는 것으로 확인된 녹두추출물과 녹두추출물의 발효에 이용한 균주 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주를 이용하여 소동물 모델에서 검증을 하였다. 소동물 모델은 검증하려는 시료를 1~2주간 투여한 뒤 장에 인위적으로 염증유발물질인 DSS (dextran sodium sulfate; 분자량 5000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)를 투여하여 장내 염증을 유발하였다. 그 뒤에 장 질환에 따른 병변이 어떻게 변화하는지를 측정, 평가하였다.

### 1. 동물실험 설계

8주령 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코에서 구입하였다. 생쥐들은 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22℃의 사육실에서 적응기간을 가졌다. 생쥐들은 6개의 실험군으로 나뉘었는데, 첫 번째 실험군은 4% DSS를 물에 섞어서 자유급수 했고, 두 번째 실험군부터 다섯 번째 실험군까지는 4% DSS를 자유급수 하면서 각각 50 mg/kg bw의 농도의 녹두추출물, 100 mg/kg bw의 농도의 sulfasalazine (SIGMA, USA), 50 mg/kg bw의 농도의 녹두추출물과 함께 E4191 균주  $10^9$  CFU/ml을 넣고 발효한 요거트, 산 처리한 요거트를 처리하였다. 여섯 번째 실험군은 PBS만 처리하였다. 이 때 사용되어진 sulfasalazine은 장염증의 치료제로 사용되며(Weber et al., 2000), sulfasalazine 처리군은 양성 대조군으로 사용하였다. 또한 PBS 처리군은 음성 대조군으로 사용하였다. 각 실험군은 각각 6 마리의 생쥐를 사용하였다(N=6).

녹두추출물 등 시료는 DSS 처리 7일 전부터 투여하였고, DSS는 7일간 처리하여 염증유발을 하였다. 따라서 녹두추출물 등 시료는 총 14일 동안 경구투여 하였다. DSS를 7일간 처리 후, DSS 급여를 중단하였으며, 그 후 7일간 장염증의 회복 속도에 대한 관찰기간을 가졌다. 결국 녹두추출물 등 시료 처리 후 3 주후에 실험동물들을 희생시켜 장 질환에 따른 병변을 측정하였다(그림 71).

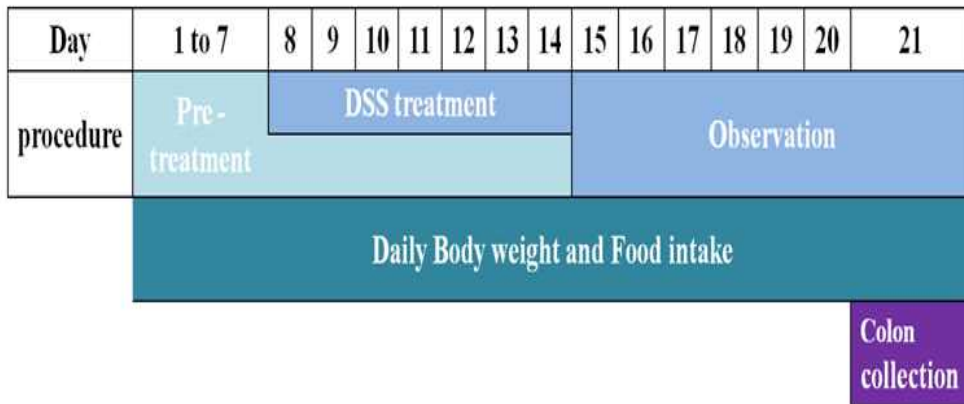


그림 71. 동물실험 설계

표 14는 동물실험에 사용된 각 처리군의 약어이다.

표 14. 장염증 모델에서 각 실험군의 약어.

약어	이름
DSS	DSS 만을 처리한 군
M.B.E	DSS와 녹두추출물 (Mung Bean Extract) 처리군
M.B.E.Y	DSS와 녹두추출물 요거트(Mung Bean Extract Yogurt) 처리군
AY	DSS와 산 처리한 요거트(Acid Yogurt) 처리군
SS	DSS와 sulfasalazine 처리군(양성대조군)
control	PBS 만을 처리한 실험군(음성대조군)

## 2. DSS로 유도된 대장염의 염증 완화 평가

DSS로 유도된 대장염의 임상평가는 체중변화량, 장 무게의 변화, 장 길이의 변화 등으로 수행하였다(Rumi et al., 2004). 각 실험군의 생쥐들은 DSS를 처리한 뒤 14일 후에 희생되었고, 그 후 체중변화량, 장 무게의 변화, 장 길이의 변화를 측정하였다. 그 결과 그림 72, 그림 73, 그림 74에서

보는 것과 같이 녹두추출물을 처리한 군에서는 PBS만을 처리한 군에 비해, 월등히 체중 변화가 증가되며 장 무게와 장 길이도 유지되는 것을 알 수 있었다.

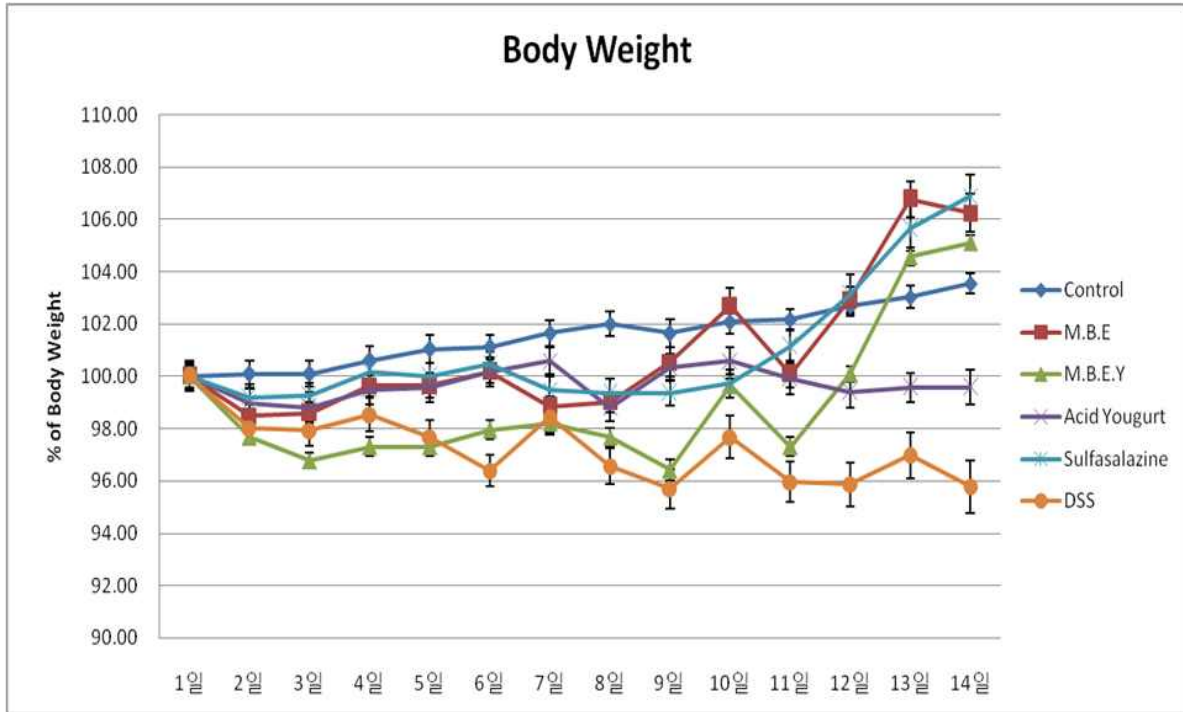


그림 72. 장염증 모델에서 각 실험군의 체중변화량.

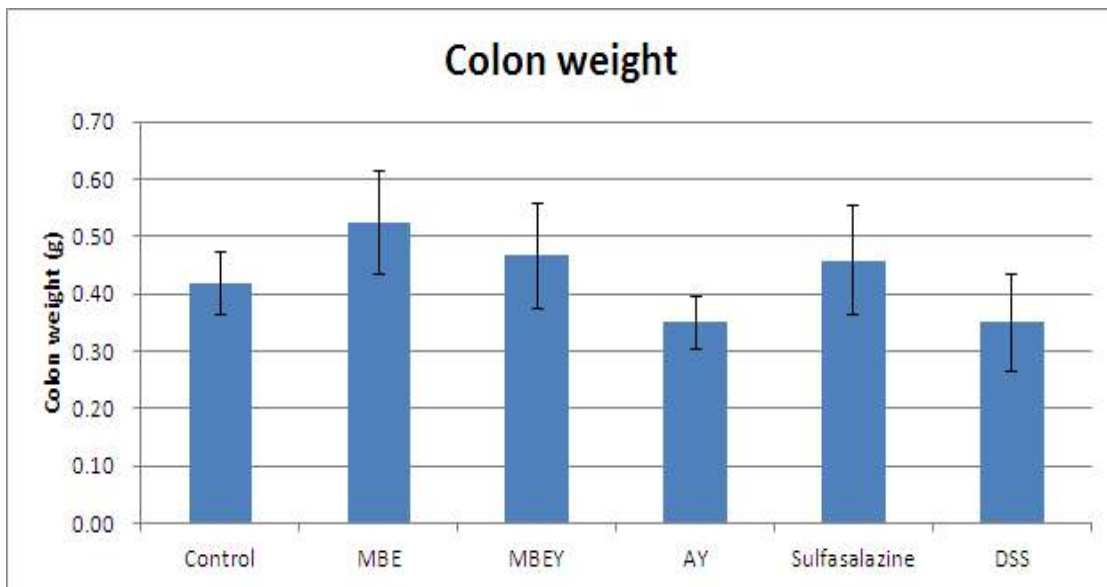


그림 73. 장염증 모델 실험 후 각 실험군의 장 무게.



그림 74. 장염증 모델 실험 후 각 실험군의 장 길이.

### 3. 장염증 모델에서 각 실험군의 조직학적 검사

장염증 모델에서 각 실험군의 조직학적 검사는 각 동물의 대장 말단 부분을 샘플로 해서 수행되었다. 샘플은 10% 포르말린 용액에 고정되었고 에탄올로 탈수를 한 후에 파라핀에 고정하였다. 그 후, 4 micron-thick section을 준비하고 H&E (hematoxylin과 eosin) 염색을 수행하였다(Dieleman et al. 1998). 염색 후 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다. 결국, H&E 염색으로 염증과 crypt 손상 부분을 평가하며, 장 점막 손상 정도는 조직학적 심각도 점수와 crypt 부분의 감소 정도에 따라 평가된다(Howarth et al., 1998). 평가 결과 DSS를 처리한 쥐의 대장 부분은 심한 inflammatory response와 crypt loss를 보여주고 상피세포의 파괴와 염증성 세포의 침입을 보여준다(그림 75와 그림 76). 그러나 녹두추출물과 녹두추출물 요거트 차리군은 정도의 차이는 있지만 조직의 증상을 완화시키는 것을 볼 수 있다(그림 75와 그림 76).

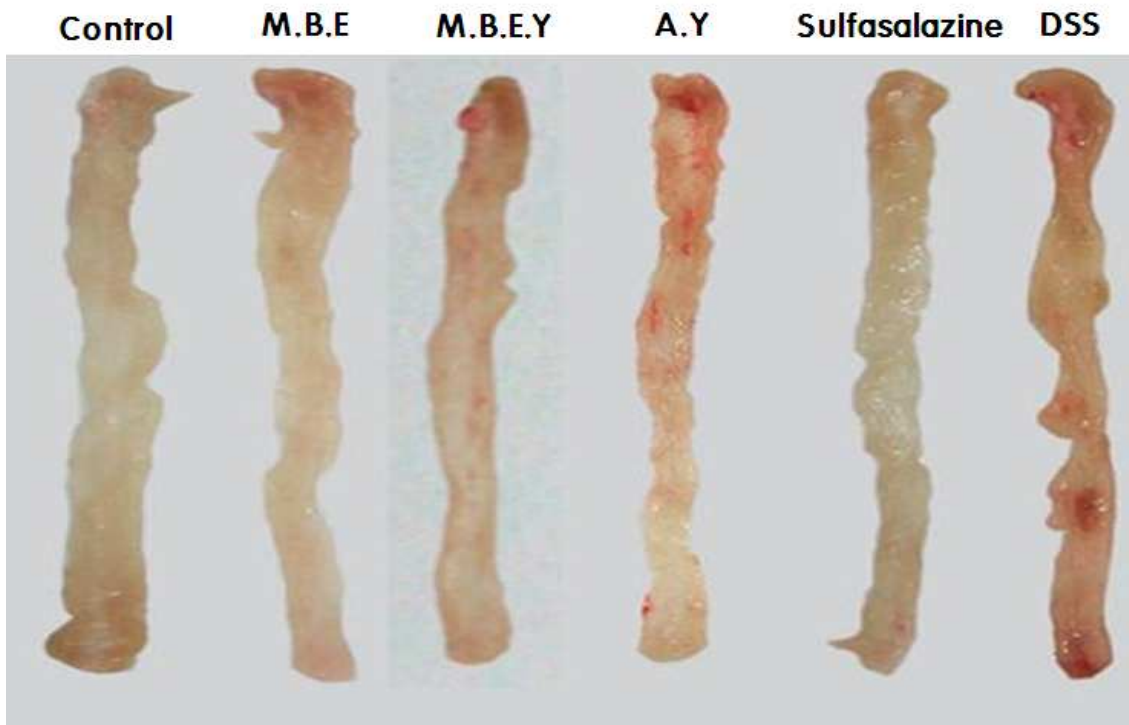


그림 75. 장염증 모델 실험 후 각 실험군의 조직학적 검사

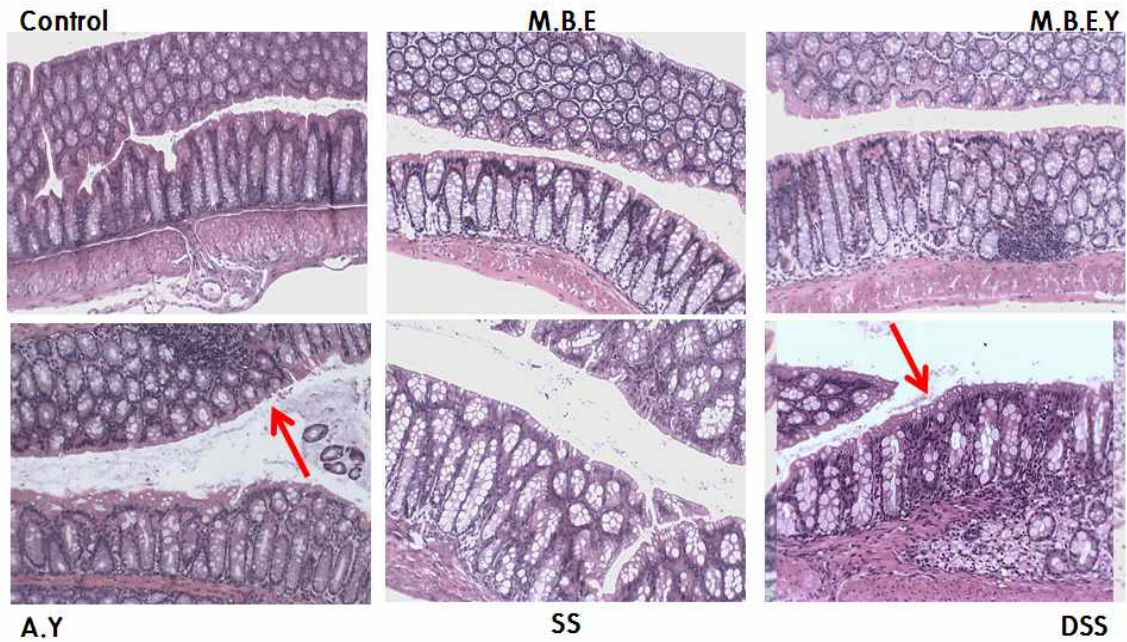


그림 76. 장염증 모델 실험 후 H&E 염색에 의한 각 실험군의 조직학적 검사



#### 4. Mesenteric lymph node의 cytokine mRNA 발현 비교

2차 림프기관 중 장 염증과 관련된 draining lymph node는 mesenteric lymph node (MLN)로 알려져 있으며, MLN은 점막 면역계에 중요한 2차 림프기관이다. 따라서, MLN에 존재하는 면역세포의 주요 cytokine mRNA의 발현 양상에 따라 장 염증 정도를 측정할 수 있다(Mantovani et al., 1992). 장염증 모델 실험 후 각 실험군에서 total RNA를 MLN에서 추출하였다. Total RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시되었다. 그 후 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다. RT-PCR 조건은 95°C에서 5분동안 pre-denaturation 한 후, 35 cycle의 amplification cycle (95°C, 30sec → 60°C, 30sec → 72°C, 30sec)을 진행 하였다. 마지막 extension은 72°C에서 10분간 진행 하였다. GAPDH는 internal control로써 사용했다. 이 때 사용되어진 primer의 sequence, GenBank access number, RT-PCR product size는 표 15에 명시하였다.

표 15. 장 염증 모델에서 mesenteric lymph node (MLN) 내 면역세포의 활성 측정 방법에 사용된 RT-PCR primer set.

<i>Gene name</i>	<i>GenBank Accession No.</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Size (bp)</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	NM_008361.3	Forward	CCAGGATGAGGACATGAGCACC	358
		Reverse	ATCCACACTCTCCAGCTGCAGG	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_013693.2	Forward	GACGTGGAAGACTGGCAGAAGAGG	502
		Reverse	TGACGGCAGAGAGGAGGTTGAC	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	NM_008337.2	Forward	CTGAGACAATGAACGCTACACAC TGC	433
		Reverse	AACAGCTGGTGGACCACTCGGAT	
<b>GAPDH</b>	NM_0020463	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC	271
		Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	

실험 결과 그림 77과 같이 DSS 만을 처리한 군(DSS)에서는 PBS 만을 처리한 실험군(control)보다 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 의 발현양이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 DSS와 sulfasalazine 처리군(SS)은 이 세 가지 cytokine 모두가 저해되는 것을 볼 수 있다. 또한

DSS와 녹두추출물 (Mung Bean Extract) 처리군(M.B.E)과 DSS와 녹두추출물 요거트(Mung Bean Extract Yogurt) 처리군(M.B.Y)에서도 이 세 가지 cytokine이 감소되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 볼 때, 녹두추출물과 녹두추출물 요거트가 DSS로 유발되는 염증의 시작을 억제한다는 결론을 얻을 수 있었다.

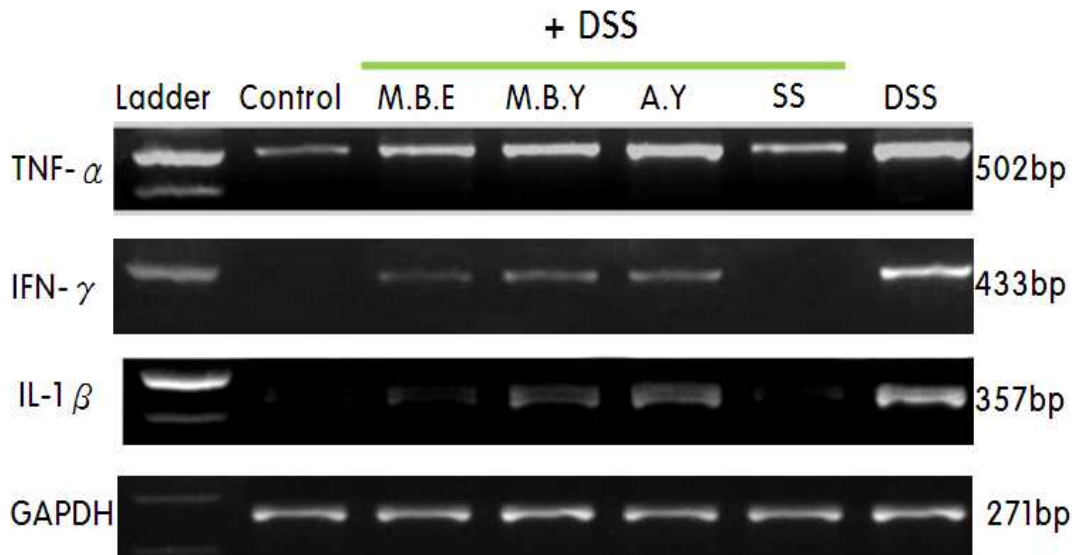


그림 77. 장 염증 모델에서 mesenteric lymph node (MLN) 내 면역세포의 활성 측정 결과 (RT-PCR 결과). Control, PBS 만을 처리한 실험군; M.B.E, DSS와 녹두추출물(Mung Bean Extract)을 처리한 실험군; M.B.Y., DSS와 녹두추출물 요거트(Mung Bean Extract Yogurt)를 처리한 실험군; A.Y., DSS와 산 처리한 요거트(Acid Yogurt)를 처리한 실험군; SS, DSS와 sulfasalazine을 처리한 실험군; DSS, DSS만 처리한 실험군.

## 제 4 절 선발된 균주와 녹두추출물을 이용한 복합발효기술 확립

### 제 1 항 녹두추출물 함유 유제품의 제조

대식세포와 T 림프구의 활성을 억제하고 장 염증 동물 모델 실험 결과 항염증 효과가 입증된 녹두추출물과, 녹두추출물 발효를 위해  $\beta$ -glucosidase 생산 능력이 우수한 균주인 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 유산균주 활용하여 요거트를 제조하였다. 이 때 장 염증 동물 모델에서 항염증 활성이 있다고 확인된 녹두의 농도인 50 mg/kg을 기준으로 0.3%의 녹두추출물 요거트를 제조하였다. 녹두추출물의 농도에 따른 발효특성 차이 확인을 위해 제조된 요거트 성분 조성은 표 16과 같다.

표 16. 녹두추출물 요거트 제조 성분.

시 료	성 분
0% 시료(Control)	우유 98.0 % + 포도당 2%
0.1% 녹두요거트	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.1%
0.2% 녹두요거트	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.2 %
0.3% 녹두요거트	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3 %

믹스액은 Stirrer (NZ1200 stirrer, EYELA)를 이용하여 내용물을 잘 혼합한 후 90 °C에서 15분간 살균을 실시하였다. 40 °C까지 냉각한 후 유산균을 접종하였다. 이 유산균 배양액을 40 °C 배양조에 배양하였으며, 배양 완료 후 커드를 분쇄한 후 냉각 저장을 하였다.

### 제 2 항 제조 성분에 따른 발효특성 차이 확인

제조된 유제품의 발효특성 차이를 확인하기 위하여 발효 간 pH, 적정산도, 생균수를 측정하였다. 시료는 제 1항에서 제조한 녹두추출물 요거트로 하였으며, 그 농도는 기존 요거트(녹두추출물 무첨가)와 비교하기 위하여 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 녹두추출물 요거트로 하였다. 우유 믹스액에 스타터 유산균(ABT-5) 및 E4191 균을 첨가하여 발효를 진행하는 동안 0, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h 까지 발효가 완료되는 동안의 생균수 및 pH, 적정산도를 측정하였다. 생균수는 시료를 잘 섞

은 뒤 1 ml 을 멸균희석액을 이용, 십진 희석법으로 희석하여 MRS 평판배지에 도말하였다. 도말한 배지는 37 ℃에서 48시간 동안 배양 후 생균수를 측정하였다. pH는 정해진 시간마다 pH meter (Thermo Orion pH meter model 420)를 사용하여 상온에서 측정하였다. 적정산도는 검사시료 9 g에 탄산가스를 함유하지 않은 증류수를 동일 양(9g)을 가하고 pH가 8.3이 될 때까지 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 적정하였으며, 적정산도의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{적정산도 (젖산 \%)} = \frac{a * f * 0.009}{10 \text{ ml} * d} * 100$$

a : 0.1 N 수산화나트륨 소비량(ml)

f : 0.1 N 수산화나트륨의 역가

0.009 g 젖산 : 0,1 N 수산화나트륨 용액 1 ml

실험 결과, 서로 다른 비율의 녹두 추출물이 함유된 요거트들의 생균수는 발효 6시간 후부터 균수가 큰 차이 없이 유지되었으며, 녹두추출물을 첨가 한 것과 첨가 하지 않은 것에 대한 차이도 존재하지 않았다(그림 78). 이와 마찬가지로 pH 및 적정산도에서도 유의적인 차이를 찾을 수 없었다(그림 78). 이 결과에 따르면 녹두추출물과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191은 유제품 제조 시, 발효 자체에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.



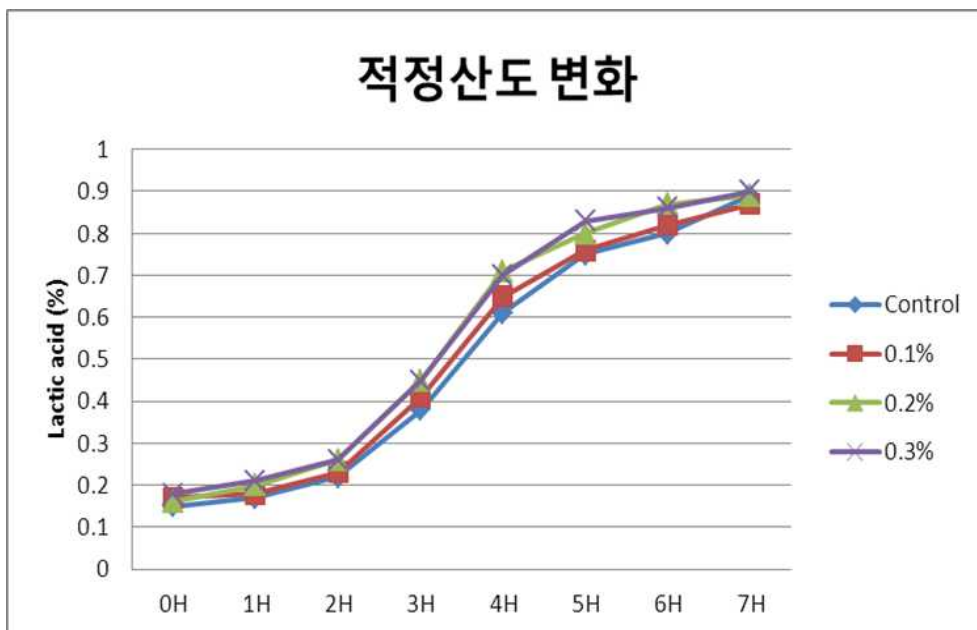
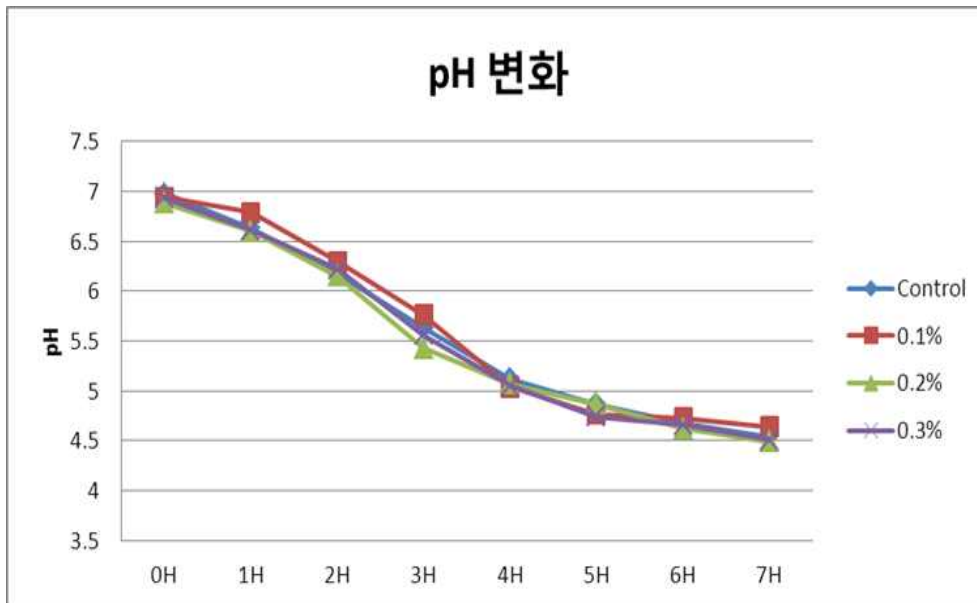


그림 78. 서로 다른 농도의 녹두 추출물을 함유한 녹두추출물 요거트 발효 제품간 생리활성 변화. Control은 녹두추출물을 첨가하지 않은 요거트를 나타낸다.

### 제 3 항 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 관능적 특성

#### 1. 마스킹 향미 성분 탐색

믹스액은 Stirrer (NZ1200 stirrer, EYELA) 를 이용하여 내용물을 잘 혼합한 후 90 °C에서 15분 간 살균을 실시하였다. 40 °C까지 냉각한 후 유산균을 접종하였다. 이 유산균 배양액을 40 °C 배양

조에 배양하였으며, 배양 완료 후 커드를 분쇄한 후 냉장 저장한 후 사용하였다. 여섯 가지 시료는 3 단위의 임의의 숫자를 부여하여 표시 하였으며 향미에 대한 선호도와 요구르트의 맛과 어울림을 순위로 표시하였다(표 17과 그림 79).

표 17. 녹두추출물 요구르트 제조 성분(향미 첨가).

시 료	성 분
Control	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3%
메론*	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3% + 메론향 0.05%
고구마*	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3% + 고구마향 0.05%
복숭아*	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3% + 복숭아향 0.05%
땅콩*	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3% + 땅콩향 0.05%
피스타치오*	우유 98.0 % + 포도당 2% + 녹두추출물 0.3% + 피스타치오향 0.05%

\* 메론 (서울 향료 Melon Flavor SK-75199)

고구마 (MSC SWEET POTATO FLA. MF-071030)

복숭아 (삼정 향료 PEACH FLAVOUR(NATURAL) 74.342)

땅콩 (서울 향료 Peanut Flavor SK-86757)

피스타치오 (우리피엔에프 Pistachio Flavor WR-12232)

### <기능성 요구르트>

A. 선호도(선호하는 순서대로 1부터 6까지 숫자로 기입해주세요)

시료 번호	순위

B. 요구르트와 어울리는 정도(어울린다고 생각하는 3가지 시료를 선택해주세요)

시료 번호	순위

그림 79. 기능성 요구르트 향미 선별 평가지.

제시된 시료는 평가 직전까지 냉장상태를 유지하였으며 한 가지 시료의 평가가 끝날 때마다 물로 입을 헹구고 다음 시료를 평가하도록 하였다. 패널은 고려대학교의 대학원생 12명(23-30세, 남 4, 여 8)을 대상으로 하였다. 그 결과 표 18에 나타난 바와 같이 메론과 복숭아향에서 높은 기호도를 보였으며, 고구마와 피스타치오 향을 첨가한 경우에는 녹두추출물만 넣은 시료보다 기호도가 낮은 것으로 나타났다. 이는 기존 요구르트에 대해 기대되는 맛이나 향이 없고 대신 첨가한 향 성분이 강하게 느껴지기 때문인 것으로 생각된다.

표 18. 마스킹 향미 성분의 기호도 순위.

시료 종류	순위	어울림(투표수)
Control	3	8
메론	1	12
고구마	5	2
복숭아	2	11
땅콩	4	2
피스타치오	6	1

## 2. 선별된 향미 성분과 당 함량에 따른 기호도 조사

시판되는 요구르트의 당 함량은 제품에 따라 다르지만 최소 약 2% ~ 최대 9%까지 다양하다. 따라서 당의 함량이 제조된 요구르트의 맛에 영향을 미칠 것이라고 판단되어 선별된 향미성분과 플레인 요구르트를 함께 당의 함량을 바꾸어 관능검사를 실시하였다. 우선 플레인요구르트, 녹두추출물 함유 플레인요구르트, 녹두추출물 함유 메론맛 요구르트, 녹두추출물 함유 복숭아맛 요구르트의 4종을 제조하였고, 이 4종에 대한 평가를 실시하였다. 네 가지 시료는 3 단위의 임의의 숫자를 부여하여 표시하였으며 관능검사를 위한 ballot은 **그림 80**에 제시하였다.

기호도의 경우 척도의 양끝을 매우 싫다(1)에서 매우 좋다(9)로 표시하였으며 강도 측정의 경우 매우 약함(1)에서 매우 강함(9)으로 지정하였다(**그림 80**). 제시된 시료는 평가 직전까지 냉장상태를 유지하였으며 한 가지 시료의 평가가 끝날 때마다 물로 입을 헹구고 다음 시료를 평가하도록 하였다. 패널은 고려대학교의 대학원생 12명(23-30세, 남 4, 여 8)을 대상으로 하였다.



**< 기능성 요구르트 >**

시료 번호 : \_\_\_\_\_

**A. 기호도**

전반적기호도 (외관, 맛, 냄새 기타)

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다				좋지도 싫지도 않다				매우 좋다

외관기호도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다				좋지도 싫지도 않다				매우 좋다

맛/향 기호도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다				좋지도 싫지도 않다				매우 좋다

조직감기호도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 싫다				좋지도 싫지도 않다				매우 좋다

**B. 강도**

단맛

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

신맛

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

떫은맛

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

끈적임정도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

단단한정도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

입안촉감 (거친정도)

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
매우 약하다								매우 강하다

그림 80. 기능성 요구르트 관능검사지.

그 결과 그림 81에 나타낸 바와 같이 전반적 기호도, 맛/향 기호도, 단맛과 신맛 모두 당 함량 변화에 따라 순차적으로 변화하는 것을 알 수 있었다. 당의 함량이 증가 할수록 단맛을 느끼는 정도와 전반적 기호도, 맛/향 기호도가 증가하고 신맛을 느끼는 정도는 감소하며 메론, 복숭아, 플레인 요구르트의 경우 녹두추출물만 첨가한 요구르트보다 당 함량별로 높은 점수를 얻었다.

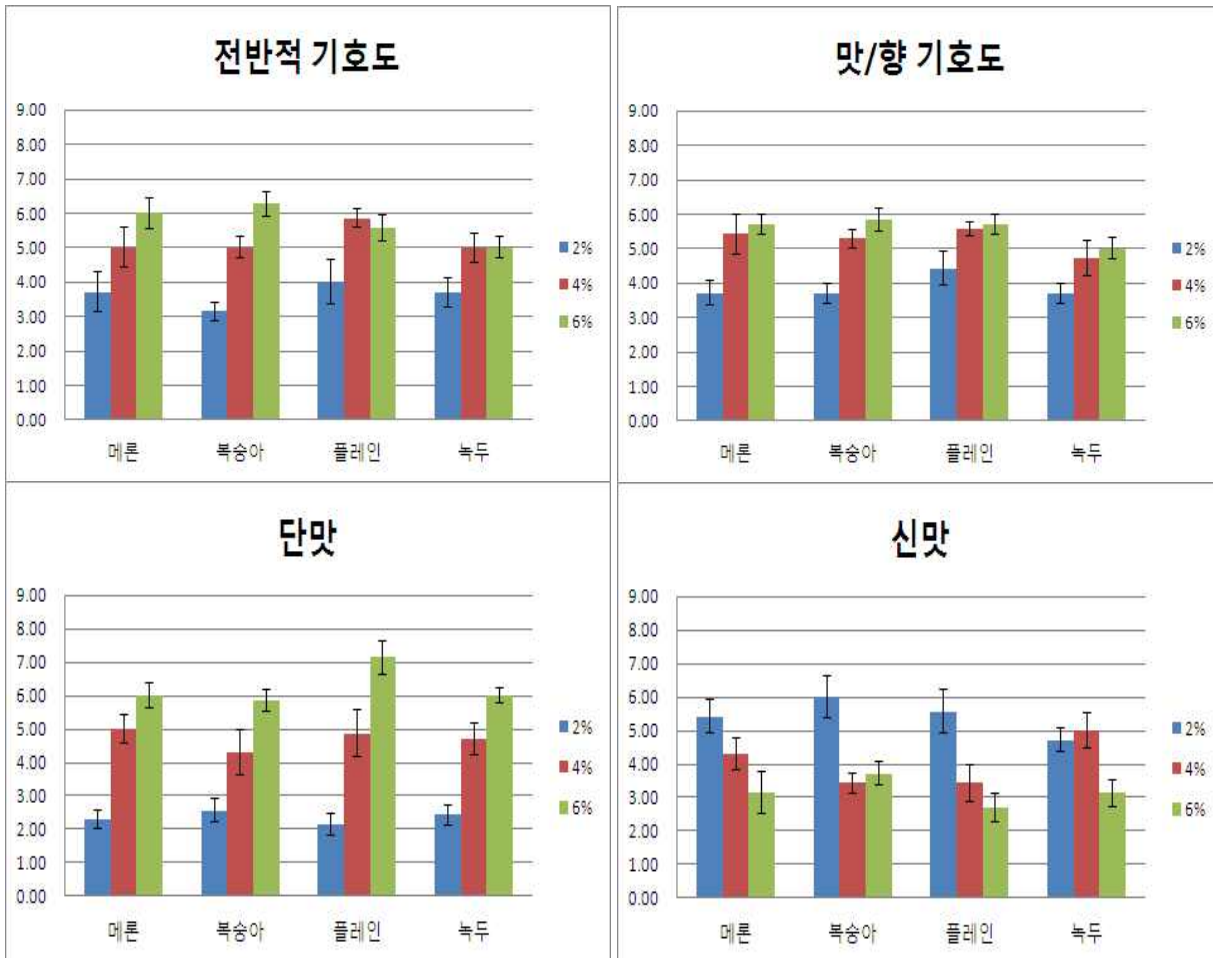


그림 81. 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 전반적 기호도, 맛/향 기호도, 단맛, 신맛 평가.

당 함량의 차이에 따른 전체적인 차이는 크지만 같은 당 농도에서의 메론과 복숭아, 플레인 요구르트의 유의적인 차이는 확인되지 않은 반면 녹두추출물을 첨가한 경우에는 소폭 기호도의 감소가 있었다. 이 결과와 녹두의 색깔을 바탕으로 마스킹을 위한 향미는 메론으로 선정하였다. 당의 함량은 위의 관능검사에서의 가장 높은 점수를 기록한 6%로 정하였으며, 더 많은 패널을 대상으로 관능검사를 진행하였다.

### 3. 메론향으로 마스킹 된 녹두추출물 함유 요구르트의 관능적 특성

관능검사용 요구르트는 녹두주정추출물을 전체 중량의 0.3%가 되도록 요구르트 믹스에 첨가하여 전술한 방법에 따라 제조하였다. 시료는 플레인요구르트, 녹두추출물 함유 플레인 요구르트와 관능적 특성을 개선하기 위하여 메론향(서울 향료 Melon Flavor SK-75199)을 0.05% 되도록 첨가한 메론맛 요구르트, 녹두추출물 함유 메론맛 요구르트의 4종을 제조하였으며 평가를 실시하였다.

네 가지 시료는 3 단위의 임의의 숫자를 부여하여 표시하였으며 관능검사를 위한 ballot은 **그림 80**에 제시하였다. 기호도의 경우 척도의 양끝을 매우 싫다(1)에서 매우 좋다(9)로 표시하였으며 강도 측정의 경우 매우 약함(1)에서 매우 강함(9)으로 지정하였다.

제시된 시료는 평가 직전까지 냉장상태를 유지하였으며 한 가지 시료의 평가가 끝날 때마다 물로 입을 헹구고 다음 시료를 평가하도록 하였다. 패널은 국민대학교의 학부 및 대학원생 51명(18-30세, 남 8, 여 43)을 대상으로 하였다.

관능 평가 결과 **그림 82**와 **그림 83**에 나타낸 바와 같이 플레인과 메론 요구르트 간에는 기호도의 유의적인 차이가 확인되지 않은 반면 녹두 추출물을 첨가한 경우에는 기호도가 감소하는 것으로 나타났다. 이는 주로 여성으로 구성된 관능검사 패널의 경우 녹두에서 유래한 풀냄새를 민감하게 감지하기 때문인 것으로 생각된다.

**그림 84**와 **그림 85**와 같이 남자 패널의 경우 시료 중 외관의 차이만을 인지하는 것으로 나타났으며 이는 녹두 추출물을 첨가 시 요구르트가 녹색을 띠게 되어 외관 특성에 영향을 미치는 것으로 보인다. 한편, 남자 패널들은 전반적 기호도, 맛, 조직감 기호도에서 시료 간의 차이를 구별하지 못하였으며 맛의 강도 평가에서도 시료간의 차이가 확인되지 않았다. 남자 패널의 수가 여자 패널의 수에 비하여 적었기 때문에 결론을 도출하기는 어려우나 남자 소비자의 경우 기호도 특성이 여자와 다를 수 있을 가능성도 배제할 수 없다.

녹두추출물의 첨가 시 나타나는 기호도 감소 문제를 해결하기 위하여 기능성 요구르트의 생산 시에는 메론 향의 농도를 증가시키는 방법을 고려하고 있으며 남녀 성비를 고려하여 보다 다양한 연령층에서 기호도 평가 결과를 종합하여 제품의 출시에 활용하고자 한다.

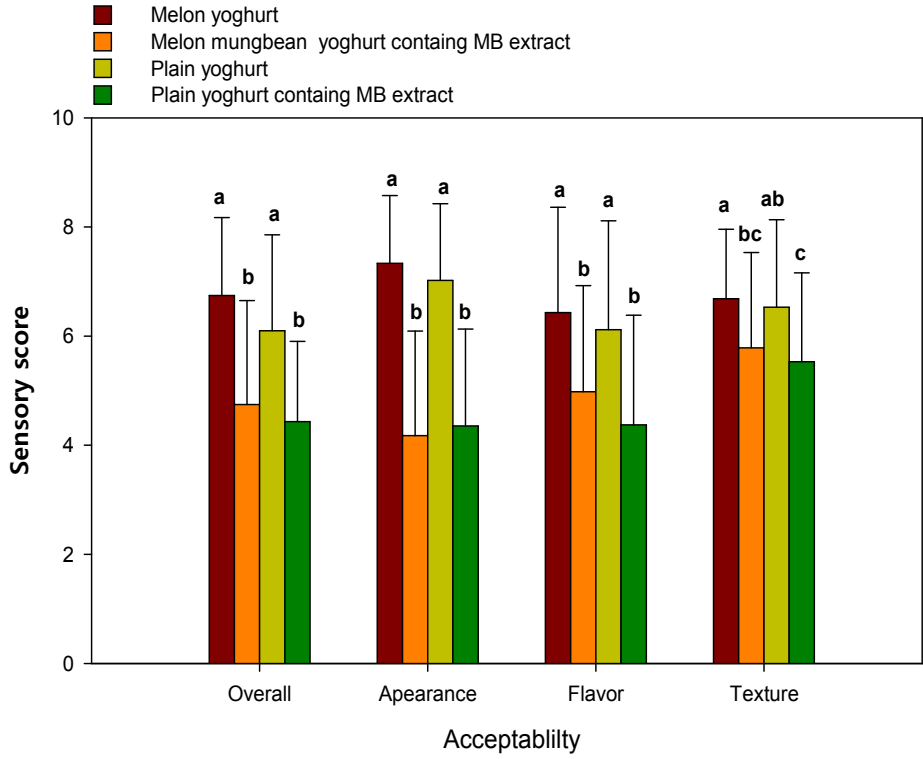


그림 82. 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 기호도

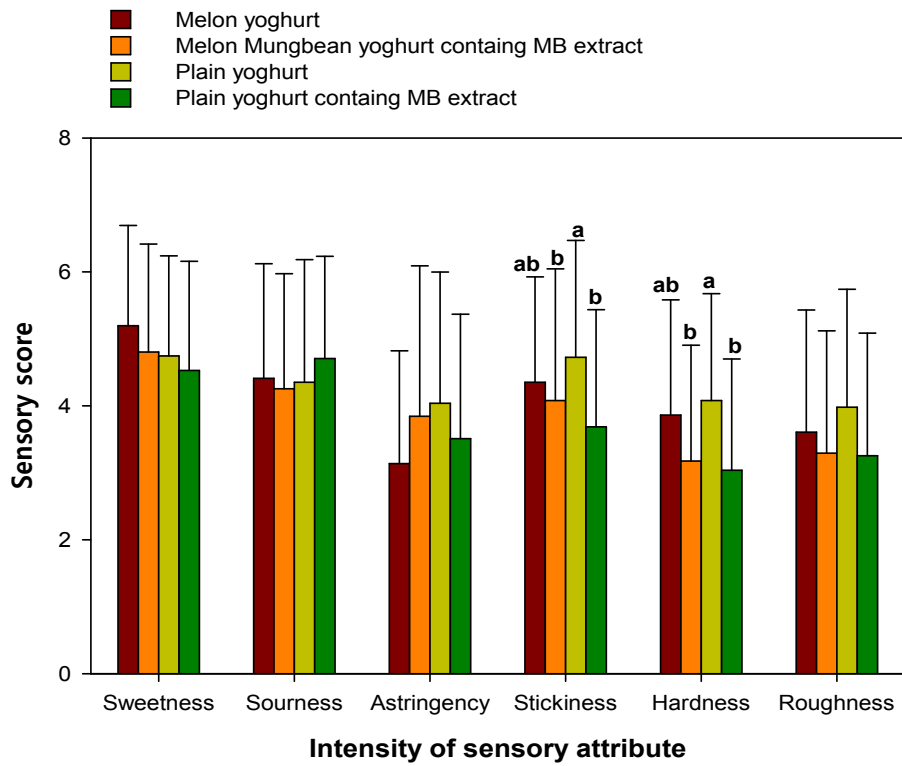


그림 83. 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 강도 특성

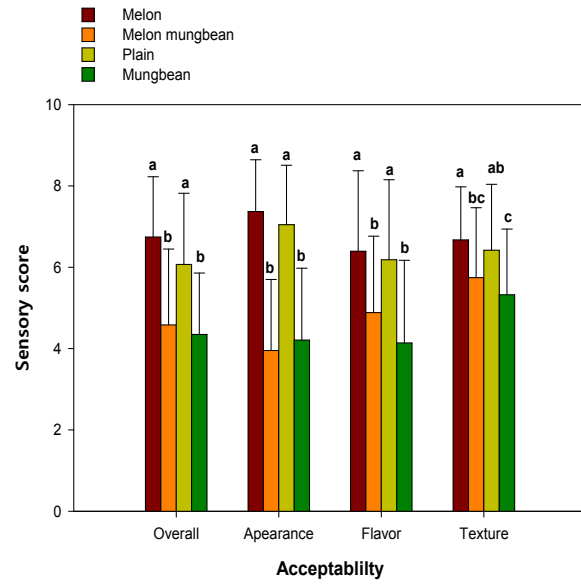
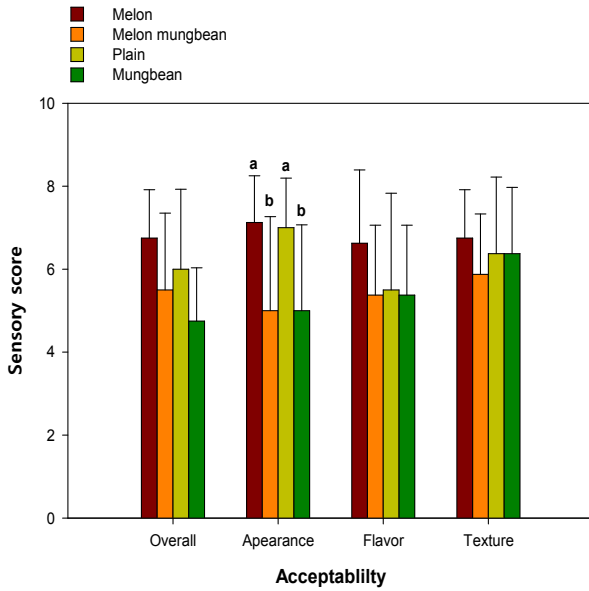


그림 84. 남성(좌)과 여성(우)의 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 기호도 평가

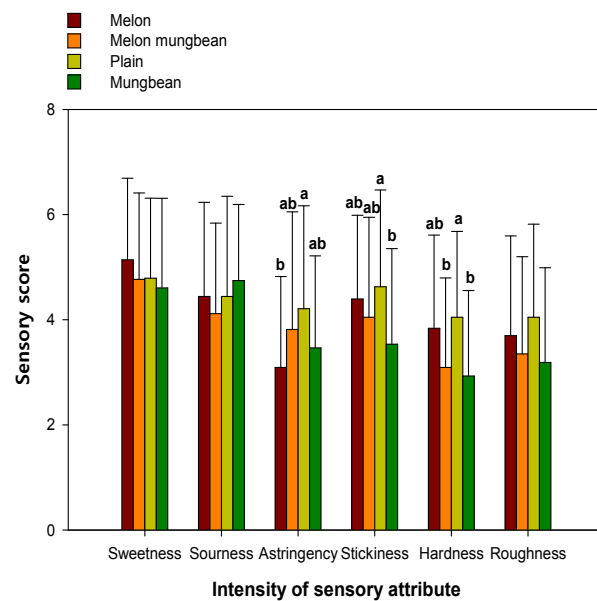
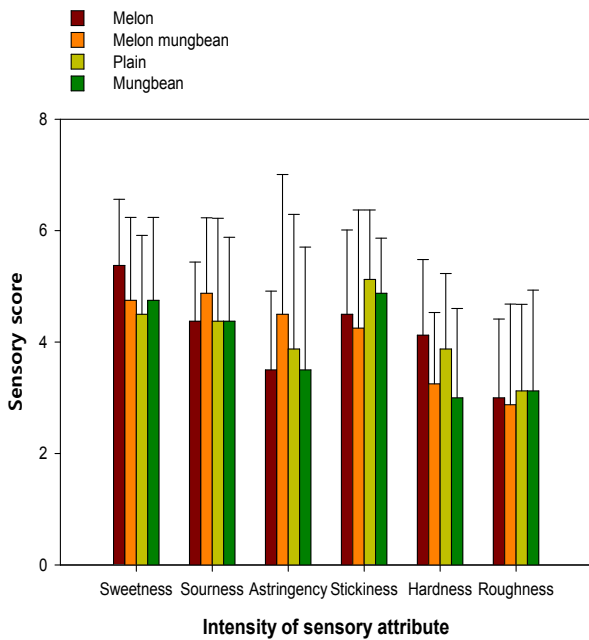


그림 85. 남성(좌)과 여성(우)의 녹두추출물 함유 기능성 요구르트의 강도 특성 평가

## 제 4 장 목표달성 및 기여도

### 제 1 절 녹두의 신규 항염증 성분과 활성형 녹두 사포닌의 분리 정제

다양한 식물에 존재하는 사포닌은 그 조성이 서로 다르며 상이한 food matrix안에 존재하기 때문에 모든 식품으로부터 사포닌 함량을 측정하는데 적용할 수 있는 유일한 방법은 존재할 수 없다. 일차적으로, 대두의 조사포닌 추출법으로 사용되는 방법에 준하여 탈지 녹두는 80% 메탄올 (MeOH)로 추출하고 부탄올과 증류수로 분획하여 부탄올 층을 회수하였다. 이후, Thin Layer Chromatography (TLC), HP-20 Chromatography, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 녹두 사포닌 및 녹두 사포닌의 분해에 따른 정량적인 분석 조건을 확립하였다. 또한 대두사포닌과 비교하여,  $\beta$ -glucosidase 및 산의 첨가에 의한 가수분해 후 항산화 활성의 변화를 측정하였다. 라디칼 소거 활성 측정 결과, 대두와 녹두 사포닌은 동일한 농도에서 차이를 나타내지 않았으나, 동일한 가수분해 조건에서 대두 사포닌과 비교하여 유의적으로 높은 항산화 활성이 관찰되었다. 이를 통해 발아 녹두 및 녹두를 이용한 다양한 기능성 식품의 개발에 이용될 수 있으며, 녹두가공 부산물로부터 고부가가치 기능성 소재 생산 가능성을 탐색하는데 활용될 수 있다.

### 제 2 절 녹두 추출물 또는 발효물을 함유한 염증완화 기능성 유제품의 개발

프로바이오틱 균주는 적당한 양을 섭취하였을 때 건강에 도움이 되는 살아있는 균(live organism)으로 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제라 할 수 있다. 프로바이오틱 균주는 숙주동물의 소화기관의 위산과 담즙산에 의해 영향을 받는다. 선발된 유산균주 *Lactobacillus salivarius* E4191은 내산성 실험결과 약 95% 이상의 생존율을 보였다. 또한 담즙에 대한 내성 측정 실험 결과 112%의 높은 생존율을 보였다. 추가적으로 용혈 검사, 젤라틴 액화 반응 검사, 유해 대사산물 (암모니아) 생성 확인 실험 결과 숙주에 대한 안전성이 우수하였다. 동결에 대한 활력의 변화를 조사한 결과, 동결 저항성이 우수하였으며, HPLC를 통한 유산균주 및 유산균 crude enzyme에 의한 대두 사포닌 분해 능력을 측정하였다. 그 결과, E4191은 soyaaponin Bb의 우수한 분해능력 (100%)을 관찰할 수 있었다.

또한, 항염증용 기능성 음료 개발을 위해 녹두를 이용하여 복합 발효물 제작 발효 조건을 설립하였으며, 녹두의 항염증성분을 함유한 주정추출물을 small-scale의 다양한 배합비의 구성을 통하여 확립하였다. 이 때, flavor, 기타 구성 요소 등을 변수로 하여 최적의 요구르트 제조 배합비 조성 확립 및 일반성분인 지방, 단백질 함량을 측정하였다.

결국 본 연구를 통해 복합 발효물 생산 및 유통 상의 안전성 확보를 위한 발효 조건을 확립하였으며, 프로바이오틱 균주의 면역조절 기능성 식품소재의 개발 및 녹두추출물을 이용한 복합 발효를 이용하여 발효유제품 시장에 다양화, 선진화를 제공할 수 있었다.

### 제 3 절 녹두 추출물과 발효물의 항염증 활성 및 기전 분석

자가 면역 질환의 하나로 알려진 염증성 장 질환은 소화관을 침범하는 원인 이상의 만성 염증성 질환이다. 본 질환을 치료하기 위한 방법으로서 약물치료가 행해지고 있는데, 이러한 약물치료는 두통, 간질환, 부신피질, 부전증 및 통증 유발 등의 문제를 가지고 있다. 따라서 이러한 부작용과 높은 비용을 대체하는 항염증 소재의 도입이 요구되는 실정이다.

본 연구에서는 프로바이오틱 균주와 녹두추출물을 이용한 면역조절을 통한 장 염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용 기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 추출 분리한 녹두 사포닌의 항염증 활성을 이미 알려진 대두 사포닌의 항염증 활성과의 비교를 위해 대식세포 (J774 cell)과 T 림프구 (RMA cell)을 대상으로 세포 수준에서의 면역 조절 효능을 검증하였으며, 또한 동물 모델을 통해 숙주의 면역세포 및 염증성 cytokine의 분비를 살펴보았다. 이를 통해 녹두 사포닌의 유효항염증 성분의 표준화 설정 및 *Lactobacillus salivarius* E4191 균주를 선별하였으며, 선별된 녹두추출물과 프로바이오틱 균주를 이용한 녹두 발효물이 염증성 cytokine의 발현을 억제하여 염증을 완화하는 것으로 밝혀졌다.

결국 본 연구를 통해 녹두에 존재하는 항염증 성분을 규명하였고, 녹두 사포닌 조성, 발아, 발효 과정 중에 일어나는 변화를 이해하였다. 또한 세포 및 동물실험을 통하여 녹두추출물의 실제적인 효과를 확인함으로써, 녹두추출물을 기능성 항염증식품 소재로써 과학적이고 객관적인 자료를 제시하였다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

### 제 1 절 추가 연구의 필요성

본 연구에서는 녹두추출물과 프로바이오틱 균주를 이용한 녹두 발효물의 면역조절을 통한 장 염증 완화 물질을 탐색하고, 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 추출 분리한 녹두 사포닌의 항염증 활성을 이미 알려진 대두 사포닌의 항염증 활성과 비교한 결과, 녹두 사포닌의 항염증 활성은 대두 사포닌의 항염증 활성과 유사하여 대식세포의 cytokine 분비와 세포 분열에는 영향을 미치지 않지만, T 림프구의 세포분열에 영향을 주어 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 분비능 억제에 효과가 있었다.

선별된 프로바이오틱 균주와 녹두추출물에 대한 항염증 작용 및 녹두 사포닌의 항염증 활성에 대한 연구는 많은 부분 수행되었지만, 균주와 추출물의 배합비에 따른 관능검사 외에 발효 후 발효물에 대한 관능검사가 추가적으로 이루어져야 하며, 녹두 발효물의 관능 품질 향상을 통해 기호적인 선호도의 변화도에 대한 연구가 이루어져야 한다.

많은 기능성을 내재하고 있는 녹두추출물 및 녹두발효물의 식품 소재로서의 연구를 통하여, 소비자의 기호도에 영향을 줄 수 있는 녹두추출물 특유의 향과 맛의 제거 및 완화를 통해 식품 소재 시장의 다양화, 선진화, 시장성에 대해 긍정적인 평가를 줄 것이다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

염증성 장 질환은 만성적인 경과를 밟으며 반복발작하기 쉬우므로 식이요법, 운동요법, 약물치료를 병행하여야 한다. 여기에 이용되는 약물은 대부분 한약재로서 환자의 체질, 병소의 부위 및 병소의 선후를 결합하여 치료원칙을 정한다.

최근 사포닌의 생리학적 활성과 약리학적 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 많은 연구들은 사포닌이 염증성 전구물질 생성과 암세포 전이를 조절함으로써 항염증성 및 항암효과를 나타냄을 시사하고 있다. 대두의 사포닌 함량은 (0.50-0.56/100g dry matter) 매우 높은 편으로 식물



사포닌 중 손쉽게 식용으로 이용 가능하다. 대두 사포닌은 혈청 콜레스테롤 저하 및 면역증가에 대한 효과뿐만 아니라 항암활성이 나타낸다고 알려져 있다.

다양한 식물에 존재하는 사포닌은 그 조성이 서로 다르며 상이한 Food matrix안에 존재하기 때문에 모든 식품으로부터 사포닌 함량을 측정하는데 적용할 수 있는 유일한 방법은 존재할 수 없다. 따라서, 본 연구를 통해 Thin Layer Chromatography (TLC), HP-20 Chromatography, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 녹두 사포닌 및 녹두 사포닌의 분해에 따른 정량적인 분석 조건을 확립하였다. 또한 프로바이오틱스로써 선별된 *Lactobacillus salivarius* E4191 균주를 이용한 사포닌 가수분해에 따른 항산화 활성의 변화 및 항염증 활성을 관찰하였다. 이러한 연구 방법 및 연구를 통해 기타 항염증 작용의 물질 선별에 초석이 될 수 있으며, 이를 통해 발아 녹두 및 녹두를 이용한 다양한 기능성 식품의 개발에 이용 및 녹두가공 부산물로부터 고부가가치 기능성 소재 생산 가능성을 탐색하는데 활용될 수 있다.

## 제 6 장 해외에서 수집한 정보

염증성 질환은 다양한 인간 질병에서 복합적으로 발생하는 질환으로 여드름, 천식, 자가 면역 질환, 염증성 장 질환, 류마티스 관절염 등 면역체계의 이상과 알레르기 반응에도 많은 영향을 받는다. 그중 염증성 장 질환으로 대표되는 궤양성 대장염과 크론씨 병은 서구에서 더 흔한 병으로 최근 국내에서도 발병율이 증가하는 추세이다. 특히 유럽이나 미국에서 많은 연구가 이루어지고 있으며, 원인 분석 및 기작, 치료 및 예방에 걸쳐서 연구가 수행되고 있다. 특히 원인은 영양학적 측면, 유전적 요인, 면역학적 요인 등을 다각도로 검토하는 것으로 알려져 있으며, 임상 실험 및 메타분석, 설문 조사 등의 방법으로 병원 및 연구소에서 행해지고 있었다.

크론씨 병과 궤양성 대장염으로 대표되는 염증성 장 질환 환자들에서 영양결핍은 매우 흔한 현상이다. 최근 영양에 대한 관심이 증가하면서 염증성 장 질환에서도 그 원인으로서는 또한 일차치료법으로서의 영양의 중요성을 입증하는 많은 연구 결과들이 축적되고 있다. 이러한 연구 결과들은 현재 염증성 장질환의 치료에 사용되고 있는 약물치료가 부작용의 가능성과 함께 근본적인 원인을 교정하지 못한 채 증상만 치료함으로써 재발방지에 도움이 되지 못하고 있고, 수술적 치료 역시 수술 후 크론씨 병 환자의 50~90%가 재발을 경험하고 있는 상황에서 매우 희망적인 결과들로 인식되고 있다.

또한 염증성 장질환의 치료 및 완화는 면역조절 억제제나, 진통 소염제, 항염증제 등이 쓰이고 있으며, 심할 경우 수술이 요구되고 있다. 최근 들어 폴리페놀계 물질 등 생리활성 물질에서 분리한 성분으로 항염증 효과를 가지는 연구결과가 보고되고 있으며, 치료 및 완화에 대하여도 연구가 활발히 진행 중이다.

## 제 7 장 참고문헌

- 김유선. 2009. 한국인 염증성 장질환의 치료의 실제. 대한장연구학회지. 7(2):133-134.
- 양석균. 2002. 한국인의 염증성 장질환의 현황과 전망. 대한소화기학회지. 40:1-14.
- 장병익. 2007. 염증성 장질환의 최신지견. 영남의대학술지. 221-233(13).
- 진운태, 권용대. 2006. 한국인의 염증성 장질환 진단의 문제점. 대한장연구학회 4(2):75-78.
- 김태호, 김병관, 신형두, 김지원, 김찬규, 김주성, 정현재, 송인성. 2003. 한국인 염증성 장질환에서 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 와 Interleukin-10 유전자의 다형성에 관한 연구. 대한소화기학회지. 42(5):377-386.
- Sano H., Kawahito Y., Wilder R. L., Hashiramoto A., Mukai S., Asai K., Kimur S., Kato H., Kondo M. and Hla T. 1995. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 55:3785-3759.
- Benitoin B. P. 1998. Vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponin, *Life Sciences.* 63:1147-1156.
- Haridas V., Arntzen C. J. and Gutterman J. U. 2001, Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benthams), inhibit activation of nuclear factor- $\kappa$ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *PNAS.* 98(20):11557-11562.
- Fujimoto J., Sakaguchi H., Aoki I., Toyoki H., Khatun S. and Tamaya T. 2001. Inhibitory effect of ginsenoside-Rb2 on invasiveness of uterine endometrial cancer cells to the basement membrane. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 22:339-341.
- Jun H. S., Kim S. E. and Sung M. K. 2002. Protective effect of soybeen saponins and major antioxidants against aflatoxin B1-induced mutagenicity and DNA-adduct formation. *J. Med.*

*Food.* 5:235-240.

Pan M. R., Chuang L. Y. and Hung W. C. 2001. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett.* 508:365-368.

Fu S. L., Wu Y. L., Zhang Y. P., Qiao M. M. and Chen Y. 2004. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *J. Gastroenterol.* 10:1971-1974.

Achike F. I. and Kwan C. Y. 2003. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30:605-615.

Surh T. J., Chun K. S., Cha H. H., Han S. S., Keum Y. S., Park K. K. and Lee S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* 480-481, 243-268.

Suh J. and Rabson A. B. 2004. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J. Cell. Biochem.* 91:100-117.

Hornebeck W., Emonard H., Monboisse J.C. and Bellon G. 2002. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Cancer Biol.* 12:231-241.

Seiki M. 2003. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 194:1-11.

Itoh Y. and Seiki M. 2004. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation, *Trends Biochem Sci.* 29:285-289.

Seiki M. and Yana I. 2003. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sic.* 94:569-574.

Sounni N. E., Janssen M., Foidart J. M. and Noel A. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* 22:55-61.

Lee S. K., Lee J. H., Lee H. H., Lee S., Kim S. H., Chun T. and Imm J. Y. 2011. Effect of mung bean ethanol extract on pro-inflammatory cytokines in LPS stimulated macrophages. *Food Sci. Biotechnol.* 20:519-524.

Pan M. H., Lai C. S., Dushenkov S. and Ho C. T. 2009. Modulation of inflammatory response by natural dietary bioactive compounds. *J. Agric Food Chem.* 57:4467-4477.

Apte R. N. and Voronov E. 2002. Interleukin-1 - a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin. Cancer Biol.* 12:277-290.

Yudkin J. S., Kumari M., Humphries S. E. and Mohamed-Ali V. 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 148:209-214.

Mannon P. J., Fuss I. J., Mayer L., Elson C. O., Sandborn W. J., Present D., Dolin B., Goodman N., Groden C., Homung R. L., Quezado M., Neurath F., Salfeld J., Veldman G. M., Schwertschlag U. and Strober W. 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Eng. J. Med.* 351:2069-2079.

Darley-Usmar V., Wiseman H. and Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen free radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369:131-135.

Kwon E. S., Kim H. and Kwon H. 2007. Inhibitory effects on the enzymes involved in the inflammation by the ethanol extracts of plant foodstuffs. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39:348-352.

Lee J. H., Lee B. M., Lee H. S., Bae E. A., Lee H. Y., Ahn Y. T., Lim K. S., Huh C. S., Kim D. H. 2008. *Lactobacillus* *suntoryeus* inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF- $\kappa$ B activation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis.* DOI 10.1007/s00384-008-0618-6.

Yao Y., Tian C. and Cao W. 2008. Anti-Oxidative Constituents of Ethanol Extract from Buckwheat Seeds by HPLC-Electro Spray MS. *Agri. Sci. in China*. 7:356 - 362.

Sosulski F. W. and Dabrowski K. J. 1984. Composition of free and hydrolysable acids in the flours and hulls of ten legume species. *J. Agric. Food Chem.* 32:131-133.

Kuppan G., Balasubramanyam J., Monickaraj F., Sirmivasan G., Mohan V. and Balasubramanyam M. 2010. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*. 49:229-234.

Kim S. H., Jun C. D., Suk K., Choi B. J., Lim H., Park S., Lee S. H., Shin H. Y., Kim D. K. and Shin T. Y. 2006. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.* 91:123-131.

Kim D. K., Chon S. U., Lee K. D., Kim J. B. and Rim Y. S. 2008. Variation of flavonoids contents in plant parts of mung bean. *Korean J. Crop Sci.* 53:279-284.

Oh H. S., Kim J. H. and Lee M. H. 2003. Isoflavone content, antioxidative and fibrinolytic activities of red bean and mung bean. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 19:263-270.

Kim O. K., Gu Y. A. and Jeong Y. J. 2007. Characteristics of mung bean powders after various hydrolysis protocols. *Korean J. Food Preserv.* 14:301-307.

Choi J. H., Kim S. O., Kim K. S. and Lee M. Y. 1998. Effect of mung bean sprouts juice on cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27:980-986.

Peng X., Zheng Z., Cheng K. W., Shan F., Ren G. X., Chen F. and Wang M. 2008. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem.* 106:475-481.

Uematsu Y., Hirata K. and Saito K. 2000. Spectrophotometric determination of saponin in yucca extract used as food additive. *J. AOAC Int.* 83:1451-1454.

- Dini I., Tenore G. C. and Dini A. 2009. Saponins in *Ipomoeabatata* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chem.* 113:411-419.
- Fenwick D. E. and Oakenfull D. 1981. Saponin Content of Soya Beans and Some Commercial Soya Bean Products. *J. Sci. Food Agric.* 32:273-278.
- Hu J., Lee S. O., Hendrich S. and Murphy P. A. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 50:2587-2594.
- Lin J. and Wang C. 2004. An analytical method for soy saponins by HPLC/ELSD. *J. Food Sci.* 69:C456-C462.
- Waller G. R., Yang C. F., Chen L. F., Su C. H., Liou R. M., Wu S. C., Young C. C., Lee M. R., Lee J. S., Cheng C. S., Chou C. H. and Kim D. 1999. Saponins produced during the life cycle of mungbeans and their role as allelochemicals. *Stud. Plant Sci.* 6:105-130.
- Guclu-Ustundag O. and Mazza G. 2007. Saponins: Properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47:231-258.
- Zhang W., Teng S. P. and Popovich D. G. 2009. Generation of group B soyasaponins I and III by hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 57:3620-3625.
- Kang J., Badger T. M., Ronis M. J. J. and Wu X. 2010. Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. *J. Agric. Food Chem.* 58:8119-8133.
- Gurfinkel D. M. and Rao A. V. 2003. Soyasaponins: The Relationship Between Chemical Structure and Colon Anticarcinogenic Activity. *Nutr Cancer.* 47:1.
- Blois M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181:1199-1200.
- Van den berg R., Haenen G. R. M. M. , Van den berg H. and Bast A. 1999. Applicability of an

improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66:511–517.

Benzie I. F. F. and Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70–76.

Taga M. S., Miller E. E. and Pratt D. E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:928–931.

Lee I. A., Park Y. J., Yeo H. K., Han M. J. and Kim D. H. 2010. Soyasaponin I attenuate TNBS-induced colitis in mice by inhibiting NF- $\kappa$ B Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 58:10929–10934.

Yoshiki Y. and Okuno K. 1995. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:1556–1557.

Mathew S. and Abraham T. E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol.* 44:198–206.

Wang M., Li J., Rangarian M., Shao Y., La Voie E. J., Huang T. and Ho C. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 46:4869–4873.

Xu G., Ye X., Chen J. and Liu D. 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J. Agric. Food Chem.* 55:330–335.

Sun-Waterhouse D., Zhou J. and Wadhwa S. 2011. Effects of adding apple polyphenols before and after fermentation on the properties of drinking yoghurt. *Food Bioprocess Technol.* DOI 10.1007/s11947-011-0563-1.

Shiraiwa M., Harada K. and Okubo K. 1991. Composition and Content of Saponins in Soybean



Seed According to Variety, Cultivation Year and Maturity. *Agric. Biol. Chem.* 55:323, 331.

Weber C. K., Liptay S., Wirth T., Adler G. and Schmid R. 2000. Sulfasalazine is a potent and specific inhibitor of IKB-kinases IKKa and IKKb. *Gastroenterology.* 118:A615.

Rumi G., Tsubouchi R., Okayama M., Kato S., Mózsik G. and Takeuchi K. 2004. Protective Effect of Lafutidine, a Novel Histamine H<sub>2</sub>-Receptor Antagonist, on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Inflammation Through Capsaicin-Sensitive Afferent Neurons in Rats. *Dig Dis Sci.* 49(10):1696 - 1704.

Dieleman L. A. and Heizer W. D. 1998. Nutritional Issues In Inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 27:435 - 45.

Howarth G. S., Cool C. J., Bourne A. J., Ballard F. J. and Read L. C. 1998. Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Stimulates Regrowth of the Damaged Intestine in Rats, when Administered Following, but not Concurrent with, Methotrexate. *Growth Factor.* 15:279-292.

Mantovani A., Bussolino F. and Dejana E. 1992. Cytokine regulation of endothelial cell function. *The FASEB Journal.* 6:2591-2599.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.