

프로바이오틱 균주와 천연물의 복합 발효 산물을 이용한
염증성 장 질환의 면역조절 식품소재 개발

Development of industrial complex fermentation using probiotics
and natural compound targeting for reducing symptom of
IBD (inflammatory bowel disease) by immune modulation

연구기관

고려대학교 식품공학부

고려대학교 생명공학과

명가유업주식회사

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “프로바이오틱 균주와 천연물의 복합 발효 산물을 이용한 염증성 장 질환의 면역조절 식품소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 김 세 현

세부연구책임자 : 이 동 호

연 구 원 : 임 광 세

연 구 원 : 이 진

연 구 원 : 박 종 호

연 구 원 : 배 준 범

연 구 원 : 나 만 흠

연 구 원 : 김 나 현

연 구 원 : 김 금 옥

연 구 원 : 김 경 환

협동연구기관명 : 명가유업주식회사

협동연구책임자 : 서 재 경

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 박 동 준

요 약 문

I. 제 목

프로바이오틱 균주와 천연물의 복합 발효 산물을 이용한 염증성 장 질환의 면역조절 식품소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

염증성 장질환은 장에 발생하는 원인 불명의 만성적인 염증을 뜻한다. 크게 2개의 군으로 나눌 수 있는데 그 하나가 만성 비특이적 궤양성 대장염(ulcerative colitis)이며, 다른 하나가 크론씨 병(Crohn's disease) 이다. 염증성 장질환의 원인은 아직까지 알려지지 않고 있으나 유전 및 환경적 영향을 받으며 면역학적 이상에 의해 매개된다고 알려져 있다. 본 질환을 치료하기 위한 방법으로 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.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 프로바이오틱 균주와 천연추출물을 이용한 면역조절을 통한 장염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 프로바이오틱 균주에서 분획한 물질을 이용하여 장 상피세포 모델인 대장 암 세포주를 대상으로 세포 수준에서의 면역 조절 효능을 검증하며, 세포주의 단백질 발현 패턴을 분석, 또한 동물모델을 통해 숙주의 면역세포 및 염증성 사이토카인의 분비를 살펴봄으로써 그 효능을 고찰하였다. 또한 천연추출물을 이용한 생리활성 물질의 분리 및 활성물질의 구조를 결정하고, 이를 이용하여 프로바이오틱 균주와 천연추출물의 복합발효를 이용한 면역 조절 기능성 식품소재를 개발하고자 한다.

연구개발의 범위는 다음과 같다.

가. 장염증 완화 활성을 가지는 Probiotic 균주 탐색

1. 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립
2. Probiotic 균주의 정착능 및 세포독성 확인
3. Probiotic 균주의 항염증 효과 탐색

나. 장염증 완화 활성을 가지는 천연추출물 탐색

1. 항염증 활성을 가지는 천연 추출물 문헌조사
2. 천연추출물의 항염증 효과 탐색
3. 천연추출물의 세포독성 측정
4. 선발된 후보물질의 농도별 항염증 효과 탐색

다. 선발된 천연 추출물의 활성물질의 분석법 및 QC방법 확립

1. 최종 선발된 시료(조각자)의 확보 및 추출물 제조
2. 선발된 추출물의 분석법 결정
3. 추출물의 기준물질의 확인
4. Quercetin의 calibration curve와 EA 추출물 내 Quercetin 정량분석

라. 선발된 물질의 세포, 단백질 수준 및 동물실험에서의 항염증 효과 검증

1. 세포수준에서 항염증 활성 검증
2. 단백질 수준에서 효능평가
3. 장염증 동물모델에서 조각자 및 유산균의 효능 검증

마. 선발된 균주와 천연추출물을 이용한 복합발효기술 확립

1. 후보물질의 발효능 측정
2. 조각자 추출물 배합비 설정을 위한 관능검사 실시
3. 조각자 추출물 함유 유제품의 제조
4. 제조간 발효특성 차이 확인 및 안전성 검사
5. 조각자 추출물 첨가 요거트의 항염증 활성 확인

바. Encapsulation process에 따른 산업적 활용방안 모색

1. Alginate coating 캡슐의 제조
2. Hybridization을 이용한 분체복합화 캡슐의 제조
3. 제조된 캡슐의 표면분석 및 생리활성 측정
4. 제조된 캡슐의 저장안정성 확인

IV. 연구개발 결과 및 성과활용 계획

항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위하여 꾸준한 섭취를 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 체내에서 안전하다고 알려진 프로바이오틱스와 천연 추출물 소재를 통하여 장염증 완화여부를 탐색하였다. 이들 프로바이오틱 균주 및 천연추출물은 문헌 및 연구에서 이미 항염증 활성이 보고되어 있으며 항염증 효과가 뛰어난 물질을 탐색한 뒤 세포수준, 단백질 수준, 동물모델에서 검증을 실시하였다. 선발된 천연물 조각자와 균주 KY21은 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 염증을 완화하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 물질이 포함된 유제품 제조를 위하여 천연물과 균주의 발효능을 탐색하였으며, 항염증 활성을 갖는 농도의 조각자추출물이 포함된 유제품을 제조하였다. 또한 균주의 Encapsulation 을 통하여 캡슐의 생리활성, 안정성이 캡슐이전의 균주에 비해 높은 것을 확인하여 산업에 적용할 수 있는 방안을 모색하였다. 결론적으로, 항염증 활성이 있는 조각자 추출물 및 Probiotic 균주 KY21 이 포함된 유제품 제조를 통하여 염증관련 장 질환을 완화하는 식품소재를 개발하는데 활용할 수 있다.

Summary

I. The Title

Development of food materials using probiotics strain and mixed fermentation of natural product for regulation of inflammatory bowel disease.

II. The Necessity and the Purpose of Research & Development

Inflammatory bowel disease (IBD) is idiopathic chronic inflammation occurred in intestine. The major types of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis. Researchers do not yet know what causes inflammatory bowel disease. Genetic, infectious, immunologic, and psychological factors have all been implicated in influencing the development of IBD. Usually the treatment is started by administering drugs with high anti-inflammatory effects, but it causes side effects including headache, liver disorder, adrenal insufficiency and pain. Therefore, the introduction of anti-inflammatory is needed.

III. The Contents and the Range of Research & Development

- We screened the probiotics strain and natural products for release of inflammatory bowel disease in vitro and established the standard methods of analysis.
- We verified the anti-inflammatory efficacy of selected product in cellular level, protein levels and animal experiment.
- We made dairy products using extract of *Gleditsia sinensis* (GS) and established the technical methods of application.

IV. The Results of Research & Development

- This study is to development of probiotic strains and natural products having anti-inflammatory effects. Natural product GS and probiotic strain KY21 were found to have anti-inflammatory effects by repress the expression of inflammatory cytokine.
- We investigated the fermentation ability for making yogurt contained natural products GS, and established the application methods for encapsulated probiotic strains for making dairy products.
- In conclusion, dairy product containing probiotic strain KY21 and natural product GS can be a potent food component for release of IBD.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	10
Chapter 2. Current research trends.....	14
Chapter 3. Results.....	23
1. Screening of probiotic strain having anti-inflammatory activity.....	23
2. Screening of natural product having anti-inflammatory activity.....	31
3. Analysis of the active compounds and establishment of QC method.....	41
4. Anti-inflammatory effect on cellular, protein levels and animal experiment.....	50
5. Mixed fermentation techniques using probiotics and natural product.....	72
6. Encapsulation process and industrial application.....	91
Chapter 4. Achievement and contributions.....	100
Chapter 5. Further plan.....	102
Chapter 6. Current research data in foreign country.....	103
Chapter 7. References.....	104

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 장 질환 관련 연구 현황.....	14
제 2 절	국외 염증성 장 질환 관련 연구 현황.....	18
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과.....	23
제 1 절	장염증 완화 활성을 가지는 Probiotic 균주 탐색.....	23
제 1 항	항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립.....	23
제 2 항	Probiotic 균주의 정착능 및 세포독성 확인.....	24
제 3 항	Probiotic 균주의 항염증 효과 탐색.....	28
제 2 절	장염증 완화 활성을 가지는 천연추출물 탐색.....	31
제 1 항	항염증 활성을 가지는 천연 추출물 문헌조사.....	31
제 2 항	천연추출물의 항염증 효과 탐색.....	36
제 3 항	천연추출물의 세포독성 측정.....	38
제 4 항	선발된 후보물질의 농도별 항염증 효과 탐색.....	39
제 3 절	선발된 천연 추출물의 활성물질의 분석법 및 QC방법 확립.....	41
제 1 항	최종 선발된 시료(조각자)의 확보 및 추출물 제조.....	41
제 2 항	선발된 추출물의 분석법 결정.....	41
제 3 항	추출물의 기준물질의 확인.....	43
제 4 항	Quercetin의 calibration curve와 EA 추출물 내 Quercetin 정량분석.....	47

제 4 절	선발된 물질의 세포, 단백질 수준 및 동물실험에서의 항염증 효과 검증.....	50
제 1 항	세포수준에서 항염증 활성 검증.....	50
제 2 항	단백질 수준에서 효능평가.....	53
제 3 항	장염증 동물모델에서 후보물질의 효능 검증.....	59
제 5 절	선발된 균주와 천연추출물을 이용한 복합발효기술 확립.....	72
제 1 항	후보물질의 발효능 측정.....	72
제 2 항	조각자 추출물 배합비 설정을 위한 관능검사 실시.....	76
제 3 항	조각자 추출물 함유 유제품의 제조.....	78
제 4 항	제조간 발효특성 차이 확인 및 안전성 검사.....	79
제 5 항	조각자 추출물 첨가 요거트의 항염증 활성 확인.....	82
제 6 절	Encapsulation process 에 따른 용출제어 및 산업적 활용방안 모색.....	91
제 1 항	Alginate coating 캡슐의 제조.....	91
제 2 항	Hybridization을 이용한 분체복합화 캡슐의 제조.....	92
제 3 항	제조된 캡슐의 표면분석 및 생리활성 측정.....	92
제 4 항	제조된 캡슐의 저장안정성 확인.....	95
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	100
제 1 절	장 염증 완화활성을 가지는 물질 탐색 및 검증.....	100
제 2 절	균주와 추출물을 이용한 복합발효기술 확립.....	100
제 3 절	Encapsulation process 에 따른 산업적 활용방안 모색.....	101
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	102
제 1 절	추가 연구의 필요성.....	102
제 2 절	타 연구에의 응용.....	102
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	103
제 7 장	참고문헌.....	104

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 방법으로서는 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 천연추출물을 이용한 면역조절을 통한 장염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 프로바이오틱 균주에서 분획한 물질을 이용하여 장 상피세포 모델인 대장 암 세포주를 대상으로 세포 수준에서의 면역 조절 효능을 검증하며, 세포주의 단백질 발현 패턴을 분석, 또한 동물모델을 통해 숙주의 면역세포 및 염증성 사이토카인의 분비를 살펴봄으로써 그 효능을 고찰하는 것이 그 목적이다. 또한 천연추출물을 이용한 생리활성 물질의 분리 및 활성물질의 구조를 결정하고, 이를 이용하여 프로바이오틱 균주와 천연추출물의 복합발효를 이용한 면역 조절 기능성 식품소재를 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

염증성 장질환은 장에 발생하는 원인 불명의 만성적인 염증을 뜻한다. 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 약이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 대부분의 약들은 두통, 간질환, 부신피질 부전증 및 통증 유발 등의 부작용을 가지고 있다.

다음 표는 염증성 장질환에 사용되는 약물과 그 부작용을 나타낸 것이다.

분류	성분	부작용
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 인정되지만 임상적인 향상에 대한 유용성은 불분명
항산화제	알로퓨리놀, 디메틸설풍사이드	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 (장병익, 2007). 또한 염증성 장질환인 궤양성 대장염과 크론병은 희귀성 난치병으로 분류되었으며 젊은 층에서(15-35세 경) 호발하며, 흑인종이나 황인종보다 백인종에서 흔하고, 특히 유태인에서 발생빈도가 높다고 한다. (진윤태 등, 2003)

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

프로바이오틱스는 적당한 양을 섭취하였을 때 건강에 도움이 되는 살아있는 균(live organism)으로 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제 재라 할 수 있다. 프로바이오틱스는 대부분 포도당이나 유당을 분해하여 다량의 유기산(젖산)을 생성하는 균주를 포함하는데 대표적인 미생물 속으로는 Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus 속 등이 있다. 이러한 프로바이오틱스는 몸에 이로운 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 쾌변을 돕는다. 프로바이오틱스의 효능을 간단하게 정리하면 다음과 같다. 장내 유해균을 억제하고, 소화 작용을 촉진하며 설사 및 변비개선에 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 장관내 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.

우리나라에서는 예전부터 음식의 질과 양으로 인하여 위장병(胃腸病)에 걸리는 경우가 많았으나 현대에 와서 음식물이 서구화되고 생활환경이 복잡해지므로 인하여 위 질환보다 장 질환이 점차적으로 늘고 있는 추세이며 따라서 궤양성 대장염도 점차적으로 증가하고 있다. 한의학에서는 이 질환을 장풍(腸風) 장독(臟毒) 설사(泄瀉) 이질(痢疾) 등의 범주에 포함되는 질병으로, 원인은 불명이나 잠재적인 유전적 소인, 강력한 환경적 요인, 감염성 요인, 면역학적 요인, 정신적인 요인이 함께 작용한다고 생각되며 음식실절(불규칙한 식이 습관, 과도한 지방식, 서구화된 식품, 오염식품)과 육체적인 과로로 인한 원기 부족, 과도한 정신적 스트레스가 이 병을 유발하거나 가중시킨다고 볼 수 있다.

염증성 장질환은 만성적인 경과를 밟으므로 반복발작하기 쉬우므로 식이요법, 운동요법, 약물치료를 병행하여야 한다. 여기에 이용되는 약물은 대부분 한약재로서 환자의 체질, 병소(病所)의 부위 및 병소의 선후를 결합하여 치료원칙을 정한다. 문헌상 항염증 효과가 있는 한약재 소재는 30여종에 달하며 한방치료와 양방치료를 겸하여 조절한다.

항염증 치료제의 부작용을 완화하고 비용을 경감하기 위하여 꾸준한 섭취를 통하여 증상을 완화하는 것이 필요하며, 체내에서 안전하다고 알려진 프로바이오틱스와 천연 추출물 소재를 통하여 장염증 완화물질을 탐색하는 것이 요구된다. 이들 프로바이오틱 균주 및 천연추출물은 문헌 및 연구에서 이미 항염증 활성이 보고되어 있으며 항염증 효과가 뛰어난 물질을 탐색하여 장염증 완화 기작을 설명하고 동물 또는 인체에 적용할 수 있다면 꾸준히 염증관련 장 질환을 완화하는데 도움이 될 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

제 1 항 장염증 완화 활성을 가지는 Probiotic 균주 탐색

1. 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립
2. Probiotic 균주의 정착능 및 세포독성 확인
3. Probiotic 균주의 항염증 효과 탐색

제 2 항 장염증 완화 활성을 가지는 천연추출물 탐색

1. 항염증 활성을 가지는 천연 추출물 문헌조사
2. 천연추출물의 항염증 효과 탐색
3. 천연추출물의 세포독성 측정
4. 선발된 후보물질의 농도별 항염증 효과 탐색

제 3 항 선발된 천연 추출물의 활성물질의 분석법 및 QC방법 확립

1. 최종 선발된 시료(조각자)의 확보 및 추출물 제조
2. 선발된 추출물의 분석법 결정
3. 추출물의 기준물질의 확인
4. Quercetin의 calibration curve와 EA 추출물 내 Quercetin 정량분석

제 4 항 선발된 물질의 세포, 단백질 수준 및 동물실험에서의 항염증 효과 검증

1. 세포수준에서 항염증 활성 검증
2. 단백질 수준에서 효능평가
3. 만성 장염증 소동물모델 구축
4. 장염증 동물모델에서 조각자 및 유산균의 효능 검증

제 5 항 선발된 균주와 천연추출물을 이용한 복합발효기술 확립

1. 후보물질의 발효능 측정
2. 조각자 추출물 배합비 설정을 위한 관능검사
3. 조각자 추출물 함유 유제품의 제조
4. 제조간 발효특성 차이 확인 및 안전성 검사

제 6 항 Encapsulation process 에 따른 용출제어 및 산업적 활용방안 모색

1. Alginate coating 캡슐의 제조
2. Hybridization을 이용한 분체복합화 캡슐의 제조
3. 제조된 캡슐의 표면분석 및 생리활성 측정
4. 제조된 캡슐의 저장안정성 확인

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 염증성 장 질환 관련 연구 현황

크론병과 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.

1. 염증성장질환의 병인

현재까지 명확한 병태생리는 알려져 있지 않지만 가능한 원인들로는 환경적 소인, 세균감염에 의한 면역조절기능의 결함, 유전적 인자 등이며 각 인자들이 단독 또는 복합적으로 관여할 수 있다. 잘 알려져 있는 환경적 인자로는 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 위생 상태의 개선으로 기생충의 감염이 감소된 것과 연관이 있을 것으로 생각된다.

2. 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)는 임상에서 염증성 장질환의 치료 반응 표지자로서 널리 이용된다. 특히 크론병에서 많이 이용되는데, 크론병 질병 활성 지수 (Crohn's disease activity index), 혈중 아밀로이드, IL-6, calprotectin과 상호 연관성이 좋은 표지자이다.

Perinuclear antineutropilic antibody(pANCA), anti-Saccharomyces cerevisiae(ASCA)중 전자는 궤양성 대장염, 후자는 크론병의 진단에 유용한 표지자로서 이용된다. 또한 불확정 대장염의 원인 질환을 감별진단 하는 데 도움을 줄 수 있고, 질환의 임상적 표현형, 임상

양상에 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 크론병의 반수에서 발현되며, 이 경우 오랜 기간 심한 질환을 가지면서 수술을 받는 경우가 많다. 이 중 전자는 크론병 가족력이 있으나 크론병이 없는 경우에도 증가하는 경우가 있으므로 면역표지자로서의 역할을 기대할 수 있다. 또 다른 세균 표지자인 CBirl flagellin에 대한 항체의 경우도 합병증이 많은 경우 및 pANCA 양성인 크론병의 경우 많이 검출된다.

나. 내시경

내시경은 만성 염증성 장질환의 진단, 침범 부위 정도, 질병의 활성도, 합병증의 발생 여부를 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 방법이며 각 상세한 내용은 아래와 같다.

색소내시경은 색소를 대장 내에 주입한 후 점막의 형태변화를 관찰하는 것으로 주로 메틸렌 블루, 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 크론병 진단에 enteroclysis에 비해 진단율이 더 좋은 것으로 알려져 있다.

3. 염증성장질환의 치료 동향

- 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 혼합 사용 시 단독 치료보다 효과가 좋다.

- 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 하며장기간 사용 시 많은 부작용이 발생한다.

- 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.

- Biological agents : 현재 염증성 장질환의 염증은 이에 관계하는 염증매개체와 사이토카인의 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 tumor necrotic factor(이하, TNF) 를 봉쇄하기위한 전략으로 이에 대한 이성 단클론항체인 infliximab이 개발되고 FDA에서 공인되면서 생물학적 치료에 새로운 장을 열었다. 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 크론병의 경우 보험 적용이 되어 국내에서도 좋은 치료성적이 보고되고 있다. Infliximab (Remicade TM), Adalimumab 등이 대표적이다.

기타 치료법으로는 leukocytapheresis(LCAP)가 유용한데, 이는 말초 백혈구를 제거하여 염증을 조절하는 시도로 80년대부터 일본에서 주로 연구가 진행되었다. 최근에도 효과 및 안정성 면에서 염증연구가 진행되고 있다.

장내 기생충이 과도한 면역 반응을 방지할 수 있다는 사실에 근거해 porcine whipworm 으로 알려진 Trichuris suis egg를 이용한 임상연구들도 있다. 여러 연구들에서 초기에 활동성인 질환을 가졌던 염증성 장질환 환자에서 T suis ova therapy 는 안전하면서 치료에 효과적이라고 알려져 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.

한국인 염증성 장 질환에서 Tumor Necrosis Factor- α 와 Interleukin-10 유전자의 다형성에 관한 연구

염증성 장 질환에서 유전적 요인은 중요한 요인의 하나로 받아들여지고 있으나, 여기에 관여하는 유전자에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 친 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 항 염증성 사이토카인인 IL-10은 염증성 장 질환의 병태생리에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 대조군과 염증성 장 질환 환자에서 TNF- α 와 IL-10 유전자의 단일 염기 다형성의 빈도를 비교하여 그 연관성을 알아보고자 하였다. 궤양성 대장염 환자 91명, 크론 병 환자 63명과 정상 대조군 200명을 대상으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 백혈구에서 DNA를 분리하여 TNF- α 유전자 촉진자의 일부인 -238 및 -308 부위와 IL-10 유전자 촉진자의 일부인 -1082, -819, -592 및 +117 부위에 대해 단일 염기 연장반응을 이용하여 단일 염기 다형성을 조사한 후 이를 대조군과 비교하였다. 또한 염증성 장 질환 환자 군을 여러 임상 양상에 따라 나누어 이들 사이에 단일 염기 다형성의 차이가 있는지 비교하였다. 결과: TNF- α -238A의 빈도는 대조군과 염증성 장 질환 환자군 사이에 유의한 차이가 없었으나, TNF- α -308A의 빈도는 염증성 장 질환, 특히 크론 병에서 대조군에 비해 유의하게 낮았다. IL-10 -1082 G, -819 C, -592 C, +117 C의 빈도는 대조군과 염증성 장 질환 환자군 사이에 유의한 차이가 없었다. 크론 병 환자에서 항문 주위 병변이 있는 경우에 TNF- α -238A의 빈도가 유의하게 높았으며 ANCA 양성인 염증성 장 질환 환자 군에서 ANCA 음성인 환자군보다 TNF- α -308A의 빈도가 유의하게 높았다. 병변의 위치, 스테로이드 정주 치료의 유무, 누공 유무, 수술 적 치료 유무, ASCA 양성 여부에 따른 TNF- α 및 IL-10의 각 부위의 대립유전자 빈도는 유의한 차이가 없었다. 결론: TNF- α 유전자 -308 부위의 단일 염기 다형성은 염증성 장 질환, 특히 크론 병과 연관성이 있었다. 또한 TNF- α -238A의 경우 항문 주위 병변이 있는 크론 병 환자에서 유의하게 높았으며 TNF- α -308A의 경우 ANCA 양성인 염증성 장 질환에서 유의하게 높았는데 이에 대해서는 향후 더 많은 연구가 필요하다.

제 2 절 국외 염증성 장 질환 관련 연구 동향

염증성 장 질환과 장내균총

만성 장염을 촉발시키는 인자로 장내에 존재하는 정상 균 무리(normal flora)의 역할이 제시되고 있다. 그러나 장 점막과 직접적으로 접촉하는 균 무리에 대해서는 아직까지 그 특성이 제대로 알려져 있지 않다. 본 연구는 장 염증을 지닌 환자 305명과 건강대조군 40명을 대상으로 대장내시경 생검을 이용하여 점막 균 무리를 분석하였다. 그 결과 장에 염증을 지닌 환자에서는 점막 내 세균 수가 대조군에 비해 매우 높았다. 점막 세균의 농도는 염증의 정도에 비례하여 증가하였다. 건강한 대조군의 장 점막 표면은 근본적으로 무균 상태였다. 그러나 10,000 CFU/mL 이상의 균 농도를 지닌 환자의 점막에는 두터운 세균 대(bacterial band)가 붙어 있었다. 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD) 환자 및 50,000 CFU/mL 이상의 점막 균 무리를 지닌 환자에서는 장 상피 세포 내부에 다양한 형태의 세균들이 묻혀져 있었다. 그러나 대식세포와 M 세포 내부에서는 세균을 관찰할 수 없었다. 이와 같은 결과는 건강한 점막은 대변에 존재하는 세균이 되돌아오는 현상을 막아주고 정상균 무리와 상피세포와의 접촉을 차단하고 있지만, IBD 환자에서는 세균과 상피세포와의 접촉 기능이 약화되어 있다는 가설을 제시해 준다.

인간이 생명을 유지하면서 장내에는 많은 수의 다양한 세균을 갖고 있다는 점은 매우 경이로운 현상이다. 즉, 10^{13} - 10^{14} 개의 세균이 장내에 존재하는데, 이 숫자는 인간 세포의 10%에 달할 정도로 매우 많은 수이다. 장내 정상 균 무리는 여러 가지 점에서 인간에게 이익을 가져다주기도 한다. 그러나 이들 세균의 세포벽과 외막 성분은 점막 염증반응을 촉발시키거나 악화시킬 수 있다. 따라서 장내 상재균의 구성과 활성을 적절히 조절하는 일은 장내 균형을 유지시키는 데 반드시 필요하다. 이와 같은 균형 유지의 주요한 방법은 영양분에 대한 경쟁과 quorum sensing과 같은 기전을 통하여 일어난다. 오늘날 식이요법과 미생물 경쟁 방법을 이용한 장내 정상 균 무리의 조작성이 관심을 끌고 있다. 즉, prebiotic 치료와 Probiotic 치료는 바로 이러한 원리를 근본으로 하고 있다. 올해 미국 San Francisco에서 개최된 DDW에서는 이와 같은 치료법이 앞으로 매우 폭넓게 환자에게 적용될 수 있음을 제시한 바 있다.

질병이라는 관점에서 볼 때 세균은 glycan을 매개로 하여 상피세포에 부착한다. 세균 부착은 숙주에게 해로운 결과를 가져다 줄 수 있다. 예를 들면 과도한 세균의 보유, 독성을 나타내거나 염증을 유발할 수 있는 세균 물질의 축적 또는 세균의 점막 침입과 같은 현상이 그 것이다. 그러나 정상 개체에서는 점막 분비, 분비 형 IgA, 국소적 대사성 방어

막의 형성, 항균 물질 분비 등과 같은 다양한 숙주 반응을 통해 세균 부착을 약화시킨다. 본 연구는 만성 장 질환에서는 세균부착 감소가 방해받는다는 점을 제시하고 있다. 연구자들은 독특한 in situ 방법을 통하여 점막에 있는 세균을 검사하였다. 세균들은 계통학적으로 매우 다양하며 건강한 성인에서는 대변에 존재하는 균과 특별히 차이하지 않는다는 점을 제시하였다.

장내 정상 균 무리는 크론 병과 만성 장염 모델에서 중요한 역할을 하고 있음이 이미 잘 알려져 있다. 더구나 세균 감지 유전자(bacterial sensing gene)인 NOD2의 돌연변이 현상이 크론 병 감수성의 주요 유전자 부위라는 보고도 있다.

그렇다면 본 연구자들의 결과가 만성 장염에서의 세균의 역할을 이해하는데 어떤 도움을 제공하고 있는가? 본 논문은 매우 정교한 실험 기법을 사용함으로써, 단지추측에 불과하였던 장내 세균 분포를 정확하게 제시하였다. 또한 점막이 파괴되었을 때 국소적으로 세균이 어떤 영향을 미치는가에 대한 정보도 제공하고 있다. 즉, 활동적인 염증 부위에서 세균은 파괴된 상피세포와 접촉하게 된다. 이와 같은 환경에서는 세균의 침입(invasion)을 낮출 수 있는 장벽이 상실되어 있다. 그러나 가상적인 예측과는 달리 본 연구에서는 전자현미경 관찰 등을 통하여 물리적 장벽이 손상되었다고 하더라도 세균이 침입한다는 증거가 거의 발견되지 않는다는 점을 제시하고 있다. 이러한 결과는 장내 염증이 일어나더라도 정상 균 무리의 침입은 거의 일어나지 않음을 시사해 준다. 따라서 만일 장내 균 무리가 IBD와 같은 질환에 관련되어 있다고 하더라도 균 침입이 아닌 세균과 상피세포와의 접촉을 통한 발병 기전이 우세할 것이라는 가설을 제시해 준다. 본 연구는 만성 장염에서 관찰되고 있는 과도한 세균부착이 어떤 기전에 의해 나타나는 지에 관한 정보도 제공하고 있다. 즉, 오늘날 IBD에서 세균 부착에 의한 다양한 발병 기전이 제시되고 있다. 그러나 관여하는 균은 대장균에 염증성 장 질환에 있어서 점막 균 무리에 국한되어 있다. 오늘날 많은 연구자들은 부착 세균이 점막 염증 반응의 유도체가 될 수 있는가 또는 부착 세균이 장염과 관련이 있는가 하는 문제에 대해 관심을 갖고 있다. 이와 같은 중요한 질문에 대해 본 연구는 정답을 제시하고 있지 않다. 그럼에도 불구하고 본 논문은 이러한 의문점을 풀기 위한 초기 단계의 정보를 제공하고 있다는 점에서 매우 중요한 자료라고 할 수 있다. 결론적으로 본 연구는 만성적인 장염에서 숙주-세균 상호 작용이 총체적으로 방해받고 있음을 제시하였다. 향후 잘못된 숙주-세균 상호 작용과 이의 기전을 규명할 수 있다면 정상적인 숙주-세균 상호 작용을 회복할 수 있는 치료법의 개발에 지대한 공헌을 할 것으로 기대한다.

장 염증 평가에 분변 표지자의 유용성:

염증성 장 질환 환자에서 염증을 시사 하는 분변 표지자인 lactoferrin (Lf), calprotectin (Cal), polymorphonuclear neutrophil elastase (PMN-e)와 혈청 C-reactive protein (CRP)이 내시경에서 활동 염증이 있는 염증성 장 질환과 활동성 염증이 없는 염증성 장 질환 및 과민성 장 증후군을 감별할 수 있는지, 둘째 이 표지자들이 염증도와 연관성이 있는지, 셋째 궤양성 대장염의 질병 활성도 지수(colitis activity index, CAI) 및 크론 병 활성도 지수 (Crohn's disease activity index, CDAI)를 이들 분변 표지자와 같이 평가하면 내시경에서 염증 정도를 평가하는 데 정확도를 증가시킬 수 있는지 등이었다. 이 연구는 54명의 과민성장 증후군 환자, 42명의 궤양성 대장염 환자, 43명의 크론 병 환자를 대상으로 분변의 Lf, Cal, PMN-e, 혈청 CRP를 측정 하였다. 질병 활성도는 궤양성 대장염에서 CAI, 크론 병에서 CDAI를 사용하였다. 분변 표지자, 혈청 CRP, 임상 활성도 지표를 다 고려하여 계산한 확대 활성도 지표를 측정하였다. 결과로 궤양성 대장염과 크론 병 환자에서 활동 염증이 있는 경우에 비활동 염증이거나 과민 장 증후군에 비해서 분변의 Lf, Cal, 및 PMN-e가 높았으며 혈청 CRP도 높았다. 염증성 장 질환에서 진단의 정확도는 Lf에서 80.0%, Cal에서 80.0%, PMN-e에서 74.1%였고 CRP는 64.0%, 임상 질병 활성도 지수에서는 79.0%였다. Cal은 크론 병 진단에 정확도가 가장 높았고 (81.4%) Lf는 궤양성 대장염에서 다른 지표보다 정확도가 높았다(83.3%). 확대 활성도 지표에서는 궤양성 대장염의 민감도 및 특이도가 증가하여 진단 정확도가 95.3%였다. 결론으로 분변 표지자인 Lf, Cal, PMN-e는 비활동 염증성 장 질환 및 과민성 장 증후군과 활동 염증성 장 질환을 감별할 수 있었다. 염증의 상태를 나타내는 데 있어서 3개의 분변 표지자 모두 혈청 CRP보다는 우수했지만 분변 표지자 간에는 차이가 없었다. 분변 표지자와 혈청 CRP, 질병 특이적인 활성도와 조합하면 궤양성 대장염 환자의 내시경에서 염증에 대한 진단 능력을 증가시킬 수 있었다.

영양과 염증성 장 질환

크론 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 크론 병 환자의 50~90%가 재발을 경험하고 있는 상황에서 매우 희망적인 결과들로 인식되고 있다.

영양학적인 요소들이 염증성 장질환의 원인으로서는 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 크론 병의 위험 인자로 보고되고 있다. 특히 일주일에 두 번 이상의 fast foods의 섭취한 경우 크론 병과 궤양성 대장염의 발생위험도가 각각 3.4배, 3.9배 증가하여 가장 강력한 위험인자1로 마아가린(margarine)의 과다한 소모는 크론 병의 발병과 연관되어 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 크론 병의 증가가 총 지방, 동물성지방, n-6 불포화지방산과 동물성 단백질, 우유단백질의 고 섭취와 함께 n-3 불포화지방산의 섭취 감소와 강력한 연관관계가 있는 것으로 보고하고 있다. 비록 후향적으로 연관성을 조사하였다는 제한점에도 불구하고 유전학적으로 동일하고 안정적인 민족에서 왜 일정 기간 동안 크론 병이 증가하는지를 영양학적인 측면에서 잘 설명한 연구도 있다. 또한 n-3 불포화지방산의 섭취감소가 원인의 하나라는 결과는 최근 염증성 장 질환의 임상적 또는 동물실험에서 n-3 불포화지방산의 치료 효과가 증명됨으로써 연구 결과의 신빙성이 입증되고 있다. 한편 채소와 과일은 방어 효과를 갖는 것으로 시사되고 있다. 식이항원(food allergen)은 염증성 장 질환의 원인으로서는 중요한 역할을 하지 않는 것으로 보고되고 있다.

영양결핍은 소장을 침범한 크론 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 성장장애가 관찰되고, 체중감소는 크론 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% 크론 병 환자의 9%에서 관련되어 있다. 크론 병에서는 말단회장의 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 혈

중농도는 흔히 낮게 측정되어도 임상양상으로 나타나는 경우는 드물다. 아연(zinc)은 염증성 장 질환 환자에서 가장 흔히 결핍되는 미소무기질(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.

사과껍질에 염증성 장 질환 억제 물질 발견

사과껍질에 많이 들어있는 항산화물질 폴리페놀이 궤양성대장염, 크론 병 등 염증성 장 질환 환자에게 나타나는 대장과 소장의 염증을 억제하는 효과가 있다는 연구결과가 나왔다.

궤양성대장염과 크론 병은 면역체계가 대장을 표적으로 오인해 공격함으로써 소장 또는 대장 점막에 다발성 궤양과 출혈, 설사, 복통을 일으키는 만성적인 난치성 장 질환이다. 미국 몬테나 주립대학 의과대학의 데이비드 파스쿠알(David Pascual) 박사는 사과껍질 속의 폴리페놀이 장 점막을 공격해 염증을 일으키는 면역세포인 T세포의 활동을 억제한다는 사실이 쥐 실험 결과 확인됐다고 밝혔다. 파스쿠알 박사는 덱스트란 황산나트륨(dextran sulfate sodium)을 이용해 일단의 쥐들을 화학적 염증성 장 질환으로 유도한 뒤 두 그룹으로 나누어 한 그룹에만 사과껍질에서 채취한 폴리페놀을 투여한 결과 폴리페놀 그룹 쥐들만이 활성화된 T세포가 장에서 줄어들었다고 밝혔다.

이는 사과의 폴리페놀이 장에서의 T세포 증가와 활성화를 억제한다는 사실을 보여주는 것이라고 파스쿠알 박사는 말했다. 염증성 장 질환 환자들은 표준 치료를 보강하기 위해 치료에 도움이 되는 일부 영양보충제를 복용하고 있으나 과학적으로 효과가 증명된 것은 없다고 한다. 이 연구결과는 '백혈구 생물학 저널(Journal of Leukocyte Biology)' 최신호에 발표되었다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

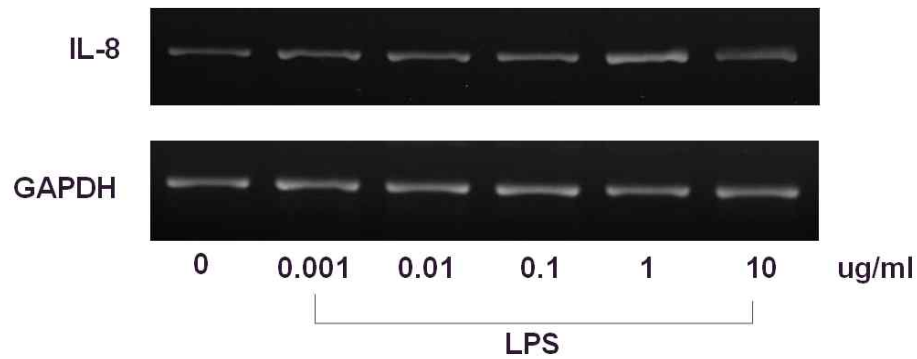
제 1 절 장 염증 완화활성을 가지는 Probiotic 균주 탐색

제 1 항 항염증 활성 평가를 위한 세포모델 확립

장 염증 완화활성을 평가하기 위해서는 후보 물질을 처리하기 위한 In vitro 모델이 필요하다. 따라서 염증을 유발한 세포모델을 확립하여 후보 물질의 탐색에 이용하였다. 염증유발 세포주로 일반 장 상피 세포주인 HT-29 는 한국 세포주은행 (KCLB)에서 분양받아 사용하였다. Positive control 로서 염증유발 물질인 염증 유발 물질로 LPS(lipopolysaccharides)를 사용하였으며 LPS처리 농도에 따른 염증활성의 정도를 측정하였다.

염증 반응의 활성 정도는 pro-inflammatory cytokine인 Interleukin 8을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하거나 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction을 시행하여 mRNA 발현 정도를 분석하였다.

HT-29 cell line에 염증반응을 일으키는 적절한 농도를 측정하기 위해 6well plate에 HT-29 cell을 1×10^6 cell/well 으로 seeding 한 후 overnight하고 안정된 HT-29 cell에 *Escherichia coli* O111:B4의 cell wall 분획물인 Lipopolysaccharide를 농도별로 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 24시간 처리 한 후 human mRNA IL-8 발현 수준을 RT-PCR을 통해 확인하였다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 는 glycolysis에 관여하는 enzyme이다. GAPDH 유전자는 발현량이 일정한 house keeping gene으로서 intra cellular control 로 사용하였다.



(그림 1) IL-8 expression level on LPS stimulated HT-29 cell.

그림 1 에서 LPS 농도가 증가할수록 IL-8 발현양이 많아지는 것을 확인할 수 있었으나 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 오히려 감소하는 경향을 분수 있다. 따라서 Cell line에 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리 하는 것으로 모델을 확립하여 다음 실험에 적용하였다.

제 2 항 Probiotic 균주의 정착능 및 세포증식성 확인

1. probiotics preparation

본 연구팀이 보유하고 있는 기본적 probiotics 능력, 내산성, 내담즙성, 콜레스테롤 저하능력이 있는 한국, 이집트 아기 분변과 김치에서 분리한 유산균주 20종을 본 연구에 적용하였다. 다양한 근원에서 분리한 유산균주를 MRS 배지에서 3회 계대 배양하여 활력을 높인 후 최종 MRS 배지에서 24시간 배양하였다. 유산균 배양액을 10,000 \times g으로 30분간 원심분리한 후 균체 (live cells)와 상등액 (conditioned medium; pH 6.5)을 회수하였다. 또한 선별된 유산균주를 동일하게 배양 후 균체를 회수하고 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 열처리를 실시함. 그것을 냉동건조하고 분쇄, 밀봉한 후 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 시료로 사용하였다 (heat killed cells). 다음은 실험에 사용된 균주 목록이다.

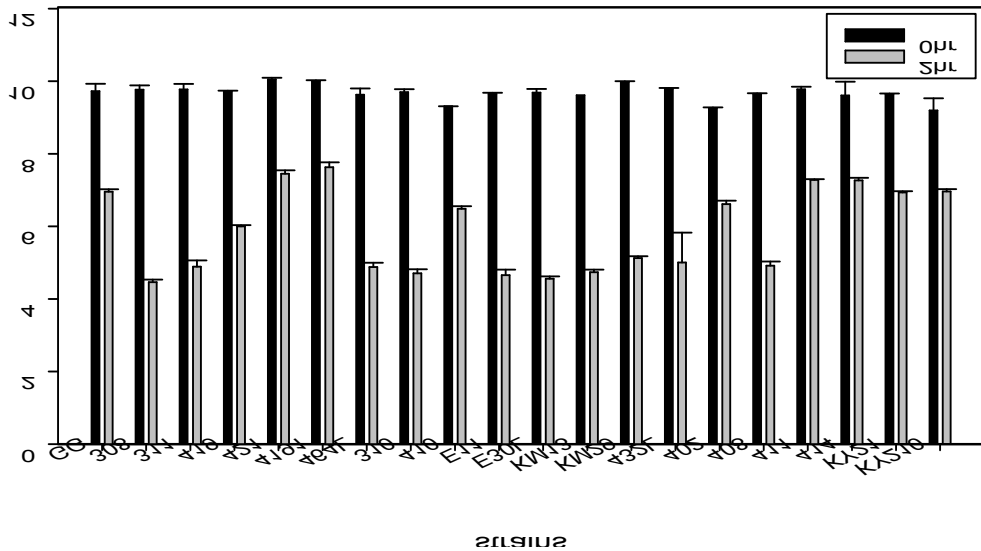
(표 1) 실험에 사용된 균주 목록

Korean infant feces(4) <i>L. plantarum</i> KM13 <i>L. plantarum</i> KM29 <i>L. brevis</i> KY21 <i>L. plantarum</i> KY210
Egyptian infant feces(5) <i>L. salivarius</i> E11 <i>L. fermentum</i> E30L <i>L. fermentum</i> E432L <i>L. fermentum</i> E464L <i>L. salivarius</i> E4191
Kim-chi(10) <i>L. salivarius</i> SWW308 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> SKR310 <i>L. fermentum</i> QWW311 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KFM402 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> MSK408 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KDK410 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KDK411 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> SRK414 <i>L. curvatus</i> KFP419 <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> KJP421

2. probiotics의 장 상피 세포에의 정착 능력 탐색

HT-29 세포는 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂ 존재 하에 37 °C에서 배양시켰다. 부착능력 실험과 부착 억제 실험을 위해 HT-29 세포는 well당 1.0×10⁵ cells/ml의 수가 되도록 12 well plate에 분주하였고 격일로 배지를 교환하며 완전하게 monolayer를 형성할 때까지 배양하여 실험에 사용하였다. 유산균의 부착능력을 확인하기 위하여 완전 monolayer를 형성한 HT-29 세포는 25 °C의 PBS buffer를 이용하여 6회 세척하고 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 1640 배지 0.5 ml을 첨가하였다. 20여종의 유산균주를 1×10⁹ CFU/ml의 농도가 되도록 RPMI에 현탁한 다음 0.5ml을 monolayer를 형성한 HT-29 cell 위에 접종하고 5% CO₂ 존재 하에 37 °C에서 2시간 배양을 실시하였다. 배양이 완료된 후 부착되지 않은 유산균의 제거와 세척에 따른 부착능력을 확인하기 위해 3분씩 200 rpm의 속도로 교반하면서 PBS buffer를 사용하여 6회 세척을 실시하였다. 세척이 완료된 후 0.2% Trypsin-EDTA를 분주하여 부착되어 있는 세포를 떼어내고 peptone수를 이용하여 연속희석법으로 MRS-agar에 평판도말하고 37 °C에서 48시간 배양하여 균수를 측정하였다. 또한, 일부 부착 확인을 위하여 70 % alcohol에 하루정도 담가 완전 살균된 cover glass를 petri-dish 바닥에 부착시킨 후 HT-29 세포를 배양하여 위와 동량의 유산균을 첨가하여 실시하였다. 세척에 의해 씻겨 내려가지 않고 HT-29 세포에 부착된

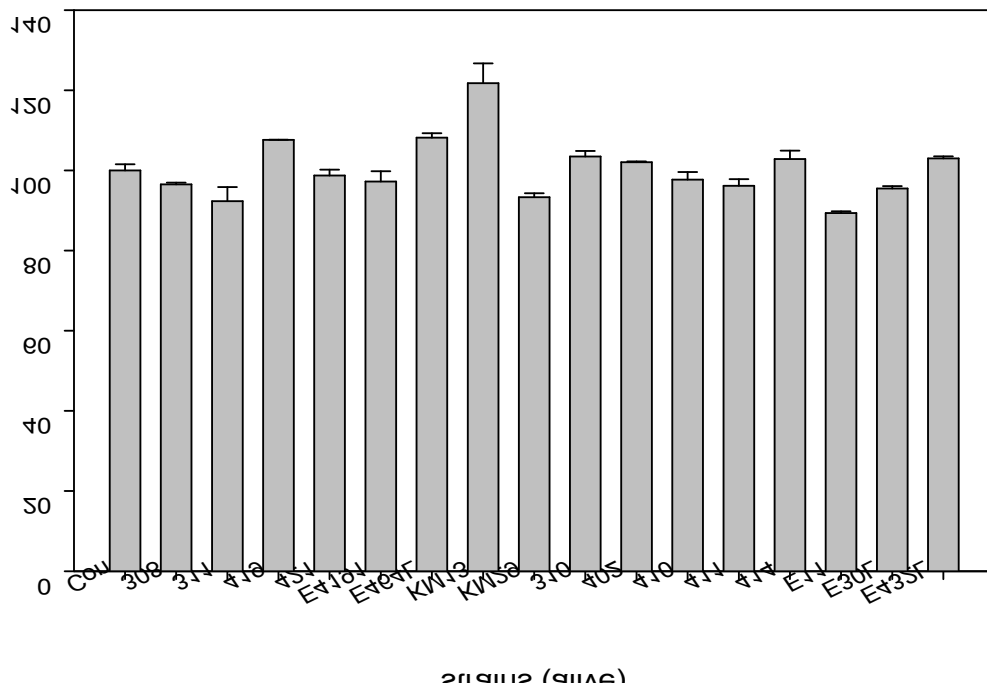
유산균주는 건조한 뒤 Gram 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 양성대조군으로 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 사용하여, 2시간 후의 장 부착능력을 비교하며 균수를 log값으로 변환하여 GG strain 보다 같거나 높은 부착능을 가진 균은 우월한 부착능력을 가진 균으로 평가하였다. 그림 2의 결과 421, 4191, 410, 402, 411, 414, KY21, KY210 유산균이 장 상피 세포에 대한 부착능이 좋은 것으로 생각되었으며, 따라서 위의 9종의 유산균이 항염증 효능이 있는 후보 균으로 선발되었다.



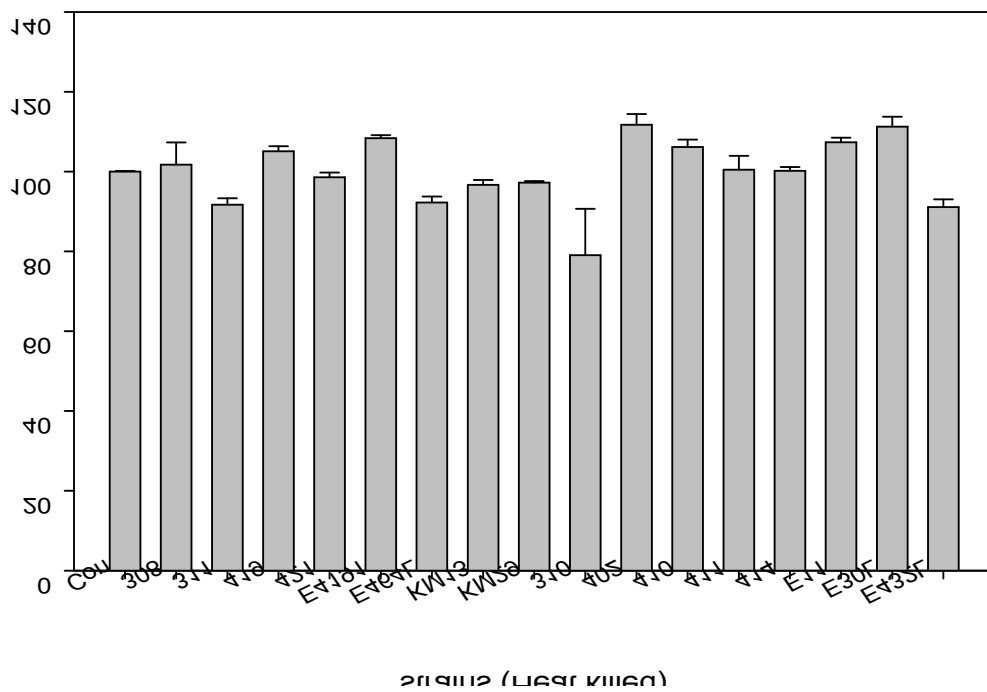
(그림 2) Attachment abilities of lactic acid bacteria to intestinal epithelial HT-29 cell line.

3. probiotics의 cell viability 측정

MTT assay를 통해 생균, 사균을 처리 했을 시 세포생존율을 측정하였다. 우선 96 well에 HT-29 cell을 1×10^4 cell/well 처리한 뒤, 잘 부착할 수 있도록 overnight 하였다. 위와 같이 준비된 생균과 사균을 1×10^5 cell/well씩 분주한 후 24시간 동안 혼합배양 한 뒤 PMS와 MTS를 1:20으로 혼합하여 MTS solution을 만들어 20 ul씩 각 well에 분주하였다. 37 °C 인공배양기에 4시간 동안 반응시킨 뒤 490 nm로 O.D. 값을 측정하여 아무것도 처리하지 않은 control HT-29 cell 의 흡광도를 100 % 로 하여 상대적인 값을 나타내었다. 생균과 사균의 경우 모두 세포에 대한 독성이 없는 것으로 나타났다.



(그림 3) Effects of live probiotics on HT-29 cell viability.



(그림 4) Effects of heat-killed probiotics on HT-29 cells viability.

제 3 항 Probiotic 균주의 항염증 효과 탐색

HT-29 세포를 6well plate에 각 well 당 1×10^6 cell 씩 분주하고 하루 동안 배양하여 안정시킨 후 3차 계대 배양하여 활성을 높인 유산균을 각 well에 1×10^7 cfu씩 항생제가 포함되지 않은 RPMI 1640+FBS 배지에 현탁한 뒤 세포주와 함께 2시간동안 5% CO₂, 37°C 배양기에 pre-treatment 하였다. 대조군은 유산균이 포함되지 않은 RPMI 1640+FBS 배지를 넣어 주었다. 염증 반응 자극제로써 *Escherichia coli* O111:B4의 cell wall 분획물인 Lipopolysaccharide 은 1 µg/ml의 농도로 양성대조군을 포함한 각 시험군에 위와 동일한 방법으로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 각 well의 supernatant는 enzyme-linked immunosorbent assay를 위해 원심 분리하여 -80 °C에 보관하고 사용하였다. 또한 RNA 수준 단백질 발현 양을 측정하기 위해 각 well은 PBS로 3회 세척한 뒤 RNA를 추출하였다.

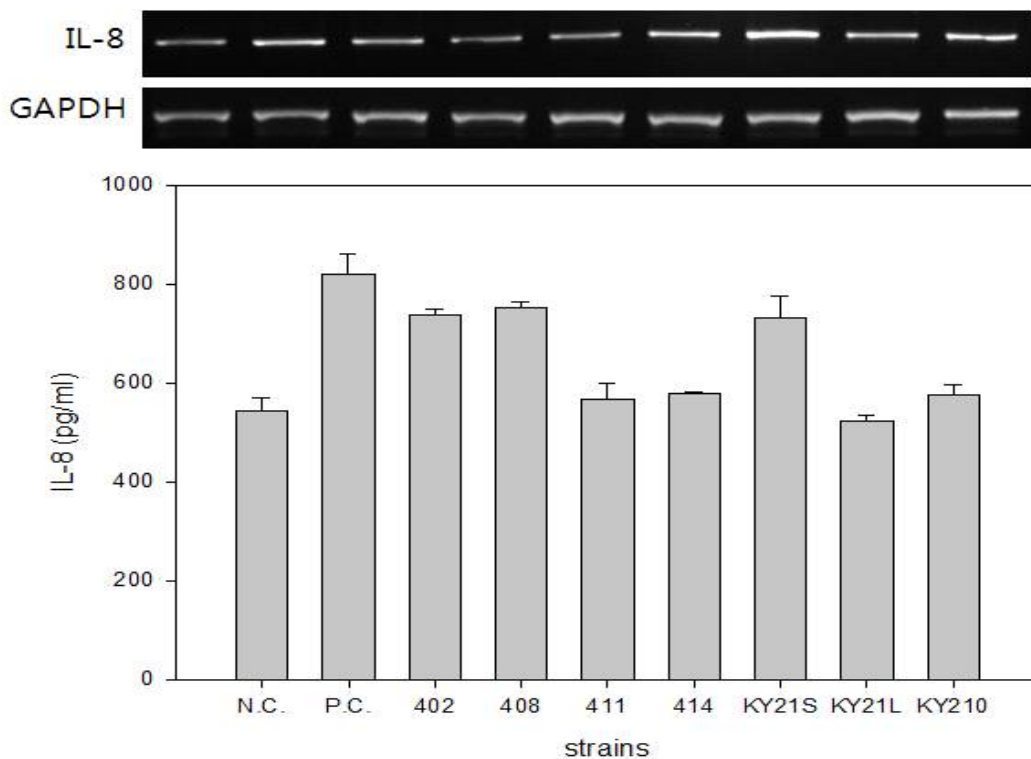
RNA 추출은 TRIzol reagent를 사용하여 실시하였다. 총 RNA양은 동일하게 1 µg으로 맞추었고, 500uM random hexamer[pd(N)6, Amersham Pharmacia Biotech], 500uM deoxynucleotide-5'-triphosphate, 50mM Tris.HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol (DTT) 와 400 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 사용하여 mRNA를 DNA로 reverse transcription하여 1 ul의 RT product를 PCR에 사용하였다. PCR은 아래와 같은 primer를 사용하였다.

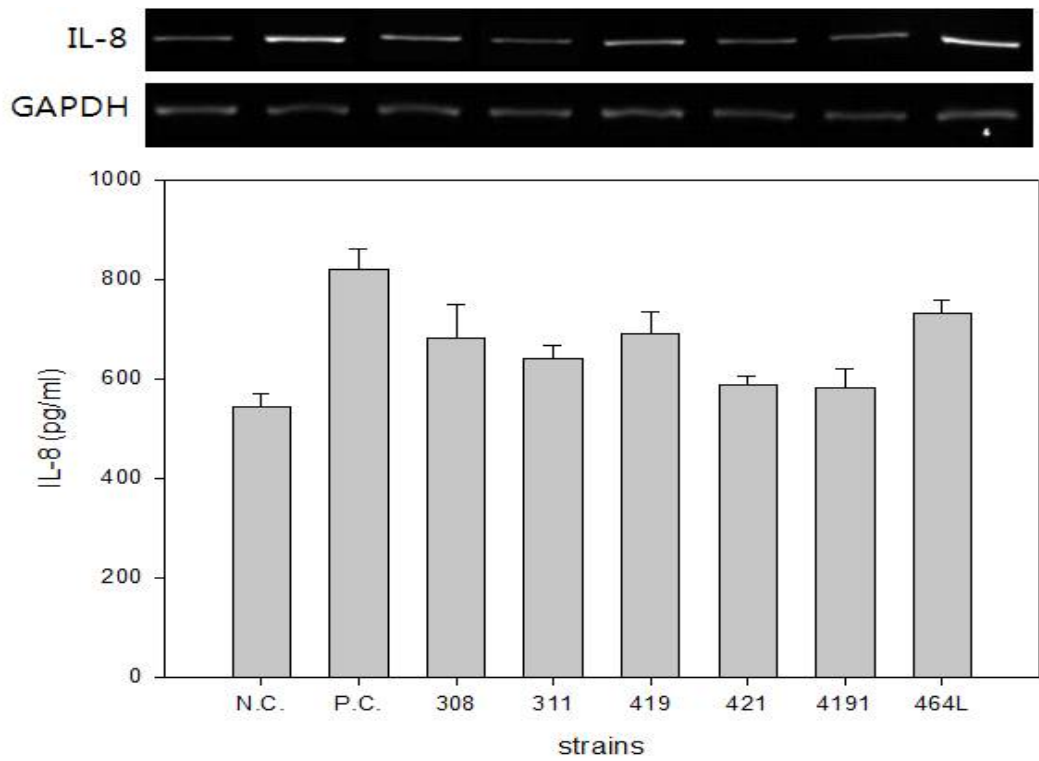
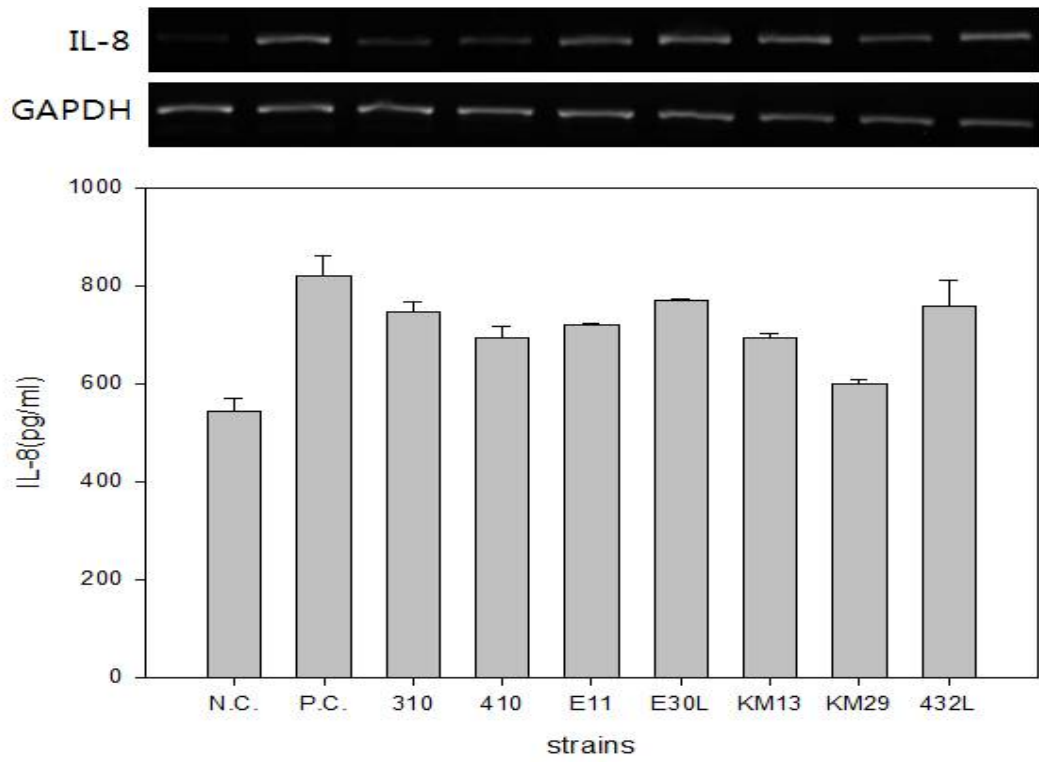
(표 2) 실험에 사용된 Primer sequence

Primer name	Sequence
IL-8 forward primer	5' GTT GTG AGG ACA TGT GGA AGC ACT 3'
IL-8 reverse primer	5' CAC AGC TGG CAA TGA CAA GAC TGG 3'
GAPDH forward primer	5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG 3'
GAPDH reverse primer	5' ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC 3'

PCR 시, primer는 10 pmol로 희석하여 사용하였다. Reverse Transcription으로 생성된 각 시험군의 cDNA 1 ul, 1 ul의 forward, reverse primer, 10×dNTP 5 ul, 10×PCR buffer 5 ul, 0.2 ul의 Tag DNA polymerase과 멸균된 증류수로 총 부피 50 ul로 맞추어 PCR을 진행 하였다. 95 °C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 30 cycle의 amplification cycle (95 °C, 30 sec → 65 °C, 30 sec → 72 °C, 30 sec)을 진행하였다.

마지막 extension은 72 °C에서 10분간 진행하였으며, GAPDH는 internal control로써 사용됨. 그 후, 각 20 ul의 PCR product는 2% agarose gel, ethidium bromide로 염색하여 전기영동을 실시하였다. 각각의 DNA band는 Kodak Digital Science ID Eletrophoresis Documentation and Analysis System을 사용하여 발현 양을 측정 하였다. 이 때, 음성대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 HT-29의 supernatant를 사용하였고 양성 대조군으로는 LPS를 24시간 동안 처리한 HT-29의 supernatant를 사용하였다. 모든 시험군은 각 strain을 2시간 동안 pre-treatment 한 후 LPS를 첨가하여 24시간 배양하였다. 양성대조군과 비교해 보았을 때, IL-8 분비량을 200 pg/ml 이상 억제 한 것(IL-8 분비량이 600 pg/ml 이하인 것, 음성대조군과 비슷한 수준의 IL-8 분비량을 보인 것)을 항염증 효과가 있는 균으로 선발하였다. 그 결과 *Leuconostoc paramesenteroides* KJP421, *Lactobacillus salivarius* E4191, *L. plantarum* KM29, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides* KDK411, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides* SRK414, *L.brevis* KY21, *L.plantarum* KY210이 선발 되어 다음 발효물 개발 대상 균주로 사용되었다.





(그림 5) Lactic acid bacteria effect on LPS-induced IL-8 secretion by HT-29 cells.

제 2 절 장 염증 완화 활성을 가지는 천연 추출물 탐색

제 1 항 항염증 활성을 가지는 천연 추출물 문헌조사

본 연구팀은 구축한 천연물 추출물 library를 high throughput screening (HTS) system에 최적화하기 위하여 각각의 추출물을 용매 분획하여 일정한 농도로 희석하여 96-well format으로 보유하고 있으며, 항염증 활성을 가진 후보 물질을 탐색하기 위하여 사전적으로 문헌조사를 실시하였다.

번호	작물명	학명	Reference
1	감초	Glycyrrhizae Radix	Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigeninasa consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and pro-inflammatory cytokines production.BrJPharmacol.154(1):165-73.
2	괴화	Sophorae Flos	Man MQ, Shi Y, Man M, Lee SH, Demerjian M, Chang S, Feingold KR, Elias PM. 2008. Chinese herbal medicine(Tuhuaextract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. Exp Dermatol. 17(8):681-7.
3	곶피	Citri unshiu Pericarpium	Kim KS, Rhee HI, Park EK, Jung K, Jeon HJ, Kim JH, Yoo H, Han CK, Cho YB, Ryu CJ, Yang HI, Yoo MC. 2008. Anti-inflammatory effects of Radix Gentianae Macrophyllae (Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshiu Pericarpium (Wenzhou migan) in animal models. Chin Med. 2:3:10.
4	진범 (진교)	Gentianae Macrophyllae Radix	Kim KS, Rhee HI, Park EK, Jung K, Jeon HJ, Kim JH, Yoo H, Han CK, Cho YB, Ryu CJ, Yang HI, Yoo MC. 2008. Anti-inflammatory effects of Radix Gentianae Macrophyllae (Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshiu Pericarpium (Wenzhou migan) in animal models. Chin Med. 3:10.

5	천황련	Coptidis Rhizoma	Kim KS, Rhee HI, Park EK, Jung K, Jeon HJ, Kim JH, Yoo H, Han CK, Cho YB, Ryu CJ, Yang HI, Yoo MC. 2008. Anti-inflammatory effects of Radix Gentianae Macrophyllae (Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshiu Pericarpium (Wenzhou migan) in animal models. Chin Med. 3:10.
6	노회	Aloe	Habeeb F, Stables G, Bradbury F, Nong S, Cameron P, Plevin R, Ferro VA. 2007. The inner gel component of Aloe vera suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. Methods. 42(4):388-93.
7	마전자	Nux-Vomica	Yin W, Wang TS, Yin FZ, Cai BC. 2003. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of Strychnos nux-vomica. J Ethnopharmacol. 88(2-3):205-14.
8	미후도	Actinidiae Fructus	Lee YC, Kim SH, Seo YB, Roh SS, Lee JC. 2006. Inhibitory effects of Actinidia polygama extract and cyclosporine A on OVA-induced eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. Immunopharmacol. 6(4):703-13.
9	계피	Cinnamomi Cortex	Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK. 2002. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. J Ethnopharmacol. 83(1-2):153-9.
10	육계	Cinnamomi Spissus	Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK. 2002. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. J Ethnopharmacol. 83(1-2):153-9.
11	구기자 (토)	Lycii Fructus	Wei Jia, Wen-yuan Gaob, Nai-qiang Cuic and Pei-gen Xiao. 2003. Anti-inflammatory effects of an herbal medicine (Xuan-Ju agent) on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats. Journal of Ethnopharmacology. 89(1):139-141.

12	봉출(초)	Zedoariae Rhizoma	Dong-II Kim, Tae-Kyun Lee, Tae-Hyun Jang and Cheorl-Ho Kim. 2005. The inhibitory effect of a Korean herbal medicine, Zedoariae rhizoma, on growth of cultured human hepatic myofibroblast cells . Life Sciences. 77(8); 890-906.
13	석창포	Acori Graminei Rhizoma	Mo SJ, Son EW, Lee SR, Lee SM, Shin DH, Pyo S. 2007. CML-1 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in endothelial cells through inhibition of IkBalpha kinase. J Ethnopharmacol. 109(1):78-86.
14	창출	Atractylodis Rhizoma	Mo SJ, Son EW, Lee SR, Lee SM, Shin DH, PyoS. 2007. CML-1 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in endothelial cells through inhibition of IkBalpha kinase. J Ethnopharmacol. 109(1):78-86.
15	연교	Forsythiae Fructus	Kang HS, Lee JY, Kim CJ. 2008. Anti-inflammatory activity of arctigenin from Forsythiae Fructus. J Ethnopharmacol. 116(2):305-12.
16	오매	Mume Fructus	Choi HJ, Kang OH, Park PS, Chae HS, Oh YC, Lee YS, Choi JG, Lee GH, Kweon OH, Kwon DY. 2007. Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Med Food. 10(3):460-6.
17	맥문동 (거심, 토)	Liriopis Tuber	Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. 2005. Liriopis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. J Ethnopharmacol. 101(1-3):144-52.
18	사삼 (잔대)	Adenophorae Radix	Roh SS, Kim SH, Lee YC, Seo YB. 2008. Effects of radix adenophorae and cyclosporine A on an OVA-induced murine model of asthma by suppressing to T cells activity, eosinophilia, and bronchial hyperresponsiveness. Mediators Inflamm. 2008:781425.

19	오약	Linderae Radix	Wang C, Dai Y, Yang J, Chou G, Wang C, Wang Z. 2007. Treatment with total alkaloids from Radix Linderae reduces inflammation and joint destruction in typeII collagen-induced model for rheumato darthritis. J Ethnopharmacol. 111(2):322-8.
20	유향	Olibanum	Gayathri B, Manjula N, Vinaykumar KS, Lakshmi BS, Balakrishnan A. 2007. Pure compound from Boswelliaserrata extractex hibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNFalpha, IL-1beta, NO and MAP kinases. Int Immunopharmacol. 7(4):473-82.
21	인삼	Ginseng Radix	Nakaya TA, Kita M, Kuriyama H, Iwakura Y, Imanishi J. 2004. Panax ginseng induces production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor. J Interferon Cytokine Res. 24(2):93-100.
22	자초	Lithospermi Radix	Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. 2004. Shikonins, phytochemicals from Lithospermum erythrorhizon, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. J Biol Chem. 279(7):5877-85.
23	조각자	Gleditsiae Spina	Dai Y, Chan YP, Chu LM, Bu PP. 2002. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from Gleditsia sinensis. Biol Pharm Bull. 25(9):1179-82.
24	행인 (거피)	Armeniacaee Semen	Chang HK, Yang HY, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS, Kim CJ, Kim OJ, Hong SP, Cho S. 2005. Armeniacaee semen extract suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase [correction of cycloosygenase]-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. Biol Pharm Bull. 28(3):449-54.

25	황기	Astragali Radix	Ryu M, Kim EH, Chun M, Kang S, Shim B, Yu YB, Jeong G, Lee JS. 2008. Astragali Radix elicits anti-inflammation via activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk. J Ethnopharmacol. 115(2):184-93.
26	황백	Phellodendri Cortex	Park YK, Chung YS, Kim YS, Kwon OY, Joh TH. 2007. Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF-alpha in LPS-stimulated microglia by methanol extract of Phellodendri cortex. Int Immunopharmacol. 7(7):955-62.

제 2 항 천연 추출물의 제조 및 항염증 효과 탐색

확보된 시료 26종을 열수추출(H₂O) 및 에탄올 추출(EtOH)하여 증발시킨 후 동결 건조하여 천연 추출물을 제조하였다. 조제과정은 다음 그림과 같다.



in vitro 상에서 염증 반응을 일으키고 그것의 억제 효과를 보기 위해 대장암 세포인 HT-29 세포를 사용함. 일반 HT-29 세포를 plate에 부착 시킨 뒤 *Escherichia coli* O111:B4의 cell wall 분획물인 Lipopolysaccharide를 염증 반응 자극제로 사용하여 24시간 반응시킴으로써 염증 반응을 일으켰다. 우선, 96well plate에 HT-29 세포를 각 well당 1×10^4 cells씩 seeding하고 overnight 하여 HT-29 cell이 monolayer를 형성하도록 함. 이때, 약 70 %의 confluency가 유지되도록 함. 각각의 천연물 샘플을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 30분 동안 95 % air + 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 pre-treatment를 진행 하고 염증 유발 물질인 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 95% air + 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 co-culture 하여 supernatant를 분리한 후 ELISA kit (Invitrogen, USA) 은 사용하여 IL-8 분비량을 비교 하였다. 음성 대조군으로써 HT-29 세포를 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1 % L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 배양하였고 양성 대조군으로써 HT-29 세포를 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1%L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지에 LPS를 24시간 첨가하여 염증반응을 유도하였다. IL-8은 염증의 정도를 나타내는 indicator로 쓰였다.

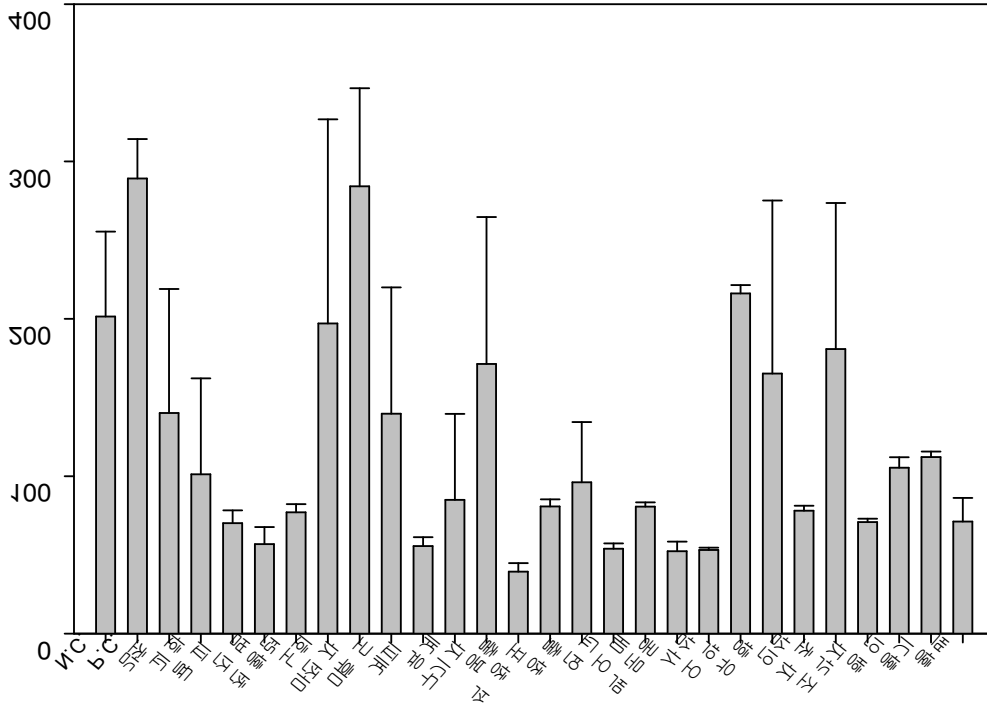


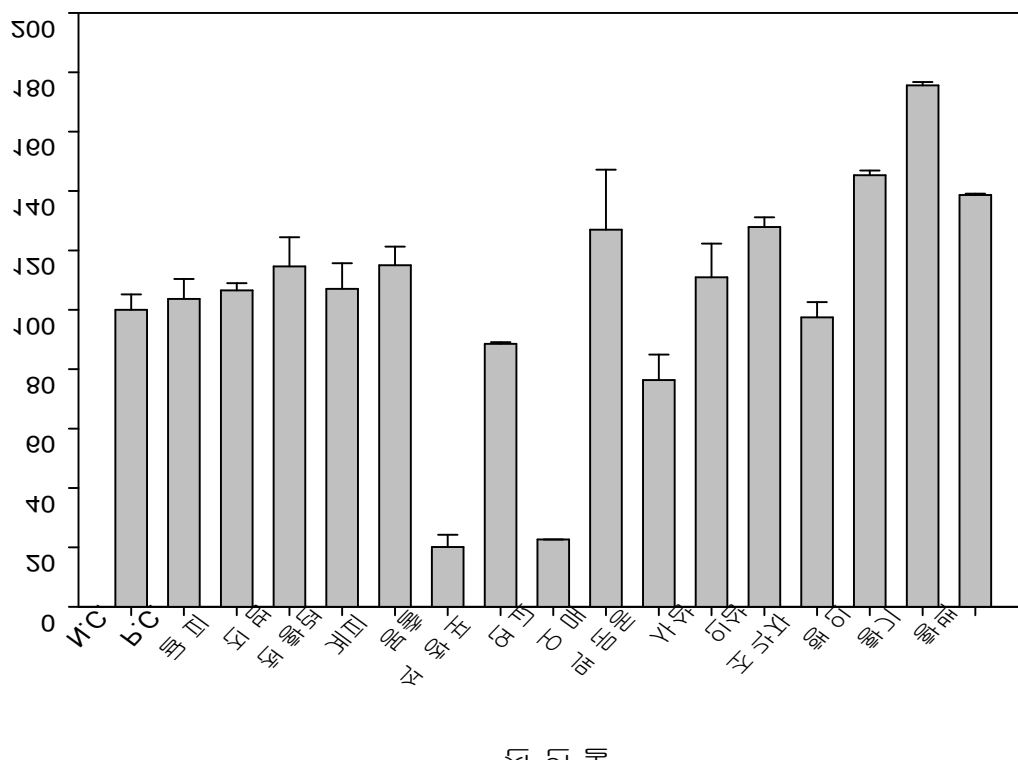
Figure 6

(그림 6) Effects of plants extract on IL-8 productions by HT-29 cells.

- 총 26 종의 천연물 중 굴피, 진범, 황련, 계피, 봉출, 석창포, 연교, 오매, 맥문동, 사삼, 인삼, 조각자, 행인, 황기, 황백 이상 15종의 천연물이 항염증 후보 물질로 선정되었다.

제 3 항 천연 추출물의 세포독성 측정

선발된 천연 추출물의 세포내에서 성장을 저해하거나 유해하게 작용하는지를 평가하기 위하여 세포독성 측정 테스트를 실시하였다. HT-29 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well 씩 분주하여 24시간동안 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1 % L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지에 배양하고, 각 천연물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 후 PMS와 MTS를 1:20으로 혼합하여 MTS solution을 만들어 20ul씩 각 well에 분주함. 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 인공배양기에 4시간 동안 반응시킨 뒤 490nm파장으로 Optical density 값을 측정하였다. 데이터는 아무것도 처리하지 않은 HT-29 cell을 100 % 으로 하여 상대적인 값을 나타내었다.

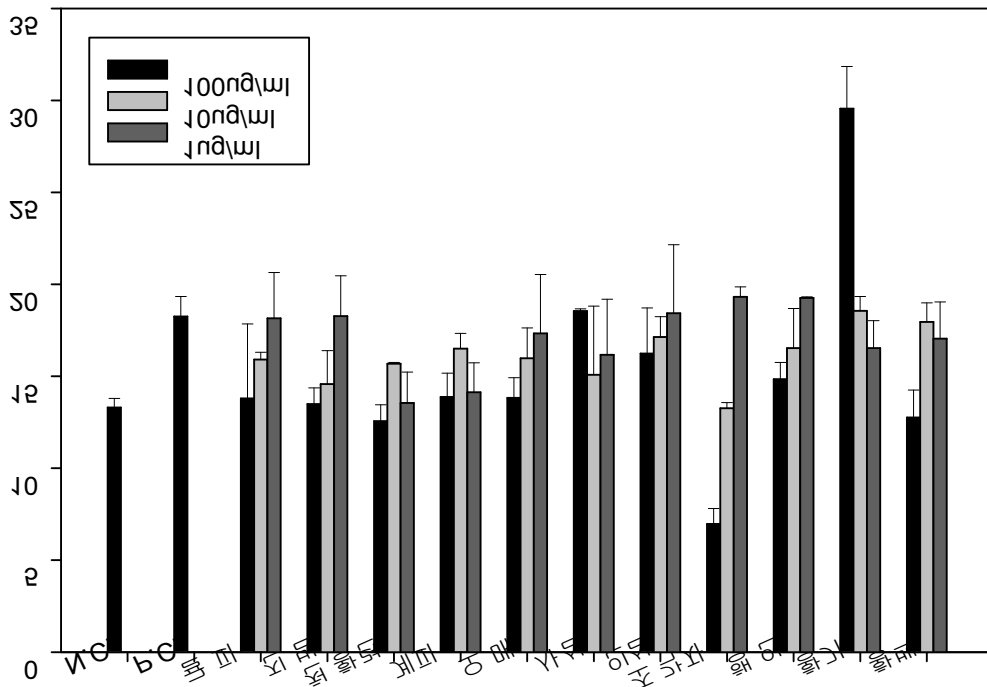


(그림 7) Effects of plant extracts on the viability of HT-29 cells.

그림 7의 실험 결과 봉출, 연교와 맥문동은 각각 80 %, 77 %, 30 % 로서 세포 생존 능력을 떨어뜨리는 것으로 보아 세포 독성이 있는 것으로 판단되어 다음 연구에서는 제외되었다.

제 4 항 선발된 후보물질의 농도별 항염증 효과 탐색

선정된 천연물을 농도 별로 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 씩 DMSO(Sigma, USA)에 희석한 뒤 세포에 처리함. 96 well plate에 HT-29 세포를 각 well당 1×10^4 cells씩 seeding하고 overnight하여 HT-29 cell 이 monolayer를 형성하도록 하였다. 이때, 약 70%의 confluency가 유지되도록 하였다. 각각의 천연물 샘플을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 30분 동안 95% air + 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 배양기에서 pre-treatment를 진행 하고 염증 유발 물질인 LPS를 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 95% air + 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 배양기에서 co-culture 하여 supernatant를 분리한 후 ELISA kit (invitrogen,USA)은 사용하여 IL-8 분비량을 비교 하였다. 음성 대조군으로써 HT-29세포를 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 배양하였고 양성 대조군으로써 HT-29세포를 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1%L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지에 LPS를 24시간 첨가하여 염증반응을 유도하였다. IL-8은 염증의 정도를 나타내는 indicator로 쓰였고 ELISA를 이용하여 측정하였다.



(그림 8) IL-8 production by HT-29 cells following plant extract and LPS treatment.

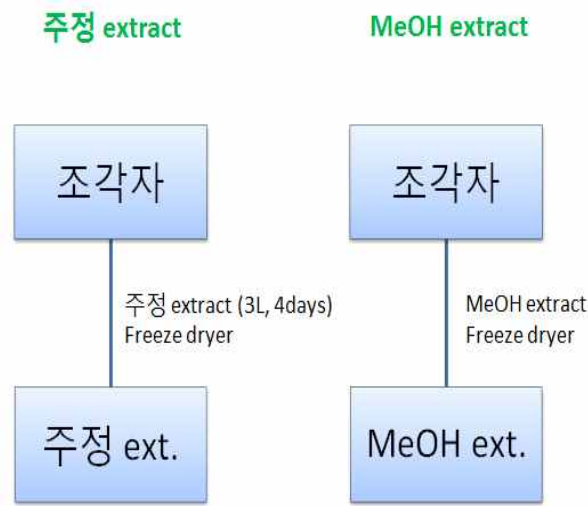
그 결과 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 천연물의 처리에도 항염증 효과를 보이는 황련, 계피, 조각자, 행인, 황백을 선발하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 항염증 효과가 큰 조각자를 선발하였다. 따라서 활성 검색 결과에 따라 96-well plate중 활성이 인정되는 well의 추출물을 확인하여 조각자를 최종 시료로 선정하였고, 시료의 raw material과 extract를 이용해 활성을 재확인하였다.

추출물 제조를 위해 선택된 조각자 시료를 freeze drying 으로 잘 건조된 상태로 준비한 후 추출효율을 높일 수 있도록 가루상태로 만든 뒤 10 0g씩을 이용해 각각 H_2O 및 EtOH 추출물을 제조하였다. H_2O 추출의 경우 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 reflux 하여 추출하였고, EtOH 추출의 경우 상온에서 이틀간 방치하여 추출하였다. 각 추출액은 evaporator를 이용해 농축한 다음 freeze dry하여 가루상태로 만들어 in vivo test 전까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

제 3 절 선발된 천연 추출물의 활성물질 분석법 및 QC방법 확립

제 1 항 최종 선발된 시료의 확보 및 추출물 제조

조각자 시료를 용매 (주정, MeOH)를 이용하여 대량 추출 후 동결건조 하여 분말형태로 만들어 제조하였다. MeOH 추출물 3 차례에 걸쳐 약 15g 를 제조하였으며 주정 추출물 약 6g 분말형태로 동결건조한 후 잘 파쇄 하여 시료로 사용하였다.

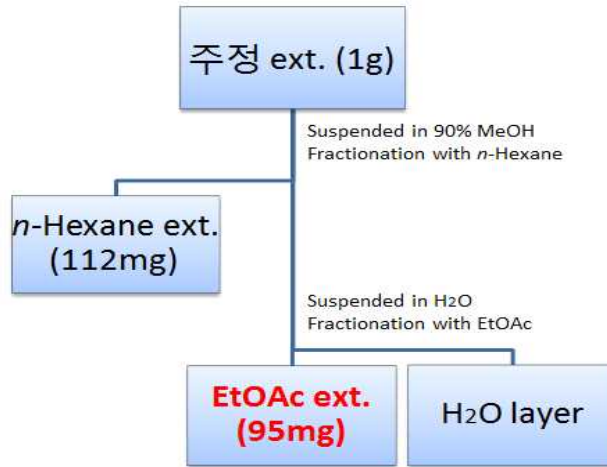


(그림 9) 조각자 sample 주정, MeOH 추출법

제 2 항 선발된 추출물의 분석법 결정

주정 추출물 partition과 UPLC/Q-Tof MS 분석 조건 확립은 조각자 주정 추출물에 함유되어 있는 Quercetin compound를 찾고 정량분석을 하기 위하여 수행하였다. Solvent를 이용한 주정추출물 partition을 진행하였는데 조각자 주정 추출물에서 Quercetin 함량이 작아 정확한 정량분석이 어려워 solvent partition을 진행하여 Quercetin의 detection 감도를 높였다. Partition을 진행하여 최종적으로 얻은 EA 추출물을 UPLC/Q-Tof MS로 분석을 진행하였으며, 추출물 내에서 Quercetin으로 추정되는 peak을 다른 물질 peak들과의 분리능을 높이기 위한 아래의 UPLC/Q-Tof MS condition을 설정하였다. (그림3)

Solvent Partition



주정 ext. 내 EtOAc ext. 추출율 (단위, mg)

$$(95/1000)*100 = 9.5\%$$

(그림 10) 분석을 위한 주정 추출물 partition

LC/MS condition

UPLC					Q-Tof																															
<ul style="list-style-type: none"> • UPLC system: Waters ACQUITY UPLC™ • Column: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 x 100mm, 1.7µm) • Mobile phase A: 0.1% FA in Water B: 0.1% FA in Acetonitrile • Flow rate: 300µl/min • Injection volume: 5µl • Column temperature: 35°C • Gradient condition: 					<ul style="list-style-type: none"> • Capillary (V) 3300.0 • Sample Cone (V) 40.0 • Extraction Cone (V) 0.6 • Desolvation Temp (°C) 300.0 • Source Temp (°C) 100.0 																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Flow rate (µl/min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>Curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3.00</td> <td>300</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3.70</td> <td>300</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3.80</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>					Time (min)	Flow rate (µl/min)	% A	% B	Curve	Initial	300	80.0	20.0		3.00	300	0.0	100.0	6	3.70	300	0.0	100.0	6	3.80	300	80.0	20.0	6	5.00	300	80.0	20.0	6	<ul style="list-style-type: none"> • TOF Flight Tube (V) 5630.0 • Reflectron (V) 1730.0 • Pusher 860.4 • Puller 650.0 	
Time (min)	Flow rate (µl/min)	% A	% B	Curve																																
Initial	300	80.0	20.0																																	
3.00	300	0.0	100.0	6																																
3.70	300	0.0	100.0	6																																
3.80	300	80.0	20.0	6																																
5.00	300	80.0	20.0	6																																
					<ul style="list-style-type: none"> • Start Mass 100.0 • End Mass 1500.0 • Start Time (min) 0.0 • End Time (min) 5.0 • Scan Time (sec) 0.48 • InterScan Time (sec) 0.1 																															

(그림 11) UPLC/Q-Tof MS condition

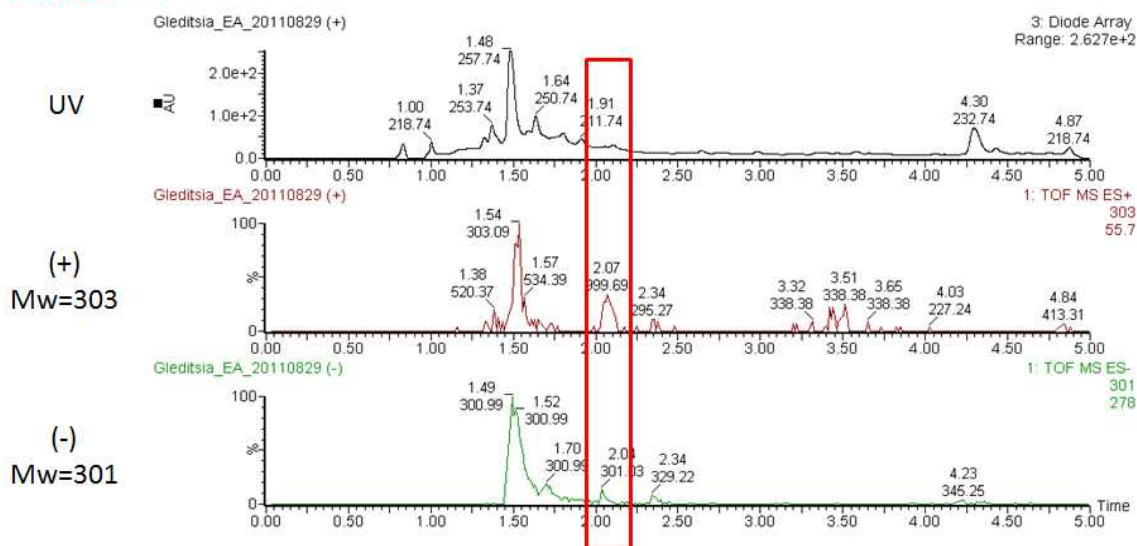
제 3 항 추출물 내 기준물질의 확인

주정추출물 내 기준물질인 Quercetin compound 의 확인은 다음과 같이 진행하였다. Partition 을 진행 후 얻은 EA 추출물을 확립된 조건으로 UPLC/Q-Tof MS 분석을 하였을 때 (그림 4) Quercetin 이 존재하는지 확인을 위하여 다음의 두 가지 검증 실험을 진행하였다.

1. 추출물과 standard compound 를 같은 조건으로 분석한 후 UV 상(369nm)에서 peak 의 retention time 과 UV pattern 비교 (그림 12)
2. Positive, negative 두 mode 에서 MS/MS 기법을 이용하여 target 물질(Quercetin)의 이온화 pattern (MS spectrum 의 fragment)을 비교 (그림 13, 그림 14) 위의 두 가지 검증을 통하여 EA 추출물 내에 Quercetin 이 존재함을 확인하였다.

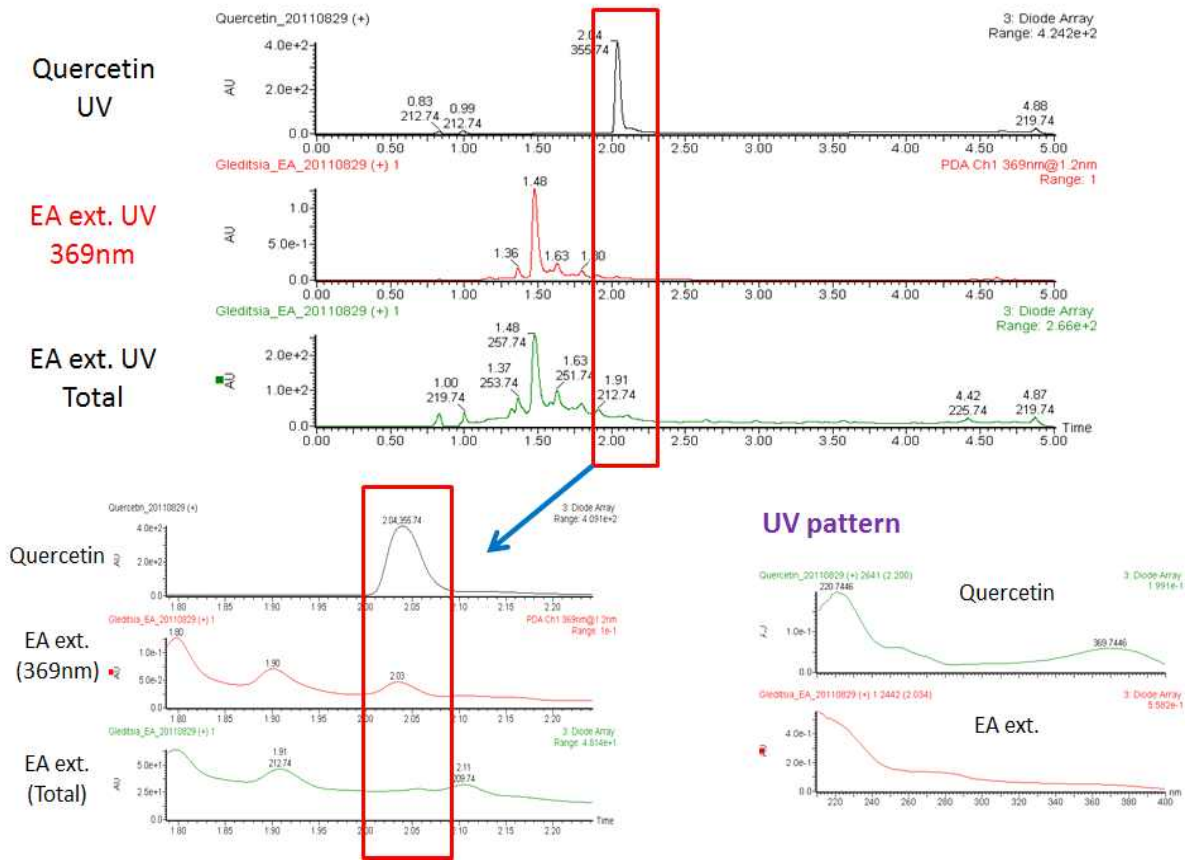


EA ext.
20-100%_3min



(그림 12) EA 추출물 UPLC/Q-Tof MS 분석 (SIM mode; select ion mode)

EA ext. & Quercetin UV 비교
20-100_3min

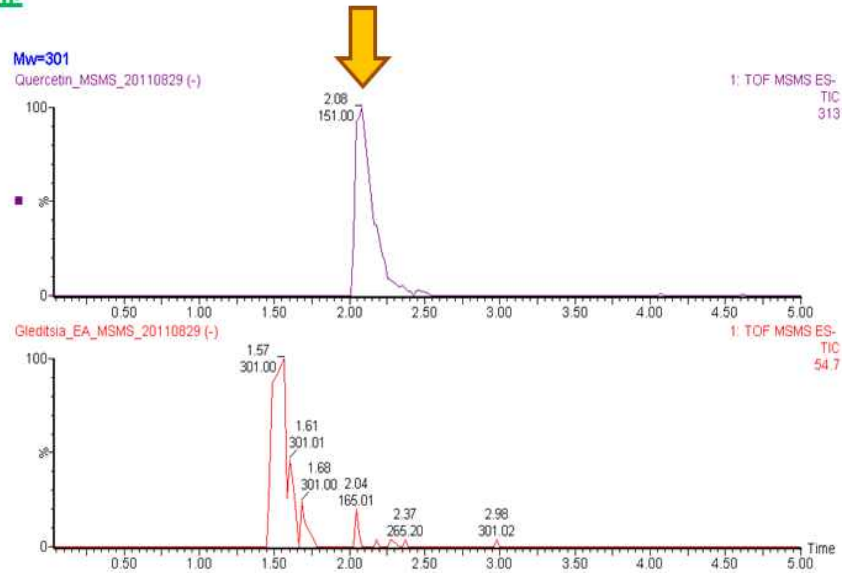


(그림 13) EA 추출물과 Quercetin standard compound 간의 UV retention time, UV pattern 비교 (369nm)

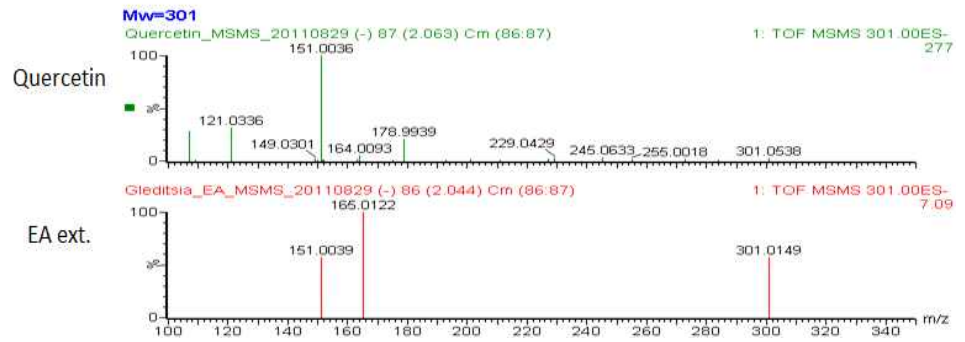
EA ext. & Quercetin MS 비교
20-100%_3min
Negative mode

Quercetin
MS/MS (Mw=301)
(-)

EA ext.
MS/MS (Mw=301)
(-)



MS spectrum

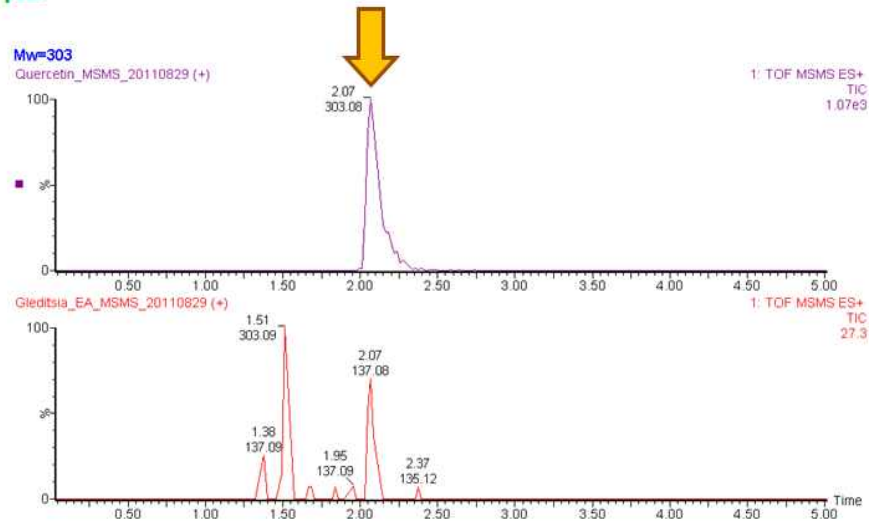


(그림 14) Negative Ion mode에서 EA 추출물과 Quercetin standard compound의 MS/MS 분석. MS spectrum의 pattern 비교

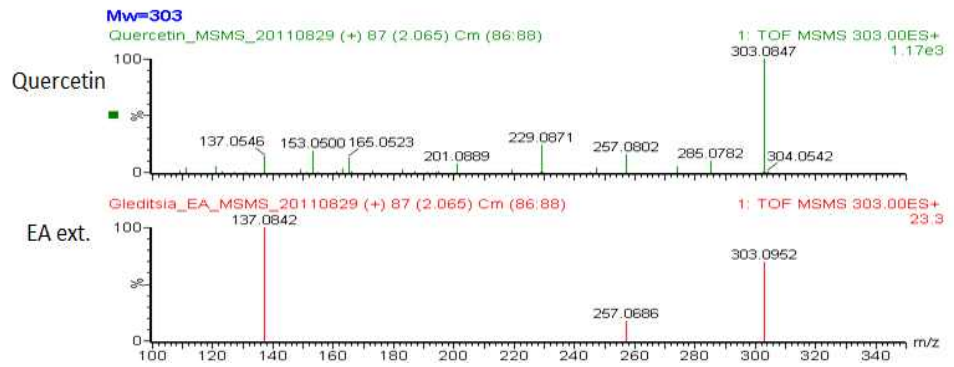
EA ext. & Quercetin MS 비교
 20-100%_3min
 Positive mode

Quercetin
 MS/MS (Mw=303)
 (+)

EA ext.
 MS/MS (Mw=303)
 (+)



MS spectrum



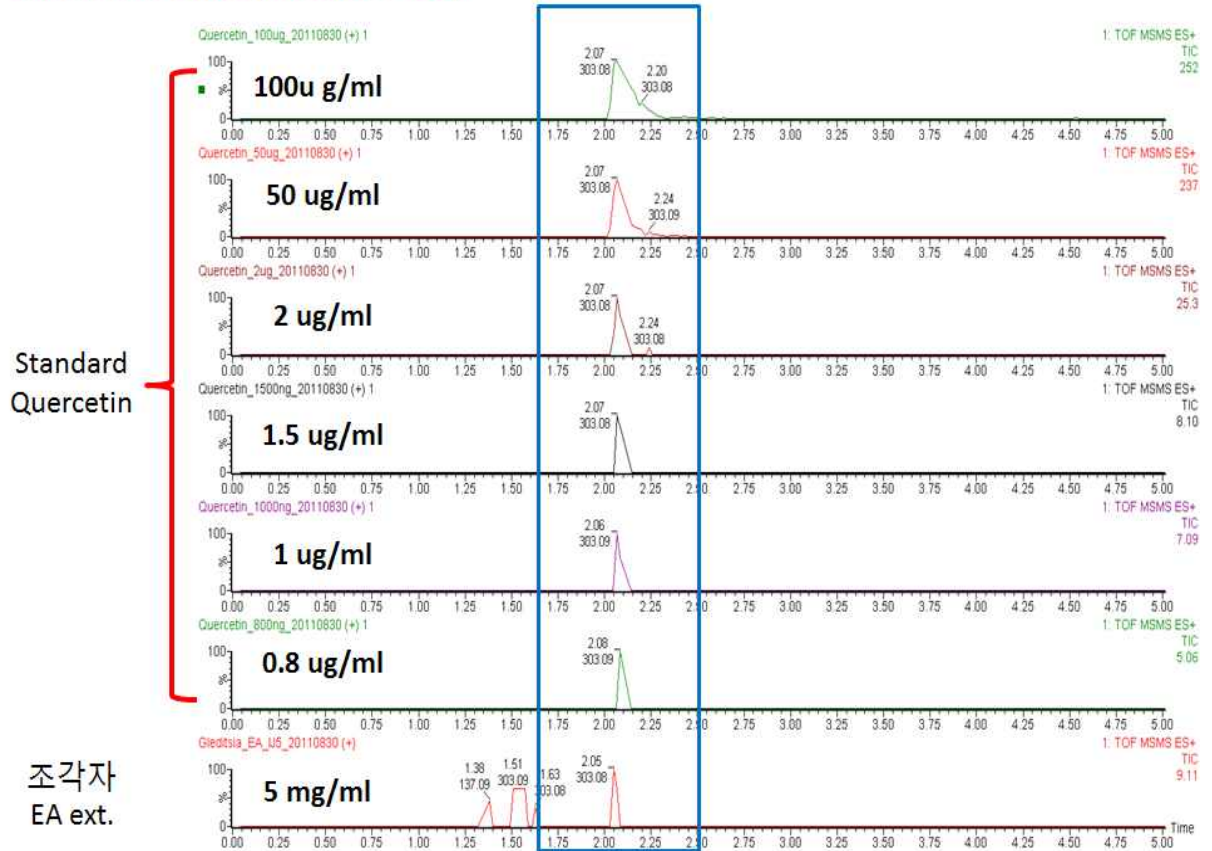
(그림 15) Positive Ion mode에서 EA 추출물과 Quercetin standard compound의 MS/MS 분석. MS spectrum의 pattern 비교

제 4 항 Quercetin의 calibration curve와 EA 추출물 내 Quercetin 정량분석

조각자 추출물에서 Quercetin 이 함유되어 있음을 검증하였고 이에 따른 추출물 내에 Quercetin 함량분석 진행하였다. Quercetin standard compound 의 calibration curve 를 만들고 추출물 내에서의 정량 분석을 실시하였다. Quercetin standard compound 에서 5 개씩 다른 농도의 sample 을 만들어 동일 조건에서 분석 후 (그림 16) MS chromatogram (Positive Ion mode, Mw=303) 에서 각 peak 의 intensity (area)값을 구해 (표 3) calibration curve 를 완성하였으며, 만들어진 calibration curve 에 EA 추출물 내에서 Quercetin compound peak 의 intensity 값을 대입하여 상대적 함량 분석을 진행하였다. (그림 17)

정량분석 결과 조각자 EA 추출물에서 Quercetin 함량이 0.19%로 나타났으며, 조각자 주정추출물에서 EA fraction 추출률이 9.5% 임으로 최종적으로 조각자 주정추출물에서 Quercetin 의 함량은 약 0.02%로 분석되었다

EA ext. & 농도별 Quercetin MS Chromatoram
 20-100%_3min
 SIM mode: Positive mode (Mw=303)

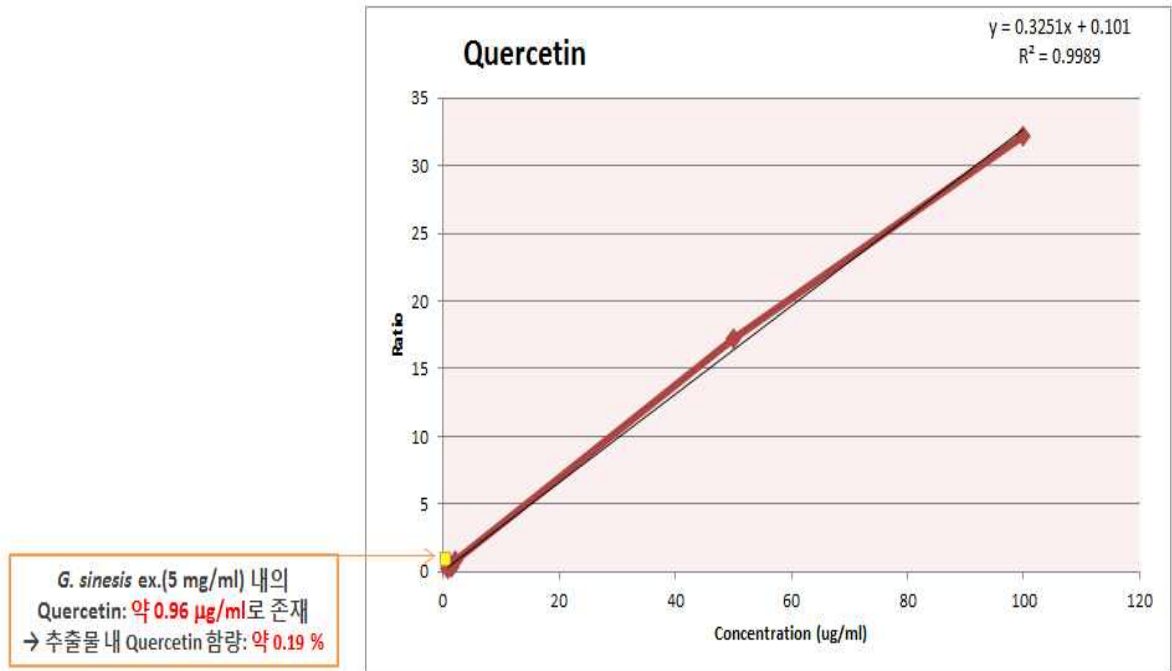


(그림 16) Positive Ion mode에서 Quercetin standard compound의 농도별 chromatogram과 조각자 EA 추출물에서의 Quercetin chromatogram

(표 3) 농도에 따른 intensity (area)값

	Concentration	Area
Standard Quercetin	100 ug/mL	32.181
	50 ug/mL	17.225
	2 ug/mL	0.801
	1.5 ug/mL	0.393
	1 ug/mL	0.293
	0.8 ug/mL	0.201
EA ext.	5 mg/mL	0.284

Linearity (Calibration curve)



Analyte	Linear range (ug/mL)	Calibration equation	Correlation coefficient
Quercetin	0.8 - 100	$y = 0.3251x + 0.101$	0.998

- EA 추출물 내의 Quercetin 함량: 0.19%
 - 조각자 주정 추출물 내 EA 추출율: 9.5%
- ➔
- 주정 추출물 내 Quercetin 함량
0.01805% (약, 0.02%)

(그림 17) Calibration curve와 추출물 내 Quercetin 함량

위의 실험을 통하여 항염증 활성이 뛰어나다고 선발된 천연추출물 조각자에 대하여 용매(MeOH, 주정)를 이용한 대량 추출 system 을 구축하였다. 또한 조각자 내에 존재하는 생리활성 물질인 Quercetin 에 대한 UPLC/Q-Tof MS 분석을 통하여 Quercetin 에 대한 검증법을 확립하였으며, 표준물질의 Calibration curve 은 통하여 조각자 내의 Quercetin 함량을 분석하였다.

제 4 절 선발된 물질의 세포, 단백질 수준 및 동물실험에서의 항염증 효과 검증

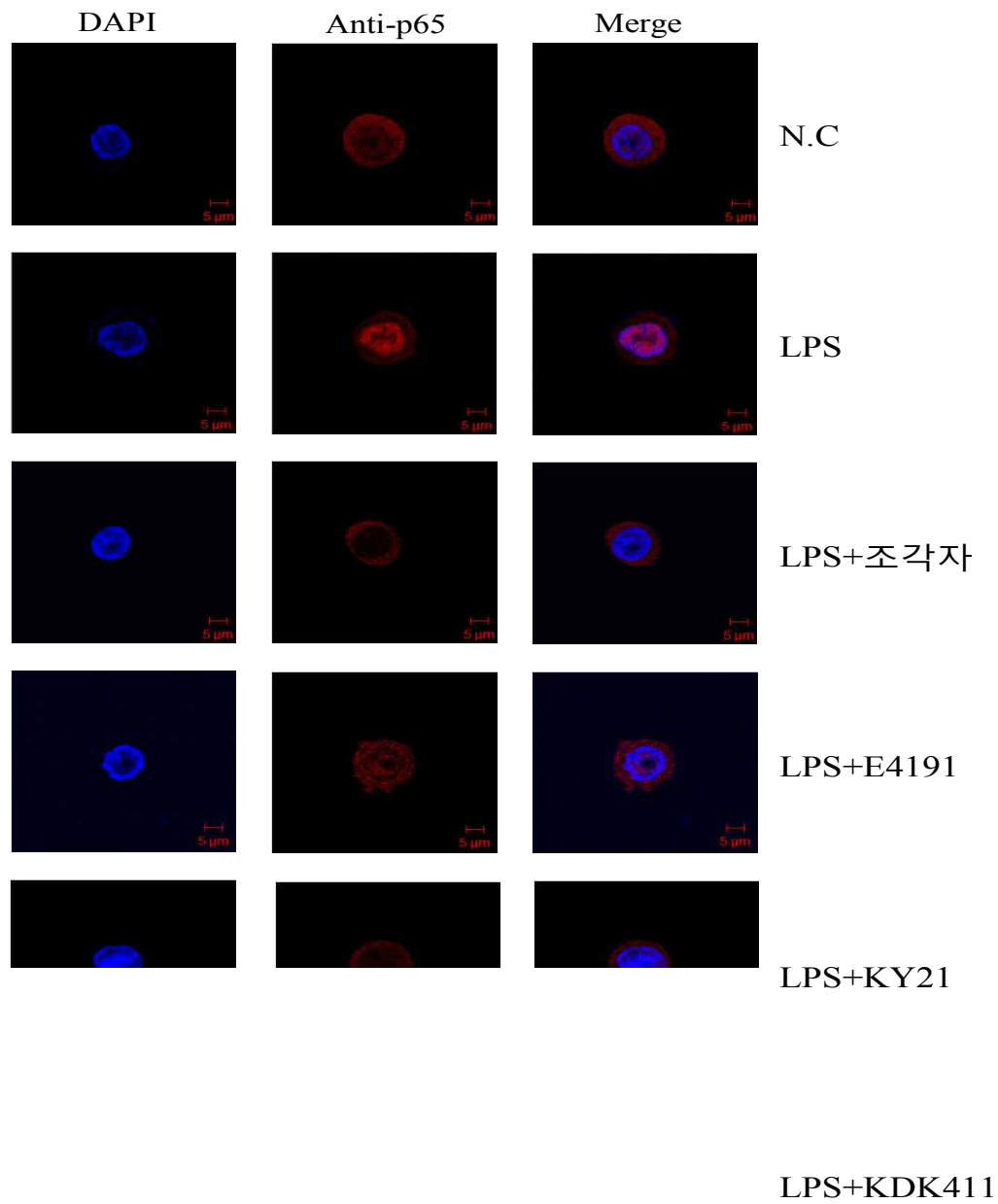
제 1 항 세포수준에서 항염증활성 검증

1. Probiotics preparation

항염증 활성을 가지는 것으로 확인된 3균주 *Lactobacillus salivarius* E4191, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides* KDK411, *L.brevis* KY21 은 MRS 배지에 3회 배양하여 활력을 높인 후 최종 MRS 배지에서 24시간 배양하였다. 유산균의 보관은 10% 탈지분유, 3% Lactose, 0.3% Yeast extract를 첨가하여 현탁한 후 동결건조하여 -80℃에서 보관하였다.

2. NF-κB translocation

Probiotics의 항염증 실험 중 최종 선발된 *Lactobacillus salivarius* E4191, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides* KDK411, *L.brevis* KY21 을 대상으로 실험을 진행하였다. 또한, 천연추출물 중 in vitro 항염증 활성이 가장 뛰어난 조각자를 선별하여 항염증 효능 입증 실험에 사용하였다. 우선 HT-29 cell line을 이용 커버 슬라이드가 부착된 6 well plate 은 이용 10^5 CFU 가 되도록 seeding 한 후 열 비 활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂ 존재 하에 37 °C에서 배양시켜 사용하였다. 각각의 cell 에 활성을 높인 KY21, KDK411, E4191 은 10^6 CFU/ml 씩 2시간 처리 후 PBS 은 이용 3회 세척함. 이 후 염증 유발 인자인 1 μg/ml LPS를 처리 24시간 배양 하여 측정하였음. 조각자 또한 IL-8 감소 효과를 보인 100 μg/ml 의 양을 이용 30분 처리 후 1 μg/ml의 LPS를 처리 24시간 배양하였다. 또한 HT-29 cell 에 LPS만을 처리한 것과 처리 하지 않은 것을 각각 No stimulate, stimulate 라고 설정한 후 실험을 진행하였다. 이에 LPS 처리 24시간 후 PBS 은 이용 3회 세척 한 후 실온에서 4% formaldehyde 은 이용 30분간 반응시켜 cell을 고정 시켰다. PBS를 이용하여 여러 번 세척 후 염색을 위해 HT-29 cell에 block solution(3% bovine serum albumin in PBS) 을 만들어 실온에서 1시간 동안 shaking 하며 반응시켰다. 3% BSA(bovine serum albumin)과 PBS를 1 : 200 으로 희석한 항체 Rabbit anti- α -p65(santaacruz)를 4 °C에서 overnight 처리하였다. PBS 를 이용하여 세척 후 HT-29 cell 을 Alexa fluor 592 conjugated anti-rabbit IgG 을 실온에서 1시간 반응시켰다. 핵의 visualization 을 위해 DAPI 염색을 실시한 후 confocal microscopy on a LSM5 EXCITER (carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)를 이용하여 측정하였다.



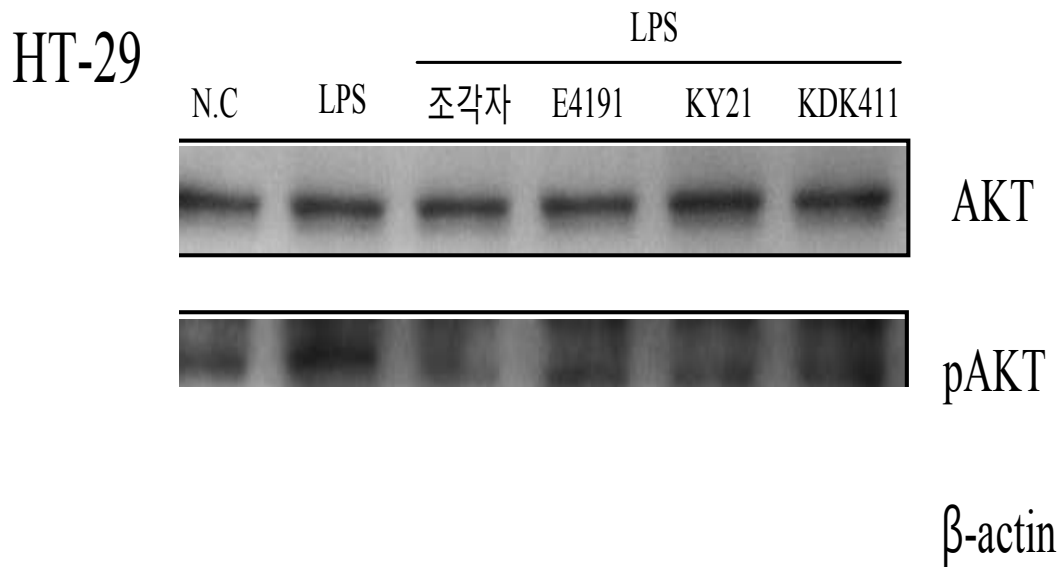
(그림 18) Confocal 을 이용한 NF- κ B translocation

그림 18 에서 보듯이 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 LPS를 처리한 그룹에서 p65 antibody를 통하여 세포 내부로 들어가는 p65 protein 을 확인하였다. NF- κB 는 DNA의 전사를 조절하는 단백질로서 염증반응에 의하여 핵으로 들어간다. 핵으로 들어간 NF- κB 는 DNA의 target gene 으로부터 염증반응을 매개하는 mRNA 를 통하여 단백질을 합성하게 된다. 이러한 일련의 반응이 염증반응을 통하여 활성화 되는 것이다. 그러나 LPS+ 조각자 처리구 및 LPS+KY21 처리구에서는 NF- κB 의 subunit 인 p65 가 핵으로 들어가는 것을 억제하였다. 이는 세포핵으로의 NF- κB 의 이동을 억제 하는 것을 의미하는 것이다.

다른 처리구(LPS+E4191, LPS+KDK411) 는 LPS 처리구에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 조각자 및 KY21의 항염증 활성을 확인하였다.

3. MAP kinase 인산화

HT-29 세포는 6 well plate를 이용 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂ 존재 하에 37 °C에서 배양시켜 mono-layer를 형성시켰다. 이후 계대배양을 통해 활성을 높인 E4191, KDK411, KY21 를 각각 10⁷ CFU/ml씩 cell 에 2시간 처리 후 PBS 로 세척 한 후 Western blotting을 실시하였다. 또한 조각자 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 HT-29 cell 에 처리한 후 30분 반응시킨 뒤 각각의 cell 에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 처리하였다. 24시간 5% CO₂ 존재 하에 37°C에서 배양시킨 후 시료로 이용하였다. 24시간 후 cell을 PBS 로 세척 후 원심 분리하여 회수하였다. Total Akt anti body(cell signalling), pAkt antibody(cell signalling) 을 이용하여 western blotting을 실시하였다. western blot 은 처리한 HT-29 의 추출물을 cell lysis solution (50mM Tris, pH 7.2 150 mM NaCl, 1%triton X-100)에 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 phenylmethylsulfonyl fluoride, phosphatase inhibitor cocktail(Sigma) hk protease inhibitor cocktail(EMD Chemicals. Inc., Gibbstown, NJ, USA)를 첨가 한 후 cell을 분해시켰다. 이 후 lysates 를 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis한 후 Immobilon P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)에 옮긴 후 antibody를 이용 Immunoblot 을 실시하였다. immunoreactive band는 ECL system 을 이용 시각화하였다.



(그림 19) Western blot 을 이용한 pAKT 인산화

그림 19 에서 보듯이 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 처리한 HT-29 cell 에 조각자를 전 처리했을 때 pAKT 의 level 이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 조각자 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리함에 따라 염증에 관여 하는 인자 AKT의 인산화를 억제함으로써 염증 반응의 전달을 억제하는 것으로서 항염증 활성이 있는 것으로 사료된다.

제 2 항 세포수준에서 항염증활성 검증

1. IEF 및 Equilibration

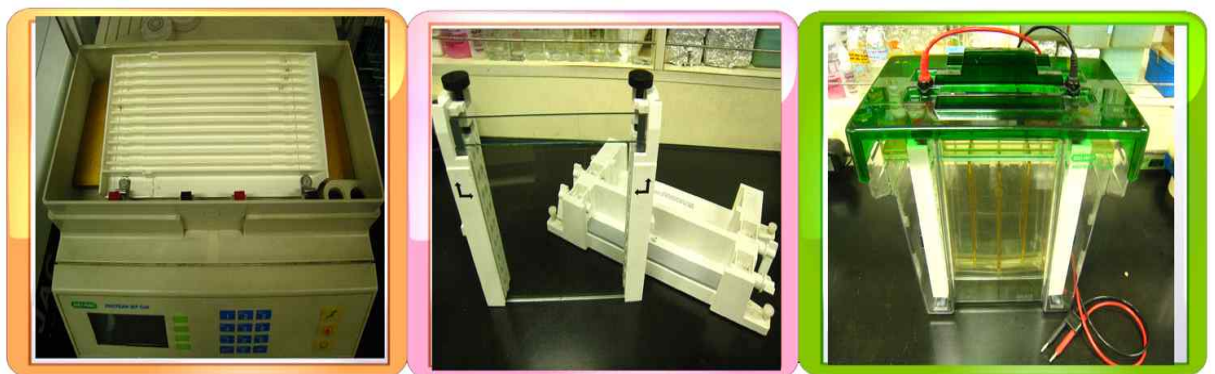
HT-29 세포는 열 비활성화된 10% 우태아혈청 (FBS), 1% L-glutamine, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 (Thermo, USA) 배지를 이용하여 5% CO₂ 존재 하에 37 °C에서 배양시켰다. KY21 을 10⁷ CFU/ml 의 농도로 2시간 pretreat 하고 PBS로 세척 한 후 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리 24시간 배양, 회수 한 후 분석하였다. 조각자는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 30분 pretreat 후 LPS 를 처리 하고 24시간 배양 측정 함. LPS만을 처리한 것과 아무 처리도 하지 않은 것을 각각 no stimulate, stimulate 로 지정 하여 분석함. 24시간 배양 후 cell 을 원심 분리하여 회수하였다. 회수된 cell 의 상등액을 제거 후 lysis buffer 를 첨가 sonication 시켜 파쇄 시켰다. 이 후 원심분리 하여 상등액을 분리함. 파쇄 된 soluble 형태의 단백질에 ice-cold phenol 을 첨가한 후, vortex 10초간 실시하여 현탁하였다. 70 °C water bath 에서 10분간 정치한 후. ice에서 2분간 정치하여 잘 섞어준다. 1.5ml tube 에 담고 14,000rpm 10분 원심 분리하였다. 수용액 층을 분리 후 증류수를 첨가 후 vortexing 하였다. 다시

70 °C water bath 에 정지한 후 Ice에 정지하여 식힌 후 원심분리 하였다. 상등액을 제거 후 ice cold acetone을 첨가 vortex 한 후 4 °C 에서 침전시켰다. 침전을 확인 후 원심분리를 통해 상등액을 분리 후 air dry를 실시 완전히 건조시켜 시료로 사용하였다. protein concentration assay를 통해 정량 한 후 Rehydration buffer 와 섞어 IPG strip(17cm, pH3-10 NL, Biorad)에 20 °C Rehydration 을 12 시간 실시한 후 IEF를 실시하였다.

2. 2D gel electrophoresis

Clamp를 이용하여 유리 plate를 spacer 와 함께 고정하여 gel casting stand를 조립 하였다. cams를 조절 하여 고정된 유리 plate와 casting stand gasket을 조립 하여 sealing 하였다. 12.5 %의 농도로 running gel (Monomer solution, 4X running gel buffer, 10% SDS, ddH₂O, 10% Ammonium persulfate, TEMED) 을 제조하여 gel casting stand 에 넣어 gel 을 준비하였다. IEF 가 끝난 IPG strip 을 Equilibration 시킨 후 gel 위에 위치시켰다. 0.5% agarose 에 0.1 % Bromo phenol blue를 섞어 sealing 하였다. 이후 tank buffer를 채운 전기영동 시스템을 이용하여 gel 을 running 시켰다.

2DE electrophoresis system



Rehydration, IEF



Assemble the stand, Gel

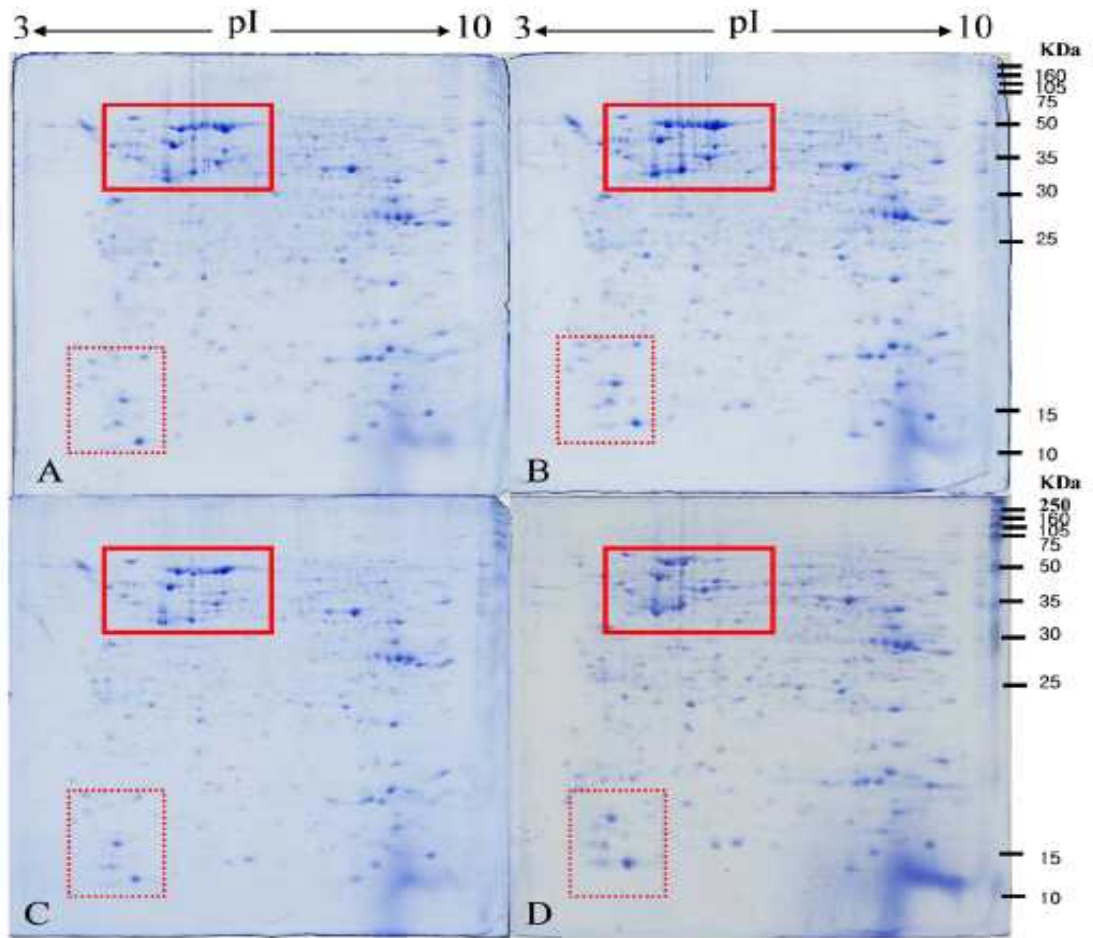


2DE electrophoresis

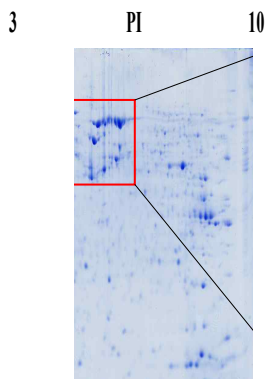
(그림12) 2D gel electrophoresis system

3. Staining

전기영동이 끝난 gel 을 조심스럽게 Fixation solution(20%MeOH, 10%phosphoric acid)을 이용하여 fixation overnight. 10분씩 3회 세척하였다. 이후 Coomassie Blue solution(10 % phosphoric acid, 10 % ammonium sulfate, 0.12 % Coomassie blue G-250, 20 % anhydrous methanol) 을 만들고 이후 24시간 이상 정치하여 염색하였다. 염색 후 10분 간격으로 3회 세척 후 Image Scanner (UMAX, GE)를 이용하여 이미지화 하였다.

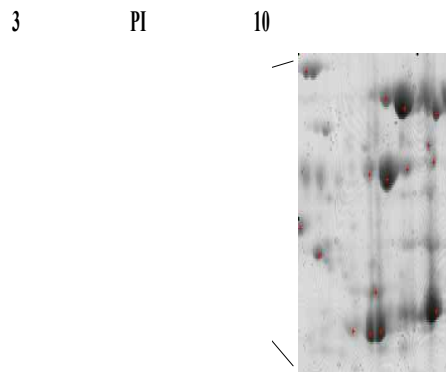


(그림 20) 2D gel electrophoresis images



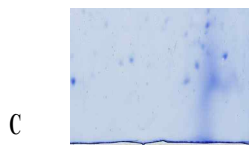
A

3 PI 10



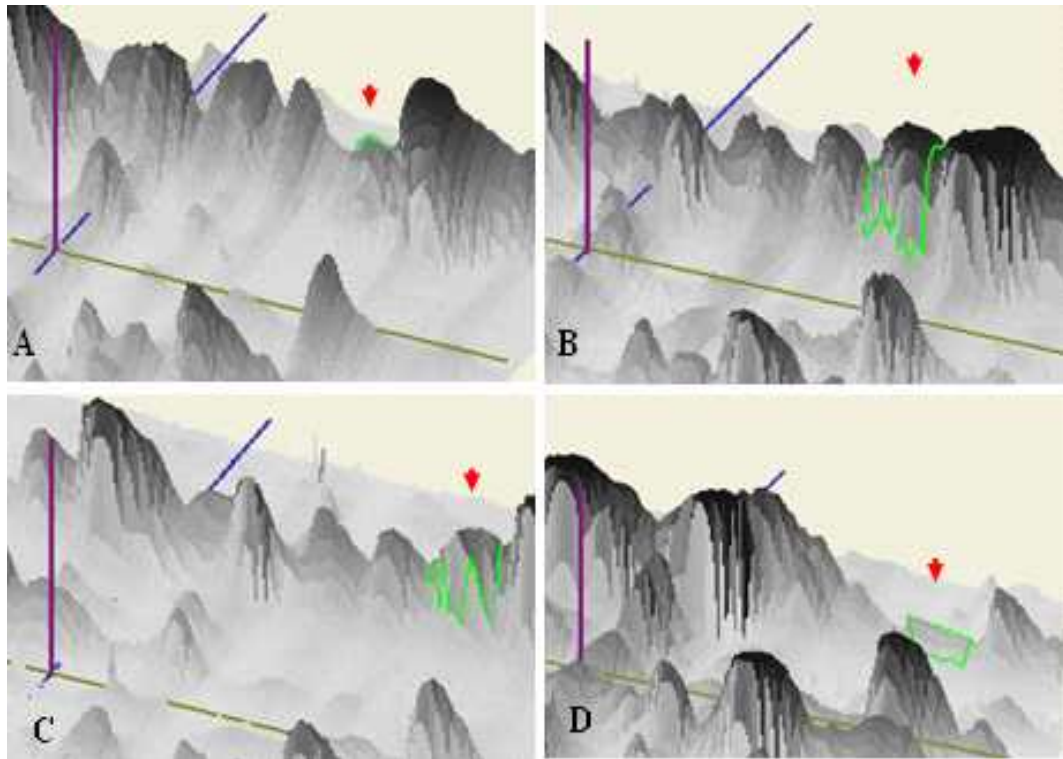
B

3 PI 10



D

(그림 21) 2D gel electrophoresis images of protein extract



(그림 22) 2D gel electrophoresis images of protein extract

No stimulate(A), 1 μ g/ml LPS(B), 조각자(C), KY21(D)를 각각 처리한 후 단백질 수준의 변화를 Image master 2D platinum 6.0 software를 이용 각각의 image의 spot을 확인한 후 3D변환으로 단백질 발현 수준의 차이를 확인하였다

제 3 항 장염증 동물모델에서 후보물질의 효능 검증

항 염증효과가 있는 것으로 선발된 Probiotic 균주 *L. brevis* KY21 과 천연추출물 조각자를 이용하여 소동물 모델에서 검증을 하였다. 소동물 모델은 검증하려는 시료를 1~2주간 투여한 뒤 장에 인위적으로 염증유발물질을 투여하여 장내 염증을 유발하였다. 그 뒤에 장질환에 따른 병변이 어떻게 변화하는지를 측정, 평가하였다.

1. 동물실험 설계

8주령 암컷 Balb/c 쥐를 샘타코에서 구입하였다. 쥐들은 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22℃의 사육실에서 적응기간을 가졌다. 쥐들은 6개의 그룹으로 나뉘었는데, 첫 번째 그룹은 4% DSS(분자량 5000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)를 물에 섞어서 자유급수 했고, 두 번째 그룹부터 다섯 번째 그룹까지는 4% DSS를 자유급수 하면서 각각 20 mg/kg bw의 농도의 조각자, KY21 균주 10^9 CFU/ml, 50 mg/kg bw의 농도의 sulfasalazine, 10 mg/ml의 조각자와 함께 KY21 균주 10^6 CFU/ml을 처리하였다. 여섯 번째 그룹은 PBS만 처리하였다.

조각자 등 시료는 전처리 7일과 DSS 처리 7일, 총 14일 동안 경구투여 하였고, DSS는 7일간 처리하여 염증유발을 하였다. (그림 23) 그 후 일주일간 관찰기간을 가진 후 3주차 21일에 희생시켜 장길이 및 무게를 측정하였다.

Day	1 to 7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
procedure	Pre-treatment	DSS treatment							Observation							
		Daily Body weight and Food intake														
																Colon collection

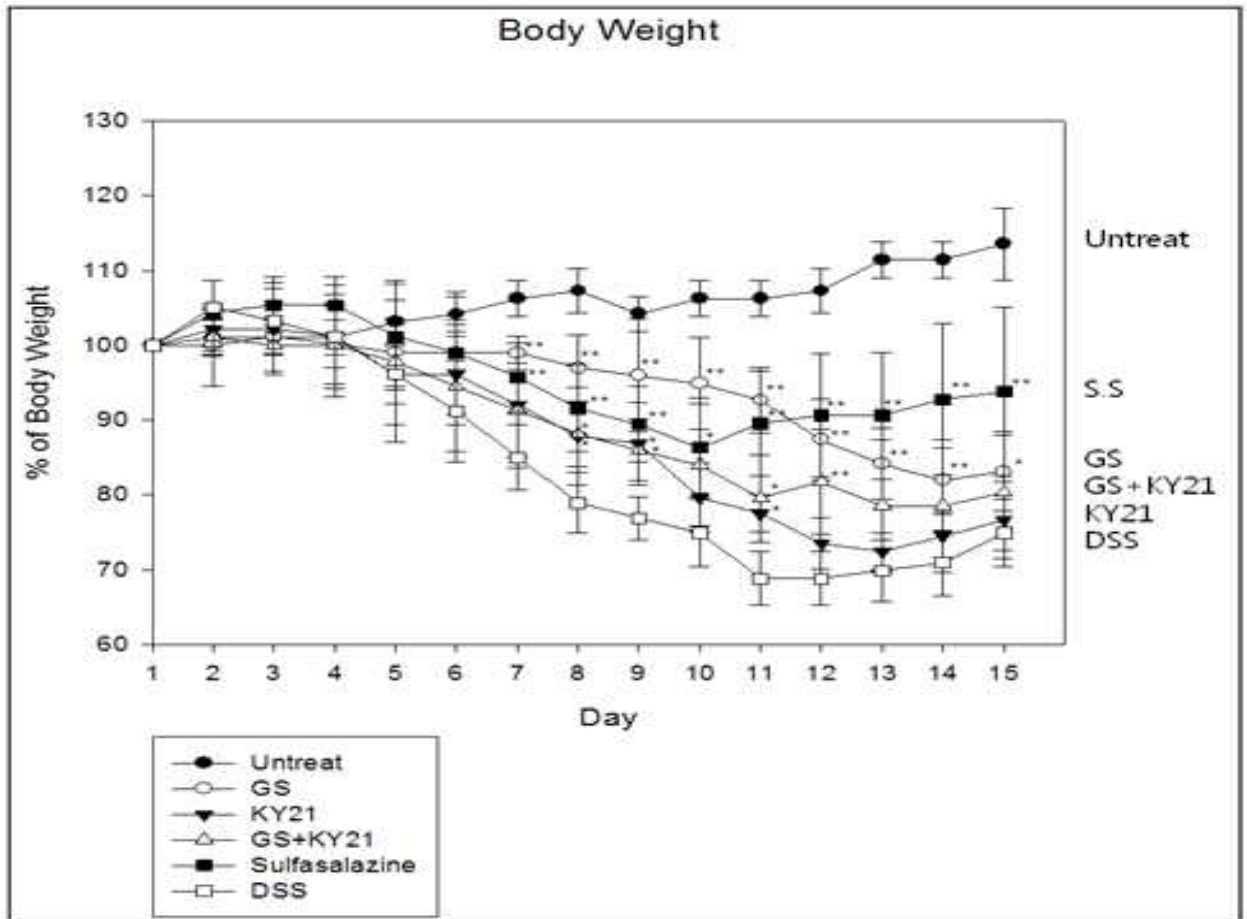
(그림 23) 동물실험 설계

다음은 동물실험에 사용된 약자이다.

약어	이름
GS	조각자 (<i>Gleditchiae sinensis</i>)
KY21	Probiotic 균주 <i>L. brevis</i> KY21
SS	Positive control Sulfasalazine
DSS	Dextran Sodium Sulfate 염증유발유도물질

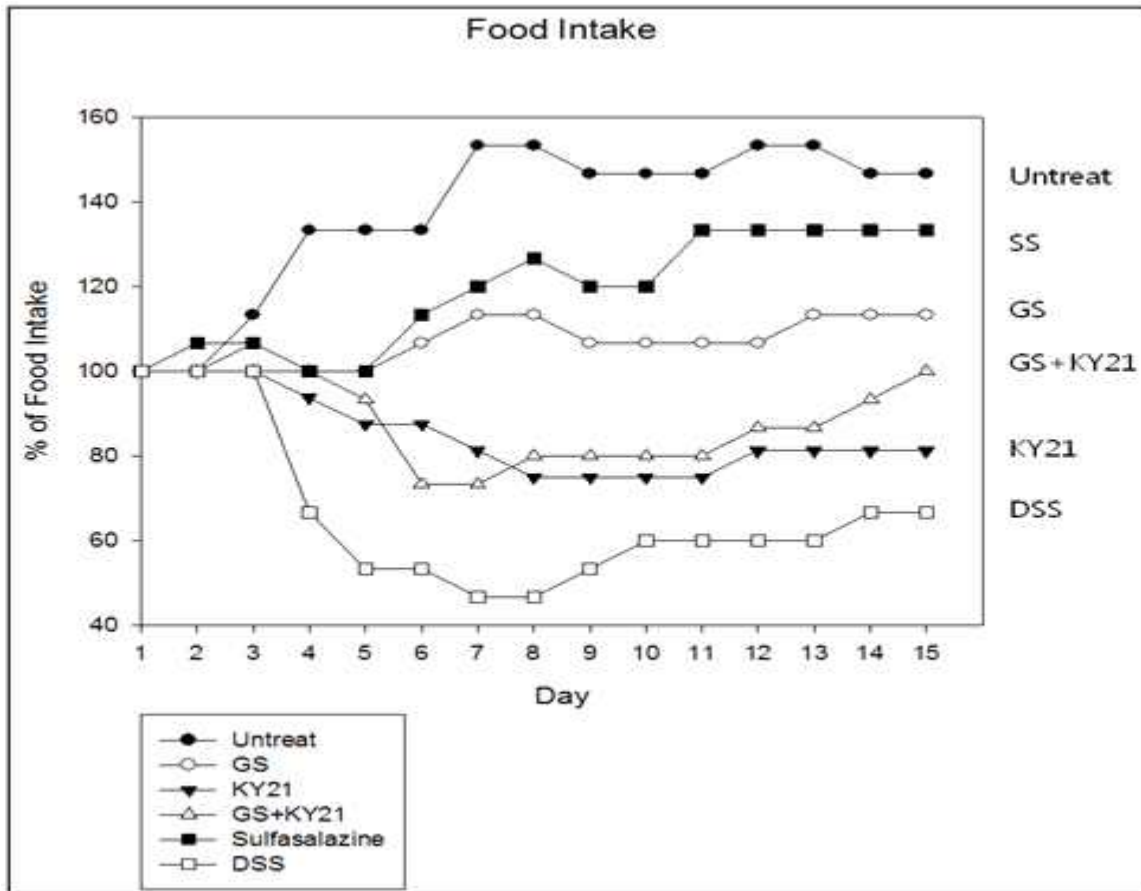
2. DSS로 유도된 대장염의 염증 평가

DSS로 유도된 대장염의 임상평가는 식이섭취량, 몸무게, 대변의 상태와 대변속의 피의 존재 여부로 진행되었다. 쥐는 DSS를 처리한 뒤 14일 후에 희생되었고 대장의 무게와 길이를 측정하였다.



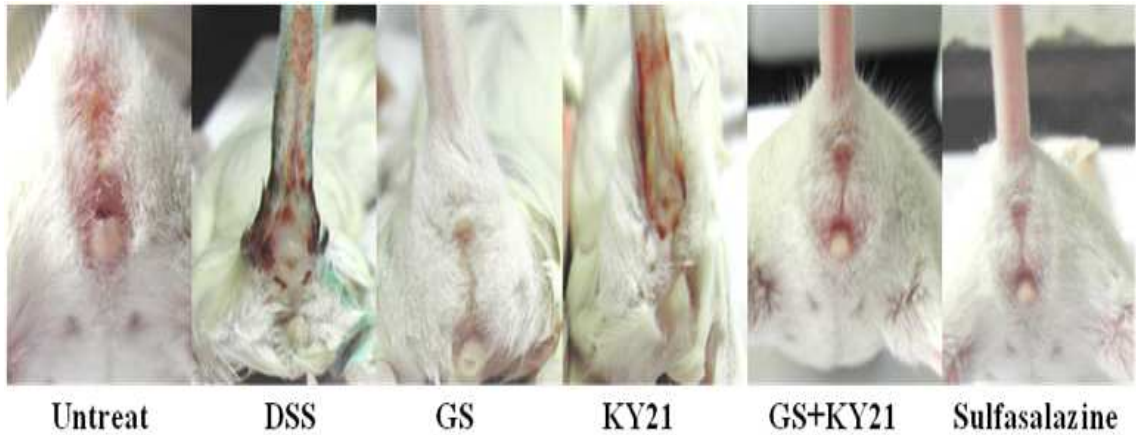
(그림 24) DSS 처리 후 체중변화량

쥐들은 6그룹으로 PBS만 처리한 그룹과 4% DSS만 처리한 그룹, 4% DSS를 처리하면서 각각 20 mg/kg bw농도의 조각자, 50 mg/kg bw 농도의 sulfasalazine(SIGMA, USA), 10^9 CFU/ml KY21, 0.1mg/kg bw와 10^6 CFU/ml KY21를 함께 처리한 그룹으로 나뉜다. 무게는 각각의 쥐를 매일 같은 시간에 측정했다. 이 자료는 \pm SEM으로 나타내었으며. *P < 0.05 DSS 그룹대비, **P < 0.01 DSS 그룹대비 (n=5 쥐/그룹)



(그림 25) 식이섭취량

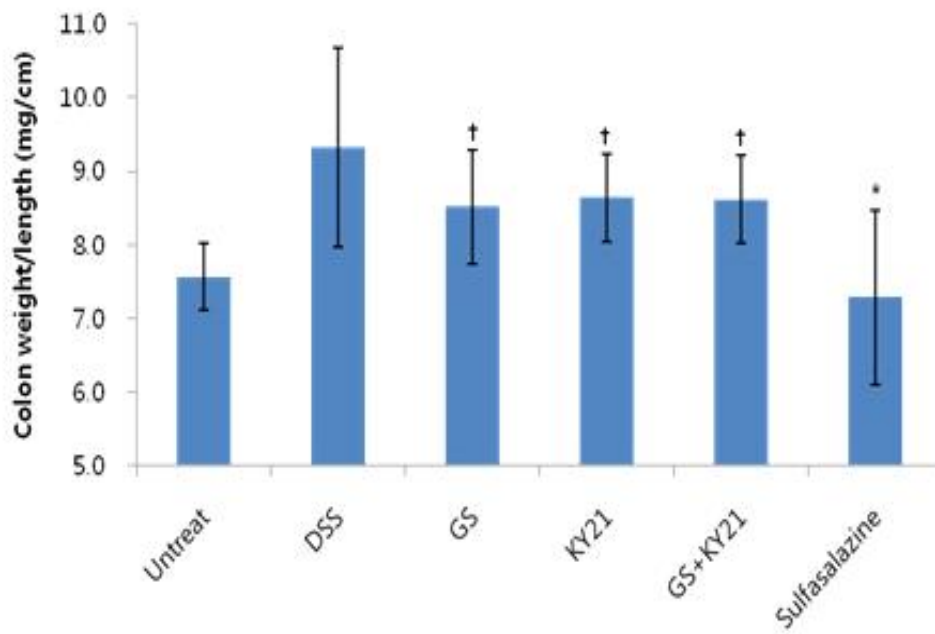
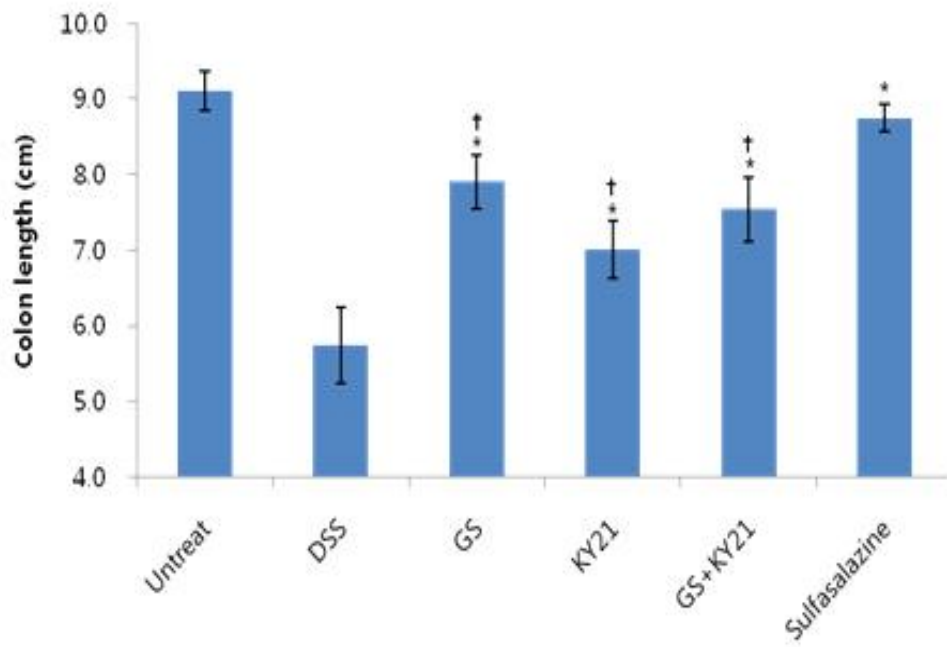
식이섭취량 변화(%). 쥐들은 6그룹으로 PBS만 처리한 그룹과 4% DSS만 처리한 그룹, 4% DSS를 처리하면서 각각 20 mg/kg bw농도의 조각자, 50 mg/kg bw 농도의 sulfasalazine(SIGMA, USA), 10^9 CFU/ml KY21, 0.1mg/kg bw와 10^6 CFU/ml KY21를 함께 처리한 그룹으로 나뉘었다.



(그림 26) DSS 처리시 혈변현상 비교

DSS를 처리하고 14일이 지난 쥐의 혈변 사진. 각 그룹당 질병의 심각성을 확인 할 수 있다. DSS만 처리한 그룹은 심한 혈변과 설사 증상을 보였다.

위의 결과를 보았을 때 DSS만 처리한 그룹은 몸무게 감소량이 다른 그룹에 비해 더 크다는 것을 알 수 있다. 식이섭취량도 마찬가지로 DSS만 처리한 그룹이 더 낮은 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 조각자와 KY21 균주가 DSS 대장염이 유도된 쥐들의 몸무게와 식이섭취량에 긍정적인 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 또한 DSS 로 염증을 유발한 쥐에서는 혈변 및 설사증상이 관찰되었으나, Sulfasalazine 및 조각자를 처리한 구에서는 미처리구와 마찬가지로 정상적인 항문을 확인할 수 있었다.



(그림 27) DSS 처리 시 처리구간 장 길의 변화 및 장길이와 무게의 비율

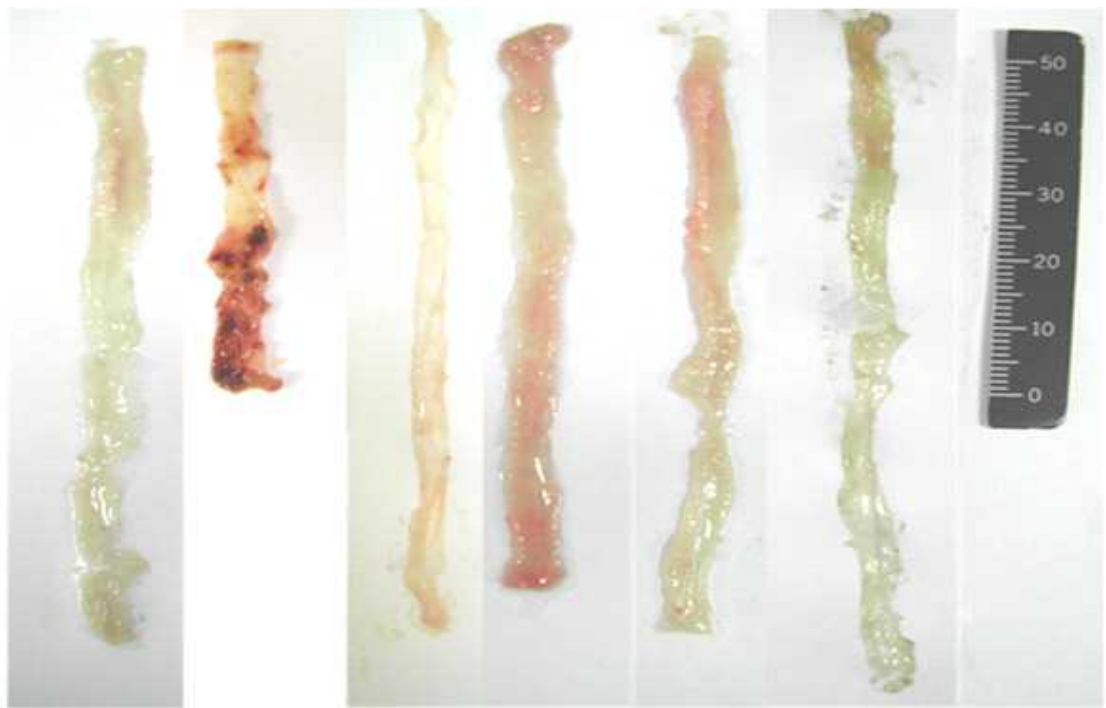
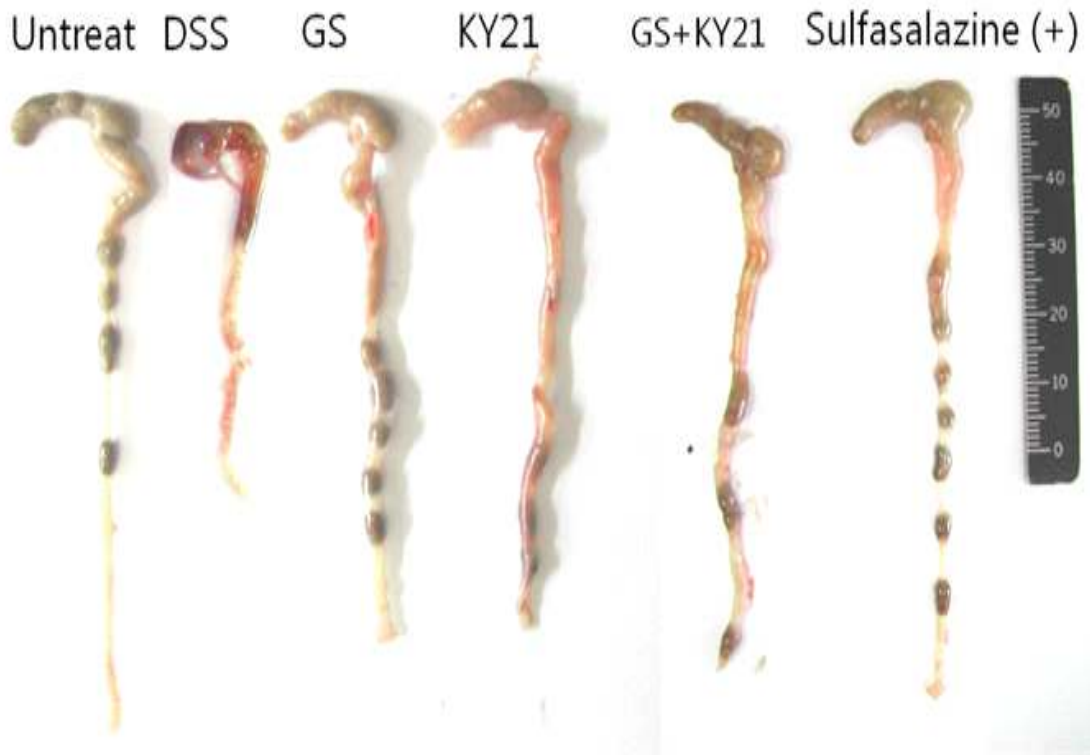
(표 4) 대장의 길이 및 무게

Group	Colon length (cm)	Colon weight (mg)
Untreated (<i>n</i> =5)	9.10±0.26	0.69±0.04
DSS (<i>n</i> =5)	5.74±0.50	0.53±0.08
DSS + GS (<i>n</i> =5)	7.90±0.35	0.67±0.06
DSS + KY21 (<i>n</i> =5)	7.00±0.38	0.60±0.043
DSS + GS+KY21 (<i>n</i> =5)	7.54±0.43	0.65±0.06
DSS + SS (<i>n</i> =5)	8.74±0.18	0.63±0.10

DSS에 의해 대장염이 유도된 모델의 일반적인 상태는 장길이가 상당히 줄어드는 것이다(Rumi et al., 2004). 6개의 그룹(4% DSS만 처리한 그룹과 PBS만 처리한 그룹 그리고 4% DSS와 함께 각각 20 mg/kg bw농도의 조각자, 50mg/kg bw 농도의 sulfasalazine(SIGMA, USA), 10⁹ CFU/ml KY21, 0.1mg/kg bw와 10⁶ CFU/ml KY21를 함께 처리한 그룹의 대장길이를 비교해 보았다(fig 2.6).

DSS 그룹의 대장 길이 대비 다른 그룹의 대장길이의 비율은 4% DSS와 함께 각각 조각자를 처리한 그룹(27%), KY21을 처리한 그룹(18%), Sulfasalazine을 처리한 그룹(34%), 조각자와 KY21을 같이 처리한 그룹(24%)순으로 증가했다.

대장의 무게는 대장 길이 비율을 기준으로 측정했다. 대장의 무게/길이 비율은 4% DSS를 처리한 그룹이 가장 높았다. 이 비율은 조직에 부종이 발생했다는 표시로 볼 수 있다(Mizoguchi et al., 2008). 이 결과를 통해서 KY21과 조각자는 DSS로 유도된 대장염의 장길이 축소를 막아준다고 볼 수 있다.

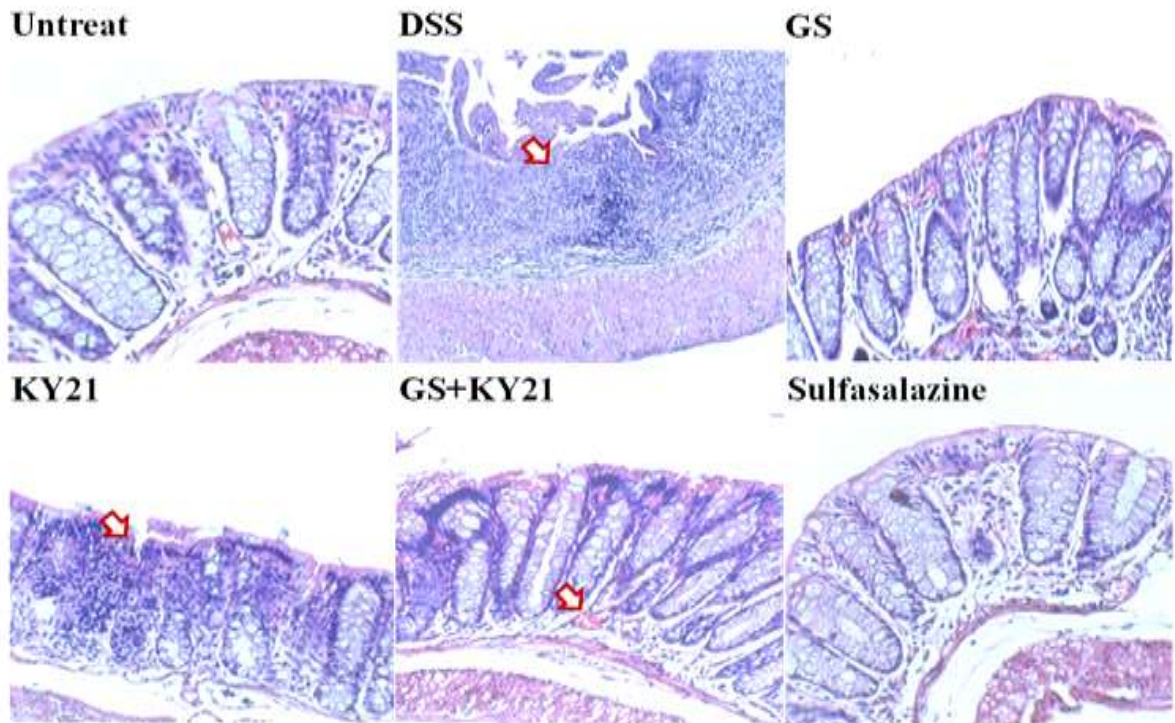


(그림 28) DSS 대장염 모델의 각 그룹의 대장사진.

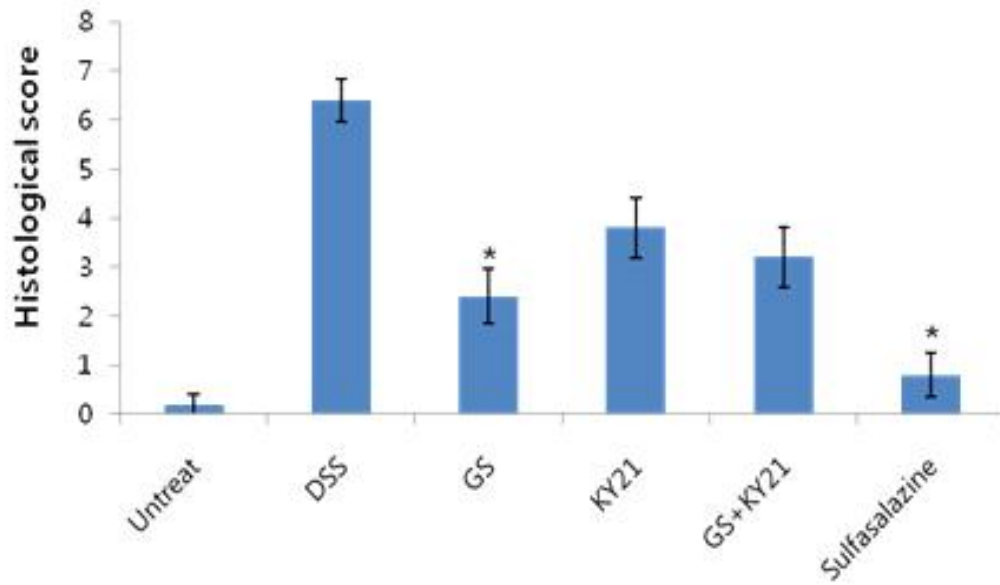
3. 대장염유발과 완화에 대한 조직학적 검사

조직학적 조사는 각 동물의 대장 말단 부분을 샘플로 해서 수행되었다. 샘플은 10% 포르말린 용액에 고정되었고 에탄올로 탈수를 한 후에 파라핀에 고정하였다. 4 micron-thick sections을 준비하고 hematoxylin과 eosin으로 염색을 하였다. 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다.

10mm 대장 조직이 조직학적 평가에 사용되었다. 염증과 crypt의 손상이 H&E 염색으로 염증과 crypt 손상 부분이 표준묘사를 사용하여 평가되었다(Dieleman et al. 1998). 대장 점막 손상 정도는 조직학적 심각도 점수 증가와 crypt 부분의 감소를 보여준다(Howarth et al., 1998). DSS를 처리한 쥐의 대장 부분은 심한 crypt loss를 보여주고 상피세포의 파괴와 염증성 세포 침입을 보여준다(fig 2.8). 그러나 조각자와 조각자 + KY21은 정도의 차이는 있지만 조직의 증상을 완화시키는 것을 볼 수 있다. 이 결과는 조각자가 DSS로부터 상피세포 손상을 막아주는 역할을 한다고 볼 수 있다.



(그림 29) 대장세포의 H&E 염색



(그림 30) DSS 처리시 대장세포의 조직학적 평가

(표 5) 세포의 염증반응 척도

Feature grad	Grade	Description
Inflammation	0	None
	1	Slight
	2	Moderate
	3	Severe
Crypt damage	0	None
	1	Basal 1/3 damaged
	2	Basal 2/3 damaged
	3	Only surface epithelium intact
	4	Entire crypt and epithelium lost

4. Mesenteric lymphnode의 사이토카인 mRNA 발현 비교

총 RNA를 쥐의 mesentric lymphnode(MLN)에서 추출하였다. 총 RNA는 Trizol 시약 (Invitrogen, USA)을 사용하였고 제조사의 설명서에 따라서 진행하였다. 순수한 총 RNA를 추출하기 위해 산성페놀과 클로로포름을 사용하였다. 그 후 Superscript transcriptase III(Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다.(변성과정 95℃에서 30초, annealing과정 60℃에서 30초, extension과정 72℃에서 30초 * 35회)

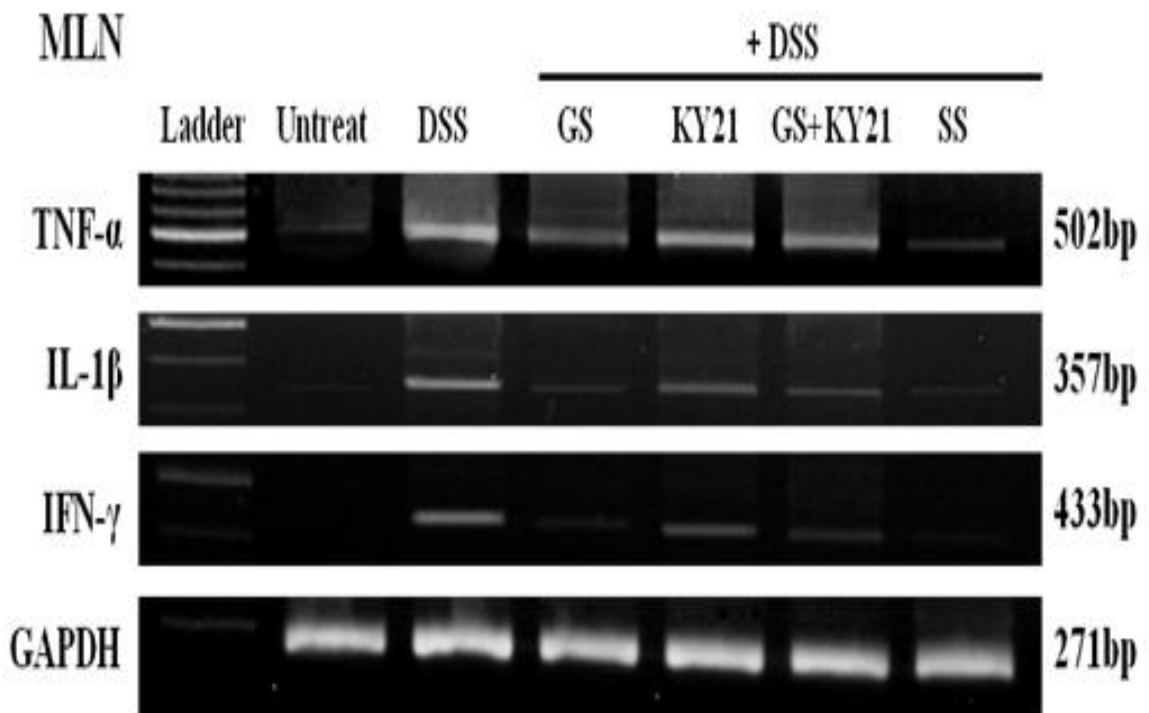
PCR실험을 진행 할 때 사용한 Primer는 표 6 에 있다. RT-PCR 생성물은 2% 아가로오스 겔과 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통해 확인하였다. 모든 결과는 GAPDH 발현량을 맞춘 후에 결정하였다.

총 RNA를 쥐의 mesentric lymphnode(MLN)에서 추출하였다. 총 RNA는 Trizol 시약 (Invitrogen, USA)을 사용하였고 제조사의 설명서에 따라서 진행하였다. 순수한 총 RNA를 추출하기 위해 산성페놀과 클로로포름을 사용하였다. 그 후 Superscript transcriptase III(Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다.(변성과정 95℃에서 30초, annealing과정 60℃에서 30초, extension과정 72℃에서 30초 * 35회)

PCR실험을 진행 할 때 사용한 Primer는 표 2.3에 있다. RT-PCR 생성물은 2% 아가로오스 겔과 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통해 확인하였다. 모든 결과는 GAPDH 발현량을 맞춘 후에 결정하였다.

(표 6) RT-PCR 에 사용한 Primer

<i>Gene name</i>	<i>GenBank Accession No.</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Size (bp)</i>
IL-1 β	NM_008361.3	Forward	CCAGGATGAGGACATGAGCACC	358
		Reverse	ATCCACACTCTCCAGCTGCAGG	
TNF- α	NM_013693.2	Forward	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	502
		Reverse	TGACGGCAGAGAGGAGGTTGAC	
IFN- γ	NM_008337.2	Forward	CTGAGACAATGAACGCTACACACT GC	433
		Reverse	AACAGCTGGTGGACCACTCGGAT	
GAPDH	NM_0020463	Forward	ATGACCACAGTCCATGCCATC	271
		Reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	



(표 31) DSS 처리그룹간 MLN에서 사이토카인 발현차이

Mesenteric lymphnode 는 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 가 존재를 평가하는데 사용된다. 이러한 염증유발 사이토카인은 종양세포를 죽이는데 중요한 역할을 하는 요소이다 (Mantovani et al., 1992). 이러한 염증유발 사이토카인은 DSS를 치료에 의해서 더욱 증가했다.(fig 2.13)

LAB에 의해 유도된 사이토카인은 면역 조절에 중요한 역할을 한다. 몇몇 논문을 살펴보면 특정한 Lactobacilli의 strains은 염증 유발 사이토카인인 interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-12, tumor necrosis factor alpha(TNF- α) 그리고 gamma interferon(IFN- γ)와 항염증 사이토카인인 IL-10 과 transforming growth factor β 를 유도한다고 알려져 있다 (Christensen et al., 2002).

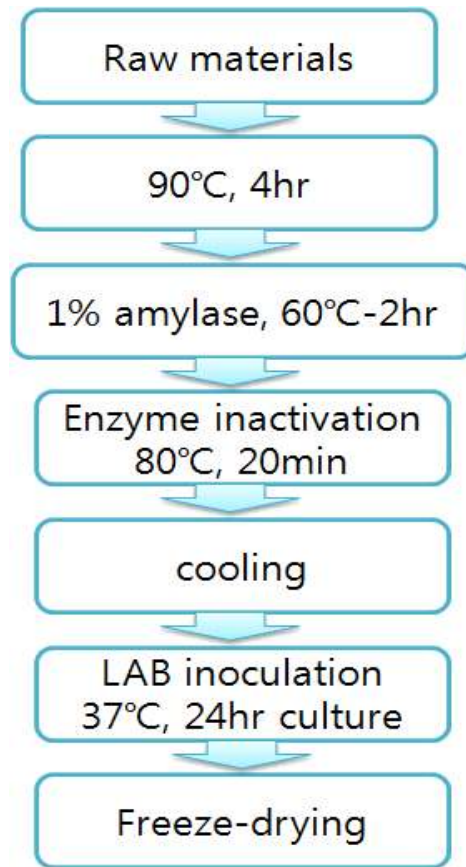
sulfasalazine은 inhibitor κ B(I κ B)의 인산화를 막는 다는 논문도 있다(Weber et al., 2000). fig 2.13은 조각자와 KY21가 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 를 약간 저해하는 것을 보여준다. sulfasalazine은 세가지 사이토카인 모두를 저해하는 것을 볼 수 있다. 이 결과는 조각자와 KY21 섭취가 DSS로 인해 유발된 염증 사이토카인을 저해 할 수 있고 염증의 시작을 막아준다는 것을 입증한다. 추출된 조각자는 DSS로 유발되는 염증의 시작을 억제 한다는 결론을 얻을 수 있었다. 또한 조각자의 효과보다는 덜하지만 Probiotic 균주 KY21 또한 DSS로 유도된 염증을 완화하는 것으로 나타났다.

제 5 절 선발된 균주와 천연 추출물을 이용한 복합발효기술 확립

제 1 항 후보물질의 발효능 측정

항염증 활성을 가진 음료 개발을 위해 선발된 유산균주와 천연물질의 항염증성 복합발효 물질을 small-scale의 다양한 배합비의 구성을 통하여 확립하였다. 우선, 항염증 후보물질로 선발된 Probiotic 균주, *Leuconostoc paramesenteroides* KJP421, *Lactobacillus salivarius* E4191, *L. plantarum* KM29, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* KDK411, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* SRK414, *L.brevis* KY21, *L.plantarum* KY210을 항염증 효과를 보이는 천연물 황련, 계피, 조각자, 행인, 황백에 첨가하여 복합 발효물을 제조하였다.

복합 발효물을 만들기 위해, 건조되어 분쇄되어 진 황련, 계피, 조각자, 행인, 황백을 건물량 기준으로 10배의 물을 첨가하여 90℃에서 4시간 동안 추출한 뒤 각각의 추출물의 온도를 상온까지 떨어뜨린 뒤 멸균된 거즈로 걸러내어 추출물을 준비하였다. 유산균 배양이 가능 하도록 각각의 추출물에 amylase라는 당화효소를 첨가하여 60℃에서 2시간 동안 정치시킨 다음 80℃에서 20분 처리함으로써 효소를 불활성화 시켰다. 효소를 처리하여 당화시킨 추출물에 위의 7종의 유산균을 1% 접종 하여 37℃ 인공배양기에서 24시간 발효 시켜 발효물을 제조하였다. 최종 발효물은 freeze-dry하여 시료로 사용하였다.



(그림 32) diagram for fermentation

유산발효의 검증은 다음과 같이 실시하였다. 발효물의 유산균 생균수와 pH를 측정하여 발효 진행을 확인 하였으며, 발효물을 peptone수를 이용하여 연속희석법으로 희석하여 MRS-agar에 평판도말법으로 생균수를 측정하였다. MRS-agar는 37 °C에서 48시간 배양하여 균수를 측정하였으며, 또한 당이용능을 pH로서 확인하였다.

(표 7) Live Lactic acid bacteria count and pH of fermented products.

균주		계피	조각자	황련	황백	행인
421	생균수 log CFU/ml	5.42	>7	7.69	>7	>7
	pH	4.84	3.70	4.53	3.54	3.40

4191	생균수 log CFU/ml	<4	<4	<4	>7	>7
	pH	4.90	4.68	5.04	3.55	3.54
411	생균수 log CFU/ml	<4	8.02	4.71	8.90	8.89
	pH	4.76	3.82	5.24	3.62	3.65
414	생균수 log CFU/ml	<4	6.30	8.30	8.12	8.36
	pH	4.77	4.71	4.73	4.33	4.41
KM29	생균수 log CFU/ml	<4	6.48	<4	8.10	8.76
	pH	4.88	4.41	5.36	4.13	3.87
KY21	생균수 log CFU/ml	<4	<4	<4	8.16	8.63
	pH	4.81	4.84	5.40	3.94	3.72
KY210	생균수 log CFU/ml	<4	7.53	<4	5.62	8.71
	pH	4.89	4.33	5.3	4.14	3.84
None	생균수 log CFU/ml	ND	ND	ND	ND	ND
	pH	5.03	5.01	5.56	5.07	5.94

실험 결과 계피와 황련의 경우, 유산균의 증식을 억제하는 능력이 있는 것으로 보인다. 황백과 행인의 경우 발효 능력이 어느 정도 있는 것으로 생각되며 조각자 발효물의 경우, 균주에 따라 발효능의 차이가 있는 것으로 판단된다.

장 염증 완화 활성을 가지는 초기 스크리닝 부터 세포 및 단백질수준에서의 검증, 후보 물질의 발효능을 종합적으로 판단하였을 때 Probiotic 균주 *Lactobacillus brevis* KY21 과 천연물 조각자가 선발되었으며 복합 발효 및 제품 제조를 위하여 추가 정보가 요구되었다.

제 2 항 조각자 추출물 배합비 설정을 위한 관능검사

항염증 효과를 보이는 천연추출물 중 조각자를 선발하여 다양한 배합비의 구성을 통하여 관능평가를 실시하였다. 조각자는 경동 시장에서 구입 하여 열수 추출하여 밀봉된 상태로 보관 사용 하였다. Flavor, 맛, 기타 구성 요소 등을 변수로 하여 최적의 음료 식품의 배합비 조성을 확립하였다. 고려대학교 ‘미생물과 건강’ 을 수강하는 수강생 및 생명과학 대학 학생 50명을 대상으로 관능 평가를 진행하였다. 항염증 실험을 통해 선별된 조각자를 추출액 고형분 기준(2 brix) 1 %, 5 %, 10 %를 첨가한 음료를 만들어 관능 평가를 실시하였다. 이에 설문을 실시하여 각각의 구성비를 통한 선호도를 평가하였다.

관능검사를 통한 선호도 조사결과 천연물 첨가 음료(우유) 에 대해 접해보지 못했다는 답변이 70 % 가까이 나왔으며, 선호 하는 비율은 천연물 추출물 1 ~ 5% 사이 이었다. 10 % 에서는 천연물의 향과 맛이 강하다는 등 부정적인 반응이 많았으며 그러한 의견이 대부분 이었다. 반면 10 %첨가 시 선호하는 그룹의 내용은 이와 반대로 천연물의 향과 맛에 대한 선호를 잠재적인 기능성과 연관 지어 응답 하는 경향을 보였다. 또한 천연물 첨가시 우선순위를 정하는 질문에 기능성보다 맛이 많은 답변으로 나왔음. 맛이 제품 선택에 큰 우선순위를 차지하는 것을 확인하였다. 이에 조각자 추출물 첨가 시 5 % 내외를 정하는 것이 선호도에 적합한 것으로 판단됨. 1 % 천연물 추출물을 첨가시 첨가량에 대비해 느끼는 맛이 미비하여 base 음료에 맛의 변화를 선호하지 않는 답변이 많았다. 이는 첨가안한 음료와 비슷한 답변이기에 조각자 추출물의 첨가 배합비는 음료에 1 %이상 5 % 이하의 구성비(2 brix 기준)를 정하여 음료 제조시 맛의 선호도 및 배합비를 확립하였다.

(표 8) 관능검사를 통한 선호도 조사

(총원 50명)

질문	답변	기타
1. 설문에 응하시는 분의 성별은 무엇입니까?	남: 54% 여: 46%	
2. 기능성(천연물)이 강조된 음료(우유)를 드신 적이 있습니까? 몇 번 정도입니까?	있다: 32% 없다: 68%	
3. 시식한 샘플중 어느 것을 선호 합니까?	A: 38% B: 38% C: 24%	
4. 샘플의 기호도를 점수로 나타낸다면 (선호 샘플 선택중 평균 점수 표시)	A: 7.0점 B: 6.5점 C: 5.1점	
5. 선호 샘플의 선호 이유는 무엇입니까? (ex) 우유의 풍미, 고소함, 천연물 향		A: 다른 sample의 천연물 향이 강해서 (89%) B: 적당한 맛 (84%) C: 선호 하는 천연물 향 (92%)
6. 선호하는 샘플의 맛의 정도를 표현해 주십시오. (1)우유의 풍미 (2)천연물향 (3)우유의 맛	A:(1)7.0점 (2)4.5점 (3)6.7점 B:(1)5.7점 (2)6.5점 (3)6.0점 C:(1).05점 (2)5.1점 (3)4.7점	
7. 선호하지 않는 샘플은	A: 12% B: 18% C: 70%	
8. 선호하지 않는 샘플의 부족한 점은 무엇입니까?		A: 천연물 향이 너무 약하다(83%) B: 향이 진하다(45%) C: 쓰다(43%), 향이 진하다(38%)
9. 천연물 첨가 음료선택의 우선순위는 무엇입니까?		맛(88%),기능성(10%), 가격(6%) 기타(향, 브랜드)

제 3 항 조각자 추출물 함유 유제품의 제조

장 상피세포에서 염증성 사이토카인의 분석을 통하여 항염증 효과를 1차 탐색한 후, 세포 및 단백질 수준에서 염증을 완화하는 효과가 있다고 선발된 Probiotic 균주와 천연추출물은 *Lactobacillus brevis* KY21 과 조각자 이다. 조각자추출물과 균주, 그 발효물을 가지고 동물실험에서 항염증 효과를 확인하였을 시, 조각자의 항염증 효과가 가장 우수하게 나타났다. 또한 조각자와 KY21을 같이 첨가한 시료의 항염증 활성도 어느 정도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 조각자 추출물과 Probiotic 균주 *Lactobacillus brevis* KY21 을 첨가하여 요거트를 제조하였다.

항염증 활성이 있다고 확인된 1% 조각자첨가 유제품을 기준으로, 0.1%, 조각자 첨가 요거트, 총 세 개의 시료를 제조하였다. 요거트 믹스 액의 성분은 다음과 같다.

시 료	성 분
0% 시료	우유 98.0 % + 포도당 2%
0.1% 시료	우유 98.0 % + 포도당 2% + 조각자추출물 0.1%
1.0% 시료	우유 98.0 % + 포도당 2% + 조각자 추출물 1.0 %

믹스액은 Stirrer (NZ1200 stirrer, EYELA) 를 이용하여 내용물을 잘 혼합한 후 90 ℃에서 15분간 살균을 실시하였다. 40 ℃까지 냉각한 후 유산균을 접종하였다. 유산균은 발효를 위하여 상업균주인 ABT-5 를 접종하였으며, KY21과 혼합하여 동시에 혼합발효를 진행하였다. 이 유산균 배양액을 40 ℃ 배양조에 배양하였으며, 배양 완료 후 커드를 분쇄한 후 냉각 저장을 하였다.

제 4 항 제조간 발효특성 차이 확인 및 안전성 검사

제조된 유제품의 발효특성 차이를 확인하기 위하여 발효간 pH, 적정산도, 생균수를 측정하였다. 시료는 제 3항에서 제조한 조각자 첨가 요거트로 하였으며, 그 농도는 기존 유제품(조각자 추출물 무첨가)과 비교하기 위하여 0%, 0.1% 1% 조각자 추출물 함유 유제품으로 하였다.

우유 믹스액에 스타터 유산균 및 KY21 균을 첨가하여 발효를 진행하는 동안 0, 1.5h, 3h, 4.5h, 6h, 7.5h 까지 발효가 완료되는 동안의 생균수 및 pH, 적정산도를 측정하였다.

생균수는 시료를 잘 섞은 뒤 1 ml 을 PBS 희석액에 십진 희석법으로 희석하여 MRS 평판배지에 도말하였다. 도말한 배지는 37 °C에서 48시간 동안 배양 후 생균수를 측정하였다.

pH는 정해진 시간마다 pH meter(HI8424NEW, Hanna Inst., USA) 를 사용하여 상온에서 측정하였다. 적정산도는 검사시료 10 ml 에 탄산가스를 함유하지 않은 증류수 10 ml 을 가하고 페놀프탈레인 시액 0.5 ml을 가하여 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 30초간 홍색이 지속되는 시점까지 적정하였으며, 적정산도의 계산식은 다음과 같다.

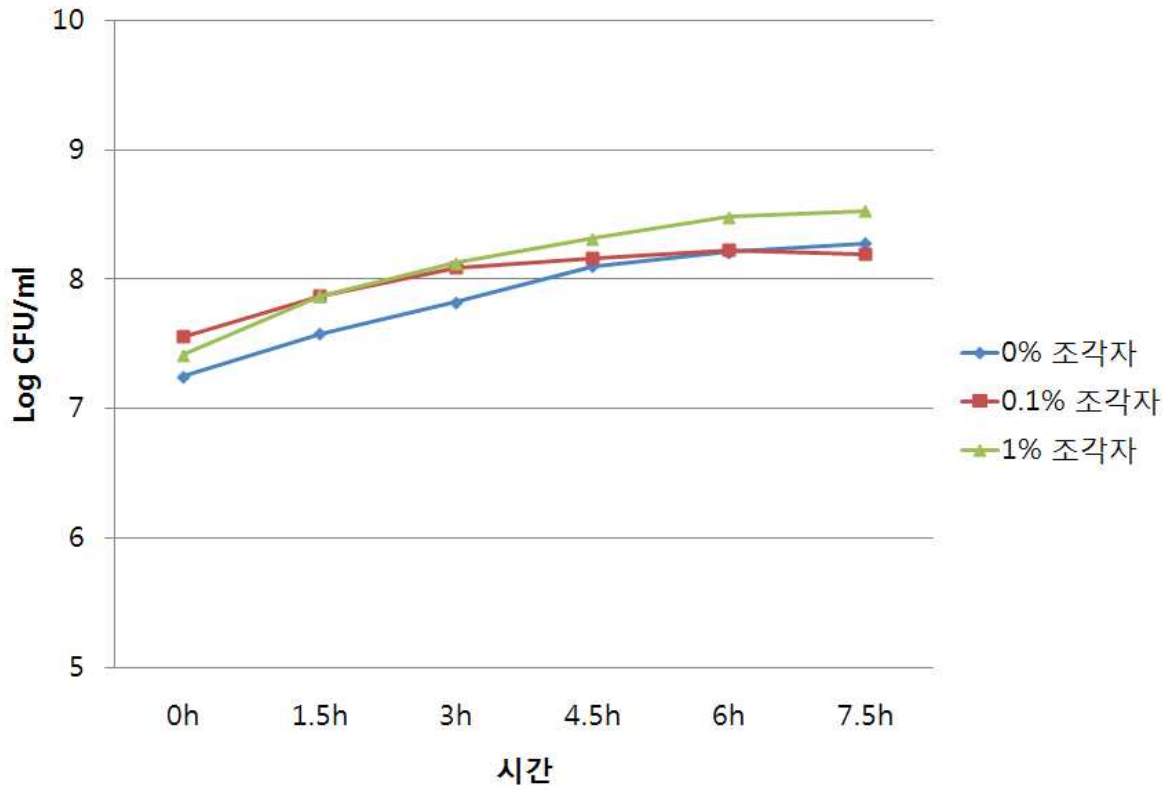
$$\text{적정산도 (젖산 \%)} = \frac{a * f * 0.009}{0 \text{ ml} * d} * 100$$

a : 0.1 N 수산화나트륨 소비량(ml)

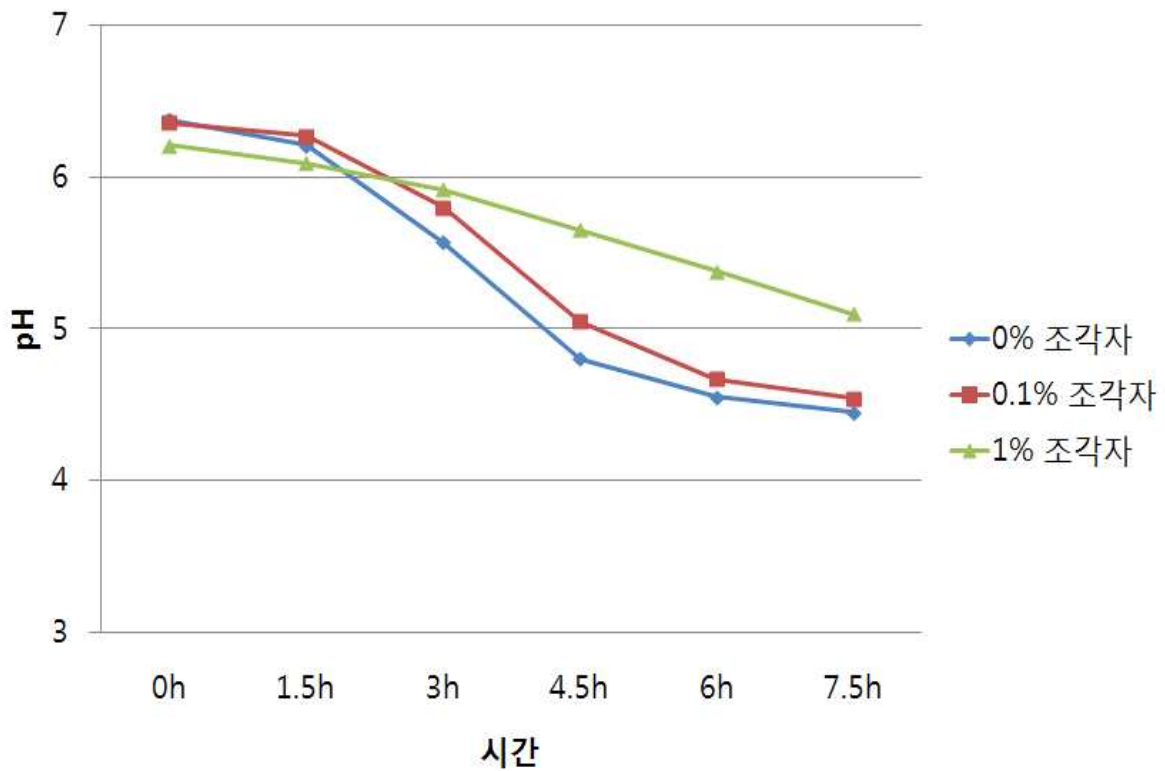
f : 0.1 N 수산화나트륨의 역가

0.009 g 젖산 : 0,1 N 수산화나트륨 용액 1 ml

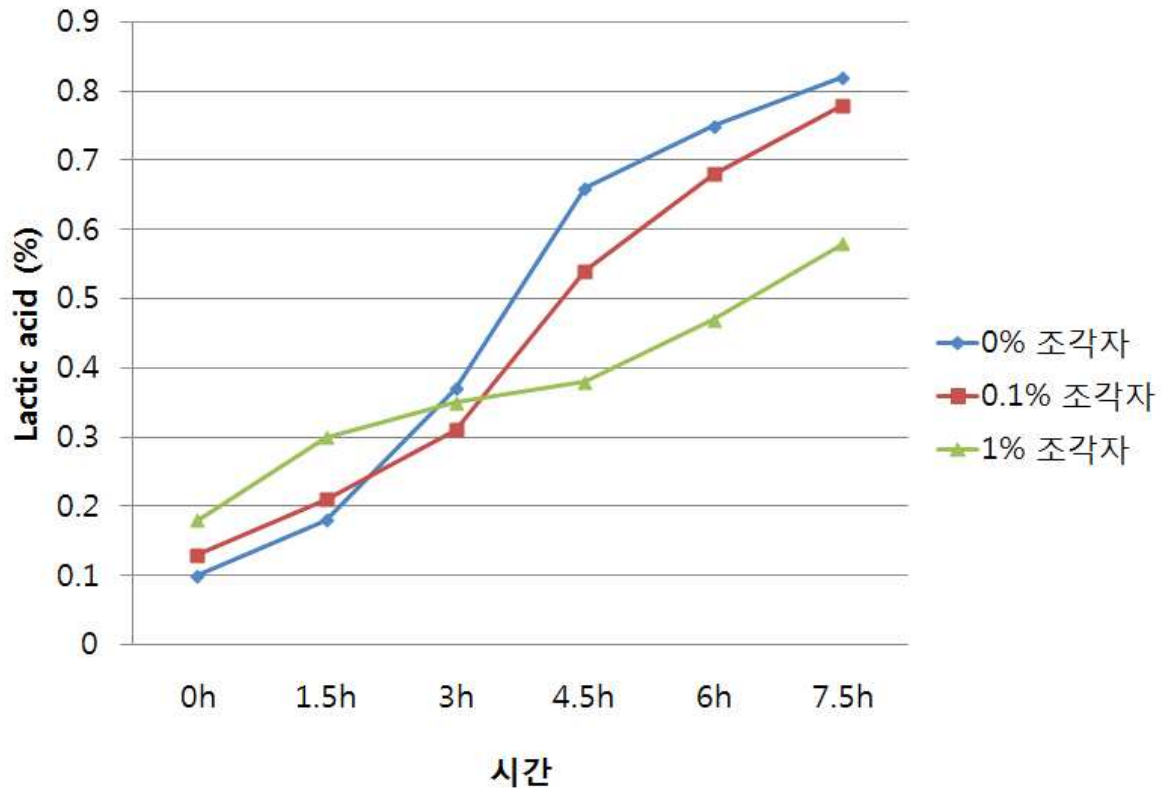
생균수 측정



pH 변화



적정산도 측정



(그림 33) 조각자 첨가 발효간 생리활성 변화

조각자 추출물과 Probiotic 균 *Lactobacillus brevis* KY21 을 함유한 유제품을 제조한 결과 생균수는 발효 6시간 후부터 균수가 일정하게 유지되었으며, 조각자 첨가 및 무첨가에 대한 차이는 존재하지 않았다. 그러나 pH 및 적정산도에서는 1% 조각자를 함유한 유제품에서 pH 강하가 낮게 나타나고 적정산도 역시 7.5시간까지는 함유량이 적은 것으로 나타났다. 조각자 첨가를 제외한 다른 조건이 같기 때문에 조각자 첨가에 따른 pH 및 적정산도가 변한 것으로 생각되며, 균의 차이는 없으므로 제품 내에서 성분에 따른 pH 및 유기산의 변화를 나타내는 것으로 생각된다. 따라서 조각자 1% 첨가 유제품을 제조할 시에는 발효시간을 7.5 시간 보다 길게 가져가는 것이 필요할 듯 하며, 유제품 제조시, 조각자 첨가가 유산균 자체에의 생존율에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

제 5 항 조각자 추출물 첨가 요거트의 항염증 활성 확인

항염증효과가 있는 것으로 선발된 Probiotic 균주 *L. brevis* KY21 과 천연추출물 조각자를 이용하여 유제품을 제조하였고 각각의 항염증 효능은 검증되었으나 유제품의 항염증 효과를 검증하기 위하여 장염증 동물모델에서 효과를 다시 한번 확인하였다.

제 3장 3 항에서 실시한 동물실험과 마찬가지로 소동물 모델은 검증하려는 시료를 1~2주간 투여한 뒤 장에 인위적으로 염증유발물질을 투여하여 장내 염증을 유발하였다. 그 뒤에 장질환에 따른 병변이 어떻게 변화하는지를 측정, 평가하였다.

1. 동물실험 설계

8주령 암컷 Balb/c 쥐를 샘타코에서 구입하였다. 쥐들은 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22℃의 사육실에서 적응기간을 가졌다. 쥐들은 6개의 그룹으로 나뉘었는데, 첫 번째 그룹은 4% DSS(분자량 5000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)를 물에 섞어서 자유급수 했고, 두 번째 그룹부터 다섯 번째 그룹까지는 4% DSS를 자유급수 하면서 각각 0.1 % 조각자 함유 요거트, 1 % 조각자 함유 요거트, 산침전 요거트, 양성 대조구로서 Sulfasalazine 50 mg / kg 을 처리하였다.

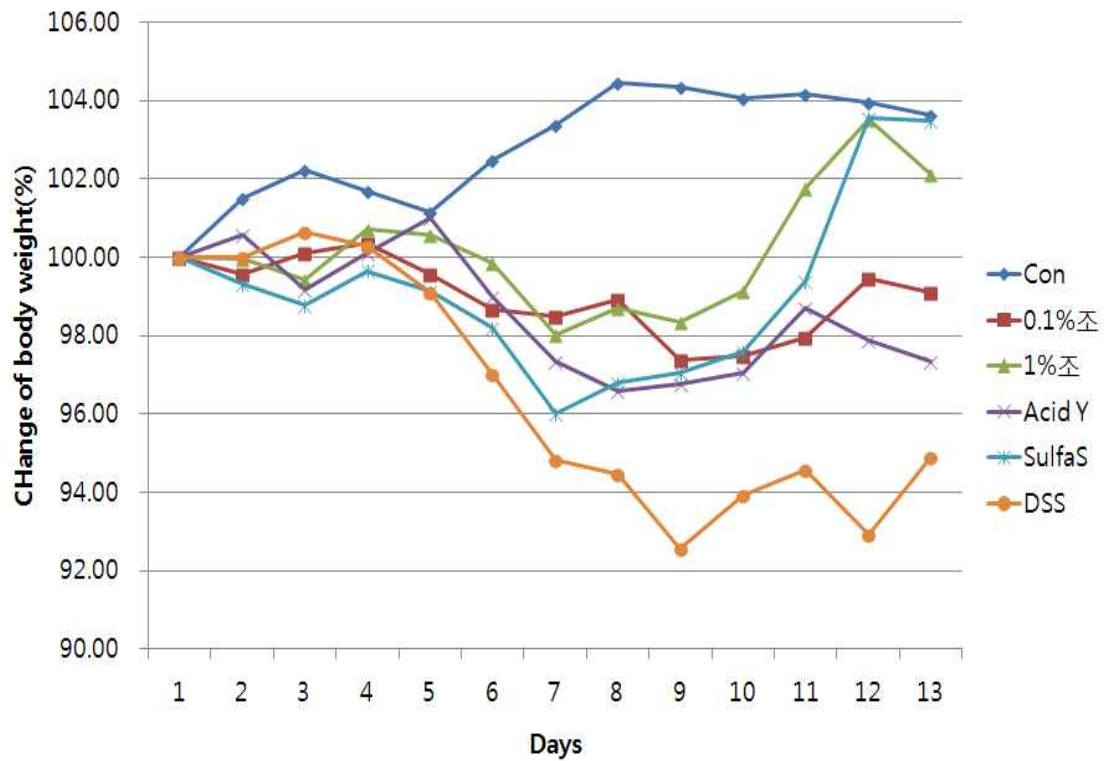
조각자 등 시료는 전처리 7일과 DSS 처리 7일, 총 14일 동안 경구투여 하였고, DSS는 7일간 처리하여 염증유발을 하였다. (그림) 그 후 일주일간 관찰기간을 가진 후 3주차 21일에 희생시켜 장길이 및 무게를 측정하였다.

다음은 동물실험에 사용된 약자이다.

약어	이름
0.1 % 조	0.1 % 조각자 함유 요거트
1 % 조	1% 조각자 함유 요거트
SS	Positive control Sulfasalazine
AY	산침전 요거트(0 % 조각자)

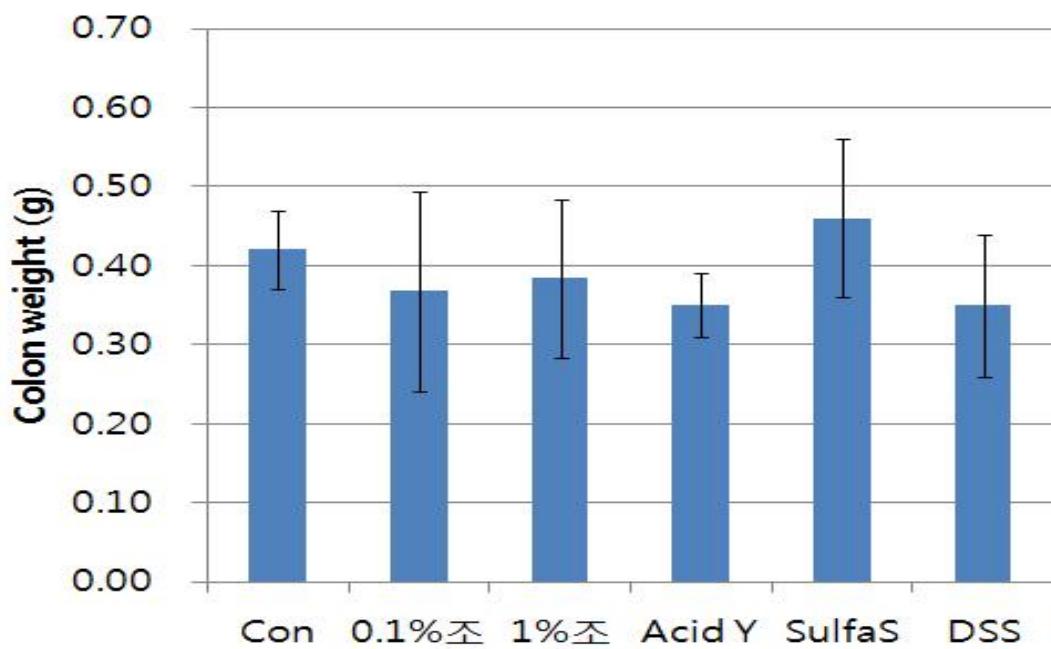
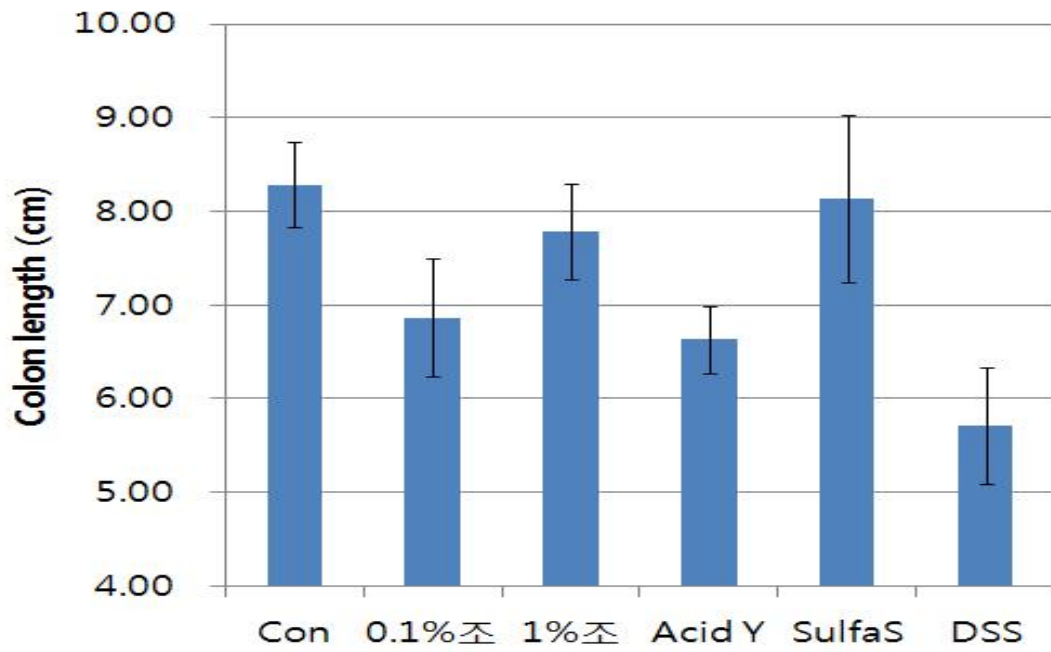
2. DSS로 유도된 대장염의 염증 평가

DSS로 유도된 대장염의 임상평가는 식이섭취량, 몸무게, 대변의 상태와 대변속의 피의 존재 여부로 진행되었다. 쥐는 DSS를 처리한 뒤 14일 후에 희생되었고 대장의 무게와 길이를 측정하였다.



(그림 34) 조각자 유제품 동물실험간 체중변화량

쥐들은 6그룹으로 4% DSS만 처리한 그룹, 4% DSS를 처리하면서 각각 조각자 첨가 요거트, 산침전 요거트, 50 mg/kg bw 농도의 sulfasalazine(SIGMA, USA) 를 함께 처리한 그룹으로 나뉜다. 무게는 각각의 쥐를 매일 같은 시간에 측정했다.

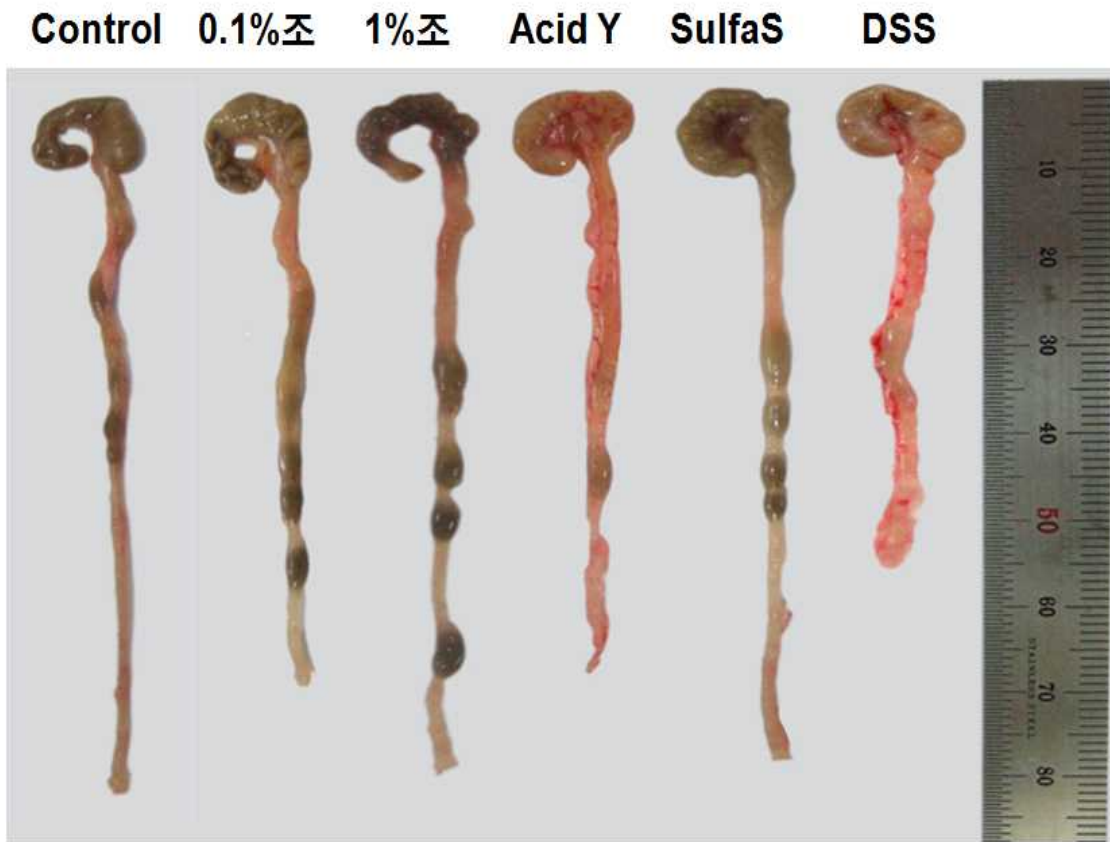


(그림 35) DSS 처리 그룹간 처리구간 장 길의 변화 및 무게

(표 9) 대장의 길이 및 무게

Group	Colon length (cm)	Colon weight (mg)
Untreated ($n=5$)	8.28±0.45	0.42±0.05
0.1 % 조 ($n=5$)	6.87±0.64	0.37±0.13
1 % 조 ($n=5$)	7.78±0.51	0.38±0.10
Acid 요거트 ($n=5$)	6.63±0.36	0.35±0.04
Sulfasalazine ($n=5$)	8.13±0.90	0.46±0.10
DSS only ($n=5$)	5.71±0.62	0.35±0.09

DSS에 의해 대장염이 유도된 모델의 일반적인 상태는 장길이가 상당히 줄어드는 것이다(Rumi et al., 2004). 6개의 그룹(4% DSS만 처리한 그룹과 PBS만 처리한 그룹 그리고 4% DSS와 함께 각각 0.1 % 조각자, 1 % 조각자 함유요거트 및 산침전요거트 등의 대장길이를 비교해 보았다. 이 결과를 통해서 1% 조각자 요거트는 DSS로 유도된 대장염의 장길이 축소를 막아준다고 볼 수 있다.

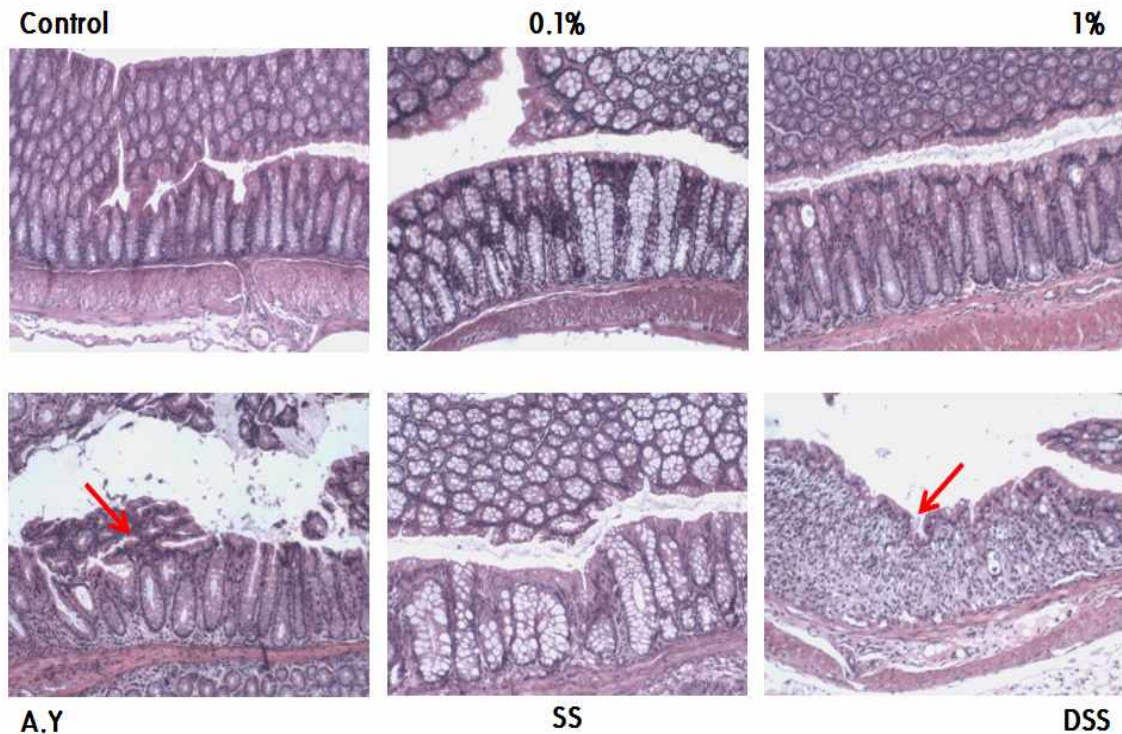


(그림 36) DSS 대장염 모델의 각 그룹의 대장사진.

3. 대장염유발과 완화에 대한 조직학적 검사

조직학적 조사는 각 동물의 대장 말단 부분을 샘플로 해서 수행되었다. 샘플은 10% 포르말린 용액에 고정되었고 에탄올로 탈수를 한 후에 파라핀에 고정하였다. 4 micron-thick sections을 준비하고 hematoxylin과 eosin으로 염색을 하였다. 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다.

10mm 대장 조직이 조직학적 평가에 사용되었다. 염증과 crypt의 손상이 H&E 염색으로 염증과 crypt 손상 부분이 표준묘사를 사용하여 평가되었다(Dieleman et al. 1998). 대장 점막 손상 정도는 조직학적 심각도 점수 증가와 crypt 부분의 감소를 보여준다(Howarth et al., 1998). DSS를 처리한 쥐의 대장 부분은 심한 crypt loss를 보여주고 상피세포의 파괴와 염증성 세포 침입을 보여준다(fig 2.8). 그러나 조각자함유 요거트는 정도의 차이는 있지만 조직의 증상을 완화시키는 것을 볼 수 있다.



(그림 37) 염증유발에 대한 시료의 조직학적 효능 검증

4. Mesenteric lymphnode의 사이토카인 mRNA 발현 비교

총 RNA를 쥐의 mesentric lymphnode(MLN)에서 추출하였다. 총 RNA는 Trizol 시약 (Invitrogen, USA)을 사용하였고 제조사의 설명서에 따라서 진행하였다. 순수한 총 RNA를 추출하기 위해 산성페놀과 클로로포름을 사용하였다. 그 후 Superscript transcriptase III(Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다.(변성과정 95℃에서 30초, annealing과정 60℃에서 30초, extension과정 72℃에서 30초 * 35회)

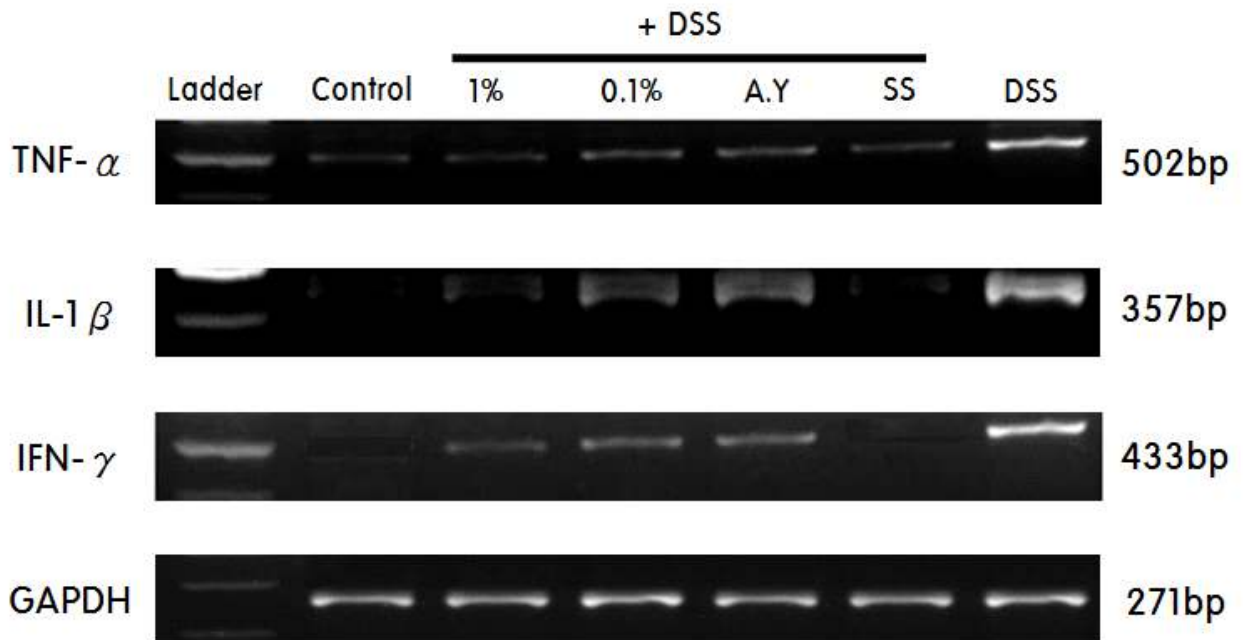
PCR실험을 진행 할 때 사용한 Primer는 표 2.3에 있다. RT-PCR 생성물은 2% 아가로오스 겔과 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통해 확인하였다. 모든 결과는 GAPDH 발현량을 맞춘 후에 결정하였다.

총 RNA를 쥐의 mesentric lymphnode(MLN)에서 추출하였다. 총 RNA는 Trizol 시약 (Invitrogen, USA)을 사용하였고 제조사의 설명서에 따라서 진행하였다. 순수한 총 RNA를 추출하기 위해 산성페놀과 클로로포름을 사용하였다. 그 후 Superscript transcriptase III(Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다.(변성과정 95℃에서 30초, annealing과정 60℃에서 30초, extension과정 72℃에서 30초 * 35회)

PCR실험을 진행 할 때 사용한 Primer는 표 2.3에 있다. RT-PCR 생성물은 2% 아가로오스 겔과 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통해 확인하였다. 모든 결과는 GAPDH 발현량을 맞춘 후에 결정하였다.

(표 10) 실험에 사용된 RT-PCR primer

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



(그림 38) 유제품 첨가에 따른 염증성 사이토카인 발현 확인

이상으로 조각자 함유 요거트의 항염증 효과를 알아보았다. 우유 및 포도당을 첨가한 요거트에 조각자를 첨가하였을시, 첫번째 3항에서 검증하였던 조각자의 항염증 효과와 유사한 결과가 나타났다. 1 % 조각자 함유 요거트에서 대장의 길이는 DSS 가 짧은 것에 비하여 미처리구와 비슷한 수준으로 나타났고, DSS로 유도한 염증성 사이토카인의 발현 역시, 조각자와 비슷한 수준으로 억제되었다. 0.1 % 조각자 함유 요거트 및 산침전 요거트는 DSS 처리구보다 항염증 효과가 완화되었다. 산침전 요거트 자체도 우유 및 유산균에 의한 면역조절 작용효과가 약간 있는 것으로 나타났으나, 1 % 조각자 함유 요거트 만큼 항염증 효과가 있지는 않았다.

제 6 절 Encapsulation process 에 따른 산업적 활용방안 모색

제 1 항 Alginate coating 캡슐의 제조

선발된 Probiotic 균주의 캡슐제조는 Alginate와 Calcium 의 Cross linkage 교차결합을 통하여 gel 화가 되는 원리를 이용하여 제조하였다. 이러한 캡슐의 제조는 유제품 내에서 Probiotics 의 생존성 및 생리활성에 보호 또는 증진 효과가 있을 것이라는 가정 하에 실험을 수행하였다.

선발된 Probiotic 균주 *Lactobacillus brevis* KY21 는 계대배양을 통하여 활력을 높인 후 원심 분리하여 cell suspension 을 모았다. 이 cell suspension 에 Skim milk, glucose, yeast extract 용액에 현탁한 후 동결건조기(일신랩, Korea)를 이용하여 2일간 동결건조하여 시료를 준비하였다.

Sodium alginate 를 이용한 캡슐제조는 Lee 등(2004)의 방법에 따라 실시하였다. Sodium Alginates (A2033, Sigma, UK) 용액을 농도별로 0.5, 1, 2%를 준비하였고 여기에 5.5% MRS broth, 5% glycerol, 0.26% (G6279, Sigma, USA), xanthan gum (G1253, Sigma, USA) , 0.1% Tween 20 (274348, Sigma, Malaysia) 을 넣어 혼합용액을 제조하였다. 실험에 사용되는 모든 유리용기와 용액을 121 °C에서 15분 동안 멸균하였다. 멸균된 Sodium alginate 용액에 20%의 KY21 cell 을 넣어 녹인 후, 각각 준비된 0.5, 1, 2M CaCl₂ (C4091, Sigma, Japan) 용액 200 ml에 1 ml syringe를 이용하여 천천히 떨어뜨려 주고 15분간 stirring 하여 캡슐화 하였다. 완성된 캡슐을 110mm∅ 의 filter paper를 이용하여 걸러 준 후, 3차 증류수로 2회 세척하여 급속 동결하였다.

Calcium Alginate 코팅의 시료는 다음과 같이 6가지로 제조하였다.

시료수	Alginate 농도	CaCl ₂ 농도
1	1% Alginate	0.5 M CaCl ₂
2		1.0 M CaCl ₂
3		2.0 M CaCl ₂
4	2% Alginate	0.5 M CaCl ₂
5		1.0 M CaCl ₂
6		2.0 M CaCl ₂

제 2 항 Hybridization 을 이용한 분체복합화 캡슐의 제조

코팅제(Eudragit L-100 (Rohm Pharma, Germany), S-100(Rohm Pharma, Germany), Sureteric (Coloncon, UK) 및 유산균을 사용하여 Hybridization system (NHS-0, Nara Machinery, Japan)을 이용하여 건식코팅(1, 2)을 수행하였다.

일정한 배합비로 premix 된 모델 생균제와 피복물질은 Hybridization system 내에서 압축공기과 회전 로터에 의해 발생한 기계적, 정전기적 힘에 의하여 복합화 되었다. Hybridization system의 처리조건에 따른 피복효과는 압축공기 3 kgf/cm²의 조건에서 회전 로터의 속도를 5,000 rpm, 10,000 rpm, 15,000 rpm으로 변화시켜 각 3분간 처리 후 관찰하였다. 또한 생균제와 피복물질간의 입도 차이에 따른 피복 효과를 조사하기 위하여 생균제를 체거름을 이용하여 분획한 후 각각 피복재와 복합화 하였다.

가장 효율적인 피복조건을 탐색한 결과, 유산균대 각각의 코팅제의 비율을 2:1 의 범위에서 실시하였고, 운전조건은 회전수를 12,000 rpm의 범위에서, 공기압은 3 kgf/cm²의 조건에서 건식코팅 공정을 수행하였다.

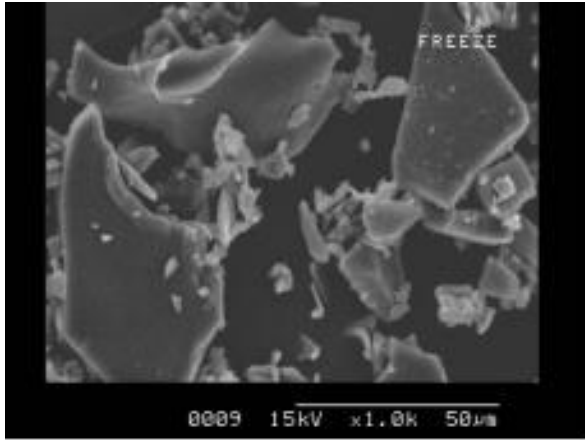
제 3 항 제조된 캡슐의 표면분석 및 생리활성 측정

1. 영상 현미경을 이용한 표면 분석

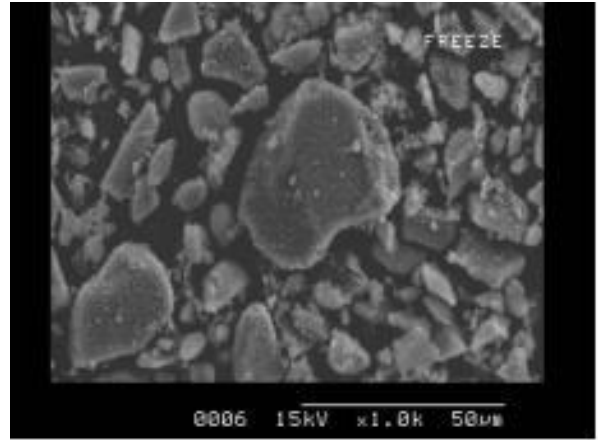
영상현미경 (MW-200B1, 삼성전관, 한국)을 이용하여 표면을 측정하였다. 슬라이드 글라스 위에 시료를 올려놓고 표본대에 장착하였다. 50 배율 렌즈를 장착하여 대표적인 화상을 출력하여 나타내었다.

2. 주사전자현미경 (SEM)에 의한 표면 분석

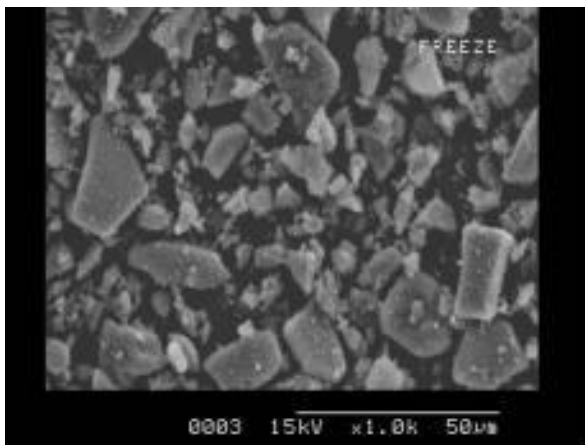
주사전자현미경 (S-2380N, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체 및 시료의 표면을 측정(1, 2)하였다. 양면테이프를 알맞은 크기로 잘라 표본대에 부착한 후 그 위에 관찰하고자 하는 시료를 가볍게 떨어뜨렸다. 준비된 표본은 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시켰다. 표본의 형태는 15kV의 accelerating voltage에서 관찰하였으며, 대표적인 화상을 출력하여 나타내었다. 단, 유당 처리한 시료의 내부 혹은 표면구조를 관찰하기 위해서는 Khalil(1999)의 방법을 이용하여 시료를 고정화시킨 후 SEM을 이용하였다.



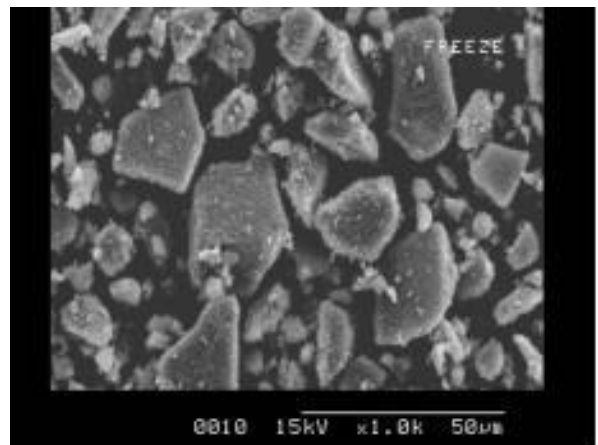
유산균(대조구)



Sureteric으로 코팅된 유산균



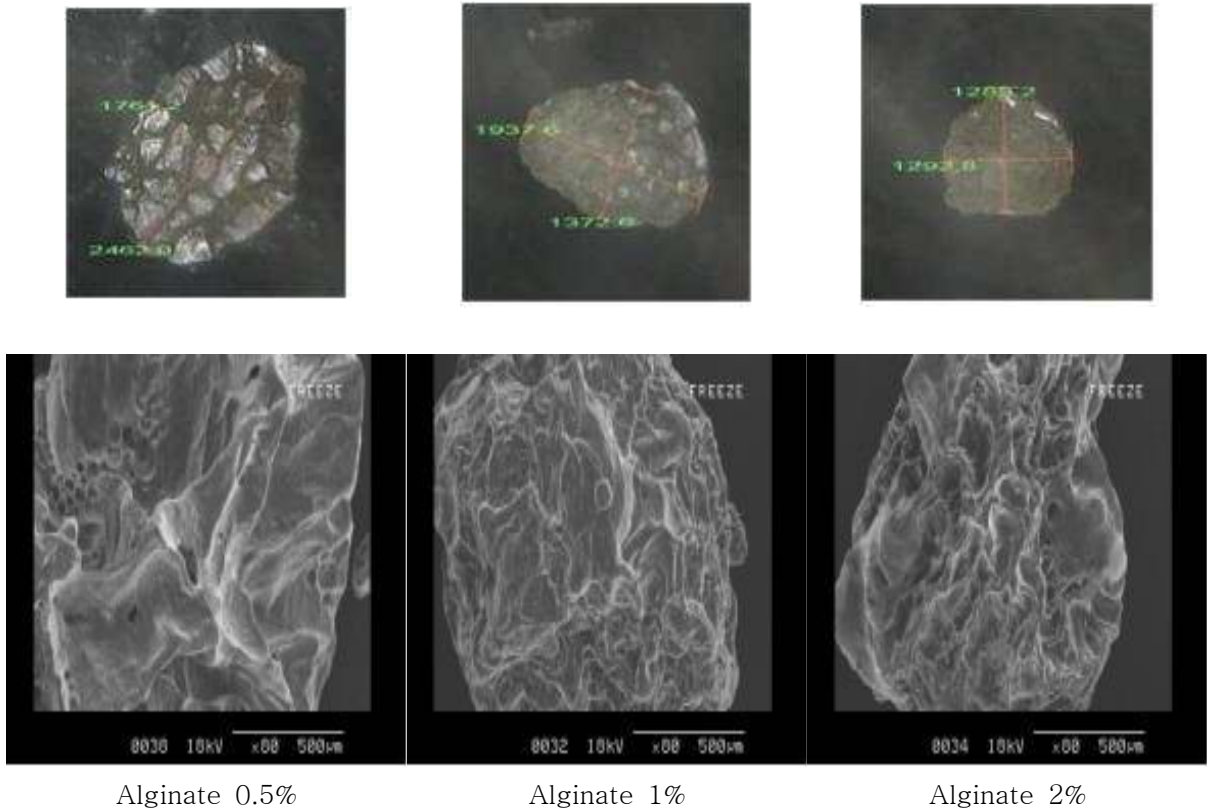
Eudragit L-100으로 코팅된 유산균



Eudragit S-100으로 코팅된 유산균

(그림 38) Hybridization system을 이용한 건식코팅 유산균의 형태

건식코팅 방법으로 encapsulation 시킨 유산균의 구조를 주사전자현미경(S-2380N, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 코팅 하기 전 동결건조한 유산균의 형태를 보면 모서리가 날카롭게 조각난 형태를 나타내었으나, 코팅제를 이용하여 건식코팅 공정을 거친 유산균을 살펴보면 코팅 공정 중 충돌에 의해 원형에 가까운 형태로 변화되었으며 이에 따라 입도도 약간 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 건식코팅의 효율은 유산균 안정성 시험 결과에서도 확인할 수 있다.



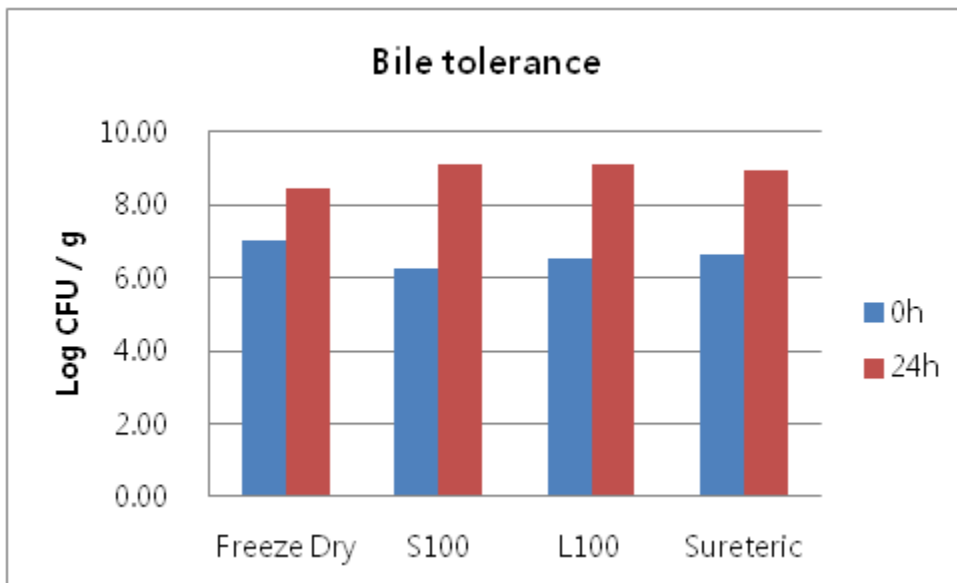
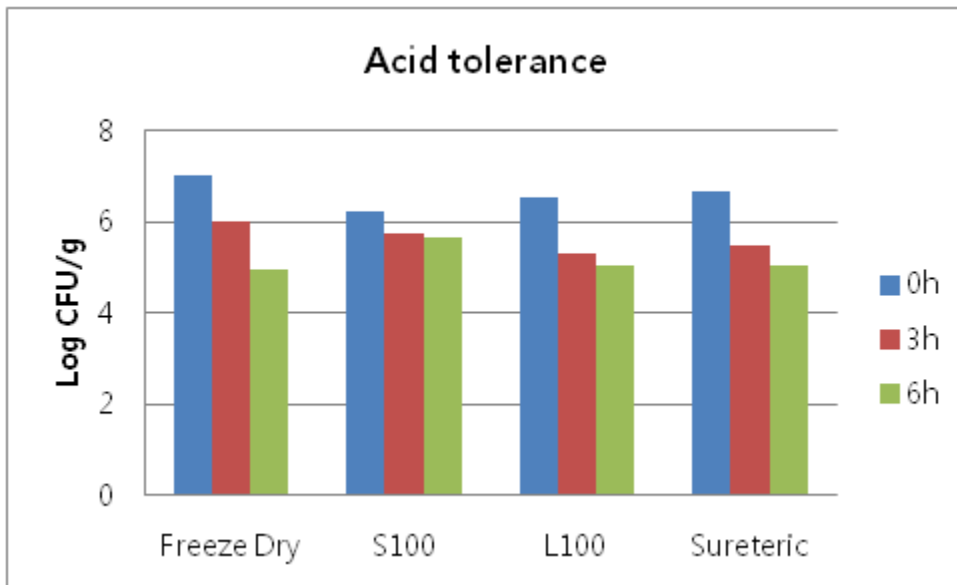
(그림 39) Alginate 농도에 따른 Probiotics-loaded alginate beads의 형태

Alginate 및 CaCl_2 를 이용하여 유산균을 캡슐화 시킨 alginate beads를 영상 현미경 (MW-200B1, 삼성전관, 한국)과 주사전자현미경(S-2380N, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰한 사진을 나타내었다. 영상 현미경을 이용하여 관찰한 결과, alginate 농도가 낮을수록 beads의 견고함이 떨어졌으며, 캡슐의 모양도 원형이 아닌 긴 타원형을 하고 있었다. 이는 alginate의 낮은 농도로 인해서 공정 중 형태가 변화된 것으로 판단된다. 반면에 alginate의 농도가 높아지면 조직이 견고해지고 캡슐화된 모양도 원형에 가까운 형태를 나타내었다. 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, alginate 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으며, CaCl_2 농도를 달리하였을 경우에도 큰 차이점이 발견되지 않았다. 반면 alginate beads를 이용한 유산균의 안정성 시험 결과 높은 효율을 확인한 바 있다.

3. 제조된 캡슐의 생리활성 측정

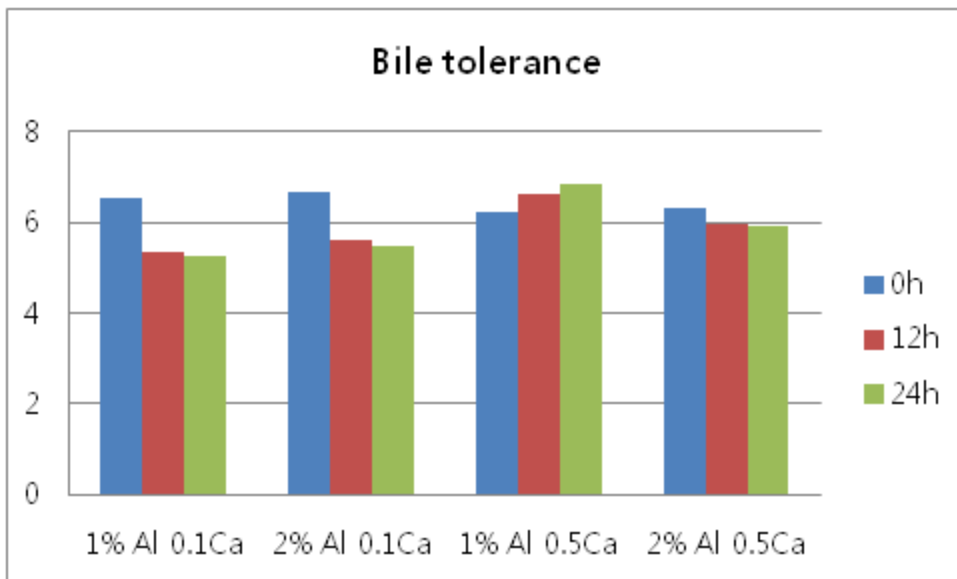
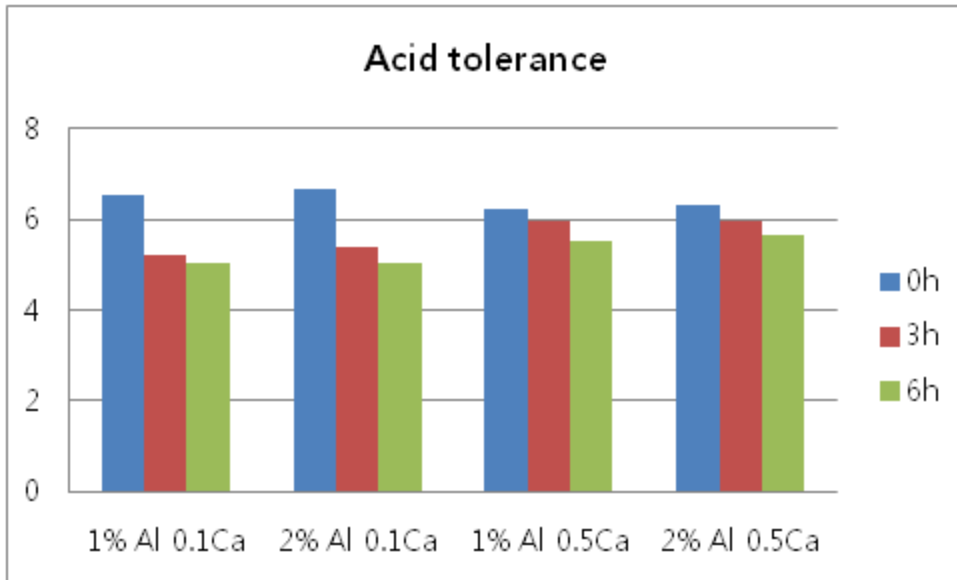
내산성 실험은 Kobayashi 등 (1974)의 방법을 변형하여 실시하였다. 제조된 캡슐 및 Freeze dry 유산균주를 시료로 이용하였다. MRS 액체 배지에 pH를 2.5로 조정하고 Pepsine(1000unit/ml) 을 첨가하여 인공위액 배지를 제조하였다. 인공위액 배지에 캡슐 및 Freeze dry 균주를 0.1 g 녹여서 접종한 후 0, 3, 6 시간 간격으로 생균수를 측정하였다. 생균수 측정은 PBS 희석액으로 희석하여 MRS agar 에 도말하였으며, 37 °C에서 48 시간 배양한 후 콜로니를 세어서 균수를 나타내었다. 단위는 log CFU / g 으로 하였다.

내담즙성 실험은 내산성실험에 사용된 인공위액 대신 oxgall 이 0.3% 함유된 MRS broth 에 캡슐을 접종한 후 내산성 평가방법과 동일한 방법으로 0, 12, 24 시간 간격으로 생존균수를 측정하였다.



(그림 40). 건식코팅제의 내산성과 내담즙성

건식코팅 캡슐의 내산성 측정결과 KY21 Freeze dry sample이 10^7 수준에서 10^5 수준으로 log 2 cycle 감소하는데 반하여 S100 의 경우는 내산성이 다른 시료에 비해 좋은 것으로 나타났다. 내담즙성의 경우 24시간 후 생균수가 모두 증가하였으며, Freeze dry sample의 증가가 낮게 나타났으나 크게 유의적 차이는 존재하지 않았다.

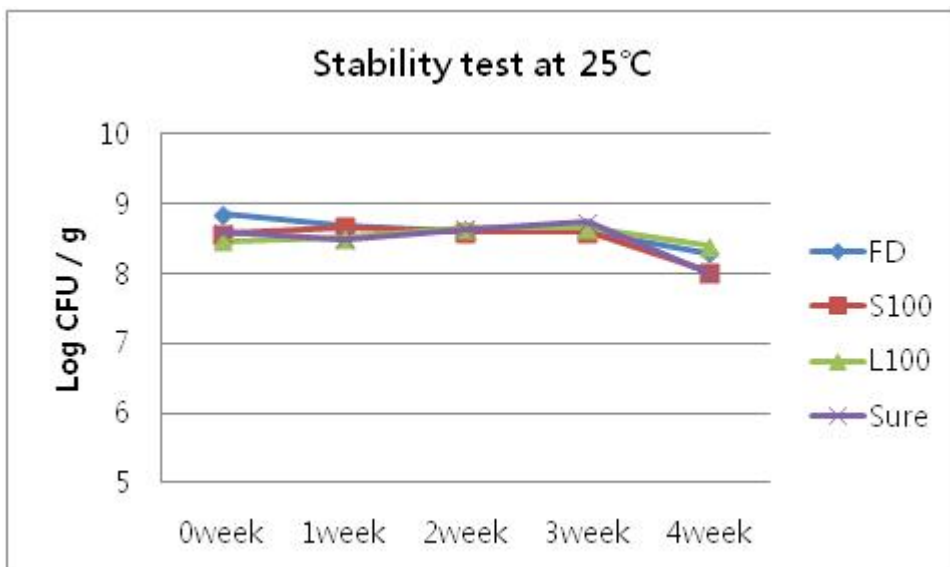
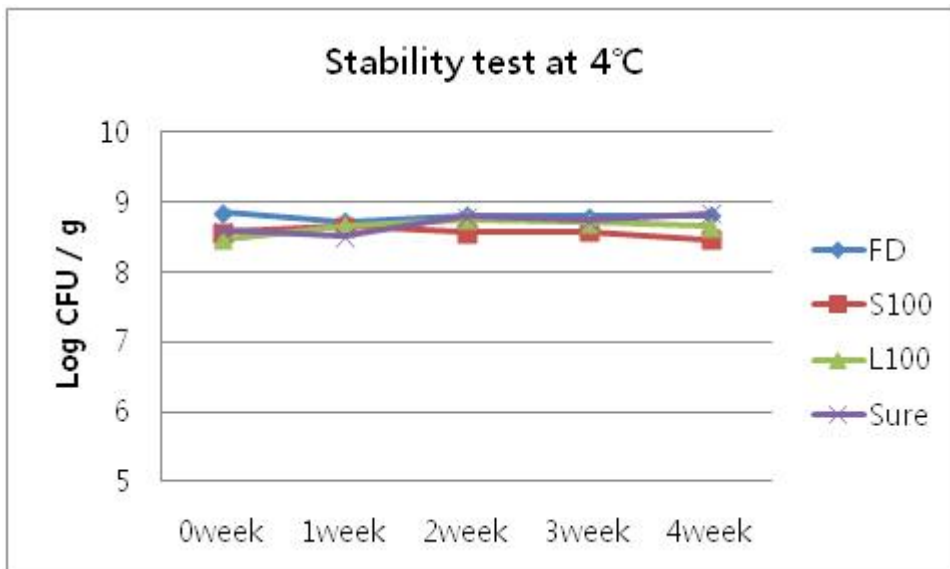


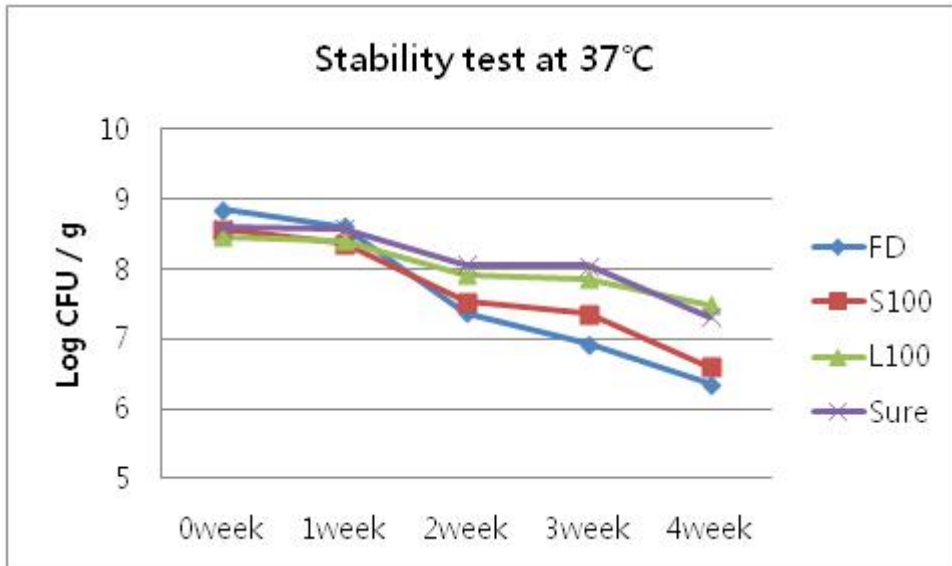
(그림 41). Alginate 코팅의 농도별 내산성과 내담즙성

Alginate와 CaCl_2 의 교차결합으로 생성된 캡슐의 내산성 측정결과 0.5 M CaCl_2 의 내산성이 0.1 M CaCl_2 의 캡슐보다 좋은 것으로 나타났다. 또한 내담즙성의 결과에서도 S100의 경우는 내산성이 다른 시료에 비해 좋은 것으로 나타났다. 내담즙성의 경우에서도 0.5 M CaCl_2 의 생존수가 시간이 지남에 따라 0.1 M CaCl_2 의 캡슐보다 좋은 것으로 나타났으며, 오히려 내담즙배지에서 성장하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 Alginate 코팅에서 Calcium 이온과 교차결합을 통하여 겔을 형성하는 과정에서 0.1M에 비해 0.5 M의 CaCl_2 solution이 probiotic 균주를 캡슐화하여 생리활성을 보호 또는 증진 시키는 것으로 나타났다.

제 4 항 제조된 캡슐의 저장안정성 확인

제조된 캡슐의 저장안정성 확인은 총 4주간 각각의 저장온도에서 시료를 저장하며 생균수를 측정하여 안정성을 비교하였다. 건식코팅 3시료, Alginate 코팅 4개시료, Freeze dry 시료를 비교하였으며, 4 °C, 25 °C 에서 저장하며 생균수를 측정, 비교하였다. 각각의 온도가 설정된 incubator 에서 저장을 하며 매주 PBS희석액과 MRS agar를 이용하여 도말, 생균수를 측정하였다.





(그림 42). 저장온도별 시료의 저장안정성

그림 4에서 보듯이, 저장성 측정결과 건식코팅 시료별 차이는 4 °C와 25 °C에서 크게 나타나지 않았다. 다만 37 °C에서 Freeze dry 시료가 주별로 생균수가 감소하는 것에 비하여 L100과 Sureteric 건식코팅 시료는 생균수가 감소하는 경향이 덜하였다. L100은 저장안정성이 Freeze dry시료와 유사한 것으로 나타났다. Alginate 코팅시료의 저장안정성은 주별로 Freeze dry와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 Hybridization을 통하여 제조한 시료 3개중 Eudragit L100과 Sureteric 복합 캡슐은 저장안정성이 Freeze dry 시료보다 뛰어난 것으로 나타났으며, Probiotic 균주의 Encapsulation 에서 산업적 이용가능성이 크다고 하겠다.

제 4 장 목표달성 및 기여도

제 1 절 장 염증 완화활성을 가지는 물질 탐색 및 검증

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 천연추출물을 이용한 면역조절을 통한 장 염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용 기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다. 프로바이오틱 균주에서 분획한 물질을 이용하여 장 상피세포 모델인 대장 암 세포주를 대상으로 세포 수준에서의 면역 조절 효능을 검증하였으며, 세포 주 단백질 발현 패턴을 분석, 또한 동물 모델을 통해 숙주의 면역세포 및 염증성 사이토카인의 분비를 살펴보았다. 이를 통해 천연물 조각자와 *Lactobacillus brevis* KY21 균주를 선별하였으며, 선별된 천연물과 프로바이오틱 균주는 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 염증을 완화하는 것으로 밝혀졌다.

제 2 절 균주와 추출물을 이용한 복합발효기술 확립

소비자 선호도변화에 대한 생산자들의 대응은 신속해지고 있고, 보다 품질이 좋고, 안전하며 차별화된 제품을 생산하는 것뿐만 아니라, 기능 또는 기타 여러 요소별로 차별화된 제품의 상표화(brand-use)를 통해 소비자들의 욕구를 충족시키고자 노력하고 있다. 그러나 검증되지 않은 '기능성'에 대한 소비자들의 의구심과 관련업체가 기능성을 알리는데 어려움을 겪고 정당한 평가를 받고 있지 못하여 기능성 식품산업의 발전이 제한되고 있다.

항염증 효과를 보이는 조각자는 열수 추출하여 밀봉된 상태로 보관 사용 하였으며, flavor, 기타 구성 요소 등을 변수로 하여 최적의 음료 식품의 배합비 조성확립을 위하여 조각자 추출액 고형분 기준으로 첨가한 음료를 만들어 관능 평가를 실시하였다. 관능검사를 통한 선호도 조사를 통해 "천연물 향과 맛이 너무 강하다"는 대부분의 의견을 확인 할 수 있었으며, 맛이 상품 선택에 많은 부분을 차지하는 것을 확인하였다. 관능 평가를 통해 선호도에 적합한 조각자 추출물 배합비를 결정하였으며, 다양한 배지를 이용한 식품 공전 상의 미생물 검사를 통해 복합 발효물을 만들기 위한 조건에서의 안전성 및 유통 상의 안정성을 확인하였다.

이를 통해 복합 발효물 생산 및 유통 상의 안전성 확보를 위한 발효 조건을 확립 하였으며, 프로바이오틱 균주의 면역조절 기능성 식품소재의 개발 및 천연추출물을 이용한 복합 발효를 이용하여 발효유제품 시장에 다양화, 선진화를 제공할 수 있다.

제 3 절 Encapsulation process 에 따른 산업적 활용방안 모색

프로바이오틱 균주는 적당한 양을 섭취하였을 때 건강에 도움이 되는 살아있는 균(live organism)으로 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제 재라 할 수 있다. 프로바이오틱 균주는 숙주동물의 소화기관의 위산과 담즙산에 의해 영향을 받는다.

선발된 균주 및 추출물의 Encapsulation을 통해 소화기관의 환경에 대한 저항성과 조각자 추출물의 비선호적인 향을 줄이기 위한 조건을 결정하였다. 캡슐의 생리활성, 캡슐 이전과 이후의 균주 활성을 비교해 산업에 적용할 수 있는 방안을 모색하였다.

Encapsulation을 프로바이오틱 균주 및 추출물에 적용하여 선별 균주와 색소에 대한 안정적인 캡슐 방법 적립과 상온 및 저장 온도에서의 저장성 향상과 내산성, 내담즙성이 향상을 확인하였다.

결론적으로, 항염증 활성이 있는 조각자 추출물 및 프로바이오틱스 균주 KY21 이 포함된 유제품 제조 및 Encapsulation을 통해 염증관련 장 질환의 완화 및 환경에 대한 저항성, 저장성이 향상된 식품소재를 개발하는데 활용할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

본 연구에서는 프로바이오틱 균주와 천연추출물을 이용한 면역조절을 통한 장 염증 완화 물질을 탐색하고 기존의 접근방법과 차별화된 다양한 분석 기술을 통해 작용기작을 탐색한 후 식품에 적용하는 기술을 개발하고자 하였다.

선별된 프로바이오틱 균주와 조각자 추출물에 대한 항염증 작용에 대한 연구는 많은 부분 수행되었지만, 균주와 추출물의 배합비에 따른 관능검사 외에 발효 후 발효물에 대한 관능검사가 추가적으로 이루어져야 하며, 조각자 추출물의 Encapsulation을 통해 기호적인 선호도의 변화도에 대한 연구가 이루어져야 한다.

많은 가능성을 내재하고 있는 천연물 및 천연물 추출물의 식품 소재로서의 연구를 통하여, 소비자의 기호도에 영향을 줄 수 있는 천연물 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 밟으므로 반복발작하기 쉬우므로 식이요법, 운동요법, 약물치료를 병행하여야 한다. 여기에 이용되는 약물은 대부분 한약재로서 환자의 체질, 병소의 부위 및 병소의 선후를 결합하여 치료원칙을 정한다. 문헌상 항염증 효과가 있는 한약재 소재는 30여종에 달하며, 본 연구를 통하여 항염증 효과가 우수한 “조각자” 추출물을 통한 다양한 방면에서의 항염증 작용을 관찰하였다.

프로바이오틱스는 적당한 양을 섭취하였을 때 숙주동물의 장내 균총을 개선시켜 줌으로써 유익한 영향을 주는 생균제제로써, 같은 연구를 통해 KY21 균주를 선별, 항염증 작용을 관찰하였다. 이러한 연구 방법 및 연구를 통해 기타 항염증 작용의 물질 선별에 초석이 될 수 있으며, 유산균에 대한 Encapsulation 적용 기술을 토대로 식품으로써 섭취 시 손실될 수 있는 기능성 물질에 대한 저항성 및 저장성 향상에 적용될 수 있다.

제 6 장 해외에서 수집한 정보

염증성 장질환으로 대표되는 궤양성 대장염과 크론씨 병은 서구에서 더 흔한 병으로 국내에서도 최근 발병율이 증가하는 추세이다. 따라서 서양, 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 각각도로 검토하는 것으로 알려져 있으며, 임상 실험 및 메타분석, 설문 조사 등의 방법으로 병원 및 연구소에서 행해지고 있었다.

크론 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 크론 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.

김정목, 2002, 염증성 장 질환에 있어서 점막 균 무리. 대한소화기학회지. 40:352-353, 122:44-54.

김태호, 김병관, 신형두, 김지원, 김찬규, 김주성, 정현재, 송인성. 2003. 염증성 장질환, 단일 염기 다형성. 대한소화기학회지. 42(5):377-388.

문기성. 2006. 프로바이오틱스를 이용한 최근 임상 연구동향. Trends in Agr.&life sciences, 4(4):183-190.

양석균. 2002. 한국인의 염증성 장질환의 현황과 전망. 대한소화기학회지. 40:1-14.

이병욱, 조재호, 이길연, 김효종, 지성길, 정용희, 한요셉, 동석호, 김병호, 장영운, 이정일, 2003. NRAMP1 유전자, 다형성, 염증성 장 질환. 대한소화기학회지. 41(6):465-472.

임병우, 정용준, 박미현, 김종대, 황성주, 유병필. 2007. DSS로 유도된 염증성 장 질환 마우스 동물모델에서 생식이 장관 임파조직내 면역조절 기능에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 36:32-42

장병익. 2007. 염증성 장질환의 최신지견. Yeungnam Univ. J. of med. 24(2):221-233

진윤태, 권용대. 2006. 한국인의 염증성 장질환 진단의 문제점. 대한장연구학회 4(2):75-78.

Abreu-Martin MT., Vidrich A., Lynch, DH., and Targan SR. 1995. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF- α and ligation of Fas antigen. *J. Immunol.* 155:4147 - 4154.

Alberto M., Barbara B., Francesco C., Silvano S., and Luigi R. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages *Immunology Today.* 13(7): 265-270.

Ann E. Y, Kim YH, Oh S, Imm JY, Park DJ, Han KS, Kim SH. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridization system. *International Journal of Food Science and Technology* 42:411-419.

Baeuerle P., and Henkel T. 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141 - 179.

Bhan, A., Mizoguchi, E., Smith, R., & Mizoguchi, A. 1999. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews,* 169: 195 - 207.

Blumberg R, Saubermann L, Strober W. 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 11:648 - 656.

Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, Sargnet M, Datta LW, Nouvet F, Shugart YY, and Bernstein CN. 2007. A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 313-323.

Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food Engineering.* 104:467-483

Cario E., and Podolsky DK. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR 3) and TLR 4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immune*. 68: 7010-7017.

Chang JH, Park JY, and Kim SK. 2000. Dependence on p38 MAPK signaling in the up-regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression in *Trichomonas vaginalis*-treated HeLa cells. *Immunol*. 118:164-170.

Chang HK, Yang HY, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS, Kim CJ, Kim OJ, Hong SP, Cho S. 2005. Armeniaca semen extract suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase [correction of cycloosygenase]-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *Biol Pharm Bull*. 28(3):449-454.

Choi HJ, Kang OH, Park PS, Chae HS, Oh YC, Lee YS, Choi JG, Lee GH, Kweon OH, Kwon DY. 2007. Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Med Food*. 10(3):460-466.

Favier C., Neut C., Mizon A., Cortot J., Colombel F., and Mizon J. 1997. Fecal β -D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 42(4): 817 - 822.

Dai Y, Chan YP, Chu LM, Bu PP. 2002. Antiallergic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract from *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull*. 25(9):1179-1182.

Dieleman LA., Palmen MJ., Akol H., Bloemena E., Pena AS., Meuwissen SG., VanRees EP. 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol*. 114: 385 - 391.

Elson CO., Sartor RB., Tennyson GS., Riddell, 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 109: 1344 - 1367.

Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K. 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 22:1199 - 1204.

Hanne R. Christensen H, F., James, J, P. 2002. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells .*The Journal of Immunology*, 168: 171-178.

Hansen, R, Thomson, J., M. Omar, E, M., Hold, G. L. .2010. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 45:266 - 276.

Habeeb F, Stables G, Bradbury F, Nong S, Cameron P, Plevin R, Ferro VA. 2007. The inner gel component of Aloe vera suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. *Methods.* 42(4):388-93.

Hibi, T., Ogata, H., & Sakuraba, 2002. A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J.Gastroenterol.* 37: 409 - 417.

Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK. 2002. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol.* 83(1-2):153-159.

Howarth GS., Xian CJ., Read LC. 1998. Insulin-like Growth Factor-I Partially attenuates Colonic Damage in Rats with Experimental Colitis Induced by Oral Dextran Sulphate Sodium. *Scandinavian J. Gastroenterol* 33(2). 180-190.

Isolauri SE. Salminen S., and Ouwehand AC. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18: 299 - 313.

Jamaluddin M., Casola A., Garofalo R., Han Y., Elliott T. 1998. The major component of Ik-B proteolysis occurs independently of the proteasome pathway in respiratory virus-infected pulmonary epithelial cells. *J. Virol* 72, 4849 - 4857.

Kang HS, Lee JY, Kim CJ. 2008. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *J Ethnopharmacol.* 116(2):305-12.

Kailasapathy K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Food Sci. Technol.* 39:1221-1227.

Kim BK, Hwang SJ, Park JB, Park, H J. 2002. Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*, 19(6): 811-822.

Kim KS, Rhee HI, Park EK, Jung K, Jeon HJ, Kim JH, Yoo H, Han CK, Cho YB, Ryu CJ, Yang HI, Yoo MC. 2008. Anti-inflammatory effects of *Radix Gentianae Macrophyllae* (Qinjiao), *Rhizoma Coptidis* (Huanglian) and *Citri Unshiu Pericarpium* (Wenzhou migan) in animal models. *Chin Med.* 2;310.

Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol.* 154(1):165-73.

Lee, JH, Lee BM, Lee HS, Bae EA, Lee HY, Ahn YT, Lim KS, Huh CS, Kim DH. 2008. *Lactobacillus suntoryeus* inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF- κ B activation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis.* DOI 10.1007/s00384-008-0618-6.

Lee JS, Cha DS, Park HJ. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated Calcium Alginate microparticles. *J. Agric. Food. Chem.* 52:7300-7305

Lee YC, Lee JC, Seo YB, Kook YB. 2005. Liriodopsis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol.* 101(1-3):144-52.

MacPherson, B. R., & Pfeiffer, C. J. 1978. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, 17, 135 - 150.

Ma D., Forsythe P., Bienenstock J. 2004. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *72(9):5308-5314.*

Madsen K., Cornish A., Soper P., McKaigney, C., Jijon H., Yachimec, C., Doyle J., Jewell, L., De Simone, C. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterol*, 121:580-591.

Man MQ, Shi Y, Man M, Lee SH, Demerjian M, Chang S, Feingold KR, Elias PM. 2008. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. *Exp Dermatol.* 17(8):681-7.

Marta L, Maria A, Monica C, Natalia B, Francesc C, Cristina M, Eloy EB, Francisco G, and Juan RM. 2009. *Lactobacillus casei* downregulates commensal's inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm. Bowel Dis.* 15:275-283.

Marteau P. 2009. Bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 27: 99 - 103

Mennigen R. 2009. Probiotic mixture VSL # 3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 296 , 1140 - 1149.

Mizoguchi A., Mizoguchi, E. 2008. Inflammatory bowel disease, past, present and future. lessons from animal models. *J. Gastroenterol.*, 43, 1-17.

Miyamoto S., Verma, IM. 1995. Rel/NF- κ B/I κ -B story. *Adv Cancer Res.* 66, 255 - 287.

Mombaerts P., Mizoguchi, E., Grusby, M., Glimcher, L., Bhan, A., Tonegawa, S. 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*, 75, 274 - 282.

Nakaya TA, Kita M, Kuriyama H, Iwakura Y, Imanishi J. 2004. Panax ginseng induces production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor. *J Interferon Cytokine Res.* 24(2):93-100.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicole DL, Chen FF, Romas R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, and Cho JH. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411: 603-606.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. A. 1990. Novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98, 694 - 702.

Park DJ, An Y, Kim JS, Imm JY, Han KS, Kim SH, Kim, Oh S. 2002. Dry Enteric Coating Process of Lactic Acid Bacteria by Hybridization System. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34(5):856-861.

Park YK, Chung YS, Kim YS, Kwon OY, Joh TH. 2007. Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF- α in LPS-stimulated microglia by methanol extract of *Phellodendri* cortex. *Int Immunopharmacol.* 7(7):955-62.

Philpott DJ and Viala J. 2004. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18: 555-568.

Rumi GR., Ryouichi T., Mitsuaki O., Shinichi K., Gyula, M., Koji T. 2004. Protective Effect of Lactulose on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Inflammation in Rats. *Dig. Dis. Sci.* 49(9):1466 - 1472.

Roh SS, Kim SH, Lee YC, Seo YB. 2008. Effects of radix adenophorae and cyclosporine A on an OVA-induced murine model of asthma by suppressing to T cells activity, eosinophilia, and bronchial hyperresponsiveness. *Mediators Inflamm.* 2008:781425.

Ryu M, Kim EH, Chun M, Kang S, Shim B, Yu YB, Jeong G, Lee JS. 2008. Astragali Radix elicits anti-inflammation via activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk. *J Ethnopharmacol.* 115(2):184-93.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A., & Horak, I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 75:253 - 261.

So, JS, Kwon HK, Lee CG. 2008. *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Mol Immunol.*45:2690 - 2699.

Sougioultzis S., Simeonidis S., Bhaskar K.R., Chen A., Anton P.M., Keates S., Pothoulakis C., Kelly C.P., 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 343, 69-76.

Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. 2004. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *J Biol Chem.* 279(7):5877-85.

Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, and Raz E. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.* 126: 520-528.

Varon C., Duriez A., Lehours P., Ménard A., Layé S., Zerbib F., Mégreaud F., Laharie D. 2009. Study of *Heliconacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells in vitro. *Gut*.58:629–635.

Verd u. E. F., Bercik, P., B. Cukrowska. 2000. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice, *Clin. Exp. Immunol*, 120(1):46 - 50.

Wang C, Dai Y, Yang J, Chou G, Wang C, Wang Z. 2007. Treatment with total alkaloids from *Radix Linderae* reduces inflammation and joint destruction in type II collagen-induced model for rheumatoid arthritis. *J Ethnopharmacol*. 111(2):322–8.

Wei Jia, Wen-yuan Gaob, Nai-qiang Cuic and Pei-gen Xiao. 2003. Anti-inflammatory effects of an herbal medicine (Xuan-Ju agent) on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats . *Journal of Ethnopharmacology*. 89(1);139–141.

Xavier, RJ, Podolsky, DK.. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427 - 34.

Yamada T., Marshall S., Specian R., Grisham, MB. 1991. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*, 102, 1524 - 1534.

Yin W, Wang TS, Yin FZ, Cai BC. 2003. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. *J Ethnopharmacol*. 88(2-3):205–14.

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.