

발간등록번호

11-1543000-002480-01

발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선
고령친화 식품소재 및 제품개발
최종보고서

2019.1.21

주관연구기관 / 서울우유협동조합
협동연구기관 / 고려대학교
협동연구기관 / 숙명여자대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

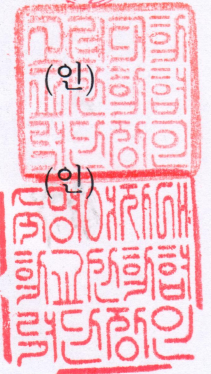
본 보고서를 “발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품 개발”(개발기간 : 2015. 10. 23 ~ 2018. 10. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 1. 21.

주관연구기관명 : 서울우유협동조합 (대표자) 송 용 헌 (인)

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (대표자) 고 제 상 (인)

협동연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 설 원 식 (인)



주관연구책임자 : 서울우유협동조합 오 남 수

협동연구책임자 : 고려대학교 김 세 헌

협동연구책임자 : 고려대학교 이 광 원

협동연구책임자 : 숙명여자대학교 윤 요 한

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	15006-3	해 당 단 계 연구 기 간	2015. 10. 23 ~ 2018. 10. 22	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품 개발			
	세부 과제명	주관 : 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품개발 제1협동 : 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 염증 유래 뇌 기능 저하 개선 기능성 연구 제2협동 : 발효 당화유단백질을 이용한 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구 제3협동 : 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 질환 원인 저병원성 세균 및 유해세균(식중독세균, 부패세균) 제어 효과 분석			
연구책임자	오남수	해당단계 참여연구원 수	총: 39명 내부: 39명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 420,000천원 민간: 420,000천원 계: 840,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 39명 내부: 39명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 420,000천원 민간: 420,000천원 계: 840,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울우유협동조합			참여기업명	서울우유협동조합
국제공동연구 위탁연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음				
기저성 염증 및 뇌 기능 저하 개선 발효 당화 유단백질 소재 개발과 기능성 연구 및 소재 적용 유제품 개발					보고서 면수 259p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 염증 개선 효과를 지니는 프로바이오틱스의 선발과 발효 당화유단백질의 대량생산 공정 확립 ○ 발효 당화유단백질의 노화 및 스트레스로 인한 뇌기능 저하 개선 효과 입증 및 메카니즘 연구 ○ 발효 당화유단백질 및 시제품의 장내 기저성 염증 및 기저질환 개선 기능성 입증 ○ 저병원성 장내미생물에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성능 입증 ○ 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증 완화 고령친화 식품 소재 및 제품 개발 (액상타입 1종 및 분말타입 1종)
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품 적용이 가능한 기능성 발효 당화유단백질 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 우유 및 유제품 또는 단백질 보충제 등으로 많은 소비가 이루어지는 유단백질을 활용한 장내 기저성 염증 개선 효과를 가지는 기능성 소재 개발 - 고령화 시대로 인한 노화 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선의 효과를 지니는 식품 소재 개발 - 장내 저병원성 세균에 대한 항균활성 기능성 소재 개발 ○ 인체 유래 고기능성 프로바이오틱스 균주 선발 ○ 발효 당화유단백질의 기능성 검증을 통한 뇌 기능 및 염증 개선 작용기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 스트레스성 뇌 기능 완화 기능성 검증을 위한 동물 모델 및 검증 시스템 확립 - 동물모델을 통한 발효 당화유단백질의 뇌 기능 및 기저성 염증 개선 효능 검증 ○ 발효 당화유단백질을 활용한 스트레스성 뇌 기능 저하 완화 및 기저성 염증 개선 효능을 지니는 고령친화 유제품의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 발효유 1종, 분말 제제 1종 시제품 제작 완료 ○ 연구결과의 홍보 <ul style="list-style-type: none"> - 국내외 학술등재지에 논문 게재 (SCI급 4건) - 국내외 학회 발표 (23 건) - 국내특허 출원 (2건) - 생물자원 등록 (2건) - 기술이전 (1건) - 제품화 3건
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 최근 고령화시대에 따라 기저성 만성염증의 개선과 관련된 다방면의 연구들이 지속적으로 증가하고 국내외적으로 새로운 연구 및 산업의 분야로 조명되어지고 있는 시점에서, 발효 당화유

	<p>단백질의 장내 염증 억제 기능성 소재 개발은 신규 고부가가치 식품산업을 형성할 것으로 기대됨</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발효 당화유단백질을 활용하여 기저성 만성염증의 개선을 통한 뇌기능 저하개선 및 장내 저병원성 세균에 대한 제어효과를 분석함으로써 종합적인 평가가 가능한 연구시스템을 구축 - 축산식품 유래인 발효 당화유단백질의 기능성 입증을 통하여 기능성 식품소재의 다양화 가능 - 고령친화용 천연 식품신소재 및 제품 개발로 인한 선진국과의 기술격차 해소 - 삼성서울병원과 연계하여 발효 당화유단백질 소재 및 프로바이오틱스의 인체적용시험을 계획 중이며, 식약처 개별인정형 원료 획득 추진 예정 <p>○ 경제·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 발효 당화유단백질 함유 유제품 개발을 통하여 기저성 질환이 개선됨에 따라 국민의 건강 증진 및 유제품의 판매수익 증가에 기여 - 주관연구기관인 서울우유협동조합의 유통망을 통하여 제품을 출시 및 홍보할 예정임 - 본 연구 결과를 바탕으로 발효 당화유단백질의 장내 염증 개선 효과를 지니는 유제품을 개발하여 우유 및 우유 내 부산물의 부가가치 상승 기대 - 고령자친화용 유제품의 개발을 통하여 초기 단계인 고령친화식품 관련 산업의 기술경쟁력을 강화하여 글로벌 시장진출 확대 및 미래 성장동력 산업으로 육성 				
국문핵심어 (5개 이내)	우유 단백질	당화 산물	고령화	만성 스트레스	유제품
영문핵심어 (5개 이내)	Milk protein	Glycated products	Aging	Chronic stress	Dairy products

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	14
2-1. 연구내용	14
2-1-1. 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품개발	14
2-1-2. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 기능성 연구	69
2-1-3. 발효 당화유단백질을 이용한 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구	131
2-1-4. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 질환 원인 저병원성 세균 및 유해세균(식중독세균, 부패세균) 제어 효과 분석	178
2-2. 연구개발 성과	238
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	244
4. 연구결과의 활용 계획 등	252
붙임. 참고 문헌	253

1. 연구개발과제의 개요

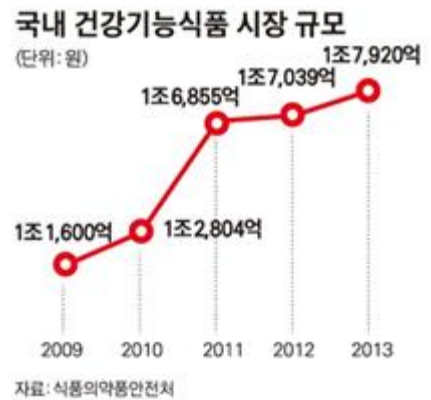
1-1. 연구개발 목적

- 염증 개선 효과를 지니는 프로바이오틱스의 선발과 발효 당화유단백질의 대량생산 공정 확립
- 발효 당화유단백질의 노화 및 스트레스로 인한 뇌기능 저하 기작연구 및 개선효과 입증
- 발효 당화유단백질 및 시제품의 장내 기저성 염증 및 기저질환 개선 기능성 입증
- 저병원성 장내미생물에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성능 입증
- 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증 완화 고령친화 식품 소재 및 제품 개발 (특수의료용도등식품 액상타입 1종 및 분말타입 1종)

1-2. 연구개발의 필요성

가. 고령화 및 고령친화 식품 시장 현황

- 2014년 통계청 자료에 따르면, 2014년 고령인구는 총 인구의 12.7%로 매년 증가하는 추세를 보이고 있으며, 우리나라는 이미 2000년에 고령화사회에 진입했으며 2026년부터 초고령사회에 들어서 2050년에는 전체 인구의 37.4%가 고령인구가 될 전망이다



- 고령화에 의한 면역력 저하는 만성염증을 일으키기 쉬운 환경을 만들게 되며, 고혈압, 당뇨병, 관절염, 만성폐질환, 암, 만성위염, 만성 간질환 등의 발병이 증가함
- 고령친화식품은 섭취기능 및 대사기능 저하, 영양성분 부족 등 일반 적인 고령 소비자의 신체적 특징을 반영하고, 다양한 기호를 충족시킬 수 있는 식품을 의미함 (한국보건산업진흥원, 2012, 건강기능식품산업 선진화 지원)
- 현재 고령친화식품의 정의는 공식적으로 정립되어 있지 않았으나 노인들에게 부족한 칼슘, 비타민A, 리보플라빈 등이 풍부한 식품, 후각·미각 기능 감소, 치아 부실등을 겪는 노인의 기호에 맞는 맛·향·형태를 지닌 식품 등을 고령자용 식품이라 함 (보건복지부, 2013, 저출산 고령사회 시행계획)
- 현재 시판중인 고령자용 식품 유형을 분류하면 일반식품과 건강식품 2 가지로 구분할 수 있으며, 일반식품은 특수의료용도식품, 즉석 섭취식품, 캔디류 및 식용유지류가 있으며 건강기능식품은 단백질보충, 식이섬유 보충, 텍스트린이 있음

표 1. 국내 판매중인 고령자용 식품의 식품유형 사례

일반식품	건강기능식품
특수의료용도식품 즉석섭취식품 캔디류 식용유지류	단백질 보충 식이섬유 보충 텍스트린

- 특수의료용도식품등 식품 유형으로 환자용 균형영양식, 당뇨환자용 식품, 신장질환자용 식품, 장질환자용 가수분해 식품, 열량 및 영양공급용 의료용도식품 등 8가지로 구성되어 있으나, 대부분 연하기능 저하 환자를 고려한 파우더 또는 액상제품으로 고령소비자의 영양적 기능을 고려한 제품은 거의 없는 실정임. 현재 국내에서 고령소비자를 대상으로 한 식품이 개발되어 유통되고 있으나 정보 제공 미흡으로 합리적인 선택이 어려운 상황임
- 최근 고령화, 서구화된 식습관 등의 영향으로 건강 기능성식품 시장은 건강을 추구하는 소비자 욕구 반영으로 인해 다양한 상품이 계속 출시되어 확대될 전망이며, 고령친화식품산업은 2010년 기준4조 9천억원 규모에 달했으며, 2020년에는 16조 6천억원 규모로 성장할 전망이다
- 2012년 고령친화산업 욕구조사에 따르면 고령자가 가장 필요로 하는 고령친화 관련 제품 및 서비스는 '노인을 위해 먹기 좋고 영양이 풍부한 식품'(30.2%)으로 나타났으며, 향후에 가장 많이 먹고자 하는 식품으로는 현재 즐겨 먹고 있는 전통/발효식품과 더불어 '건강기능식품'(57.3%)도 많이 응답되어 고령자들의 건강 유지에 대한 욕구가 파악되었음. 또한, 고령자용 식품으로 평소 즐겨먹는 식품으로 여성의 경우 '우유/유제품' (58.5%), '전통/발효식품' (77.1%)을 상대적으로 많이 섭취하는 것으로 나타났으며, 이러한 고령자들의 욕구에 부합하여 고령친화식품의 개발이 필요한 실정임

나. 기저질환과 뇌질환의 연관성

- 대한민국은 이미 고령사회에 접어들었으며, 노인성 질환의 발생률은 2005년 이후로 꾸준히 증가하는 추세이며 특히 뇌혈관 질환, 치매 등을 비롯한 뇌와 관련된 질병들이 크게 증가함
- 최근의 연구에 따르면 gut microbiota의 변화는 뇌에 영향을 미쳐 불안, 우울증세에 영향을 끼친다는 결과가 있음. 장에 영향을 끼치는 요소로는 식이, 스트레스, 미생물균총, 항생제 등이 있음. 그러므로 probiotics 식이를 통하여 gut microbiota를 개선할 수 있음. probiotics를 투여하여 변화된 체내의 미생물 군집에 의해 신호전달물질, 점막 면역체계 활성화로 인하여 장크롬성세포의 조절 등에 변화가 발생하면, 뇌의 활성화를 기대할 수 있음
- blood brain barrier(BBB)는 뇌의 내부와 외부에서 molecules와 cell의 transport를 선택적으로 조절함으로써 뇌의 microenvironment를 조절하여 뇌를 보호하고 신경혈관의 항상성을 유지하는 매체임. 이러한 BBB의 integrity가 손상 될 경우 신경 교세포 활성화 및

extracellular milieu의 변화가 일어남. brain cell의 inflammation은 BBB permeability를 증가시키며 이러한 과정은 neuronal excitability를 증가시킴. 이러한 결과들을 보았을 때, BBB permeability는 brain dysfunction에 중요한 요소임

- 고령화된 세포는 세포간의 결합 tight junction의 세기가 장 뿐만 아니라 전신의 세포에서 약화됨으로써 BBB의 tight junction 또한 약해져 염증에 취약한 상태가 됨. 따라서, **BBB의 tight junction을 강화, 염증의 침투를 저해하여 뇌질환을 완화할 수 있는 기능성 신소재의 개발이 필요한 실정임**

다. 염증성 장질환 및 기저 질환 관련 연구 현황

- 최근 농림축산식품부 발표에 의하면 2013년 기준으로 한국인의 1인당 평균 육류소비량은 42.7kg이었음. 이처럼 고기를 많이 먹는 인구가 늘면서 관련 질병도 따라 늘고 있음. 식생활이 서구화되면서 최근 10년 사이 대장암 환자는 2배 이상 늘었고 협심증도 50% 가까이 증가함
- 인스턴트식품과 같은 식생활의 서구화가 장에 살고 있는 유익한 세균들을 감소시키고 유해한 균들의 증가를 일으킴. 장내세균이 대장암의 발생에 영향을 미친다는 증거는 이 장내세균 구성에 문제를 보이는 대표적인 질환인 크론병, 궤양성대장염과 같은 염증성 장질환 환자에게 대장암이 발생할 확률이 현저히 높음
- 기저 질환이 있는 경우 장내 만성염증의 발병율이 더 높다고 알려져 있으며, 또한 장내 만성염증으로 인해 복부 비만, 고혈압, 중성지방 증가, HDL 감소, 인슐린 내성 당뇨병 등을 유발하는 것으로 알려져 있음
- 염증성 장질환 (Inflammation Bowel Disease, IBD)이란 장에서 발생하는 원인 불명의 만성적인 염증을 말하며, 원인은 아직까지 정확하게 알려지지 않고 있으나 이 질환들은 유전 및 환경적 영향을 받으며 면역과 관련된 염증이 매개되어 있다고 알려져 있음
- 염증성 장질환은 서양에서는 흔한 병이지만 이와 달리 아시아지역에는 드문 질병으로 인식되어 왔으나 최근에는 점차 서구화되어가는 생활습관에 의해 동양에서도 염증성 장질환의 발생 빈도가 급격하게 증가하고 있는 추세임
- 최근 염증성 장질환 개선과 관련된 연구가 많이 시도되고 있으며, 그 치료 또는 예방 소재를 천연에서 찾고자하는 노력이 이뤄지고 있음. 국외에서 이런 시도가 많이 이뤄지고 있고 새로운 분야로 각광을 받고 있음. 소재로 발효 당화유단백질을 이용한 장염증 억제 소재를 개발할 필요성 있음

라. 장내미생물에 의한 다양한 질환 발생 가능성

- 장내 균총은 유용균과 유해균으로 나눌 수 있으며 이들의 균형에 의하여 건강상태가 조절되고 (O'Sullivan, 2000), 이는 섭취하는 식이, 약물, 생균 제품, 기후, 스트레스 등의 외부요

인과 미생물 간의 관계에 의하여 발생하는 내부요인에 의하여 조성이 달라질 수 있음. 체내 장관의 생리, 소화 속도, 기질 이용능력, 담즙산의 농도, pH, 산소 포화도 등에 따른 영향으로 정상적인 장내 균총의 변화가 나타날 가능성이 있음 (Freter, 1983)

- 특히 연령이 증가함에 따라 장내에 존재하는 유익균의 수는 감소하게 되고, 유해균은 증가하게 되는데(그림 1), 보통 소장에서의 균수가 현저하게 증가하거나 *Streptococcus*와 *Enterobacteriaceae* 등의 호기성균이 증가하게 되고, *Bifidobacterium* spp.가 감소하거나 사멸하는 반면에 *C. perfringens* 등의 *Clostridium* spp.는 현저히 증가함 (Tomotari, 2014)

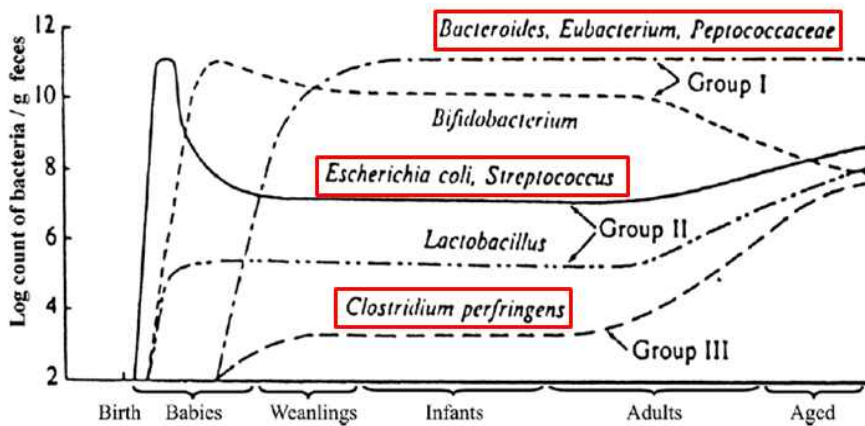


그림 1. 연령에 따른 장내 미생물총의 변화

- 유해작용을 하는 장내세균으로는 *Clostridium*, *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus* 등이 알려져 있으며 *E. coli*, *Bacteroides* spp. 등의 경우 장내 환경 조건에 따라 유익균으로 작용하기도 하고 유해균으로 작용함

(1) *Clostridium perfringens*

최근에는 사람과 동물에게 괴사성 장염을 일으키는 독소인 β -toxin (*C. perfringens* enterotoxin, CPB)에 대하여 보고되었으며, 장내에서 치명적인 장 중독증(enterotoxemia)를 일으키는 독소임. 그러나 CPB의 구조와 기작에 대하여 아직 분명하게 밝혀진 것은 없어 지속적인 연구가 필요한 실정임

(2) *Staphylococcus aureus*

최근 중요하고 연구되고 있는 것이 *S. aureus*와 아토피피부염을 포함한 알레르기 질환과의 연관성인데, 정상인의 피부에 비하여 아토피피부염 환자에서 현저히 많은 양의 *S. aureus* 집락을 형성하는 것을 하였음. 또한 알레르기 질환에서 중요한 역할을 하는 비만세포(mast cell)를 포함한 다양한 면역세포들이 나타내는 신호에 대하여 인식이 가능하며, *S. aureus*의 펩티도글리칸은 비만세포의 toll-like receptors 2에 의존적으로 T 세포의 면역관련 사이토카인 분비를 자극한다고 보고하였음 (Rocha-de-Souza et al., 2008)

(3) *Bacteroides fragilis*

*B. fragilis*는 정상적인 장내 미생물총의 구성원으로 잘 알려져있으나, 염증성장질환(IBD) 환자에게 ETBF 검출률이 높게 나타났으며 (Prindiville et al., 2000; Basset et al., 2004), 동

물실험을 통하여 ETBF이 장염을 유도할 뿐 아니라 dextran sodium sulfate (DSS)로 인한 장염을 더욱 악화시킨다고 확인되었음 (Rabizadeh et al., 2007)

- 아미노산의 종류에 따른 당화반응 생성물의 항균활성 차이가 보고되었으며 (Rufián-Henares and Morales, 2007), maillard reaction이 발생하는 식품(커피, 맥주, 와인 등)의 종류에 따른 당화반응 생성물의 항균활성 능력에도 차이가 있는 것으로 보고되고 있음 (Rufián-Henares and Morales, 2008)
- 이처럼 당화반응 생성물의 항균활성에 관한 다양한 연구들이 보고되었지만 장내미생물에서의 당화반응물의 항균활성에 대한 연구는 아직 미비한 실정임. 장내미생물의 병원성과 항생제 및 스트레스 내성 등의 위협성으로 인한 질병 발생을 저감화 시키기 위하여, 다양한 생리활성과 항균활성을 지닌 당화반응 생성물의 연구가 필요하다고 사료됨

마. 당화반응을 이용한 기능성 신소재 및 제품 개발의 필요성

- 당화반응 생성물은 항산화, 면역활성, 항당뇨, 항고혈압, 지질대사조절 등의 다양한 생리활성 효과가 있어 새로운 건강기능성 소재로서 주목받고 있음
- 최근 당화 반응 생성물과 프로바이오틱스를 활용한 당화 반응 생성물 발효가수분해물의 심혈관 보호효과에 대한 연구와 함께 항산화 활성을 통한 기능성 신소재의 개발을 통하여 우유 유래 단백질의 우수성을 알리기 위한 연구가 지속되고 있음 (오남수 외, 2015)
- 유단백질은 카제인과 유청단백질이 있으며, 유단백질이 질병을 예방하는 등의 건강 기능성이 있는 것으로 알려지면서 유단백질에 대한 관심이 증가하고 있음. 유단백질과 유단백질의 당화산물 및 가수분해물이 항산화 활성과 면역 활성 등의 생리활성 효과를 가지고 있으며 발효 당화유단백질의 면역 조절 효과는 본 연구진이 확인하였으나 발효 당화유단백질의 장내 염증 개선 효과에 대해서는 연구된 바 없음
- 기능성 물질 발굴 및 이용 기술은 차세대 핵심사업인 바이오산업의 원천소재 확보와 다양한 발효물 및 기능성 신소재의 이용을 통한 신규 산업제품 창출이 가능하여 시장 잠재력이 매우 높음
- 최근 다양한 생리활성을 지닌 신소재 개발은 전 세계적으로 천연소재에 대한 기술적 접근 방법을 추구되면서 기능성 소재 개발에 초점이 맞춰 지고 있음. 특히 우유는 면역 활성을 비롯한 기능성 효과가 입증되었으며, 이를 이용하여 새로운 기능성 소재를 개발을 통해 기능성을 높이고, 기저성 염증 개선 기능성 효과를 측정함으로써 우유의 고부가가치 제품 생산을 가능하게 할 것으로 기대함

1-3. 연구개발 범위

가. 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품개발

(1) 연구개발의 목표

- 기저성 염증개선 기능성을 지니는 발효 당화유단백질 소재의 최적 조건 확립 및 이를 활용한 고령친화 유제품의 개발

(2) 연구개발의 내용

- 발효 당화유단백질의 제조 및 최적 조건 확립
 - 유단백질-당의 당화반응 생성물의 제조 및 최적 조건 확립
- 발효 당화유단백질 소재의 이화학적 특성 분석
 - MAIDI-TOF/MS를 이용한 발효 당화유단백질의 분석 연구
- 발효 당화유단백질에 의한 장내 미생물 분석
 - 미생물총 분포 및 변화양상 분석을 통한 기저성 염증과의 관련성 규명
- 유제품 적용 검토, 발효특성 평가 시스템 확립
 - 기능성 소재 적용 유제품 소량 배합 실험
 - 발효 및 관능 특성 평가
- 기능성 고령친화 유제품의 개발
- 기능성 표시기준 및 관련 법령 검토
- 최종 시제품 생산
 - 고령친화 특수의료용도등 식품 액상타입 1종 및 분말타입 1종

나. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 기능성 연구

(1) 연구개발의 목표

- 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 기능성 연구

(2) 연구개발의 내용

- 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 목적 당화유단백질 발효 균주의 선별과 발효기술 정립
 - 신생아 분변에서의 프로바이오틱스 분리
 - 내산성, 내담성을 기반으로한 probiotics기능 확인
 - urease test, gelatinase test를 통한 식이 안전성 확인
 - 당화유단백질 발효 기술 정립
 - 발효물의 생균수와 pH측정을 통한 발효진행상황 확인
 - 발효 당화유단백질 제조
 - 확립된 발효조건을 통하여 선발된 균주를 이용하여 발효 당화유단백질을 제조
- 인체 세포주를 이용한 세포간 결합 개선능력 평가 (*in vitro*)

- caco-2 cell을 이용한 TER(transepithelial electrical resistance)측정

○ 뇌기능 저하가 유도된 동물모델을 이용한 발효당화유단백질의 기능성 확인 (in vivo)

- 쥐 모델을 통한 뇌 기능저하 및 염증 개선효과 관찰실험 설계

• 스트레스, 장염증, 노화성 뇌 모델을 통한 뇌기능 저하유도

• immobile method를 통한 스트레스 모델

• DSS 투여를 통한 장 염증 모델

• D-galactose 복강투여를 통한 뇌 노화 모델

- 뇌기능 저하가 유도된 동물모델의 behavior 개선 검증

• forced swim test method

• elevated plus maze method

- intestine, brain에서의 gene expression 관찰

• tight junction gene (occludin, ZO-1, claudin)

• inflammation gene(TNF- α)발현 측정

다. 발효 당화유단백질을 이용한 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구

(1) 연구개발의 목표

- 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 기능성과 안전성을 확인함으로써, 새로운 장내 기저성 염증 억제 기능성 식품 소재를 개발

(2) 연구개발의 내용

○ 발효 당화유단백질의 장내 만성염증 억제 조절 기능 확인 (in vitro co-culture study)

- 발효 당화유단백질의 세포 독성 확인

- Co-culture system을 이용한 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

- 사이토카인 발현 및 NO assay를 통한 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

○ 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인 (in vivo study)

- DSS를 이용하여 장내 염증을 유발 시킨 동물 모델 실험

- 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

- 결장 조직의 조직 병리학적 검사

- 결장 조직에서의 사이토카인 및 항산화 효소 발현 측정

- 혈액으로부터 Nitric Oxide(NO) 및 TNF- α 생성량 측정

○ 발효 당화유단백질 및 시제품의 장내 기저성 염증 및 기저질환 개선 기능성 연구 (in vivo study)

- 당뇨 유발 동물에 DSS를 이용하여 장내 염증을 유발 시킨 동물 모델 실험

- 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

- 혈액 내 glucose 농도 측정

- 조직에서의 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

- 혈액으로부터 Nitric Oxide(NO) 및 TNF- α 생성량 측정

- 발효 당화유단백질 및 시제품의 안전성 확인 (*in vivo*)
 - 동물 모델을 이용한 단회 투여 독성 시험
 - 동물 모델을 이용한 14일 반복 투여 독성 시험

라. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 질환 원인 저병원성 세균 및 유해세균(식중독세균, 부패세균) 제어 효과 분석

(1) 연구개발의 목표

- 장내 기저성 질환 관련 저병원성 세균·식품관련 유해세균에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 분석 및 발효 당화유단백질 함유 유제품의 기저성 질환 개선 효과 확인

(2) 연구개발의 내용

- 장내 기저성질환 관련 저병원성 세균 감염 동물모델에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 분석
 - 장내 저병원성 세균(*Staphylococcus aureus* strains, *Clostridium* spp., *Bacteroides fragilis* 등)의 기저성 질환(염증성 질환, 대장암 등) 발생 확인
 - 장내 저병원성 세균의 omics 분석을 통한 질환 발생원인 분석
 - 장내 저병원성 세균으로 인한 동물모델의 장내 기저성 질환 확인 및 발효 당화유단백질의 개선효과 분석
- 유해세균(식중독세균, 부패세균)에 대한 발효 당화유단백질 항균활성 분석 및 발효 당화유단백질 적용을 통한 유제품의 안전성 확보기술 개발
 - 식중독세균(*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella*, 병원성 *E. coli* 등) 및 부패미생물(*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* 등)에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 확인
 - 생화학적 분석을 통한 발효 당화유단백질 항균활성 확인
 - 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 항균활성 확인 및 저해원인 분석
 - 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 유해세균 성장패턴 비교 분석
 - Omics 분석 및 microscopic technique을 통한 저해원인 분석
- 발효 당화유단백질함유 유제품의 급여를 통한 저병원성 세균 감염 동물모델의 장내 기저성 질환 개선 효과 연구
 - 발효 당화유단백질 함유 유제품의 급여를 통한 동물모델의 장내 저병원성 세균 제어 효과 및 기저성 질환 개선효과 확인
 - 발효 당화유단백질 함유 유제품을 급여한 동물모델의 기저성 질환 관련 장내 저병원성 세균 제어효과 확인
 - 발효 당화유단백질 함유 유제품 급여를 통한 기저성 질환(염증성 질환, 대장암, 노화 등) 지표 개선효과 확인

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구내용

2-1-1. 발효 당화유단백질을 활용한 기저성 염증개선 고령친화 식품소재 및 제품개발

[주관 : 서울우유협동조합 오남수]

가. 발효 당화유단백질의 최적 제조 조건 확립 및 이화학적 특성 확인

(1) 실험 내용

(가) 유단백질-당을 이용한 당화 반응 생성물 제조 최적 조건 확립

- 유단백질 (whey protein isolate, WPI; sodium caseinate, CN)과 당 (glucose, galactose)의 단백질/당 비율을 1:2 또는 2:1로 배합하여 DW에 녹인 후, WPI는 65℃, 6시간 또는 24시간, CN은 75℃ 또는 85℃에서 8시간 또는 24시간 당화반응 시켜 당화유단백질을 제조함.

- 당화반응 생성물의 반응 특성 확인을 위해, fluorescence intensity, advanced Maillard product(AMP) 생성능, furosine 생성능, reducing power를 측정하여 최적 반응 조건을 선정함.

① Fluorescence intensity : 당화반응 특성을 평가하기 위해 DW로 10배 희석한 후 spectrophotometer(Synergy H1 plate reader, Bio-Tek Instruments Inc.)를 사용하여 excitation 370nm, emission 440nm에서 형광도를 측정함.

② AMP 생성능 : 당화반응 진행정도를 확인하기 위해 당화반응 생성물인 AMP를 측정함. 당화유단백질을 DW로 10배 희석한 후, spectrophotometer(Synergy H1 plate reader, Bio-Tek Instruments Inc.)를 사용하여 excitation 330nm, emission 420nm에서 형광도를 측정함.

③ Furosine 생성능 : furosine은 당화반응의 초기 생성물로 당화반응 특성을 평가하기 위해 제조한 당화유단백질에 HCl을 첨가한 후 110℃에서 약 24시간 산 분해함. C18 Sep-pak 으로 furosine을 solid phase extraction하여 시험용액으로 함. Furosine 분석을 위해 HPLC-UVD(280nm)와 C18 column (30℃)을 사용하였으며, 용매는 5 mM sodium heptane sulfonate, 20% (vol/vol) acetonitrile, 0.2% (vol/vol) formic acid (1.0 mL/min)를 사용하여 분석함.

④ Reducing power : 유단백질과 당의 당화반응은 reducing power를 증가시킨다고 알려져 있으며, 제조한 당화유단백질의 reducing power를 측정하기 위해 DW에 10배 희석한 후, FRAP(Ferric-Reducing Antioxidant Power) assay를 측정함.

(나) 유단백질-당을 이용한 당화 반응 생성물 pilot scale 제조

- 당화반응생성물의 대량 생산을 위해 당화반응 특성이 뛰어난 샘플 4가지를 pilot scale (60kg)로 제조함.
- 당화반응생성물의 대량 생산을 위해 당화반응 특성이 뛰어난 샘플 4가지를 pilot scale (60kg)로 제조함.
- ① TS : 미리 가열하여 항량 한 칭량접시에 시료와 해사를 넣어 잘 섞은 후 105℃ 건조기에 넣어 항량한 후 무게 차이를 이용하여 측정함.
- ② 단백질 : 조단백질 분석은 Kjeldahl Digestion Unit K-438을 이용하여 가수분해하고, Auto Kjeldahl Unit K-370을 사용하여 증류, 적정을 통해 조단백질을 분석함. 34% NaOH로 증류시켜 얻은 암모니아 가스를 4% 붕산(pH 4.65)에 흡착, 포집하여 0.1N HCl로 적정하여 조단백질 함량을 측정함.
- ③ 당 : 시료 약 3g에 DW와 아세토니트릴 1:1 혼합용액을 가하여 녹인 후, 원심분리한 상등액을 0.45um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였으며, HPLC 분석 조건은 표 1-1과 같음.

표 1-1. 당 분석을 위한 HPLC 분석 조건

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

(다) 당화유단백질의 항산화능 평가

- 항산화능은 환원력 측정법과 라디칼 소거능 측정법으로 나누어 평가하였으며, 환원력 측정을 위해 FRAP assay를 사용하였고, 라디칼 소거능 측정을 위해 DPPH, ABTS, hydroxyl (\cdot OH) 라디칼 소거능 측정 및 ORAC(oxygen radical absorbance capacity by fluorescein) assay를 사용함.
- ① DPPH 라디칼 소거능 : DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)로 최초 산화를 개시한 후 시료에 의한 radical의 소거 활성을 알아보기 위한 실험으로, 500 μ M의 DPPH reagent 100 μ L와 시료 100 μ L를 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정함.
- ② ABTS 라디칼 소거능 : ABTS{2, 2-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid)}와 2.45 mM potassium persulfate를 상온에서 12 시간 동안 반응시킨 후 에탄올을 이용하여 734 nm의 파장에서 흡광도가 1.4 ± 0.02 가 되도록 희석하여 ABTS reagent로 함. 20 μ L의 control(EtOH only)과 각 시료에 180 μ L의 ABTS reagent를 넣고 6분 후 734 nm 파장의 흡광도를 통해 라디칼 소거능을 측정함.
- ③ \cdot OH 라디칼 소거능 : 450uL 0.1M phosphate buffer (pH7.4)와 150uL 10mM

deoxyribose, 10mM FeSO₄-EDTA, 525uL DW 혼합물에 샘플 또는 buffer(control)를 첨가하고, 150uL 10mM H₂O₂를 넣어 반응을 시작함. 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, 750uL 2.8% TCA를 넣어 반응을 종료시키고 1% TBA(in 50mM NaOH) 첨가하여 10분동안 끓는 물에서 발색시킴. 520nm에서 흡광도를 측정하여 control 대비 •OH 라디칼 소거능 활성을 계산함.

- ④ ORAC : Peroxy radical의 생성을 위해 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, 표준물질로 trolox를 사용함. 시료는 75 mM phosphate buffer (pH7.4)를 이용하여 시료를 농도별로 제조한 다음 96 well plate에 시료 각 농도별로 25uL 또는 buffer (control)와 trolox (standard)를 분주함. 그 후 40nM의 fluorescein을 150 μ l 첨가하고 37°C에서 15분간 정치함. 배양기에서 꺼낸 후, 즉시 150mM AAPH 25uL를 첨가함. Ex/Em=485/535 nm에서 형광물질의 감소 정도를 37°C에서 (1분당 1회) 초기값에 비해 95%이상 감소할 때까지 측정함.

(라) 당화유단백질의 항노화 기능성 평가

- 항노화 활성을 측정하기 위해 피부 탄력을 관장하는 단백질인 elastin의 분해 효소인 elastase 저해 활성과, 진피 세포 기질의 대부분을 차지하며, 기계적 구조적으로 진피의 통합을 유지하는 단백질인 collagen의 분해 효소인 collagenase 저해활성을 측정함.

- ① Elastase 저해활성 : 96-well plate에 substrate로 elastin과 샘플 또는 reaction buffer (control)를 넣어 섞어주고, elastase를 첨가하여 상온에서 반응을 시작한 후, 일정시간이 지나고 Ex/Em=505/515 nm 에서 형광도를 측정하여 control과 비교한 값으로 함.
- ② Collagenase 저해활성 : 96-well plate에 substrate로 collagen과 샘플 또는 reaction buffer (control)를 넣어 섞어주고, collagenase를 첨가하여 상온에서 반응을 시작한 후, 일정시간이 지나고 Ex/Em=495/515 nm 에서 형광도를 측정하여 control과 비교한 값으로 함.

(마) MALDI-TOF/MS를 이용한 당화유단백질의 단백질 분석 연구

- ① 당화 유단백질 샘플의 단백질 구조 분석을 위해 MALDI-TOF/MS를 사용하여 protein modification site를 분석함. 분석을 위한 샘플 전처리를 위해 trypsin으로 in-soluble digestion 함.

- 단백질 기준으로 약 10mg/mL로 희석한 샘플을 speed vac dry한 후, 6M urea에 용해시킴. Disulfide bond 제거를 위해 reducing agent (DTT) 5uL를 넣고 45분 동안 상온에서 반응시키고, alkalating agent (IAA) 20uL를 첨가하여 다시 45분 동안 상온에서 반응시킴. 반응하지 않고 남은 IAA 제거를 위해 DTT를 넣고 45분 동안 상온에서 반응시킨 후, DW와 trypsin solution을 넣어 37°C에서 overnight 함. 반응 종료를 위해 acetic acid로 pH를 6이하로 떨어뜨리고 zip-tip(C18)으로 탈염시킴.

- ② MALDI-TOF/MS/MS protein modification site 분석

- 분석시료를 Matrix(HCCA)와 1:1로 섞은 후 ground steel plate에 1.5 μ L 분주함. MS 분석 조건은 500-4,500 m/z (Nitrogen laser 337 nm, Positive mode, Reflector mode(20 kV), 500 laser shot at once)이며, MS/MS Spectrum을 얻은 후 Database(Swissprot)을 이용해 modification peptide 및 유래 단백질을 찾음.

(바) 발효당화 유단백질의 이화학적 특성 및 기능성 분석

① 발효 당화유단백질의 유기산 함량 측정

- 시료 약 1g에 10mL 0.005N H₂SO₄를 가하여 녹인 후, sonication 10분, shaking 10분하여 균일하게 혼합함. 4,500rpm, 10분 원심분리한 상등액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였으며, HPLC 분석 조건은 표 1-2와 같음.

표 1-2. 유기산 분석을 위한 HPLC 분석 조건

검출기	UVD
컬럼	Aminex HPX-87H Column, 7.8mm x 300mm, 9 μ m (Biorad, USA)
이동상	0.005N H ₂ SO ₄
유속	0.6mL/min
주입량	10 μ l

② 발효 당화유단백질의 항산화 활성 분석

- 발효 당화유단백질의 항산화 활성 평가를 위해 각 샘플을 원심분리한 상등액을 pH7.5로 맞춘 후, 0.45 μ m membrane filter로 여과하였으며, 단백질 양을 10mg/mL로 동일하게 하여 기능성을 평가함.
- 발효 당화유단백질의 항산화 활성 평가를 위해 환원력과 라디칼 소거능을 측정하였으며, 환원력으로 FRAP assay를, 라디칼 소거능 확인을 위해 DPPH, ABTS, \cdot OH 라디칼 소거능 및 ORAC assay를 진행함.

③ 발효 당화유단백질의 항노화 기능성 분석

- 발효 당화유단백질의 항노화 기능성 확인을 위해 각 샘플을 원심분리한 상등액을 pH7.5로 맞춘 후, 0.45 μ m membrane filter로 여과하였으며, 단백질 양을 10mg/mL로 동일하게 하여 기능성을 평가함.
- 발효 당화유단백질의 항노화 기능성 확인을 위해 elastase 및 collagenase 저해 활성을 측정하였음.

(사) 발효당화 유단백질의 펩타이드 분석

- ① 발효 당화유단백질 샘플은 acetonitrile과 TFA로 활성화시킨 Sep-pak(C18)으로 분리한 후,

zip-tip(C18)으로 탈염하여 분석시료로 하였음.

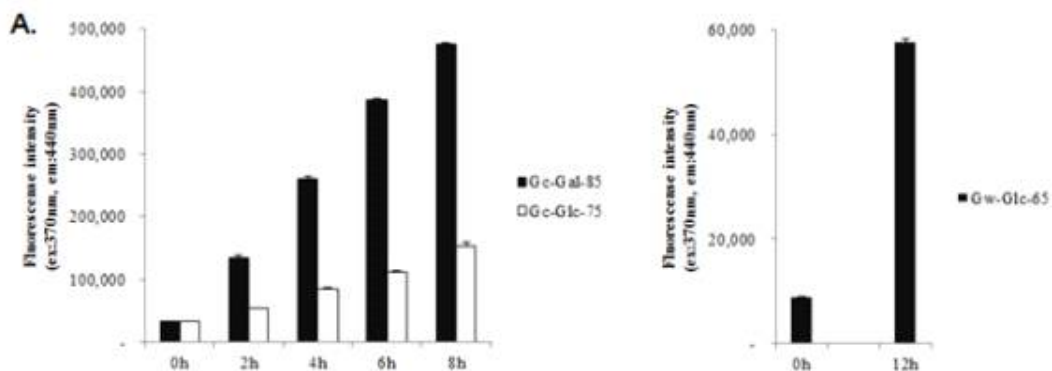
- ② 분석시료를 Matrix(HCCA)와 1:1로 섞은 후 ground steel plate에 1.5 μ L 분주함. MS 분석 조건은 500-4,500 m/z (Nitrogen laser 337 nm, Positive mode, Reflector mode(20 kV), 500 laser shot at once)이며, MS/MS Spectrum을 얻은 후 Database(Swissprot)을 이용해 modification peptide 및 유래 단백질을 찾음.

(2) 연구 결과

(가) 유단백질-당을 이용한 당화 반응 생성물 제조 최적 조건 확립

① 당화반응 온도에 따른 당화반응생성물의 반응 특성 확인

- CN과 WPI 당화 반응 생성물을 제조하기 위해 각 단백질 특성에 맞는 온도 설정이 필요함. CN은 열안정성이 비교적 높으므로 75 $^{\circ}$ C와 85 $^{\circ}$ C의 조건에서 glucose와 반응시킨 후, 당화반응 특성을 확인하였으며, 상대적으로 열안정성이 낮은 WPI의 경우 65 $^{\circ}$ C에서 반응시키며, 당화반응 특성을 확인함.
- Glucose와 반응 시킨 CN은 Gc-Glc(glycated CN with glucose)로 표기하였으며, WPI는 Gw-Glc(glycated WPI with glucose)로 표기함.
- 그림 2와 같이, 반응온도가 높을수록 형광도, AMP 생성도, furosine 생성량, reducing power가 높게 나타났으며, 당화반응이 잘 일어난 것을 확인하였음. 하지만 CN-85 $^{\circ}$ C의 경우, 반응시간이 지남에 따라 AMP와 furosine의 증가속도가 감소하였으며, 당화반응이 과하게 일어난 것으로 판단됨.
- 단백질과 당의 반응 최종 당화산물인 AGEs (advanced glycated endproducts)는 체내에서 분해되지 않고 축적되어 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 따라서 당화반응 지표물질인 AMP와 furosine 생성량에 따라 CN의 반응 온도는 75 $^{\circ}$ C로 선정함.



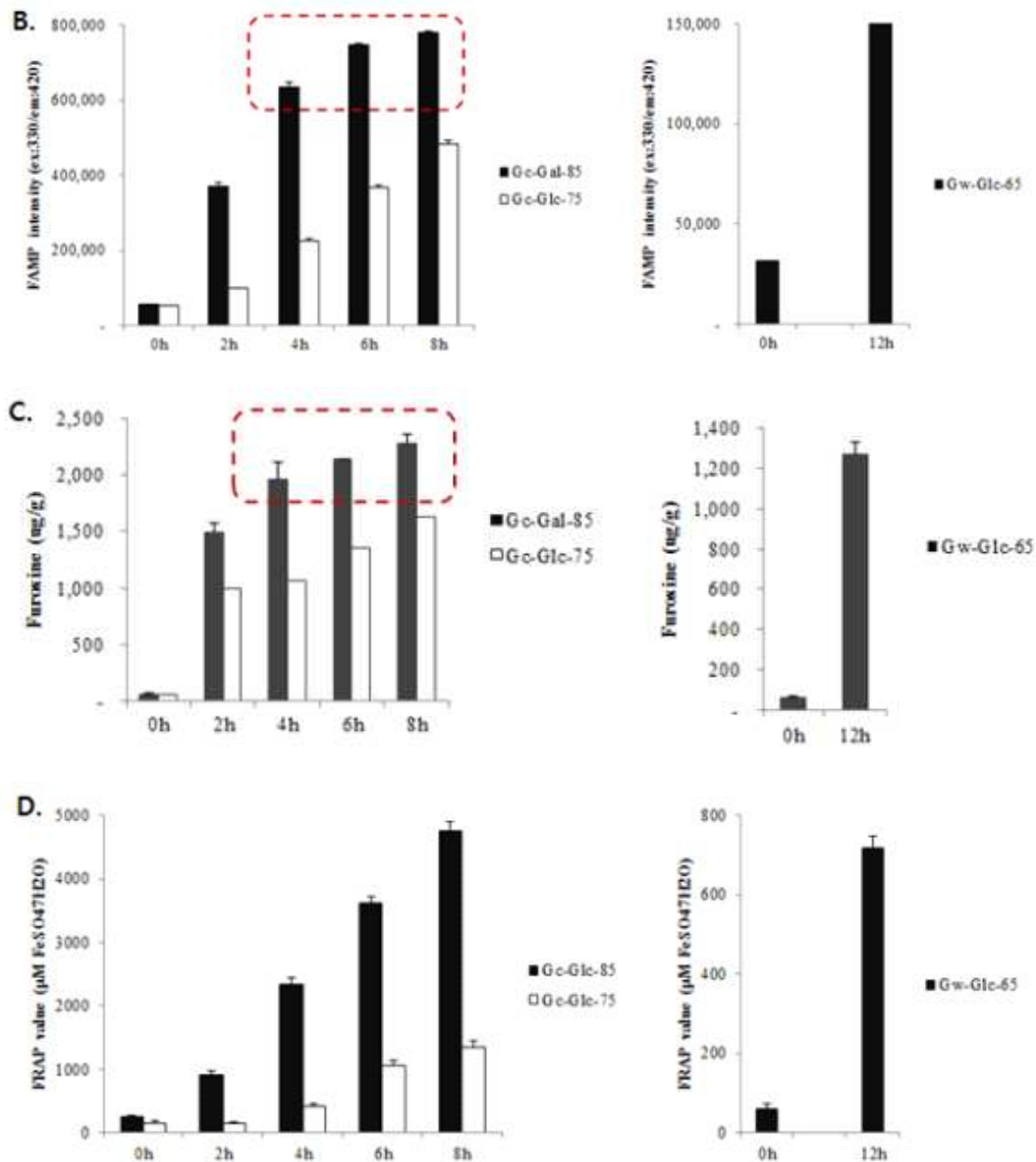


그림 1-1. 반응 온도에 따른 casein과 whey protein의 반응 특성

(A) Fluorescence intensity, (B) FAMP intensity, (C) Furosine content, (D) reducing power

② 유단백질-당의 비율에 따른 당화반응 생성물의 반응 특성 확인

- 75°C, 65°C에서 각각 반응시킨 CN과 WPI의 단백질/당 비율을 설정하기 위해 단백질/당 비율을 1:2(50mg/mL:100mg/mL)와 2:1(50mg/mL:25mg/mL)로 조건을 다르게 하여 당화반응생성물을 제조하였음.
- 그림 1-2에서와 같이 단백질/당의 비율이 1:2인 경우 2:1에 비해 형광도, AMP생성도, furosine 생성량 및 reducing power가 높았으며, 반응 특성이 더 높게 나타남.
- 하지만, 2:1 비율로 제조한 당화반응생성물의 반응 특성 factor들의 값이 선행연구에서 수행했던 1:5 (20mg/mL:100mg/mL) 비율로 제조한 당화반응생성물과 비교하여 더 높

은 수치를 나타내며, 당화반응생성물의 발효 진행 시 필요한 당의 첨가량은 당화반응생물 대비 약 2/3 이므로, 추후 발효 당화유단백질의 대량생산 공정 최소화를 위해 단백질/당의 비율은 2:1로 선정함.

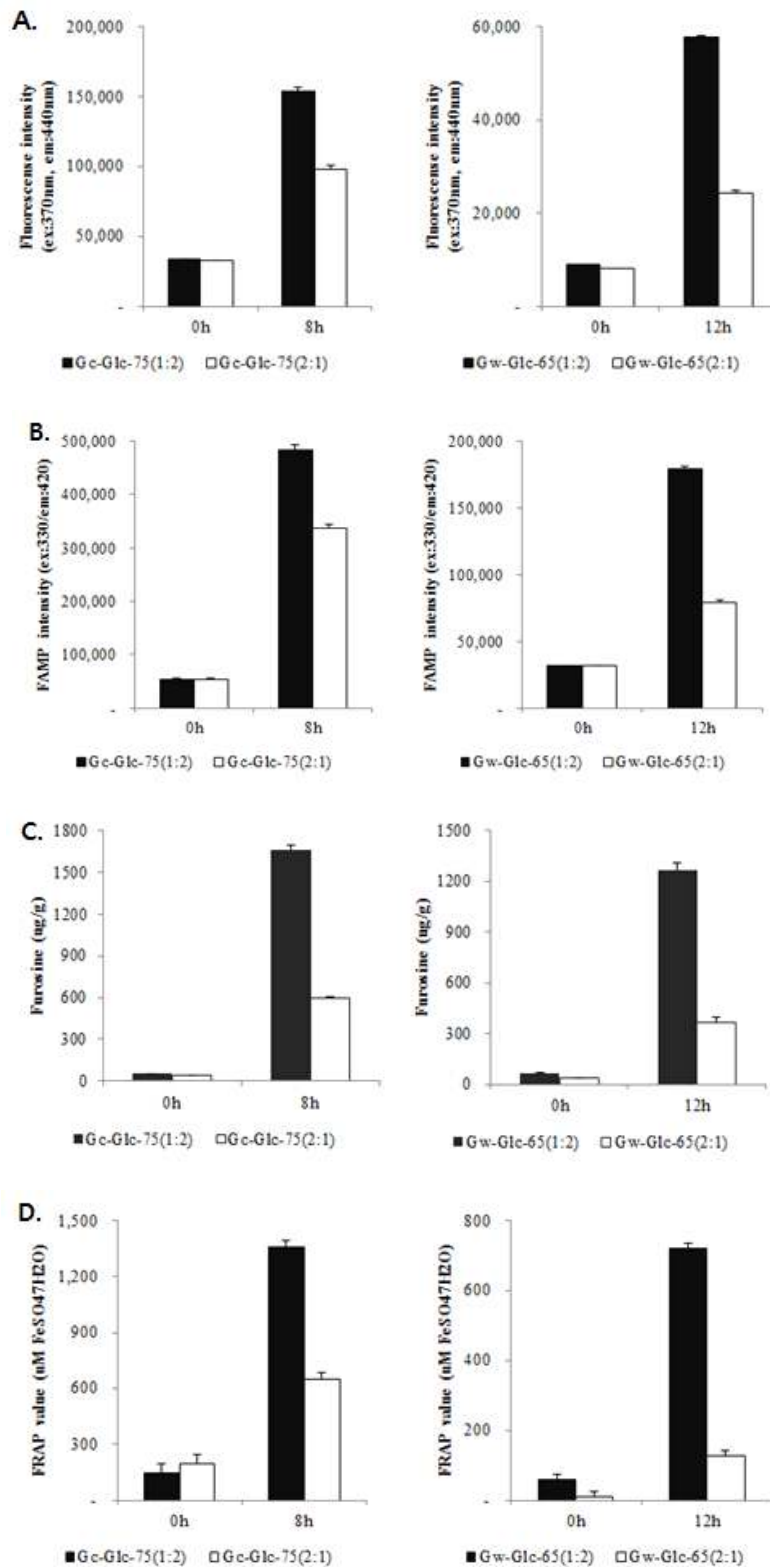


그림 1-2. 단백질/당의 반응 비율에 따른 casein과 whey protein의 반응 특성

(A) Fluorescence intensity, (B) FAMP intensity, (C) Furosine content, (D) reducing power

③ Ultra-filtration(UF) 조건 설정

- 추후 실험을 위한 제조 당화반응 유단백질의 동결건조 전, 당화반응유단백질의 순도를 높이고 당을 제거하기 위해 UF를 진행함.
- UF는 2차에 나눠서 진행하였으며, 1차에 비해 2차 UF후 당 함량이 현저히 감소하였으므로 (그림 1-3), UF는 2차까지 진행하는 것으로 제조 조건을 설정함.

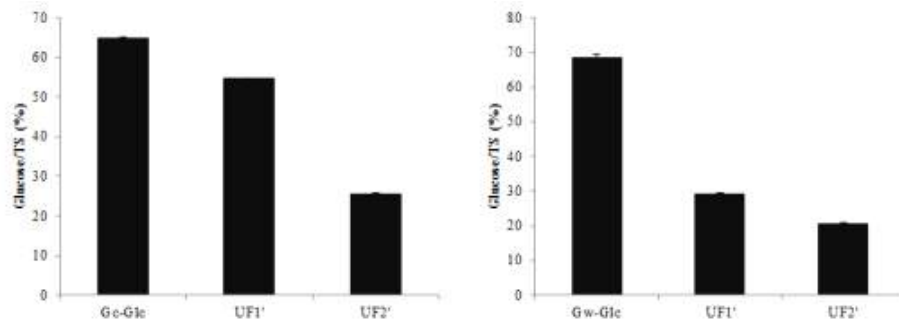


그림 1-3. 당화반응생성물의 UF 1차 및 2차 후 당 함량

(나) 당화반응 생성물의 pilot scale 제조

- ① 최종 선정된 제조 조건에 따라 Gc-Glc (glycated casein with glucose), Gc-Gal (glycated casein with galactose), Gw-Glc (glycated whey protein with glucose), Gw-Gal (glycated whey protein with galactose)의 네 가지 당화유단백질 샘플을 pilot scale로 제조하였음.
 - 60kg의 당화유단백질 샘플 제조는 pilot system에서 제조하였으며, 제조과정 및 설비는 그림 1-4와 같음.
 - 단백질과 당 비율을 2:1(5%:2.5%)로 하여 DW와 혼합한 후 casein은 75°C, WPI는 65°C에서 24시간 동안 당화 반응시켜 당화유단백질을 제조함. 50°C에서 UF 2차후, 동결건조하여 각 협동기관에 제공함.
 - 제조된 샘플의 규격은 표 1-3와 같으며, 샘플의 단백질 함량은 TS대비 약 90%이며, TS는 약 95%임. Endotoxin 테스트 결과, 검출되지 않았음.



그림 1-4. 당화반응생성물 제조 pilot system

표 1-3. 당화반응 생성물의 규격

	Protein	Sugar	TS	Protein/TS	Sugar/TS	Endotoxin
Gc-Glc	87.9	1.9	94.1	93.4	2.1	N.D.
Gc-Gal	88.5	3.8	96.4	91.9	4.0	N.D.
Gw-Glc	87.3	2.4	97.6	89.4	2.4	N.D.
Gw-Gal	87.0	2.0	95.8	90.8	2.1	N.D.

* Gc-Glc:glycated casein with glucose, Gc-Gal:glycated casein with galactose, Gw-Glc:glycated WPI with glucose, Gw-Gal:glycated WPI with galactose

(다) 당화유단백질의 이화학적 특성 확인

① 유단백질-당의 종류에 따른 당화유단백질의 반응 특성 확인

- 당화반응생성물은 단백질과 당의 종류에 따라 Gc-Glc, Gw-Glc, Gc-Gal, Gw-Gal 네 가지로 제조하였음.
- 그림 1-5과 같이 CN과 WPI 모두 galactose 반응 당화생성물이 glucose 반응 당화생성물에 비해 형광도와 AMP생성도가 높았음.
- 반면, CN 유래 당화반응생성물의 경우 furosine 생성량은 Gc-Glc이 Gc-Gal에 비해 높게 나타남. 이는 furosine으로부터 다음 단계로 진행되는 당화 반응의 진행속도가 Gc-Gal이 Gc-Glc보다 높아 furosine이 다른 물질로 전환되었기 때문일 것으로 예상됨.
- 당화반응 시간이 지남에 따라 당의 함량은 감소하였으며 (표 1-4), CN과 WPI 두 단백질에서 모두 galactose 반응 당화생성물이 glucose 반응 당화생성물에 비해 당의 감소

비율이 높았음.

- 따라서, 전반적으로 당화반응 특성은 galactose가 glucose에 비해 높았으며, 추가적으로 당 종류에 따른 당화반응생성물의 항산화 및 항노화 기능성 비교 평가 실험을 진행하였음.

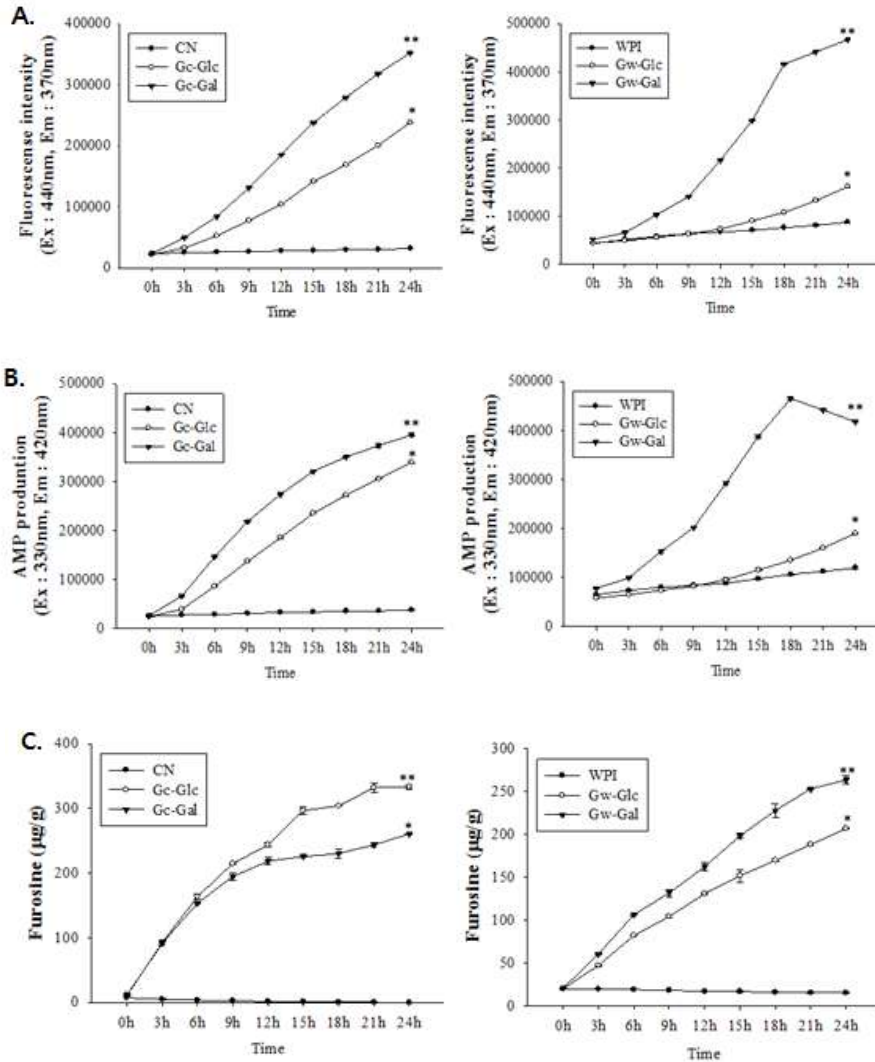


그림 1-5. 단백질/당의 종류에 따른 casein과 whey protein의 당화반응 특성

(A) Fluorescence intensity, (B) FAMP intensity, (C) Furosine content

표 1-4. 단백질/당의 종류에 따른 casein과 whey protein의 당 함량 변화

Sugar	0h	3h	6h	9h	12h	15h	18h	21h	24h
Gc-Glc	2.43	2.42	2.38	2.29	2.28	2.23	2.23	2.20	2.16
Gc-Gal	1.98	1.97	1.79	1.77	1.75	1.74	1.70	1.59	1.58
Gw-Glc	2.28	2.27	2.26	2.28	2.27	2.29	2.26	2.25	2.26
Gw-Gal	2.50	2.44	2.42	2.47	2.34	2.40	2.27	2.26	2.29

* Gc-Glc:glycated casein with glucose, Gc-Gal:glycated casein with galactose, Gw-Glc:glycated WPI with glucose, Gw-Gal:glycated WPI with galactose

(라) 당화유단백질의 항산화 활성 확인

① 당화유단백질의 FRAP assay를 통한 환원력 측정결과는 그림 1-6에 나타내었음.

- CN과 WPI 두 단백질 모두 당화반응에 의해 환원력이 증가하였음.
- 특히, 두 단백질에서 모두 galactose 당화 반응 생성물의 환원력이 glucose 당화 반응 생성물에 비해 2배 이상 높았음.
- 당화 반응 생성물의 환원력은 당화반응 특성 결과와 비슷한 양상을 보였으며, 당화반응이 환원력에 영향을 끼친 것으로 사료됨.

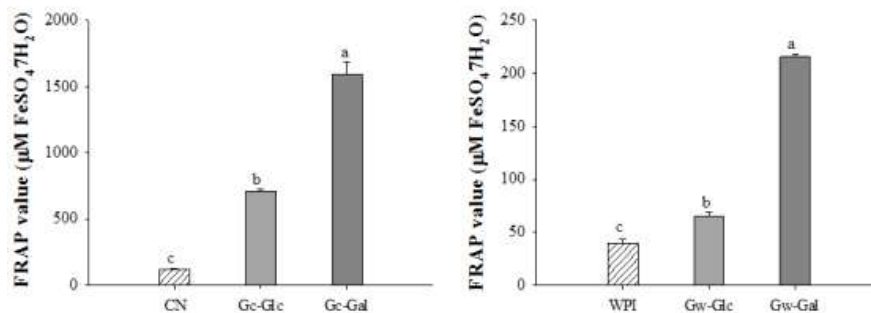


그림 1-6. 당화유단백질의 환원력

② 당화유단백질의 라디칼 소거능은 DPPH assay, ABTS assay, $\bullet\text{OH}$ 라디칼 소거능을 이용하여 측정하였으며, 결과는 그림 1-7과 같음.

- CN은 당화반응에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였으며, Gc-Gal이 Gc-Glc에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 높았음 (그림 8A). 반면, WPI는 당화반응 및 당의 종류에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화를 보이지 않았지만 WPI 자체의 DPPH 라디칼 소거능이 IC50 value 약 3.5mg/mL로 CN에 비해 높았음.
- 당화유단백질의 ABTS 라디칼 소거능 측정 결과 (그림 8B), WPI는 당화반응에 의해 ABTS 라디칼 소거능이 증가하였으며, Gw-Gal이 Gw-Glc에 비해 ABTS 라디칼 소거능이 높았음. 반면, CN은 당화반응에 의해 오히려 IC50 value가 증가하여 ABTS 라디칼 소거능이 감소하였지만, CN 자체의 ABTS 라디칼 소거능은 IC50 value 약 0.9mg/mL로 WPI에 비해 훨씬 낮았음.
- 당화유단백질의 $\bullet\text{OH}$ 라디칼 소거능은 CN과 WPI 모두 당화반응에 의해 유의적으로 증가하였음. 당의 종류에 따른 차이는 보이지 않았음 (그림 1-7C).
- 전체적으로 당화 반응에 의해 라디칼 소거능은 증가하였으며, glucose 당화 반응 생성물에 비해 galactose 당화 반응 생성물의 라디칼 소거능이 높았음. 라디칼 소거능 결과는 당화반응 특성과 유사한 양상을 보임.

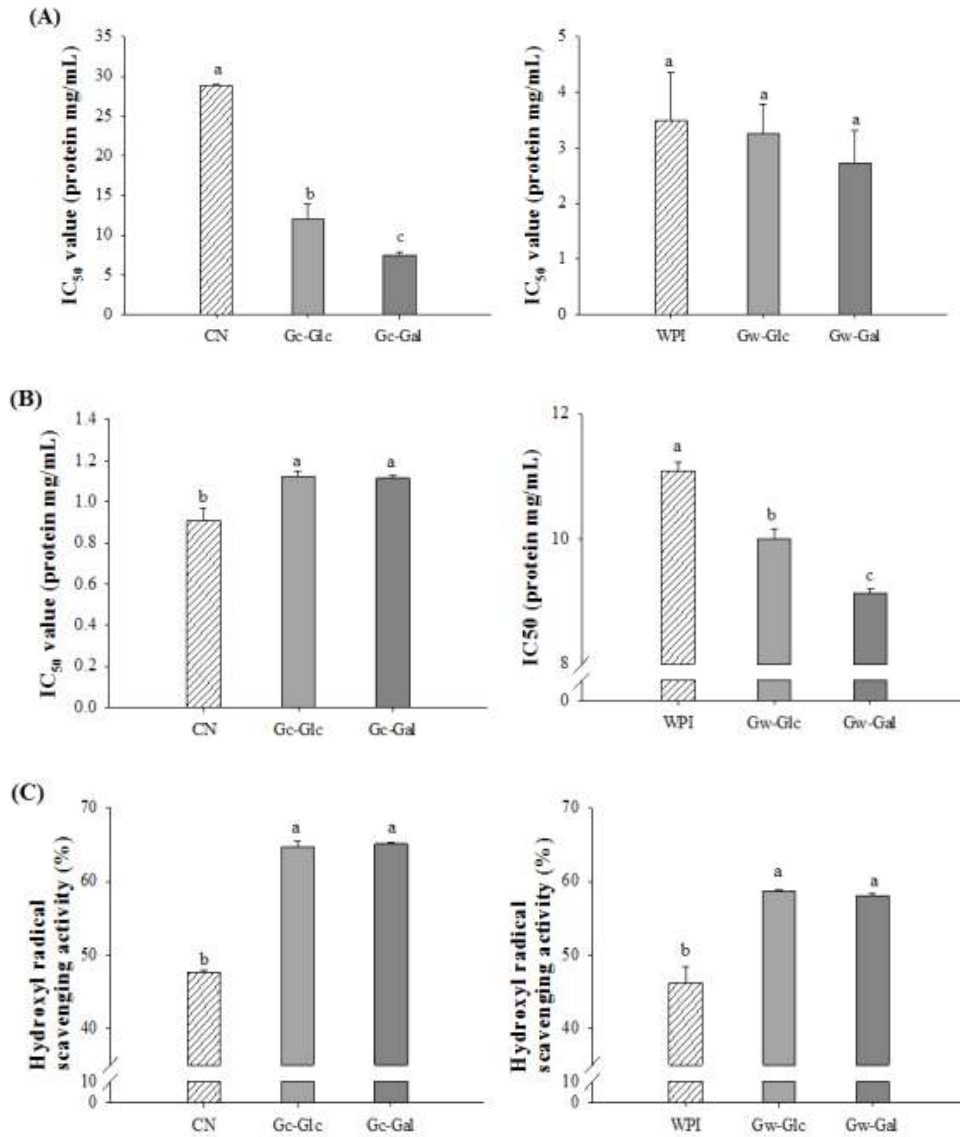


그림 1-7. 당화 반응 생성물의 라디칼 소거능

(A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) Hydroxyl radical scavenging activity

(마) 당화유단백질의 항노화 기능성 확인

① 당화유단백질의 elastase 저해활성 측정 결과는 그림 1-8에 나타내었음.

- CN 유래 당화유단백질이 CN에 비해 elastase 저해 활성이 유의적으로 높았으며, Gc-Gal이 Gc-Glc에 비해 높았음.
- WPI 역시 당화반응에 의해 elastase 저해 활성이 유의적으로 증가하였으나, glycated CN과는 반대로 Gw-Glc가 Gw-Gal에 비해 elastase 저해 활성이 높았음.

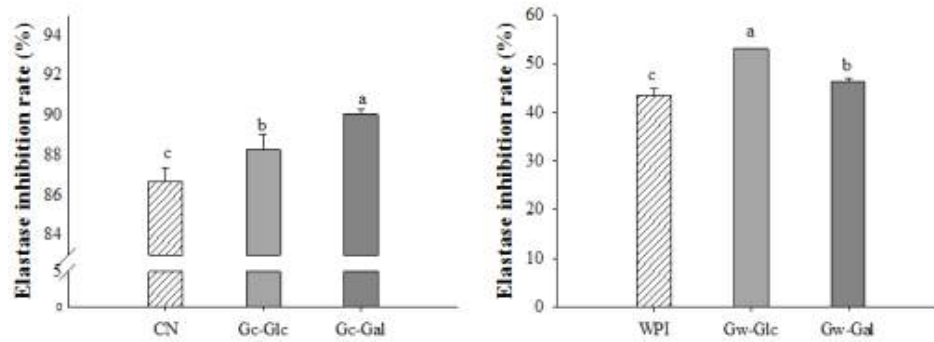


그림 1-8. 당화유단백질의 elastase 저해 활성

② 당화유단백질의 collagenase 저해 활성 측정 결과는 그림 1-9과 같음.

- CN과 WPI 두 단백질 모두 당화반응에 의해 collagenase 저해 활성이 유의적으로 증가 하였음.
- Gc-Gal이 Gc-Glc에 비해 collagenase 저해 활성이 높았으나, glycated WPI는 당의 종류에 따른 저해활성의 차이가 나타나지 않았음.

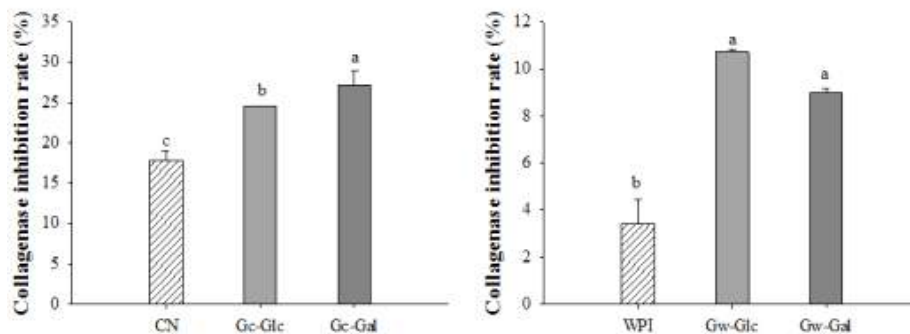


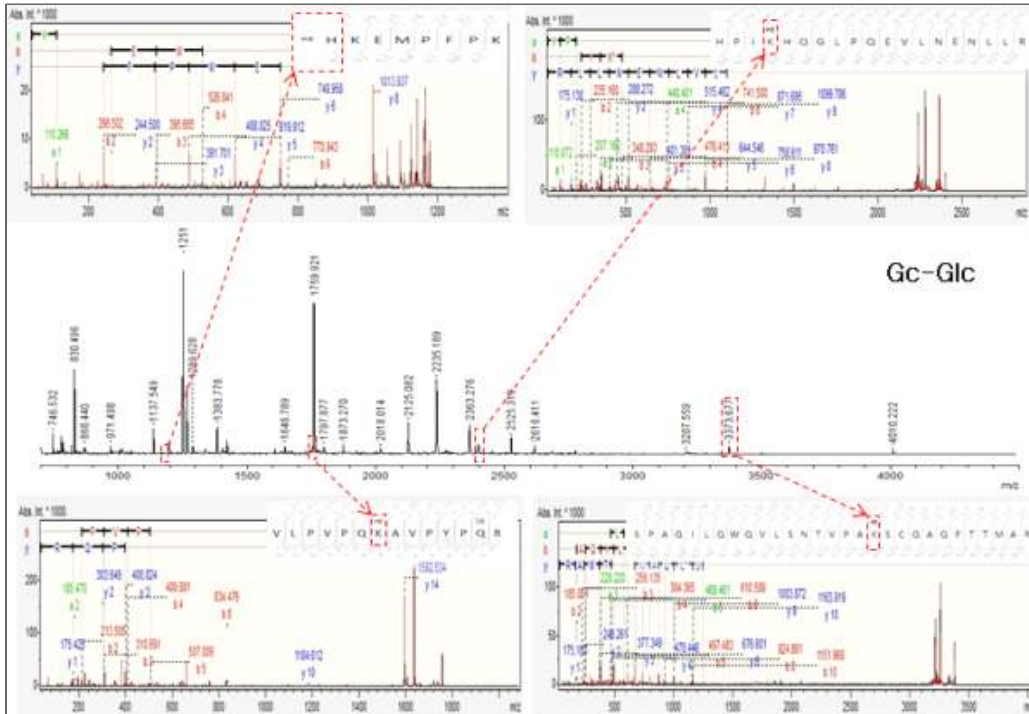
그림 1-9. 당화유단백질의 collagenase 저해 활성

(바) MALDI-TOF/MS를 이용한 당화 반응 생성물의 단백질 구조 분석

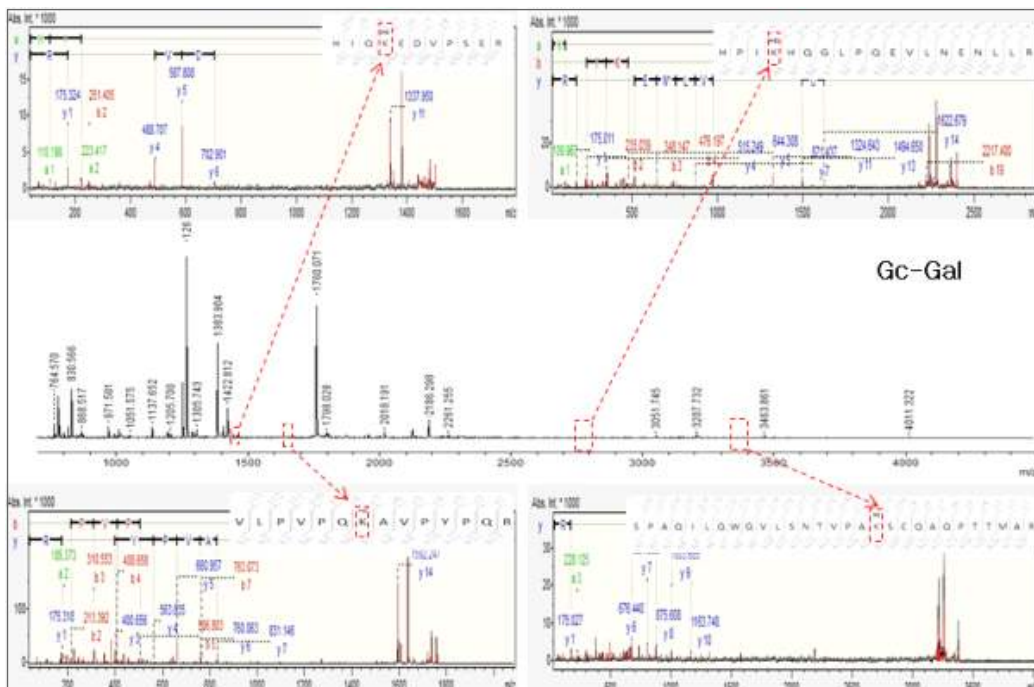
- ① 당화유단백질의 단백질 구조 분석을 위해 MALDI-TOF/MS/MS를 이용하여 당화반응에 의한 단백질 modification 특성을 분석하였으며, 결과는 그림 1-10에 나타내었음.
 - 당화반응에 의해 glucose 및 galactose는 유단백질 내 아미노산에 binding하며, 주로 lysine 잔기에 binding 하는 것으로 알려져 있음. 또한 단백질과 당의 종류 및 온도, 시간 등의 당화반응 조건에 따라 binding site (glycation site) 및 갯수가 다름.
 - Gc-Glc의 경우, α S1-CN의 K3와 K7, β -CN의 K107와 K176, κ -CN의 K86 총 5 lysine residue에 glucose가 binding 되어있었음.
 - Gc-Gal의 경우, α S1-CN의 K3, K7, K83, β -CN의 K176, κ -CN의 N81 총 5 site에 galactose가 binding 되어있었으며, lysine 외에 asparagine residue에도 당이 binding 되어있는 것을 분석하였음.
 - Gw-Glc과 Gw-Gal의 glycation site는 β -LG의 K74, K101, K141 세가지로 동일했음.

- Gw-Glc와 Gw-Gal의 경우, β -LG에서만 glycation site가 검출되었으며, α -LA에서는 발견되지 않았음. 이는 선행연구에서 glycated whey protein을 FPLC를 통해 단백질 분리 분석한 결과 α -LA peak이 현저하게 감소했던 것과 일치하며, α -LA은 glycation에 의한 영향을 덜 받거나 분해 또는 변성이 일어나는 것으로 사료됨.

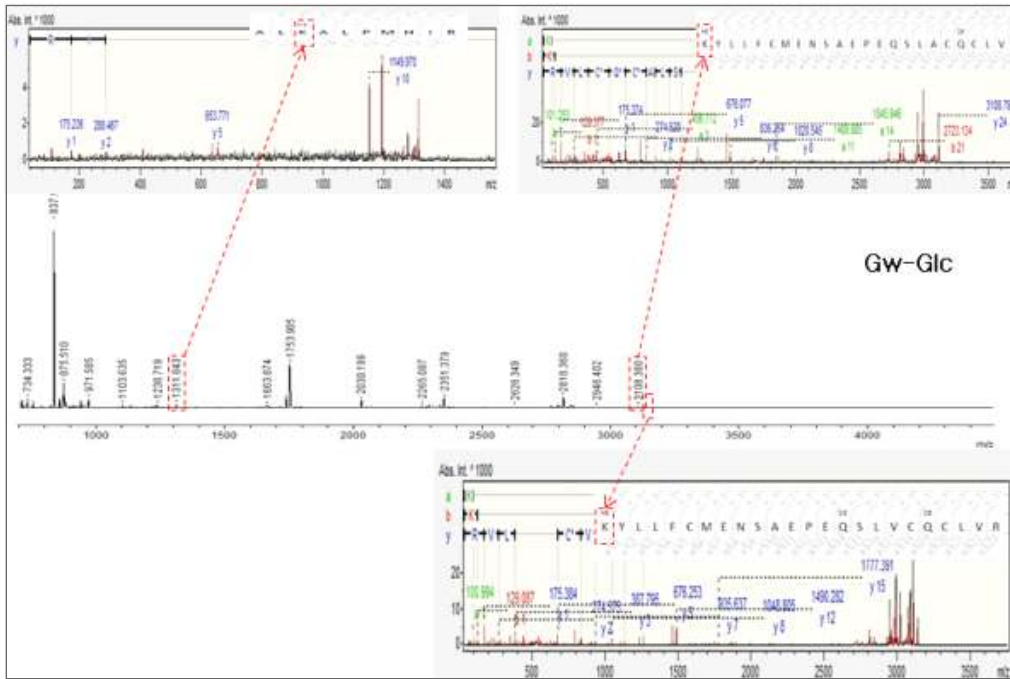
(A) 당화유단백질(casein-glucose, Gc-Glc)의 glycation site 분석



(B) 당화유단백질(casein-galactose, Gc-Gal)의 glycation site 분석



(C) 당화유단백질(WPI-glucose, Gw-Glc)의 glycation site 분석



(D) 당화유단백질(WPI-galactose, Gw-Gal)의 glycation site 분석

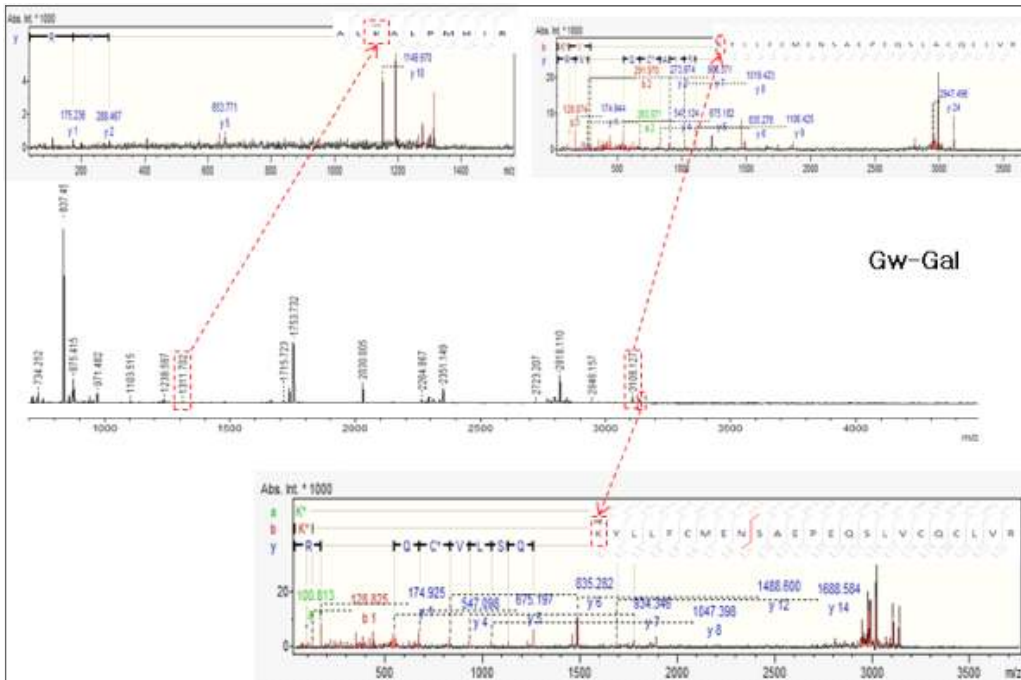


그림 1-10. 당화유단백질의 MALDI-TOF/MS/MS를 통한 glycation site 분석

② MALDI-TOF/MS/MS를 이용하여 tryptic digested 당화 반응 생성물의 glycation site의 protein modification site를 분석한 결과는 표 1-5에 나타내었음.

- 당화반응에 의해 hexose binding 이외에도 oxidation과 deamidation, phosphorylation 등의 단백질 modification이 일어난 것을 확인하였음.

- 당화반응에 의한 protein modification은 기능성 및 영양학적 특성에 영향을 끼친다는 연구가 보고되어있음.

표 1-5. 당화 반응 생성물의 MALDI-TOF/MSMS를 통한 modification site 분석

Protein	m/z	Amino acid sequence	Gc-Glc	Gc-Gal
(A)				
β-CN	1175	¹⁰⁶ HKEMPPK ¹¹³	Hex	
α _{S1} -CN	1499	⁸⁰ HIQKEDVPSER ⁹⁰		Hex
β-CN	1753	¹⁷⁰ VLPVPQKAVPYQR ¹⁸³		Hex
β-CN	1754	¹⁷⁰ VLPVPQKAVPYQR ¹⁸³	Hex	
α _{S1} -CN	2397	⁴ HPIKHQGLPQEVNENLLR ²²	Hex	Hex
α _{S1} -CN	2525	³ KHPIKHQGLPQEVNENLLR ²²	Hex (N-term)	Hex
κ-CN	3373	⁶⁹ SPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTMAR ⁹⁷	Hex	Hex (N)
(B)				
β-CN	1029	¹⁰⁶ HKEMPPK ¹¹³	Oxidation	
κ-CN	1624	⁹⁸ HHPHLSFMAIPPK ¹¹¹		Oxidation
(C)				
α _{S2} -CN	1352	¹¹⁴ RNAVPTIPTLNR ¹²⁵		Deamidated
β-CN	1754	¹⁷⁰ VLPVPQKAVPYQR ¹⁸³	Deamidated	
α _{S1} -CN	1760	⁸ HQGLPQEVNENLLR ²²		Deamidated
α _{S1} -CN	1873	¹⁰⁴ YKVPQLEIVPNSAEER ¹¹⁹	Deamidated	Deamidated
β-CN	2186	¹⁵⁴ DMPIQAFLLYQEPVLPVPR ²⁰²		Deamidated
α _{S1} -CN	3207	¹²² EGIHAAQKQKPMIGVNLQELAYFYPELFR ¹⁵¹	Deamidated	Deamidated
α _{S1} -CN	3209	¹²² EGIHAAQKQKPMIGVNLQELAYFYPELFR ¹⁵¹		Deamidated
κ-CN	3373	⁶⁹ SPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTMAR ⁹⁷	Deamidated	Deamidated
κ-CN	4010	³⁵ YPSYGLNYYQKPVALLNNQFLPYPYAKPAAVR ⁶⁸	Deamidated	2 Deamidated
(D)				
α _{S1} -CN	1952	¹⁰⁴ YKVPQLEIVPNSAEER ¹¹⁹		Phospho

*β-CN=β-casein, α_{S1}-CN=α_{S1}-casein, κ-CN=κ-casein

Gc-Glc=glycated casein with glucose, Gc-Gal=glycated casein with galactose

Protein	m/z	Amino acid sequence	Gw-Glc	Gw-Gal
(A)				
β-LG	1311	¹³⁶ ALKALP MHIR ¹⁴⁸	Hex	Hex
β-LG	3108	¹⁰¹ KYLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴	Hex	Hex
β-LG	3136	¹⁰¹ K YLLFCMENSAEPE QSLVCQC LVR ¹²⁴		Hex
β-LG	3137	¹⁰¹ K YLLFCMENSAEPE QSLVCQC LVR ¹²⁴	Hex	
(B)				
β-LG	2833	¹⁰² YLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴	Oxidation	
β-LG	2834	¹⁰² YLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴		Oxidation
β-LG	2862	¹⁰² YLL FCMENSAEPE QSLVCQC LVR ¹²⁴	Oxidation	
(C)				
β-LG	1716	¹⁴⁹ LSFNPT QLEEQCHI ¹⁶²	Deamidated	
β-LG	2818	¹⁰² YLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴	Deamidated	
β-LG	2946	¹⁰¹ KYLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴		Deamidated
β-LG	3108	¹⁰¹ KYLL FCMENSAEPE QSLACQCLVR ¹²⁴	Deamidated	
β-LG	3137	¹⁰¹ K YLLFCMENSAEPE QSLVCQC LVR ¹²⁴	2 Deamidated	

*β-LG=β-lactoglobulin

Gw-Glc=glycated WPI with glucose, Gw-Gal=glycated WPI with galactose

(사) 발효 당화유단백질의 이화학적 특성 평가

① 제1협동기관에서 선발한 유산균주를 사용하여 제조한 발효 당화유단백질의 유기산 함량을 측정된 결과는 그림 1-11에 나타내었음.

- 4M13은 *Lactobacillus gasseri*로 hetero-fermentative lactobacilli이므로 그림 12와 같이 citric acid를 사용하여 acetic acid를 생산함. 4B15는 *Lactobacillus rhamnosus*로 lactic acid를 덜 생산하는 species로 보고되어 있으며, 유기산 분석 결과 역시 glycated casein에서 4B15에 비해 4M13으로 발효 한 결과 더 많은 함량의 lactic acid가 분석되었음.
- 유기산 분석 결과를 통해 4B15와 4M13 균주에 의해 glycated protein의 발효가 잘 진행되었다는 것을 확인하였음.

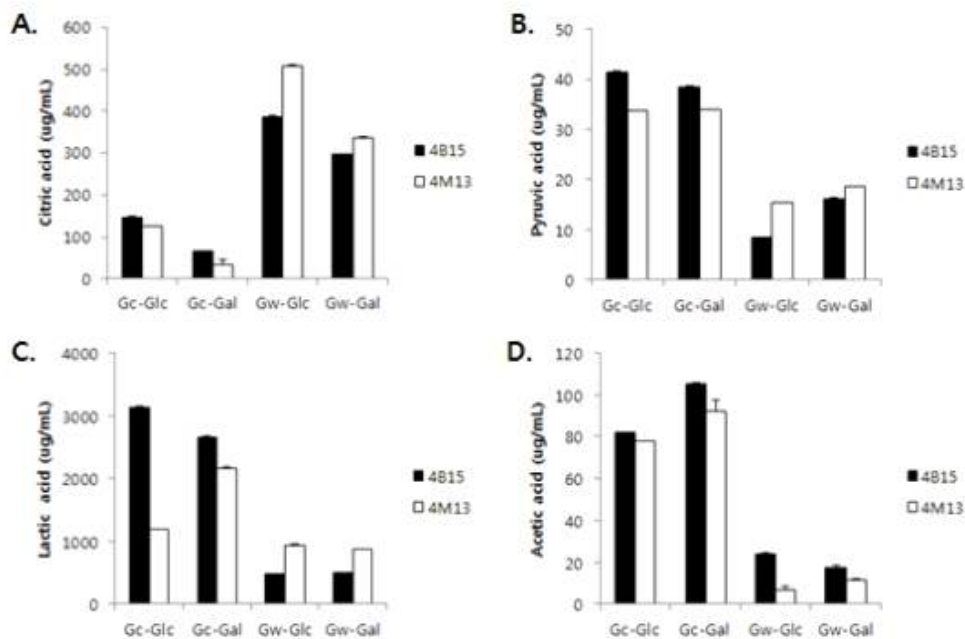


그림 1-11. 발효 당화유단백질의 유기산 함량

(A) citric acid, (B) pyruvic acid, (C) lactic acid, (D) acetic acid

(아) 발효 당화유단백질의 항산화 활성 평가

① 발효 당화유단백질의 항산화 기능성 평가를 추가적으로 수행하였으며, 환원력 측정 결과는 그림 1-12에 나타내었음.

- CN과 WPI 모두 발효 전에 비해 발효 후 환원력이 증가하였으며, 4B15와 4M13 두 균주 사이에 차이는 없었음.

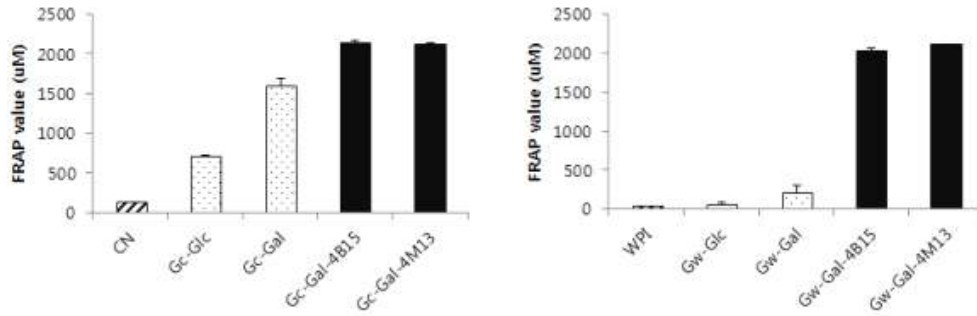
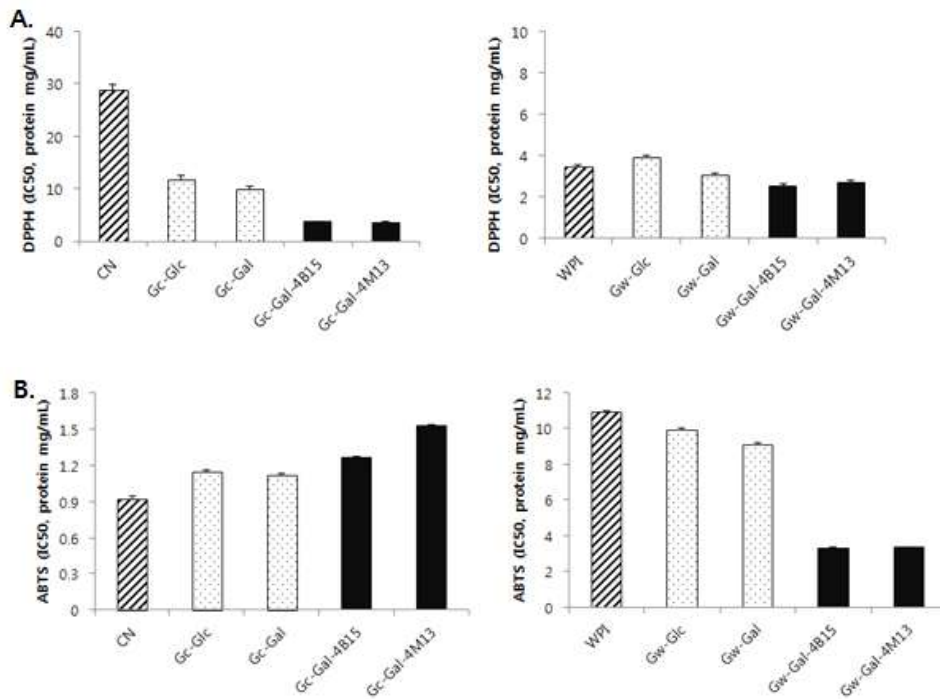


그림 1-12. 발효 당화유단백질의 환원력

② 발효 당화유단백질의 라디칼 소거능 측정 결과는 그림 1-13와 같음.

- DPPH, ABTS, •OH 라디칼 소거능 및 ORAC value는 CN과 WPI 모두 발효 전에 비해 발효 후 증가하였음.
- 특히 ABTS 라디칼 소거능과 ORAC value는 Gc-Gal-4B15가 Gc-Gal-4M13에 비해 높았으며, WPI 유래 발효 당화유단백질의 경우 Gw-Gal-4B15가 Gw-Gal-4M13에 비해 ORAC value가 높았음.



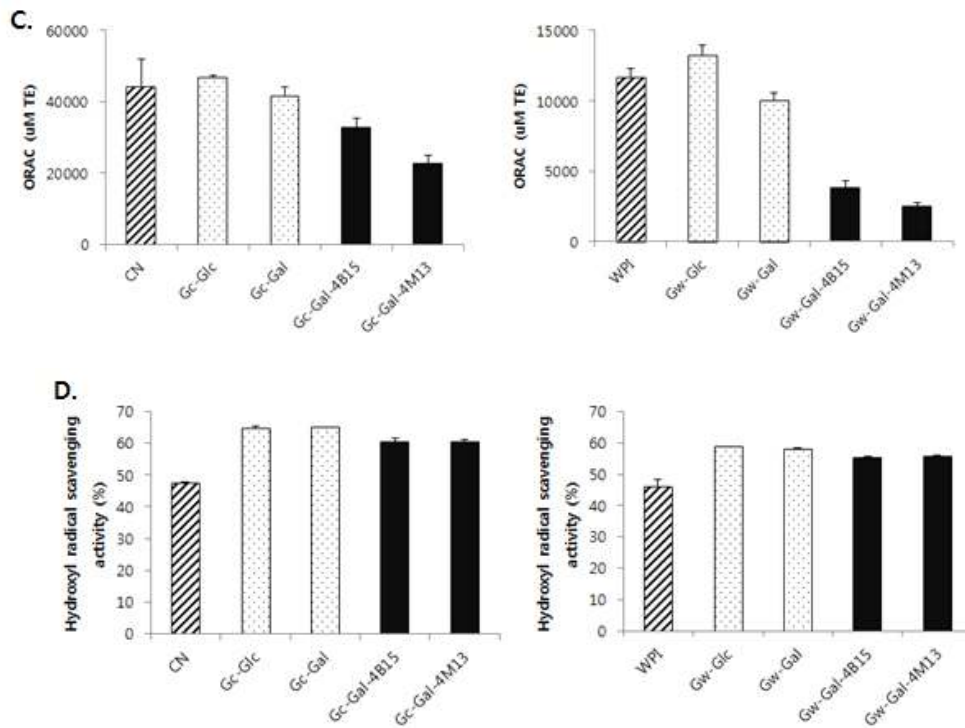
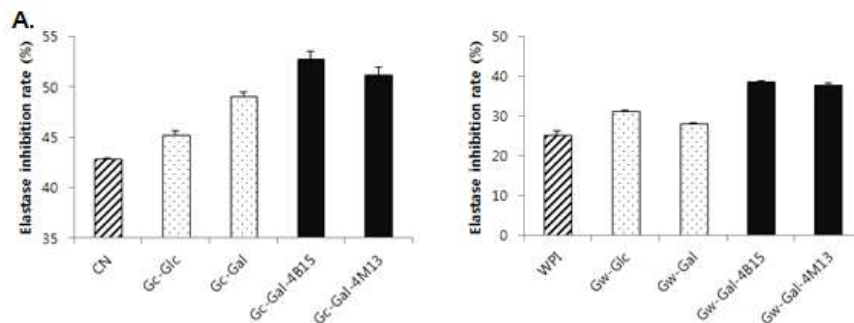


그림 1-13. 발효 당화유단백질의 라디칼 소거능

(A) DPPH assay, (B) ABTS assay, (C) ORAC assay, (D) hydroxyl radical scavenging activity

(자) 발효 당화유단백질의 항노화 활성 평가

- ① 발효 당화유단백질의 항노화 기능성 평가를 추가적으로 수행하였으며, elastase 저해 활성 평가 결과 (그림 1-14), 발효 전에 비해 발효 후 elastase 저해 활성이 증가하였으며, CN 유래 발효 유단백질의 경우 Gc-Gal-4B15가 Gc-Gal-4M13에 비해 저해 활성이 높았음.
- ② 발효 당화유단백질의 collagenase 저해 활성 평가 결과 역시 발효 전에 비해 발효 후 collagenase 저해 활성이 증가하였으며 CN 유래 발효 당화유단백질에서 4B15가 더 높은 저해 활성을 나타내었음.



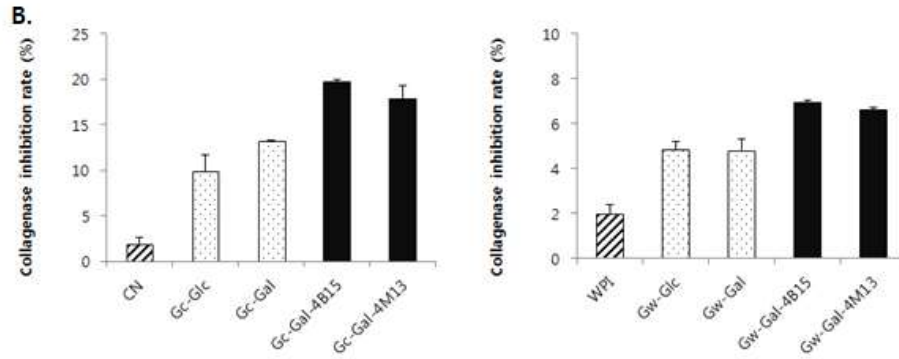


그림 1-14. 발효 당화유단백질의 항노화 기능성

(A) elastase inhibition activity, (B) collagenase inhibition activity

(차) 발효 당화유단백질의 펩타이드 분석

① MALDI-TOF/MS/MS를 사용하여 발효 당화유단백질의 펩타이드를 분석한 결과는 그림 16과 같음.

- 상대적으로 항산화와 항노화 기능이 뛰어난 4B15 균주로 발효한 발효 당화유단백질의 펩타이드를 MALDI-TOF/MSMS를 이용하여 분석한 결과, 네 가지 샘플에서 1,000MW 이하의 펩타이드 피크가 많이 생성된 것을 확인하였으며, 발효가 잘 진행된 것으로 판단됨.

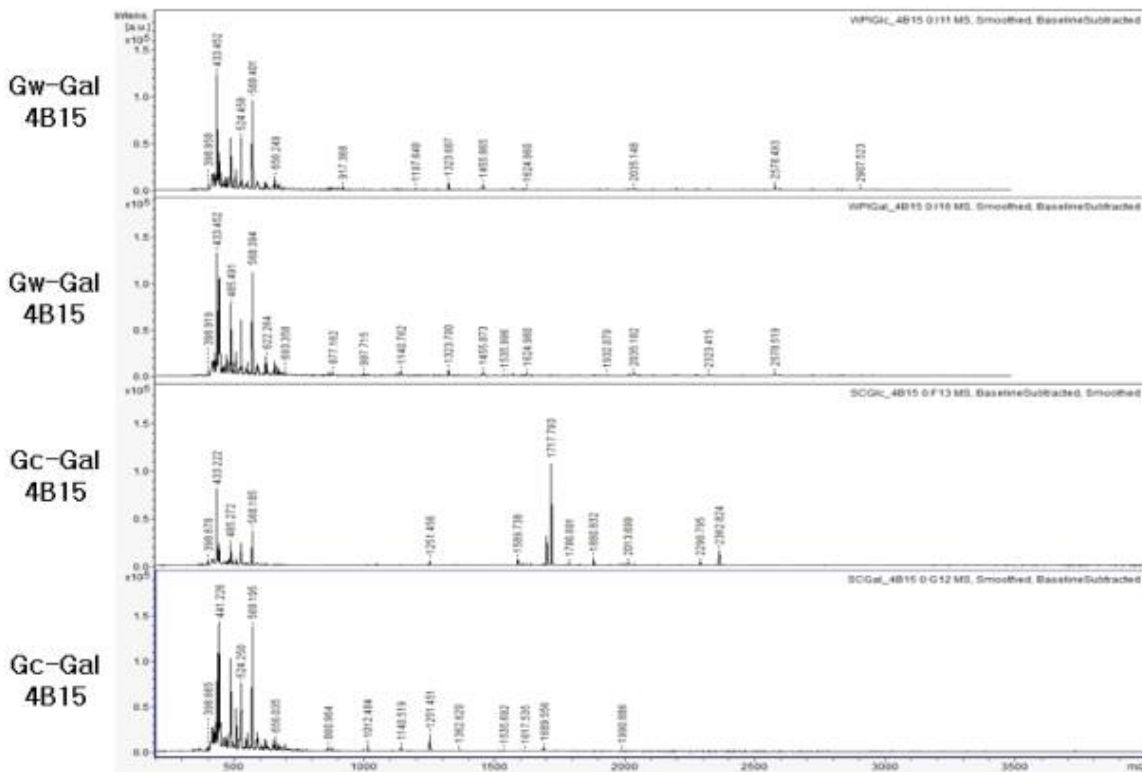


그림 16. 발효 당화유단백질의 펩타이드 분석 결과

② 4B15로 발효한 발효 당화유단백질의 800-4,000MW의 펩타이드를 분석한 결과는 표 7과 그림 1-16에 나타내었음.

- 표 1-6과 같이 Gc-Glc- 4B15와 Gc-Gal-4B15에서 검출된 유단백질 유래 펩타이드는 각각 8개, 3개였으며, Gw-Glc-4B15와 Gw-Gal-4B15는 각각 7개, 5개 검출되었음.
- Casein 유래 발효 당화유단백질의 펩타이드는 α -와 β -CN에서 유래했으며, WPI 유래 발효 당화유단백질의 펩타이드는 β -LG와 κ -CN 에서 유래한 펩타이드였음. κ -CN은 caseinomacropепptide로 whey에서 유래하는 단백질이며, 4B15 균주에 의해 발효되어 펩타이드가 생성됨.
- 각 펩타이드 분석은 발효에 의한 당화유단백질의 항산화 및 항노화 기능성 증가에 영향을 끼쳤을 것이라 사료됨.

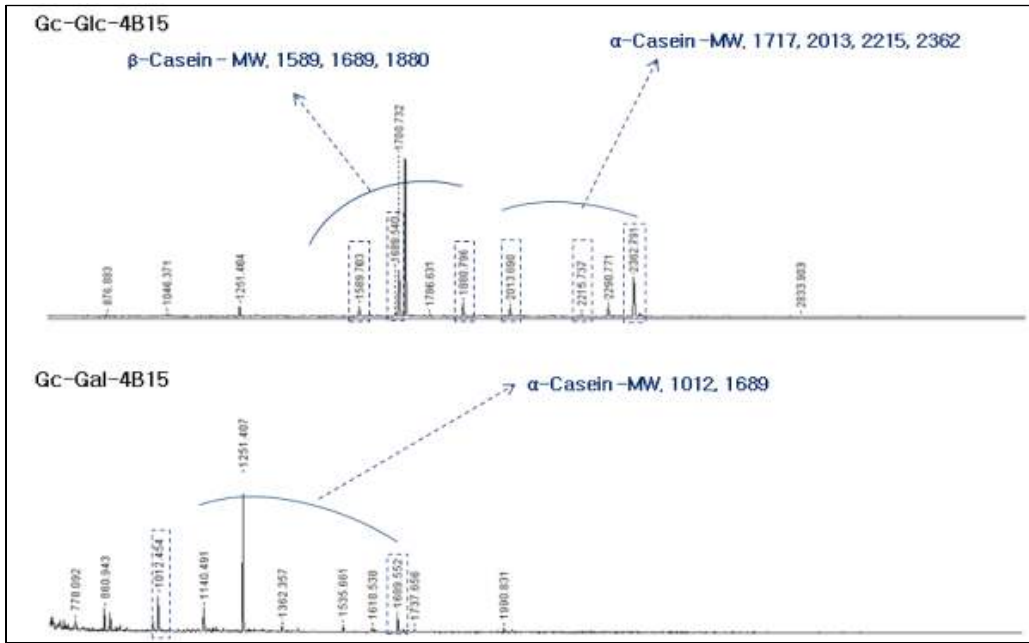
표 1-6. 발효 당화유단백질의 펩타이드 분석 결과

Number	m/z	Protein	Position	Sequence	Gc-Glc-4B15	Gc-Gal-4B15	Gw-Glc-4B15	Gw-Gal-4B15
1	1012	α 1-CN	1-8	RPKHPIKH		●		
2	1197	β -LG	153-162	PTQLEEQCHI			●	
3	1455	κ -CN	156-169	PPEINTVQVTSTAV			●	●
4	1535	κ -CN	156-169	PPEINTVQVTSTAV				●
5	1589	β -CN	195-209	EPV LGPVRGPFPIIV	●			
6	1689	α 1-CN	185-199	PIGSENSEKTTMPLW	●	●		
7	1705	α 1-CN	185-198	PIGSENSEKTTMPL		●		
8	1717	β -CN	194-209	QEPV LGPVRGPFPIIV	●			
9	1880	β -CN	193-209	YQEPV LGPVRGPFPIIV	●			
10	2013	α 1-CN	182-209	IPNPIGSENSEKTTMPLW	●			
11	2020	κ -CN	116-133	KTEIPTINTIASGEPST			●	
12	2035	κ -CN	116-134	KTEIPTINTIASGEPSTP			●	
13	2110	κ -CN	150-169	PEVIESPPEINTVQVTSTAV			●	●
14	2198	κ -CN	149-169	SPEVIESPPEINTVQVTSTAV			●	●
15	2215	α 1-CN	180-199	SDIPNPIGSENSEKTTMPLW	●			
16	2277	κ -CN	149-169	SPEVIESPPEINTVQVTSTAV			●	
17	2362	α 1-CN	179-199	FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW	●			
18	2378	α 1-CN	179-198	FSDIPNPIGSENSEKTTMPL	●			
19	2595	κ -CN	109-128	PPKKNQDKTEIPTIN TIASG				●

* β -CN= β -casein, α S1-CN= α S1-casein, κ -CN= κ -casein

Gc-Glc-4B15=fermented glycosylated casein with glucose by 4B15, Gc-Gal-4B15=fermented glycosylated casein with galactose by 4B15, Gw-Glc-4B15=fermented glycosylated WPI with glucose by 4B15, Gw-Gal-4B15=fermented glycosylated WPI with galactose by 4B15

(A) 발효 당화유단백질 (Gc-Glc-4B15, Gc-Gal-4B15)의 펩타이드 분석



(B) 발효 당화유단백질 (Gw-Glc-4B15, Gw-Gal-4B15)의 펩타이드 분석

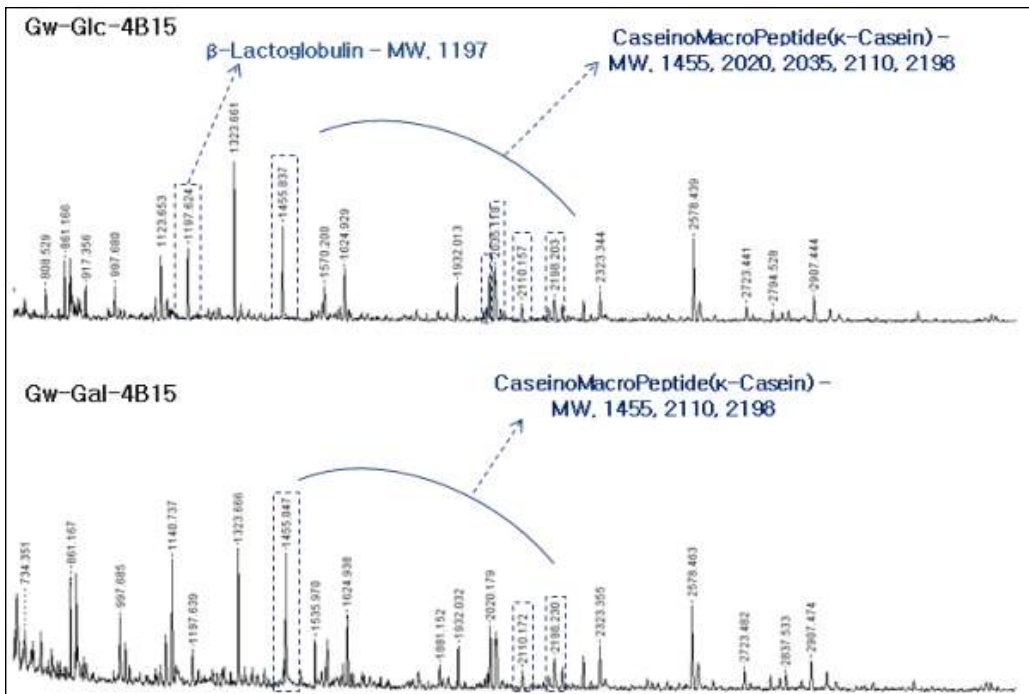


그림 1-16. 발효 당화유단백질의 펩타이드 분석 결과

나. 발효 당화유단백질 소재 적용 유제품의 제조공정 확립 및 발효 당화유단백질에 의한 장내균총 분석

(1) 실험 내용

(가) 선발 유산균주 생물자원 소재등록 및 대량생산

① 1차년도에 선발된 영유아분변 유래 유산균주 기능성 평가

- 1차년도에 선발된 유산균주 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15와 *Lactobacillus gasseri* 4M13 균주의 프로바이오틱스로써 특성을 평가하기 위해 항산화능(FRAP assay, DPPH assay, ABTS assay, ORAC assay), α -glucosidase 저해능, cholesterol 감소능, 면역증강활성을 측정함.

② 선발 유산균주 특허기탁 및 NCBI 유전자 등록

- 생리활성능이 뛰어난 4B15와 4M13 균주는 NGS(new generation sequencing)를 통해 whole genome sequencing 분석을 진행하였으며, 기존 유사 균주와의 comparative 분석을 통해 신규 균주로 확인함. 4B15와 4M13 균주는 한국미생물보존센터에 국제특허기탁 및 NCBI에 균주등록을 완료함.

(나) 발효 당화유단백질 소재 유제품 적용 및 발효 특성 평가 시스템 확립

① 기능성 소재 적용 유제품 소량 배합 실험

- 1차년도에 선발된 발효 당화유단백질 소재인 Gc-Glc-4B15 적용 유제품 배합비율 설정을 위해 casein과 glucose 배합비율(5%:2.5%, 3%:1.5%)을 다양하게 하여 발효액을 제조함.
- 배합비에 따른 발효액을 당액과 혼합하여 발효 당화유단백질 적용 발효유를 제조하였으며, 관능검사를 통해 최종 배합비율 설정 및 제조공정도 작성을 완료함.

② 발효 및 관능특성 평가

- 배합비에 따른 미생물학적 특성은 유산균수를 pour plate method를 통해 측정하였으며, 관능검사는 숙련된 30명의 시험자를 대상으로 실시함.

(다) Scale-up을 통한 대량생산 공정 개발

① Pilot-scale 시제품 생산실험

- 최종 배합비와 제조공정도를 바탕으로 선발된 발효 당화유단백질인 Gc-Glc-4B15 적용 유산균음료 및 분말제제를 pilot-scale로 제조함.
- 혼합믹서기에 casein과 glucose를 2:1(5%:2.5%) 비율로 혼합하여 75°C에서 24시간 동안 마이알 반응시킨 후, *L. rhamnosus* 4B15 균주를 107 CFU/mL 수준으로 접종함. 37°C 발효기에서 48시간 동안 발효시킨 후, 당액과 혼합하여 발효유를 제조함.
- 발효가 끝난 발효 당화유단백질 발효액을 건조기에서 동결건조하여 분말화 한 후, 부형제와 혼합하여 균질한 후 분말제제로 제조함.
- 제조한 유산균음료와 분말제제는 안전성 평가를 위해 제3협동기관에 제공함.

② 저장기간과 조건에 따른 미생물학적 이화학적 및 관능특성 평가

- 제조한 유산균음료와 분말제제는 4°C에서 저장하며, 저장기간에 따른 미생물학적, 이화학적 및 관능특성을 평가함.
- 미생물학적 특성은 대장균, 대장균군, 유산균수를 pour plate method를 통하여 측정하였으며, 이화학적 특성은 총고형분, 단백질, 지방, 당 함량을 분석하여 무지유고형분 함량으로 산출하였음.
- 관능특성은 숙련된 30명의 시험자를 대상으로 기호도 및 신맛을 포함한 관능적 특성을 평가함.

③ 저장기간과 조건에 따른 제품 내 기능성 지표물질 안정성 및 기능성 평가

- 저장기간에 따른 시제품 내 기능성 지표물질 안정성 평가를 위해 MALDI-TOF/MSMS를 통해 타겟 펩타이드를 분석함.
- 저장기간에 따른 시제품의 기능성 평가를 위해 FRAP assay와 ABTS assay를 통해 항산화능을 측정함.

(라) 발효 당화유단백질에 의한 장내 미생물 분석

① 동물모델로부터 분변 샘플링

- 1차년도에 선발된 발효 당화유단백질인 Gc-Glc-4B15에 의한 장내균총 변화를 분석하기 위해 제2협동기관에서 마우스 분변을 샘플링하였음.
- 뇌기능 개선 스트레스 모델 마우스 그룹은 다음 7그룹임.
 - 1) Normal + PBS
 - 2) Normal + casein
 - 3) Stress + PBS
 - 4) Stress + Fluoxetine
 - 5) Stress + casein
 - 6) Stress + Gc-Glc
 - 7) Stress + Gc-Glc-4B15
- 분변 샘플링은 그림 1-17과 같이 Gc-Glc-4B15 식이 전, 스트레스 유도 전, 스트레스 2주 후, 스트레스 4주 후, 스트레스 8주 후로 총 5번 실시하였음.
- 장내 미생물 군집 분석을 위해 FastDNA® Spin Kit for soil을 이용하여 분변 내 미생물로부터 metagenomic DNA를 추출함. DNA agarose gel electrophoresis과 UV spectrophotometer를 이용하여 추출한 유전자의 순도 및 양을 확인하였음.

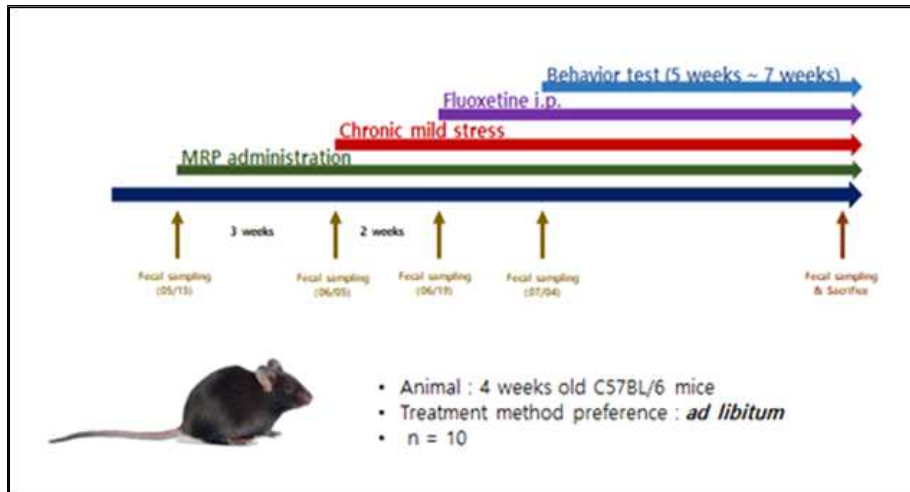


그림 1-17. 스트레스 동물모델 분변 샘플링

② NGS(new generation sequencing)를 통한 미생물 군집 분석

- 장내 미생물 군집 분석을 위해 FastDNA® Spin Kit for soil을 이용하여 분변 내 미생물로부터 metagenomic DNA를 추출함. DNA agarose gel electrophoresis과 UV spectrophotometer를 이용하여 추출한 유전자의 순도 및 양을 확인하였음.
- 마우스 장내균총 분석을 위해 16S rRNA 유전자의 high-throughput 분석기법인 pyrosequencing 기술을 이용하였음. 준비된 DNA 시료를 illumina 사의 MiSeq 장비를 이용, 마우스 장관내 균총 16S rRNA 유전자 서열의 hypervariable region 중 V3-V4 영역을 선택적으로 증폭하였음.
- Pyrosequencing 데이터는 ChunLab의 CLcommunity program을 사용하여 분변 내 genus 및 species 레벨까지 미생물 군집을 분석하여 그룹 간 미생물총의 차이 및 식이 및 스트레스 기간별 미생물총의 차이를 평가하였음.

(마) 발효 당화유단백질에 의한 장내 metabolites 분석

① 장내 metabolites 분석을 위한 SCFA(short chain fatty acids) 분석

- 분변 내 SCFA 분석을 위해 분변 샘플에 ether/heptane을 혼합하여 추출 후, NH2 seppak을 사용하여 SPE(solid-phase extraction)으로 SCFA만을 추출함. Heptane/formic acid 용액으로 최종적으로 SCFA를 추출한 후, GC-FID와 FFAP column으로 SCFA를 분석하였음. GC-FID 분석 조건은 다음 표 1-7과 같음.

표 1-7. 분변 내 SCFA 분석을 위한 GC-FID 조건

Column	FFAP column (30m x 320um x 0.25um)
Inlet temp.	240°C, split mode (20:1)

Detector temp.	250°C
Oven temp.	40°C, 2min (10°C/min)→ 65°C, 2min (10°C/in) → 240°C, 5min
Flow rate	2.0 mL/min

(2) 연구 결과

(가) 선발 유산균주 프로바이오틱스 기능성 평가 및 생물자원 소재 등록

① 선발 유산균주의 항산화능 평가

- 영유아 분변에서 분리한 유산균주 중 내산, 내담, 장 부착능이 좋은 8가지 균주에 대해 FRAP, DPPH, ABTS, ORAC assay로 항산화능을 확인한 결과, 다른 6가지 균주에 비해 4B15와 4M13의 항산화능이 가장 뛰어났음. 특히, 4B15균주가 가장 큰 항산화능을 보임 (그림 1-18).

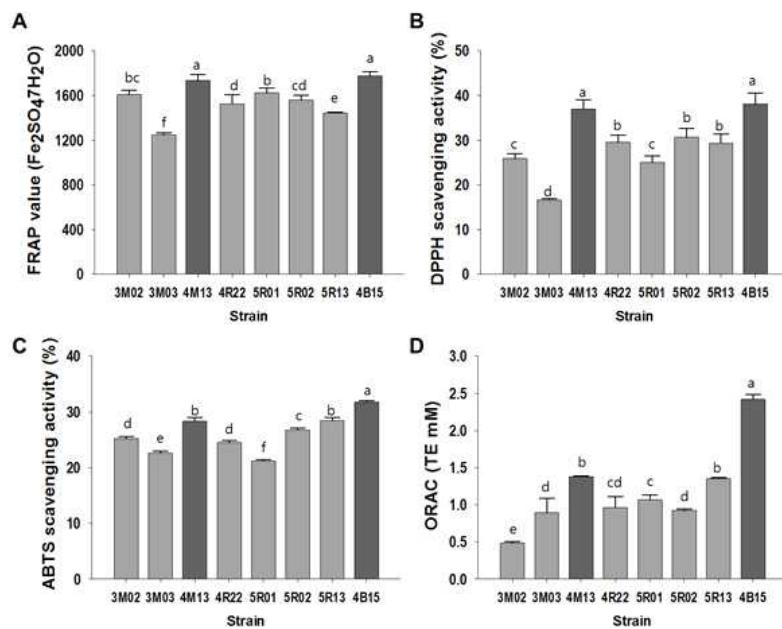


그림 1-18. 4B15와 4M13 균주의 항산화능 평가 결과

② 선발 유산균주의 α-glucosidase 저해능과 콜레스테롤 감소능 평가

- 4B15와 4M13 균주는 다른 6가지 균주에 비해 α-glucosidase 저해능과 콜레스테롤 감소능이 뛰어났음. 특히, 4B15의 기능성이 유의적으로 가장 크게 나타남 (그림 1-19).

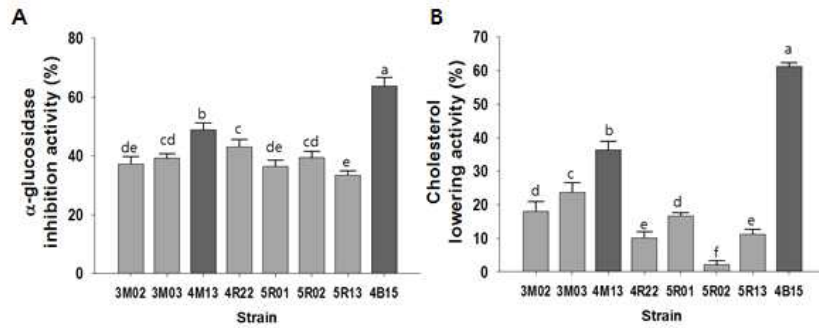


그림 1-19. 4B15와 4M13 균주의 α-glucosidase 저해능과 콜레스테롤 감소능 평가 결과

③ 선발 유산균주의 면역증강활성 평가

- 총 8가지 균주의 면역증강활성 평가를 위해 LPS 처리에 대한 NO (nitric oxide)와 pro-inflammatory cytokines 발현을 측정하였음. NO release 분석 결과, 4M13과 4B15 균주의 NO 생성량이 유의적으로 가장 작게 나타났으며 (그림 1-20), 두 균주의 LPS에 대한 cytokines 생성량을 protein 및 mRNA 수준에서 분석한 결과, 균수에 따라 농도 의존적인 경향을 보였으며, 4B15 균주에서 모든 cytokines의 발현이 유의적으로 작게 나타나는 것을 확인함 (그림 1-21).

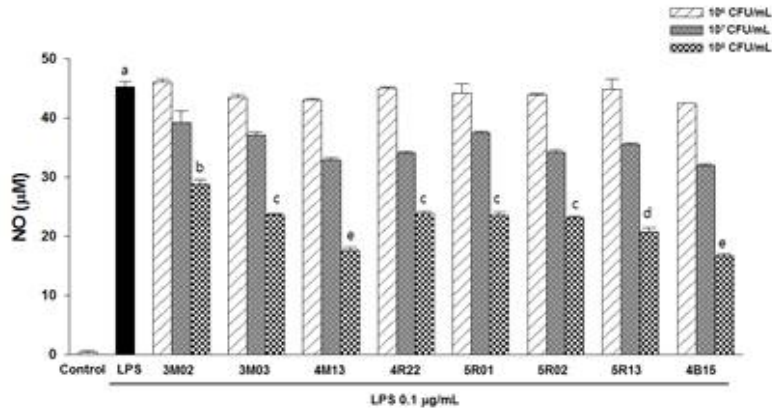
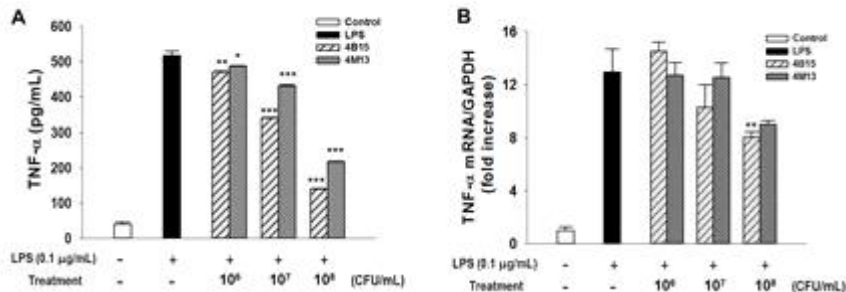


그림 1-20. 4B15와 4M13 균주의 LPS 처리에 의한 NO 생성량



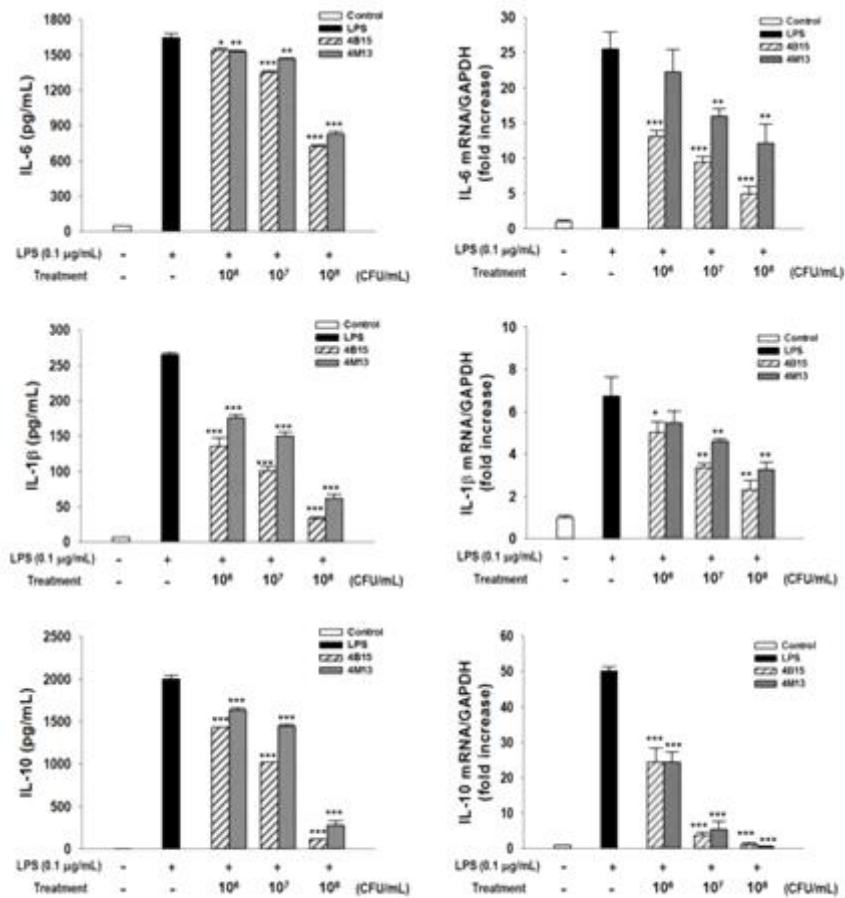


그림 1-21. 4B15와 4M13 균주의 LPS 처리에 의한 pro-inflammatory cytokines 발현량 (A ELISA를 통한 단백질 발현량, B. q-RT-PCR을 통한 mRNA 발현량)

④ 선발 유산균주의 whole genome/comparative sequencing

- 프로바이오틱스능이 확인된 선발 균주 4B15와 4M13은 NGS를 통해 WGS을 진행하였음. 4B15와 4M13의 genomic information은 표 1-8에 나타내었으며, circular map 과 COGs distribution은 그림 1-22과 같음.

표 1-8. 4B15와 4M13 균주의 genomic information

	<i>L. rhamnosus</i> 4B15	<i>L. gasseri</i> 4M13
Sequencing platforms	Pacbio_20K	
Assembler	Pacbio SMRT Analysis 2.3.0	
methods reads	91,317	95,521
Methods coverage	421.71	573.42
Genome size (bp)	3,040,074	2,114,362
G+C content (%)	46.68	34.94
Predicted CDS	2,863	2,089
Number of contigs	2	2
Number of rRNA genes	15	12
Number of tRNA genes	59	60

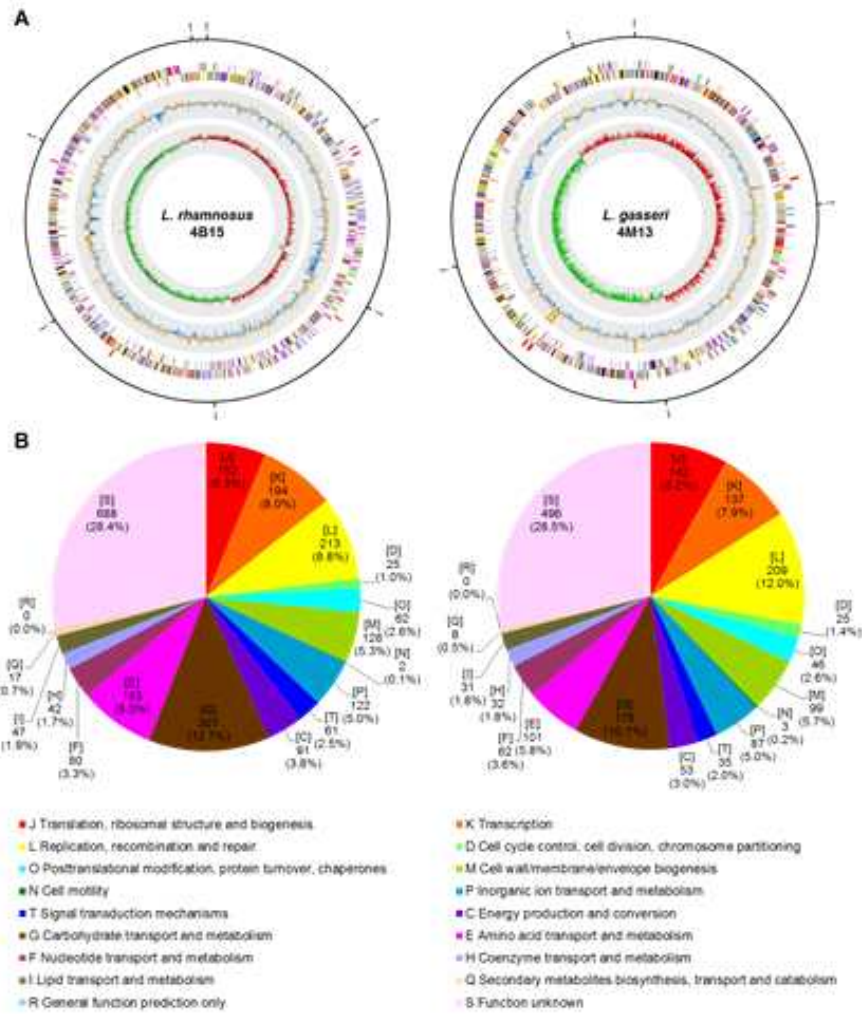


그림 1-22. 4B15와 4M13 균주의 genome sequencing 결과
(A. Circular map, B. COGs distribution)

⑤ 선발 유산균주의 특허/NCBI 등록

- Genomic sequencing 분석을 완료한 4B15와 4M13 균주는 한국미생물보존센터에 국제 특허기탁을 완료하였으며, NCBI에 등록을 완료하였음. 균주 특허번호 및 NCBI 등록번호는 표 1-9과 같음.

표 1-9. 4B15와 4M13 균주의 특허/NCBI 등록 번호

균주명	KCCM 특허기탁번호	NCBI 등록번호
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	KCCM11983P	CP021426
<i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13	KCCM11984P	CP021427

⑥ 선발 유산균주 대량생산

- 프로바이오틱스능이 뛰어난 선발 균주 *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 균주를 10^{11} CFU/g 수준의 유산균 분말로 대량생산하였으며, 추후 제품 제조 시 사용함 (그림 1-23).



그림 1-23. *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 대량생산 균주

(나) 발효 당화유단백질 소재 적용 유제품 및 발효 특성 평가 시스템 확립

- ① 배합비율을 다르게 하여 Gc-Glc를 두 가지 타입으로 제조하였으며, 제조과정 및 제조한 Gc-Glc 발효액 사진은 그림 1-24, 1-25와 같음.



그림 1-24. 발효 당화유단백질 발효액 제조과정

(왼쪽: 교반, 오른쪽 위: 배양직후 커드상태, 오른쪽 아래: 커드 파쇄 후)



그림 1-25. 배합비율을 다르게 하여 제조한 Gc-Glc
(왼쪽: casein 5% : glucose 2.5%, 오른쪽: casein 3% : glucose 1.5%)

- 배합비율에 따라 제조한 발효액과 당액을 혼합하여 발효유를 제조하였으며 (그림 1-26), 제조한 두 가지 타입의 발효유를 대상으로 선발 균수 측정 및 규격과 관능 특성 평가 결과는 표 1-10, 1-11와 그림 1-27에 나타냄.



그림 1-26. 발효 당화유단백질(Gc-Glc-4B15) 적용 발효유

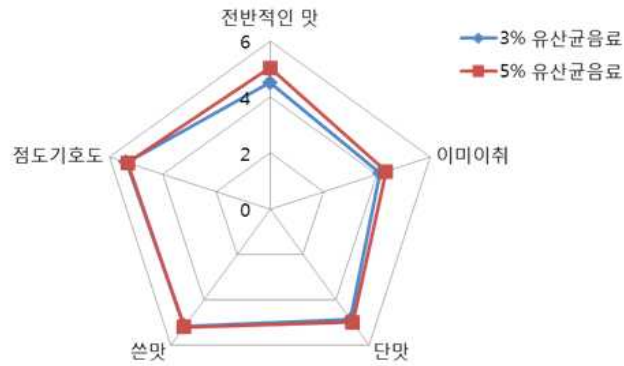
- 두 가지 타입 발효유의 규격 및 유산균수 분석 결과, 두 가지 발효유 모두 대장균군은 음성으로 분석되었으며, 유산균수는 10^7 CFU/mL 이상, 무지유고형분 3% 이상으로 발효유 규격에 부합함. 관능 평가 결과, 단백질과 당 함량이 높은 5% 발효유가 이미이취, 점도, 쓴맛, 단맛이 높게 나왔지만, 전체적인 기호도는 5% 발효유가 더 높았음.

표 1-10. 선발 균주를 사용한 발효 당화유단백질 발효액 균수 측정

	<i>L. rhamnosus</i> 4B15 (log CFU/mL)	
	배양 전	배양 후
3% 발효액	7.32	8.38
5% 발효액	7.35	8.46

표 1-11. 발효 당화유단백질 적용 유산균음료 규격

	3% 유산균음료	5% 유산균음료
pH	3.46 (20.1℃)	3.38 (19.9℃)
당도 (%)	15.3	16.7
유산균수 (logCFU/mL)	8.56	8.64
대장균군	-	-



	전반적인 맛	이미이취	단맛	쓴맛	점도기호도
3% 유산균음료	4.50	4.12	4.88	5.17	5.38
5% 유산균음료	5.04	4.33	5.00	5.21	5.33

그림 1-27. 발효 당화유단백질 적용 유산균음료 기호도 관능적 특성

- ② 미생물학적 및 관능특성 결과를 토대로 최종적으로 작성한 배합비율 및 제조공정도는 표 1-12, 그림 1-28와 같음.

표 1-12. 발효 당화유단백질 적용 발효유 배합비

원료명	함량(%)
casein 5% + Glu 2.5% 발효액	15
정제수	65.07
당류	18.64
오렌지농축과즙(65 brix)	0.85
구연산	0.13
안정제	0.14



그림 1-28. 발효 당화유단백질 적용 발효유 기초 공정도

③ 발효 당화유단백질 적용 발효액의 발효특성 평가

- Gc-Glc-4B15와 Gw-Glc-4M13의 발효 당화유단백질 적용 발효유 제조 시 발효시간에 따른 프로바이오틱스 균주의 균수 및 pH의 변화는 그림 1-29과 같으며, 생성된 유기산 (lactic acid, acetic acid, formic acid, propionic acid) 함량은 그림 1-30에 나타내었음.
- 발효 시간이 증가함에 따라 프로바이오틱스 균주의 균수가 증가하였으며, pH는 감소하였음. 또한 발효 시간이 증가함에 따라 유기산 함량도 증가하였음.

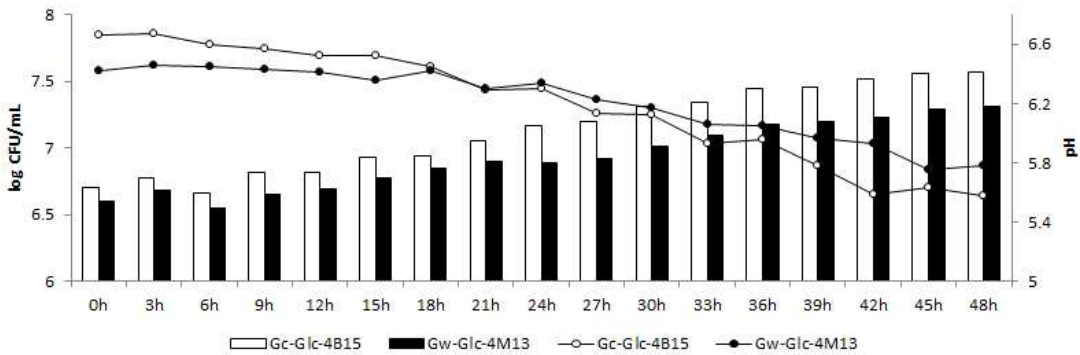


그림 1-29. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 미생물학적 특성 평가

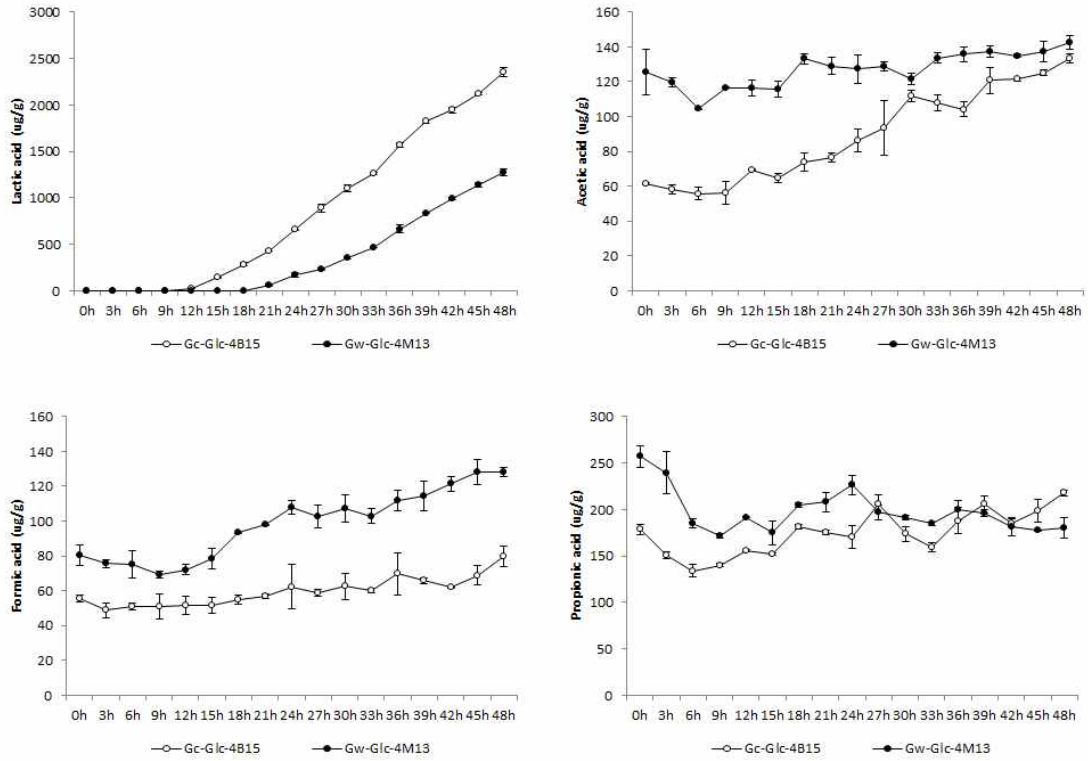


그림 1-30. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 유기산 함량

④ 발효 당화유단백질 적용 발효액의 기능성 평가

- Gc-Glc-4B15와 Gw-Glc-4M13 발효액의 항산화 활성 측정 결과 (그림 1-31), casein과 whey protein 당화반응물에 비해 4B15와 4M13으로 각각 발효한 후, 환원력 및 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하였음.

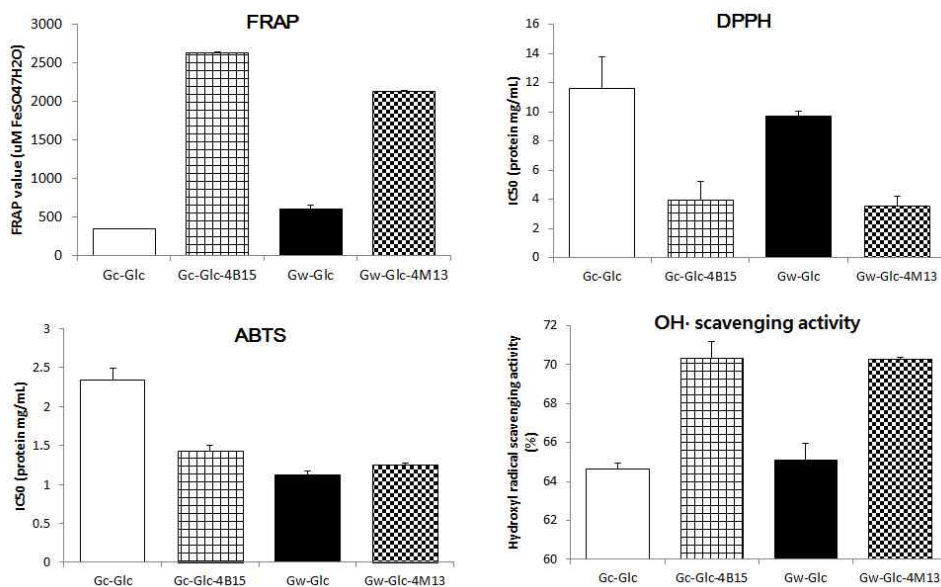


그림 1-31. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 항산화 활성

- 발효액의 염증 억제 활성 측정 결과는 그림 1-32에 나타내었음. LPS 처리에 의해 염증 매개체(inflammatory mediators)로서 측정된 TLR-4, IL-8, MCP-1의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였음.
- 반면, 발효 전과 후의 당화유단백질을 LPS와 함께 처리한 결과, 염증 매개체들의 mRNA 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였음.

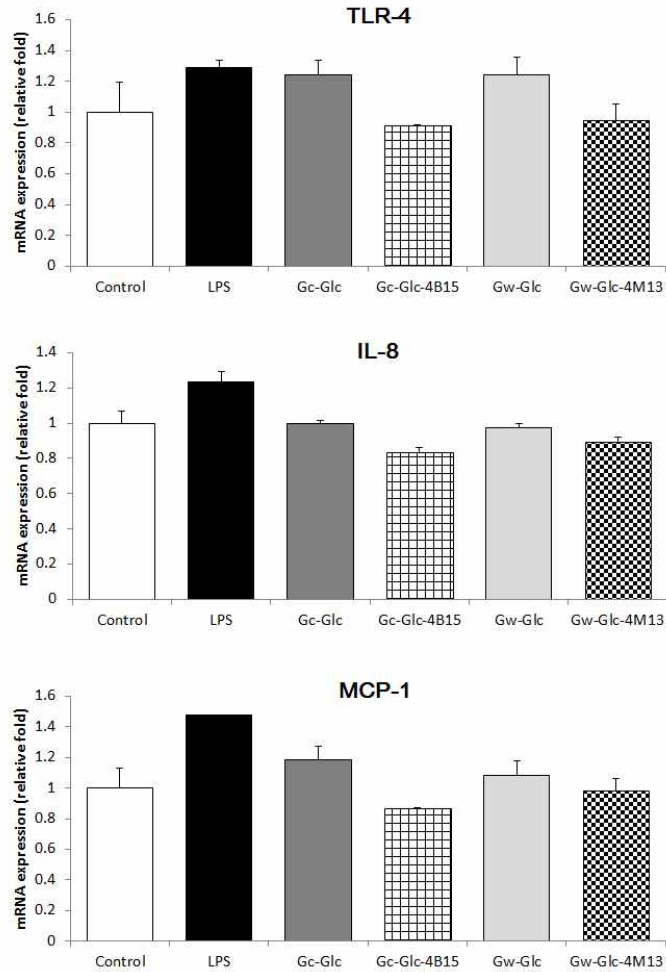


그림 1-32. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 염증억제 활성

- 장내 방어벽 형성에 중요한 영향을 끼치는 tight junction proteins의 발현을 mRNA 수준에서 측정된 결과, LPS 처리에 의해 유의적으로 감소한 반면, 발효 당화유단백질을 LPS와 동시에 처리한 결과 tight junction 관련 zo-1, occludin, claudin-5의 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였음 (그림 1-33).

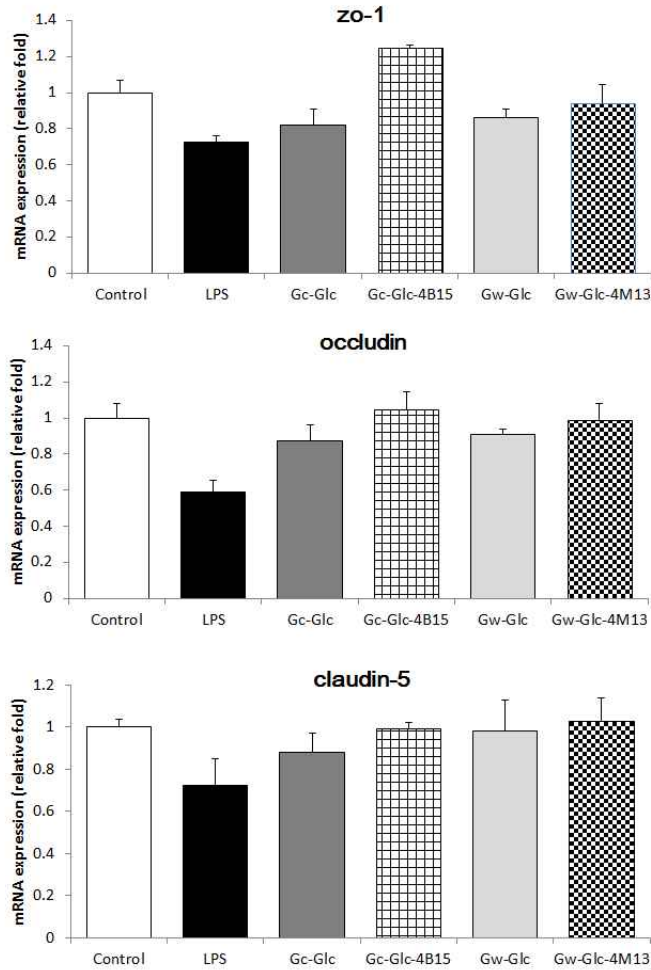


그림 1-33. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 장내 방어벽 보호 효과

- 뇌 세포 (SH-SY5Y cell)에서 발효 당화유단백질의 neurogenesis (신경생성) 효과를 측정 한 결과, 뇌 유래 신경영양인자인 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)와 뇌신경 세포 분화 역할을 하는 NeuroG2의 mRNA 발현이 Gc-Glc-4B15를 처리한 그룹에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었음 (그림 1-34).
- bax, bcl-2, caspase-3의 mRNA 발현 측정 결과에서도 발효 당화유단백질 처리 그룹에서 뇌 세포의 apoptosis를 억제하는 것으로 확인되었음.

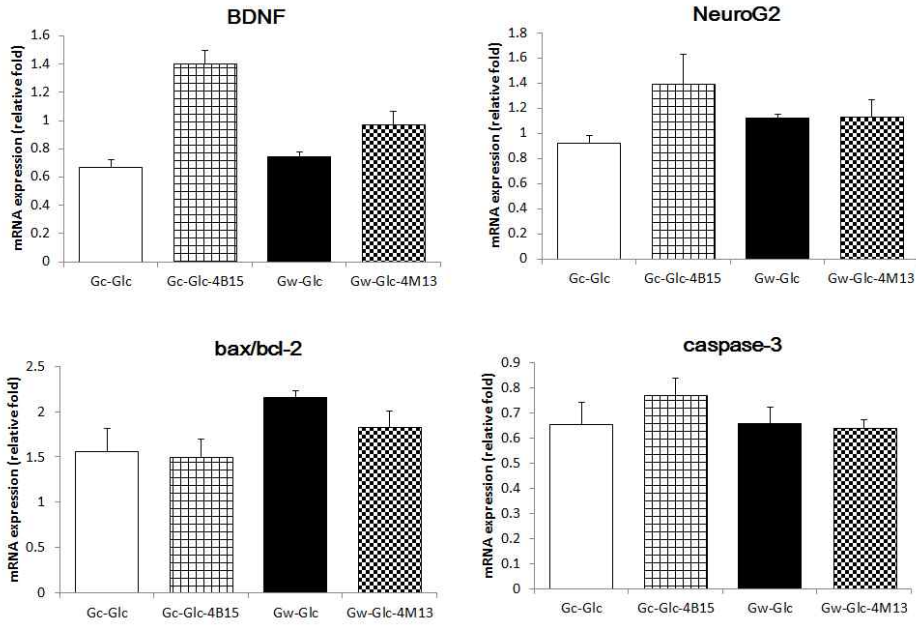


그림 1-34. 발효 당화유단백질 적용 발효액의 neurogenesis(신경생성) 효과

- Gc-Glc-4B15와 Gw-Glc-4M13 두 가지 발효 당화유단백질을 적용한 발효액의 항산화 및 염증 억제 활성, 장내 방어벽 보호 효과, 뇌신경생성 효과를 확인하였음.

⑤ 발효 당화유단백질 적용 발효유 내 지표물질 분석

- 발효 당화유단백질 적용 유산균음료 내 펩타이드 분석 결과는 그림 1-35와 표 1-13에 나타내었음. 검출된 펩타이드는 α -, β -, κ -CN에서 유래했으며, 기존 기능이 검증된 펩타이드 포함 총 28개의 펩타이드가 검출됨.

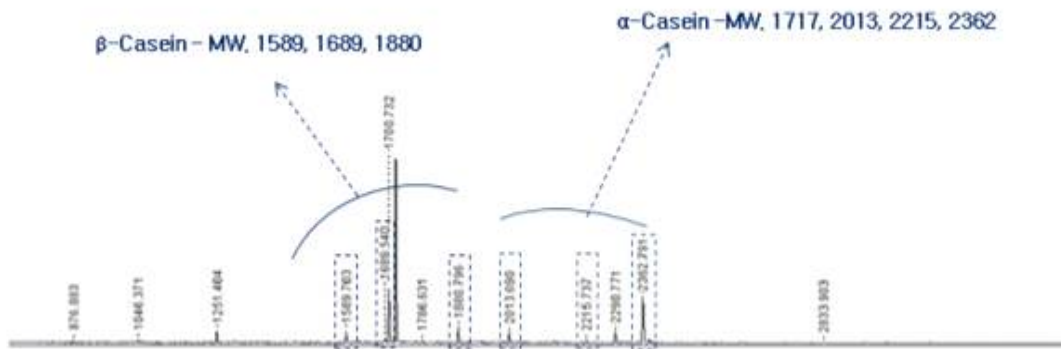


그림 1-35. 발효 당화유단백질 적용 발효유 내 펩타이드

표 1-13. 발효 당화유단백질 적용 발효유 내 펩타이드

Protein	m/z	Sequences	Post-translational modification	Ref.
α_{S1} -Casein	1991	$_1$ RPKHPIKHQGLPQEVLN $_{17}$	N $^1_{17}$ (Deamidated)	Baum et al. (2013)

	2997	173YTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉		Jin et al. (2016)
	2834	174TDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated)	
	2618	176APSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉		Baum et al. (2013)
	2547	177PSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉		Jin et al. (2016)
	2291	179FSDIPNPIGSENSEKTTM ₁₉₆	N ₁₉₀ (Deamidated), T ₁₉₅ (dHex.Hex), M ₁₉₆ (Oxidation)	
	2363	179FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉		Ha et al. (2015)
	2363	179FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated),	
	2379	179FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated), M ₁₉₆ (Oxidation)	
	2525	179FSDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₈₄ (Hex), N ₁₉₀ (Deamidated)	
	2216	180SDIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated)	
	2219	181DIPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated)	
	2001	182IPNPIGSENSEKTT ₁₉₅	S ₁₉₁ ,T ₁₉₅ (dHex.Hex)	
	1942	182IPNPIGSENSGKTTM ₁₉₆	K ₁₉₃ (Hex2)	
	2014	182IPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉		Baum et al. (2013)
	2029	182IPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated), M ₁₉₆ (Oxidation)	
	2176	182IPNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	N ₁₉₀ (Deamidated),K ₁₉₃ (Hex)	
	2385	183PNPIGSENSEKTTMPLW ₁₉₉	T ₁₉₄ ,T ₁₉₅ ,W ₁₉₉ (HexN)	
α_{S2} -Casein	1718	194IQPKTKVIPYVRYL ₂₀₇		Jin et al. (2016)
β -Casein	1057	85PPFLQPEVM ₉₃		Jin et al. (2016)
	1555	193YQEPVLPVVRGPF ₂₀₆		Baum et al. (2013)
	1880	193YQEPVLPVVRGPFPIIV ₂₀₉		Baum et al. (2013)
	1881	193YQEPVLPVVRGPFPIIV ₂₀₉	Q ₁₉₄ (Deamidated)	
	1718	194QEPVLPVVRGPFPIIV ₂₀₉		Baum et al. (2013)
	1590	195EPVLPVVRGPFPIIV ₂₀₉		Baum et al. (2013)
	1094	199PVRGPFPIIV ₂₀₉		Baum et al. (2013)
κ -Casein	1542	155SPPEINTVQVTSTAV ₁₆₉		Le et al. (2016)
	1455	156PPEINTVQVTSTAV ₁₆₉		Le et al. (2016)

(다) 발효 당화유단백질에 의한 마우스 모델 장내 미생물 분석

① 분변 내 metagenomic DNA 추출

- 분변 내 metagenomic DNA 추출 후, agarose gel에 loading하여 확인한 결과, 그림 1-36에서와 같이 DNA 상태 및 양이 충분하게 추출된 것으로 확인됨.

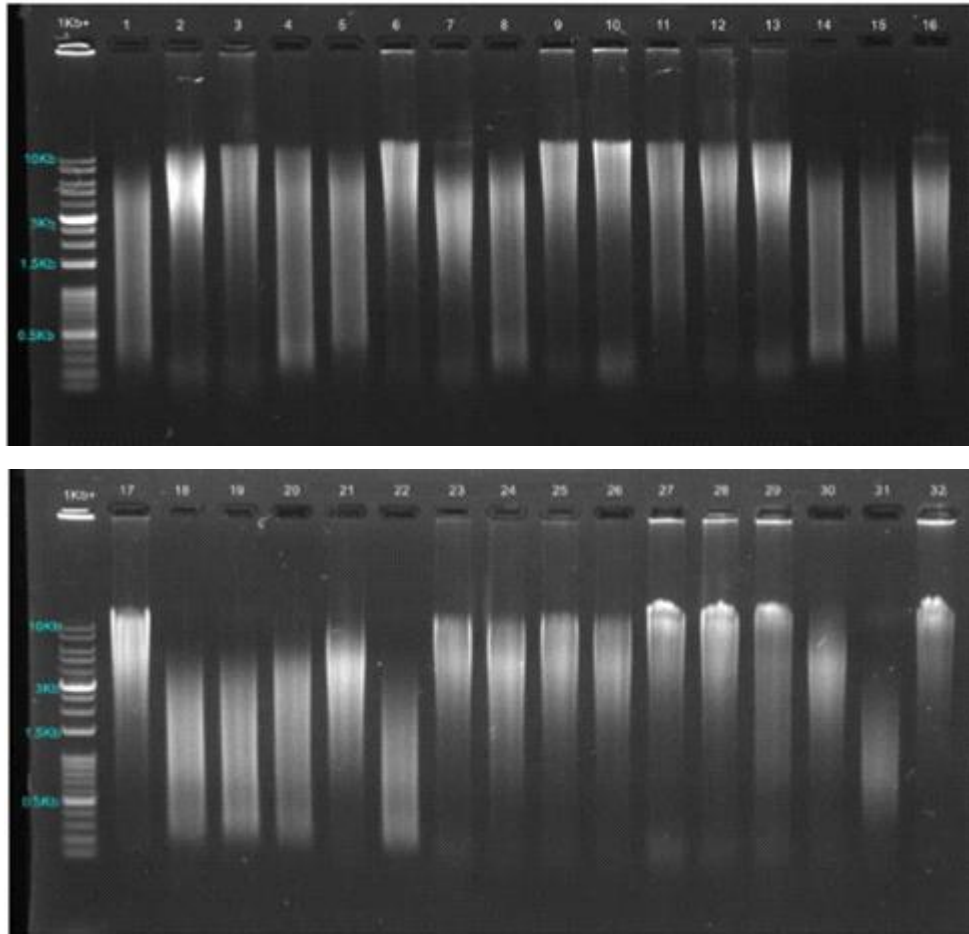


그림 1-36. 분변 metagenomic DNA

② 발효 당화유단백질 식이를 통한 마우스 장내 미생물 군집 변화 분석

- 제2협동기관에서 수행한 스트레스 마우스 모델에서 분변 샘플을 수거하였으며, 분변 샘플로부터 DNA 추출 후, 장내 미생물 군집의 변화를 분석하였음 (그림 1-37).
- 분변 샘플 분석 결과, 0주차와 10주차 두 그룹으로 나뉘었으며, 10주차의 5그룹 중에서도 스트레스 받지 않은 컨트롤 그룹과 당화유단백질 Gc-Glc, 발효 당화유단백질 Gc-Glc-4B15 섭취 그룹이 같은 클러스터를 형성하였음.
- 스트레스 노출 후, 궤양성 장염 및 크론병 환자에서 대부분 존재하는 Lachnospiraceae, Staphylococcaceae, Clostridiaceae 등의 family가 증가하였으나, Gc-Glc-4B15 섭취 그룹에서는 동일 균주들이 감소하였음. 또한 Lactobacillaceae는 발효 당화유단백질 섭취 그룹에서 높은 비율로 존재하였음.
- 당화유단백질의 발효에 사용한 4B15균주가 속한 Lactobacillus는 발효 당화유단백질 섭취 그룹에서 높은 비율로 존재하였으며, Lactobacillus rhamnosus는 발효 당화유단백질 섭취 그룹에서만 분석되었음 (그림 1-38).
- Phylum, class, family, species 및 genus 수준에서의 미생물 군집 변화가 그룹에 따라 동일한 패턴으로 나타났으며, 이 같은 결과는 스트레스의 노출 및 발효 당화유단백질의

섭취가 장내 미생물 군집의 변화에 유의적인 영향을 미치는 것으로 판단 할 수 있음.

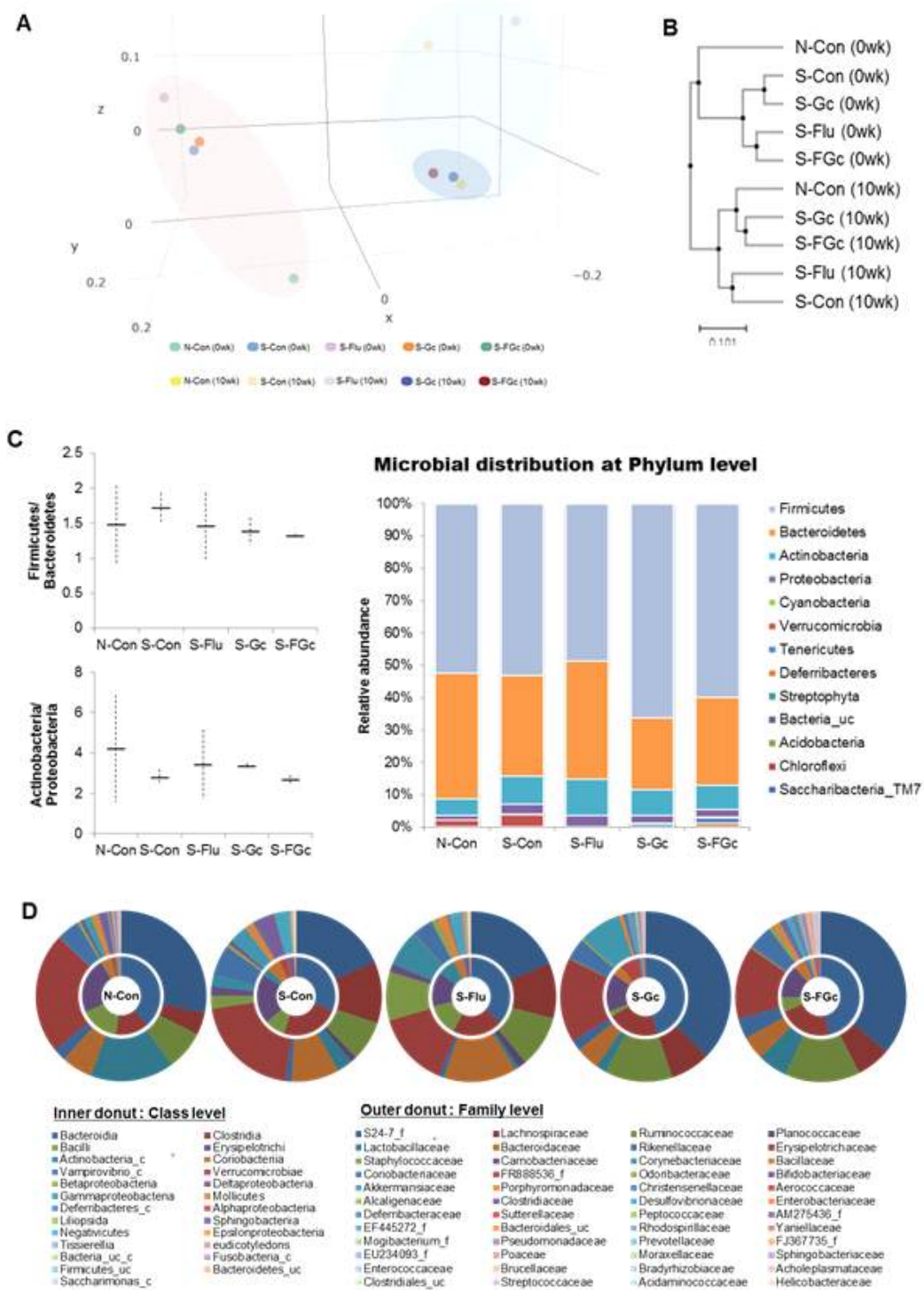


그림 1-37. 스트레스 마우스 모델에서 발효 당화유단백질에 의한 장내 미생물 군집 변화 (Phylum, class, family level)

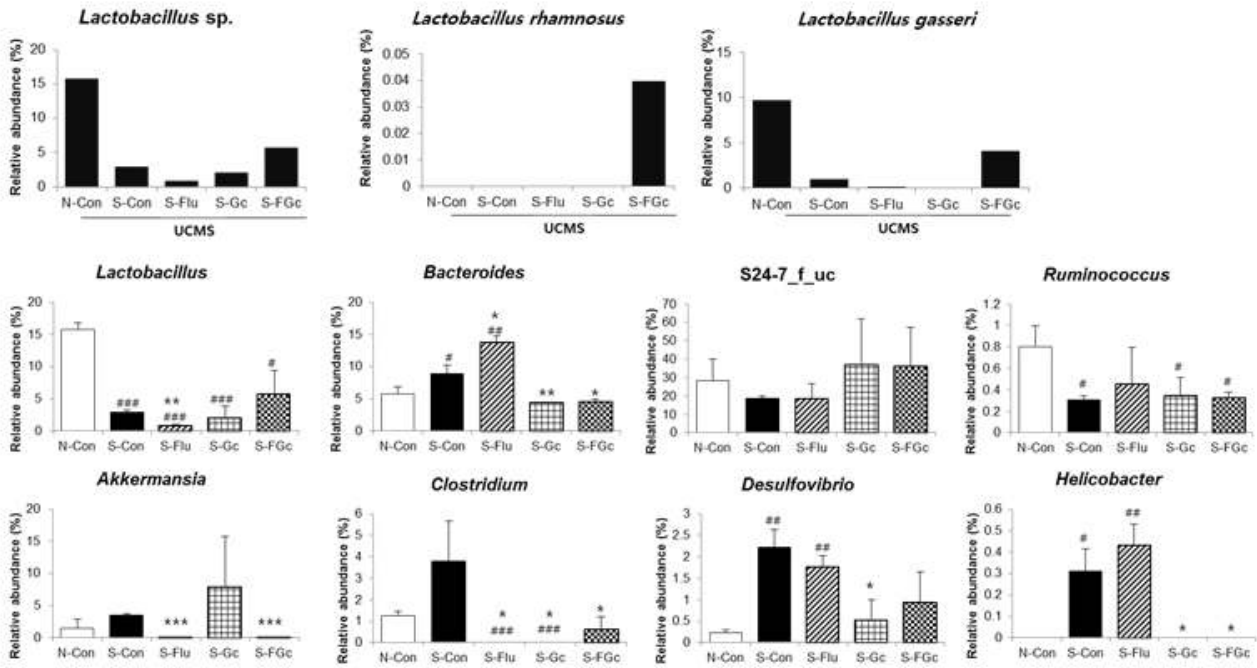


그림 1-38. 스트레스 마우스 모델에서 발효 당화유단백질에 의한 장내 미생물 군집 변화, (genus level)

(라) 발효 당화유단백질에 의한 마우스 모델 장내 metabolites 분석

① 분변 샘플 내 단쇄 지방산(short chain fatty acid, SCFA) 함량 분석

- 제2협동기관에서 수행한 스트레스 마우스 모델에서 분변 샘플을 수거하였으며, 분변 샘플로부터 SCFA 함량을 측정하였음 (그림 1-39A).
- SCFA는 장내 미생물로부터 생성되며, 체내 면역 및 enteric nervous system을 조절하는 것으로 알려져 있음.
- 스트레스의 노출에 의해 acetic acid, propionic acid, butyric acid의 함량이 유의적으로 감소하였으나, 발효 당화유단백질 섭취 그룹에서 컨트롤 그룹의 수준으로 회복된 것을 확인하였음.

② 분변 샘플 내 proteolytic activity 측정

- 제2협동기관에서 수행한 스트레스 마우스 모델에서 분변 샘플을 수거하였으며, 분변 샘플 내 proteolytic activity를 측정하였음 (그림 1-39B).
- 분변 내 proteolytic activity는 IBS 환자에게서 높은 수준으로 나타나는 것으로 알려져 있으며, 스트레스 그룹에서 유의적으로 proteolytic activity가 증가하였음. 반면, 발효 당화유단백질 그룹에서 proteolytic activity의 증가가 유의적으로 저해되는 것을 확인하였음.

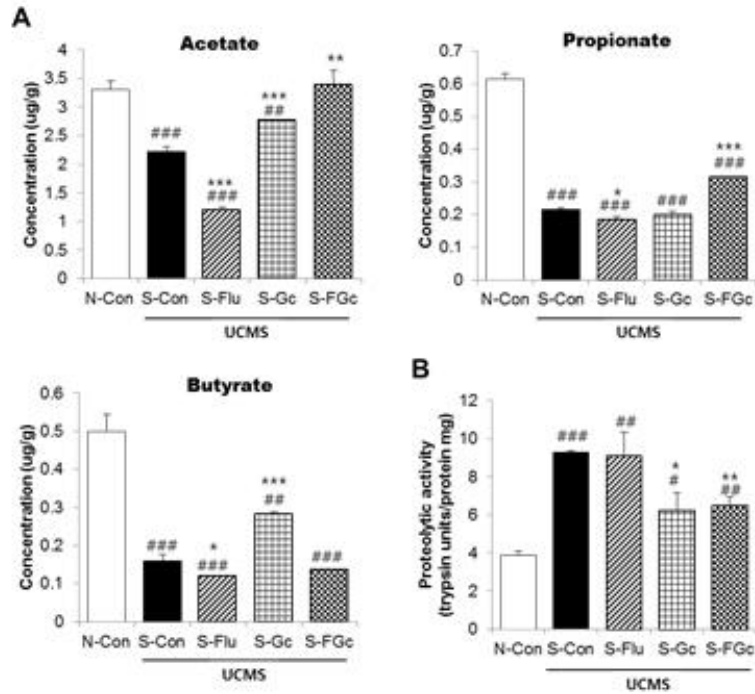


그림 1-39. 스트레스 마우스 모델에서 발효 당화유단백질에 의한 장내 metabolites 및 proteolytic activity 변화

다. 기저성 염증 개선 기능성의 발효 당화유단백질 고령친화 유제품의 대량시험 및 시제품 생산

(1) 실험 내용

(가) 발효 당화유단백질 적용 유제품 제조 공정 개발 및 대량 생산

① 발효 당화유단백질 적용 발효유 대량 생산

- 선발 당화유단백질 및 유산균을 사용하여 발효 당화유단백질 발효액의 최적 배합비 및 제조 공정을 설정하였으며, 발효 당화유단백질을 적용한 발효유의 대량 생산 시험을 진행함.

② 발효 당화유단백질 적용 분말제제 대량 생산

- 선발 당화유단백질 및 유산균을 사용하여 발효 당화유단백질을 제조하였으며, 발효 당화유단백질을 적용한 분말 제제의 대량 생산 시험을 진행함.

(나) 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 분말제제 규격 및 관련 법령 검토

① 발효 당화유단백질 적용 발효유의 기준 및 규격

- 「식품의 기준 및 규격」을 참고하여 발효 당화유단백질 적용 발효유의 식품 유형 및 규격을 검토하였으며, 식품의 유형은 발효유 중 발효유에 해당함. 발효유의 기준 및 규격은 표 1-14와 같음.

표 1-14. 발효유의 기준 및 규격 (식품의 기준 및 규격, 제2018-54호)

18-4 발효유류							
1) 정의							
발효유류라 함은 원유 또는 유가공품을 유산균 또는 효모로 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것을 말한다.							
2) 원료 등의 구비요건							
3) 제조·가공기준							
(1) 배합된 원료(유산균, 효모는 제외한다)는 살균 또는 멸균, 냉각공정을 거친 후 원료로 사용한 유산균 또는 효모 이외의 다른 미생물이 오염되지 않도록 하여야 한다.							
(2) 유산균 또는 효모는 적절한 온도를 유지하여 배양 또는 발효하여야 한다.							
(3) 발효유류는 냉동 공정을 거칠 수 있다.							
4) 식품유형							
(1) 발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 3% 이상의 것을 말한다.							
(2) 농후발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 8% 이상의 호상 또는 액상의 것을 말한다.							
(3) 크림발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 3% 이상, 유지방 8% 이상의 것을 말한다.							
(4) 농후크림발효유 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나, 이에 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로 무지유고형분 8% 이상, 유지방 8% 이상의 것을 말한다.							
(5) 발효버터유 : 버터유를 발효시킨 것으로 무지유고형분 8% 이상의 것을 말한다.							
(6) 발효유분말 : 원유 또는 유가공품을 발효시킨 것이거나 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 분말화한 것으로 유고형분 85% 이상의 것을 말한다.							
5) 규격							
항목	유형	발효유	농후발효유	크림발효유	농 후 크림발효유	발효버터유	발효유분말
(1) 수분(%)		-	-	-	-	-	5.0 이하
(2) 유고형분 (%)		-	-	-	-	-	85 이상
(3) 무지유 고형분(%)		3.0 이상	8.0 이상	3.0 이상	8.0 이상	8.0 이상	-
(4) 유지방(%)		-	-	8.0이상	8.0이상	1.5이하	-
(5) 유산균수 또는 효모수		1 mL당 10,000,000 이상	1 mL당 100,000,000 이상	1 mL당 10,000,000 이상	1 mL당 100,000,000 이상	1 mL당 10,000,000 이상	-

	(단, 냉동제품은 10,000,000 이상)	(단, 냉동제품은 10,000,000 이상)	
(6) 대장균군	n=5, c=2, m=0, M=10		
(7) 살모넬라	n=5, c=0, m=0/25g		
(8) 리스테리아 모노사이토 제네스	n=5, c=0, m=0/25g		
(9) 황색포도상 구균	n=5, c=0, m=0/25g		

6) 시험방법

제7. 일반시험법에 따라 시험한다.

② 발효 당화유단백질 적용 분말제제의 기준 및 규격

- 「식품의 기준 및 규격」을 참고하여 발효 당화유단백질 적용 분말제제의 식품 유형 및 규격을 검토하였으며, 식품의 유형은 건강기능식품 중 프로바이오틱스에 해당함. 프로바이오틱스의 기준 및 규격은 표 1-15과 같음.

표 1-15. 프로바이오틱스의 기준 및 규격 (건강기능식품의 기준 및 규격, 식약처 고시 제 2018-12호)

2-51 프로바이오틱스	
1) 제조기준	
(1) 원재료 : 다음의 미생물 또는 이를 혼합한 균과 균 또는 배양체를 배양시키기 위한 배지 및 보호제	
	종 류
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhamnosus, L.salivarius</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E.faecium, E.faecalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum, B.breve, B.longum, B.animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
(2) 제조방법 : 상기 미생물을 배양·건조하여 제조하여야 함.	
(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 생균을 100,000,000 CFU/g 이상 함유하고 있어야 함	
2) 규격	

- (1) 정상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함
- (2) 프로바이오틱스 수 : 표시량 이상
- (3) 대장균군 : 음성

3) 최종제품의 요건

- (1) 기능성 내용 : 유산균 증식 및 유해균 억제·배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음
- (2) 일일섭취량
100,000,000 ~ 10,000,000,000 CFU

4) 시험법

- (1) 프로바이오틱스 수 : 제 4. 3-58 유산균수, 3-59 유산간·구균 및 비피더스균
- (2) 대장균군 : [별표 4] 참조

(2) 연구 결과

(가) 발효 당화유단백질 적용 유제품 제조를 위한 배합비 및 제조공정 설정

① 발효 당화유단백질 적용 발효액 배합비 설정

- 발효 당화유단백질 적용 발효유의 제조를 위해 기존 정제수 베이스가 아닌 우유 베이스 발효액을 제조하기로 함.
- 당화 반응 시 생성되는 acetic acid 및 formic acid에 의해 당화반응물의 산도가 높은 경향을 보임에 따라 산업스타터 균주 중 산미 형성이 낮은 스타터 균주인 mild 1.0 스타터를 선발하였음.
- 우유 내에 존재하는 casein 및 whey protein양을 감안하여 유단백질 5%, glucose 2.5%가 되게 배합비를 표 1-16과 같이 조정하였으며, 배합비에 따라 발효액을 제조하여 발효 특성 및 관능 평가를 진행하였음. 배합비에 따라 제조한 발효 당화유단백질 발효액은 그림 1-40과 같음.
- Whey를 사용한 발효 당화유단백질 제조 시, 65도 24시간 당화반응에 의해 열에 약한 whey proteins의 특성으로 인해 발효액의 물성이 너무 단단해져서 발효유 제조에 어려움이 있었음. 따라서 whey 당화 시, 당화반응 온도를 55도로 낮춤.

표 1-16. 발효 당화유단백질 제조 공정 설정을 위한 배합비

	유단백질 (%)		포도당 (%)	우유 (%)
	Casein	Whey		
c1	0.5	-	1.5	98
c2	2.5	-	2.5	95
c3	4.5	-	3.5	92
w1	-	2.5	1.5	96
w2	-	4.5	2.5	93
w3	-	6.5	3.5	90



그림 1-40. 배합비에 따라 제조한 발효 당화유단백질 발효액

- 배합비에 따라 제조한 발효 당화유단백질 발효액의 pH 및 균수는 배합비에 영향을 받지 않았으며(표 1-17), 관능적 특성은 표 1-18와 같음. 따라서 발효유로 제조하기 위해 선별한 발효액의 배합비는 casein 적용 발효액은 C2로, whey 적용 발효액은 W3로 하여 다음 실험을 진행하였음.

표 1-17. 배합비에 따라 제조한 발효 당화유단백질 발효액의 균수

	Log CFU/mL	
	발효 전	발효 후
c1	8.71	10.21
c2	8.61	10.08
c3	8.60	10.09
w1	8.50	9.80
w2	8.44	9.70
w3	8.40	9.79

표 1-18. 배합비에 따라 제조한 발효 당화유단백질 발효액의 특성

	관능특성
c1	물성 적당하지만 끝에 쓴맛이 너무 강해 발효유 제조에 어려움이 있음.
c2	물성이 조금 강하며, 쓴맛도 안남.
c3	물성이 너무 강해 단단하여 균질에 어려움이 있음.
w1	물성이 너무 낮아 묽고 쿽쿽한 냄새가 심해 관능적으로 제품화 불가능
w2	물성은 적당하고, W1보다는 심하지 않지만 쿽쿽한 냄새가 남
w3	물성도 적당하며, 쿽쿽한 냄새 없음.

② 발효 당화유단백질 적용 발효액을 사용한 발효유 관능 특성 평가

- 선별 발효액을 사용하여 파인애플 및 사과 맛의 발효유 총 8가지를 제조하였으며 (그림 1-41), 사내 관능평가를 진행함.
- 최종적으로 W는 사과맛 C는 파인애플맛의 결과가 높게 나옴. 따라서 W발효유는 7:3

사과맛 발효유, C발효유는 8:2 파인애플맛 발효음료로 배합비를 최종적으로 결정하여, 발효유 및 발효음료를 제조하였음.



그림 1-41. 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 발효음료

- ③ 발효 당화유단백질 적용 발효액을 사용한 발효유 및 발효음료 배합비 및 제조 공정 설정
 - 최종적으로 발효 당화유단백질을 적용한 발효유 및 발효음료 제조를 위해 설정한 배합비와 제조공정도는 다음과 같음.

표 1-19. 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 발효음료 배합비

원료명	배합비 (%)	
	발효음료	발효유
유단백질(casein/whey)	2.5	6.5
포도당	2.5	3.5
Mild 1.0	0.034	0.034
유산균주(4B15/4M13)	0.14	0.14
우유	94.816	89.816
발효액	20	30
액상과당	4.000	4.000
백설탕	1.000	1.000
Pectin	0.250	0.250
과일 농축액	3.820	3.820
향	0.100	0.100
정수	20.830	20.830
시럽액	80	70
합계	100	100

원료혼합

- 유단백질, 포도당을 우유에서 혼합 후,
완전히 용해



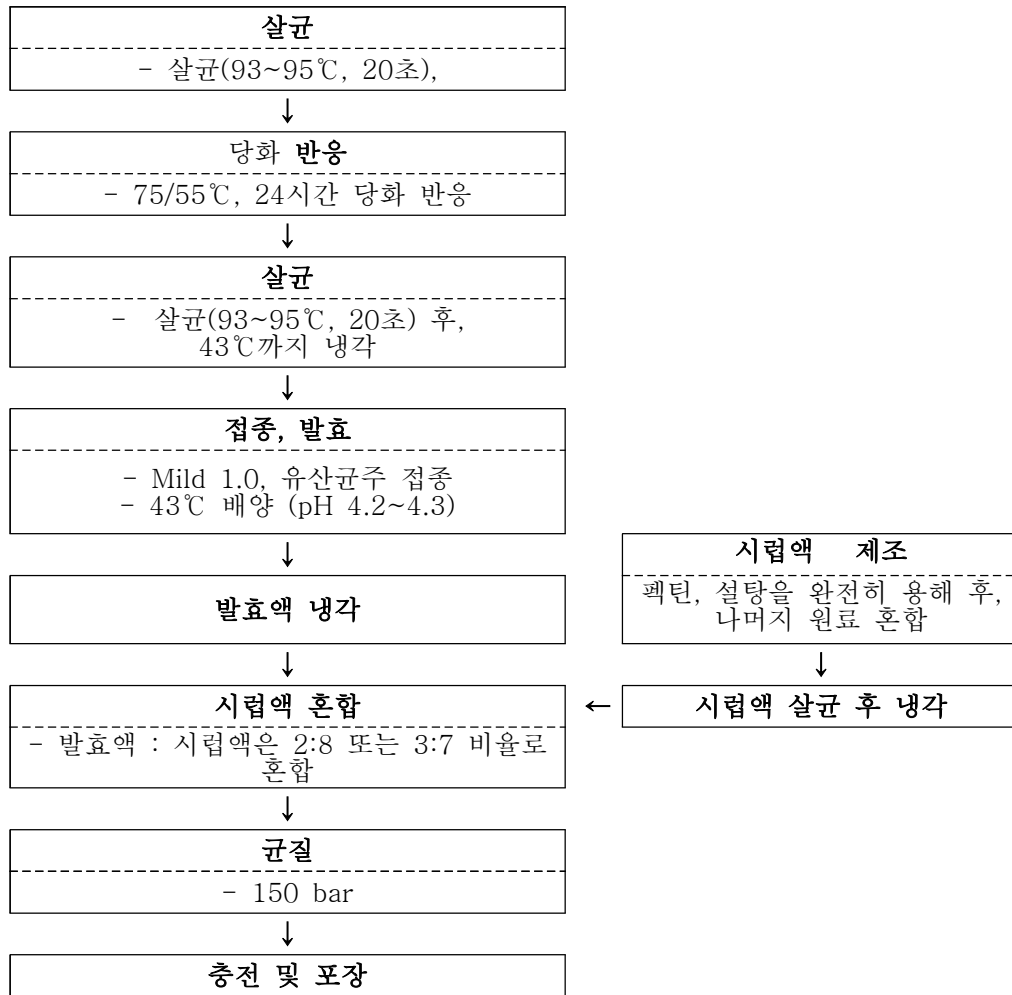


그림 1-42. 발효 당화유단백질 적용 발효유 제조 공정

(나) 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 발효음료 대량 생산 공정 개발

① 제품 특징

- 스트레스성 장 기능 및 면역 강화 기능성 소재 및 프로바이오틱스 적용 고령 친화 발효유
- 맛 : 파인애플, 사과
- 포장 및 용량 : 컵(PE) / 225mL
- 식품유형 : 발효유, 발효음료 (그림 1-43)
- 기존제품과의 차별성 : 국내 개발 (주관기관인 서울우유협동조합 특허 균주) 프로바이오틱스를 포함하고 있으며, 기저성 염증 억제 및 뇌 기능 향상의 기능성을 가지고 있는 노인층을 타겟으로 하는 고령친화 제품임.



그림 1-43. 발효 당화유단백질 소재 적용 발효유 및 발효음료

② 배합비율 및 제조공정도는 표 1-19 및 그림 1-42, 1-44와 같음.



그림 1-44. 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 발효음료 Pilot scale 제조 공정
(왼쪽 위: 배합탱크, 오른쪽 위 발효탱크,
왼쪽 아래: 혼합, 오른쪽 아래: 살균)

③ 발효 당화유단백질 적용 발효유 및 발효음료 보존테스트

- 시험생산 제품을 10, 15, 20℃ 저장고에서 28일간 저장. 제품의 색상 및 풍미, 산도, pH, 유산균수 및 대장균군수 측정함.
- 시중 유통 및 저장 온도는 1~10℃로, 10℃에서는 비교적 1×10^9 CFU/ml 정도의 유산균수를 유지하는 것으로 확인할 수 있었음. 성상이나 풍미는 저장 15일차까지는 양호한 편이나 15일 이후부터는 강한 산미 발생함.
- 20℃ 저장 시에는 산미 진행 속도가 매우 빠르므로 제품 개발 시 유통 및 저장온도에 주의해야 할 필요 있음.

표 1-20. 발효 당화유단백질 발효음료 파인애플맛 제품 보존 테스트 결과

저장 일수	온도 (°C)	성상/풍미	T.A.	pH	대장 균군	총 유산균수 (BCP)	<i>Lactobacillus</i> (MRS)
0일	-	양호	0.73	4.47	N.D.	1.72E+09	1.10E+09
1일	10	양호	0.73	4.37	N.D.	2.00E+09	1.49E+09
	15	양호	0.75	4.36	N.D.	1.69E+09	1.42E+09
	20	양호	0.78	4.27	N.D.	1.91E+09	1.28E+09
6일	10	양호	0.81	4.33	N.D.	1.56E+09	1.17E+09
	15	양호	0.85	4.13	N.D.	1.54E+09	1.26E+09
	20	산미 강함	1.00	3.97	N.D.	1.54E+09	9.85E+08
9일	10	양호	0.81	4.40	N.D.	1.67E+09	1.47E+09
	15	양호	0.87	4.16	N.D.	1.54E+09	1.34E+09
	20	산미 강함	1.01	3.96	N.D.	1.16E+09	1.12E+09
12일	10	양호		4.19	N.D.	1.65E+09	1.44E+09
	15	양호		4.13	N.D.	1.43E+09	1.26E+09
	20	산미 강함		3.92	N.D.	1.20E+09	9.15E+08
15일	10	양호	0.86	4.23	N.D.	1.24E+09	1.26E+09
	15	양호	0.92	4.14	N.D.	1.27E+09	1.06E+09
	20	산미 강함	1.13	4.14	N.D.	3.60E+08	3.75E+08
20일	10	산미 강함	0.84	4.04	N.D.	1.61E+09	1.17E+09
	15	산미 강함	0.95	3.99	N.D.	1.21E+09	1.02E+09
	20	산미 강함	1.12	3.77	N.D.	9.50E+07	6.50E+07
23일	10	산미 강함	0.87	4.19	N.D.	1.17E+09	1.03E+09
	15	산미 강함	0.95	4.09	N.D.	6.95E+08	4.75E+08
	20	산미 강함	1.2	3.81	N.D.	5.55E+07	2.55E+07
26일	10	산미 강함	0.93	4.18	N.D.	8.00E+08	6.85E+08
	15	산미 강함	0.97	4.03	N.D.	5.30E+08	3.90E+08
	20	산미 강함	1.21	3.79	N.D.	8.65E+07	3.70E+07
28일	10	산미 강함	0.9	4.12	N.D.	7.05E+08	6.40E+08
	15	산미 강함	0.98	4.05	N.D.	4.65E+08	3.00E+08
	20	산미 강함	1.22	3.82	N.D.	5.60E+07	1.90E+07

표 1-21. 발효 당화유단백질 발효유 사과맛 제품 보존 테스트 결과

저장 일수	온도 (°C)	성상/풍미	T.A.	pH	대장 균군	총 유산균수 (BCP)	<i>Lactobacillus</i> (MRS)
0일	-	양호	0.86	4.42(13.6°C)	N.D.	1.53E+09	1.25E+09
1일	10	양호	0.87	4.18(19.8°C)	N.D.	1.59E+09	1.23E+09
	15	양호	0.89	4.14(20.3°C)	N.D.	1.83E+09	1.34E+09
	20	양호	0.91	4.13(20.7°C)	N.D.	1.79E+09	1.15E+09
6일	10	양호	0.91	4.17(18.8°C)	N.D.	1.59E+09	1.23E+09
	15	양호	0.95	4.11(19.5°C)	N.D.	1.55E+09	1.31E+09
	20	산미 강함	1.09	3.91(21.2°C)	N.D.	1.39E+09	1.22E+09
9일	10	양호	0.92	4.19(14.9°C)	N.D.	1.51E+09	1.04E+09
	15	산미 강함	0.96	4.14(16.4°C)	N.D.	1.55E+09	1.18E+09

그림 1-45. 발효 당화유단백질 적용 발효유제품의 관능평가지

- 유단백질 당화반응 시 특유의 이미, 이취가 약하게 있어 이미, 이취가 있다고 표현했으나 기호도에 크게 영향을 미치지 않음.

㉔ 사내 관능검사 결과(연구소 직원 20명 대상)

- 파인애플맛 제품의 전반적인 기호도는 6.40으로 높은 편. 사과맛 제품은 5.60으로 파인애플맛 대비 낮은 편이었으나 2가지 모두 평균 이상으로 평가됨 (표 1-22, 1-23).

표 1-22. 파인애플맛 발효음료 1차 관능검사 결과

[9 점 척도]

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

표 1-23. 사과맛 발효유 1차 관능검사 결과

[9점 척도]

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

㉕ 사외 관능검사 결과(숙명여대/고려대 교수 및 학생 36명 대상)

- 파인애플맛 제품의 전반적인 기호도는 7.25로 매우 높은 편. 반면 whey 특유의 이미, 이취가 강한 사과맛 제품에 대한 기호도 떨어짐 (표 1-24, 1-25).

표 1-24. 파인애플맛 발효음료 2차 관능검사 결과

[9 점 척도]

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

표 1-25. 사과맛 발효유 2차 관능검사 결과

[9점 척도]

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

(다) 발효 당화유단백질 적용 분말제제 대량 생산 공정 개발

① 제품 특징

- 발효 당화유단백질 소재를 주원료로 사용, 요구르트 맛이 나는 혼합 분말제제
- 맛 : 요구르트
- 포장 및 용량 : PE 스틱 / 2g * 100포
- 건강기능식품 유형 : 프로바이오틱스 제제 (그림 1-46)
- 기존제품과의 차별성 : 국내 개발 (주관기관인 서울우유협동조합 특허 균주) 프로바이오틱스 사용한 뇌 기능 향상의 기능성을 가지고 있는 노인층을 타겟으로 하는 고령 친화 제품임.



그림 1-46. 발효 당화유단백질 소재 적용 분말제제

② 발효 당화유단백질 적용 분말제제 배합비 및 제조공정도

- 발효 당화유단백질 적용 분말제제는 발효액을 동결건조 한 후, 부형제 및 기타원료와 혼합하여 그림 1-47의 공정에 따라 제조하였음.

표 1-26. 발효 당화유단백질 적용 분말제제 배합비율

원료명	배합비율 (%)
포도당	43.9
발효 당화유단백질 분말 소재	40
분말향	1
효소처리스테비아	0.2
구연산	1
탈지분유	5
올리고당	3
자일리톨	5
초유	0.1
이산화규소	0.8
합계	100



그림 1-47. 발효 당화유단백질 적용 분말제제 제조 공정

③ 발효 당화유단백질 분말 소재 적용 양갱 제조

- 기능성이 검증된 발효 당화유단백질 소재를 적용한 발효유와 분말제제 뿐만 아니라, 고령친화 제품 제조를 위해 양갱 제품을 제조하였음 (그림 1-48).
- 제2, 3협동기관의 스트레스성 뇌 기능 보호 및 면역강화 활성이 검증된 발효 당화유단백질 소재를 적용하였으며, 저작능력이 떨어지는 노인을 타겟으로 제품화를 검토 중임.



그림 1-48. 발효 당화유단백질 소재 적용 양갱 제품

④ 기술이전 실시

- 본 연구과제 결과를 바탕으로 “기저성 염증 억제 및 뇌 기능 개선 효과를 지니는 발효

당화유단백질을 활용한 유제품의 제조" 기술이전을 완료하였음.

- 이전 기술을 바탕으로 발효 당화유단백질 적용 유제품 3종 (발효유, 발효음료, 분말제제)의 시제품 제작을 완료하였음.
- 추후, 저장기간에 따른 안정성 검증 시험 및 마케팅 부서와의 패키징 및 마케팅 관련 협의 완료 후, 품목제조보고와 함께 제품 출시 예정임.

2-1-2. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 기능성 연구

[제1협동 : 고려대학교 김세현]

가. 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 목적 당화유단백질 발효 균주의 선별

(1) 실험 내용

(가) 프로바이오틱스 능력(내산성, 내담성)을 통한 미생물 균주 선정

- 식품미생물실험실에서 보관하고 있는 유산균주 (표 2-1)를 MRS 배지에서 37°C, 18시간 동안 배양하고 원심분리하여 유산균주를 침전시킴. 이것을 멸균 saline(0.85%NaCl)으로 2회 세척 후 균체 현탁액을 MRS 배지(대조구)와 인공위액 (표 2-2)에 각각 약 106CFU/mL수준으로 접종하여 37°C에서 배양시키면서 0시간, 3시간 간격 으로 생존 균수를 측정함.
- 인공 위액의 제조는 1N HCl을 사용하여 MRS broth의 pH를 2.5로 조정 한 후 pepsin을 1000 unit/mL 농도가 되도록 첨가한 후 멸균하여 제조함. KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-cysteinHCl, Tween80등이 함유된 phosphate buffer (pH 6.8)로 연속 희석법으로 희석하여 MRS 평판 agar 배지에 접종하고 생존수를 측정함. 0시간인 대조구와 인공위액에서 3시간 배양한 생존수의 차이를 계산함. 사용한 배지 조성은 아래와 같음(표 2-2).
- 내담성 측정은 내산성 평가에 사용된 인공위액 대신 oxgall이 0.3% 함유된 MRS broth (표 2-2)에 유산균주를 접종시킨 후 내산성 평가방법과 동일한 방법을 통해 0시간, 24시간 간격으로 생존 균수를 측정하였음.

표 2-1. 실험에 사용한 유산균주

Strain	Species
4797	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
A4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
GP1B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
606	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
4356	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
GP2A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
30SC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
911	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
107A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
43121	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
GP4A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
NCFM	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
393	<i>Lactobacillus casei</i>
9595	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
GG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
2M02	<i>Lactobacillus gasseri</i>
3M01	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3M02	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3M03	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3M09	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4M05	<i>Lactobacillus gasseri</i>
4M13	<i>Lactobacillus gasseri</i>
4M14	<i>Lactobacillus gasseri</i>
3R02	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3R07	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3R08	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4R01	<i>Lactobacillus zeae</i>
4R22	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R01	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R02	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R03	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R06	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R07	<i>Lactobacillus gasseri</i>
5R13	<i>Lactobacillus gasseri</i>
3B03	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4B15	<i>Lactobacillus casei</i>
4B16	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

표 2-2. 내산성과 내담성 확인 배지 조성

Ingredient	조성(%)	Gram / Liter	
Glucose	2%	20 g	
Beef extract	1%	10 g	
Peptone No.3	1%	10 g	
Yeast extract	0.5%	5 g	
Sodium acetate	0.5%	5 g	
Magnesium sulfate-7H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)	
Manganese sulfate-4H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)	
Tween 80	0.1%	10 mL (5 g/50 mL w/v)	
Diammonium citrate	0.2%	2 g	
Dipotassium phosphate	0.2%	2 g	
내산 배지	Pepsin	0.234%	2.34 g
내담 배지	Oxgall	0.3%	3 g

(나) 안정성(gelatinase, urease test) 검증

- MRS배지에서 37°C, 18시간동안 배양한 균주를 Gelatin 배지에 1%로 접종한 뒤 37°C에서 48시간 배양시킨 뒤 Gelatin 배지를 확인함.
- Gelatin 배지의 제조는 Beef extract, Peptone No.3, Gelatin, MRS broth를 정량하여 넣고 Auto Clave에서 121°C, 15분 멸균하여 제조함. 식힌 Gelatin 배지에 균 1%를 접종하고 37°C, 48시간 배양한 뒤 배양이 완료된 배지를 2~8°C의 냉장고에서 보관하여 Gelatin 배지가 유산균에 의해 가수분해 되었는지 여부를 확인함. 사용한 배지 조성은 아래와 같음(표 2-3).

표 2-3. Gelatinase 생성 확인 배지 조성

Ingredient	Gram / 100ml
Beef extract	0.3 g
Peptone No.3	0.5 g
Gelatin	12 g
MRS broth	5.5 g

- 내산성, 내담성 확인 실험에서 선발된 15 균주를 대상으로 MRS배지에서 37°C, 18시간 동안 배양하고 Urease 평판 배지에 도말하여 37°C에서 배양시키고 48시간 후 배양한 배지 색을 확인함.
- Urease 평판 배지의 제조는 Sodium chloride, Monopotassium phosphate, Peptone No.3, Glucose, Phenol red 등을 정량하여 Auto Clave에서 121°C, 15분 멸균한 뒤 식힌 상태에서 0.2µm filter 처리한 Urea를 넣어 제조함. 실험 시작 전에 제조한 배지상태 확인을 위해 1N NaOH를 Urease 평판 배지에 한 방울 떨어뜨려서 배지가 붉은색으로 변하는 것을 확인한 뒤에 실험을 진행함. 배지에 균을 도말한 뒤 48시간 배양후에 배지

색이 붉은 색으로 변하는 지 여부를 확인함. 사용한 배지 조성은 아래와 같음(표 2-4).

표 2-4. Urease 생성 확인 배지 조성

Ingredient	Gram / 100ml
Urea	2 g
Sodium chloride	0.5 g
Monopotassium phosphate	0.2 g
Peptone No.3	0.1 g
Glucose	0.1 g
Phenol red	0.0012 g
Agar	1.5 g

(다) 장 부착능 확인

- 프로바이오틱스 균주의 장 부착능 확인 실험은 HT-29 cell을 통하여 이를 검증하였으며 MRS배지에서 37℃, 18시간동안 배양하여 3차 계대를 완료한 균주를 원심분리하고 PBS buffer를 이용해서 세척하여 HT-29 cell에 접종할 균주를 준비하였음.
- HT-29 세포는 열 비활성화된 10% FBS, 2.05mM L-Glutamine, penicillin G(100IU/ml) 와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가된 RPMI 1640(Thermo, USA)배지를 이용하여 5% CO2존재 하에 37 ℃에서 배양시켰음. 격일로 배지를 교환하며 완전한 monolayer를 형성할 때까지 배양하여 실험에 사용하였음.
- 완전한 monolayer를 형성한 HT-29세포는 항생제가 첨가되지 않은 RPMI 1640배지에 현탁한 후 0.5ml을 첨가하였음. 선발된 균주를 1*10⁸CFU/ml의 농도가 되도록 RPMI에 현탁한 다음 monolayer를 형성한 HT-29 위에 접종하고 5% CO2존재 하에 37 ℃에서 2시간 배양하였음. 배양 후 세척하여 균주의 부착능력을 확인하기 위해 배지를 제거한 뒤에 PBS buffer를 사용하여 6회 세척을 실시하였음. 세척 완료한 후 0.1% Triton X-100를 0.5ml 투여하고 정치시킨 뒤 연속 희석법으로 MRS Agar배지에 도말하였음. 0 시간, 2시간 간격으로 37 ℃에서 48시간 배양하여 생균수를 측정하였음.

(라) 유단백질 분해활성

- 유단백질 분해 활성 실험은 MRS배지에서 37℃, 18시간동안 배양한 균주를 3차 계대하여 PBS에 2~3회 washing 한 후 원심분리하였음. Cell pellet을 모은 뒤 PBS에 현탁하여 Sodium caseinate와 Whey protein isolate가 각 포함된 2가지 유단백질 배지에 균 현탁액을 1%씩 접종하였음. 유단백질 분해 활성 실험에 사용한 배지 조성은 아래와 같음(표 2-5).

표 2-5. 유단백질 분해 활성 확인 배지 조성

Ingredient	조성(%)	Gram / Liter
Glucose	2%	20 g
Peptone No.3	0.01%	0.1 g
Sodium acetate	0.5%	5 g
Magnesium sulfate-7H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)
Manganeise sulfate-4H ₂ O	0.01%	1 mL (5 g/50 mL w/v)
Tween 80	0.1%	10 mL (5 g/50 mL w/v)
Dipotassium phosphate	0.2%	2 g
Sodium Caseinate, Whey protein isolate	3%	30 g

- OPA Reagent는 Disodiumtetraborate decahydrate 7.620 g 과 200 mg 의 Sodium-dodecyl-sulfate(SDS)를 150 mL의 증류수에 희석한 용액 A에, Ethanol에 160 mg의 OPA를 녹인 용액과 176 mg 의 Dithiothreitol (DTT)를 증류수에 녹인 용액을 혼합하여 최종 200 mL의 OPA reagent를 제조하였음. OPA는 빛에 민감하여 쉽게 분해되기 때문에, 사용하기 바로 직전에 제조하여 실험에 사용하였음.
- 유단백질 배지에서 48시간 배양 후 배지성분을 추출하여 여기에 110 mM TCA solution을 1:3 비율로 첨가함으로써 가용성 펩타이드 및 아미노산을 용출시켰음. 이것을 2,000 x g에서 30분간 원심 분리하고, 상등액을 OPA reagent와 반응 시켜 30분간 37 °C에서 배양한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(마) 당화 유단백질의 당화반응에 의한 mass shift 확인

- 당화유단백질 샘플과 matrix인 2,5 - Dihydroxyacetophenone (2,5-DHAP)를 1:1로 섞어 groud steel plate에 분주하여 MALDI-TOF/MS로 분석하였음.
- MALDI-TOF/MS 분석 조건은 LP 5-20 Kda (Total shots 1000 이상, Each Shot 200)을 사용하였음.

(바) 인체 세포주를 이용한 tight junction 강화 효과 검증과 염증 개선 및 뇌기능 저하 개선 관련 확인 (*in vitro*)

- Caco-2 cell은 열 비활성화된 10% FBS, penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin(100 mg/ml)이 첨가된 DMEM high glucose(Hyclone)배지를 이용하여 5% CO₂존재 하에 37 °C에서 배양시키고 격일로 배지를 교환하였음. Caco-2 cell을 6 well에 5 x10⁵ cell/ml로, 96 well에는 1.5 x 10⁶ cell/ml로 각각 seeding후, 배지를 suction한 뒤에 발효당화유단백질을 농도별로 처리하였음.
- MTT 실험은 먼저 발효당화유단백질을 0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL, 1.5mg/mL, 2mg/mL 로 제조하였음. 발효당화유단백질 처리 후 배지를 suction 한 후, LPS를 well에 분주하여 배양하였음. 배양 후 MTT 용액을 96 well에 분

주하고 incubation 하였음. 그 다음 DMSO를 분주하고 incubation 하고 575nm에서 흡광도를 측정하였음.

- Caco-2 cell의 qRT-PCR 분석 방법은 다음과 같음. monolayer를 형성한 6 well 10 plate의 배지를 모두 suction하고 발효당화유단백질을 분주하였음. 배양 후 LPS treatment 후에 발효당화유단백질을 통해 qRT-PCR 분석 실험을 진행하였음. 투여 후 RNA extraction을 진행하였고 Trizol을 이용하였음. Nanodrop spectrophotometer를 이용하여 농도 측정하였고 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems)를 이용하여 cDNA 합성한 뒤, SYBR Fast qPCR kit(Kappa Biosystem)를 이용하여 PCR 실험을 진행하였음. 각 유전자의 mRNA 발현 정도는 housekeeping gene인 GAPDH의 발현량으로 보정하였음. Real Time PCR(RT-PCR)에 사용되는 Primer set는 아래 표와 같음(표 2-6).

표 2-6. Oligonucleotide primer sequences (Caco-2 cell)

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Tm
ZO-1	CAACATACAGTGACGCTTCACA	CACTATTGACGTTTCCCCACTC	64.4
Occludin	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT	64.4
Claudin-1	TCTGGCTATTTTAGTTGCCACAG	AGAGAGCCTGACCAAATTCGT	63.2
TLR-4	CTGGAAATATGACCACAGTCAGAA	TCAATCACCTAGACCTGCTCAA	58.3
IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC	54.0
MCP-1(CCL2)	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT	64.4
IκBα	ACCTGGTGTCACTCCTGTTGA	CTGCTGCTGTATCCGGGTG	54.7
p65	GTGGGGACTACGACCTGAATG	GGGGCACGATTGTCAAAGATG	63.2
GAPDH	CTGACTTCAACAGCGACACC	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC	52.7

(사) 인체 세포주를 이용한 뇌기능 저하 개선 관련 Protein과 marker 확인 (*in vitro*)

- SH-SY5Y cell은 MEM/EBSS 배지와 Nutrient mixture(F-12 HAM'S(1X))를 합하여 하나의 배지를 제조한 뒤 열 비활성화된 10% FBS, 1% penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin (100 mg/ml)이 첨가한 배지를 cell 배양에 이용하였음. 5% CO2존재하에 37 °C에서 배양시키고 격일로 배지를 교환하였음. SH-SY5Y cell을 6 well에 5x 10⁵ cell/ml로, 96 well에는 1.5 x 10⁶ cell/ml로 각각 seeding후 배지를 suction한 뒤에 발효당화유단백질을 처리해줌.
- SH-SY5Y cell의 MTT 실험은 발효당화유단백질을 0.125mg/mL, 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 1mg/mL, 1.5mg/mL, 2mg/mL로 맞추어 cell에 처리해줌. 발효당화유단백질 처리 후 MTT 용액을 처리한 뒤 incubation 해줌. DMSO를 각 well에 처리하고 incubation 해준 뒤 575nm에서 흡광도를 측정하였음.
- SH-SY5Y cell의 qRT-PCR 분석은 우선 seeding한 plate에 배지를 suction한 후 발효당화유단백질을 분주함. 총 8가지 발효당화유단백질을 suction하고 이를 통해 나타나는

Real time PCR 분석 실험을 진행하였음. 발효당화유단백질 투여 후 RNA extraction을 진행하였고 Trizol을 이용하였음.

- Nanodrop spectrophotometer를 이용하여 농도 측정을 하였고 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems)를 이용하여 cDNA 합성한 뒤, SYBR Fast qPCR kit(Kappa Biosystem)를 이용하여 PCR 실험을 진행하였음. 각 유전자의 mRNA 발현 정도는 housekeeping gene인 GAPDH의 발현량으로 보정하였음. Real Time PCR(RT-PCR)에 사용되는 Primer set는 아래 표와 같음(표 2-7).

표 2-7. Oligonucleotide primer sequences (SH-SY5Y cell)

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Tm
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	GCCACTCGGAAAAAGACCTC	52.7
Bcl	ATGAACTCTTCCGGGATGG	TGGATCCAAGGCTCTAGGTG	55.6
Caspase-3	TGGAACAAATGGACCTG	ACCACGGCAGGCCTGA	52.7
NEUROG2	GCAAGCGTGGAAATTTAGGC	GCAATCCTCCCTCCTGATTT	58.0
GAPDH	CTGACTTCAACAGCGACACC	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC	52.7

(2) 연구 결과

(가) 균주 내산성 확인

- 내산성 배지에서 3시간 배양 후 생균수가 감소하지 않거나 0.5 log 미만 감소한 균주들을 산성 조건에서 생장이 저해 받지 않는 우수한 내산성을 가진 균주로 선발하였음(그림 2-1).

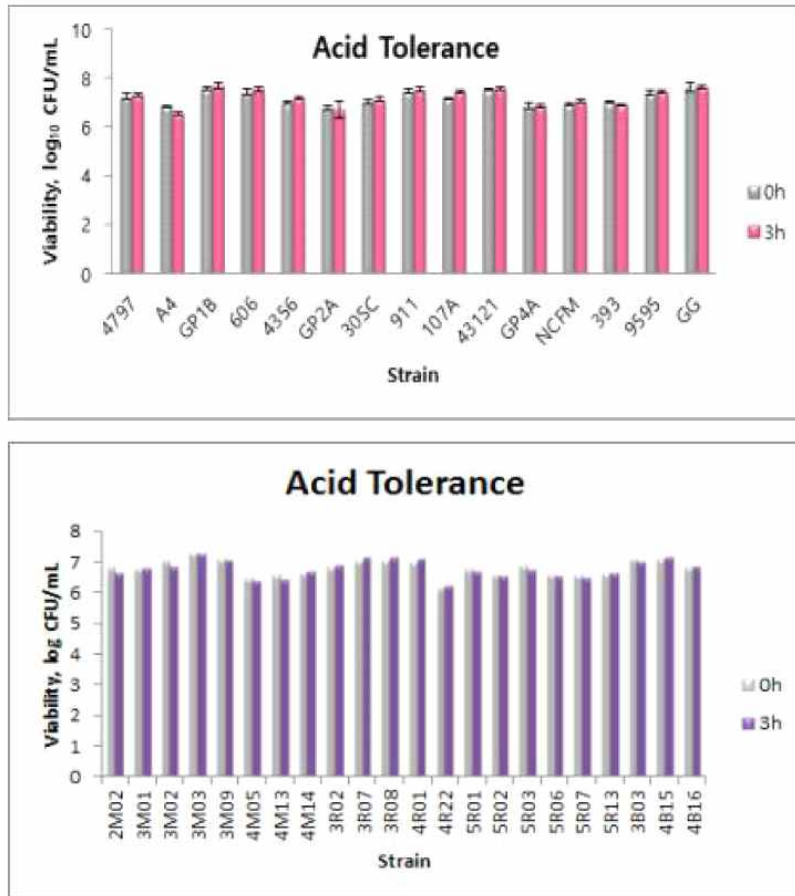


그림 2-1. 내산성 선발 결과

(나) 균주 내담성 확인

- 실험실에서 보유하고 있는 유산균주를 대상으로 내담 배지에서 24시간 배양 후 생균수가 증가하거나 2 log 미만으로 감소했을 때, 내담성이 우수한 균주로 선발하였으며, 결과는 그림 2-2와 같음.
- 최종적으로 내산성과 내담성이 우수한 37개의 유산균주를 선발하였음.

(다) 균주 Gelatinase 생성 확인

- Gelatinase 생성 실험은 내산성 및 내담성 확인 실험에서 우수한 균주로 선발된 15 균주들을 대상으로 실험을 진행하였으며 결과는 아래와 같음(표 2-8).
- Gelatinase 생성 확인 실험에서는 37°C, 48시간 배양하고 2~8°C의 냉장고에서 냉장 보관한 뒤 고체상태를 나타내는 배지의 균주를 세균 액화요소 Gelatinase를 생성하지 않는 식이 안전성이 검증된 균주로 선발하였음.
- 앞서 선발한 우수한 내산성, 내담성을 가진 37 균주가 모두 Gelatinase를 생성하지 않아 안전성이 있는 것으로 확인되어 37균주를 모두 선발하였음.

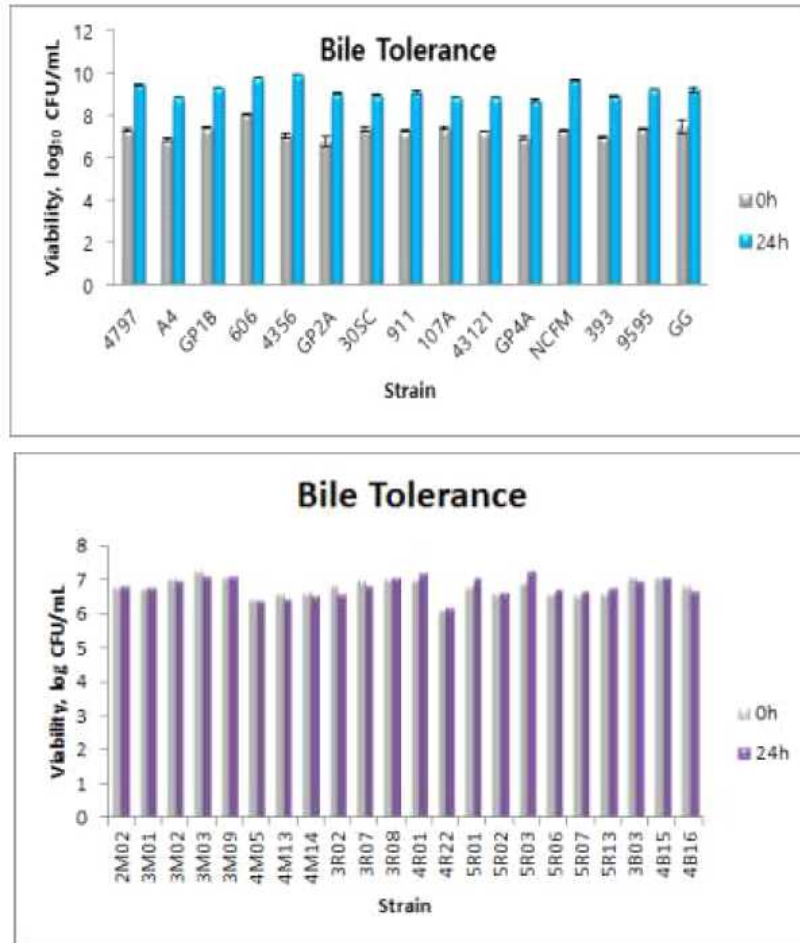


그림 2-2. 내담성 선발 결과

(라) 균주 Urease 생성 확인

- Urease 배지에서 48시간 배양 후 배지의 색이 붉은색으로 변하지 않는 배지의 균주를 암모니아를 형성하는 Urease를 생성하지 않는 안전성을 가진 균주로 선발하였음 (표 2-9).
- 앞에서 선발한 우수한 내산성, 내담성을 가진 37균주가 모두 Urease를 생성하지 않아 안전성이 있는 것으로 확인되어 37 균주를 모두 선발하였음.

표 2-8. Gelatinase 생성 확인 선발 결과

Strain	Gelatinase test
4797	-
A4	-
GP1B	-
606	-
4356	-
GP2A	-
305C	-
911	-
107A	-
43121	-
GP4A	-
NCFM	-
393	-
9595	-
GG	-
2M02	-
3M01	-
3M02	-
3M03	-
3M09	-
4M05	-
4M13	-
4M14	-
3R02	-
3R07	-
3R08	-
4R01	-
4R22	-
5R01	-
5R02	-
5R03	-
5R06	-
5R07	-
5R13	-
3B03	-
4B15	-
4B16	-

표 2-9. Urease 생성 확인 선발 결과

Strain	Urease test
4797	-
A4	-
GP1B	-
606	-
4356	-
GP2A	-
305C	-
911	-
107A	-
43121	-
GP4A	-
NCFM	-
393	-
9595	-
GG	-
2M02	-
3M01	-
3M02	-
3M03	-
3M09	-
4M05	-
4M13	-
4M14	-
3R02	-
3R07	-
3R08	-
4R01	-
4R22	-
5R01	-
5R02	-
5R03	-
5R06	-
5R07	-
5R13	-
3B03	-
4B15	-
4B16	-

(마) 균주 장 부착능 확인

- 내산성 및 내담성 확인 실험과 안전성 실험에서 우수한 균주로 선발된 37개의 유산균주를 대상으로 장 부착능 확인 실험을 진행하였으며 결과는 아래와 같음 (그림2-3).
- 선발제의 균주 그래프에서 비교를 위해 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 포함하였음.
- 세포에 균주를 접종하고 0시간, 2시간 후 세포에 부착한 균수를 측정하여 37°C, 48시간 배양한 뒤 (세포에 균주 접종 후 2시간 후 생균수/0시간 후 생균수)*100 를 계산하여 positive control로 사용된 GG 균과 그 결과가 비슷하거나 그 이상의 부착능을 나타내는 *L. acidophilus* 4356, 911, 606, NCFM, GP1B, 107A, A4, GP2A, *L. casei* 393, 4B15, *L. rhamnosus* GG, 3M01, 3R07, 3R08, *L. gasseri* 5R13, 4R22, 4M13, 5R02, *L. reuteri* 3M02, 3M03 총 20 균주를 선발하였음.

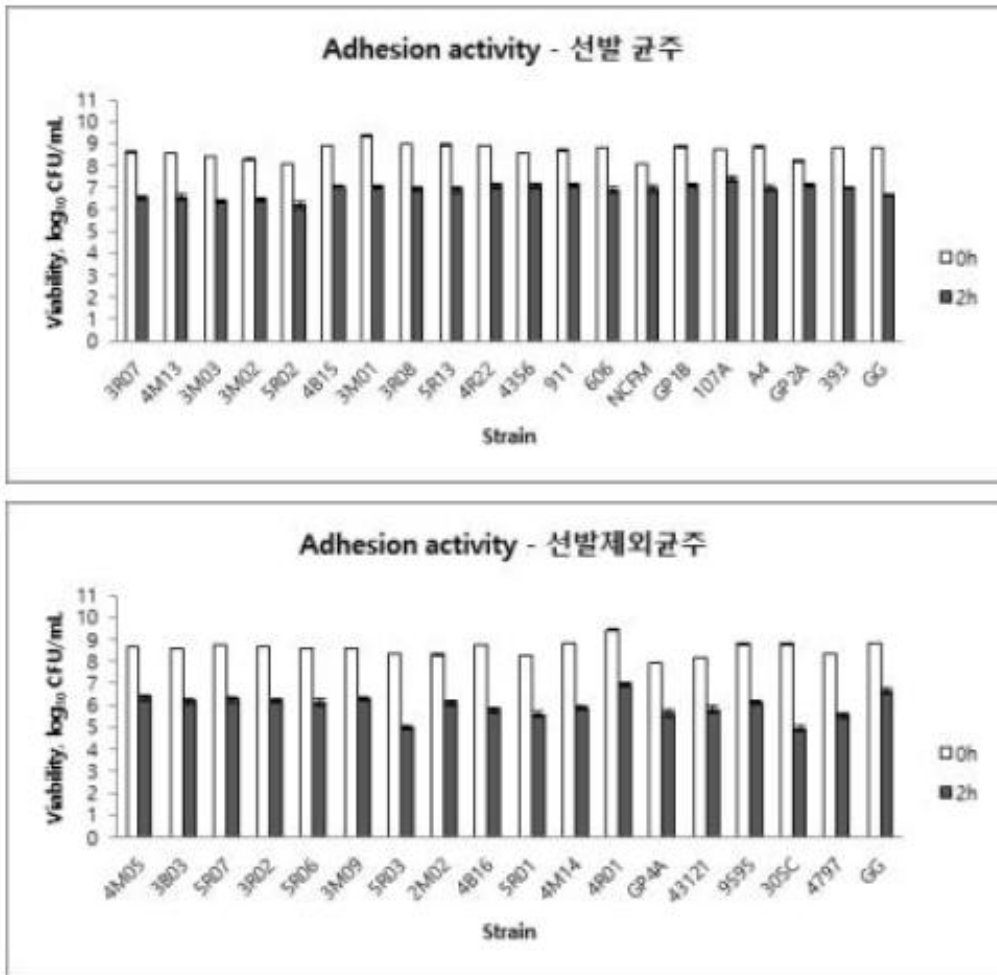


그림 2-3. 균주 장 부착능 선발 결과

(바) 유단백질 분해 활성 확인

① 흡광도 측정

- Sodium caseinate와 Whey protein isolate가 각 포함된 2가지 유단백질 배지에 균 현탁액을 1%씩 접종하고 48 시간동안 배양 후, 배양을 시작한 0 시간과 48 시간 이후의 OPA반응의 흡광도를 측정하여, 값의 차이를 확인하였으며 결과는 아래와 같음.(그림 2-4, 5)

- 0시간과 48시간 흡광도 변화 결과, WPI의 경우 0.44 정도가 증가폭이 가장 높은 폭으로 나타났고 (그림 2-4), SC의 경우에는 0.29 정도가 가장 높은 증가 폭으로 나타났음 (그림 2-5).

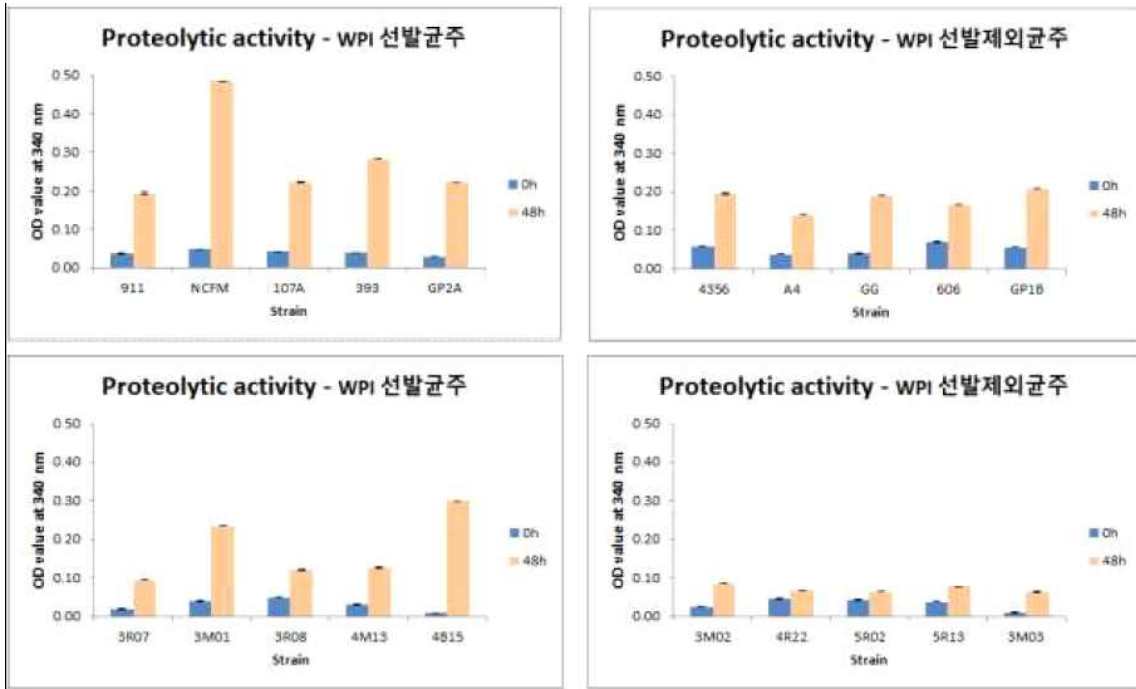


그림 2-4. WPI 분해 활성 선발 결과

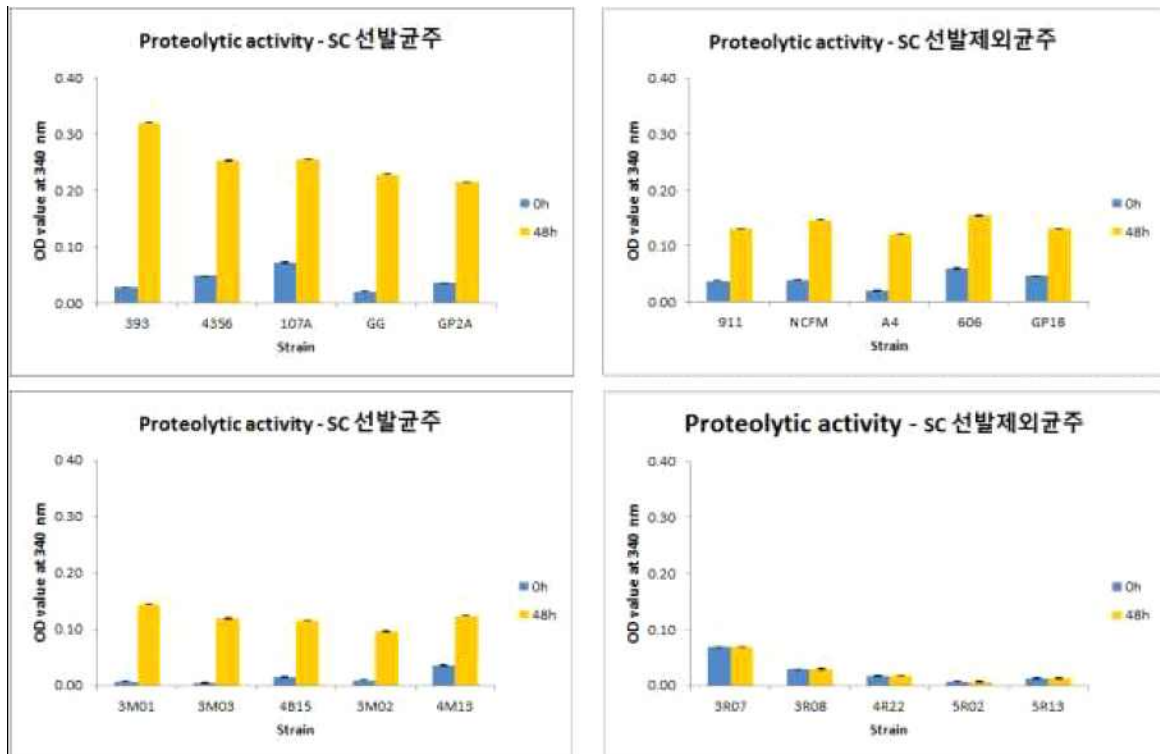


그림 2-5. Casein 분해 활성 선발 결과

② Prptase activity unit

- 흡광도의 증가 수치를 단백질 분해효소인 protease를 WPI, SC와 0 activity unit/mL

~1 activity unit/mL 까지 반응시켜서 직선의 검량 곡선을 작성한 후 (그림 2-6, 7), 해당 검량곡선을 토대로 흡광도의 증가 값을 Protease의 activity unit/mL로 변환하였음.

- 균의 유단백질 분해 활성을 흡광도 값의 증가와 protease의 activity unit으로 변환한 결과를 정리하여 상위 10개의 균주의 값을 수치로 나타낸 결과는 아래 표와 같음 (표 2-10)

- 균의 유단백질 분해 활성을 흡광도 값의 증가와 protease의 activity unit으로 변환한 결과를 정리하여 유단백질당 상위 10개의 균주를 선발하였음. WPI 배지에서는 911, NCFM, 107A, 393, GP2A, 3R07, 3M01, 3R08, 4B15, 4M13 균주와 SC 배지에서는 4356, 107A, GG, 393, GP2A, 3M02, 3M01, 3M03, 4B15, 4M13 균주를 선발하였음.

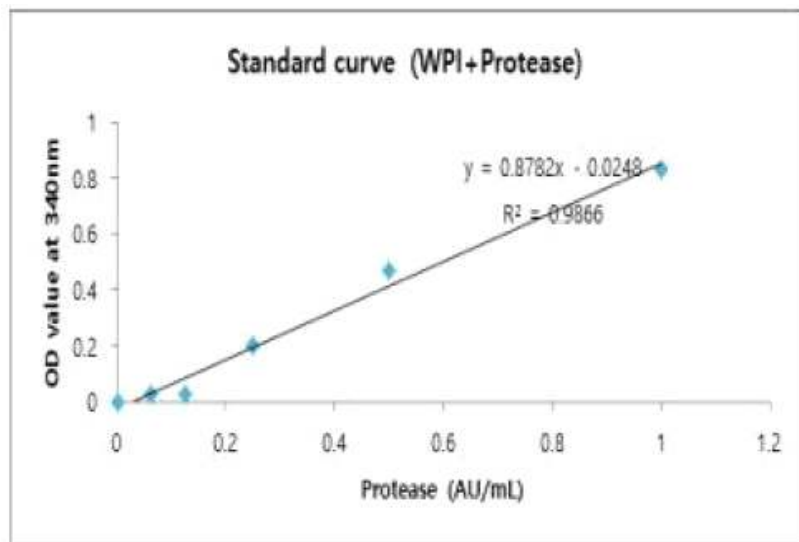


그림 2-6. Protease와 유단백(WPI)의 반응 검량곡선

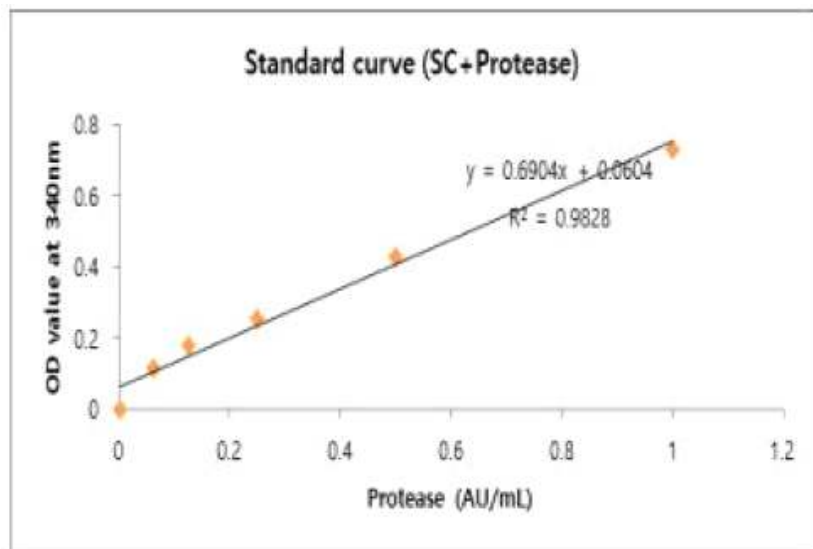


그림 2-7. Protease와 유단백(SC)의 반응 검량곡선

표 2-10. 유단백질 분해 활성 선발 결과 (WPI, SC)

WPI 배지 (3%)				
Strain	O.D 340nm		O.D 변화값	AU 변환 (AU/ml)
	0 HR	48 HR		
911	0.0368	0.1922	0.1555	0.2052
NCFM	0.0478	0.4840	0.4362	0.5249
107A	0.0416	0.2228	0.1812	0.2345
393	0.0386	0.2835	0.2448	0.3070
GP2A	0.0291	0.2209	0.1917	0.2465
3R07	0.0192	0.0942	0.0750	0.1136
3M01	0.0401	0.2344	0.1943	0.2495
3R08	0.0503	0.1205	0.0703	0.1082
4B15	0.0095	0.2991	0.2896	0.3580
4M13	0.0310	0.1256	0.0946	0.1360

SC 배지 (3%)				
Strain	O.D 340nm		O.D 변화값	AU 변환 (AU/ml)
	0 HR	48 HR		
4356	0.0477	0.2524	0.2047	0.2090
107A	0.0720	0.2550	0.1830	0.1776
GG	0.0195	0.2283	0.2088	0.2149
393	0.0266	0.3197	0.2932	0.3371
GP2A	0.0347	0.2142	0.1796	0.1726
3M02	0.0089	0.0952	0.0863	0.0375
3M01	0.0070	0.1446	0.1376	0.1118
3M03	0.0046	0.1184	0.1137	0.0772
4B15	0.0145	0.1154	0.1009	0.0586
4M13	0.0356	0.1241	0.0885	0.0407

(사) 당화유단백질 발효 균주의 선별을 위한 당화유단백질 발효능 확인

① 발효 당화유단백질 제조

- 유단백질 분해활성에서 선발된 균주를 대상으로 발효당화유단백질을 제조하였음. 발효당화유단백질은 발효배지의 배합비인 당화유단백질 : 당 = 2:1의 비율에 맞추어 각 당화유단백질에 해당되는 당을 추가로 넣어 배지를 제조하고, 선발된 균주로 1% 접종하여 37℃에서 48시간 배양하였음. 배지 종류와 조성은 아래 표와 같음(표 2-11).

② 발효당화유단백질 발효능 확인

- 유단백질 분해활성 실험에서 선발된 균주를 대상으로 4가지 발효당화유단백질 배지 제조를 진행하여 1% 접종 후 37℃에서 0시간, 24시간, 48시간 배양하였음.
 - Peptone수를 이용하여 0시간, 24시간, 48시간 배양한 발효물을 연속희석법으로 MRS agar 배지에 평판 도말하고 생균수를 측정하였으며, 발효당화유단백질의 이용능을 확인하기 위해 pH를 측정하였음(그림 2-8, 9, 10, 11).
 - 배양 후 pH가 4.0 수준으로 감소하거나 균의 생장이 가장 좋은 상위 균주인 4B15와

4M13 두 균주의 8가지 발효물을 제조 샘플 대상으로 선발하였음.

표 2-11. 발효당화유단백질 배지 조성

당화유단백질 Ingredient	Gram / 100ml
Gw-Glc	5
Glucose	2.43
Gw-Gal	5
Galactose	2.38
Gc-Glc	5.2
Glucose	2.35
Gc-Gal	5
Galactose	2.31

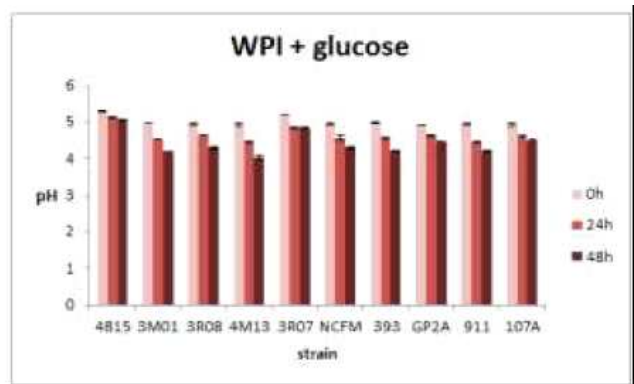
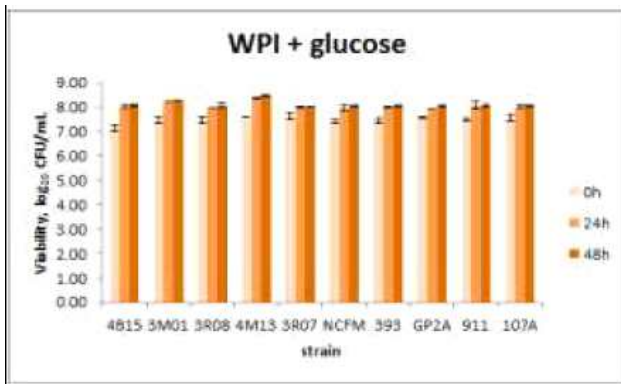


그림 2-8. Gw-Glc 발효물의 생균수와 pH 측정 결과

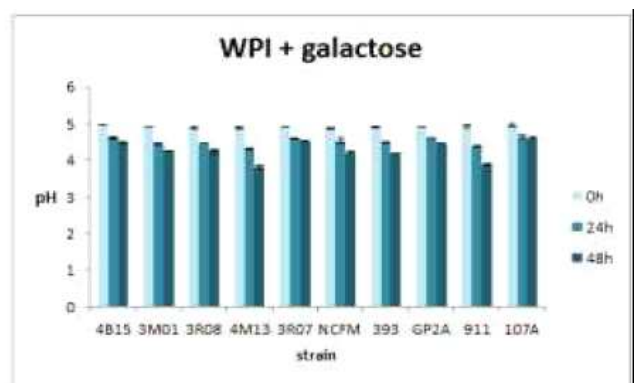
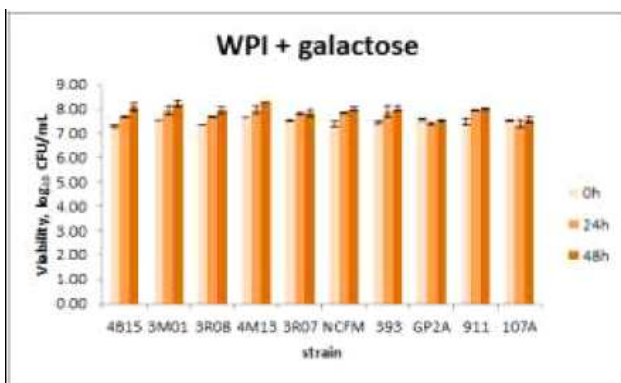


그림 2-9. Gw-Gal 발효물의 생균수와 pH 측정 결과

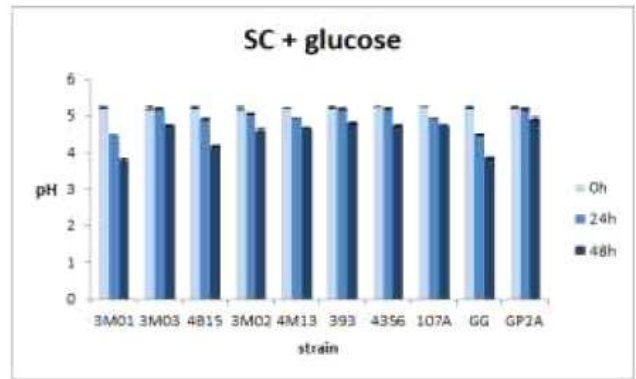
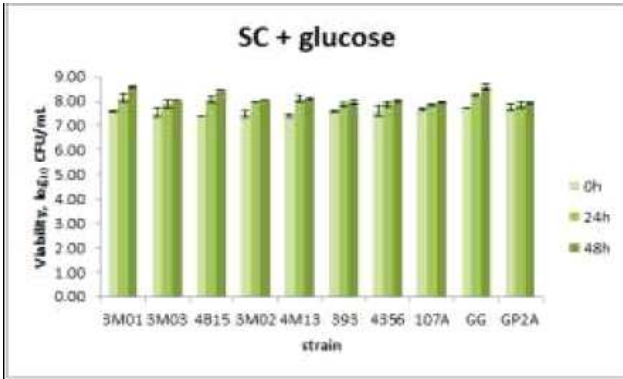


그림 2-10. Gc-Glc 발효물의 생균수와 pH 측정 결과

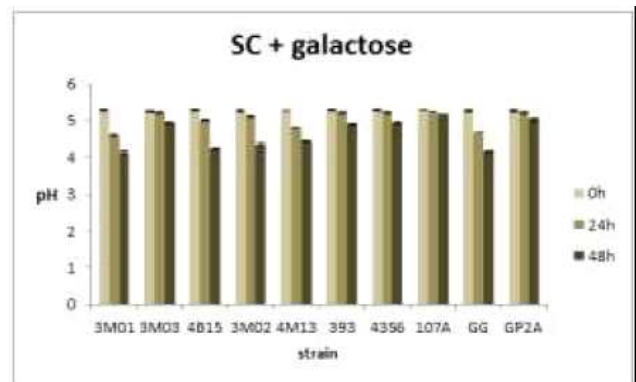
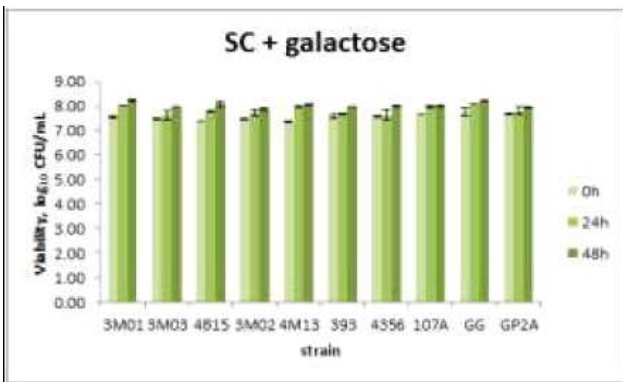


그림 2-11. Gc-Gal 발효물의 생균수와 pH 측정 결과

(아) 당화유단백질의 proteomics를 위한 MALDI-TOF/MS를 통한 mass shift 확인

- MALDI-TOF/MS를 이용하여 당화반응에 의한 단백질 mass shift를 확인한 결과는 그림 2-12에 나타내었음.
- 당화반응 후 casein과 WPI에서 검출된 피크의 mass값이 전체적으로 증가한 것을 확인하였음.
- Casein 유래 당화반응유단백질 chromatogram의 경우, κ -CN (19,000 Da), α S1-CN (23,000 Da), β -CN (24,033 Da)에서 mass shift가 일어난 것을 확인하였음.
- WPI 유래 당화반응유단백질 chromatogram의 경우, α -LA (14,178 Da)과 β -LG (18,400 Da)에서 mass shift가 일어난 것을 확인하였음.

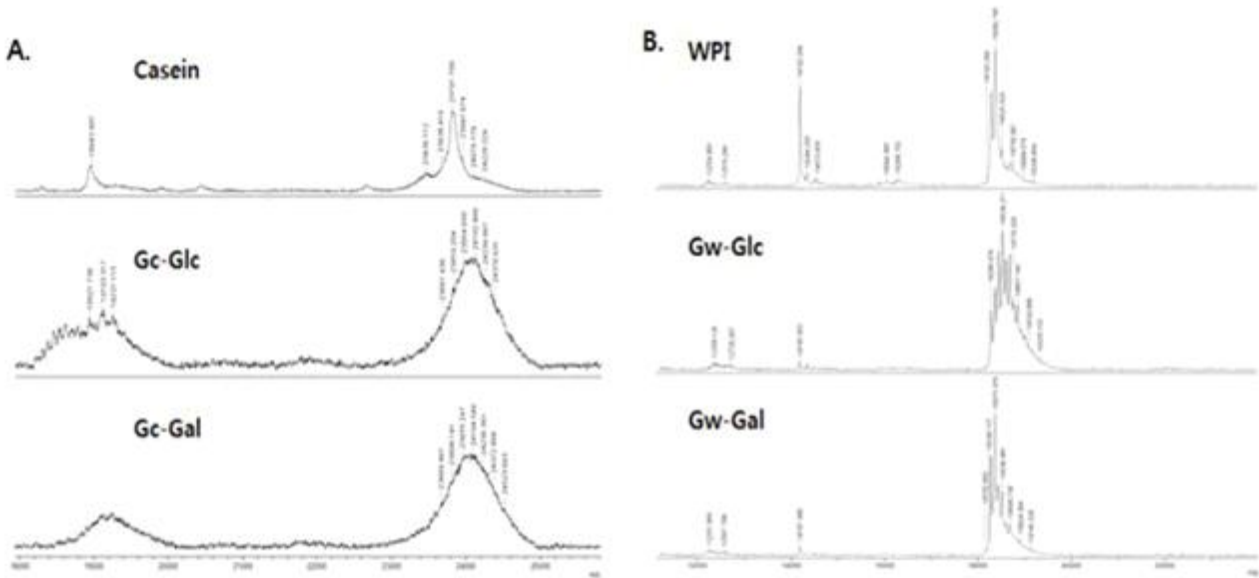


그림 2-12. 당화유단백질의 mass shift chromatogram
 (A) casein 유래 당화유단백질, (B) WPI 유래 당화유단백질

(자) 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 목적 발효 당화유단백질 제조

- 선발된 상위 2균주의 발효 당화유단백질 8가지를 10,000 rpm, 4°C에서 원심분리하여 균체를 제거하고 배양한 상등액을 동결건조, 분말화하여 샘플을 제조하였음.

(차) 인체 세포주를 이용한 Tight junction 강화 효과 검증 및 염증 개선 확인 (*in vitro*)

- Gw-Glc 4B15 MTT 결과, 샘플의 농도가 높아질수록 증가하다가 0.5mg/ml을 기준으로 감소하였음. 대조군의 경우 대체적으로 농도에 기반하여 수치가 증가하는 경향을 나타냄 (그림 2-13). Gw-Glc 4M13 MTT 결과, 샘플과 대조군 샘플 모두 농도가 증가할수록 수치가 증가함을 나타내었음(그림 2-14). Gw-Gal 4B15 MTT 결과, 샘플에서는 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보였으나 대조군에서는 농도에 기반하여 값이 증가함을 볼 수 있었음(그림 2-15). Gw-Gal 4M13 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도가 올라갈수록 proliferation %가 증가함을 볼 수 있었음(그림 2-16).

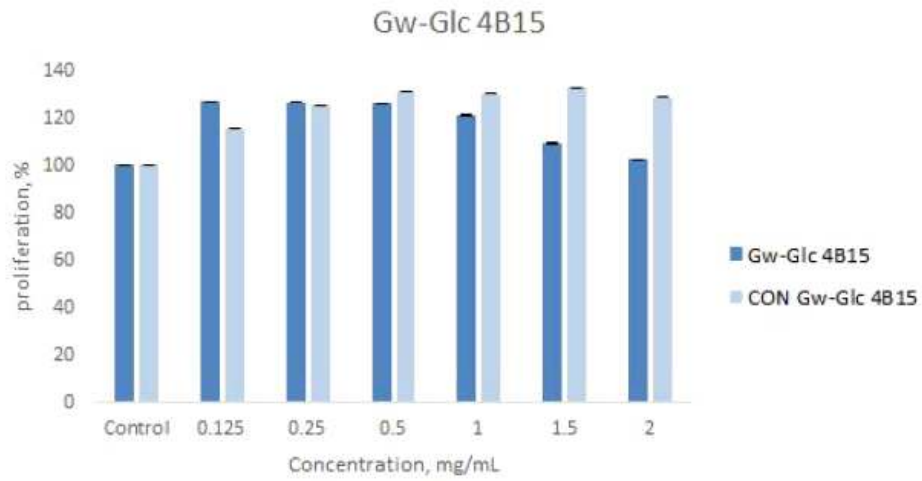


그림 2-13. Gw-Glc 4B15 MTT 결과

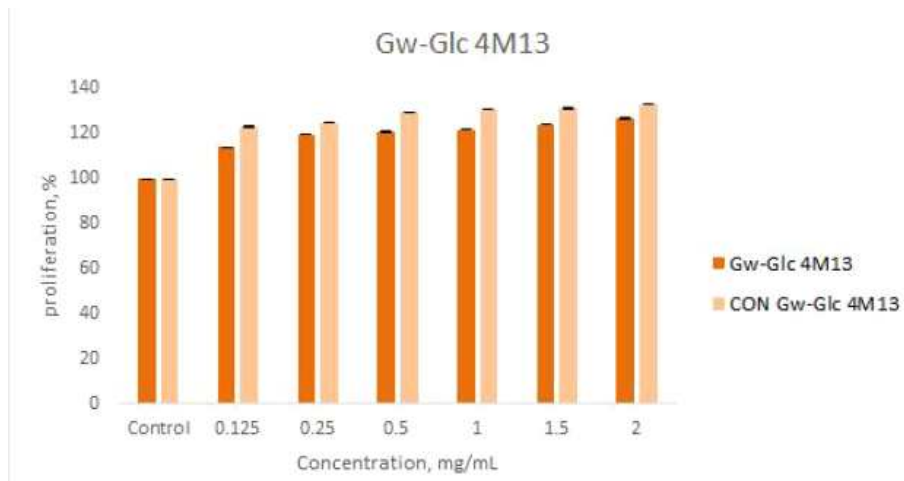


그림 2-14. Gw-Glc 4M13 MTT 결과

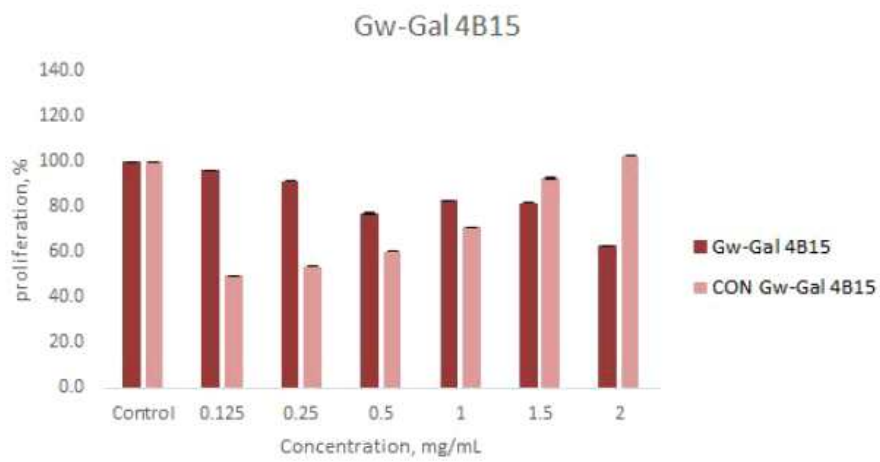


그림 2-15. Gw-Gal 4B15 MTT 결과



그림 2-16. Gw-Gal 4M13 MTT 결과

- Gc-Glc 4B15 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도에 따라 값도 증가하였음(그림 2-17). Gc-Glc 4M13 MTT 결과, 샘플에서는 0.25mg/ml을 전후로 증가하다가 감소하였으며, 대조군에서는 전체적으로 적은 차이를 보이면서 계속 증가하였음(그림 2-18). Gc-Gal 4B15 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도가 증가할수록 값도 증가하다가 1mg/ml를 기점으로 해서 조금씩 감소하였음(그림 2-19). Gc-Gal 4M13 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 0.5mg/ml를 기준으로 하여 증가하다가 감소함을 나타내었음(그림 2-20).

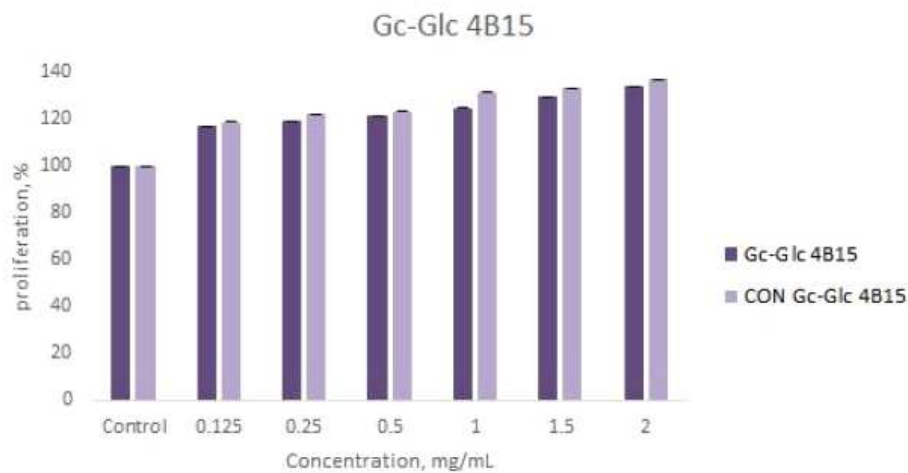


그림 2-17. Gc-Glc 4B15 MTT 결과

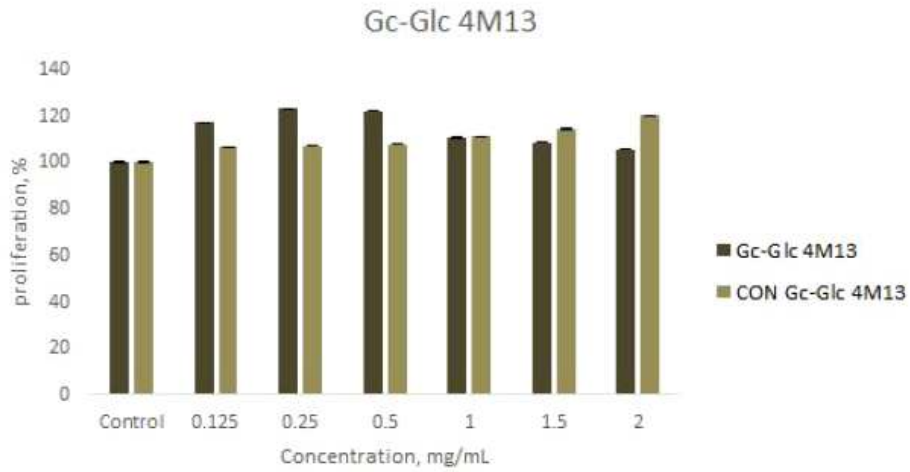


그림 2-18. Gc-Glc 4M13 MTT 결과

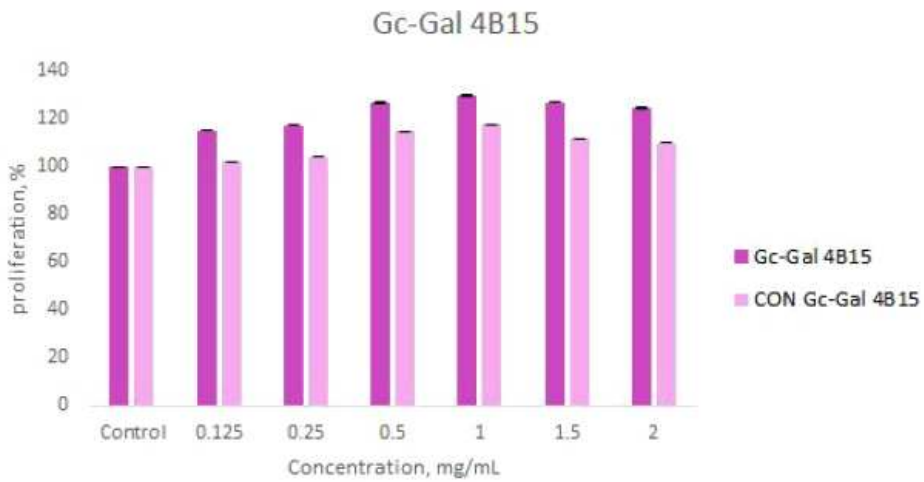


그림 2-19. Gc-Gal 4B15 MTT 결과

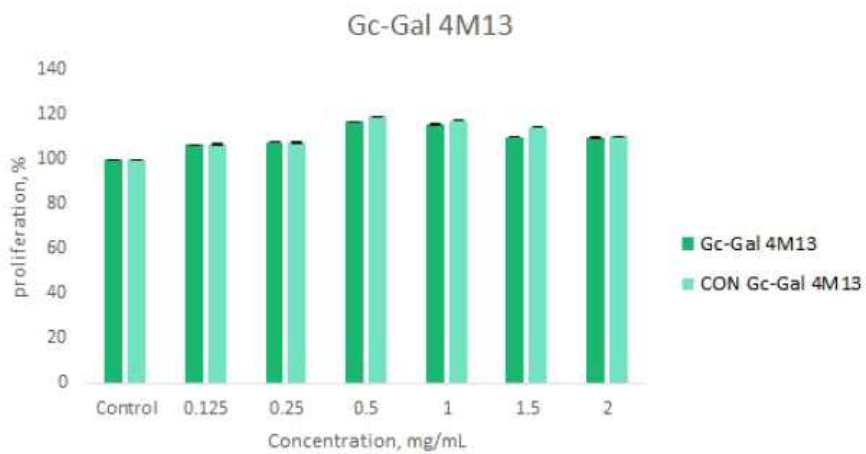


그림 2-20. Gc-Gal 4M13 MTT 결과

- 전체적으로 control인 100% 값에서 최대 120~130%의 값을 나타냈으며, 대조군과 차이를 많이 보이는 것은 Gw-Gal에서 특히 볼 수 있었음. 그 중 Gw-Gal 4M13에서 대조군과 비교 시의 샘플 proliferation %가 특히 높음을 알 수 있었음. proliferation %이 높을수록 cancer cell에 있어서 좋지 않은 현상이므로 다음으로 진행하는 RT-PCR에서는 샘플 농도를 0.125mg/ml 0.25mg/ml, 0.5mg/ml 3가지를 선택하여 실험을 진행하였음.

① ZO-1, Claudin-1, Occludin

- RT-PCR 결과 ZO-1 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 ZO-1의 발현량이 증가하는 경향을 보였고 그 중 특히 0.125mg/ml의 Gc-Glc 4M13을 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄(그림 2-21). RT-PCR 결과 claudin-1 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 claudin-1의 발현량이 증가하는 경향을 보였고 그 중 특히 0.5mg/ml의 Gc Glc 4M13을 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄 (그림 2-22). RT-PCR 결과 occludin 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 occludin의 발현량이 증가하는 경향을 보였고 그 중 특히 0.5mg/ml의 Gc Gal 4B15을 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄(그림 2-23).

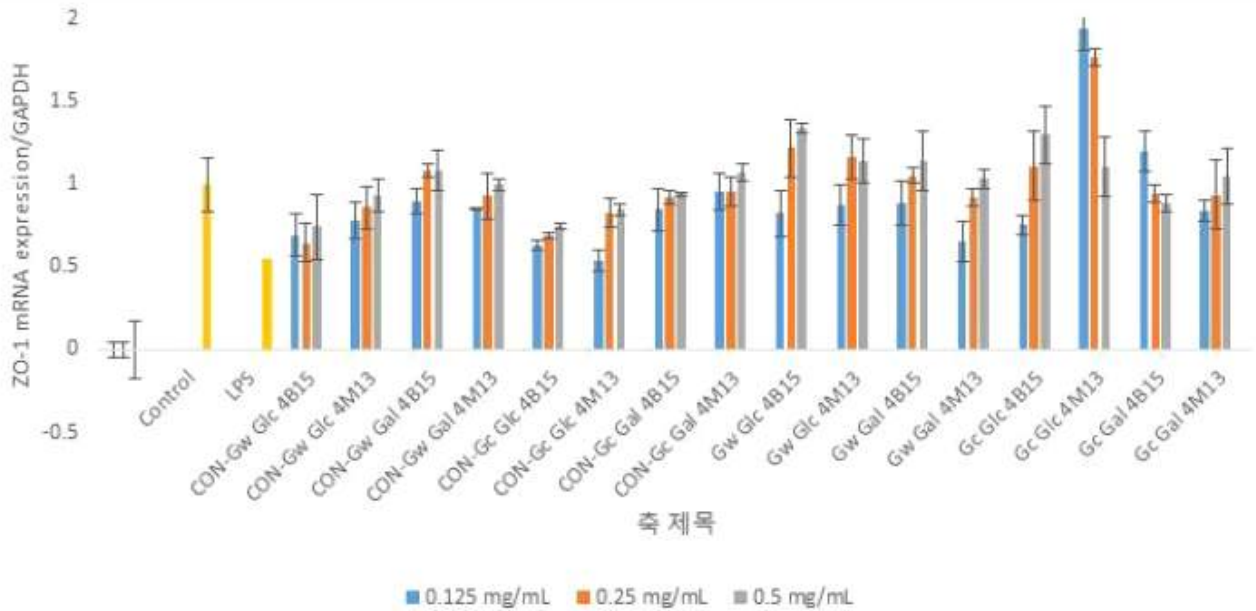


그림 2-21. Caco-2 cell ZO-1 RT-PCR 결과

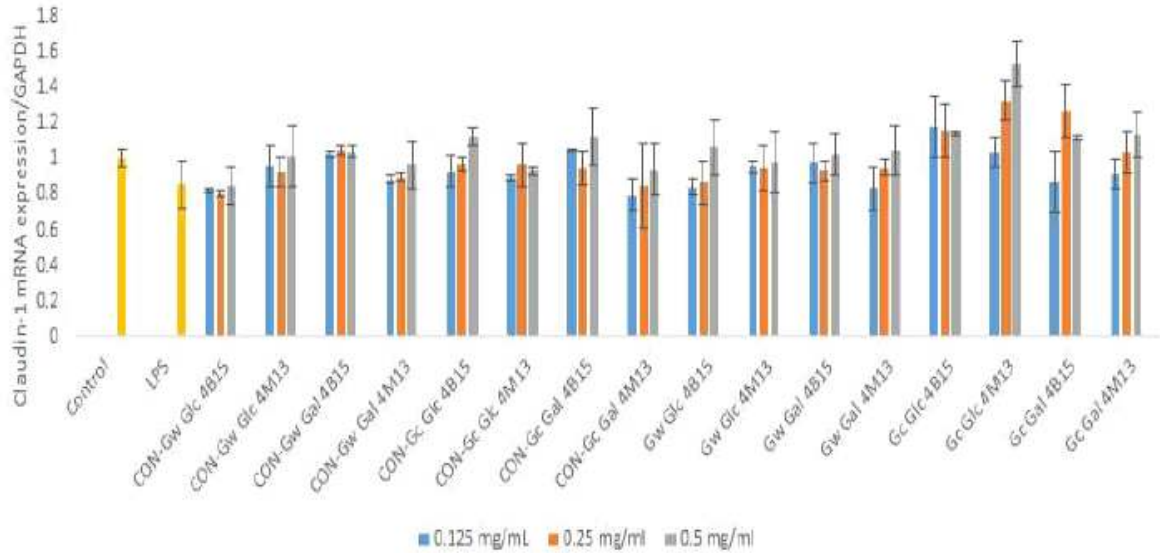


그림 2-22. Caco-2 cell claudin-1 RT-PCR 결과

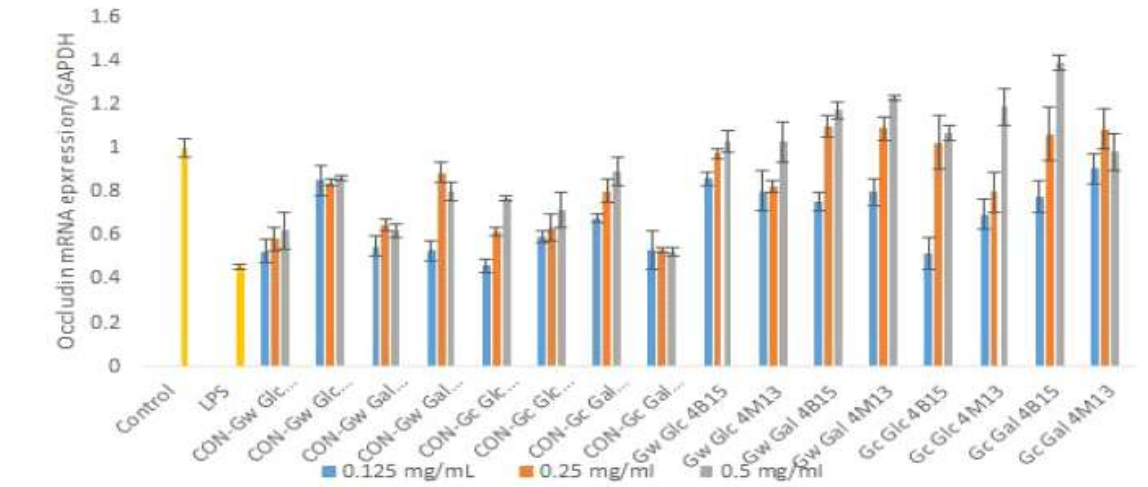


그림 2-23. Caco-2 cell occludin RT-PCR 결과

② MCP-1, TLR-4, IL-8

- RT-PCR 결과 MCP-1 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 MCP-1의 발현량이 감소하는 경향을 보임. 따라서 샘플의 처리는 MCP-1 발현량을 낮추는데 영향을 주는 것으로 나타남(그림 2-24). RT-PCR 결과 TLR4 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 TLR4의 발현량이 감소하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gw Gal 4M13를 처리한 그룹에서 가장 낮은 발현량을 나타냄. 따라서 샘플의 처리는 TLR4 발현량을 낮추는데 영향을 주는 것으로 나타남(그림 2-25). RT-PCR 결과 IL-8 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 IL-8의 발현량이 감소하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gc-Glc 4M13를 처리한 그룹에서 가장 낮은 발현량을 나타냄. 따라서 샘플의 처리는 IL-8 발현량을 낮추는데 영향을 주는 것으로 나타남(그림 2-26).

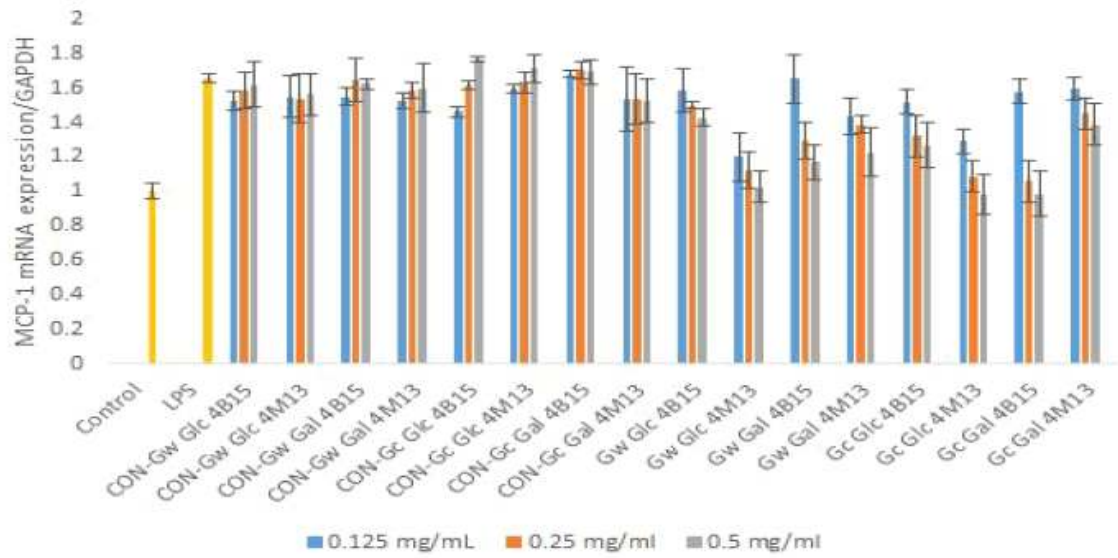


그림 2-24. Caco-2 cell MCP-1 RT-PCR 결과

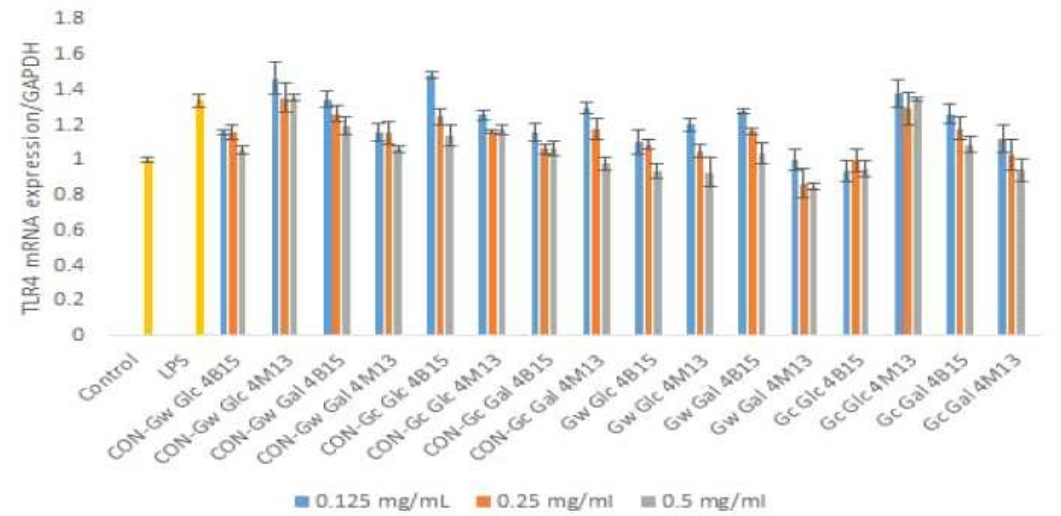


그림 2-25. Caco-2 cell TLR4 RT-PCR 결과

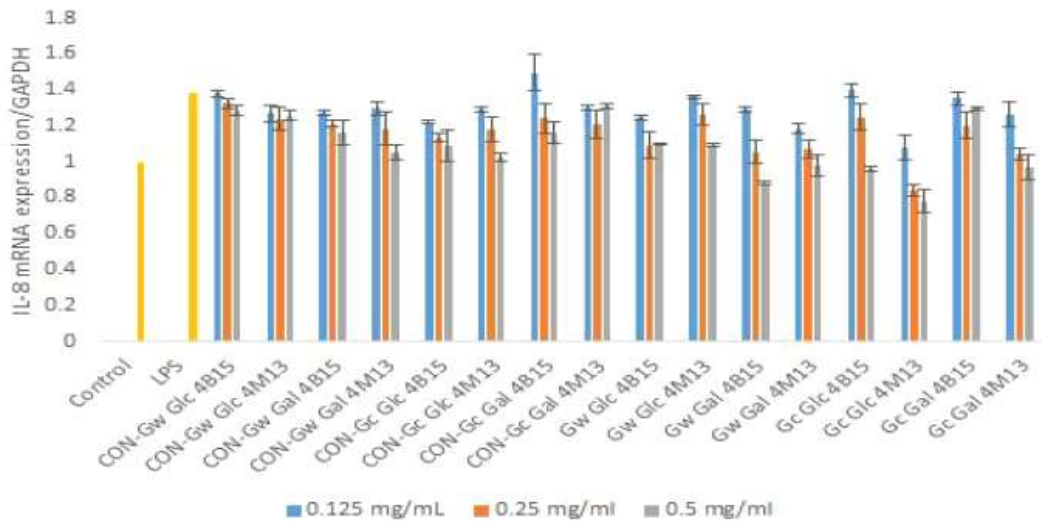


그림 2-26. Caco-2 cell IL-8 RT-PCR 결과

③ IkBa

- RT-PCR 결과 IkBa 실험 결과에서는 LPS 그룹과 대조하였을 때 IkBa의 발현량이 증가하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gw Glc 4M13를 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄. 따라서 샘플의 처리는 IkBa 발현량을 높이는데 영향을 주는 것으로 나타남(그림 2-27).

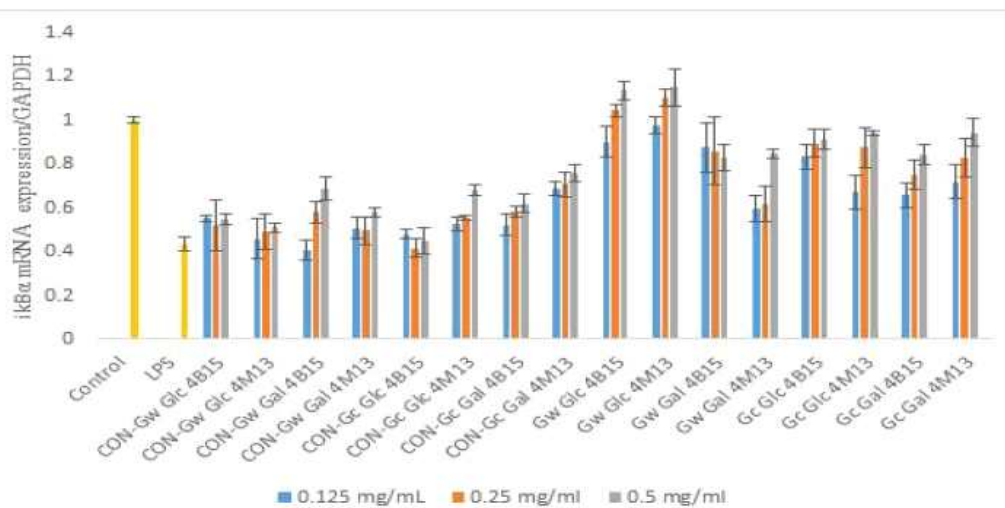


그림 2-27. Caco-2 cell IkBa RT-PCR 결과

- RT-PCR 실험 결과, 샘플의 처리는 Tight junction protein의 발현량을 증가시키는데 영향을 주는 것으로 나타남. 또한 Inflammatory markers의 발현량을 감소시키고 inflammation 억제시키는 Degradation in cytosol의 발현량을 증가시키는데 영향을 주는 것으로 나타남.

(카) 인체 세포주를 이용한 뇌기능 저하 개선 관련 Protein과 marker 확인 (*in vitro*)

- Gw- Glc 4B15 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도가 높아질수록 증가하였음(그림 2-28). Gw- Glc 4M13 MTT 결과, 샘플과 대조군 샘플 모두 농도에 따라 점차 수치가 증가하였음(그림 2-29). Gw- Gal 4B15 MTT 결과, 샘플에서는 농도가 높아질수록 값이 점차 증가하였으며 대조군에서는 0.5mg/ml을 기준으로 하여 증가하다가 감소함을 나타내었음(그림 2-30). Gw- Gal 4M13 MTT 결과, 샘플에서는 농도가 증가함에 따라 값도 증가하였고 대조군에서는 1mg/ml까지는 증가하다가 그 이후로는 점차 감소하였음(그림 2-31).

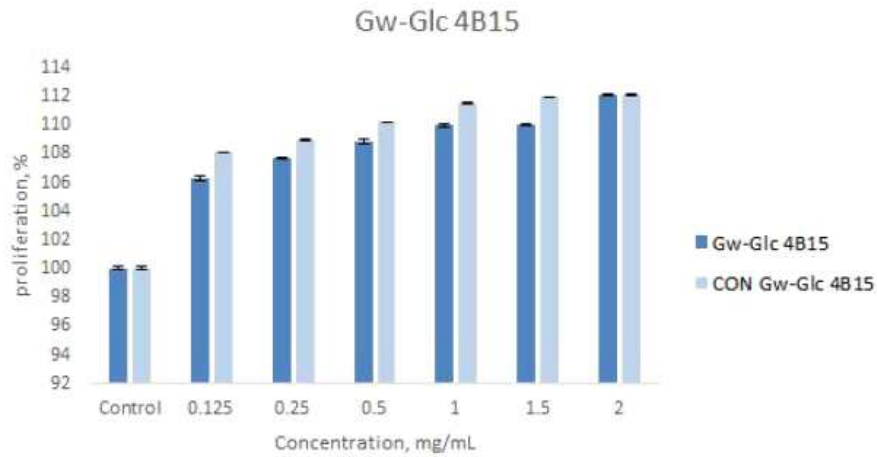


그림 2-28. Gw-Glc 4B15 MTT 결과

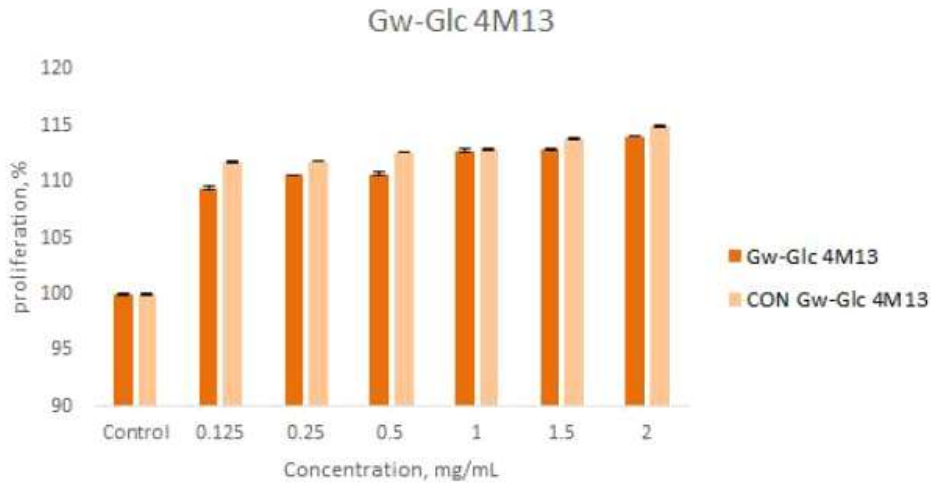


그림 2-29. Gw-Glc 4M13 MTT 결과

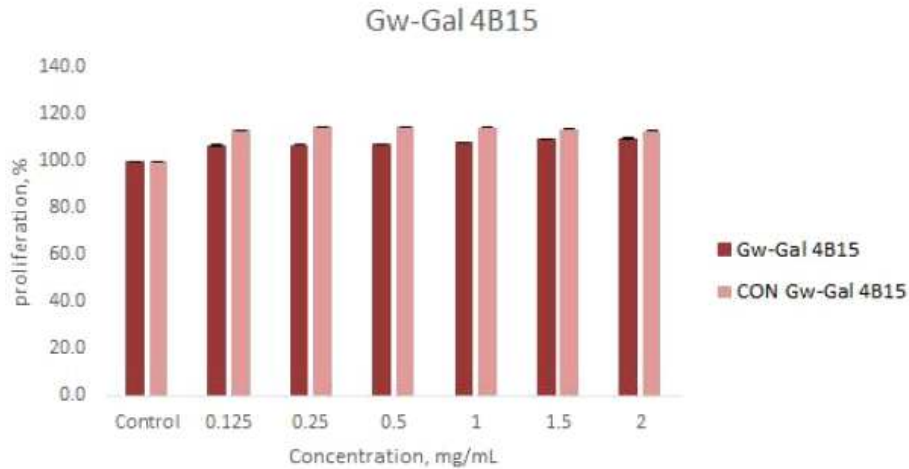


그림 2-30. Gw-Gal 4B15 MTT 결과



그림 2-31. Gw-Gal 4M13 MTT 결과

- Gc- Glc 4B15 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도에 따라 값도 증가하였으며 1.5mg/ml부터는 샘플에서 대조군보다 높은 값을 나타내었음(그림 2-32). Gc- Glc 4M13 MTT 결과, 샘플에서는 농도에 따라 값이 계속 증가하였으며 대조군에서는 1mg/ml 이후부터 점차 감소하였음. 1.5mg/ml 부터 대조군보다 높은 수치를 나타내었음(그림 2-33). Gc- Gal 4B15 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도가 증가할수록 값이 증가하였음. 1mg/ml 부터 대조군보다 높은 수치를 나타내었음(그림 2-34). Gc-Gal 4M13 MTT 결과, 샘플과 대조군 모두 농도에 따라 증가하는 모습을 나타내었음. 가장 높은 값을 나타낼 때 대조군보다 높은 proliferation %를 나타내었음(그림 2-35).

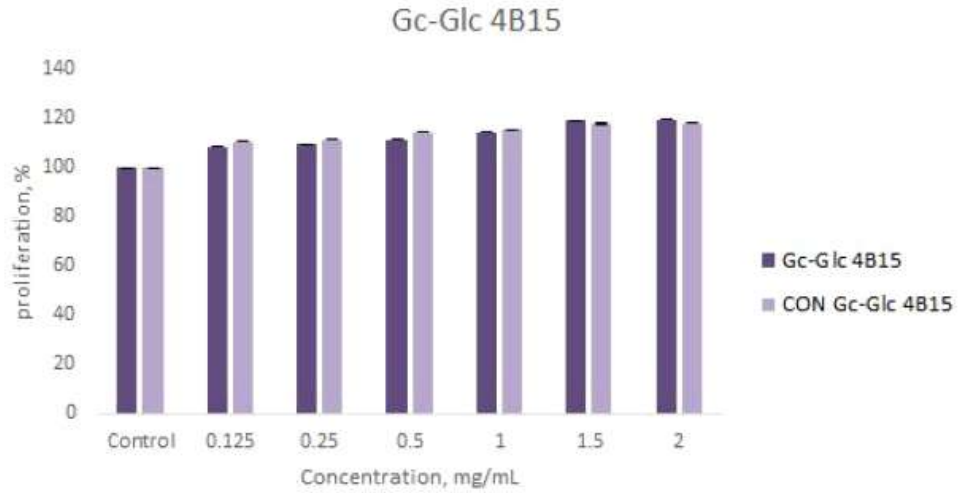


그림 2-32. Gc-Glc 4B15 MTT 결과

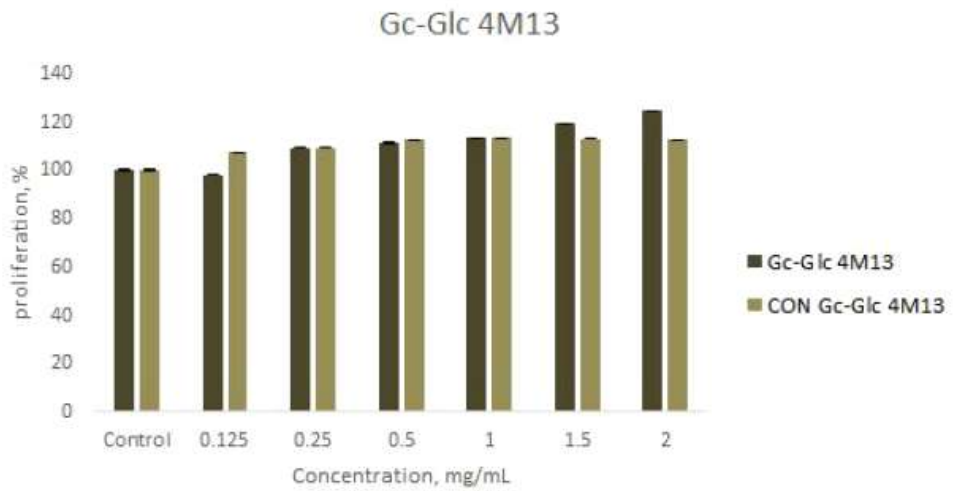


그림 2-33. Gc-Glc 4M13 MTT 결과

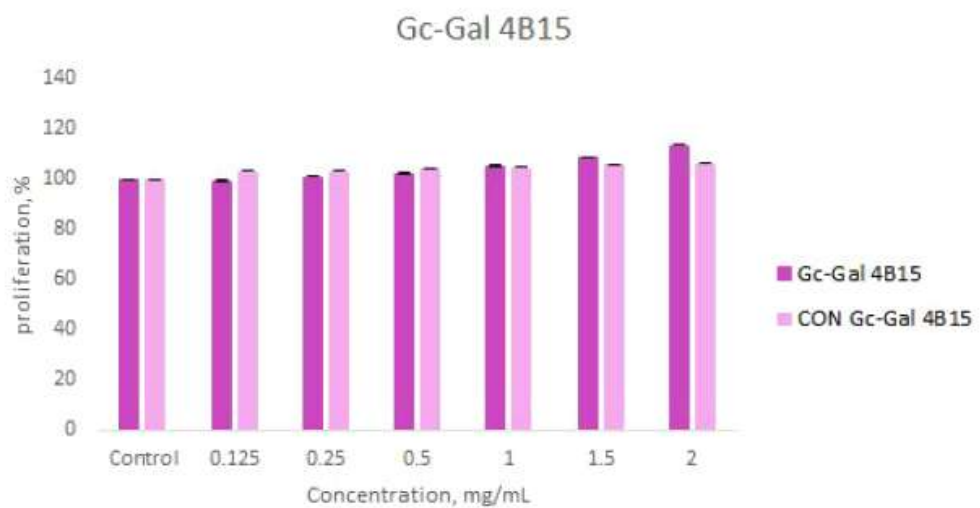


그림 2-34. Gc-Gal 4B15 MTT 결과

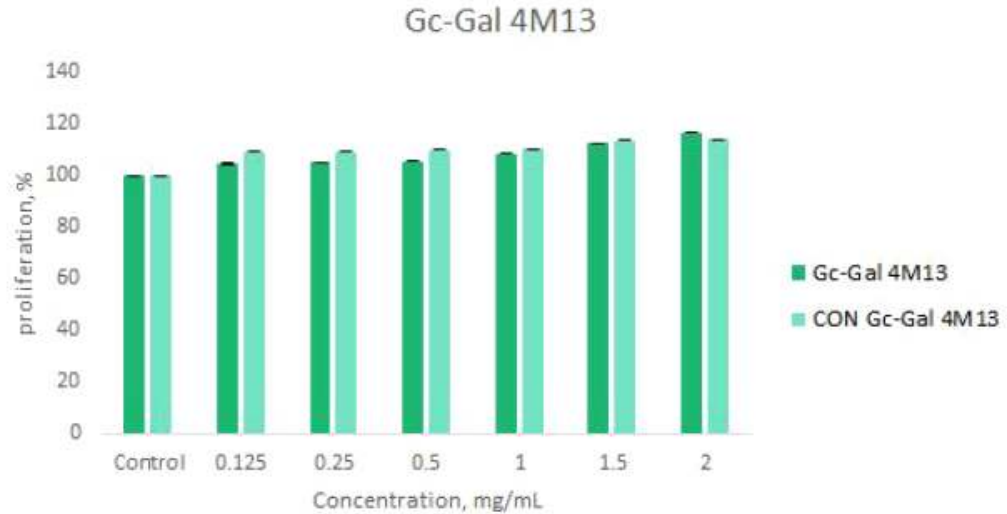


그림 2-35. Gc-Gal 4M13 MTT 결과

- 전체적으로 control인 100%에서 최대 120~130%의 값으로 normal effect를 나타냈으며, 주로 1mg/ml에서 대조군보다 높은 값을 나타내었음. 전체 8가지 샘플 중에서 주로 4M13의 군주로 발효한 샘플값이 더 높았으며 glucose보다 galactose에서 더 높은 수치를 나타내었음.
- Proliferation %의 값이 normal한 현상보다 많이 높을수록 cell의 성장에 있어서 좋지 않은 현상이므로 다음으로 진행하는 RT-PCR에서는 샘플 농도를 0.125mg/ml, 0.25mg/ml, 0.5mg/ml 3가지를 선택하여 실험을 진행하였음.

① BDNF

- RT-PCR 결과 Brain-derived neurotrophic factor(BDNF) 실험 결과에서는 control 그룹과 대조하였을때 BDNF의 발현량이 증가하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gc Glc 4M13를 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄. 따라서 샘플의 처리는 BDNF 발현량을 높이는데 영향을 주는 것으로 나타남 (그림 2-36).
- RT-PCR 실험 결과, 샘플의 처리는 Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)의 발현량을 증가시키는데 영향을 주는 것으로 나타남. 또한 caspase-3과 Bax의 발현량을 증가시키고 bcl의 발현량은 감소시키는데 영향을 주는 것으로 나타남.

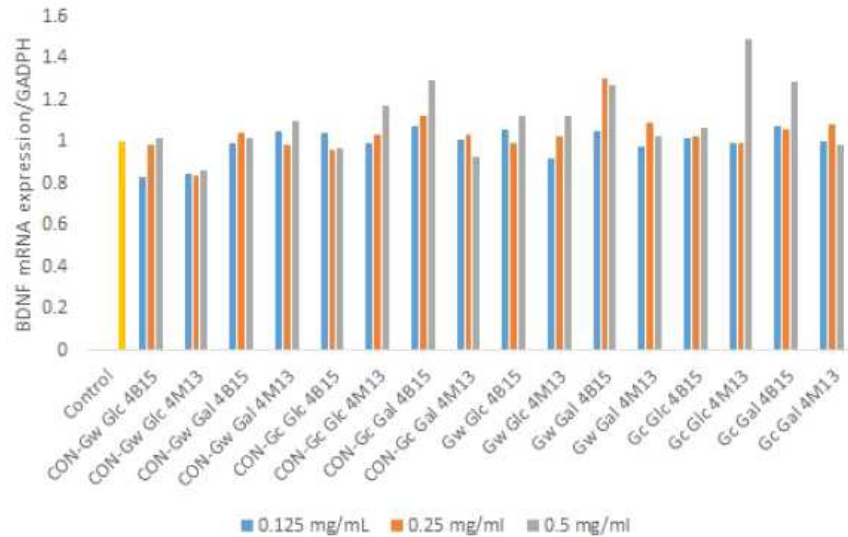


그림 2-36. SH-SY5Y cell BDNF RT-PCR 결과

② Bcl, Caspase-3, Bax

- RT-PCR 결과 Bcl 실험 결과에서는 control 그룹과 대조하였을 때 Bcl의 발현량이 감소하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gw Glc 4B15를 처리한 그룹에서 가장 낮은 발현량을 나타냄(그림 2-37). RT-PCR 결과 Caspase-3 실험 결과에서는 control 그룹과 대조하였을 때 Caspase-3의 발현량이 증가하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gw Glc 4B15를 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄(그림 2-38). RT-PCR 결과 Bax 실험 결과에서는 control 그룹과 대조하였을 때 Bax의 발현량이 증가하는 경향을 보임. 그룹 중 특히 0.5mg/ml의 Gc Glc 4M13를 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량을 나타냄(그림 2-39).

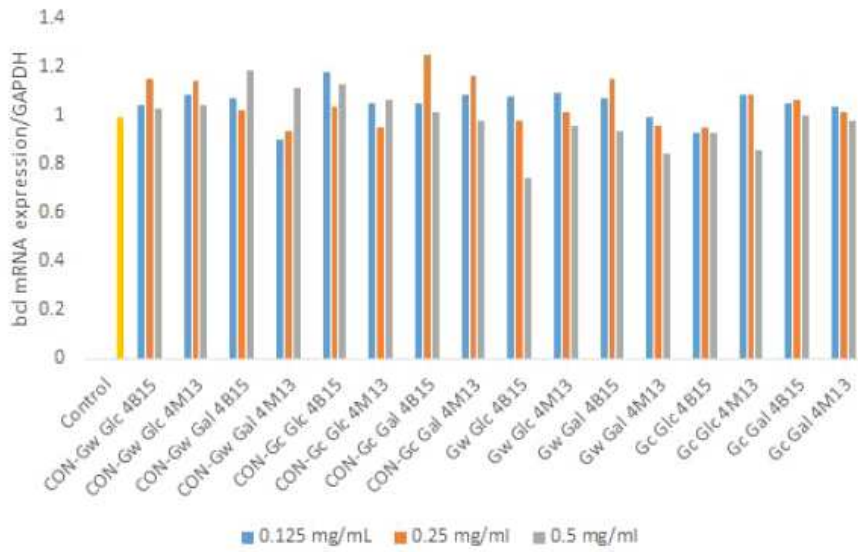


그림 2-37. SH-SY5Y cell Bcl RT-PCR 결과

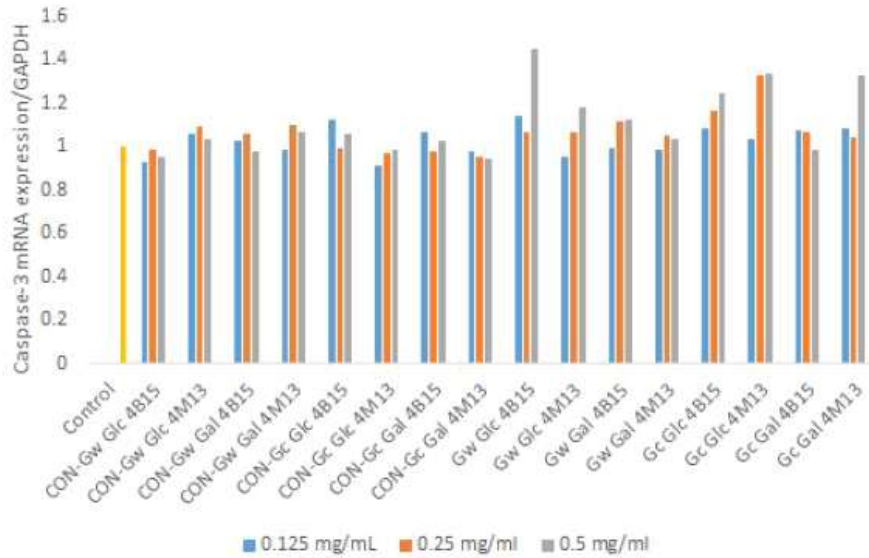


그림 2-38. SH-SY5Y cell Caspase-3 RT-PCR 결과

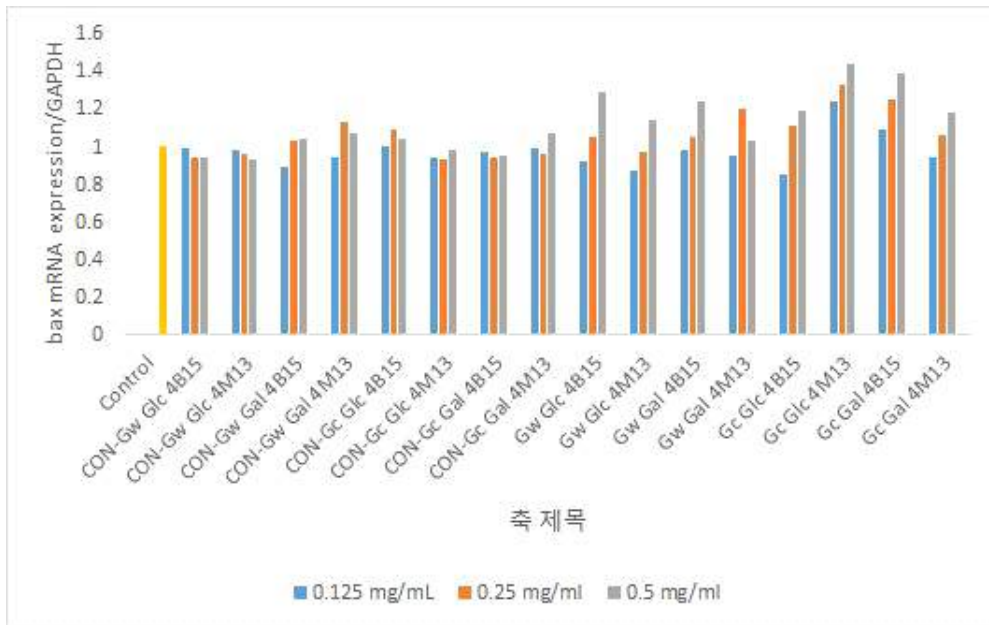


그림 2-39. SH-SY5Y cell Bax RT-PCR 결과

나. 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 발효 당화유단백질의 스트레스 모델을 통한 생체 기능 검증 (*in vivo* study)

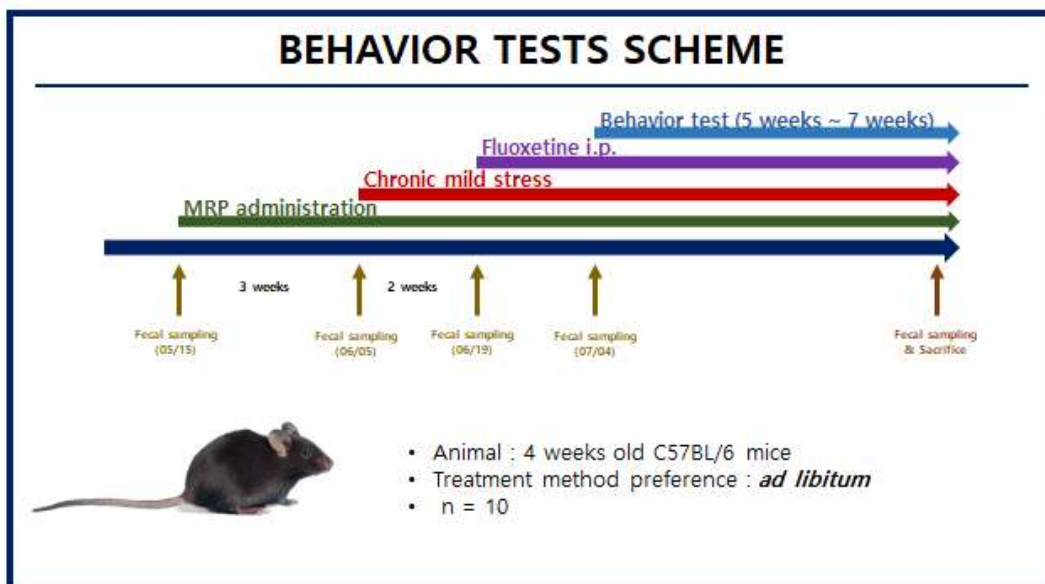


그림 2-40. 만성 스트레스를 유도한 mice model

(1) 실험 내용

(가) 마우스 구입 및 사육 환경

- 만성 스트레스를 주어 뇌기능장애를 유도하기 위해 4주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험에 사용하였음. 사용한 마우스는 Samtako Bio Korea에서 구입하여 사용하였음.
- 사육은 개체의 체중을 측정 한 후, 그룹간의 체중 차이가 최소화 될 수 있도록 그룹당 케이지를 분리하였음. 한 케이지당 5 혹은 6마리씩 사육하였음. 사육실의 사육환경은 12시간 간격으로 9:00~21:00까지 점등하였고, 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$ 로 유지하며, 소음은 60dB이하로 조절해 스트레스를 최소화하였음. 깔집은 주 2~3회 교체하였음.

(나) 발효당화유단백의 뇌기능 저하 개선을 확인하기 위한 실험 디자인

- 만성 스트레스 모델을 유도하기 위한 실험 그룹 및 발효당화유단백 treatment의 뇌기능저하 개선을 확인하기 위해 총 7그룹으로 실험을 디자인함.
- 만성 스트레스를 유발한 마우스와 스트레스를 유발하지 않은 일반 마우스로 나누었음. 스트레스를 유발하지 않은 마우스 그룹은 (1) 일반 사료로 식이를 제공하는 그룹과 (2) casein 식이를 제공하는 그룹으로 나눔. 스트레스를 유발하는 그룹은 총 5개로, 먼저 (3) positive control 그룹으로 항우울제 Fluoxetine을 경구투여 처리하는 그룹, (4) 경구투여로 인한 스트레스를 동일하게 주는 일반식이 그룹, (5) Casein 식이 그룹, (6) MRP 식이 그룹, (7) 발효당화유단백(FMRP) 식이 그룹으로 나누어 실험함.

(다) 마우스 식이 제조 및 제공방법

- 발효당화유단백질의 제조 : 발효 당화 유단백질의 선정은 1차년도 결과와 주관기관과의 협의로 Glycated casein protein isolate with glucose fermented with 4B15 strain (Gc-Glc 4B15)로 선정하였음. 각 그룹별로 casein, MRP, 발효당화유단백의 ad libitum 사료를 Samtako Bio Korea에서 제작함. 각각의 농도는 1500mg/kg/day로 계산하여 30g/4kg 으로 사료를 제작하였음.

(라) 만성 스트레스 유도 방법 및 스케줄

- 만성 스트레스는 총 12가지 종류의 ation, Cold water bath, Forced swimming, Rotarod 포함 12가지 스트레스가 사용됨. 스트레스로 비 순환적인 반복을 통해 마우스에게 유도 됨. Tilting cage, Restricted space, Foreign cage, Light off, Empty cage, Wet cage, Sleep cycle change, Water deprivation, Illumin

(마) 행동실험

① Open field Test

- 그림 2-41.과 같이 임의 크기의 뚜껑이 없는 직육면체 상자 안에 마우스를 넣고 움직

임을 관찰하는 실험. 이 실험은 마우스의 움직임에 의해 기본적인 운동성을 확인하고, 다른 행동실험의 기본이 될 수 있는 중요한 실험임. 마우스의 불안 정도를 측정할 수 있는 간접적인 행동실험 데이터로 볼 수 있음. 마우스가 상자의 center 영역에서 얼마나 많은 시간을 보내는지의 여부에 따라 불안 정도를 파악할 수 있음.

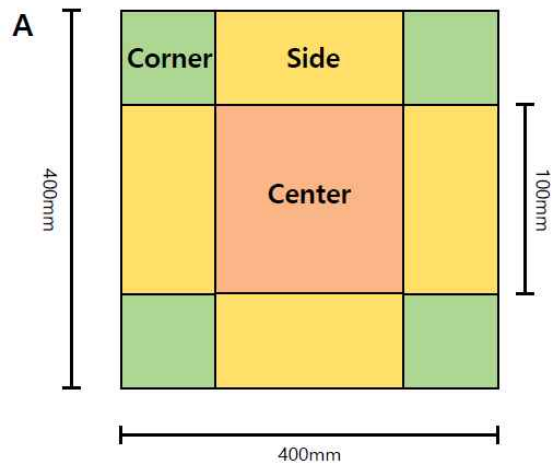


그림 2-41. Open field test apparatus plans

② Rotarod Test

- 그림 2-42.에서 같이 돌아가는 원통 위에서의 균형감각을 보는 실험. 떨어지지 않고 균형을 맞춰 움직이려면 온 몸의 근육을 이용해 민첩한 움직임이 필요. 운동신경에 이상이 생긴 마우스의 경우 정상마우스에 비해 균형을 빨리 잃고 떨어지게 됨.

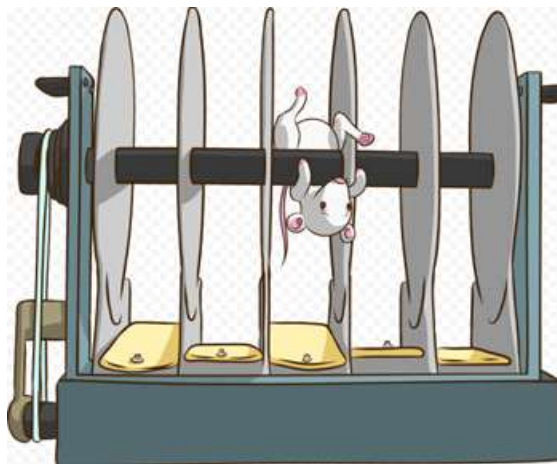


그림 2-42. Rotarod Test

③ Light & Dark Box Test

- Light & Dark Box Test (LDB) 장치는 상자에 2개의 구획으로 나뉘어 구성됨. Light 부분은 상자의 2/3이며 빛을 이용해 밝게 유지함. Dark 부분은 상자의 1/3이며 어둡게

덮여있음. 두 공간 사이의 통로가 있으며 마우스가 이동할 수 있음. 마우스는 밝은 부분보다 어두운 부분을 선호하는 성향이 있음. 하지만 새로운 환경을 마주하면 탐구하려는 습성이 있기 때문에 이 상자에서의 행동분석을 통해 불안 증세를 측정할 수 있음.

④ Elevated plus maze Test

- 마우스의 불안(anxiety)정도를 파악할 수 있게 고안된 행동실험. 높고 좁은 낭떠러지를 재현한 장치임. 십자 형태의 미로에는 4개의 통로 중 2개는 높은 벽으로 막혀있고, 나머지 2개는 벽이 없는 낭떠러지 형태임. 마우스를 십자 미로의 한가운데 놓았을 때, 뚫린 부분의 통로와 닫힌 부분의 통로에 머무는 시간을 통해 불안 정도를 측정하게 됨. 불안감이 감소된 마우스의 경우 벽이 뚫린 통로에 머무는 시간이 길어지게 됨.



그림 2-43. Elevated plus maze Test

⑤ Forced swimming Test

- Forced swimming Test(FST)는 행동 테스트 중에서도 마우스가 스트레스를 많이 받는 실험중 하나. chronic stress를 유발하는 stress의 일종으로 사용되기도 함. 우울함 (Depression)을 파악할 수 있는 실험. 실린더에 마우스의 발이 닿지 않는 높이의 물을 채우고 실험을 진행함. 우울감이 적거나 정상인 마우스일 경우 물에 빠졌으니 살기위해 발을 움직여 움직이는 행동을 보임. 우울감이 큰 마우스 일수록 허우적대다가 포기하고 정지한 상태까지 도달하는 시간이 짧아짐. 또한 정지상태로 있는 시간도 길어짐. 낙담한 상태를 통해 우울감의 정도를 판단하는 행동실험.

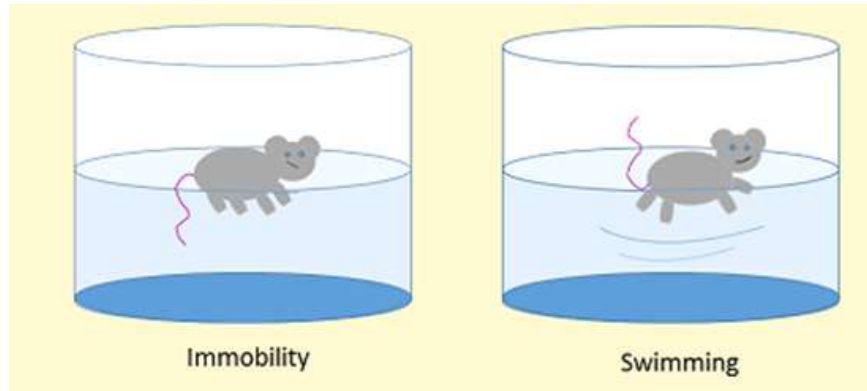


그림 2-44. Forced swimming Test

⑥ Novel Object Recognition 24hr Test

- Novel object test에서 A와 A' 는 같은 물체로 실험함. 24시간 이후에 A' 물체를 B 물체로 바꿔서 실험을 함. 마우스가 새로운 물체에 호기심을 보이는 것을 이용해 기억력에 대한 행동을 확인하는 실험.

⑦ Spatial Recognition 24hr Test

- Spatial Recognition test에서 A와 B 는 다른 공간으로 실험함. 24시간 이후에 머물던 공간과 반대 공간 중 어느곳에 더 머물게 되는지 확인하는 실험을 함. 마우스가 새로운 공간에 호기심을 보이는 것을 이용해 기억력에 대한 행동을 확인하는 실험.

⑧ Social interaction Test

- Social interaction Test는 동일한 주령의 파트너 마우스를 이용해 다가가 머무는 시간을 측정한 실험임. Stress로 인해 사회성이 결여 혹은 떨어지게 되면 파트너 마우스에게 다가가 머무는 시간이 감소하게 됨.

(바) 분변 내 microbiota 와 metabolites 분석을 위한 분변 샘플링

- 마우스 분변에서 NGS를 이용한 microbiota 분석과 metabolites 분석을 위한 샘플링을 각각의 처리기간에 따라 총 6번 진행함. 첫 번째 샘플링은 1주일 housing 이후 식이 treatment 이전에 진행하였음. 두 번째 샘플링은 3주간의 식이 treatment 이후 chronic mild stress 처리 이전에 진행하였음. 세 번째 샘플링은 positive control인 약 처리 기간 이전에 진행하였음. 네 번째 샘플링은 행동테스트 시작 이전에 진행하였음. 다섯 번째 샘플링은 행동테스트가 종료된 이후 부검 이전에 진행되었음. 마지막 샘플링은 부검을 하며 대장 flushing을 통해 수집하였음.

(사) 행동 실험 종료에 따른 마우스 부검 및 분석

- Social interaction test를 마지막으로 총 8가지 행동실험이 종료 된 후, 부검을 실시하였음. chloral hydrate(100 μ L/20g body weight) 통해 마취 후 cardiac puncture를 통해 혈액을 채취하고, 장기(뇌, 소장, 대장 및 분변)을 적출함.
- 기저성 염증 인자와 스트레스 호르몬의 확인을 위해 혈액 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 원심분리(5,000 rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C)하여 혈청을 얻었음.
- 뇌는 적출 후 degradation을 방지하기 위해 즉시 -60 $^{\circ}$ C에 저장하였음.
- 다른 장기들은 적출한 즉시 기저성 염증의 확인을 위한 조직병리분석을 실시하기 위해 저장하였음. 조직병리학적 검사를 위한 검체는 대장, 소장을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경 (Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰할 예정.

(2) 연구 결과

(가) 스트레스를 유도한 마우스 모델의 그룹 간 무게 변화

- 4주령 마우스를 1주 housing 후 treatment 처리 한 10주간의 개체 무게 변화를 나타냄. 그룹간의 개체의 무게를 평균 내어 사용됨. 10주간 무게가 증가하는 양상을 세 그룹 모두 볼 수 있음. 하지만 각 그룹간의 무게 차이는 유의미하지 않음.

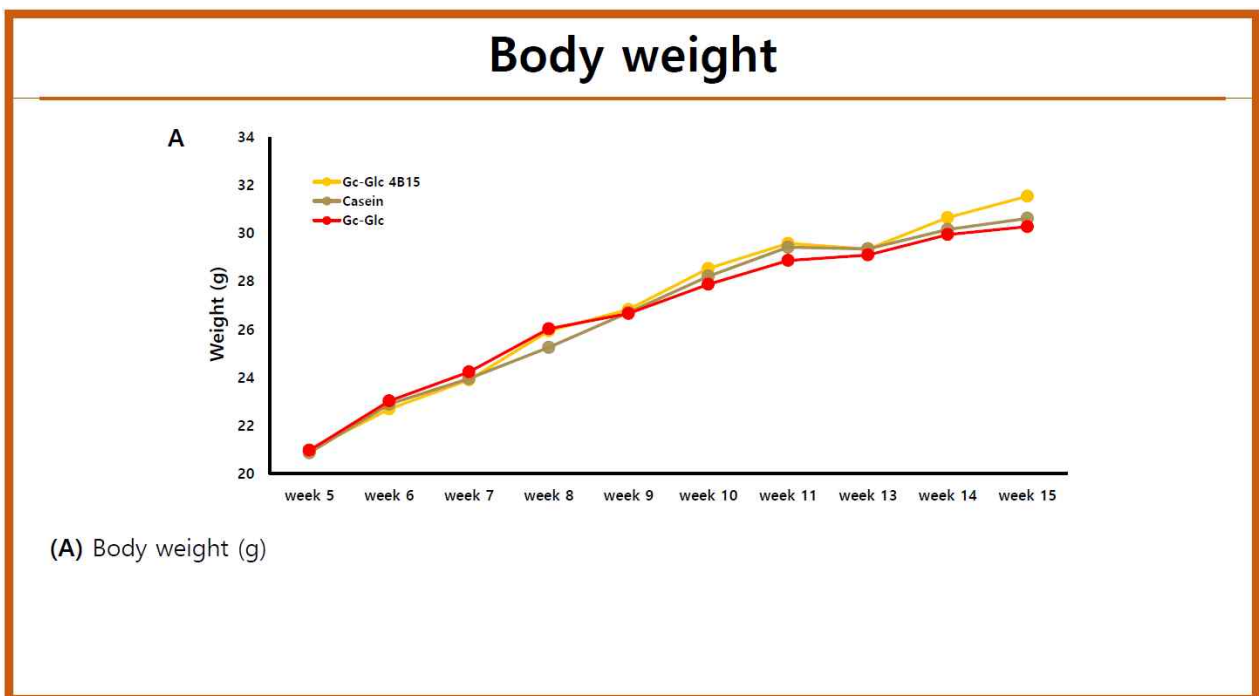
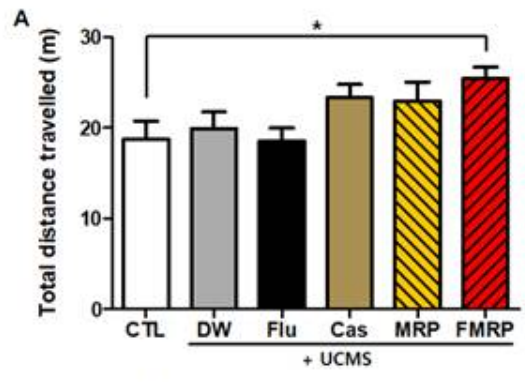


그림 2-45. 10주간 Body weight

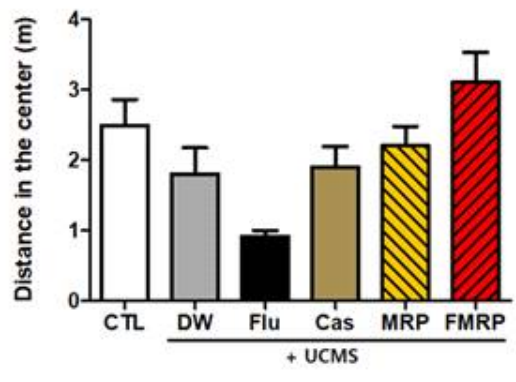
(나) 행동실험

① Open field Test

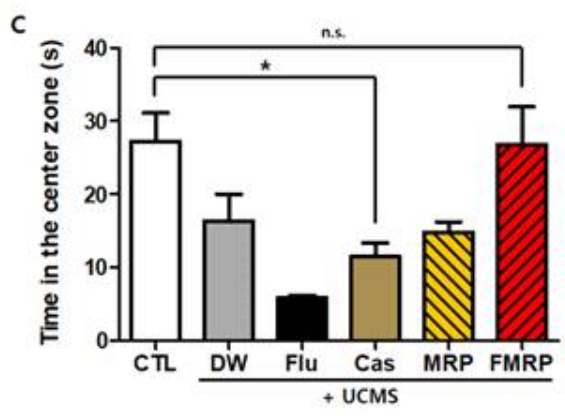
- (A)는 마우스가 상자 안에서 이동한 전체 거리를 측정한 결과. 전체적 움직인 거리는 세 그룹간의 유의적 차이는 없었음. (B)는 상자의 가운데 부분이 center에서의 이동거리를 측정해 본 결과 발효당화유단백질 그룹이 casein 그룹과 비교했을 때, 더 많이 움직인 경향성은 보이지만 세 그룹간의 유의적 차이는 확인할 수 없었음.
- (C)는 상자안의 center zone에서의 머무는 시간을 나타낸 결과. (D)는 center zone으로 들어온 횟수를 측정한 것. 마우스는 우울감이 적을수록 center zone으로 많이 오게 되는 성향이 있음. 발효당화유단백 그룹의 마우스들이 casein 그룹과 비교했을 때 유의미한 차이로 center zone에서 머무는 시간이 긴 것을 확인 할 수 있음.
- (E)는 마우스가 center안에 한번 들어왔을 때 얼마나 오래 center에 머무는지 측정한 결과. casein 그룹을 보면 머무는 시간이 들어온 후 금방 나가는 반면, 발효당화유단백 그룹은 좀 더 오래 머무는 것을 확인 할 수 있음.
- (F)는 상자에서 side zone에서의 마우스가 머무는 시간을 측정했고, (G)는 박스의 corner zone에서의 마우스가 머무는 시간을 측정함. 우울감이 적을수록 center에 오래 있고 corner에 적게 있는 경향이 있음. side zone은 그 두 가지의 중간으로 볼 수 있음. corner zone에 있는 시간을 비교해 보면 발효당화유단백 그룹이 가장 짧은 시간 머무는 것을 확인 할 수 있음.



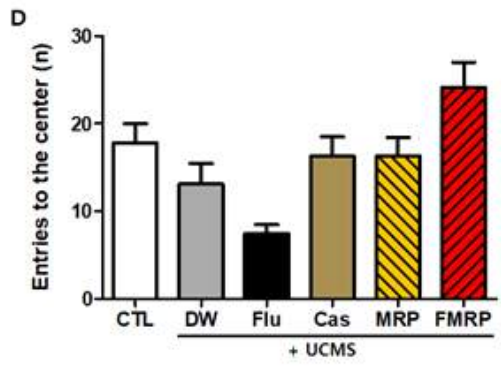
(A) Total distance travelled (m)



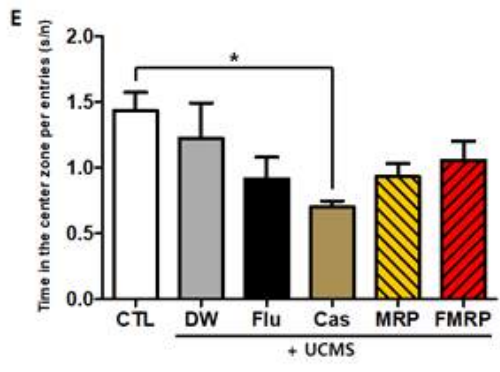
(B) Distance in the center (m)



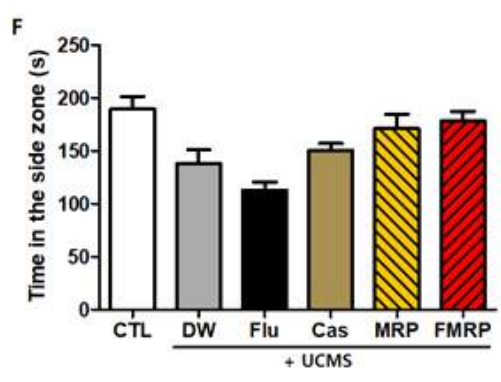
(C) Time in the center zone (s)



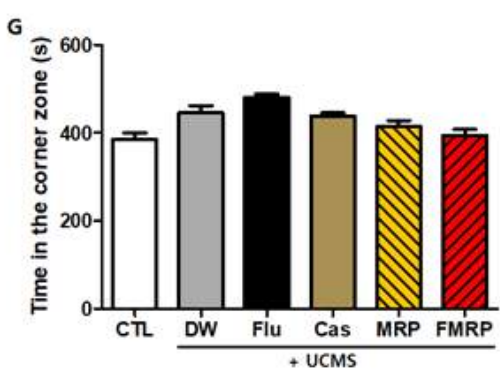
(D) Entries to the center (n)



(E) Time in the center zone per entries (s/n)



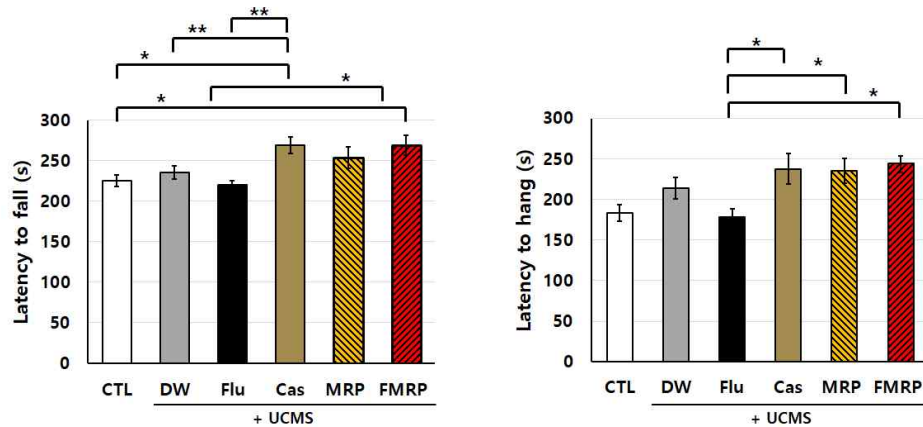
(F) Time in the side zone (s)



(G) Time in the corner zone (s)

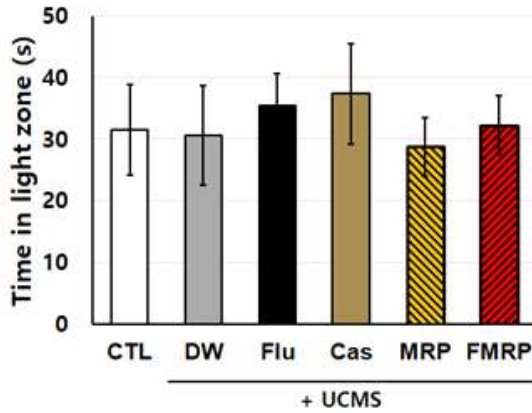
② Rotarod Test

- (A)는 Rotarod 장치에서 떨어지는데 걸린 시간을 측정하였고, (B)는 rotarod장치에서 마우스가 매달려 있는 시간을 측정한 결과.
- (A) 결과를 확인해 보면, FMRP그룹은 CTL그룹과, Positive control 그룹인 Flu그룹과 유의미한 차이를 보이고 있음. 정상 마우스와 positive 대조그룹과 비교했을 때, rotarod 장치에서 균형을 더 오랜 시간 유지한 것으로 보임. Cas, MRP, FMRP그룹 모두 떨어지는데 걸리는 시간(A)와 매달려있는 시간(B)가 Flu 그룹과 비교했을 때, 더 오랜시간 유지한 것으로 Stress로 인한 운동신경이 손상되지 않은 것으로 보임.

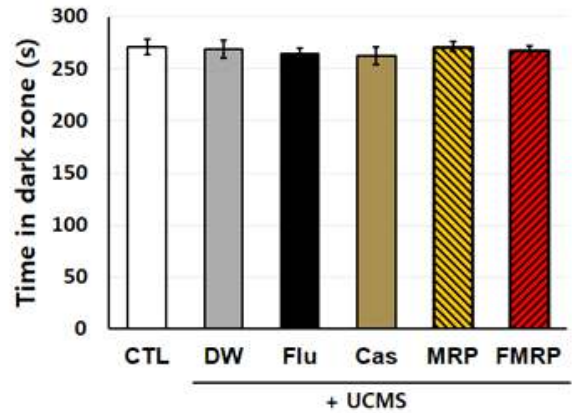


③ Light & Dark Box Test

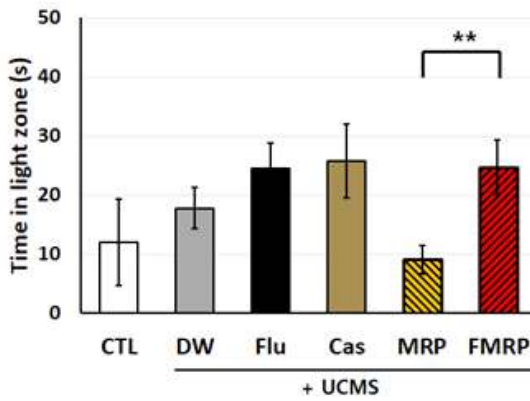
- (C)를 보면 첫 번째 dark zone에서 머무른 것을 제외한 light zone에서 머무른 시간을 측정한 결과. MRP 그룹과 비교했을 때, 발효당화유단백 그룹이 light zone에서 머무른 시간의 차이가 MRP그룹과 비교했을 때, 크게 증가한 것을 확인 할 수 있음.
- (F)는 Light zone과 Dark zone에서의 이동한 횟수를 측정한 결과. 이 결과를 확인 해 보면, FMRP그룹이 MRP그룹과 비교했을 때, 이동한 횟수가 유의미하게 많았음. 또한, MRP그룹은 DW그룹과 Flu그룹간의 유의미한 차이로 낮은 횟수를 나타냄. 이것을 통해 FMRP그룹의 마우스들이 다른 그룹과 비교했을 때, 불안증세가 낮은 것으로 볼 수 있음.



(A) Time in light zone (s)

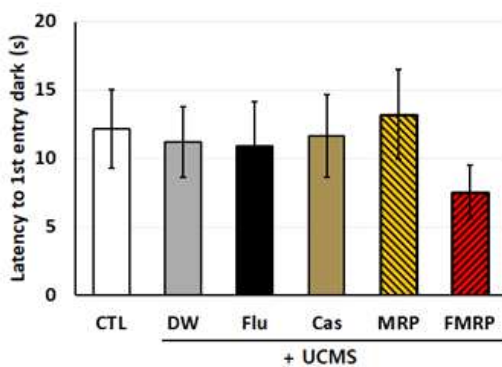
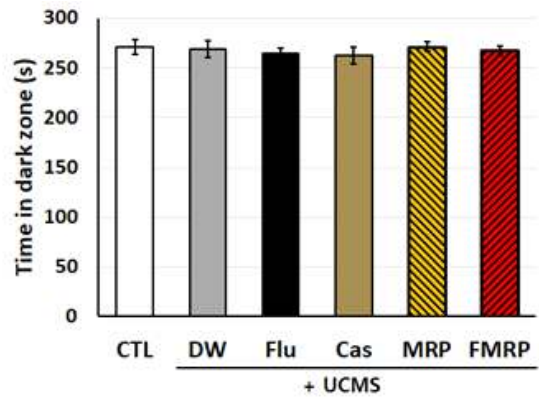


(B) Time in dark zone (s)

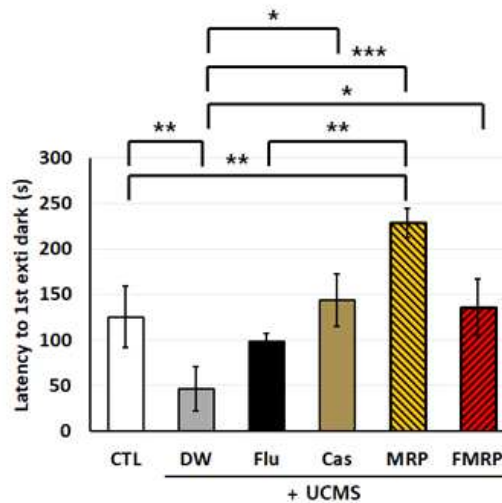


Left – time spent in light zone except the time spent before 1st entry to dark zone.

(C) Time in light zone except the time spent before 1st entry to dark zone (s)



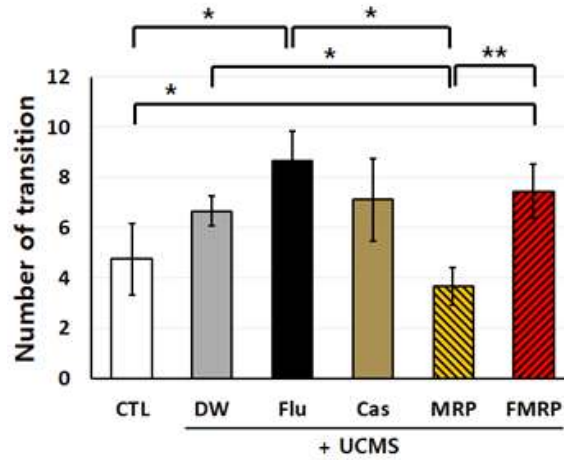
(D) Latency to 1st entry dark zone (s)



(E) Latency to 1st exit dark zone (s)

④ Elevated plus maze Test

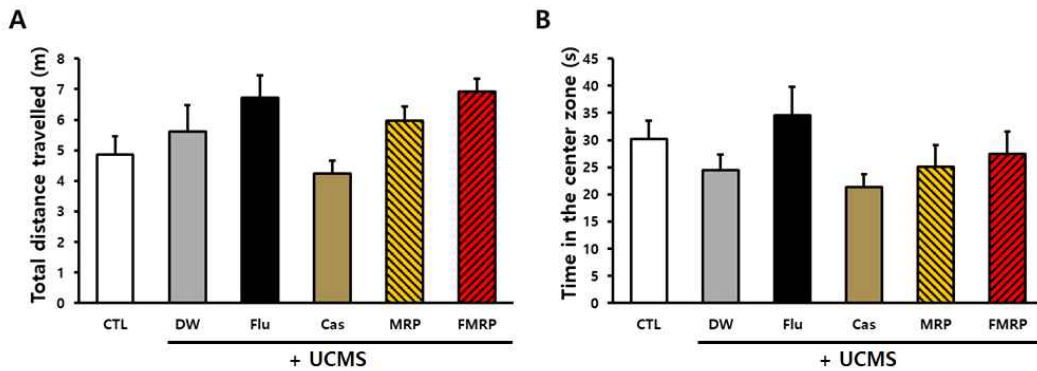
- (A)는 전체 통로에서 마우스가 이동한 거리를 비교함. 각 그룹간의 유의적인 차이와 casein과 발효당화유단백 그룹간의 유의적 차이는 나타나지 않음. 하지만 cas, MRP, FMRP그룹을 비교했을 때, 전체 이동길이가 증가하는 경향을 보임.
- (C) 닫힌 통로에서 가장 짧은 시간을 머무는 발효당화유단백 그룹의 불안증세가 가장



(F) Number of transition (n)

완화된 것을 확인함. CTL과 비교했을 때, Cas그룹은 가장 긴 시간 닫힌 통로에 머문 것을 확인함. Cas, MRP, FMRP그룹간의 유의미한 차이는 없지만 점점 머무는 시간이 감소하는 경향성을 보임. (D)는 닫힌 통로의 끝부분에서 머무는 시간을 나타낸 결과. 닫힌 통로의 끝부분에서 머무는 시간은 각 그룹간의 유의미한 차이를 나타내지 않음.

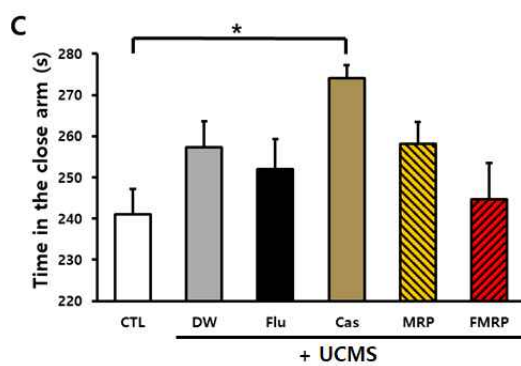
- (E), (F)는 열린 통로와 열린 통로의 끝부분에서 마우스가 머무는 시간을 측정된 것. 불안증세가 없을수록 열린 통로에 머무는 시간이 길어짐. 두 가지 모두 발효당화유단백 그룹이 열린 통로에서 머무는 시간이 casein과 MRP그룹과 비교했을 때 긴 것을 확인할 수 있었음. (E)에서는 그룹간에 유의미한 차이를 나타내었음. (F)에서는 (E)와는 비슷한 경향을 띄고 있지만 각 그룹간의 유의미한 차이는 보이지 않음.
- 따라서, casein 그룹보다 MRP 그룹에서 불안(anxiety)정도가 완화되었고, MRP그룹보다 FMRP그룹에서 불안 정도가 더 완화된 것을 볼 수 있음.



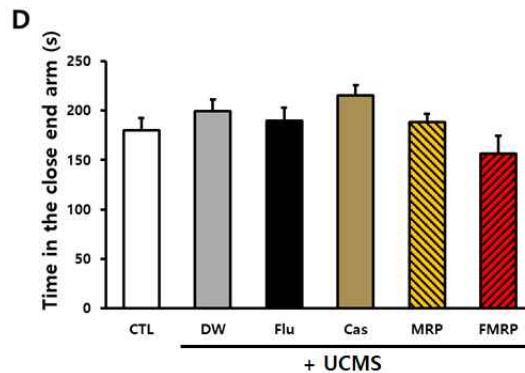
(A) Total distance travelled (m),

(B) Time in the center zone (s)

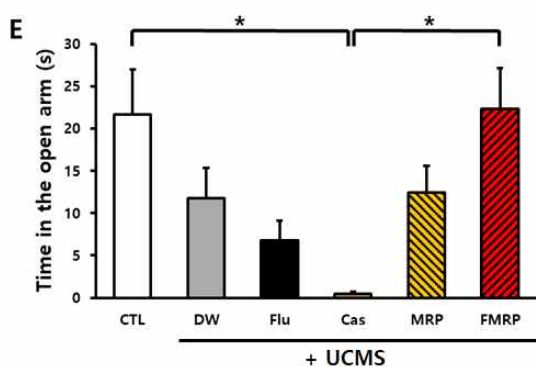
⑤ Forced swimming Test



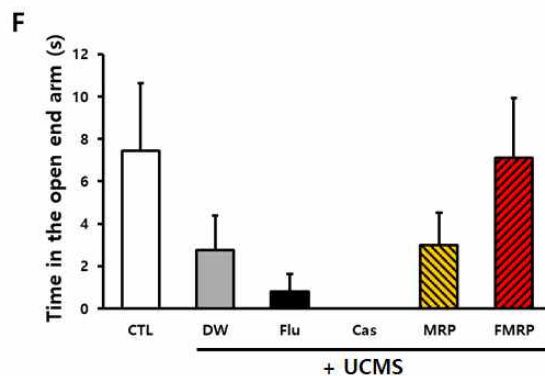
(C) Time in the close arm (s),



(D) Time in the close end arm (s)

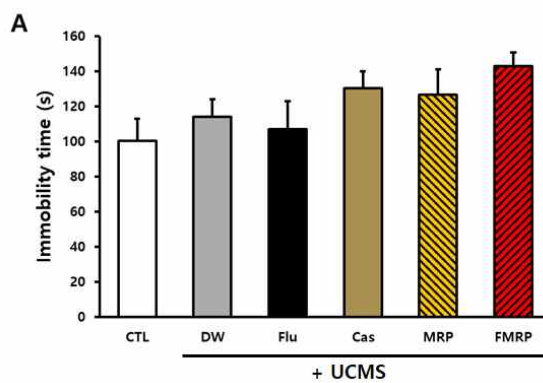


(E) Time in the open arm (s),



(F) Time in the open end arm (s)

- (A) 물에서 마우스가 정지해있는 시간을 측정한 결과에서는 세 그룹간의 유의미한 차이는 확인되지 않음.

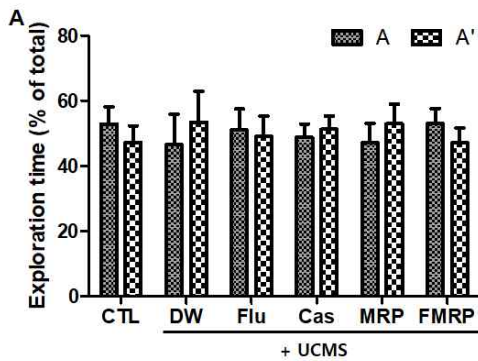


(A) Immobility time(s)

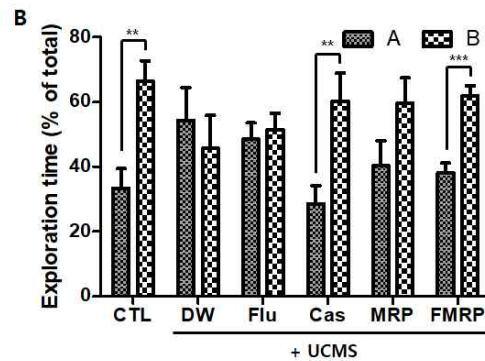
⑥ Novel Object Recognition 24hr Test

- (A)를 보면 같은 물체인 A와 A'를 두고 training session을 실험 했을 때 비슷하고 차이가 거의 없는 결과가 나와야 실험 조건이 제대로 잡힌 것으로 볼 수 있음. (B)는 A'를 새로운 B로 바꿔서 원래 물체를 기억하는지에 대한 행동실험 결과. CTL그룹과, Cas, FMRP그룹에서 A와 A'의 유의미한 차이를 확인 할 수 있음. MRP그룹에서는 기억을 잘 못하는 반면, 발효당화유단백 그룹에서는 기억을 하는 결과를 볼 수 있었음.

- 따라서 casein 그룹과 발효당화유단백 그룹에서 기억력이 MRP그룹에 비해 완화된 것을 볼 수 있음.



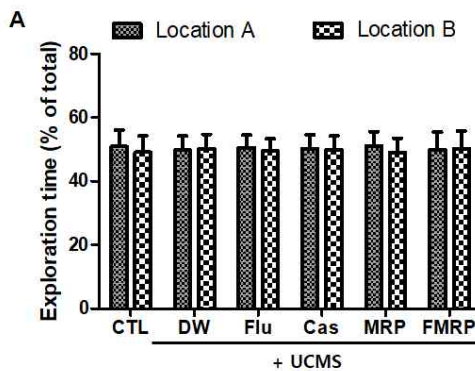
(A) Exploration time(% of total) in training,



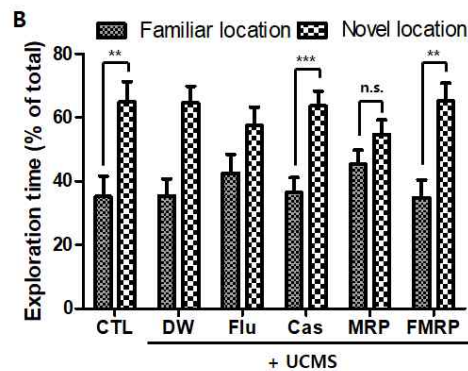
(B) Exploration time(% of total) in test

⑦ Spatial Recognition 24hr Test

- (A)를 보면 같은 다른공간인 A와 B를 두고 training session을 실험 했을 때 비슷하고 차이가 거의 없는 결과가 나와야 실험 조건이 제대로 잡힌 것으로 볼 수 있음.
- (B)는 원래 머물던 공간을 새로운 B로 바꿔서 원래 공간에 대한 기억을 측정하는 행동 실험 결과. CTL그룹과, Cas, FMRP그룹에서 머물던 공간과 새로운 공간에서 머무는 시간의 유의미한 차이를 확인 할 수 있음. MRP그룹에서는 기억을 잘 못하는 반면, 발효당화유단백 그룹에서는 기억을 하는 결과를 볼 수 있었음.
- 따라서 casein 그룹과 발효당화유단백 그룹에서 기억력이 MRP그룹에 비해 완화된 것을 볼 수 있음



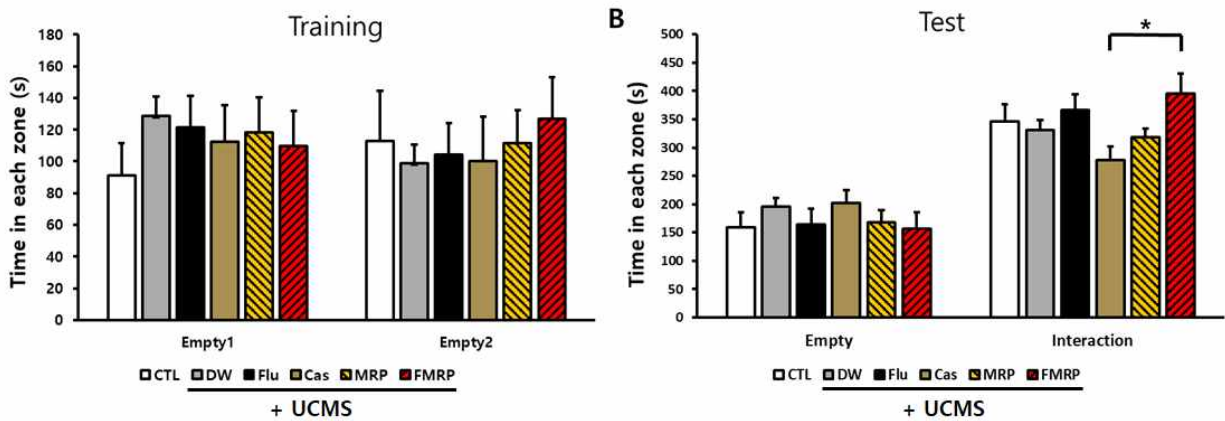
(A) Exploration time(% of total) in training



(B) Exploration time(% of total) in test

⑧ Social interaction Test

- (A)는 Trainin 단계로, 파트너 마우스를 두지 않고 각각 다른 두 개의 공간에 얼마나 머무는지 시간을 측정함. 두 공간에 머무는 시간이 여섯 그룹 모두 유의미한 차이를 나타내지 않은 것으로 보아 실험 조건이 잘 잡힌 것을 확인 할 수 있음.
- (B)는 두 공간중 한 공간에 파트너 마우스를 두고 그 마우스에 다가가 머무는 시간을 측정한 결과. 파트너 마우스에게 다가가 머무는 시간이 파트너 마우스가 없는 빈공간에서의 머무는 시간을 비교했을 때 Cas그룹과 FMRP그룹간의 유의미한 차이를 보임. 이 결과로 FMRP그룹이 가장 긴 시간동안 머문 것으로 보아 FMRP그룹의 마우스들이 가장 사회성이 뛰어나다는 것을 확인 할 수 있음.



(A) Time in each zone in training session (s),

(B) Time in each zone in test session (s)

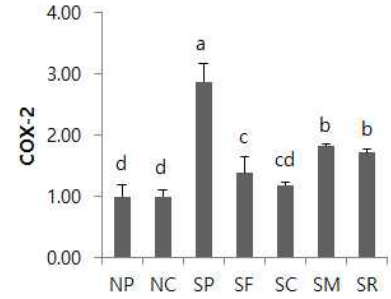
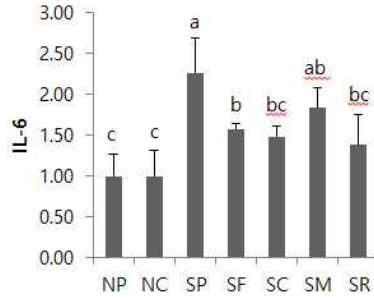
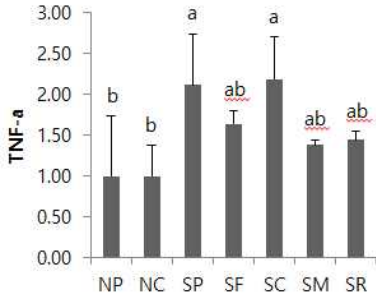
(다) 뇌에서의 분석 결과

① 염증성 사이토카인 IL-6, TNF-a, COX-2

- 뇌에서의 염증성 사이토카인을 qRT-PCR을 이용해 분석함.
- IL-6, TNF-a, COX-2는 염증을 유발하는 pro-inflammatory cytokine임.
- Interleukin-6는 Stress처리 그룹과 비교했을 때 FMRP그룹에서 낮은 수치를 보임. 이를 통해 FMRP그룹에서 염증성사이토카인(IL-6)와 관련된 염증 수치가 완화된 것을 확인할 수 있음.
- TNF-a는 스트레스 처리 후 유의적으로 증가했다가 약, MRP, FMRP그룹에서 감소된 수치를 나타냈고, COX-2는 모든 샘플 처리 그룹에서 유의적으로 감소함을 나타냄. FMRP그룹에서도 stress 그룹과 비교했을 때 유의적 차이를 보이는 것으로 보아 염증완화에 긍정적 영향을 미치는 것을 알 수 있음.

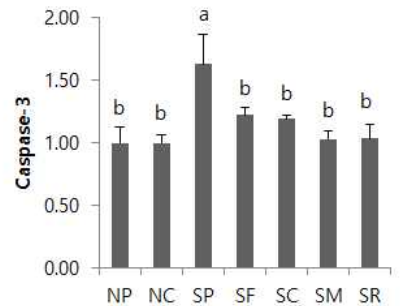
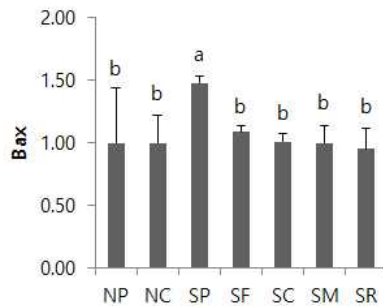
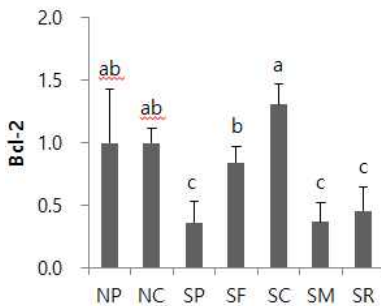
② Apoptosis 분석

- 뇌에서 Apoptosis와 관련된 Bax, Caspase3, Bcl-2 인자를 qRT-PCR을 통해 확인함.
- 뇌에서 Apoptosis가 일어나게 되면 파킨슨병이나 다른 뇌기능 관련 disorder가 일어



나게 됨. Bax와 Caspase3는 Pro-apoptosis 인자로서 세포자살을 유도하는 역할을 함. Bcl-2는 anti-apoptotic적인 역할을 함.

- Stress를 처리한 그룹을 비교해보면, FMRP 그룹에서 Pro-apoptosis인자인 Bax와 Caspase3의 발현량이 낮은 것을 확인 할 수 있음. Anti-apoptotic 역할을 하는 Bcl-2의 발현에서는 효과를 보이지 않음.



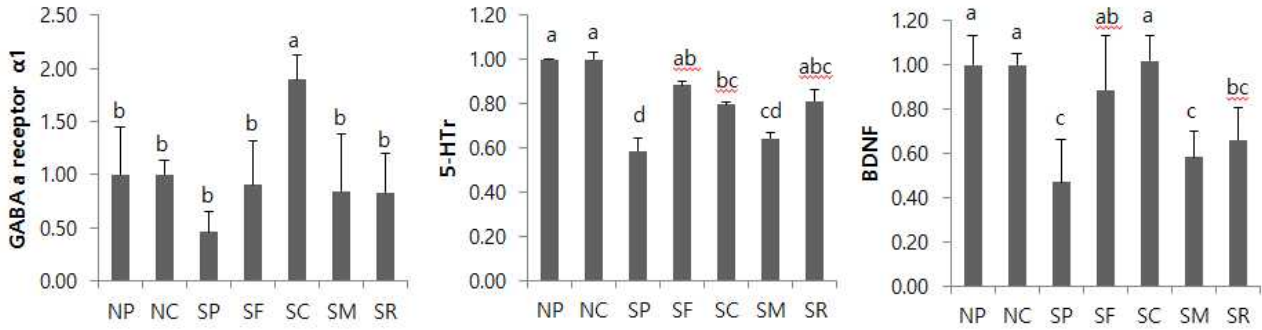
③ 신경전달물질 분석

- 신경전달물질 receptor로서 GABA a receptor, 5HT receptor, BDNF를 분석함.
- 뇌 조직에서의 신경전달물질 중 5HT_{1a}와 BDNF는 normal 그룹과 비교했을 때 stress 그룹에서 유의적으로 감소함을 확인함.
- GABA receptor에서는 casein그룹만이 유의적인 증가를 나타냈음
- BDNF는 인지기능을 담당하는 유전자로, 스트레스를 받으면 발현이 감소하는 것으로 알려져 있음. FMRP처리를 한 후 일정수준 증가함을 확인함.
- 5HT receptor 1a는 세로토닌의 리셉터임. 세로토닌은 항우울작용을 하는 호르몬으로 알려져 있음. FMRP처리 후 유의적인 증가를 나타냄.

(라) 장에서의 염증 개선 분석

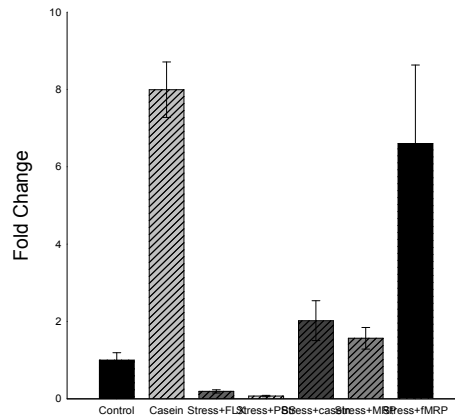
① 염증성 사이토카인 분석

- 장(Ileum)에서 qRT-PCR을 이용해 항염증 사이토카인 Interleukin-10의 발현량을 비교함.



- Interleukin-10은 염증반응을 억제하는 anti-inflammatory cytokine임.
- 식이Control 그룹(casein)과 Stress처리 그룹간의 항염증 사이토카인 IL-10을 비교해 보면, 발효당화유단백을 처리한 그룹에서 가장 높게 나타난 것을 확인함. 이를 통해 Ileum에서 항염증 인자가 개선되었다고 볼 수 있음.

Ileum IL-10

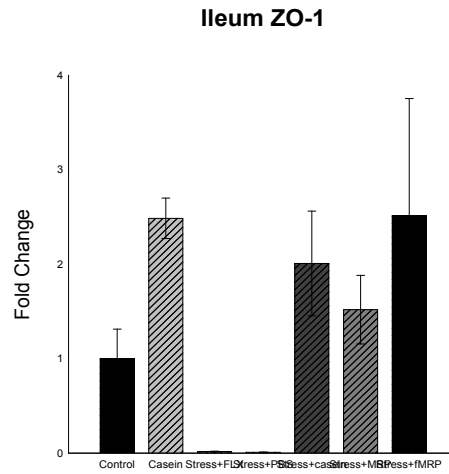


② Tight Junction Protein 분석

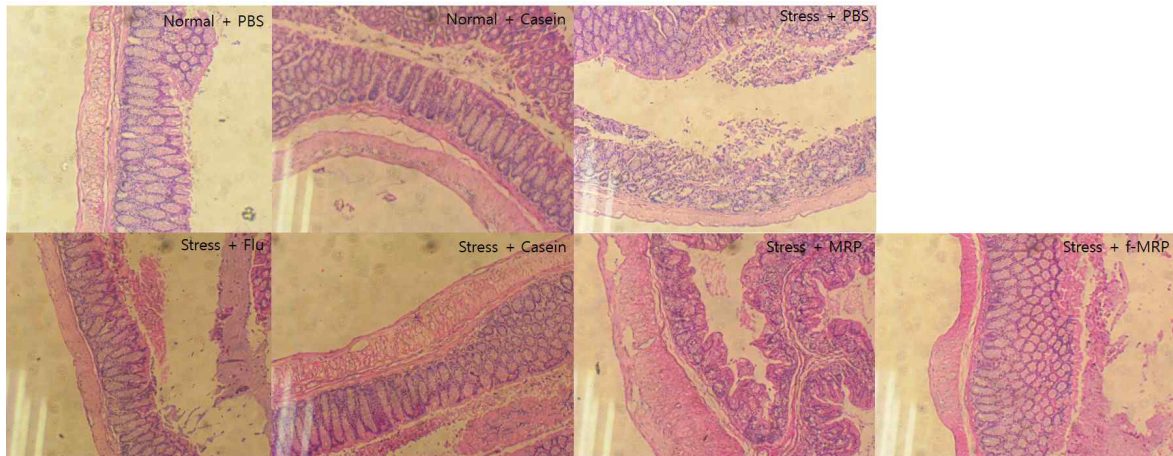
- 장(Ileum)에서의 Tight junction Protein의 발현량을 qRT-PCR을 통해 분석한 결과임.
- Tight junction protein의 발현량이 낮을수록 장 벽이 손상되어 염증, 독성 물질의 흡수율, 항상성 유지에 문제가 발생할 수 있음.
- Ileum에서 ZO-1의 발현량을 비교해 보면, Diet control(Casein)그룹과 비교했을 때, 발효당화유단백 그룹에서 stress를 처리한 다른 그룹과 비교했을 때, restore된 것을 확인할 수 있음.

③ 장(Colon)의 H&E staining

- 장(Colon)에서의 용모와 장벽을 Hematoxylin and eosin stain을 통하여 각 그룹간의 무너짐 정도와 복원된 정도를 알아봄.
- Stress를 주지 않은 그룹의 장은 Stress+PBS 그룹과 비교했을 때, 용모와 장벽이 두껍고 온전하게 존재하는 것을 스테이닝을 통해 확인 할 수 있음. Stress+PBS그룹은 용모가 모두 손상되었고, 그 두께 또한 얇아진 것을 볼 수 있음.

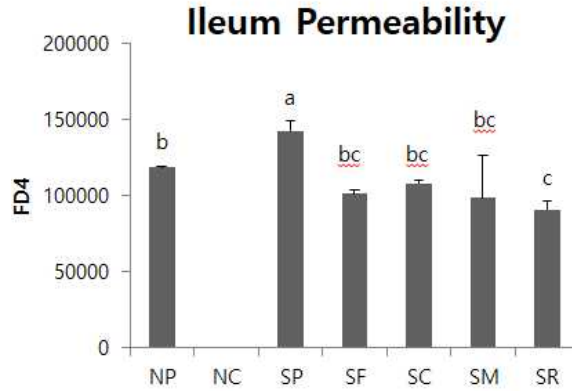


- Stress를 받은 그룹들을 비교해 보았을 때, FMRP를 식이로 제공한 그룹의 용모의 두께가 가장 두껍게 확인 되었음. 이것을 통해 FMRP그룹이 Stress로 무너진 장이 식이를 통해 가장 잘 회복 된 것으로 보임.



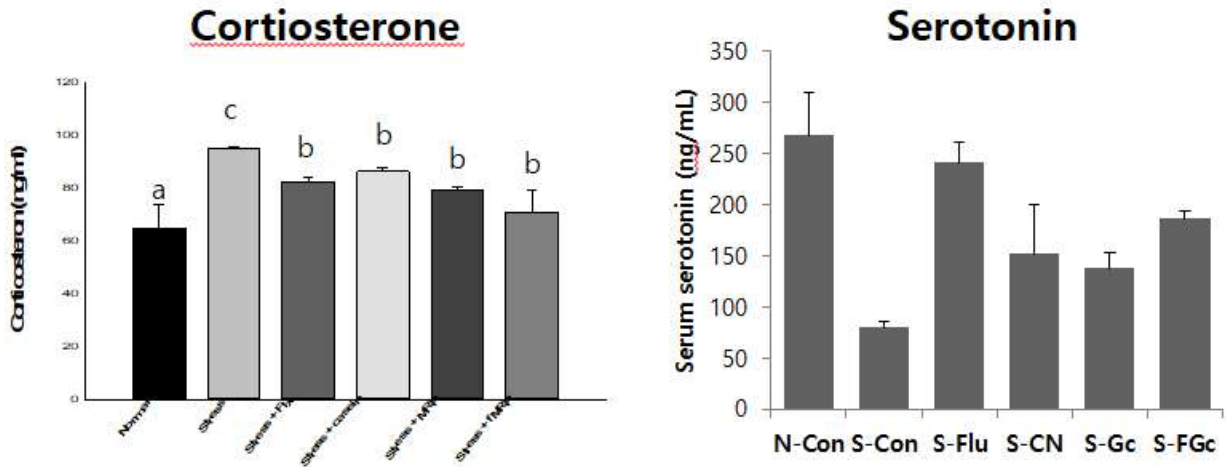
④ 장의 투과도 분석

- 장의 끝을 묶고 FD4 형광물질을 주입하여 일정시간동안 형광물질의 투과량을 조사하기 위해 형광광도계를 이용해 분석함
- 스트레스 그룹에서 정상그룹에 비해 투과도가 유의적으로 증가함을 보였고 FMRP 그룹에서 가장 낮은 투과도를 나타냄. 이것은 FMRP가 장의 밀착연접단백질의 개선에 효과적으로 작용해 장을 투과하는 형광물질의 양이 가장 적은 것을 의미함.



(마) 혈중 스트레스 관련 호르몬 농도 변화 측정

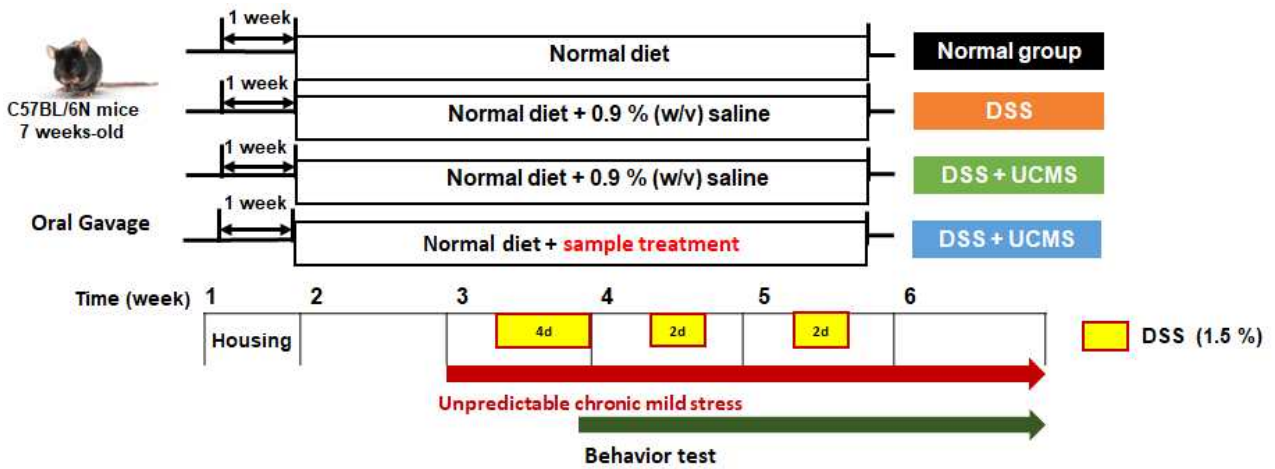
- 혈액에서 스트레스 호르몬인 corticosterone과 신경전달물질로 작용하는 serotonin을 분석함.
- 본 연구에서 스트레스 호르몬인 corticosterone의 serum 내 농도는 정상그룹에 비교했을 때 Stress 처리 후 유의적으로 증가함을 확인. MRP와 fMRP를 처리했을 때 Stress 처리 그룹과 비교하여 유의적인 감소를 보임.
- Serotonin에서 stress처리 후 유의적으로 감소했다가 MRP와 fMRP를 처리했을 때 증가하는 경향을 보임.



다. 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 발효 당화유단백질의 뇌 노화 모델을 통한 생체 기능 검증 (*in vivo* study)

(1) 실험 내용

- 첫 1주 동안 acclimation기간을 거친 후, 1주 동안 probiotics 및 synbiotics 식이를



Group	DSS	UCMS	Treatment
1 Normal	-	-	-
2 DSS	+	-	0.9 % (w/v) saline
3 DSS+ stress	+	+	0.9 % (w/v) saline
4 4B15	+	+	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 (10^9 cfu/kg/day)
5 MRP	+	+	Milk protein
6 fMRP	+	+	Fermented milk protein with 4B15

pre-treatment. 이후 4주 동안 DSS와 스트레스 처리를 통해 장염증 및 뇌 손상을 유도함.

- Dextran Sodium Sulfate 1.5 %를 식수에 포함하여 자유식이를 통해 장염증을 일으킴. 건강한 Control 그룹, DSS 처리 그룹, DSS+Stress 처리 그룹을 통해 건강한 상태의 쥐와 DSS 및 스트레스 처리를 통해 장염증과 뇌 손상을 입은 것을 확인하고자 함. 또한 DSS 처리와 스트레스 처리와 함께 *L. rhamnosus* 4B15, MRP, fMRP를 처리한 세 그룹을 추가하여, 세 가지 샘플의 스트레스성 장염증 모델에서의 기능성을 확인하고자 함. 실험종료 후 18시간 후 sacrifice.

(가) DSS와 stress에 의한 장의 변화 관찰

- 대장 길이 측정 : 실험이 종료되고 모든 실험동물의 대장을 적출하여 길이를 측정하여 비교해서 DSS에 의해 mild colitis가 유도된 샘플별 장의 변화를 봄.
- Intestine의 tight junction proteins(occludin, ZO-1, claudin)의 발현을 확인함으로써 intestinal epithelial cell의 tight junction의 손상 및 회복 정도를 확인. 측정에는 qRT-PCR이 사용됨.
- Intestine에서 발현되는 inflammatory markers (IL-6, NF-kB)의 변화를 확인. 측정에는 qRT-PCR이 사용됨.
- 대장의 조직 병리학적 검사 (Intestine tissue의 histopathology를 H&E staining으로

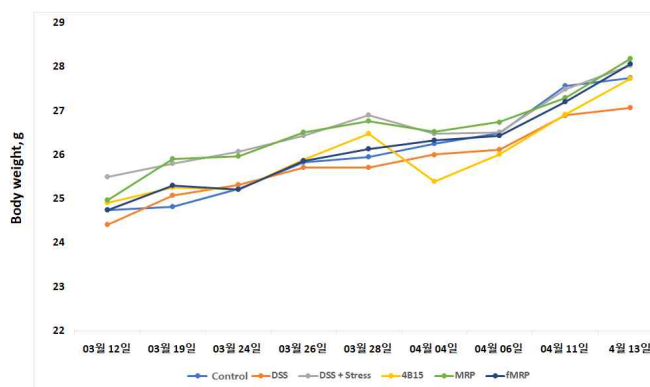
통해 확인) : Colon 부분을 10% 포르말린 용액에 24시간 고정 후 수돗물로 세척하여 알코올로 탈수시킴. 파라핀으로 고정하여 24시간 동안 56°C에서 반응시킨 후 슬라이스하여, 슬라이드에 수집하여 탈파라핀화 후에 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 현미경을 통해 관찰함. 이를 통해 DSS로 유도된 colitis에 의한 조직학적 변화를 확인할 수 있음.

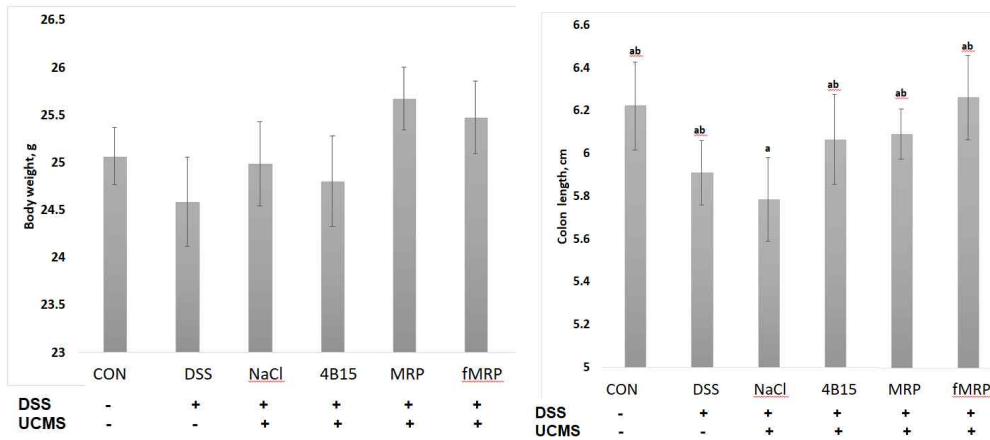
(나) DSS와 stress에 의한 뇌의 변화 관찰

- 희생 후, brain의 RT-PCR을 통해 아래의 인자들을 확인함.
Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)와 serotonin receptor, neuro-transmitter인 GABA receptor의 발현정도를 측정하여 anti-anxiety 정도를 확인.
- Neuro-inflammatory marker인 IL-1b, IL-6, Cox-2의 발현을 확인하여 스트레스 정도를 확인.
- Tight junction protein인 ZO-1, occludin, claudin 5의 mRNA의 발현을 확인하여, blood brain barrier의 손상 및 회복 정도를 확인.
- Serum에서 stress hormone인 corticosterone을 확인. 측정에는 ELISA를 이용. HPA axis에서의 gut과 brain간의 연결을 확인해 볼 수 있음.
- 이를 통해 DSS로 유도된 mild한 colitis에 의해 영향을 받은 뇌의 변화를 볼 수 있음.

(2) 연구 결과

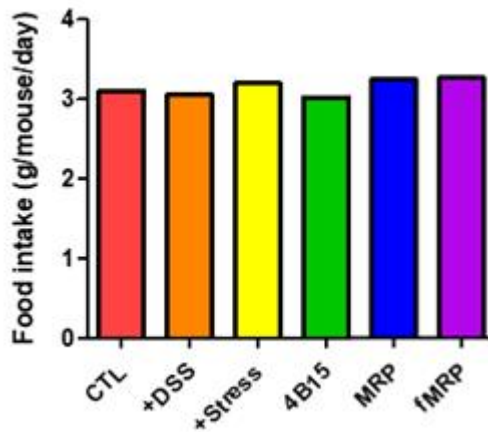
(가) 주차별 body weight과 실험 종료 날 body weight 및 colon length 결과





	CON	DSS	NaCl	4B15	MRP	fMRP
DSS	-	+	+	+	+	+
UCMS	-	-	+	+	+	+

(나) 실험기간 동안의 식이량 결과



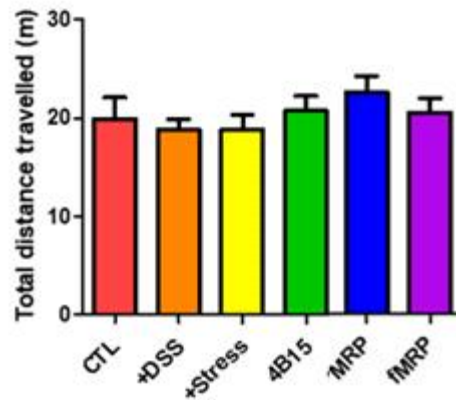
(다) 행동실험 결과

- ① 기본적인 운동능력 Open field test: 실시간 비디오 추적 시스템을 이용하여 한정된 공간 내의 마우스의 움직임을 추적함으로써 운동능력 측정.

Group	UCMS	1.5% DSS	Treatment
CTL	X	X	saline
+DSS	X	O	saline
+Stress	O	O	saline
4B15	O	O	4B15
MRP	O	O	MRP
fMRP	O	O	fMRP

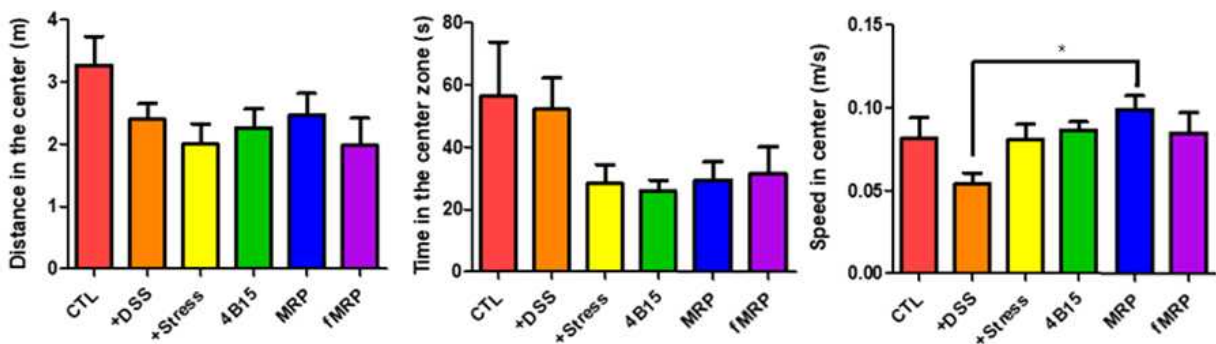


- Open field test 수행 시간 동안 각 group 간 총 이동 거리의 차이는 없었음. 즉, 장질 환 유도, 스트레스, 사료의 차이에 의해 운동능력의 차이는 보이지 않음.



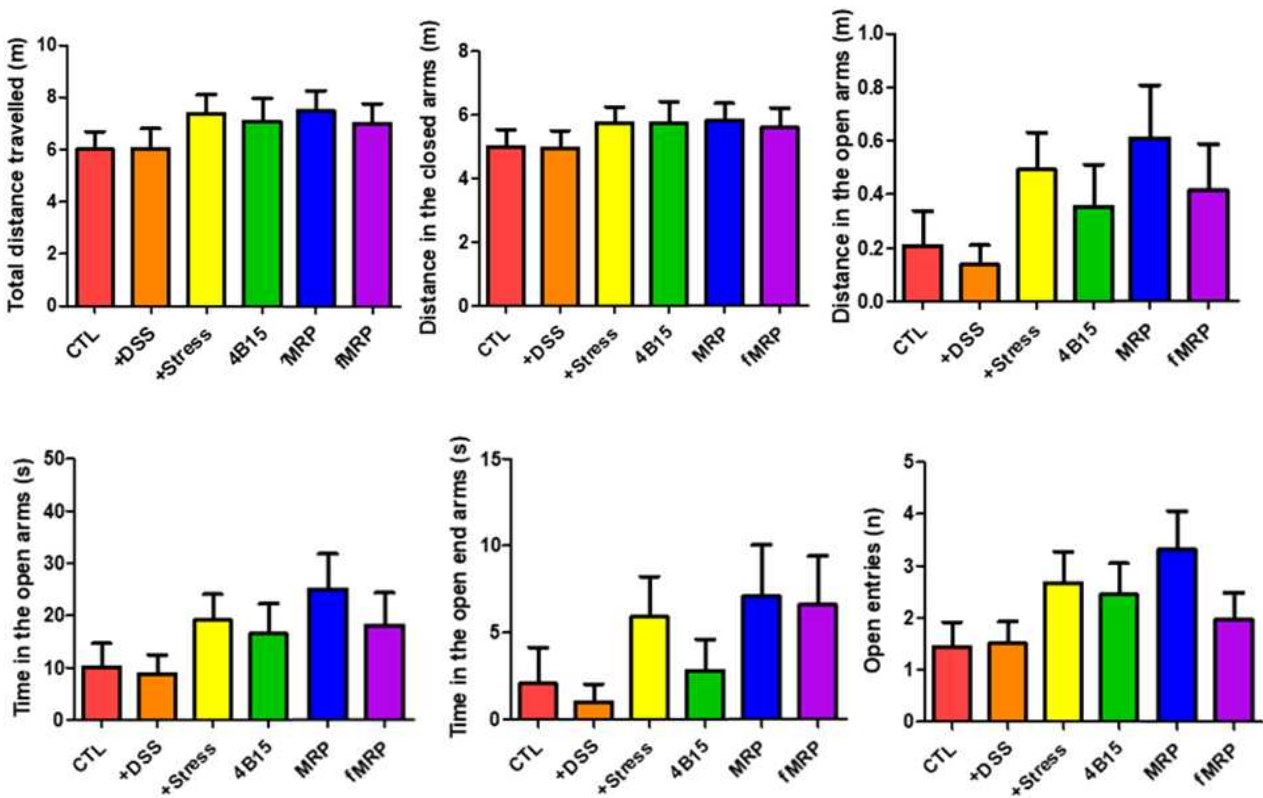
② 정신질환 관련 Open field test: 실시간 비디오 추적 시스템을 이용하여 한정된 공간 내의 마우스의 center zone, corner zone에서의 움직임을 추적함으로써 정신질환 관련 증상 측정.

- Open field test 에서 마우스의 center zone, corner zone에서의 움직임을 분석한 결과 우울증상 개선의 척도가 되는 center zone에서의 움직임의 경우 center zone에서의 이동거리나 머문 시간은 DSS 유도 장질환 group이나 stress group 들에서 감소하는 경향을 보이나, center zone에서의 이동 속도의 경우, MRP에서 DSS 장질환 유도 group에 비해 통계적으로 유의한 증상 개선 정도를 관찰할 수 있었음.

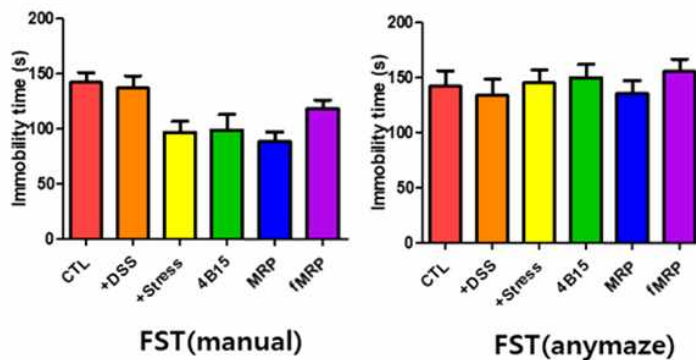


③ Elevated Plus Maze test: 폐쇄된 팔과 개방된 팔에서 머무는 시간과 운동 거리를 측정함으로써 우울/불안 증상을 분석함.

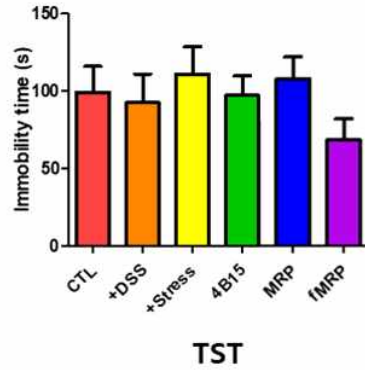
- 실험 수행결과, Elevated Plus Maze 안에서 총 이동거리, 이동 속도에서 각 group간 통계적으로 유의미한 차이는 관찰할 수 없었음. 이는 open field test에서 관찰한 결과와 일치함. 그러나 open arm에서 이동한 거리, 머문 시간, open arm에 들어간 횟수, open arm end에서 머문 시간을 분석한 결과 대조군에 비해 fGOS 식이 group과 MRP group의 값이 현격히 향상된 것을 관찰할 수 있었음. 이는 상대적으로 불안 증상이 개선됨을 의미함.



- ④ Forced swim test: 물이 차있는 원통형 기구에서 강제 수영을 통해 탈출을 포기한 정지시간을 측정함으로써 우울한 정도를 분석

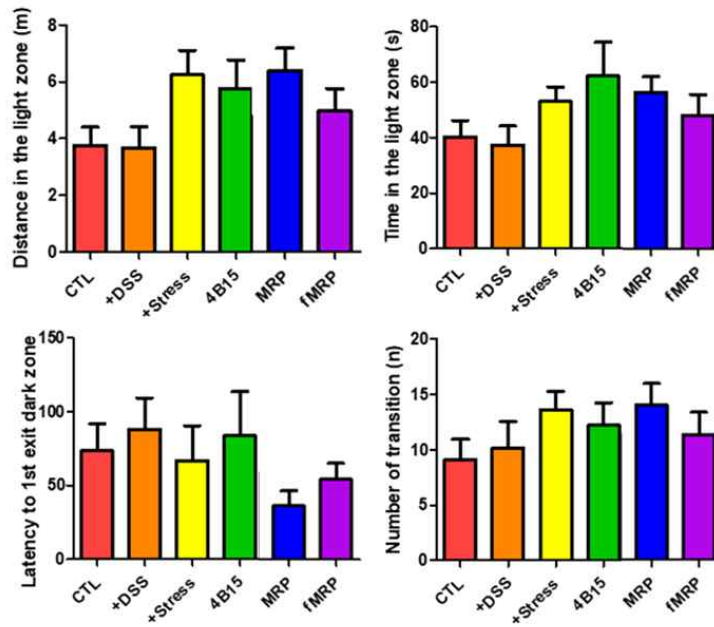


- ⑤ Tail suspension test: 꼬리를 고정시켜 매달린 상태에서 저항을 포기한 시간을 측정함으로써 우울한 정도를 분석.



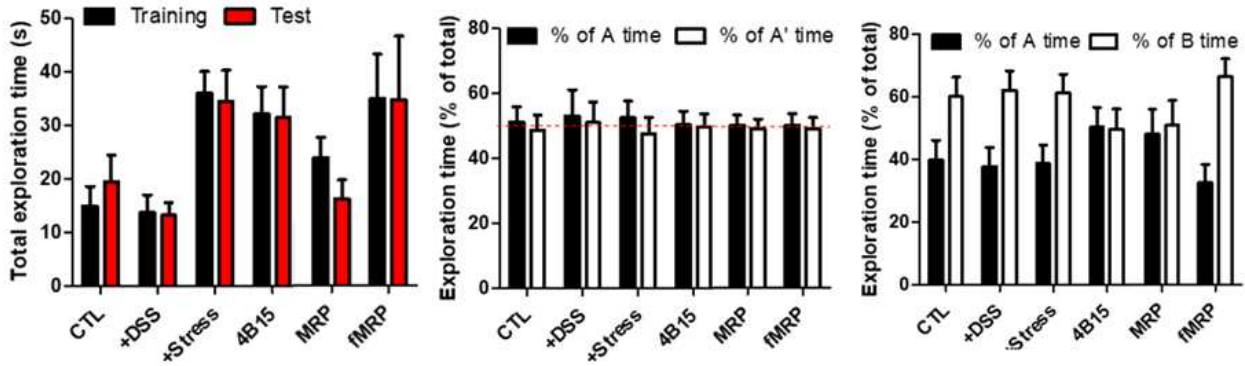
⑥ Light and dark box test: 빛이 차단된 어두운 공간과 밝은 공간에 머무는 시간을 측정함으로써 우울한 정도를 분석하는 행동실험.

- 실험 수행결과 각 group간 유의미한 차이는 없었으나 전반적으로 4B15, MRP, fMRP group 에서 Light zone에서 이동한 거리, 머문 시간 등이 개선되는 경향을 보임.



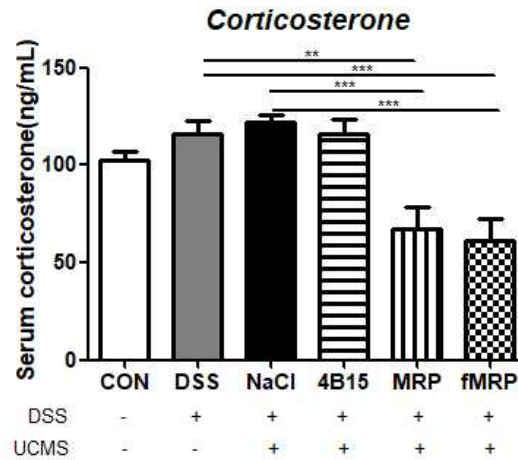
⑦ Novel object test: 익숙한 물체와 새로운 물체에 대한 호기심을 이용하여 인지/학습 능력의 저하 혹은 개선 정도 측정.

- 실험 결과 fMRP group에서 인지 학습 능력의 향상을 타 사료 group에 비해 관찰할 수 있었으며 이는 선행 연구결과와 일치함. 또한 물체에 대한 호기심 자체의 총합 수치를 비교해보면 4B15와 fMRP group이 다른 group에 비해 증가된 경향을 관찰할 수 있음.



(다) 혈중 스트레스 호르몬 농도 변화 측정

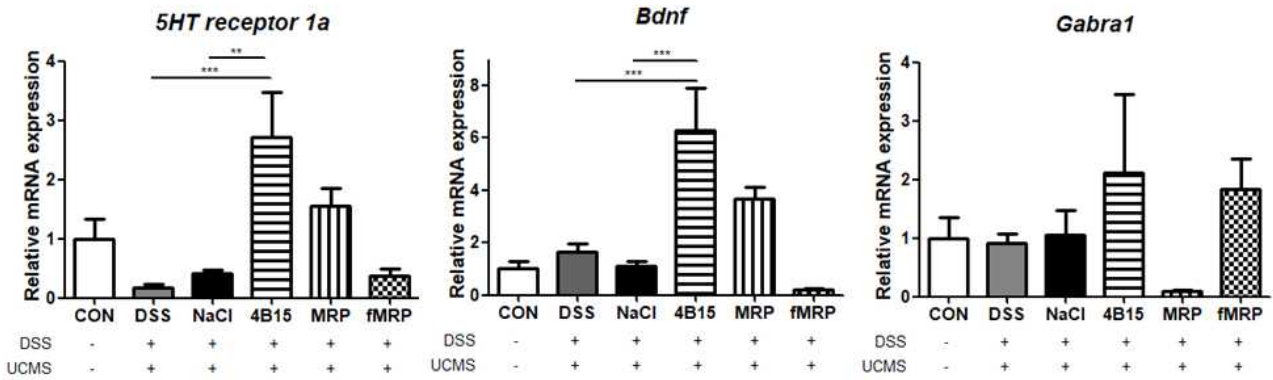
- 본 연구에서 스트레스 호르몬인 corticosterone의 serum 내 농도는 정상그룹과 DSS 및 DSS+Stress 처리 그룹과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 MRP와 fMRP를 처리했을 때 DSS 및 DSS+Stress 처리 그룹과 비교하여 유의적인 감소를 보임.



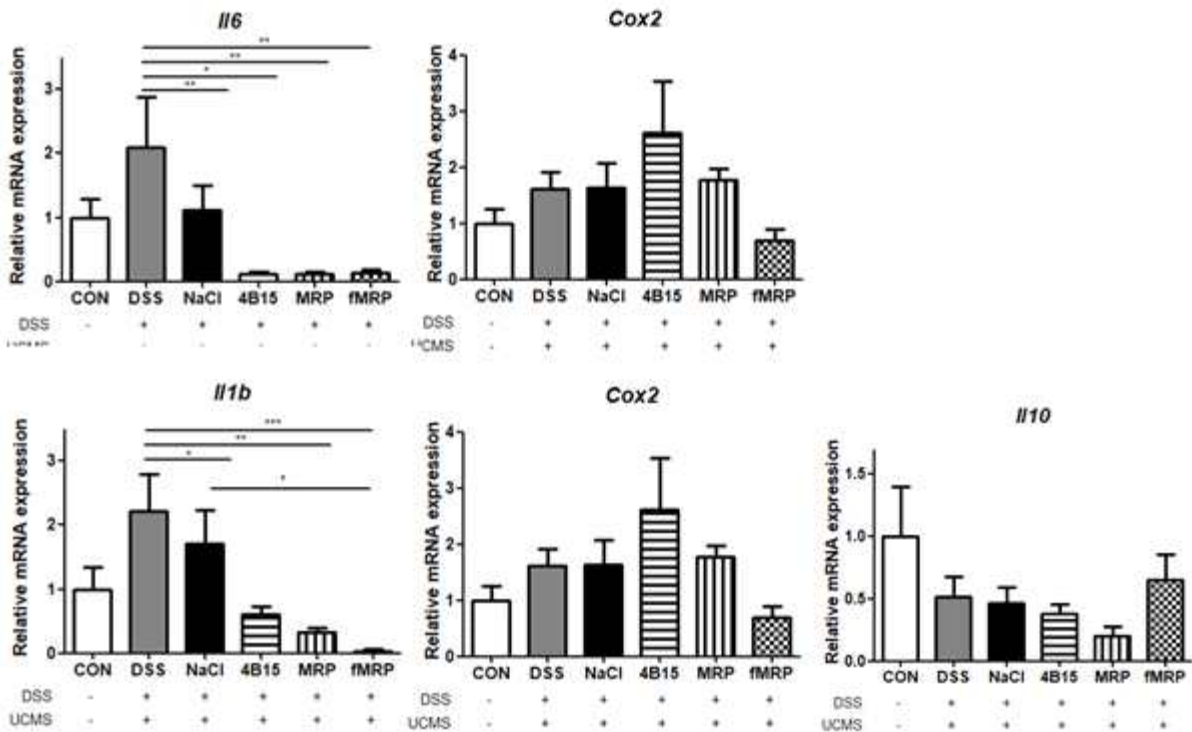
(라) 뇌에서의 분석 결과

- ① 뇌 조직에서의 신경전달물질 리셉터, 전염증, 밀착연접 단백질 및 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현 측정
 - 뇌 조직에서 전염증, 밀착연접 단백질 및 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현을 알아보았음. 신경전달물질 리셉터로는 Gabra1, 5HT receptor 1a, Bdnf, 전염증과 관련된 유전자로는 IL-6, IL-1b, Cox2, Nf-kB, IL-10, 밀착연접 단백질 관련 유전자로는 ZO-1, Occludin, Claudin5, 세포자멸 관련 유전자로는 Bax, Caspase3의 발현 정도를 각 그룹 사이에서 비교하였음.
 - 뇌 조직에서의 신경전달물질은 DSS와 스트레스에 인한 유의적인 차이는 없었으나, 4B15 균 섭취에 의해 유의적인 차이를 가지고 증가한 것을 관찰 할 수 있었음. BDNF는 인지기능을 담당하는 유전자로, 스트레스를 받으면 발현이 감소하는 것으로 알려져 있음. Gabra1는 신경전달물질인 GABA의 리셉터이며, 5HT receptor 1a

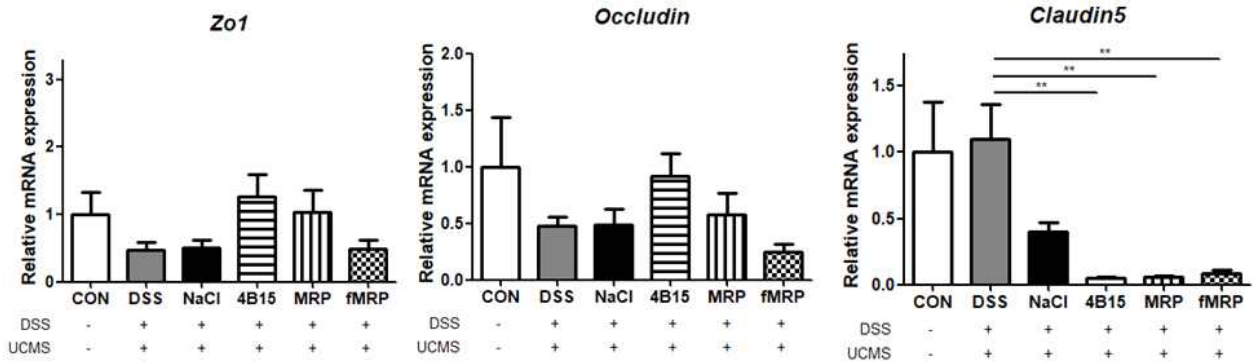
는 세로토닌의 리셉터임. 세로토닌은 항우울작용을 하는 호르몬으로 알려져 있어 4B15 균주의 항우울효능에 대한 간접적 증거를 제시함.



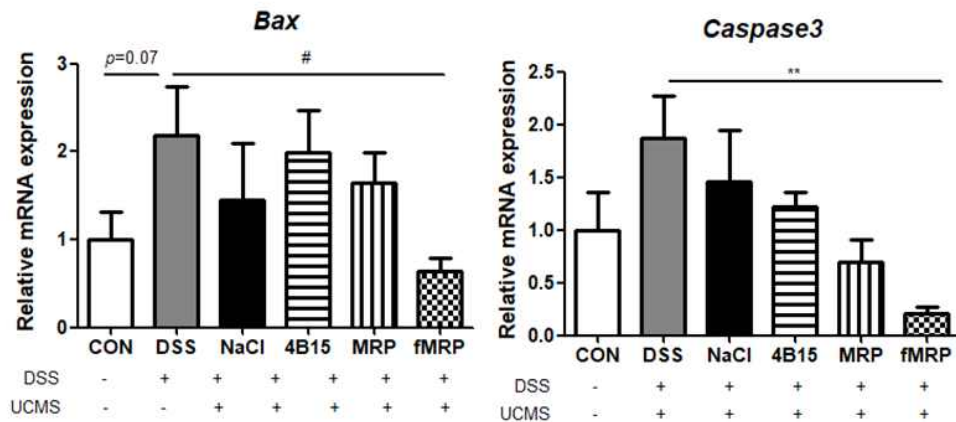
- 전염증 관련 인자의 발현이 DSS+Stress 그룹에서 정상 그룹에 비교했을 때 증가하는 경향성을 보였으며, 샘플 처리를 한 후 유의적으로 감소한 결과를 보임.
- 항염증 인자인 IL-10은 DSS와 스트레스 처리 이후 유의적으로 감소했음.



- 밀착 연결 단백질 유전자인 Zo1와 Occludin의 발현이 DSS와 스트레스 처리에 의해 감소하는 경향을 보이고, 4B15와 MRP 샘플 처리에 의해 회복되는 경향을 보임. 단 Claudin5는 샘플 처리를 통해서 회복되지 않았음.



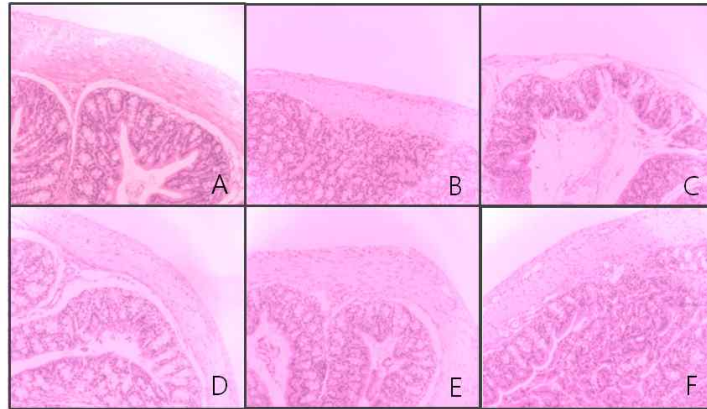
- 세포자멸사인자인 Bax, Caspase3의 발현이 DSS와 스트레스 처리에 의해 증가하는 경향을 보였으나, 통계적 유의차는 없었음. fMRP를 먹인 그룹에서 위의 두 가지 인자가 유의적으로 감소한 것으로 보아, fMRP가 스트레스에 의한 뇌손상의 회복에 대한 도움을 주는 것으로 보임.



(마) 대장에서의 분석 결과

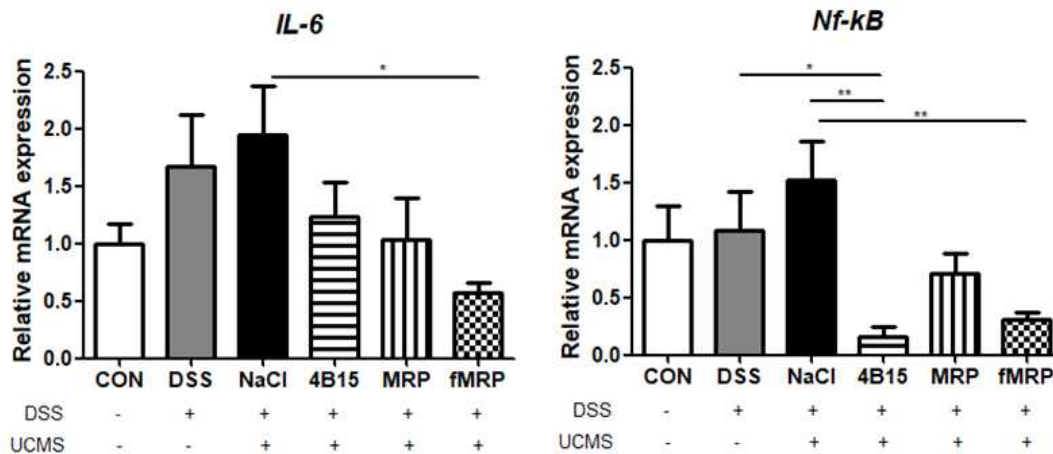
① 대장의 조직 병리학적 결과

- 대장 조직의 H&E 염색 결과, 정상 그룹에 비해 DSS와 DSS+Stress를 같이 처리한 그룹에서 장벽이 약간 파괴되고 얇아진 것이 관찰되었음. 이는 DSS와 스트레스의 영향으로 장에 부정적인 결과를 끼친 것으로 볼 수 있음. 반면에 나머지 처리 그룹에서는 대조군에 비해 정상 그룹과 유사한 수준으로 대장 조직이 개선된 것을 관찰할 수 있었음.

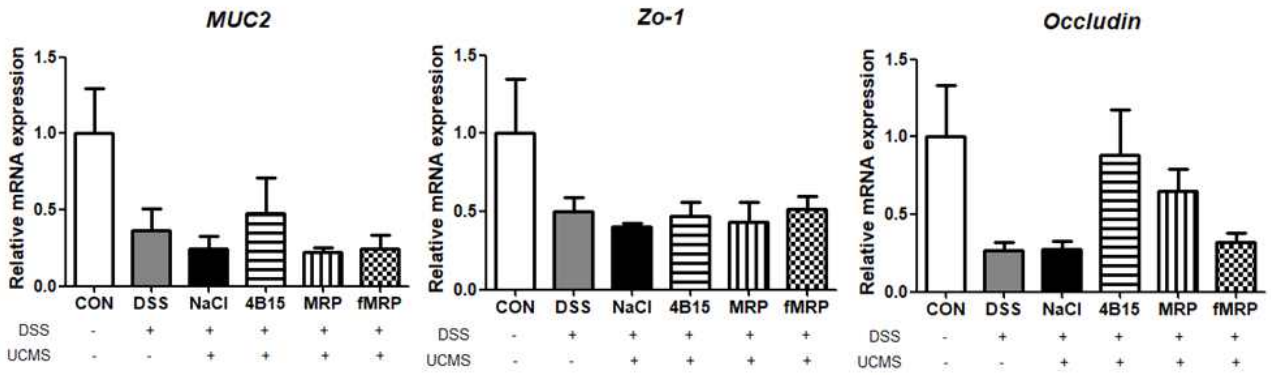


(A)Control, (B)DSS, (C)DSS+Stress, (D)*L. rhamnosus* 4B15, (E)MRP, (F)fMRP

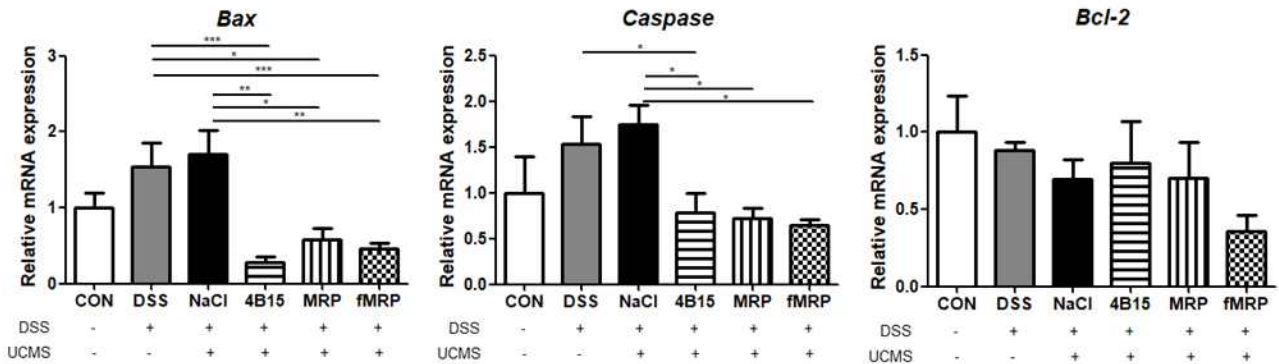
- ② 대장 조직에서 전염증, 밀착연접 단백질 및 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현
- 대장 조직에서 전염증, 밀착연접 단백질 및 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현을 알아보았음. 전염증과 관련된 유전자로는 IL-6, Nf-kB, 밀착연접 단백질 관련 유전자로는 ZO-1, occludin, MUC2, 세포자멸 관련 유전자로는 Bax, caspase, bcl-2의 발현 정도를 각 그룹 사이에서 비교하였음.
 - 본 연구에서 전염증 관련 인자의 발현이 DSS+Stress 그룹에서 정상 그룹에 비교했을 때 증가하는 경향성을 보였으며, fMRP 처리를 한 후 유의적으로 감소한 결과를 보임.



- 본 연구에서 밀착연접 단백질 ZO-1, occludin과 뮤신생성 인자 MUC2의 발현이 정상그룹과 비교했을 때 DSS, DSS+Stress처리 그룹에서 감소하는 경향성을 보였고, 샘플 처리 후에 밀착연접 단백질에서 다시 회복하는 경향성을 보였지만 유의적인 차이는 보이지 않음.



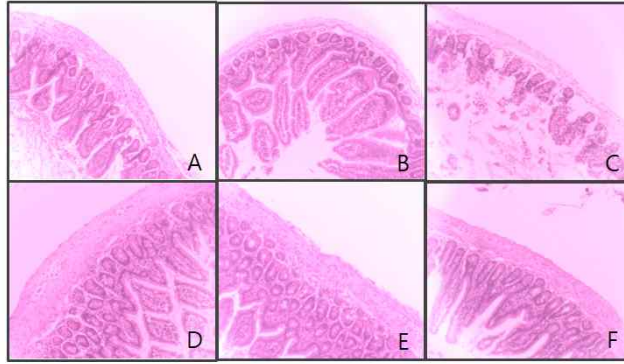
- 본 연구에서 세포자멸 관련 인자인 bax, caspase의 발현은 정상그룹에 비교했을 때 DSS, DSS+Stress 처리 그룹에서 증가하는 경향성을 보였고 샘플 처리를 했을 때 다시 유의적으로 감소함을 보였음. bcl-2의 발현은 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았음.
- 여포성 림프종에 나타나는 세포성 염증 유전자인 bcl-2는 다른 유전자와는 달리 여러 조건 하에서 유도되는 세포자멸을 억제시키는 기능이 있음. 이때 bax는 bcl-2 단백질과 헤테로 이합체를 형성하고 bcl-2의 세포사 억제기능을 소멸시킴.



(바) 소장에서의 분석 결과

① 소장의 조직 병리학적 결과

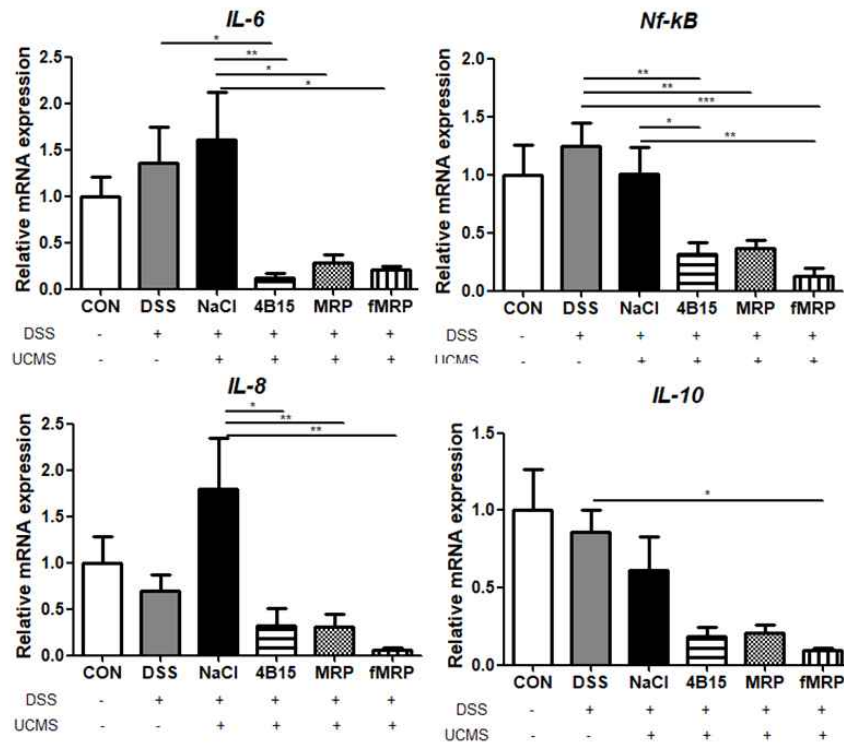
- 소장 조직의 H&E 염색 결과, 정상 그룹에 비해 DSS와 DSS+Stress를 같이 처리한 그룹에서 장벽이 약간 파괴되고 얇아진 것이 관찰되었음. 이는 DSS와 스트레스의 영향으로 장에 부정적인 결과를 끼친 것으로 볼 수 있음. 반면에 나머지 처리 그룹에서는 대조군에 비해 정상 그룹과 유사한 수준으로 소장 조직이 개선된 것을 관찰할 수 있었음.



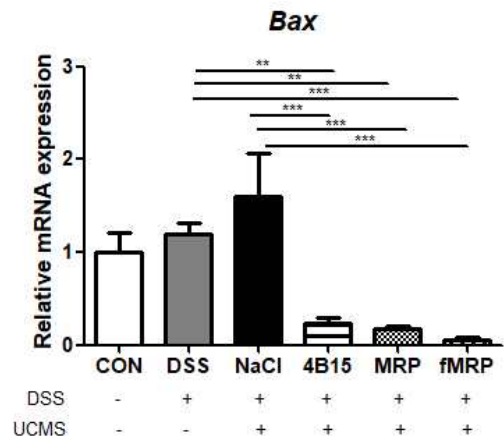
(A)Control, (B)DSS, (C)DSS+Stress, (D)*L. rhamnosus* 4B15, (E)MRP, (F)fMRP

② 소장 조직에서 염증, 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현

- 소장 조직에서 염증 및 세포자멸 관련 유전자의 mRNA 발현을 알아보았음. 염증과 관련된 유전자로는 IL-6, IL-8, IL-10, Nf-kB, 세포자멸 관련 유전자로는 Bax의 발현 정도를 각 그룹 사이에서 비교하였음.
- 본 연구에서 전염증 관련 인자의 발현이 DSS+Stress 그룹에서 정상 그룹에 비교했을 때 증가하는 경향성을 보였으며, 샘플 처리를 한 후 유의적으로 감소한 결과를 보임. 항염증 인자인 IL-10에서는 효과적인 결과를 보이지 못함.



- 세포자멸과 관련된 유전자인 Bax의 발현을 분석했을 때, DSS와 스트레스 처리후 증가하는 경향을 보였고, 3가지 샘플처리 그룹에서 모두 유의적으로 감소했음.



2-1-3. 발효 당화유단백질을 이용한 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구

[제2협동 : 고려대학교 이광원]

가. 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인 (*in vitro* co-culture study)

(1) 실험 내용

(가) 발효 당화유단백질의 염증 억제 활성 스크리닝

① 수령 샘플의 종류

- 당화유단백질 6종을 주관기관인 서울우유에서 제공받고, 이를 이용한 발효 당화유단백질 8종을 제1협동에서 제공받아 사용하였음.

㉠ 당화유단백질 (표 3-1)

표 3-1. 당화유단백질 샘플명

유단백질	당	명명
Whey protein isolate (WPI)	Glucose	Gw-Glc
	Galactose	Gw-Gal
Sodium caseinate	Glucose	Gc-Glc
	Galactose	Gc-Gal

㉡ 발효 당화유단백질 (표 3-2)

표 3-2. 발효 당화유단백질 샘플명

유단백질	당	발효균주	명명
Whey protein isolate (WPI)	Glucose	4B15	Gw-Glc-4B15
	Glucose	4M13	Gw-Glc-4M13
	Galactose	4B15	Gw-Gal-4B15
	Galactose	4M13	Gw-Gal-4M13
Sodium caseinate	Glucose	4B15	Gc-Glc-4B15
	Glucose	4M13	Gc-Glc-4M13
	Galactose	4B15	Gc-Gal-4B15
	Galactose	4M13	Gc-Glc-4M13

② 실험 방법

㉠ NO assay

- 대식세포 (macrophage)는 외부 침입 물질으로 인한 첫 번째 면역작용인 선천면역에 관여하는 세포로, 염증반응으로 nitric oxide를 생성함. 이때의 nitric oxide는 염증반응이 증가함에 따라 생성량도 증가하므로 염증반응 정도를 확인하고자 할 때 측정하여 비교할 수 있음
- 18시간 배양한 상등액 50 μ l와 griess reagent를 100 μ l 섞어 반응시킴. Sodium nitrite로 100 μ M부터 0 μ M까지 정량 곡선을 작성하여 상등액에 생성된 nitric oxide의 nitrite (μ M)를 구함
- 발효 당화유단백질의 염증 억제 효과를 더 효과적으로 확인하기 위하여 mouse 유래 대식 세포인 RAW 264.7 세포를 6×10^5 cells/well로 seeding한 후 overnight 하여 발효 당화유단백질 및 당화유단백질을 농도별로 처리함. 2 시간 후 LPS를 100 μ g/ml로 추가로 처리하여 총 18 시간 배양 후 상등액을 얻고, 남은 세포로 MTT assay를 진행함

㉡ MTT assay

- 살아있는 세포에서 보라색 formazan을 형성하는 MTT 시약을 1 mg/ml로 세포에 처리하여 3시간 후 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 그 흡광도를 540 nm에서 측정함. 아무것도 처리하지 않은 control을 100%로 계산하여 농도별 세포생존율을 %로 계산하여 비교함

(나) 발효 당화유단백질의 장 세포 독성 확인 및 사이토카인 확인

① 장세포를 이용한 처리 농도 결정 및 세포독성 확인

㉠ MTT assay

- 발효 당화유단백질을 섭취하였을 때, 장내 기저성 염증을 완화할 수 있는지 확인하기 위해 샘플은 Caco-2에 처리함. 따라서 Caco-2에서 세포독성을 나타내지 않는 농도를 결정

하기 위하여 MTT assay를 Caco-2에서 실시하였으며, 샘플을 농도별로 처리하여 세포 생존율을 바탕으로 최고 처리 농도를 결정함. 처리 시간은 TEER값 및 western blot 처리 시간을 바탕으로 24시간을 처리하였으며, 24시간에서 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유의적인 차이가 나지 않는 농도를 처리 농도로 결정함

② 발효 당화유단백질에 의한 장세포의 사이토카인 발현 확인

㉠ Real-time PCR

- Caco-2 장 내피 세포에 발효 당화유단백질을 세포 독성이 없는 농도로 처리한 2시간 후 LPS로 염증을 유도함. LPS를 처리한 4시간 후 RNA iso plus (Trizol)을 처리하여 세포의 RNA를 얻고 real-time PCR로 정량함. 장 세포의 염증 반응 시 증가한다고 알려진 IL-8 사이토카인의 mRNA 발현량을 housekeeping gene인 β -actin의 발현량과 비교하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값으로 정량함

㉡ primer sequence (표 3-3)

표 3-3. primer suquence

IL-1 β	Sense	5'-CGGCCACATTTGGTTCTAGA-3'
	Antisense	5'-AGGGAAGGGTTGCTCATC-3'
IL-8	Sense	5'-AGAGTGATTGAGAGTGGACC-3'
	Antisense	5'-ACTTCTCCACAACCCTCTG-3'
β -actin	Sense	5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'
	Antisense	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

(다) 발효 당화유단백질의 RAW264.7/Caco-2 co-culture 모델에서 장내 기저성 염증 완화 효과 확인

① Co-culture 모델 (RAW264.7/Caco-2 co-culture)을 이용한 발효 당화유단백질의 기저성 염증 예방 효과 확인 (*in vitro*)

㉠ 공동 배양 모델

- Co-culture 모델은 Transwell을 이용함. Insert 위 부분인 apical side에는 Caco-2를 분주하고 아래 부분인 basolateral side는 배지를 분주하여 monolayer를 형성할 수 있도록 21일간 배양하여 분화시킴. 21일째 되는 날 RAW264.7 세포가 있는 basolateral plate와 Caco-2가 배양된 insert를 공동 배양함. Co-culture 모델에 샘플을 Caco-2에 먼저 처리하고 4시간 배양한 후 LPS를 RAW264.7에 처리하여 24시간 대식 세포의 염증을 유발함

- 기저성 염증이 일어난 장내 염증 모델은 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7과 인체

유래 장세포주인 Caco-2를 사용함(그림 3-1). Caco-2 세포는 monolayer를 형성하였을 때, 인체의 장과 비슷한 성격을 가진 세포로 분화하는 것으로 알려져 있음. 따라서 *in vitro* 상에서 발효 당화유단백질을 섭취하였을 때 장의 염증 반응 조절 정도를 확인하기 위하여 발효 당화유단백질을 Caco-2의 상층부 (apical)에 처리하고, 기저성 염증을 재현하기 위해 대표적인 외부 유래 염증 물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 RAW 264.7에 처리함

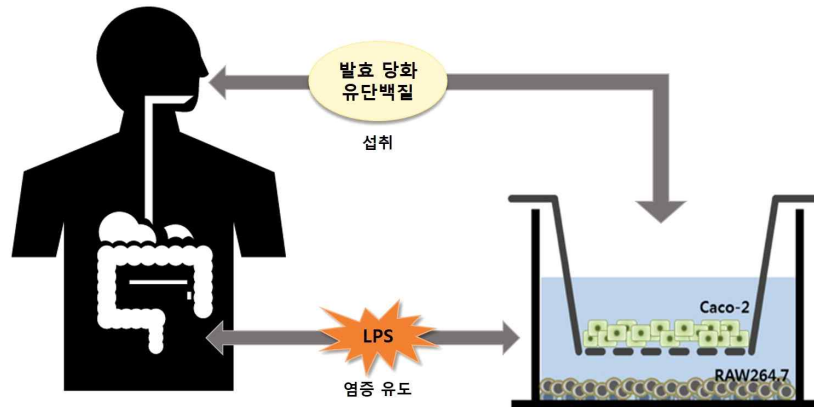


그림 3-1. RAW264.7/Caco-2 co-culture 모델과 인체의 비교 모식도

㉞ TEER 값 측정

- Caco-2 monolayer가 형성되면 직류 전류를 흘려줬을 때 monolayer에 의해 저항값이 증가하게 되는 원리를 이용함. EVOM epithelial volttohmmeter (World Precision Instruments, USA)를 이용하여 저항값을 측정하고, 이를 transwell의 면적으로 곱하여 Ωcm^2 단위로 계산함. 실험에서는 Caco-2를 seeding하고 800 Ωcm^2 이 되었을 때 monolayer를 충분히 형성하였으며, co-culture를 진행하여 LPS 처리 후 24시간 동안의 monolayer 붕괴를 확인하기 위하여 시간별로 TEER값의 변화를 측정함

㉞ 염증성 사이토카인 감소 확인

- RAW 264.7의 염증반응으로 인하여 Caco-2의 monolayer integrity가 감소할 때 동시에 염증 반응으로서 사이토카인인 IL-1 β 와 IL-8의 생성이 증가하는 것으로 알려져 있음. 따라서 basolateral side에 LPS를 처리하고 4시간 후 Caco-2를 RNA iso plus (trizol)으로 처리하여 Caco-2에서 RNA를 얻어내어 사이토카인을 real-time PCR로 확인함. Real-time PCR에 사용한 primer는 표 14와 같음

㉞ Western blot analysis

- 세포 내의 단백질을 용해하는 RIPA buffer를 이용하여 세포의 단백질을 얻은 뒤, sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 완충용액과 증탕하여 시료를 준비함. 이를 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 전기영동시킨 후 표적 단백질을 항체와 반응시켜 이

를 확인함

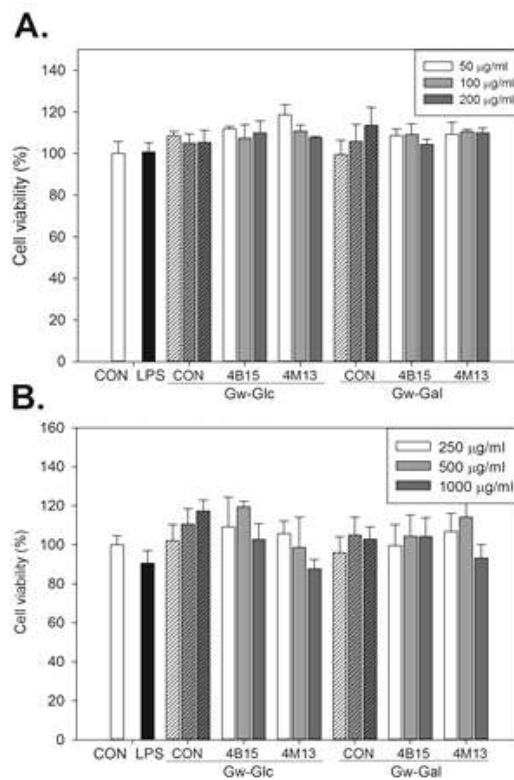
- 장내 기저성 염증 모델에서 Gw-Gal-4M13과 Gal-4M13을 4시간 처리한 후 면역 세포에서 분비하는 사이토카인 중 장의 염증을 일으키는 tumor necrosis- α (TNF- α)를 장 세포주인 Caco-2에 처리하여 세포 내 신호전달 과정 인산화 효소 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs)의 인산화를 확인함

(2) 연구 결과

(가) 발효 당화유단백질의 염증 억제 활성 스크리닝

① 발효 당화유단백질 8종의 RAW 264.7에서 처리 농도 결정

- 발효 당화유단백질 8종을 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때, 50~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 Gw 발효물의 경우 세포 생존율에 영향이 있는 농도가 아님을 확인함 (그림 3-2 A). 따라서 더 높은 농도인 250~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 확인하였을 때, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 모든 발효물 및 당화유단백질이 세포생존율이 양호하므로 처리 농도로 결정함 (그림 3-2 B)
- Gc 발효물 및 당화유단백질의 경우 50~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 세포 독성을 나타내는 샘플이 있어 비교를 위하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리를 결정함 (그림 3-2 C)



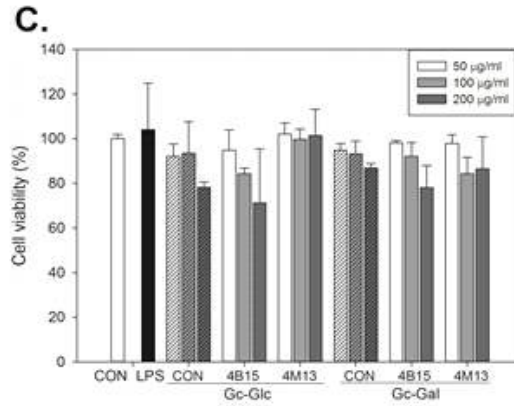


그림 3-2. 발효 당화유단백질 8종의 RAW 264.7에서의 세포 생존율

- A. 50~200 µg/ml의 Gw 발효 당화유단백질 처리
- B. 250~1000 µg/ml Gw 발효 당화유단백질 처리
- C. 50~200 µg/ml의 Gc 발효 당화유단백질 처리

② NO assay

- MTT assay로 결정된 처리 농도에 따라 Gw 발효물과 당화유단백질은 250 및 500 µg/ml을 처리하고(그림 3-3), Gc 발효물과 당화유단백질은 50 및 100 µg/ml을 처리하여 NO 생성량을 NO assay로 측정함. Gw 발효물의 경우 당화유단백질 대조군에 비해 LPS로 인한 NO 생성을 감소시켜주는 효과를 보였으며, 특히 Gw-Glc-4B15 및 Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M15의 경우 농도에 따라 감소 효과가 증가하는 양상을 보임. 반면 Gc 발효물 및 당화유단백질은 LPS에 의한 NO 증가를 감소시켜주는 효과를 보이지 못함. 따라서 이후 실험에 Gw 발효당화유단백질을 이용하여 장내 염증 감소 효과가 있는 샘플을 선정하고자 함

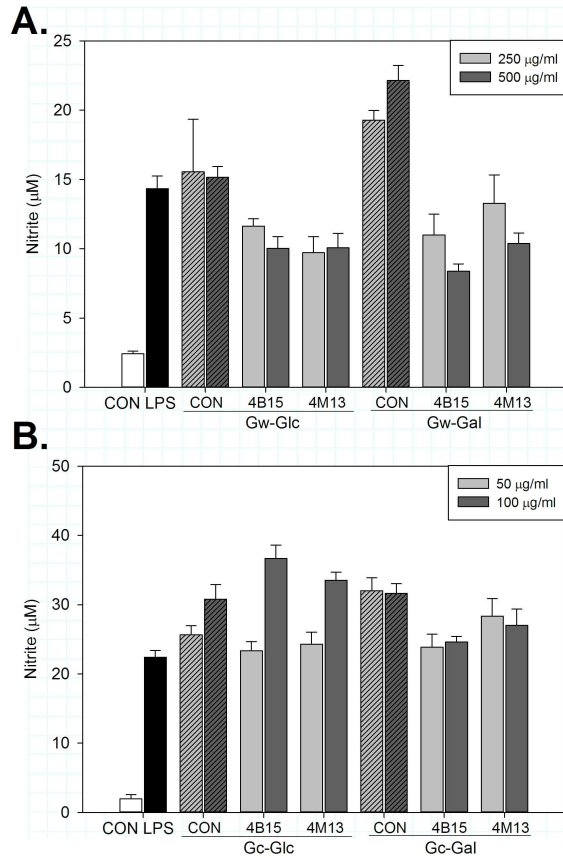


그림 3-3. 염증이 유발된 대식세포에서 발효 당화유단백질의 NO 생성량

A. Gw 발효물 및 당화유단백질 250~500 µg/ml 처리

B. Gc 발효물 및 당화유단백질 50~100 µg/ml 처리

(나) 발효 당화유단백질의 장 세포 독성 확인 및 사이토카인 확인

① 장세포를 이용한 처리 농도 결정 및 세포독성 확인

- MTT assay를 통하여 Caco-2 처리 농도를 세포 생존율로 결정함. Caco-2의 세포생존율은 Gw 발효물 및 당화유단백질에서 낮은 농도인 50 µg/ml에서 높아 처리 농도로 결정함. Gc 발효물은 그 보다 더 높은 농도인 100 µg/ml에서도 높게 유지되어 해당 농도를 처리하도록 결정함(그림 3-4)

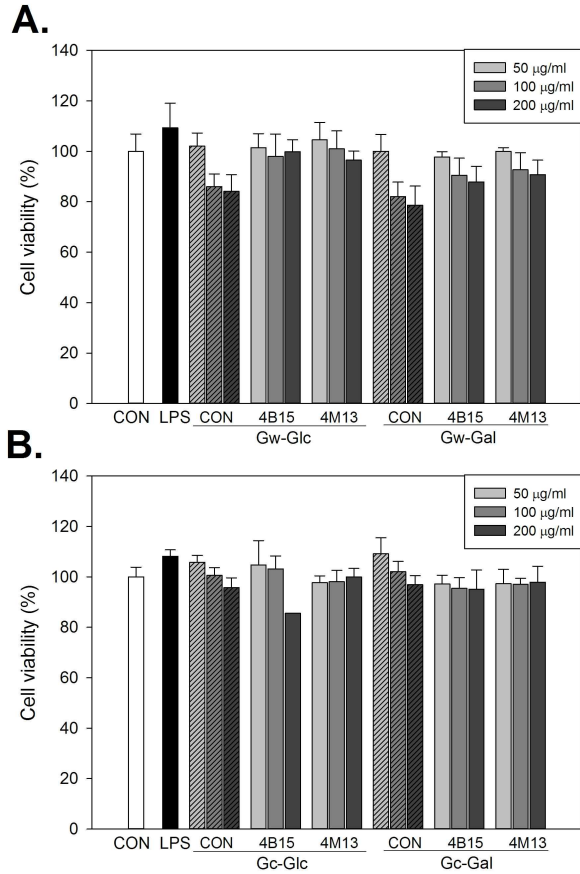


그림 3-4. Caco-2에서 발효 당화유단백질 및 당화유단백질의 세포 생존율

A. Gw 발효 당화유단백질 및 당화유단백질 처리

B. Gc 발효 당화유단백질 및 당화유단백질 처리

② 발효 당화유단백질에 의한 장세포의 사이토카인 발현 확인

- Caco-2에서 LPS로 유도된 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-8을 감소시켜줌을 real-time PCR로 확인함. 특히 4종의 Gw 발효물 중에서 Gw-Gal-4M13은 LPS로 인한 IL-8를 mRNA level에서 감소시킬 수 있음을 확인함(그림 3-5)

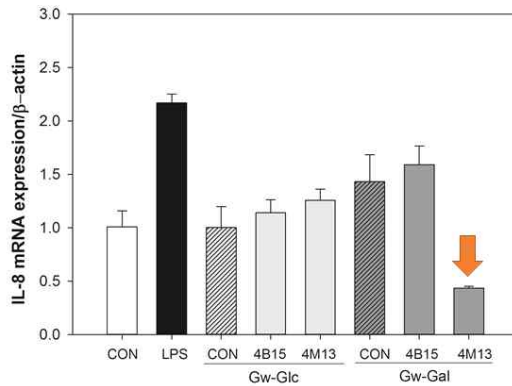


그림 3-5. Caco-2에서 Gw 발효 당화유단백질 및 당화유단백질에 의한 IL-8 mRNA 발현량

(다) 발효 당화유단백질의 RAW264.7/Caco-2 co-culture 모델에서 장내 기저성 염증 완화 효과 확인

① Co-culture 모델 (RAW264.7/Caco-2 co-culture)을 이용한 발효 당화유단백질의 기저성 염증 예방 효과 확인 (*in vitro*)

㉠ TEER 값 측정

- Caco-2 단독 배양 및 co-culture 모델에서 Gw-Gal-4M13이 농도 의존적으로 LPS를 이용한 장내 염증 감소에 효과를 주었으므로, 이를 이용하여 장의 tight junction 붕괴를 막아주는 효능을 TEER 값 측정을 통하여 확인함(그림 3-6)

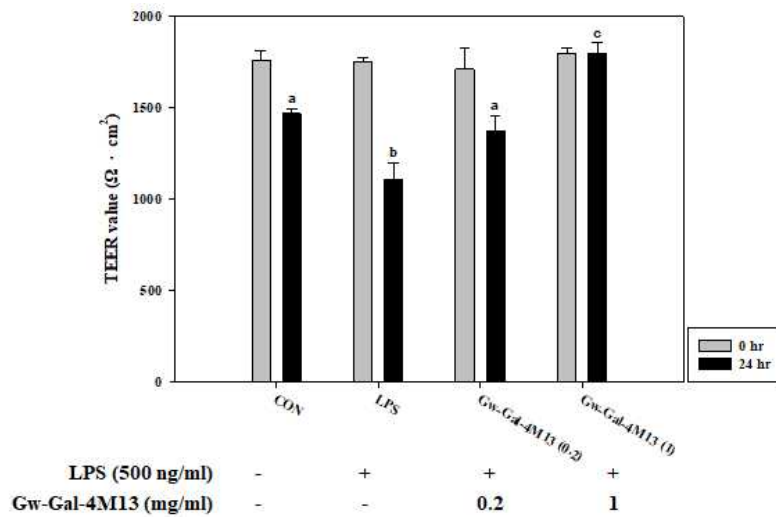


그림 3-6. TEER를 이용한 Gw-Gal-4M13의 LPS 처리로 인한 염증 완화 효과

Duncan's ANOVA test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 표시함 ($p < 0.05$)

㉡ 염증성 사이토카인 감소 확인

- RAW 264.7의 염증으로 인한 Caco-2의 염증 발현시 증가하는 IL-8 및 IL-1 β 의 경우, Caco-2만 배양했을 때와 같은 경향으로 Gw-Gal-4M13 발효 당화유단백질의 염증성 사이토카인의 감소가 나타남(그림 3-7)

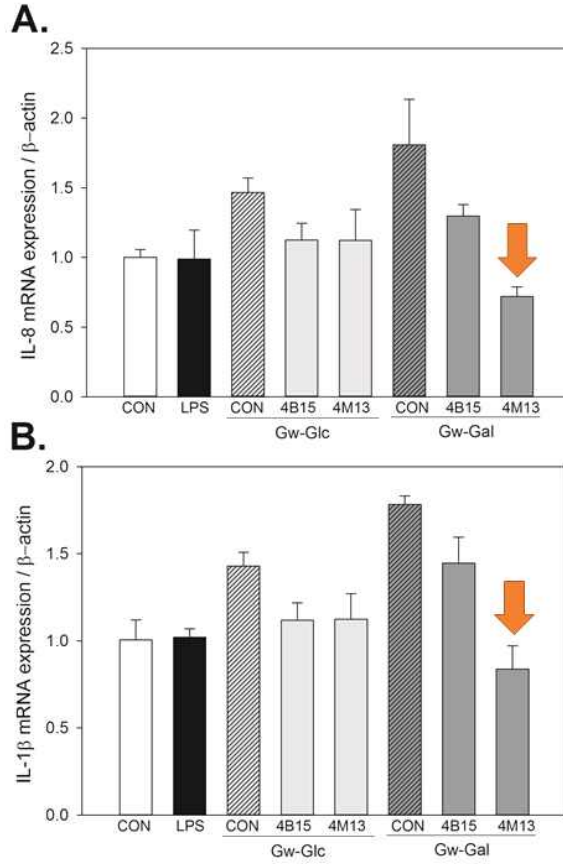


그림 3-7. RAW 264.7/Caco-2 co-culture 모델에서 Caco-2의 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현량

㉔ Western blot analysis

- Gw-Gal-4M13과 Gal-4M13을 1 mg/ml과 0.2 mg/ml으로 처리한 후 TNF- α 50 ng/ml 를 추가로 처리하여 MAPK의 인산화를 확인함. 그 결과 TNF- α 로 인한 신호전달 과정은 P38, JNK, ERK 중 ERK의 인산화에 크게 작용하며, 또한, Gw-Gal-4M13의 처리 농도에 따라 ERK의 인산화를 억제시킴을 확인하였음. 대조군인 Gal-4M13도 ERK의 인산화를 감소시킬 수 있으나, Gw-Gal-4M13에 비해 작은 감소 효과를 나타냄(그림 3-8)

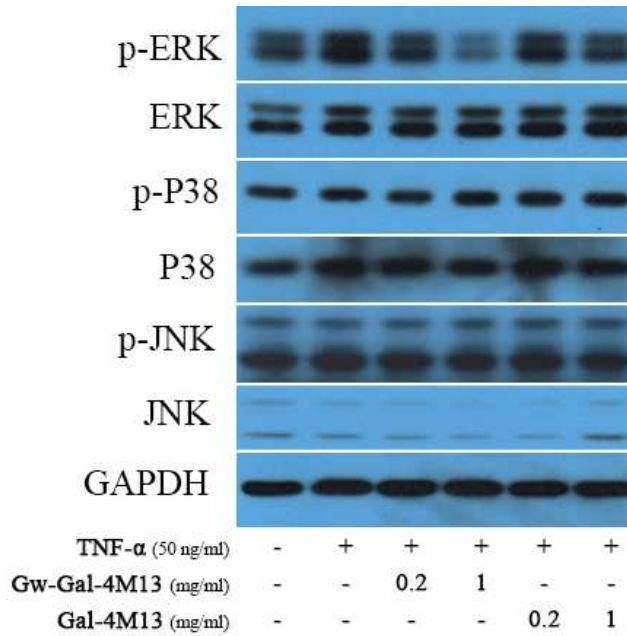


그림 3-8. Western blot을 이용한 Gw-Gal-4M13의 TNF- α 로 인한 ERK의 인산화 억제 효능

나. 발효 당화유단백질의 안전성 및 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구 (*in vivo* study)

(1) 실험 내용

(가) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 안전성 검증

① 실험 재료 및 방법

㉠ 종 및 계통 : C57BL/6N mouse, 수컷 8주령

㉡ 투여 샘플

- 발효당화유단백질: *in vitro*에서 염증 완화 효능이 발견된 Gw-Gal-4M13을 이용하였으며, 유산균이 모두 포함 된 상태로 경구투여에 사용하였고, 건조된 건물의 양을 기준으로 투여함
- 당화유단백질: Gw-Gal-4M13의 대조군으로 사용하였으며, 발효되지 않은 당화유단백질로 Gw-Gal로 명명함. Gw-Gal-4M13 제조 시 들어가는 Gw-Gal가 5%인 것을 이용하여 동일한 단백질양을 기준으로 투여함

㉢ 발효 당화유단백질 (Gw-Gal-4M13) 및 당화유단백질 (Gw-Gal)의 단회 및 반복 투여 독성시험을 수행함으로써, 시험 기간 중 사망예, 장기 또는 혈액학적 이상 유무 등을 판단하여 안전성을 확인함

② 단회 투여 독성 시험

㉠ 투여 농도 및 그룹 (표 3-4)

표 3-4. 단회 투여 독성 시험 그룹 및 투여량.

그룹	투여농도 (mg/kg b.w.)	개체수 (마리)
CON	-	10
Gw-Gal-4M13	1500	10

㉡ 실험 방법 및 기간

- 경구투여로 시료를 투여하며, 투여 하루 전 절식 후 주사기와 존대를 이용하여 1회 투여 후 2주간 임상 증상을 관찰함
- 단회 투여 독성시험은 투여 당일 8시간은 매시간 일반 증상을 관찰하고, 다음날부터 1일 1회씩 2주간 일반 증상, 독성 증상, 운동성, 외관 및 사망 유무를 관찰함
- 장기 무게 측정: 희생 시 간, 신장, 비장, 심장, 정소, 갑상선, 폐의 무게를 측정하여 몸무게로 나누어 체중 대비 장기의 무게 비율을 비교함
- 혈액학적 분석: 희생 시 복대동맥에서 혈액을 얻은 후 혈청을 분리하여 녹십자에 의뢰하여 혈액 내 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, protein 함량을 분석함

③ 다회 투여 독성 시험

㉠ 투여 농도 및 그룹

- 저농도, 중농도, 고농도 선정 (15, 150, 1500 mg/kg body weight (b.w.))(표 3-5)

표 3-5. 다회 투여 독성 시험 그룹 및 투여량

그룹	투여농도 (mg/kg b.w.)	개체수 (마리)
CON	-	9
Gw-Gal	846	10
Gw-Gal-4M13 15	15	10
Gw-Gal-4M13 150	150	10
Gw-Gal-4M13 1500	1500	10

㉡ 실험 방법 및 기간

- 14일간 1일 1회 투여하며, 각 개체가 해당하는 그룹의 투여 당시 체중 평균을 기준으로 각 그룹에 해당하는 필요량에 맞춰 시료를 용해시켜 경구 투여 함
- 반복 투여 독성시험은 매일 2회 일반 증상, 독성증상, 빈사 및 사망 유무를 관찰함
- 장기 무게 측정: 희생 시 간, 신장, 비장, 심장, 정소, 갑상선, 폐의 무게를 측정하여 몸 무게로 나누어 체중 대비 장기의 무게 비율을 비교함
- 혈액학적 분석: 희생 시 복대동맥에서 혈액을 얻은 후 혈청을 분리하여 녹십자에 의뢰하여 혈액 내 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, protein 함량을 분석함

(나) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

① 실험 재료 및 방법

㉠ 종 및 계통

- C57BL/6N 마우스, 수컷 8주령

㉡ 투여 농도 및 그룹 (표 3-6)

표 3-6. DSS 염증 완화 효능 확인 실험의 그룹 및 투여량

그룹	투여농도 (mg/kg b.w.)	2% DSS 급수	개체수
CON	-	x	9
DSS	-	o	9
Gal-4M13	236	o	9
Gw-Gal-4M13	750	o	9

㉢ 투여 방법

- 경구투여로 Gal-4M13, Gw-Gal-4M13을 2주간 (1일 1회) 투여하였고, 8일차부터 7일간 2% DSS를 식수 대신 자유훁수 하여 대장염을 유도시킴 (그림 3-9)
- Dextran sulfate sodium (DSS)을 이용하여 장내 염증을 유발한 동물 모델을 이용하여 발효 당화유단백질의 장내 만성 염증 억제 조절 기능성을 확인함

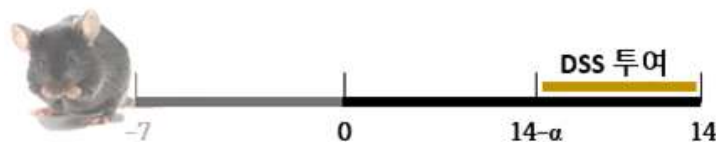


그림 3-9. 투여 기간 및 방법 (0일부터 14일까지 2주간 1일 1회 시료 투여 진행)

㉣ 결장 조직 수집

- 마지막 경구투여 종료 후 18시간 뒤 마우스를 희생시킴. 결장을 적출하여 무게를 측정하고 결장의 교차지점부터 직장 말단부분까지 길이를 측정함. 결장 말단 부분은 현미경과 생화학적 분석에 이용함. 결장의 나머지 부분은 균질화하여 -70°C에서 보관하여 이후 실험에 사용함

② 몸무게 변화 확인 및 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

- DSS 공급 당일부터 7일 동안 마우스 분변의 농도와 상태를 DAI scoring system을 이용하여 측정함. 각 마우스의 DAI 점수는 각 마우스의 분변 농도와 혈변 점수를 더하고 2로 나누어 계산함 (표 3-7)

표 3-7. 질병(혈변 및 설사)활성도 점수 지표

	0	1	2	3	4
Stool consistency	normal	normal	loose stool	loose stool	diarrhea
Stool blood	0 negative	1 ±	2 +	3 ++	4 gross

- DSS로 인한 염증 발현 시 감소하는 몸무게가 실험 군에서 회복될 수 있는지 DSS 공급 후 매일 몸무게를 측정하여 비교함

③ 조직 병리학적 검사

- 결장 부분을 10% 포르말린 용액에 24시간 고정 후 수돗물로 세척하여 알코올로 탈수시킴. 파라핀으로 고정하여 24시간 동안 56°C에서 반응시킨 후 슬라이스하여, 슬라이드에 수집하여 탈파라핀화 후에 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 현미경을 통해 관찰함

④ 결장 조직에서의 사이토카인 발현 측정

- 결장 조직에서 염증 발현 마커 사이토카인의 생성을 real-time polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 mRNA 수준에서 확인함. 염증 유발 시 증가하는 TNF-α 및 interleukin(IL)-6의 mRNA 발현량을 정량함

⑤ 결장 조직에서의 항산화 효소 발현 측정

- 결장 조직을 얻어 균질화 한 후 항산화 효소의 양을 측정함. DSS로 인한 염증 발현 시 증가하는 항산화 효소 발현의 양을 측정하여 염증을 완화 효능을 확인함
- Myeloperoxidase (MPO) 활성 확인: MPO는 과산화수소를 분해하는 효소로, DSS로 인한 장내 염증 발현 시 활성이 증가되는 것으로 알려짐. Hexadecyltrimethylammonium

bromide가 포함된 인산완충용액 상에서 장을 갈아준 뒤 상등액을 취하여 시험 용액으로 함. 시험 용액을 7 μ l 취하여 과산화수소가 포함된 o-dianisidine 용액을 200 μ l 분주하고 시간에 따른 450 nm의 흡광도 변화량을 다음의 식을 이용하여 시험 용액의 장기 질량으로 나누어 구함

- Catalase (CAT) 활성 확인: 과산화수소를 분해하는 CAT의 양을 측정하기 위해 과산화수소와 시험 용액을 반응시킨 후 dichromate와 중탕하여 생성된 chromic acetate의 양을 562 nm에서 측정하여 계산함
- Superoxide dismutase (SOD) 활성 확인: SOD가 superoxide anion radical을 위협도가 더 낮은 과산화수소로 치환시키는 성질을 이용함. Xanthine oxidase와 xanthine을 완충액과 함께 시험 용액에 가하여 SOD의 양을 측정함
- Glutathione peroxidase (GPx) 활성 확인: GPx는 GSH를 GSSG로 만들고 이 때 생성된 GSSG를 NADPH와 반응시켰을 때 NADP+로 환원시키므로 이를 340 nm에서 측정하여 환산함

⑥ 혈액으로부터 Nitric oxide (NO) 측정

- 염증 시 혈액 내에 증가하는 NO의 양을 측정하여 체내 염증의 완화를 확인함. 혈액을 1000 rpm에서 10 분간 원심분리 후 얻은 혈청 80 μ l와 동량의 griess 시약 80 μ l를 첨가함. 실온에서 10 분간 방치 시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정함. NO의 농도는 NaNO₂ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산함
- 혈액의 일부 헤모글로빈의 용혈반응으로 인해 NO 측정 시 간섭을 받아 혈액 외에 대장 조직을 이용하여 NO 생성을 유도하는 효소인 iNOS (inducible NO synthase)를 mRNA 수준으로 확인하는 것을 추가함

⑦ 혈액으로부터 TNF- α 생성량 측정

- 혈액을 얻어 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 혈청을 얻음. TNF- α 의 생성량 측정은 ELISA kit를 이용하여 측정함

(2) 연구 결과

(가) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 안전성 검증

① 단회 투여 독성 시험

㉠ 생존율 및 무게 변화

- 단회 독성시험은 Gw-Gal-4M13 1500 mg/kg b.w.의 고농도로만 진행되었으며, 1회 경구투여 하여 8시간 동안 아무런 증상이 발견되지 않았고 그 후 2주간 이상 증후 및 사망사례가 없었음 (표 3-8)

- 1500 mg/kg b.w.의 Gw-Gal-4M13 투여 그룹과 대조군을 비교했을 때 체중의 변화 및 장기 무게에서 유의적 차이를 보이지 않은 것을 보아 1500 mg/kg b.w.의 Gw-Gal-4M13의 단회 투여는 독성을 나타내지 않았음(표 3-9, 3-10)

표 3-8. 단회 독성 실험을 통한 생존율

그룹	생존율 (%)
CON	100
Gw-Gal-4M13	100

표 3-9. 단회 독성 실험 중 체중 변화

기간	체중변화 (g)	
	CON	Gw-Gal-4M13
1일	22.7±0.88	22.3±1.03
4일	23.8±0.82	23.5±1.08
8일	24.0±0.94	23.5±1.09
12일	24.2±0.92	23.5±1.09
14일	23.9±0.94	23.0±1.2

표 3-10. 단회 독성 시험에 대한 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

	CON	Gw-Gal-4M13
간	4.97±0.2	4.85±0.16
신장	6.7±0.24	6.67±0.2
비장	6.97±0.26	6.91±0.21
심장	7.44±0.28	7.39±0.22
정소	8.4±0.26	8.42±0.3
갑상선	7.73±0.28	7.69±0.24
폐	5.55±0.22	5.44±0.19

%, 장기 무게 / 쥐체중 *100

㉞ 혈액학적 분석

- 혈액학적 분석에서도 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, total, glucose, protein, total 를 확인한 결과, Gw-Gal-4M13 고농도 투여군과 대조군의 수치가 유의적 차이를 보이지 않음(표 3-11)

표 3-11. 단회 독성 실험에 대한 혈액학적 분석

Parameter	CON	Gw-Gal-4M13
Albumin (g/dL)	3.46 ± 0.15	3.52 ± 0.13
ALP (U/L)	102.7 ± 9.3	107.3 ± 5.38
ALT (U/L)	25 ± 3.8	40.3 ± 35.81
AST (U/L)	44.7 ± 5.96	65.6 ± 45.35
Bilirubin, total (mg/dL)	< 0.1	< 0.1
Glucose(S) (mg/dL)	265.6 ± 37.01	261.2 ± 26.73
Protein,total (g/dL)	4.83 ± 0.16	4.84 ± 0.14

② 다회 투여 독성 시험

㉑ 생존율 및 무게 변화

- 다회 독성 시험은 Gw-Gal-4M13 저농도, 중농도, 고농도 (15, 150, 1500 mg/kg b.w.)의 농도로 14일간 1일 1투여를 진행하였으며, Gw-Gal의 경우 Gw-Gal-4M13 1500 mg/kg b.w. 그룹과 동일한 단백질 양을 기준으로 계산한 846 mg/kg b.w.으로 같은 방법으로 투여함. 2주간 이상증후 및 사망사례가 없었음(표 3-12)
- 2-3일 간격으로 몸무게의 변화를 측정된 결과 투여 첫날은 Gw-Gal-4M13 15 mg/kg b.w. 투여 그룹이 대조군 및 다른 그룹과 유의차가 있었으나 그 이후로 2주간 그룹 간 몸무게의 유의차는 없었음(표 3-13)
- 2주간의 반복 투여 후 희생을 통하여 장기무게를 비교한 결과 중농도, 고농도 투여군의 간에서 대조군과 유의적 차이가 있었고, 고농도 투여군은 갑상선에서 유의차를 보였음. 간과 갑상선 모두 대조군 대비 무게가 감소한 것을 알 수 있음(표 3-14)

표 3-12. 다회 투여 독성 시험 생존율

그룹	생존율 (%)				
	CON	Gw-Gal	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
	100	100	100	100	100

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함

표 3-13. 다회 독성 실험 중 체중 변화

기간	체중변화 (g)				
	CON	Gw-Gal	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
1일	24.38±0.76	24.08±0.9	23.59±0.78*	24.32±0.46	24.46±0.47
3일	24.1±0.69	23.87±0.79	24.20±0.86	24.30±0.94	23.87±0.96
5일	24.36±0.93	24.06±0.88	24.33±1.21	24.45±0.79	23.95±0.85
7일	24.46±0.79	23.99±0.67	24.5±1.32	24.6±0.95	24.27±0.73
9일	24.41±0.91	24.26±0.84	24.55±1.4	24.61±0.88	24.36±1.08
12일	24.71±0.85	24.55±0.95	24.97±1.07	24.71±0.89	24.47±0.77
14일	24.73±0.8	24.65±1.03	25.19±1.32	25.05±0.92	24.31±0.72

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함

Duncan's ANOVA test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p<0.05$)

표 3-14. 다회 독성 시험 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

	간	신장	비장	심장	정소	갑상선	폐
CON	5.06±0.24	1.24±0.04	0.27±0.03	0.49±0.03	0.66±0.11	0.29±0.06	0.58±0.07
Gw-Gal	4.89±0.30	1.24±0.07	0.29±0.07	0.5±0.04	0.66±0.09	0.26±0.07	0.55±0.05
Gw-Gal-4M13 15	4.87±0.43	1.24±0.11	0.27±0.03	0.5±0.06	0.63±0.06	0.26±0.05	0.51±0.17
Gw-Gal-4M13 150	4.70±0.20*	1.28±0.09	0.24±0.02	0.5±0.04	0.67±0.06	0.24±0.04	0.61±0.05
Gw-Gal-4M13 1500	4.58±0.22*	1.24±0.11	0.23±0.03	0.5±0.03	0.62±0.13	0.23±0.04*	0.57±0.05

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

Duncan's ANOVA test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p<0.05$).

㉞ 혈액학적 분석

- 혈액학적 분석에서도 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, total, glucose, protein, total 확인한 결과, Gw-Gal-4M13 모든 그룹에서 대조군 대비 유의적 차이를 보이지 않음 (표 3-15)

표 3-15. 다회 독성 실험에 대한 혈액학적 분석

	CON	Gw-Gal	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
Albumin (g/dL)	3.5±0.19	3.3±0.23	3.5±0.13	3.6±0.1	3.8±0.17
ALP (U/L)	96.8±6.14	94.7±12.81	96.7±12.28	105.3±6.72	94.7±14.12
ALT (U/L)	23.9±3.18	28.8±7.39	29.3±8.9	23.8±5.16	23.8±3.33
AST (U/L)	40.4±2.74	47.7±8.56	49.6±15.1	46.5±10.88	43.3±2.83
Bilirubin, total (mg/dL)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Glucose (S)(mg/dL)	296.8±35.43	293.2±36.07	299±37.7	289.3±48.12	308.4±52.37
Protein, total (g/dL)	5±0.19	4.8±0.19	5±0.1	5.1±0.12	5.3±0.25

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

Duncan's ANOVA test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p < 0.05$).

(나) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

- Gw-Gal-4M13을 독성 실험에서 진행했던 1500 mg/kg b.w. 보다 낮은 농도인 750 mg/kg b.w.으로 경구투여함. 대조군으로는 Gal-4M13을 동일 부피의 액체를 기준으로 나온 건조물의 비율을 적용하여 236 mg/kg b.w.으로 투여함. Gal-4M13은 Gw-Gal-4M13과 동일한 제조 조건에서 Gw-Gal를 제외한 상태로 발효한 당 발효 대조군임

① 몸무게 변화 확인 및 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

㉞ 몸무게 및 장기 무게 변화 확인

- 모든 그룹은 경구투여 8일차부터 14일차까지 총 7일간 2% DSS 자율급수를 진행하였으며 물, Gal-4M13, Gw-Gal-4M13을 투여한 그룹 간 체중 변화에는 유의적 차이가 보이지 않음 (그림 3-10)
- 장기 무게를 비교하였을 때, 정소에서 Gw-Gal-4M13 투여 그룹이 CON 그룹 대비 유의적으로 증가함. 그 외 다른 장기에서는 모든 그룹에서 유의적 차이를 보이지 않음 (표 3-16)

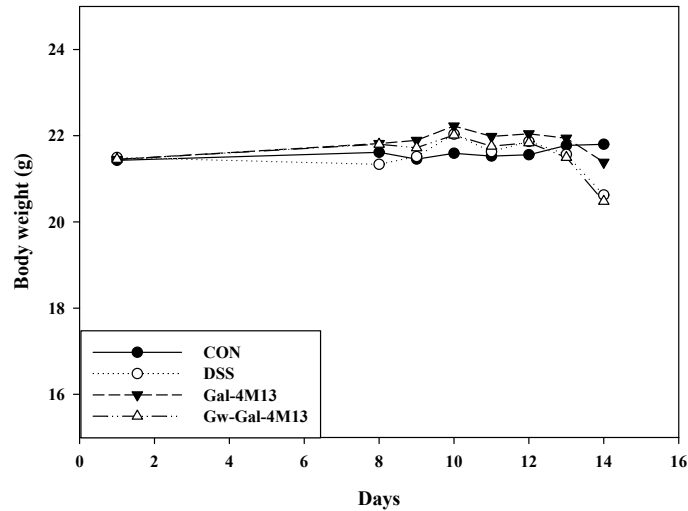


그림 3-10. 발효 당화유단백질의 반복 투여 및 2% DSS 급수에 따른 몸무게 변화 (유의차가 없는 경우 표기 안함)

표 3-16. 발효당화유단백질의 반복 투여 및 2% DSS 급수에 따른 장기 무게 차이

	간	신장	비장	정소	심장	갑상선	폐	대장
CON	4.67±0.67	1.31±0.1	0.26±0.04	0.74±0.22	0.52±0.05	0.24±0.03	0.64±0.06	3.21±0.38
DSS	4.27±0.34	1.24±0.24	0.34±0.1	0.83±0.12	0.51±0.03	0.23±0.07	0.63±0.09	3.55±0.63
Gal-4M13	4.18±0.61	1.32±0.16	0.35±0.11	0.78±0.18	0.53±0.07	0.57±1.12	0.70±0.1	3.49±0.63
Gw-Gal-4M13	4.36±0.16	1.24±0.09	0.29±0.07	0.93±0.08*	0.50±0.03	0.21±0.08	0.65±0.08	2.93±0.63
장기 무게 / 쥐체중*100								

Gal-4M13 236 mg/kg b.w., Gw-Gal-4M13 750 mg/kg b.w.을 의미함.

Duncan's ANOVA test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 (p<0.05)(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함).

㉔ 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 및 대장 길이 측정

- 2% DSS 급수로 짧아진 장 길이를 비교했을 때 CON 그룹 대비 모든 그룹에서 장의 길이가 유의적으로 짧아짐. DSS 대비 비교했을 시 Gal-4M13 및 Gw-Gal-4M13의 장 길이가 유의적으로 더 긴 것을 확인함. Gal-4M13과 Gw-Gal-4M13 사이의 유의적인 차이는 나타나지 않음. 또한 분변을 이용한 질병활성도를 계산한 결과 DSS 그룹과 Gal-4M13 및 Gw-Gal-4M13 그룹에서 유의적 차이를 보이지는 않았지만 DSS 그룹 대비 Gw-Gal-4M13의 혈변 및 설사가 다소 적음을 알 수 있음(그림 3-11, 3-12)

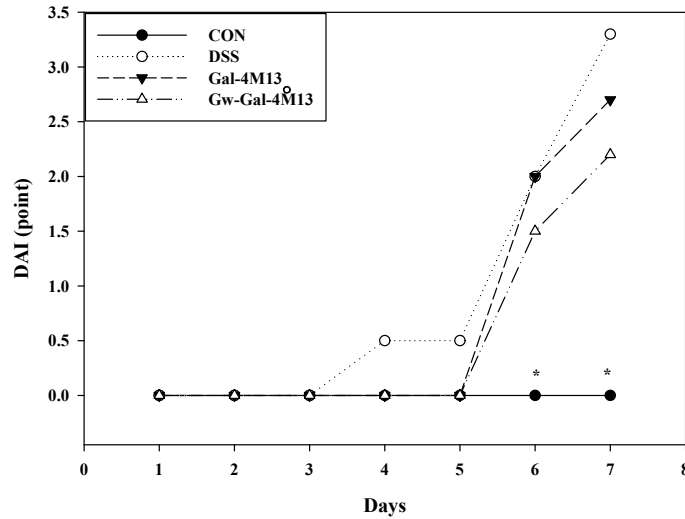


그림 3-11. DSS 급수 후 분변을 이용한 질병활성도 점수 (DAI score)

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 ($p < 0.05$)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

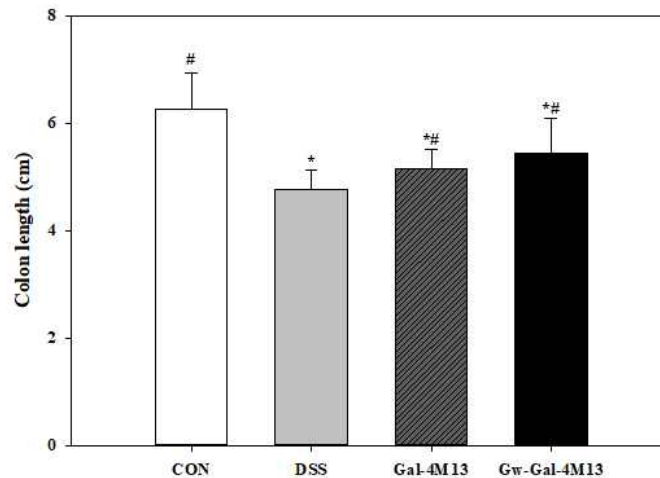


그림 3-12. DSS 급수 후 그룹간 장 길이의 변화

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 ($p < 0.05$),

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

㉔ 장 투과성 측정

- 장의 투과성을 알아보기 위하여 희생 4시간 전에 FITC-dextran을 경구 투여한 후 희생을 통해 얻은 혈액으로 장 투과성을 알아봄. 장의 염증이 유발되어 장벽이 허물어질수록 혈액에서 검출되는 FITC-Dextran의 수치가 높게 측정됨. 실험군의 혈액을 통해 장 투과성을 알아본 결과 CON 그룹과 DSS 그룹에서만 유의적 차이를 보였음. Gal-4M13 그룹은 전 그룹과 유의적 차이를 보이지 않음. Gw-Gal-4M13 그룹에서는 CON 그룹과

유의적 차이가 없는 반면, DSS 그룹과 유의적 차이를 보이는 것을 확인함. 이는 Gw-Gal-4M13이 장벽의 염증완화에 영향을 준다는 것을 의미함(그림 3-13)

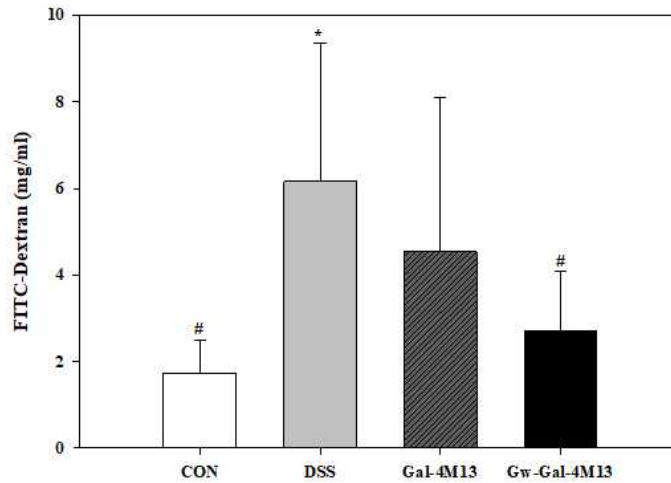


그림 3-13. DSS 투여 후 FITC-dextran을 이용한 장벽 투과 정도

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

② 조직 병리학적 검사

㉠ H&E staining을 이용한 조직 병리학적 검사

- 조직 내 염증 유도정도와 샘플에 의한 염증완화 정도를 조직병리학적으로 분석하고자 하여 진행함
- CON 그룹에 비해 DSS 급수 그룹인 DSS, Gal-4M13, Gw-Gal-4M13 그룹의 장에서는 염증으로 인해 장의 전체 (e) 및 표면(화살표)의 손상을 확인할 수 있었으며 DSS 그룹 대비 Gw-Gal-4M13의 염증완화 정도에는 유의적인 차이를 보이지 않았음(그림 3-14)
- 장의 길이와 장벽의 투과성 결과와 비교하였을 때, 이는 장의 말단부분만을 염색하여 비교한 것으로 장 전체를 대변하기에는 어려움이 따른다는 전문가의 의견이 있음

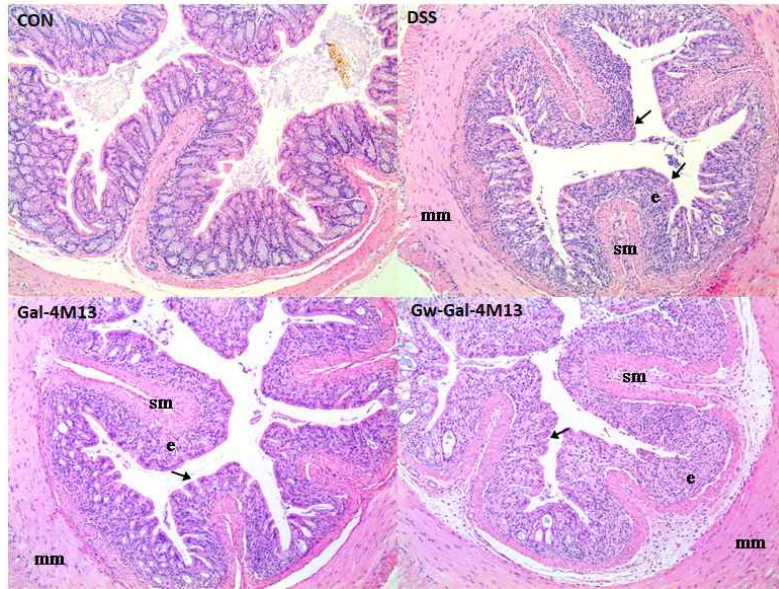


그림 3-14. H&E staining을 이용한 조직병리학적 검사

대장 점막 중 점막하 점막 (mm), 점막하 부조직 (sm)이 표기되어 있으며, 표면 상피의 손상(화살표)과 전체 쇄약 (e)가 표시되어 있음

③ 결장 조직에서의 사이토카인 발현 측정

- 결장 조직을 이용하여 TNF- α 수치를 real time PCR로 실험한 결과, CON 그룹과 모든 그룹간의 유의적 차이는 나타나지 않음. DSS 그룹과 Gal-4M13 그룹간의 유의적 차이 또한 나타나지 않음. 그러나 Gw-Gal-4M13 그룹에서는 DSS 그룹과 Gal-4M13 그룹과의 유의적 차이를 확인할 수 있었으며, 이는 Gw-Gal-4M13이 다른 그룹에 비해 DSS로 인한 장 염증을 완화한다는 것을 의미함(그림 3-15)
- 결장 조직을 이용하여 IL-6 수치를 real rime PCR로 측정한 결과, CON그룹과 모든 그룹간에 유의적인 차이를 보였음. DSS 그룹에 비해 유의적 차이는 나타나지 않았으나, Gal-4M13 및 Gw-Gal-4M13 그룹의 경우 IL-6 발현량이 줄어드는 경향을 보임(그림 3-16)

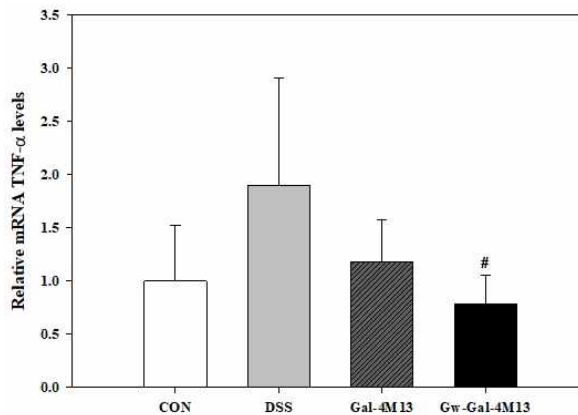


그림 3-15. 결장 내 TNF- α mRNA 발현량

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

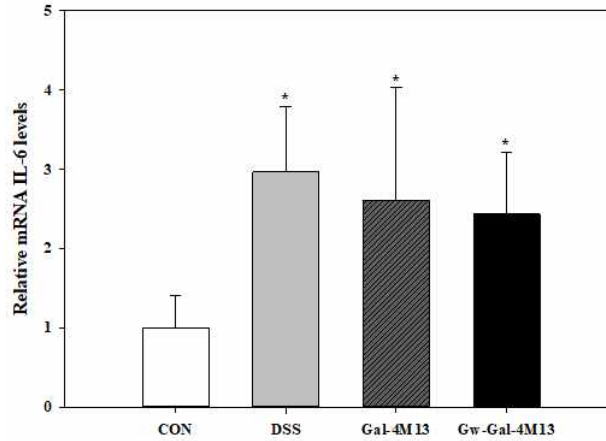


그림 3-16. 결장 내 IL-6 mRNA 발현량

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

④ 결장 조직에서의 항산화 효소 발현 측정

- 결장조직에서 항산화 효소 발현량을 측정하기 위해 MPO, CAT, SOD, GPx 활성도를 확인함(그림 3-17~3-20)
- MPO의 결과 어느 그룹에서도 유의적 차이를 보이지 않았음. MPO는 과산화수소를 산화제로 세포독성을 일으키는 라디칼을 생성하기 때문에 MPO의 수치가 낮을수록 항산화능이 있는 것으로 판단함. 또한 MPO는 염증서 장 질환에서 주로 면역 세포의 침윤 지표로도 활용됨. 따라서 유의적 차이는 보이지 않았지만 Gw-Gal-4M13 섭취 시 MPO 값이 줄어드는 경향을 보이므로 결장 내 면역 세포의 침윤 정도가 적음을 알 수 있고 항염증 효과가 있음을 확인함(그림 3-17)
- CAT의 결과 DSS 그룹 대비 모든 그룹에서 유의적으로 CAT가 증가함. Gal-4M13과 Gw-Gal-4M13에서 acetic acid 내에 있는 dichromate를 chromic acetate로 환원하는 능력이 DSS 그룹에 비해 더 큼을 확인할 수 있음(그림 3-18)
- SOD란 superoxide anion radical을 위험도가 더 낮은 과산화수소로 치환시키는 성질을 이용한 것으로 그 값이 더 클 때 항산화 능력이 있음을 의미. DSS 그룹 대비 CON 그룹만이 유의적인 차이를 나타냈으며, Gal-4M13과 Gw-Gal-4M13과는 유의차는 존재하지 않음. 그러나 DSS 그룹의 SOD 값에 비해 Gal-4M13과 Gw-Gal-4M13 그룹의 SOD 값이 증가한 경향이 확인됨(그림 3-19)

- GPx란 GSH를 GSSG로 만들고 이 때 생성된 GSSG를 NADPH와 반응시켰을 때 NADP+로 환원되는 정도를 나타낸 수치로, 그 값이 클 때 항산화 능력이 있음. 모든 그룹에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, DSS 그룹에 비해 Gw-Gal-4M13 그룹의 값이 증가하는 경향을 보임. 이는 Gw-Gal-4M13 섭취 시에 결장 내의 항산화능이 향상된다는 가능성을 의미함(그림 3-20)

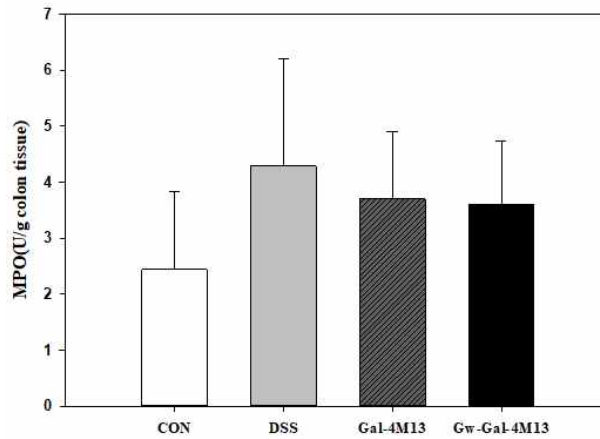


그림 3-17. 결장 조직의 myeloperoxidase (MPO) 활성화도

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

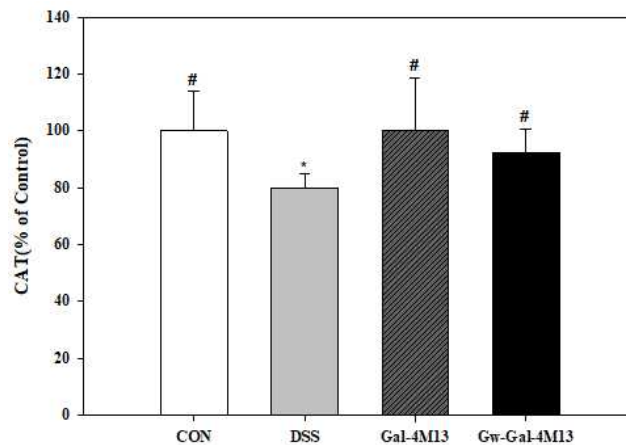


그림 3-18. 결장 조직의 catalase (CAT) 활성화도

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

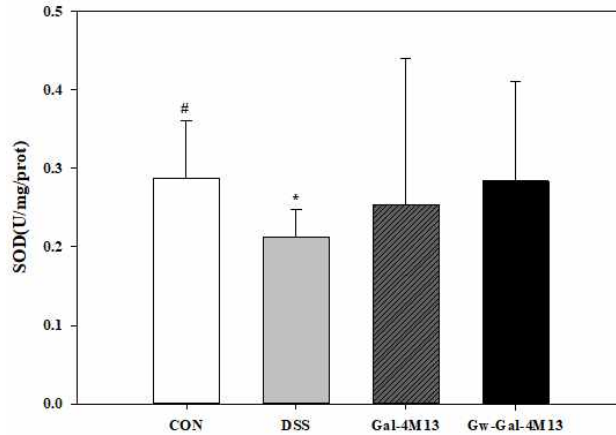


그림 3-19. 결장 조직의 superoxide dismutase (SOD) 활성도

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

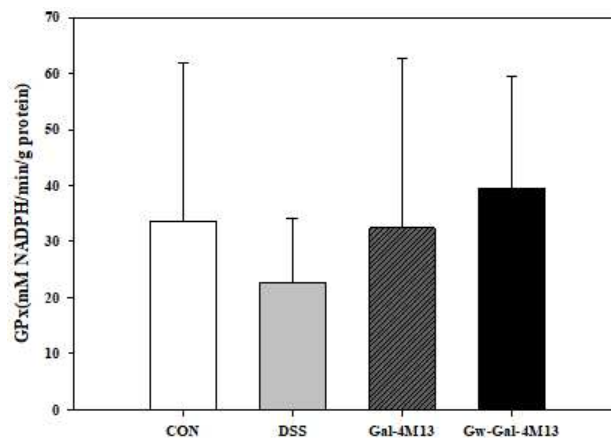


그림 3-20. 결장 조직의 Glutathione peroxidase (GPx) 활성도

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

⑤ 혈액으로부터 Nitric oxide(NO) 측정

- DSS 그룹 대비 Gw-Gal-4M13 그룹은 유의적 차이를 보이지 않았으나 높은 NO 수치를 나타내고 있음. 그룹마다 일부 헤모글로빈의 용혈현상이 일어남에 따라 육안으로도 색의 차이를 보여 NO 측정 시 간섭이 일어났기에 간섭을 받지 않는 다른 방법이나 결장 조직에서의 NO 측정이 추가적으로 필요함(그림 3-21)

- NO 측정 대신 NO 생성 효소인 iNOS를 측정함. 혈액이 아닌 결장 조직을 이용하여 real time PCR을 통해 mRNA 수준으로 iNOS를 확인함. 그 결과 어느 그룹에서도 유의

적인 차이는 나타나지 않음(그림 3-22)

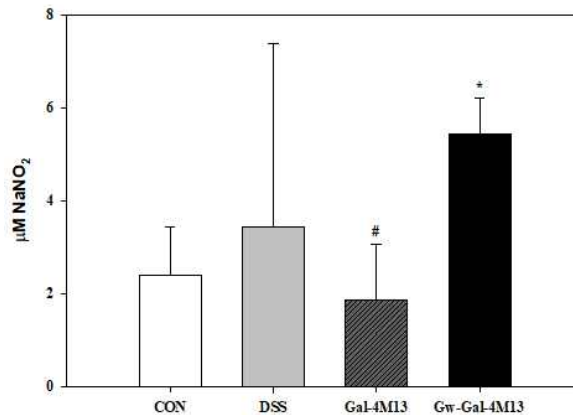


그림 3-21. 혈액 내 NO 생성량

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

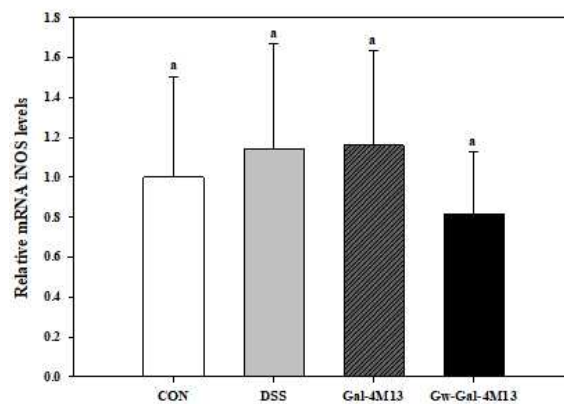


그림 3-22. 결장 내 iNOS mRNA 발현량

Students t-test를 이용하여 CON 대비 유의차이를 표시함 n=7 (p<0.05)

*: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

⑥ 혈액으로부터 TNF-α 생성량 측정

- 혈액을 얻어 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 혈청을 얻음. ELISA kit를 이용하여 혈청 내 TNF-α의 발현량을 측정한 결과 DSS 그룹 대비 모든 그룹이 유의적 차이를 보였으며 CON과 Gal-4M13, Gw-Gal-4M13의 경우는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 가장 높게 검출된 DSS 그룹의 경우 10.16 pg/ml의 농도로 보였으며 나머지 그룹들은 이보다도 유의적으로 낮은 수준으로 검출된 것을 보아 샘플의 염증완화 효과가 있음을 확인함

(그림 3-23)

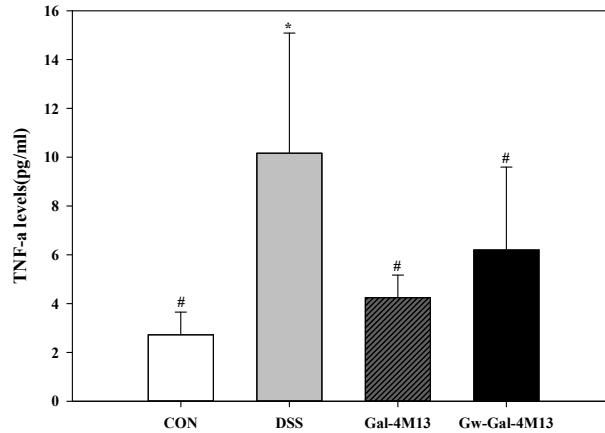


그림 3-23.ELISA를 이용한 혈액 내 TNF-α 발현량

n=7 (p<0.05) *: CON과 유의차가 있는 경우, #: DSS와 유의차가 있는 경우 표기
(단, 유의차가 없는 경우 표기 안함)

다. 발효 당화유단백질 및 시제품의 장내 기저성 염증 및 질환 개선 기능성 연구 (*in vivo* study)

(1) 실험 내용

(가) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질 시제품의 안전성 검증

① 실험 재료 및 방법

㉠ 종 및 계통 : C57BL/6N mouse, 수컷 8 주령

㉡ 발효당화유단백질 농도: 2차년도 *in vivo*에서 염증 완화 효능이 발견된 Gw-Gal-4M13을 이용하였으며, 유산균이 모두 포함 된 상태로 경구투여에 사용하였고, 건조된 건물의 양을 기준으로 투여함

- 발효 당화유단백질 (Gw-Gal-4M13) 시제품의 단회 및 반복 투여 독성시험을 수행함으로써, 시험 기간 중 사망예, 장기 또는 혈액학적 이상 유무 등을 판단하여 안전성을 확인함

② 단회 투여 독성 시험

㉠ 투여 농도 및 그룹 (표 3-17)

표 3-17. 단회 투여 독성 시험 그룹 및 투여량

그룹	투여농도 (mg/kg b.w.)	개체수 (마리)
CON	-	10
Gw-Gal-4M13	1500	10

㉠ 투여 방법 및 기간

- 경구투여로 시료를 투여하며, 투여 하루 전 절식 후 주사기와 존대를 이용하여 1회 투여 후 2주간 임상 증상을 관찰함

㉡ 실험 방법

- 증상관찰: 단회 투여 독성시험은 투여 당일 8시간은 매시간 일반 증상을 관찰하고, 다음날부터 1일 1회씩 2주간 일반 증상, 독성 증상, 운동성, 외관 및 사망 유무를 관찰함
- 혈액학적 분석: 희생 시 복대동맥에서 혈액을 얻은 후 혈청을 분리하여 녹십자에 의뢰하여 혈액 내 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, protein 함량을 분석함
- 장기 무게 측정: 희생 시 간, 신장, 비장, 심장, 정소, 갑상선, 폐의 무게를 측정하여 몸무게로 나누어 체중 대비 장기의 무게 비율을 비교함

③ 다회 투여 독성 시험

㉠ 투여 농도 및 그룹

- 저농도, 중농도, 고농도 선정 (15, 150, 1500 mg/kg body weight (b.w.))(표 3-18)

표 3-18. 다회 투여 독성 시험 그룹 및 투여량

그룹	투여농도 (mg/kg b.w.)	개체수 (마리)
CON	-	10
Gw-Gal-4M13 15	15	10
Gw-Gal-4M13 150	150	10
Gw-Gal-4M13 1500	1500	10

㉠ 투여 방법 및 기간

- 14일간 1일 1회 투여하며, 각 개체가 해당하는 그룹의 투여 당시 체중 평균을 기준으로 각 그룹에 해당하는 필요량에 맞춰 시료를 용해시켜 경구 투여 함

㉡ 실험 방법

- 증상관찰: 반복 투여 독성시험은 매일 2회 일반 증상, 독성증상, 빈사 및 사망 유무를 관찰함

- 혈액학적 분석: 희생 시 복대동맥에서 혈액을 얻은 후 혈청을 분리하여 녹십자에 의뢰하여 혈액 내 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, glucose, protein 함량을 분석함
- 장기 무게 측정: 희생 시 간, 신장, 비장, 심장, 정소, 갑상선, 폐의 무게를 측정하여 몸무게로 나누어 체중 대비 장기의 무게 비율을 비교함

(나) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

① 실험 재료 및 투여방법

- 당뇨 유발 동물에 dextran sulfate sodium (DSS)을 이용하여 장내 염증을 유발한 동물 모델을 이용하여 발효 당화유단백질의 장내 만성 염증 억제 조절 및 항당뇨 기능성을 확인함

② 투여 농도 및 그룹(표 3-19)

- 종 및 계통 : db/db mice, 수컷, 5주령

표 3-19. DSS 염증 완화 효능 확인 실험의 그룹 및 투여량

그룹	약어	계통	투여샘플	투여농도 (mg/kg b.w.)	3% DSS 급수	개체수
Wild type	WT	wild	PBS	-	x	9
Control 1	CON	DB/D	PBS	-	x	9
Control 1	DSS	B	PBS	-	o	9
FCON	FC	DB/D	Gw-Gal-4M13	1500	x	9
FMRP 1	FL	B	Gw-Gal-4M13	750	o	9
FMRP 2	FH	DB/D	Gw-Gal-4M13	1500	o	9
		B				

④ 투여 방법

- 경구투여로 Gw-Gal-4M13을 2주간 (1일 2회) 투여하였고, 10일차부터 5일간 3% DSS를 식수 대신 자유훁수 하여 대장염을 유도시킴(그림 3-24)

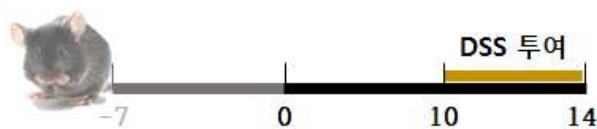


그림 3-24. 투여기간 및 방법

㉔ 조직 시료 수집

- 마지막 경구 투여 종료 후 18시간 뒤 마우스를 희생시킴. 결장을 적출하여 무게를 측정하고 결장의 교차지점부터 직장 말단부분까지 길이를 측정함. 결장 말단 부분은 현미경과 생화학적 분석에 이용함. 결장의 나머지 부분은 균질화하여 -70℃에서 보관하여 이후 실험에 사용함

② 몸무게 변화 확인 및 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

- DSS 공급 당일부터 5일 동안 마우스 분변의 농도와 상태를 DAI scoring system을 이용하여 측정함. 각 마우스의 DAI 점수는 각 마우스의 분변 농도와 혈변 점수를 더하고 2로 나누어 계산함(표 3-20)
- DSS로 인한 염증 발현 시 감소하는 몸무게가 실험 군에서 회복될 수 있는지 DSS 공급 후 매일 몸무게를 측정하여 비교함

표 3-20 .질병(혈변 및 설사)활성도 점수 지표

	0	1	2	3	4
Stool consistency	normal	normal	loose stool	loose stool	diarrhea
Stool blood	0 negative	1 ±	2 +	3 ++	4 gross

③ 혈액 내 glucose 농도 측정

- 발효당화유단백질 섭취 전 0일과 2주간 섭취 후의 fasting blood glucose level을 측정함. 희생 전날에는 복강 내 glucose tolerance test를 진행하며, 혈액의 농도를 0, 15, 30, 90, 120, 180분에 측정함

④ 조직 병리학적 검사

- 결장 부분을 10% 포르말린 용액에 24시간 고정 후 수돗물로 세척하여 알코올로 탈수시킴. 파라핀으로 고정하여 24시간 동안 56℃에서 반응시킨 후 슬라이스하여, 슬라이드에 수집하여 탈파라핀화 후에 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 현미경을 통해 관찰함

⑤ 조직에서의 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

- 결장 및 간, 신장 조직에서 염증 발현 마커 사이토카인 및 PPAR- α/γ 의 생성을 real-time polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 mRNA 수준에서 확인함

⑥ 결장 조직에서의 항산화 효소 발현 측정

- 결장 조직을 얻어 균질화 한 후 항산화 효소의 양을 측정함. DSS로 인한 염증 발현 시

증가하는 항산화 효소 발현의 양을 측정하여 염증의 완화 효능을 확인함

- Myeloperoxidase (MPO) 활성 확인: MPO는 과산화수소를 분해하는 효소로, DSS로 인한 장내 염증 발현 시 활성이 증가되는 것으로 알려짐. Hexadecyltrimethylammonium bromide가 포함된 인산완충용액 상에서 장을 갈아준 뒤 상등액을 취하여 시험 용액으로 함. 시험 용액을 7 μ l 취하여 과산화수소가 포함된 o-dianisidine 용액을 200 μ l 분주하고 시간에 따른 450 nm의 흡광도 변화량을 다음의 식을 이용하여 시험 용액의 장기 질량으로 나누어 구함
- Catalase (CAT) 활성 확인: 과산화수소를 분해하는 CAT의 양을 측정하기 위해 과산화수소와 시험 용액을 반응시킨 후 dichromate와 중탕하여 생성된 chromic acetate의 양을 562 nm에서 측정하여 계산함
- Superoxide dismutase (SOD) 활성 확인: SOD가 superoxide anion radical을 위험도가 더 낮은 과산화수소로 치환시키는 성질을 이용함. Xanthine oxidase와 xanthine을 완충액과 함께 시험 용액에 가하여 SOD의 양을 측정함
- Glutathione peroxidase (GPx) 활성 확인: GPx는 GSH를 GSSG로 만들고 이 때 생성된 GSSG를 NADPH-와 반응시켰을 때 NADP+로 환원시키므로 이를 340 nm에서 측정하여 환산함

⑦ 혈액으로부터 Nitric oxide (NO) 측정

- 염증 시 혈액 내에 증가하는 NO의 양을 측정하여 체내 염증의 완화를 확인함. 혈액을 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 얻은 혈청을 적당히 희석함. 희석한 혈청 50 μ l와 griess 시약 25 μ l씩을 첨가함. 실온에서 10분간 방치 시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정함. NO의 농도는 NaNO₂ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산함

⑧ 혈액으로부터 TNF- α 생성량 측정

- 혈액을 얻어 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 혈청을 얻음. 희석한 혈청을 이용하여, TNF- α 의 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정함

(2) 연구 결과

(가) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질 시제품의 안전성 검증

① 단회 투여 독성 시험

㉠ 생존율 및 무게 변화

- 단회 독성시험은 Gw-Gal-4M13 1500 mg/kg b.w.의 고농도로만 진행되었으며, 1회 경구투여 하여 8시간 동안 아무런 증상이 발견되지 않았고 그 후 2주간 이상 증후 및 사망사례가 없었음(표 3-21)

표 3-21. 단회 독성 실험을 통한 생존율

그룹	생존율 (%)
CON	100
Gw-Gal-4M13	100

- 1500 mg/kg b.w.의 Gw-Gal-4M13 투여 그룹과 대조군을 비교했을 때 체중의 변화 및 장기 무게에서 유의적 차이를 보이지 않은 것을 보아 1500 mg/kg b.w.의 Gw-Gal-4M13의 단회 투여는 독성을 나타내지 않았음(표 3-22, 3-23)

표 3-22. 단회 독성 실험 중 체중 변화

기간	체중변화 (g)	
	CON	Gw-Gal-4M13
1일	21.3±0.59	21.32±0.58
3일	21.58±0.89	21.46±0.60
5일	22.04±0.82	21.94±0.60
8일	22.41±0.93	22.41±0.65
10일	22.65±0.91	22.82±0.58
12일	23.29±0.89	23.28±0.54
14일	23.64±0.72	23.72±0.53

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우

* 표시함 ($p < 0.05$)

표 3-23. 단회 독성 시험에 대한 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

	CON	Gw-Gal-4M13
간	5.31±0.20	5.03±0.26
신장	1.26±0.09	1.26±0.13
비장	0.28±0.02	0.27±0.03
심장	0.48±0.02	0.46±0.03
정소	0.71±0.12	0.71±0.09
갑상선	0.29±0.07	0.30±0.05
폐	0.60±0.05	0.62±0.08
%, 장기 무게 / 쥐체중 *100		

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p < 0.05$).

㉠ 혈액학적 분석

- 혈액학적 분석에서도 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, total, glucose, protein, total 를 확인한 결과, Gw-Gal-4M13 고농도 투여군과 대조군의 수치가 유의적 차이를 보이지 않음(표 3-24)

표 3-24. 다회 독성 실험에 대한 혈액학적 분석

Parameter	CON	Gw-Gal-4M13
Albumin (g/dL)	3.63±0.09	3.67±0.13
ALP (U/L)	125.40±7.65	124.70±5.64
ALT (U/L)	24.40±3.84	24.30±2.91
AST (U/L)	48.90±6.21	47.60±6.40
Bilirubin, total (mg/dL)	< 0.1	< 0.1
Glucose(S) (mg/dL)	249.80±25.62	261.30±28.84
Protein,total (g/dL)	4.96±0.10	4.97±0.11

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p < 0.05$).

② 다회 투여 독성 시험

㉠ 생존율 및 무게 변화

- 다회 독성 시험은 Gw-Gal-4M13 저농도, 중농도, 고농도 (15, 150, 1500 mg/kg b.w.)의 농도로 14일간 1일 1투여를 진행하였으며, Gw-Gal의 경우 Gw-Gal-4M13 1500 mg/kg b.w. 그룹과 동일한 단백질 양을 기준으로 계산한 846 mg/kg b.w.으로 같은 방법으로 투여함. 2주간 이상증후 및 사망사례가 없었음(표 3-25)

표 3-25. 다회 투여 독성 시험 생존율

그룹	생존율 (%)				
	CON	Gw-Gal	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
	100	100	100	100	100

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

- 2-3일 간격으로 몸무게의 변화를 측정된 결과 대조군 및 다른 그룹 간에 유의차가 없었음(표 3-26)

표 3-26. 다회 독성 실험 중 체중 변화

기간	체중변화 (g)			
	CON	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
1일	21.86±1.14	21.78±1.33	21.62±1.18	21.71±0.83
3일	22.58±1.26	22.55±1.28	22.41±1.28	22.27±0.96
6일	22.76±1.25	22.82±1.18	22.76±1.55	22.45±0.89
8일	22.97±1.24	22.72±0.74	22.7±1.45	22.44±0.94

10일	23.24±0.87	23.41±0.99	23.27±1.56	23.11±1.04
12일	23.61±1.14	23.49±0.72	23.69±1.64	23.29±0.99
14일	23.83±1.08	23.83±0.78	24.08±2.12	23.43±0.74

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p<0.05$).

- 2주간의 반복 투여 후 희생을 통하여 장기무게를 비교한 결과 저농도, 중농도, 고농도 모두 대조군 대비 유의적 차이를 보이지 않음(표 3-27)

표 3-27. 다회 독성 시험에 대한 체중 대비 장기 무게 비율 (%)

	CON	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
간	3.77±0.43	4.00±0.38	3.74±0.35	3.89±0.27
신장	1.18±0.30	1.12±0.15	1.12±0.15	1.10±0.10
비장	0.25±0.12	0.23±0.05	0.29±0.16	0.23±0.05
심장	0.47±0.04	0.45±0.03	0.48±0.05	0.48±0.05
정소	0.59±0.08	0.95±1.12	0.60±0.10	0.65±0.08
갑상선	0.23±0.06	0.33±0.21	0.26±0.04	0.27±0.09
폐	0.53±0.04	0.60±0.23	0.56±0.05	0.56±0.05

%, 장기 무게 / 쥐체중 *100

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p<0.05$).

㉞ 혈액학적 분석

- 혈액학적 분석에서 albumin, ALP, ALT, AST, bilirubin, total, glucose, protein, total 확인한 결과, Gw-Gal-4M13 모든 그룹에서 대조군 대비 유의적 차이를 보이지 않음(표 3-28)

표 3-28. 다회 독성 실험에 대한 혈액학적 분석

	CON	Gw-Gal-4M13 15	Gw-Gal-4M13 150	Gw-Gal-4M13 1500
Albumin (g/dL)	3.83±0.2	3.85±0.2	3.78±0.1	3.91±0.2
ALP (U/L)	123.0±15.0	115.7±16.6	116.6±10.0	115.2±12.2
ALT (U/L)	24.6±3.8	22.5±2.5	27.0±7.7	25.5±5.8
AST (U/L)	66.6±11.9	60.7±7.1	67.9±22.6	57.9±12.7
Bilirubin, total (mg/dL)	0.2±0.0	< 0.1	< 0.1	< 0.1

Glucose(S) (mg/dL)	204.8±48.8	220.0±41.9	179.0±29.7	229.6±32.9
Protein total (g/dL)	5.5±0.3	5.56±0.2	5.49±0.2	5.49±0.2

Gw-Gal-4M13 15, 150, 1500 mg/kg b.w.을 의미함.

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 * 표시함 ($p < 0.05$).

(나) 동물 모델을 이용한 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인

- Gw-Gal-4M13을 독성 실험에서 진행했던 1500 mg/kg b.w.으로 경구 투여함. 고농도이기 때문에 750 mg/kg b.w.으로 하루 두 번 나누어 투여함. 모두 동일한 조건을 주기 위해 PBS 투여 그룹 및 750 mg/kg b.w. 그룹 또한 두 번에 걸쳐 투여함. 750 mg/kg b.w.은 375 mg/kg b.w.으로 투여함
- 몸무게 변화, 장기무게 변화, AUC를 제외한 모든 결과는 WT을 제외한 나머지 그룹을 이용하여 비교 분석함. WT은 DB/DB가 제 2 당뇨병이 걸린 동물임을 입증해주는 그룹으로 이용되며, 발효당화유단백질의 효능 검증에는 모두 같은 DB/DB로 이루어진 그룹 간 비교를 적용함

① 몸무게 변화 확인 및 분변을 이용한 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 측정

㉠ 몸무게 변화 확인

- 모든 그룹은 경구 투여 10일차부터 14일차까지 총 5일간 3% DSS 자율급수를 진행하였으며 모든 그룹 간 체중 변화에는 유의적 차이가 보이지 않음(그림 3-25)

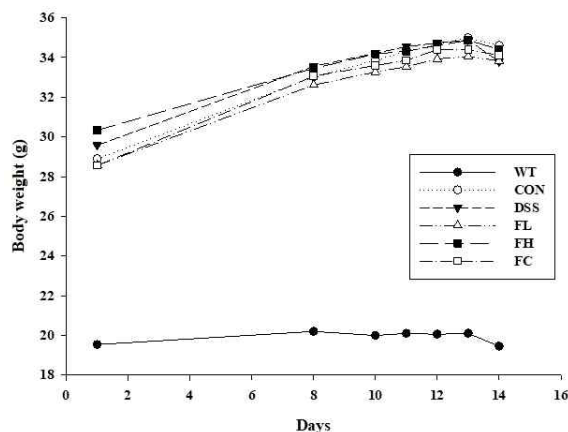


그림 3-25. 발효 당화유단백질의 반복 투여 및 3% DSS 급수에 따른 몸무게 변화

(유의차가 없는 경우 표기 안함)

- 장기 무게를 비교하였을 때, WT의 간과 근육, 대장을 제외한 모든 장기에서 DSS와 유의적 차이를 보였으며, 간과 근육을 제외한 모든 장기에서 CON 그룹과 유의적 차이를

보였다. DSS 그룹의 비장과 대장, FC 그룹의 근육, FL 그룹의 비장, 근육, 대장, FH 그룹의 간, 비장, 근육, 대장은 모두 CON 그룹과 유의적 차이를 나타냄. FC 그룹의 비장, 근육, 대장, FL 그룹의 근육, FH 그룹의 비장, 심장, 정소, 근육은 DSS 그룹 대비 유의적 차이를 보임(표 3-29)

표 3-29. 발효당화유단백질의 반복 투여 및 3% DSS 급수에 따른 장기 무게 차이

	간	신장	비장	심장	정소	갑상선	폐	근육	대장
WT	5.6±0.38	1.45±0.07 *#	0.29±0.04 *#	0.61±0.12 *#	0.69±0.03 *#	0.24±0.09 *#	0.61±0.06 *#	1.28±1.17	3.64±0.59 *
CON	5.97±0.43	0.86±0.07	0.12±0.02	0.31±0.03	0.35±0.04	0.13±0.05	0.35±0.03	0.47±0.06	2.60±0.29
DSS	5.68±0.71	0.91±0.10	0.16±0.02 *	0.33±0.03	0.35±0.05	0.16±0.11	0.38±0.05	0.51±0.10	3.50±0.53 *
FC	5.72±0.63	0.95±0.21	0.13±0.02 #	0.31±0.02	0.36±0.02	0.19±0.08	0.37±0.06	0.36±0.03 *#	2.77±0.33 #
FL	5.58±0.48	0.87±0.07	0.15±0.03 *	0.32±0.04	0.37±0.03	0.17±0.09	0.38±0.07	0.38±0.03 *#	3.28±0.65 *
FH	5.41±0.52 *	0.88±0.07	0.20±0.04 *#	0.29±0.02 #	0.35±0.06 #	0.18±0.12	0.35±0.04	0.40±0.04 *#	3.27±0.44 *

장기 무게 / 쥐체중*100

Student's t-Test를 이용하여 CON 대비 유의차가 있는 경우 *, DSS 대비 유의차가 있는 경우 #로 표시함 ($p < 0.05$).

㉞ 질병활성도 (Disease activity index, DAI) 및 대장 길이 측정

- 분변을 이용한 질병활성도를 계산한 결과 DSS 그룹과 FL, FH 그룹 간에 점수를 비교 하였을 때 유의적 차이는 보이지 않았지만 DSS 그룹 대비 FL과 FH의 혈변 및 설사가 다소 적음을 알 수 있음. 또한 3% DSS 급수로 짧아진 장 길이 및 샘플의 효능을 검증 하기 위해 대장의 길이를 비교함. CON 그룹 대비 FH를 제외한 나머지 그룹에서 장의 길이가 유의적으로 짧아짐. DSS 그룹 대비 FL, FH, FC 그룹의 대장 길이가 유의적으로 증가함(그림 3-26)

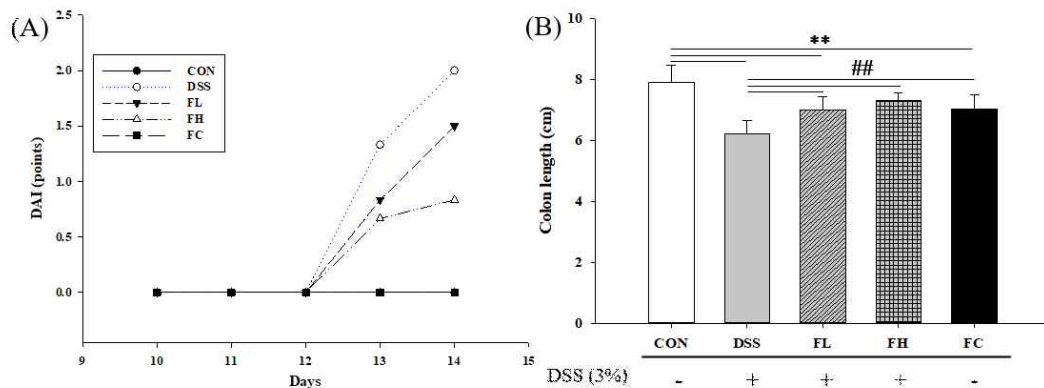


그림 3-26. DSS 급수 후 분변을 이용한 (A) 질병활성도 점수 (DAI score) 및 (B) 대장 길이의 변화 확인

Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 표시함.

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

㉔ 장 투과성 측정

- 장의 투과성을 알아보기 위하여 희생 4시간 전에 FITC-dextran을 경구투여한 후 희생을 통해 얻은 혈액으로 장 투과성을 알아봄. 장의 염증이 유발되어 장벽이 허물어질수록 혈액에서 검출되는 FITC-Dextran의 수치가 높게 측정됨. 실험군의 혈액을 통해 장 투과성을 알아본 결과 CON 그룹 대비 DSS 그룹에서 유의적으로 증가하였음. DSS 그룹 대비 FH 그룹에서 유의적으로 감소함을 확인함(그림 3-27)

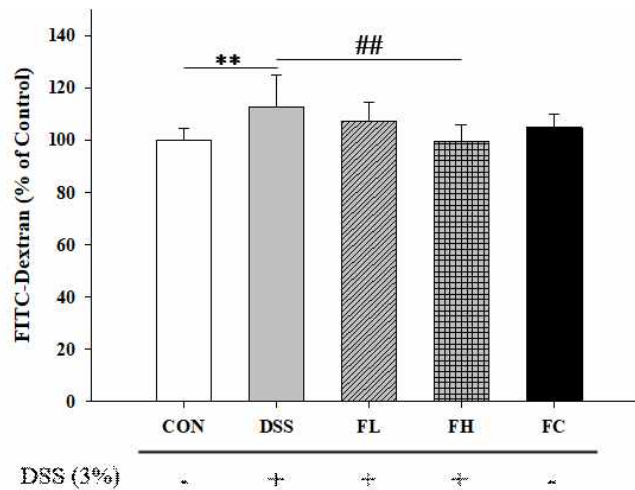


그림 3-27. DSS 투여 후 FITC-dextran을 이용한 장벽 투과성 정도 확인

Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 표시함

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함. n=6

② 혈액 내 glucose 농도 측정

- 복강 내 당 부하 시험을 실시한 결과, WT은 다른 DB/DB로 이루어진 그룹 (CON, DSS, FL, FH, FC)과 비교했을 때 유의적으로 낮은 수치의 혈당을 확인함. FL 그룹의 경우 CON과 DSS 그룹 대비 유의적으로 수치가 감소함(그림 3-28)

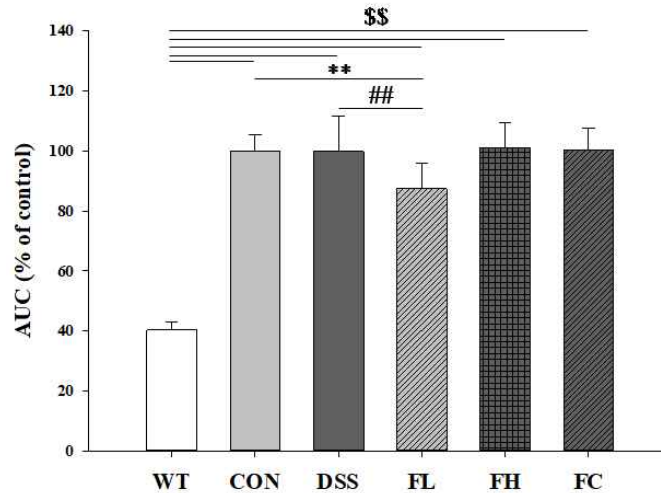


그림 3-28. 복강 내 당 부하 시험

Student's t-test를 이용하여 \$:p<0.05, \$\$p<0.01 WT과 유의차가 있는 경우,
 *:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,
 #:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우,
 \$:p<0.05, \$\$:p<0.01 WT과 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

③ 조직 병리학적 검사

㉑ H&E staining을 이용한 조직 병리학적 검사

- 조직 내 염증 유도정도와 샘플에 의한 염증완화 정도를 조직병리학적으로 분석하고자 하여 진행함
- DSS를 급수 하지 않은 WT, CON, FC 그룹에서는 염증의 정도가 미비함(그림 3-29)
- CON 그룹과 비교하여 보았을 때 DSS 급수 그룹인 DSS, FL, FH 그룹의 장에서는 염증으로 인해 장내의 손상(화살표)을 확인할 수 있었으며 특히 DSS 그룹에서는 submucosa 부분의 굴곡 (submucosa 손상 범위, 원)이 더 심해졌음을 확인함. DSS 투여 시 submucosa의 굴곡범위가 넓어진다는 연구결과를 바탕으로 보았을 때 FL과 FH에서는 mucosa 부분보다 submucosa에서 예방 효과를 나타낸 것으로 보임(그림 3-29)

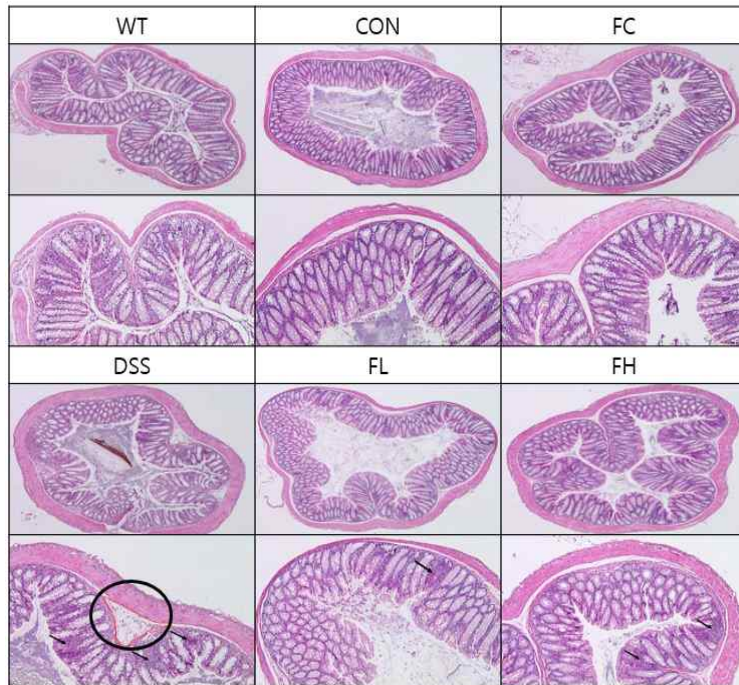


그림 3-29. H&E staining을 이용한 조직병리학적 검사
mucosa 염증부분 (화살표), submucosa 손상 범위 (원)

④ 조직에서의 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

㉞ 결장 조직에서 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

- 결장 조직을 이용하여 염증마커인 TNF- α , COX-2, real time PCR로 측정함. TNF- α 의 결과 CON그룹 대비 FC 그룹에서 유의적으로 감소하였으며, DSS 그룹 대비 FL과 FC 그룹에서 유의적으로 감소함. COX-2 발현량을 비교한 결과 DSS 그룹 대비 FL과 FH 그룹의 유의적 차이는 보이지 않았지만 감소하는 경향을 보였으며, FC 그룹의 경우 CON 및 DSS그룹과 비교하였을 때 유의적으로 감소한 것을 확인함(그림 3-30)
- 결장조직에서 암으로의 전이를 억제해주는 인자인 PPAR- γ 를 real time PCR로 측정한 결과 DSS와 FH 그룹에서 CON 그룹 대비 유의적으로 감소였고 ($*p<0.05$), FL 그룹의 경우 DSS 그룹 대비 유의적으로 증가함 ($\#p<0.05$)(그림 3-30)
- 장막의 tight junction 마커인 ZO-1을 real time PCR로 측정한 결과 CON 대비 DSS, FC 그룹에서 유의적으로 감소하였지만, DSS 그룹 대비 FL과 FH 그룹에서는 유의적으로 증가한 것을 확인함(그림 3-30)
- 위 결과를 종합적으로 봤을 때 발효당화유단백질의 고농도보다는 그의 절반인 저농도 (750 mg/kg b.w.)에서 염증인자가 감소하고 암화 억제 인자가 증가하는 것에 효과를 보였으며, 장벽의 tight junction의 기능을 회복해주는 효과를 나타내는 것으로 사료됨 (그림 3-30)

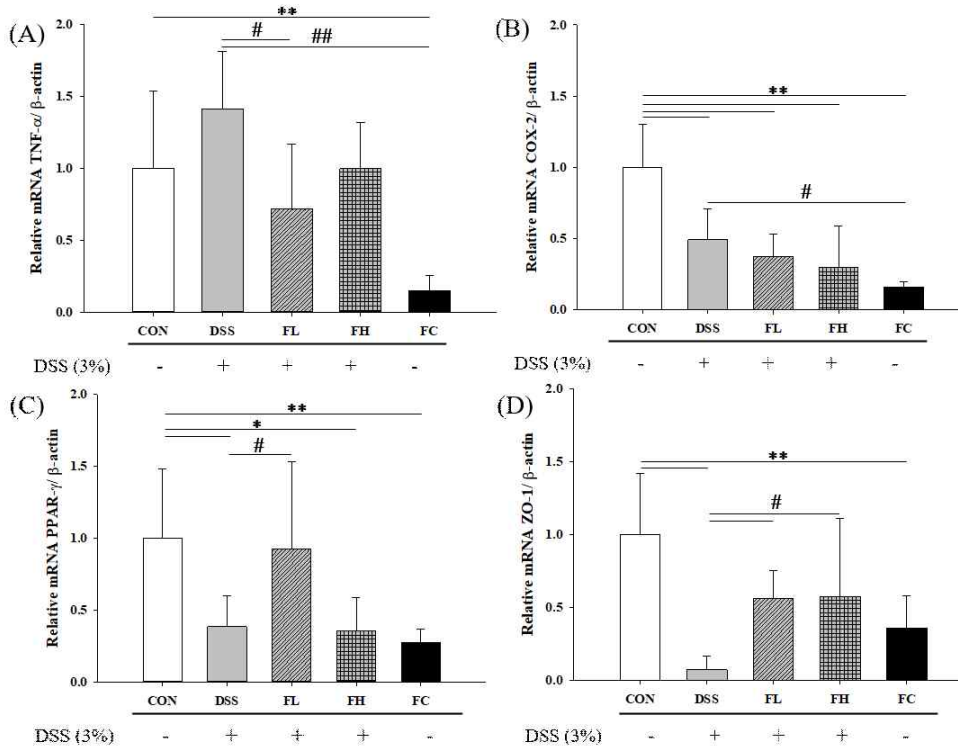


그림 3-30. 결장 내 염증마커, tight junction 마커 및 PPAR mRNA 발현량

Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 표시함.

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

㉞ 간 조직에서 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

- 간 조직을 이용하여 염증 마커인 TNF-α, COX-2, real time PCR로 측정함. 그 결과 TNF-α의 발현양은 CON 대비 FL과 FH에서 유의적으로 증가하였으며, DSS 대비 FH가 유의적으로 증가한 것을 확인함. COX-2 역시 FH 그룹이 CON과 DSS 그룹 대비 유의적으로 증가함(그림 3-31)
- 간 조직 내에서 지방산의 대사에 관여하는 PPAR-α와 지방산의 축적 및 인슐린 감수성을 조절하는 마커인 PPAR-γ를 real time PCR을 이용하여 측정함. PPARs의 또 다른 기능으로는 염증을 조절하는 기능이 있음. PPAR-α의 경우 CON 그룹 대비 FH 그룹이 유의적으로 증가하였으며, DSS 그룹 대비 FH는 유의적으로 증가하고, FC는 유의적으로 감소한 것을 확인함. PPAR-γ 측정 결과 FH 그룹에서 CON과 DSS 그룹 대비 유의적으로 증가한 것을 확인함(그림 3-31)
- DSS에 직접적 영향을 받는 조직이 아니기에 CON, DSS 그룹 간에 유의차가 보이지 않음. 하지만 발효당화유단백질 고농도는 간에서 염증을 조절하고 인슐린 감수성을 증가시켜 주는 것으로 보임(그림 3-31)

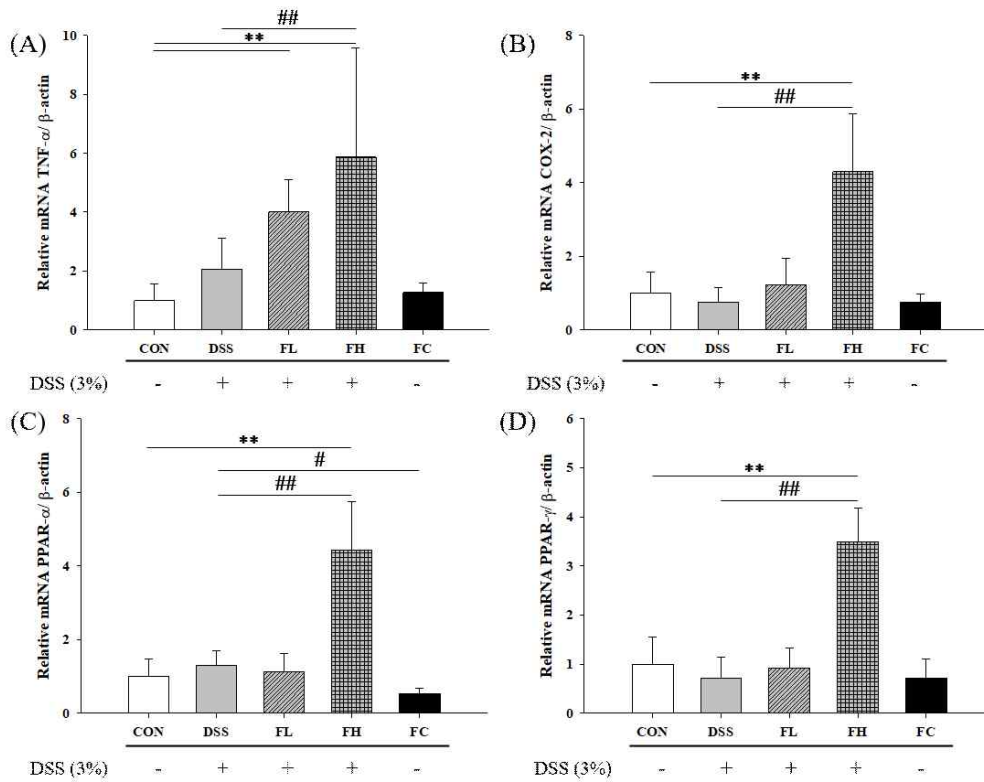


그림 3-31. 간에서의 염증마커 및 PPAR mRNA 발현량

Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 표시함.

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

㉔ 신장 조직에서 사이토카인 및 PPAR 발현 측정

- 신장 조직을 이용하여 염증 마커인 TNF-α, MCP-1 수치를 real time PCR로 측정함. TNF-α의 발현량은 각각 CON과 DSS 대비 FC에서 유의적으로 감소한 것을 확인함. MCP-1의 발현량은 FL과 FH가 각각 CON 대비 유의적으로 감소하였으며, DSS와 비교하여 FH에서 유의적으로 감소함(그림 3-32)
- 염증 발생 과정을 억제조절하는 마커로 알려진 PPAR-α/γ의 발현량이 DSS 그룹 대비 FL, FH에서 유의적으로 감소함. 신장에서의 PPARs의 역할은 아직 충분히 밝혀지지 않았으며, 샘플이 신장에 염증을 억제하지 못하는 것으로 확인할 수 없음(그림 3-32)

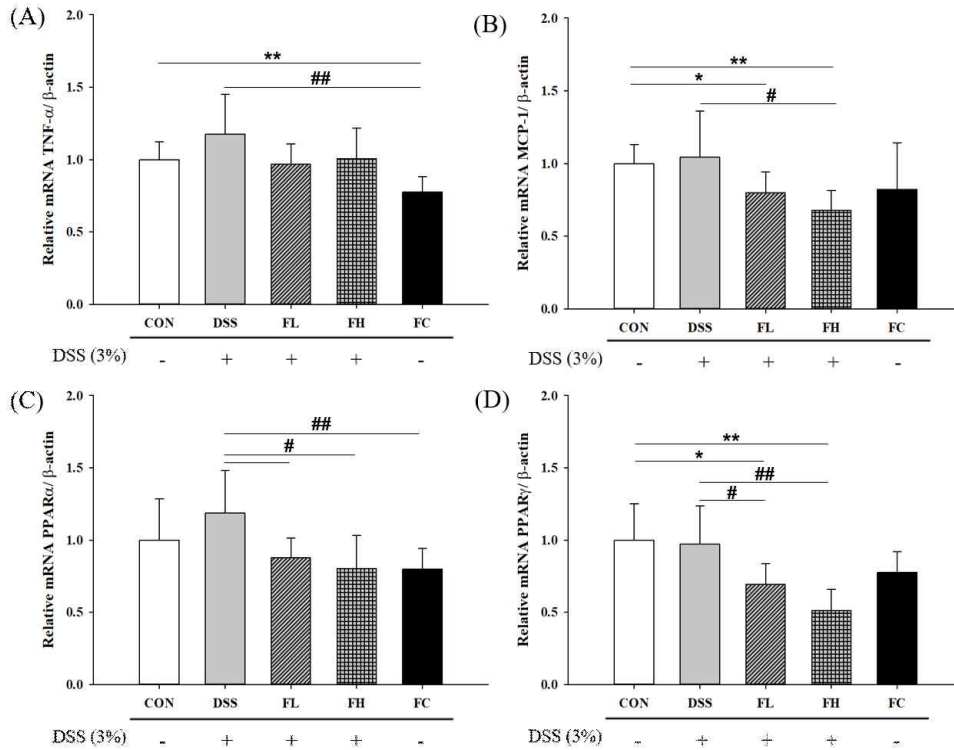


그림 3-32. 신장에서의 염증마커 및 PPAR mRNA 발현량

Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 표시함.

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=7

⑤ 조직에서의 항산화 효소 발현 측정

㉞ 결장 조직에서 항산화 효소 발현 측정

- CAT는 acetic acid 내에 있는 dichromate를 chromic acetate로 환원하는 능력을 측정하는 것으로 CAT 활성 측정 결과 모든 그룹에서 유의적 차이는 보이지 않았음. 하지만 DSS 그룹 대비 FL과 FH 그룹에서 CAT 활성이 증가하는 경향을 보임(그림 3-33)
- SOD란 superoxide anion radical을 위험도가 더 낮은 과산화수소로 치환시키는 성질을 이용한 것으로 그 값이 더 클 때 항산화 능력이 있음을 의미. CON 그룹 대비 DSS, FL, FC에서만 유의적으로 감소한 것을 확인함. DSS 대비 유의적으로 증가한 실험군은 없지만 DSS 급수 그룹인 FL, FH 모두 증가하는 경향을 보임(그림 3-33)
- GPx란 GSH를 GSSG로 만들고 이 때 생성된 GSSG를 NADPH와 반응시켰을 때 NADP+로 환원되는 정도를 나타낸 수치로, 그 값이 클 때 항산화 능력이 있음. CON 그룹과 비교하였을 때 DSS와 FL 그룹은 $p<0.01$ 에서 유의적으로 감소하였으며, FH 그룹의 경우 $p<0.05$ 에서 유의적으로 감소한 것을 확인함. 하지만 DSS 그룹 대비 FH의 수치는 유의적 차이를 보이지 않음(그림 3-33)
- MPO의 결과 어느 그룹에서도 유의적 차이를 보이지 않았음. 유의적 차이는 보이지 않

았지만 DSS 그룹 대비 FL 그룹의 경우 감소한 경향을 보임. MPO는 과산화수소를 산화제로 세포독성을 일으키는 라디칼을 생성하기 때문에 MPO의 수치가 낮을수록 항산화능이 있는 것으로 판단함. 또한 MPO는 염증서 장 질환에서 주로 면역 세포의 침윤 지수로도 활용됨(그림 3-33)

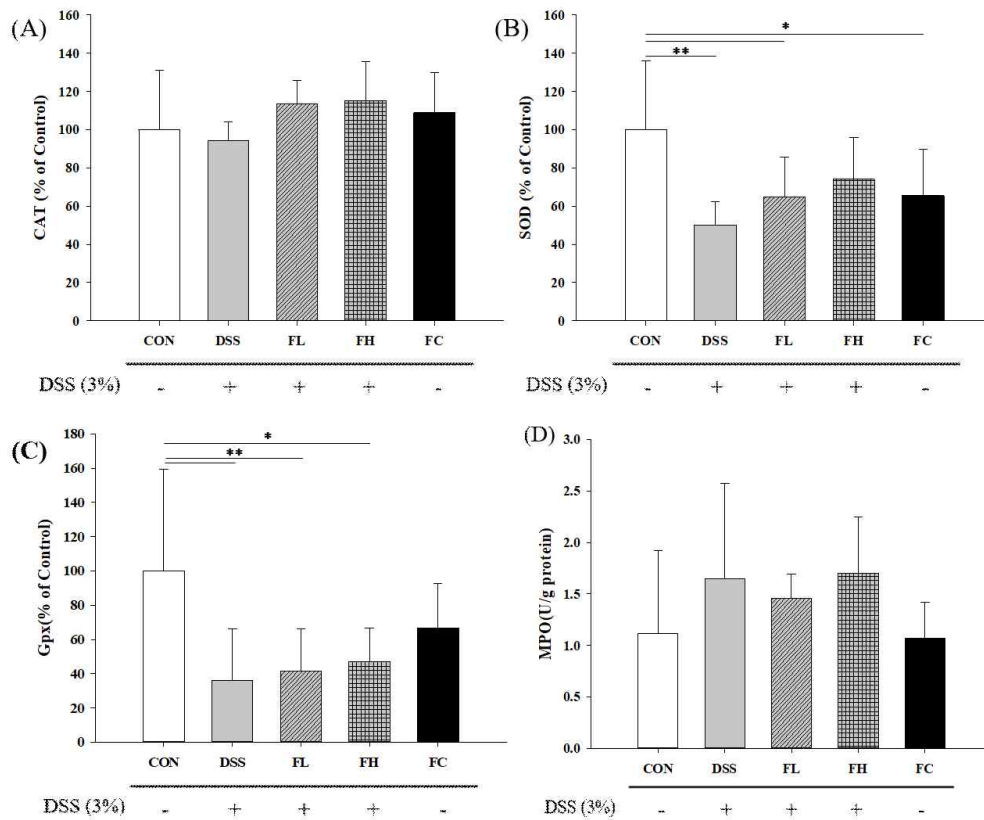


그림 3-33. 결장 조직의 (A) catalase (CAT), (B) superoxide dismutase (SOD), (C) Glutathione peroxidase (GPx), (D) myeloperoxidase (MPO) 활성도

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

㉞ 간 조직에서 항산화 효소 발현 측정

- CAT 활성 측정 결과 CON 그룹에 비해 DSS 그룹의 활성이 유의적으로 감소한 것을 확인함. DSS 그룹 대비 유의적으로 증가한 그룹은 FL 그룹뿐이지만 FL과 FH 그룹에서 CAT 활성이 증가하는 경향을 보임(그림 3-34)
- SOD 활성 측정 결과, CON 그룹 대비 DSS, FL, FH에서 유의적으로 감소함. DSS 대비 유의적으로 증가한 실험군은 FL, FC이며, FH는 증가하는 경향을 보임(그림 3-34)
- DSS 그룹 대비 FH, FC 그룹의 Gpx 활성도가 유의적으로 증가한 것을 확인함. DSS 비 급수 그룹인 CON과 FC의 비교 시 FC의 활성도가 CON에 비해 유의적으로 증가함(그림 3-34)

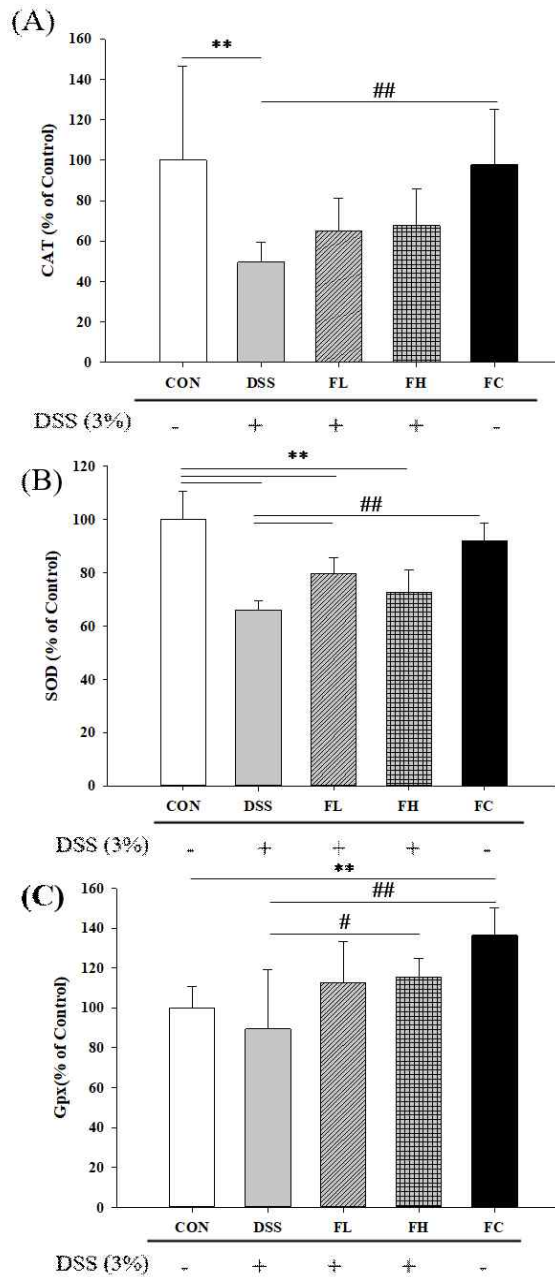


그림 3-34. 간 조직의 (A) catalase (CAT), (B) superoxide dismutase (SOD), (C) Glutathione peroxidase (GPx), 활성도

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,

#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6.

㉔ 신장 조직에서 항산화 효소 발현 측정

- CAT 활성 측정 결과 CON 대비 DSS 그룹이 유의적으로 감소하였으며, DSS 대비 FL 과 FH에서 유의적으로 활성이 증가함을 확인함(그림 3-35)
- SOD 활성 측정 결과 CON과 DSS 그룹 대비 FH에서 활성이 유의적으로 감소하였으

며, 다른 그룹간에 차이는 보이지 않음(그림 3-35)

- GPx 활성 측정 결과 모든 그룹에서 유의적인 변화는 없었지만 DSS 그룹에 비해 FL과 FH, FC에서 GPx 활성이 증가하는 경향을 보임(그림 3-35)

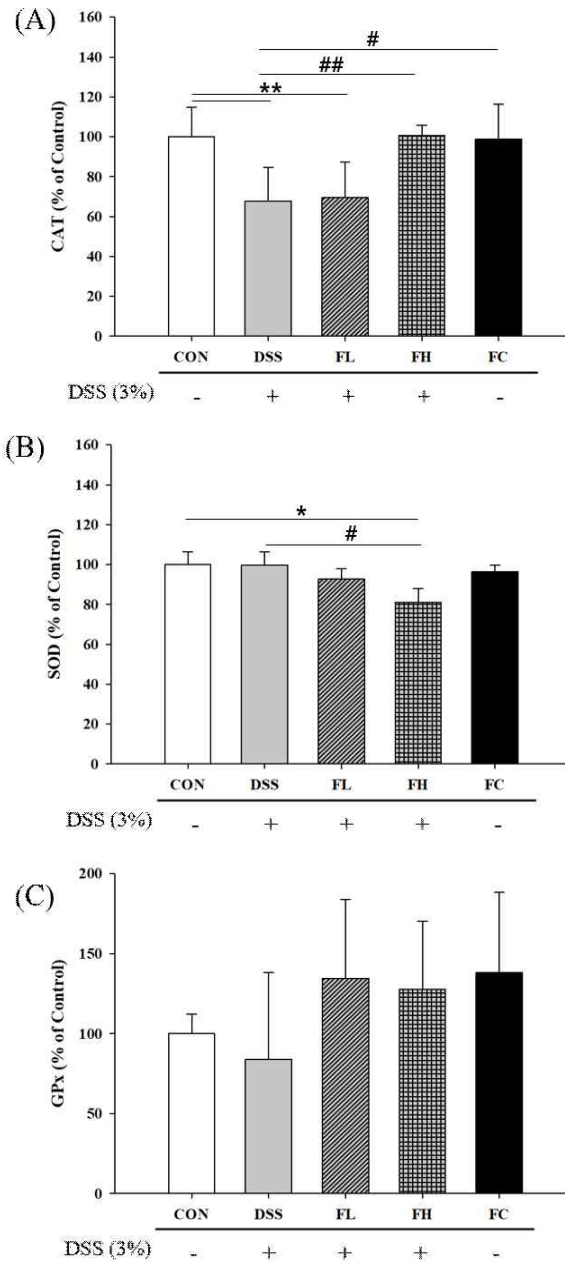


그림 3-35. 신장 조직의 (A) catalase (CAT), (B) superoxide dismutase (SOD), (C) Glutathione peroxidase (GPx) 활성도

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,
#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6.

⑥ 혈액으로부터 Nitric oxide (NO) 측정

- 혈액 내에 Nitric oxide (NO)를 측정했을 때 DSS 급수 그룹끼리 비교를 하였을 때, DSS 그룹과 유의적으로 차이가 있는 실험군은 없음. 하지만 FH의 경우 감소하는 경향을 보임(그림 3-36)

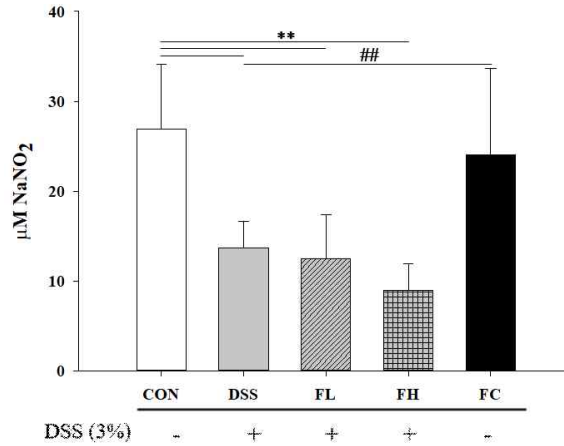


그림 3-36. 혈액 내 NO 생성량

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,
#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

⑦ 혈액으로부터 TNF-α 생성량 측정

- 혈액을 얻어 1000 rpm에서 10분간 원심분리 후 혈청을 얻음. ELISA kit를 이용하여 혈청 내TNF-α의 발현량을 측정한 결과 DSS 급수를 한 DSS, FL, FH 그룹 간에는 유의적 차이를 보이지 않음. DSS 급수를 하지 않은 그룹인 CON과 FC 그룹 간에도 유의적 차이는 보이지 않았지만 FC가 CON 보다 감소하는 경향을 보임(그림 3-37)

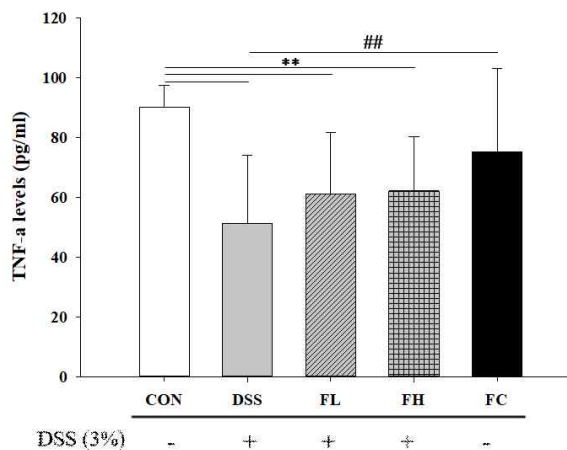


그림 3-37. ELISA를 이용한 혈액 내 TNF-α 발현량

*:p<0.05, **:p<0.01 CON과 유의차가 있는 경우,
#:p<0.05, ##:p<0.01 DSS와 유의차가 있는 경우 표시함 n=6

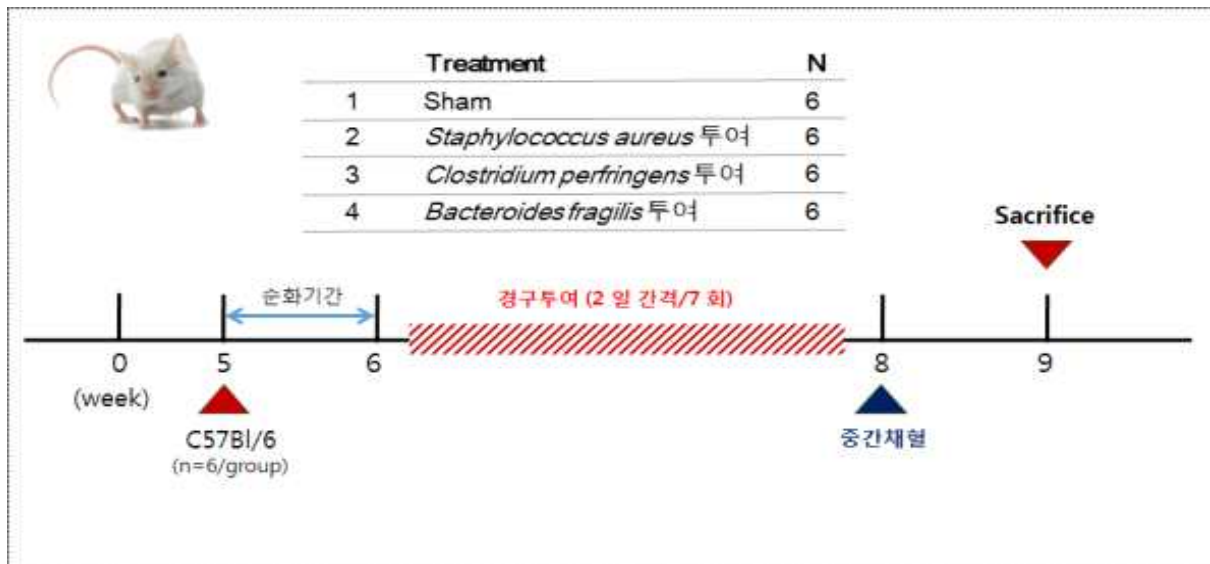
2-1-4. 발효 당화유단백질을 이용한 기저성 질환 원인 저병원성 세균 및 유해세균(식중독세균, 부패세균) 제어 효과 분석

[제3협동 : 숙명여자대학교 윤요한]

가. 장내 기저성질환 관련 저병원성 세균 감염 동물모델에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 분석

(1) 실험 내용

(가) 장내 기저성질환 관련 저병원성 세균 감염 동물모델에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 분석



① 마우스 구입 및 사육환경

- 장내 저병원성 세균의 기저성 질환 발생 확인을 위하여 5 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험에 사용하였음
- 사육은 개체의 체중을 측정 후 그룹간 체중의 차이가 최소화 되도록 균분리를 실시한 후, 식별번호 부여 후 한 케이지당 2 마리씩 사육하였음. 감염동물실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20~23oC, 습도 40~60%로 유지하였음. 모든 식이는 (주)카길애그리퓨리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 기본 공급하였고, 깔집은 주 2~3회 교체하였음

② 장내 저병원성 세균 투여 및 면역지표 분석을 위한 중간 채혈

㉠ 시험 균액의 제조

- *S. aureus* 시험균액의 제조: *S. aureus* ATCC13565, *S. aureus* ATCC14458, *S. aureus*

ATCC23235, *S. aureus* ATCC27664, *S. aureus* NCCP10826을 각각 10 ml의 tryptic soy broth(TSB)에서 37°C, 24 시간 배양한 후, 다시 새로운 10 ml TSB에 37°C, 24 시간 배양함. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 10 분, 4°C)하여 동량의 phosphate buffer solution (PBS)로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음

- *C. perfringens* 시험균액의 제조: *C. perfringens* NCCP10846, *C. perfringens* NCCP10858, *C. perfringens* NCCP10347, *C. perfringens* NCCP15911, *C. perfringens* NCCP15912, *C. perfringens* NCCP10970을 각각 10 ml의 cook meat medium (CMM)에서 gas pack (AnaeroGen, Oxiod, UK)과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양한 후, 배양액 0.1 ml을 10 ml의 fluid thioglycollate broth에 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기 배양함. 배양액을 conical tube에 각각 3 strain씩 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 10 분, 4°C)하여 15 ml의 PBS로 녹여 이를 다시 섞음. 다시 원심 분리 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 10 분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음

- *B. fragilis* 시험균액의 제조: *B. fragilis* ATCC43858, *B. fragilis* ATCC43859, *B. fragilis* ATCC43860을 각각 10 ml의 pre-reduced Brain Heart Infusion (BHI) broth에서 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양한 후, 배양액을 다시 새로운 10 ml의 BHI broth에 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양함

㉔ 1주일간의 순화기간 후 6주령의 마우스에게 장내 저병원성 세균을 2일 간격으로 총 7회 시험균액을 100 μg씩 경구투여함. 실험 대조군의 경우 실험군의 경구투여 용량과 동량의 PBS를 경구투여함

㉕ 장내 저병원성 세균 투여에 따른 면역지표 확인을 위해 경구투여 종료일에 경동맥에서 300 μl정도의 혈액을 채취하였음. 혈액은 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 상온에서 30분에서 1시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 Nitric oxide (NO) 분석에 사용하였음. NO 측정은 Griess Reagent System (G2930, Promega, USA)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음

③ 마우스 부검 및 분석

㉖ 경구 투여 종료 1 주 후 부검을 실시하였음. Zoletil 50 (VIRBAC, France) 및 xylazine (Rompun®, Bayer AG, Germany) 흡입을 통해 마우스를 마취한 후 개복하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고 장기(대장, 소장, 맹장, 간, 비장)를 적출하였음

㉗ 기저성 질환 지표를 확인하기 위하여 혈액 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 상온에서 30분에서 1시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 NO 및 Prostaglandin E2 (PGE2) 분석에 사용하였음

- NO 측정은 Griess Reagent System (G2930, Promega, USA)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음.
- PGE2 측정은 Prostaglandin E2 Assay (KGE004B, R&D systems, USA)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음.
- ㉔ 장기는 적출한 즉시 장내 저병원성 세균의 독성 및 염증 발생 가능성을 판단하기 위해 간과 비장은 무게를 측정하고, 대장과 소장은 길이를 측정하였음. 또한, 대장, 소장은 기저성 질환의 발생유무 확인을 위해 스위스롤 방법을 이용하여 조직병리분석을 실시하였음
- 조직병리학적 검사를 위한 검체는 대장, 소장 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경 (Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음

(나) 장내 저병원성 세균의 omics 분석을 통한 질환 발생원인 분석

① 장내 저병원성 세균의 분리 및 동정

- 장내 저병원성 세균의 질환 발생원인 분석을 위하여 마우스 대장, 소장, 맹장 조직으로부터 장내 저병원성 세균(*S. aureus*, *C. perfringens*, *B. fragilis*)을 각 세균의 선택배지를 이용하여 분리함. 세균 분리 방법은 아래와 같음
- ㉔ 대장, 소장, 맹장 조직은 부검 즉시 아이스에 보관하여 실험실로 운반하여 미생물 분석을 수행하였음
- ㉕ 대장, 소장, 맹장 조직을 각각 멸균 플라스크 위에 올리고 PBS 5 ml을 첨가한 후, 화염멸균한 가위로 3~5 조각 내어 이를 불투명 슬라이드 글라스를 이용하여 조직의 세균이 분리될 수 있도록 으갠 후 conical tube에 담아 세차게 vortex하여 다시한번 세균이 조직에서 분리 될 수 있도록 함. 이를 멸균 거즈를 이용하여 조직 고형물과 용액을 분리하여 걸러진 용액을 미생물 분석에 사용하였음
- ㉖ *S. aureus* 단일 colony 분리를 위해 Chrome Staphylococcus aureus agar 배지에 걸러진 용액을 펩톤수로 십진희석하여 그 희석액을 평판 도말한 후, 37oC에서 24 시간 배양하여 전형적인 *S. aureus* 집락을 확인하였음. 확인된 집락은 다시 TSB 배지에서 37oC, 24 시간 배양하고 이를 다시 Chrome Staphylococcus aureus agar 배지에 희석 도말하여 37oC에서 24시간 배양함. 희석 도말된 배지의 단일 colony를 이용하여 16s rRNA 분석을 통해 *S. aureus*임을 판단하였음
- ㉗ *C. perfringens* 단일 colony 분리를 위해 egg yolk emulsion이 첨가된 tryptose sulphite cycloserine (TSC) agar 배지에 걸러진 용액을 펩톤수로 십진희석하여 그 희석액을 평판 도말한 후, egg yolk emulsion이 첨가되지 않은 TSC agar 배지로 중층한 뒤 gas pack을 사용하여 혐기조건을 형성하였고, 이를 37oC에서 24 시간동안 배양하여 전형적인 *C. perfringens* 집락을 확인하였음. 확인된 집락은 다시 cook meat

medium 배지에서 37°C, 24 시간 혐기배양하고, 이를 다시 egg yolk emulsion이 첨가된 TSC agar배지에 희석 도말 및 egg yolk emulsion이 첨가되지 않은 TSC agar 배지로 중층하여 37°C에서 24시간 혐기배양함. 희석 도말된 배지의 단일 colony를 이용하여 16s rRNA 분석을 통해 *C. perfringens*임을 판단하였음

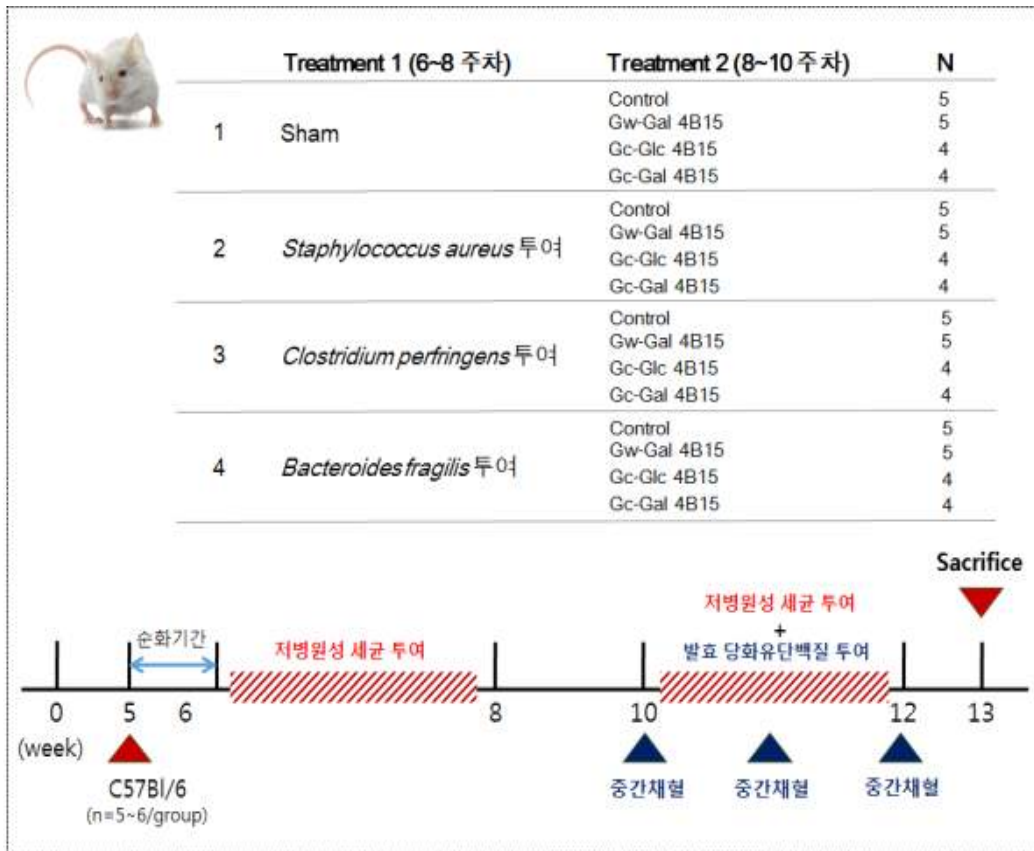
- ㉓ *B. fragilis* 단일 colony 분리를 위해 pre-reduced BHI agar 배지에 걸러진 용액을 펩톤수로 십진희석하여 그 희석액을 평판 도말한 후, 37°C에서 24 시간 혐기배양하여 전형적인 *B. fragilis* 집락을 확인하였음. 확인된 집락은 다시 pre-reduced BHI broth 배지에서 37°C, 24 시간 배양하고 이를 다시 pre-reduced BHI agar 배지에 희석 도말하여 37°C에서 24시간 혐기배양함. 희석 도말된 배지의 단일 colony를 이용하여 16s rRNA 분석을 통해 *B. fragilis*임을 판단하였음

② 장내 저병원성 세균의 병원성 확인

- 병원성 유전자 분석

- ㉔ 세균 배양 : *S. aureus* 단일 집락을 TSB broth에 37°C, 24 시간 배양하였고, *C. perfringens*와 *B. fragilis*는 pre-reduced BHI broth에 gas pack과 함께 37°C, 24 시간 혐기 배양하였음
- ㉕ 병원성 유전자 분석 : 배양한 세균 1 ml을 e-tube에 넣고, 10 min, 5,000×g (7,500 rpm)의 조건에서 원심분리하고 상층액은 제거한 후 QIAGEN Kit (DNeasy Blood & Tissue Kit; Cat No. 69504)를 사용하여 Chromosomal DNA를 추출함. Enzymatic lysis buffer (20mM Tris·Cl, pH 8.0, 2mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100, 200 μl/ml lysostaphin) 180 μl로 pellet을 현탁시키고 proteinase K, Buffer 용액(lysis buffer, wash buffer), Ethanol(96-100%) 등을 단계별로 첨가하여 추출한 Chromosomal DNA와 병원성 유전자 primer, 멸균증류수, 5X buffer, 10mM dNTP, DNA polymerase를 혼합하여 PCR을 수행함. 1.5% agarose gel에 PCR product를 전기영동하여 밴드의 유무 및 크기를 확인함

(다) 장내 저병원성 세균으로 인한 동물모델의 장내 기저성 질환 확인 및 발효 당화유단백질의 개선효과 분석



① 마우스 구입 및 사육환경

- 장내 저병원성 세균의 기저성 질환 발생 확인을 위하여 5 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험에 사용하였음
- 사육은 개체의 체중을 측정 후 그룹간 체중의 차이가 최소화 되도록 균분리를 실시한 후, 식별번호 부여 후 한 케이지당 2 마리씩 사육하였음. 감염동물실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20~23oC, 습도 40~60%로 유지하였음. 모든 식이는 (주)카길애그리퓨리나에서 생산하는 실험동물용 사료를 기본 공급하였고, 깔집은 주 2~3회 교체하였음

② 장내 저병원성 세균 및 발효 당화유단백질 투여

㉠ 시험 균액의 제조

- *S. aureus* 시험균액의 제조: *S. aureus* ATCC13565, *S. aureus* ATCC14458, *S. aureus* ATCC23235, *S. aureus* ATCC27664, *S. aureus* NCCP10826을 각각 10 ml의 tryptic soy broth(TSB)에서 37oC, 24 시간 배양한 후, 다시 새로운 10 ml TSB에 37oC, 24 시간 배양함. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 10 분, 4oC)하여 동량의 phosphate buffer solution (PBS)로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음
- *C. perfringens* 시험균액의 제조: *C. perfringens* NCCP10846, *C. perfringens* NCCP10858,

C. perfringens NCCP10347, *C. perfringens* NCCP15911, *C. perfringens* NCCP15912, *C. perfringens* NCCP10970을 각각 10 ml의 cook meat medium (CMM)에서 gas pack (AnaeroGen, Oxiod, UK)과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양한 후, 배양액 0.1 ml을 10 ml의 fluid thioglycollate broth에 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기 배양함. 배양액을 conical tube에 각각 3 strain씩 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 10 분, 4°C)하여 15 ml의 PBS로 녹여 이를 다시 섞음. 다시 원심 분리 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 10 분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음

- *B. fragilis* 시험균액의 제조: *B. fragilis* ATCC43858, *B. fragilis* ATCC43859, *B. fragilis* ATCC43860을 각각 10 ml의 pre-reduced Brain Heart Infusion (BHI) broth에서 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양한 후, 배양액을 다시 새로운 10 ml의 BHI broth에 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양함

㉔ 발효 당화유단백질의 제조: 발효 당화유단백질의 선정은 주관기관과 협의하여 Glycated whey protein isolate with galatose fermented with 4B15 strain (Gw-Gal 4B15), Glycated casein protein isolate with glucose fermented with 4B15 strain (Gc-Glc 4B15), Glycated casein protein isolate with galatose fermented with 4B15 strain (Gc-Gal 4B15) 3가지로 선정하였음. 일반 성인 기준(60 kg)으로 환산하였을 때 1일당 1~2 g의 발효 당화유단백질을 섭취할 수 있도록, 발효 당화유단백질 분말 100 mg을 2 ml의 멸균증류수에 녹여 50 mg/ml의 농도로 제조함

㉕ 1주일간의 순화기간 후 6 주령의 마우스에게 저병원성 세균이 장내 상존 가능하도록 2 일 간격으로 총 7 회 시험균액을 100 µg씩 경구투여하고 2 주간 휴지기를 두어 장내 정착 환경을 조성하였음. 3 주 후 경구투여한 장내 저병원성 세균이 장내에 정착된 것으로 판단하고 장내 저병원성 세균으로 인한 기저성 질환 확인 및 당화유단백질의 개선효과를 확인하기 위해 1 일 간격으로 14 일 동안 시험균액 100 µg를 경구 투여 한 후, 발효 당화 유단백질을 100 µg를 경구 투여함. 실험 대조군의 경우 실험군의 경구투여 용량과 동량의 PBS를 경구투여함

㉖ 발효 당화유단백질 투여에 따른 장내 기저성 질환 개선효과 확인을 위해 발효 당화유단백질 투여 전과 투여 각각 1, 2주 후에 경동맥에서 300 µl 정도의 혈액을 채취하였음. 혈액은 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 상온에서 30 분에서 1 시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 NO 분석에 사용하였음. NO 측정은 Griess Reagent System (G2930, Promega, USA)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음

③ 마우스 부검 및 분석

- ㉔ 경구 투여 종료 1 주 후 부검을 실시하였음. Zoletil 50 (VIRBAC, France) 및 xylazine (Rompun®, Bayer AG, Germany) 흡입을 통해 마우스를 마취한 후 개복하여 복대정맥 으로부터 혈액을 채취하고 장기(대장, 소장, 맹장, 간, 비장)를 적출하였음
- ㉕ 기저성 질환 지표를 확인하기 위하여 혈액 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 상온에서 30 분에서 1 시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 NO 및 Prostaglandin E2 (PGE2) 분석에 사용하였음
 - NO 측정은 Griess Reagent System (G2930, Promega)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음
 - PGE2 측정은 Prostaglandin E2 Assay (KGE004B, R&D systems)을 이용하여 매뉴얼에 따라 분석하였음
- ㉖ 장기는 적출한 즉시 장내 저병원성 세균의 독성 및 염증 발생 가능성을 판단하기 위해 간과 비장은 무게를 측정하고, 대장과 소장은 길이를 측정하였음. 또한, 대장, 소장은 기저성 질환의 발생유무 확인을 위해 스위스롤 방법을 이용하여 조직병리분석을 실시하였음
 - 조직병리학적 검사를 위한 검체는 대장, 소장 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경 (Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음.

(2) 연구 결과

(가) 장내 저병원성 세균(*Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacteroides fragilis* 등)의 기저성 질환(염증성 질환, 대장암, 노화 등) 발생 확인

① 장기 조직의 무게 및 길이

- 저병원성 세균 감염에 따른 마우스의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직 후 체중, 간 무게, 비장 무게, 소장 길이, 대장 길이를 측정하였음 (표 4-1)
- 체중의 경우, *S. aureus* 투여군에서 다소 낮게 나왔으나 이는 마우스 체중 편차에 의한 것으로 판단됨
- 간과 비장의 무게는 대조군과 비교하였을 때, 세균을 투여한 실험군과 차이를 나타내지 않았음
- 외부 스트레스 혹은 염증 등이 유발될 경우 장 길이가 짧아질 수 있음. *S. aureus* 투여군의 소장 길이는 33.23 cm로 PBS를 투여한 대조군 (35.73 cm)에 비해 유의적으로 짧게 나타났음. 대장 길이 또한 대조군 (7.63 cm)과 비교하였을 때, *S. aureus* 투여군이 5.87 cm로 다소 짧게 나타남. 이러한 결과는 *S. aureus* 투여가 마우스 장에 염증성 질환을 일으킬 가능성이 있다는 것을 보여줌

표 4-1. PBS 및 장내 저병원성 세균 투여 마우스의 물리적 지표

(mean±SD)

	무게(g) (n=5)			길이(cm) (n=3)	
	체중	간	비장	소장	대장
Sham	22.01±1.25 ^A	1.12±0.13 ^A	0.07±0.02 ^A	35.73±1.62 ^A	7.63±1.31 ^A
SA	19.05±7.96 ^A	1.09±0.11 ^A	0.08±0.04 ^A	33.23±1.54 ^B	5.87±0.40 ^B
CP	23.11±1.07 ^A	1.10±0.11 ^A	0.07±0.02 ^A	34.17±0.58 ^A	6.33±0.58 ^A
BF	22.40±0.96 ^A	1.04±0.04 ^A	0.06±0.01 ^A	35.20±0.26 ^A	6.50±0.36 ^A

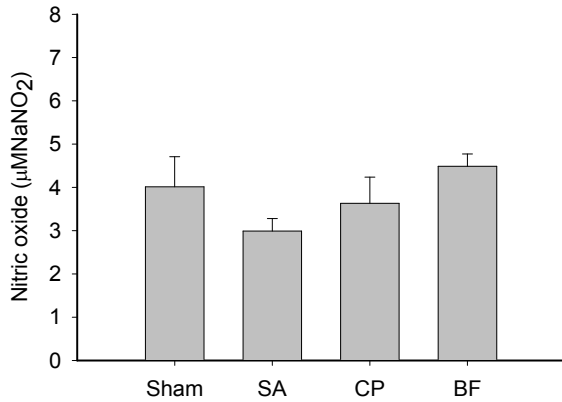
Sham: control (PBS); SA: *S. aureus*; CP: *C. perfringens*; BF: *B. fragilis*

Different letters indicate significant differences between groups (p<0.05)

② 기저성 질환 지표 분석

- 저병원성 세균 감염에 따른 마우스에서의 기저성 질환 발생을 확인하기 위해 NO 및 PGE2 분석을 실시함 (그림 4-1)
- NO는 대표적인 면역반응의 일종인 식세포작용(phagocytosis)에서 필수적으로 생성되는 물질로 면역활성화 지표로 사용됨
- PGE2는 프로스타글란딘 계통의 신호분자로서 발열을 포함한 염증반응에 관여할 뿐만 아니라, 결합이 있는 세포를 공격하는 면역시스템의 정상적인 작용을 방해하여 암 발생을 돕는 기전으로 작용함
- 저병원성 세균 투여 종료 2 일 후 중간채혈 혈청으로 NO를 분석한 결과, 대조군과 실험군간의 차이를 나타내지 않았음
- 저병원성 세균 투여 종료 7 일 후 희생하여 부검하였고, 부검혈액의 혈청으로 NO를 분석한 결과 세균 투여군이 PBS를 투여한 대조군에 비하여 NO 생성량이 적은 것으로 나타남
- 또한, 부검혈액의 혈청으로 PGE2 분석한 결과, 대조군 및 저병원성 세균 투여군 모두에서 PGE2 발현량이 검출한계 (1 pg/ml) 이하로 나타남

[중간채혈]



[부검혈액]

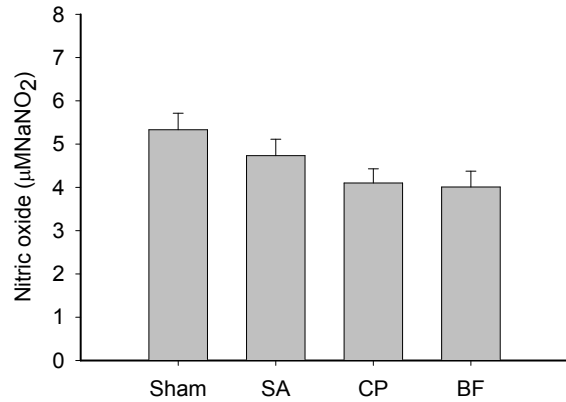
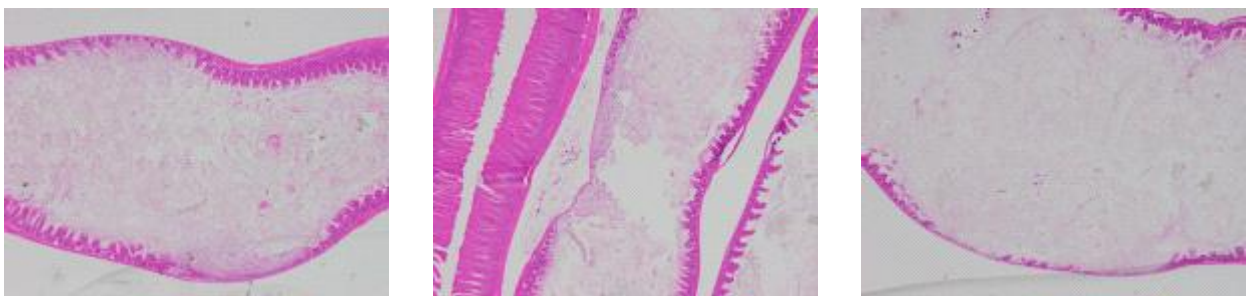


그림 4-1. PBS 및 장내 저병원성 세균 투여 마우스 혈청에서의 nitric oxide 분석
(Sham: control (PBS); SA: *S. aureus*, CP: *C. perfringens*, BF: *B. fragilis*)

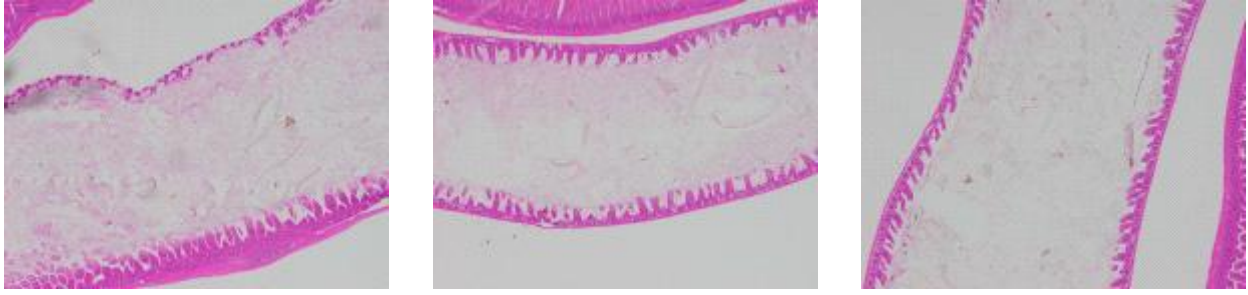
③ 소장 및 대장의 조직병리학적 분석

- 조직 내 염증 반응 및 유도된 장염의 스크리닝 목적으로 스위스롤 방법을 이용하여 조직병리학적 분석을 수행하였음 (그림 4-2)
- 대조군 소장 일부분에서 검경 상 조직 손상이 일부 나타나지만, 붕괴된 조직 주변부에서 염증 세포의 침윤이나, 대식세포에 의한 탐식 반응이 관찰되지 않아, 부검 후 물리적 손상 또는 (autolysis)에 의한 것으로 사료됨
- *S. aureus* 투여군, *C. perfringens* 투여군, *B. fragilis* 투여군 모두 검경상 소장상피 탈락 및 붕괴가 관찰되나 염증세포의 침윤이나 대식세포에 의한 탐식 반응이 관찰되지 않아, 이는 부검 후 자가용해에 의한 주변병변으로 사료됨

(A) 대조군 (PBS 투여) 마우스 소장



(B) *S. aureus* 투여군 마우스 소장



(C) *C. perfringens* 투여군 마우스 소장



(D) *B. fragilis* 투여군 마우스 소장

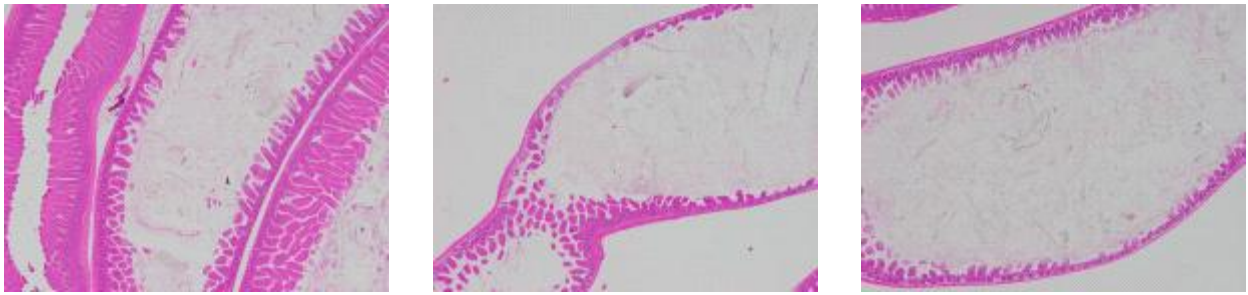
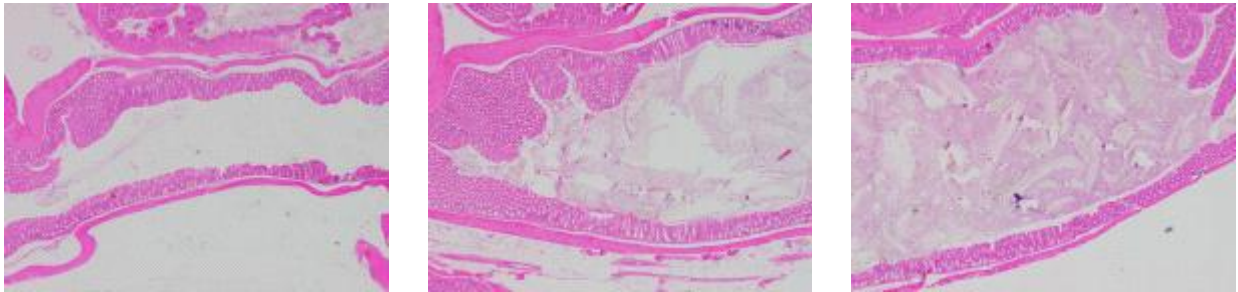


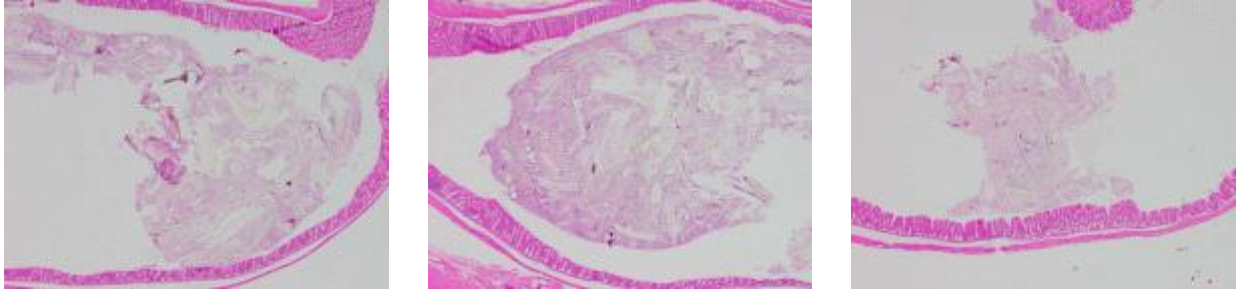
그림 42. PBS 및 저병원성 세균 투여 마우스 소장에서의 조직병리 결과

- PBS 및 저병원성 세균 투여 마우스 대장에서의 조직병리학적 분석 결과, PBS 및 저병원성 세균 투여군 모두에서 대장 부분의 이상 소견은 관찰되지 않았음 (그림 4-3)

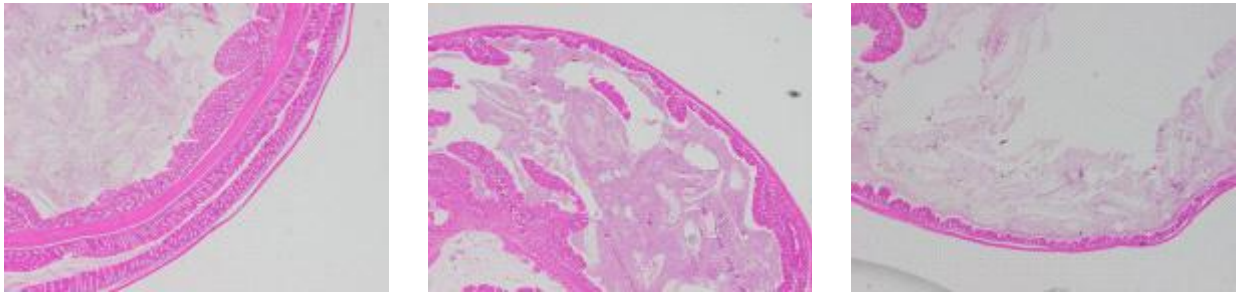
(A) 대조군 (PBS 투여) 마우스 대장



(B) *S. aureus* 투여군 마우스 대장



(C) *C. perfringens* 투여군 마우스 대장



(D) *B. fragilis* 투여군 마우스 대장

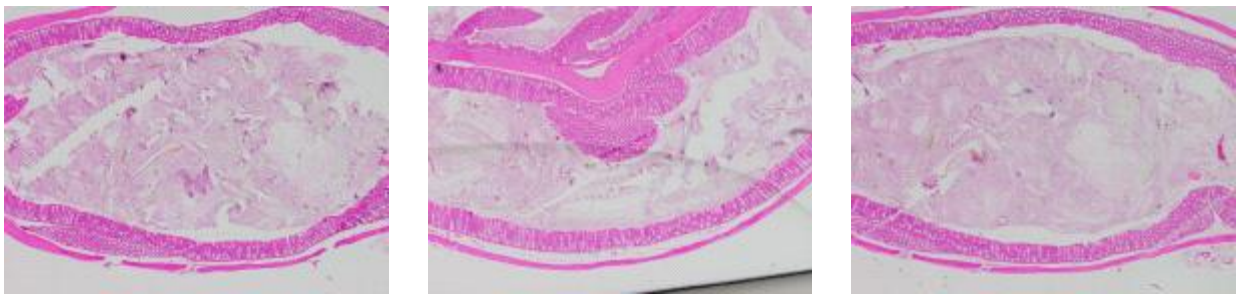


그림 4-3. PBS 및 저병원성 세균 투여 마우스 대장에서의 조직병리 결과

(나) 장내 저병원성 세균의 omics 분석을 통한 질환 발생원인 분석

① 마우스 장 조직 분리균주의 병원성 유전자 분석

- PBS 및 저병원성 투여군의 소장, 대장, 맹장 조직에서 *S. aureus*가 검출되었음 (그림 4-4). 16s rRNA 분석을 통해 확인한 결과 *S. aureus*로 최종 확인되었음. *S. aureus*를 투여하지 않은 대조군 및 다른 실험군(*C. perfringens* 투여군, *B. fragilis* 투여군)에서도 *S. aureus*가 검출된 것으로 보아, *S. aureus*가 마우스 장내에 상존하고 있는 것이 입증됨
- *S. aureus*를 투여하지 않은 대조군 및 다른 실험군에서 검출된 *S. aureus*는 병원성 유전자(SEA, SEB, SEC, SED, SEE) 분석 결과, 병원성 유전자가 검출되지 않았음
- *S. aureus*를 투여한 실험군에서는 소장의 경우 SED가 검출되었고, 대장, 맹장의 경우 SEE가 검출되었음

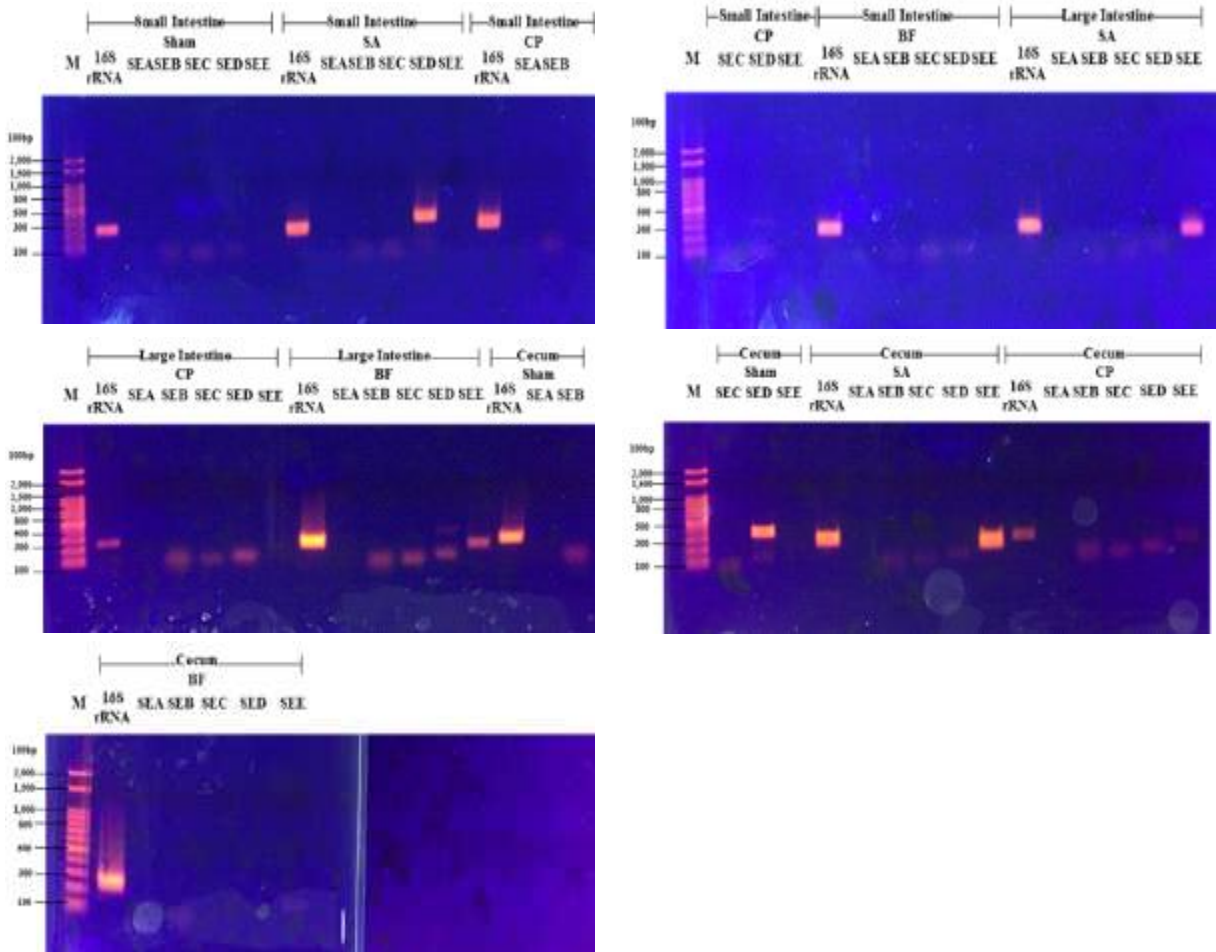


그림 4.4. PBS 및 *S. aureus* 투여 마우스 소장, 대장, 맹장 조직 분리균주의 병원성 유전자 분석 결과

(다) 장내 저병원성 세균으로 인한 동물모델의 장내 기저성 질환 확인 및 발효 당화유단백질의 개선효과 분석

① 장기 조직의 무게 및 길이

- 장내 저병원성 세균 감염 마우스 모델의 장내 기저성 질환 확인 및 발효 당화유단백질 투여에 따른 마우스의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직 후 체중, 간 무게, 비장 무게, 소장 길이, 대장 길이를 측정하였음 (표 4-2)
- 체중의 경우, 대조군 및 모든 실험군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음
- 발효 당화유단백질을 투여하였을 경우, 대장과 소장의 길이가 전반적으로 길게 나타났음. 특히 *C. perfringens* 투여군에서 Gc-Glc-4B15를 투여하였을 때 소장, 대장의 길이가 길게 나타남. 이는 *C. perfringens*에 의한 기저성 질환 발생 가능성이 Gc-Glc-4B15에 의해 낮아질 가능성이 있음을 의미함

표 4-2. 장내 저병원성 세균 마우스 모델의 발효 당화 유단백질 투여에 의한 물리적 지표 변화
(mean±SD)

		무게(g)			길이(cm)	
		체중	간	비장	소장	대장
Sham	Control	27.75±1.43 ^{AB}	1.40±0.23 ^{AB}	0.08±0.02 ^B	36.92±1.91 ^B	7.56±0.69 ^A
	Gw-Gal-4B15	27.10±1.70 ^{AB}	1.29±0.13 ^{AB}	0.19±0.25 ^A	35.16±3.65 ^B	7.16±0.73 ^{AB}
	Gc-Glc-4B15	28.17±0.59 ^{AB}	1.34±0.04 ^{AB}	0.10±0.02 ^{AB}	37.88±1.25 ^{AB}	7.18±1.23 ^{AB}
	Gc-Gal-4B15	27.28±1.29 ^{AB}	1.25±0.02 ^B	0.08±0.03 ^B	37.85±0.75 ^{AB}	7.70±0.81 ^A
SA	Control	28.00±1.53 ^{A^B}	1.24±0.15 ^B	0.08±0.02 ^B	37.82±1.68 ^{AB}	7.60±0.59 ^A
	Gw-Gal-4B15	27.21±1.11 ^{AB}	1.26±0.07 ^B	0.08±0.02 ^B	36.16±1.69 ^B	7.04±0.59 ^{AB}
	Gc-Glc-4B15	25.46±0.82 ^B	1.12±0.04 ^B	0.12±0.06 ^{AB}	36.93±1.28 ^B	6.95±0.54 ^{AB}
	Gc-Gal-4B15	27.12±1.25 ^{AB}	1.23±0.08 ^B	0.08±0.02 ^B	38.48±0.66 ^{AB}	7.40±0.88 ^{AB}
CP	Control	28.81±1.30 ^A	1.33±0.15 ^{AB}	0.09±0.03 ^B	37.20±1.57 ^B	6.98±1.27 ^{AB}
	Gw-Gal-4B15	28.36±2.55 ^{AB}	1.38±0.10 ^{AB}	0.08±0.02 ^B	36.52±2.86 ^B	6.82±0.33 ^{AB}
	Gc-Glc-4B15	29.07±2.22 ^A	1.43±0.13 ^A	0.10±0.02 ^{AB}	40.28±2.36 ^A	7.43±0.87 ^{AB}
	Gc-Gal-4B15	27.46±0.55 ^{AB}	1.21±0.08 ^B	0.09±0.03 ^B	37.90±2.05 ^{AB}	6.83±1.05 ^{AB}
BF	Control	27.92±1.62 ^{AB}	1.26±0.09 ^B	0.09±0.02 ^B	36.94±3.83 ^B	7.16±0.93 ^{AB}
	Gw-Gal-4B15	26.59±1.42 ^B	1.17±0.06 ^B	0.08±0.03 ^B	38.08±0.88 ^{AB}	6.32±1.21 ^B
	Gc-Glc-4B15	27.63±1.19 ^{AB}	1.30±0.10 ^{AB}	0.10±0.04 ^{AB}	37.55±0.86 ^{AB}	7.38±0.73 ^{AB}
	Gc-Gal-4B15	27.89±2.39 ^{AB}	1.24±0.16 ^B	0.10±0.04 ^B	37.23±1.15 ^B	7.53±0.69 ^A

Different letters indicate significant differences between groups (p<0.05)

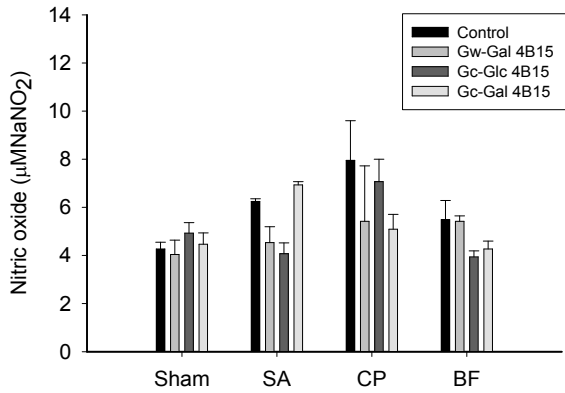
② 기저성 질환 지표 분석

- 장내 저병원성 세균 마우스 모델의 발효 당화 유단백질 투여에 의한 기저성 질환 개선 효과를 확인하기 위해 NO 및 PGE2 분석을 실시함 (그림 4-5)
- NO는 대표적인 면역반응의 일종인 식세포작용(phagocytosis)에서 필수적으로 생성되는 물질로 면역활성화 지표로 사용됨
- PGE2는 프로스타글란딘 계열의 신호분자로서 발열을 포함한 염증반응에 관여할 뿐만 아니라, 결합이 있는 세포를 공격하는 면역시스템의 정상적인 작용을 방해하여 암 발생을 돕는 기전으로 작용함
- 저병원성 세균 및 발효 당화유단백질 투여 12 일 후 혈청에서의 NO 생성량은 PBS를 투여한 대조군과 비교하였을 때 *S. aureus* 및 *C. perfringens* 투여군에서 다소 높게 나타

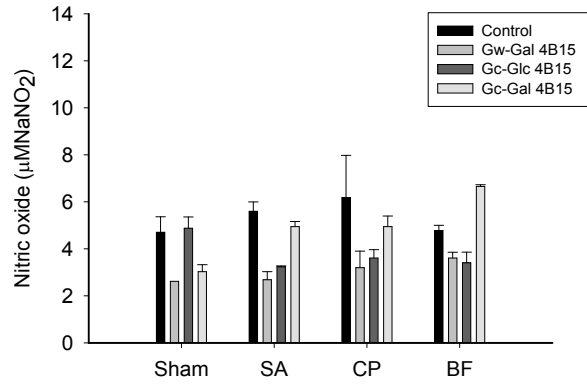
남.

- 각 그룹 내 발효 당화유단백질의 효과는 대조군, *S. aureus* 투여군, *C. perfringens* 투여군에서 Gw-Gal 4B15 투여군의 NO 생성량이 줄어들었음. 또한, *S. aureus* 투여군과 *C. perfringens* 투여군의 경우 Gc-Glc-4B15 투여군도 Sham군에 비해 NO 생성량이 줄어들었음
- 저병원성 세균 및 발효 당화 유단백질 투여 14 일 후 Sham군에서의 NO 생성량은 12 일 후 보다 더 크게 나타났음
- 발효 당화유단백질 투여에 의한 감소효과는 크게 나타나지 않았으나, *S. aureus* 투여군과 *C. perfringens* 투여군에서 Gc-Glc-4B15를 투여하였을 때 NO 생성량이 감소하였음
- 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 발효 당화유단백질은 염증 지표인 NO 생성량을 감소시키며 특히 Gc-Glc-4B15가 *S. aureus*와 *C. perfringens*에 의한 염증성 질환을 감소시키는데 영향을 줄 수 있을 것으로 사료됨
- 부검혈액의 혈정으로 PGE2 분석한 결과, 대조군 및 실험군 모두에서 PGE2 발현량이 검출한계 (1 pg/ml) 이하로 나타남

[투여 전]



[투여 12 일 후]



[투여 14 일 후]

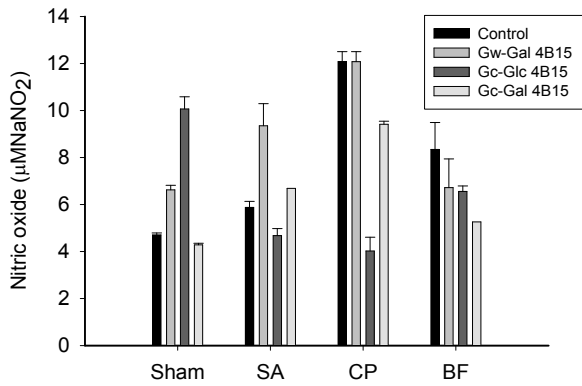


그림 45. 장내 저병원성 세균 마우스 모델의 발효 당화유단백질 투여에 의한 혈청의 nitric oxide 생성 양 변화

(Sham: control (PBS); SA: *S. aureus*; CP: *C. perfringens*, BF: *B. fragilis*)

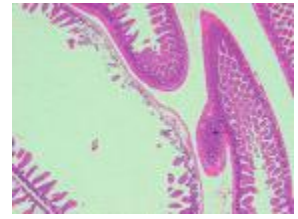
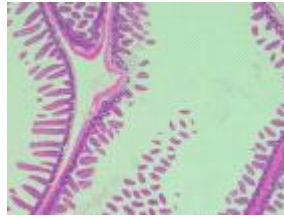
③ 소장 및 대장의 조직병리학적 분석

- 조직 내 염증 반응 및 유도된 장염의 스크리닝 목적으로 스위스롤 방법을 이용하여 조직병리학적 분석을 수행하였음 (그림 4-6, 4-7)
- 조직병리학적 검사 결과, 전 시험군의 소장 일부분에서 소장 상피의 탈락 및 용모 원위부의 pyknosis가 관찰되었으나, 붕괴된 조직 및 그 주변부의 백혈구 (leukocyte) 침윤, 대식세포의 탐식과 같은 염증 반응이 관찰되지 않았으며, 손상된 소장 상피의 반대부분은 정상 상피로 관찰되는 경우가 다수였음. 이러한 결과로 보아 소장 상피의 손상은 부검 시 물리적인 변화에 의한 것으로 사료됨

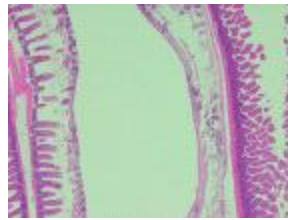
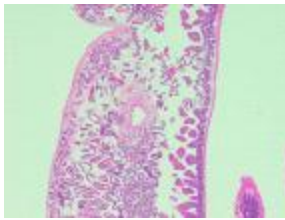
(A-1) Sham + control



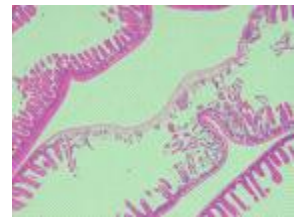
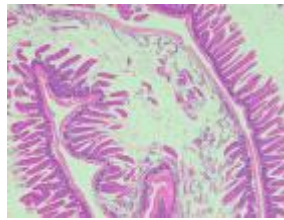
(A-2) Sham + Gw-Gal 4B15



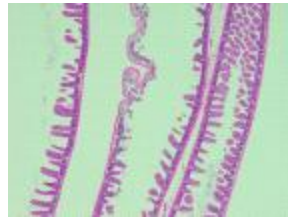
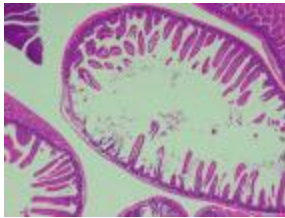
(A-3) Sham + Gc-Glc 4B15



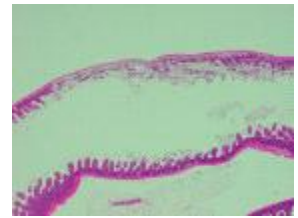
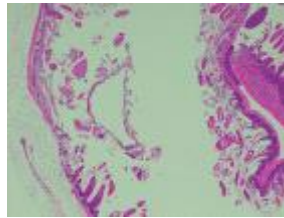
(A-4) Sham + Gc-Gal 4B15



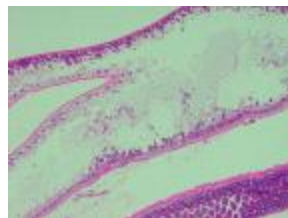
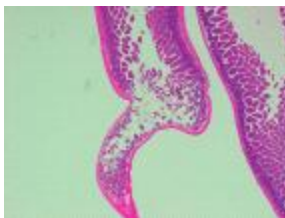
(B-1) *S. aureus* + control



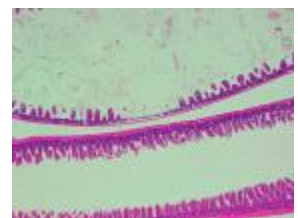
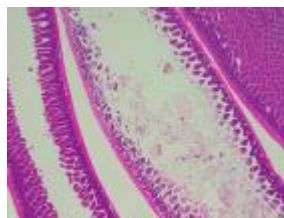
(B-2) *S. aureus* + Gw-Gal 4B15



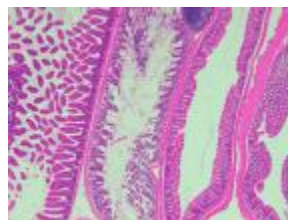
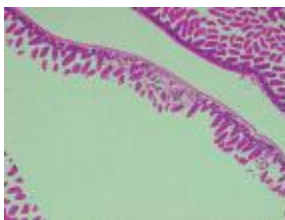
(B-3) *S. aureus* + Gc-Glc 4B15



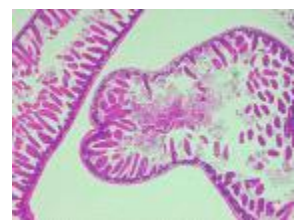
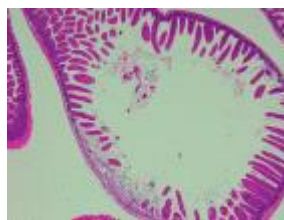
(B-4) *S. aureus* + Gc-Gal 4B15



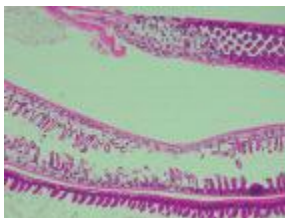
(C-1) *C. perfringens* + control



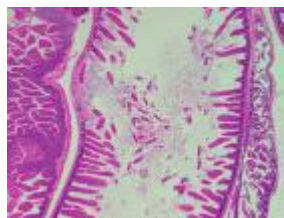
(C-2) *C. perfringens* + Gw-Gal 4B15



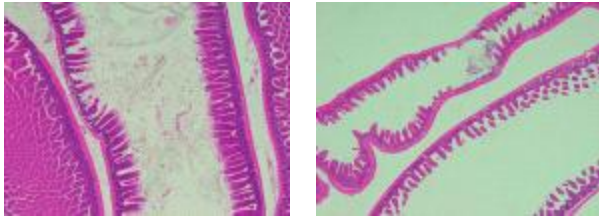
(C-3) *C. perfringens* + Gc-Glc 4B15



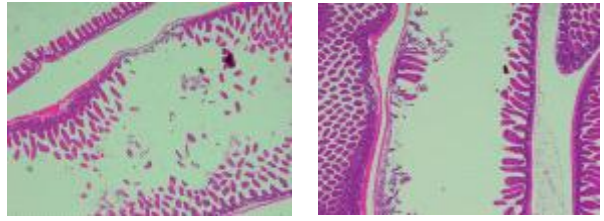
(C-4) *C. perfringens* + Gc-Gal 4B15



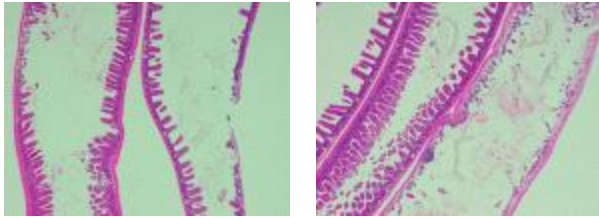
(D-1) *B. fragilis* + control



(D-2) *B. fragilis* + Gw-Gal 4B15



(D-3) *B. fragilis* + Gc-Glc 4B15



(D-4) *B. fragilis* + Gc-Gal 4B15

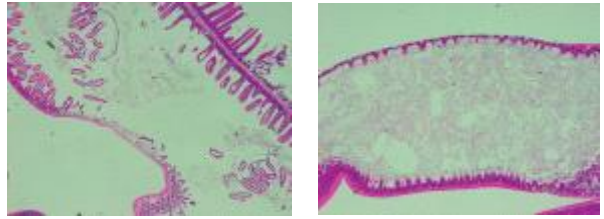
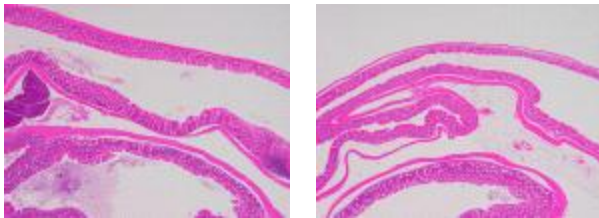


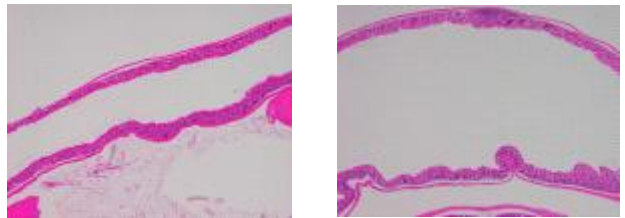
그림 4-6. 장내 저병원성 세균 마우스 모델의 발효 당화 유단백질 투여 마우스 소장에서의 조직병리 결과

- 대장의 경우, 1 개체에서 대장 상피의 탈락이 미약한 수준으로 나타났으나, 타 시험군은 모두 정상으로 나타났으며, 동일한 시험군의 다른 개체 또한 정상으로 나타나, 배경 병변으로 추정됨

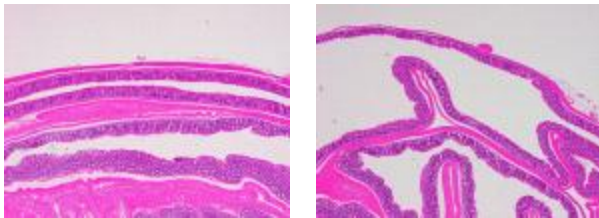
(A-1) Sham + control



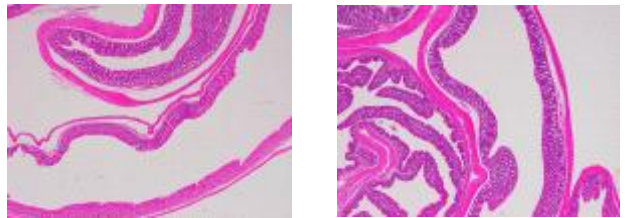
(A-2) Sham + Gw-Gal 4B15



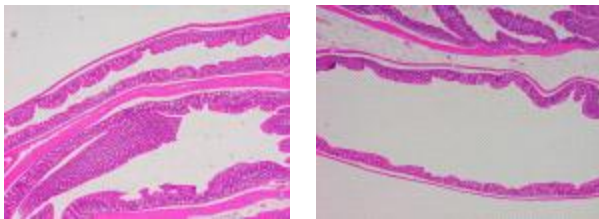
(A-3) Sham + Gc-Glc 4B15



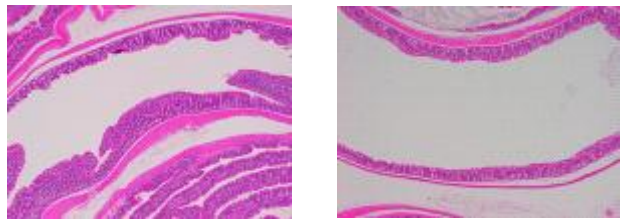
(A-4) Sham + Gc-Gal 4B15



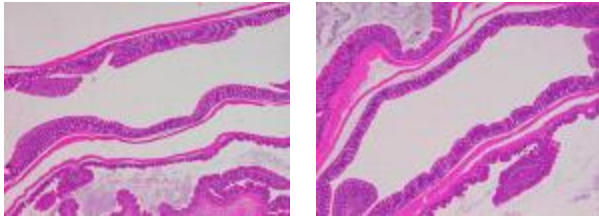
(B-1) *S. aureus* + control



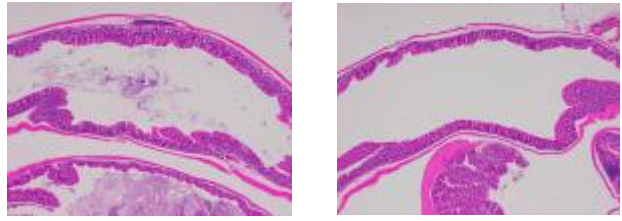
(B-2) *S. aureus* + Gw-Gal 4B15



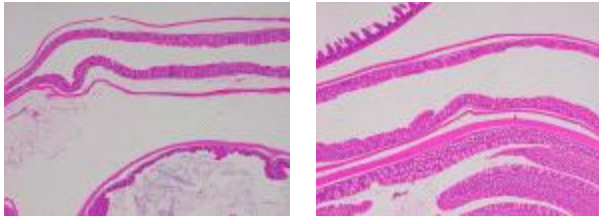
(B-3) *S. aureus* + Gc-Glc 4B15



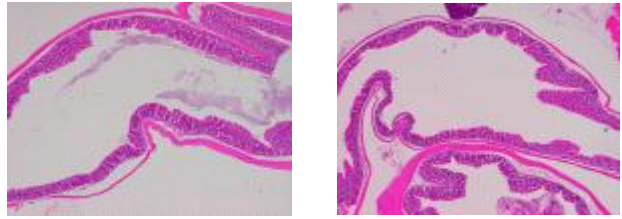
(B-4) *S. aureus* + Gc-Gal 4B15



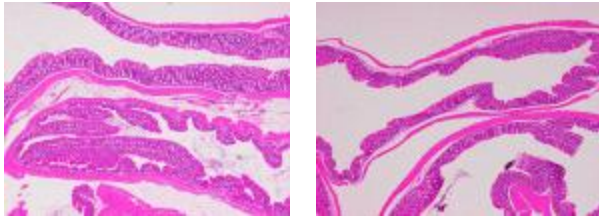
(C-1) *C. perfringens* + control



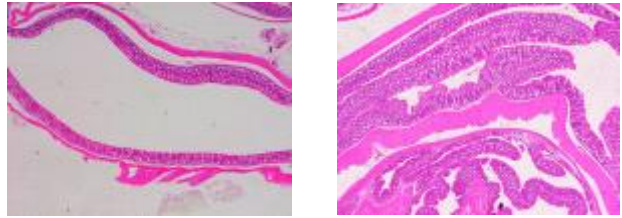
(C-2) *C. perfringens* + Gw-Gal 4B15



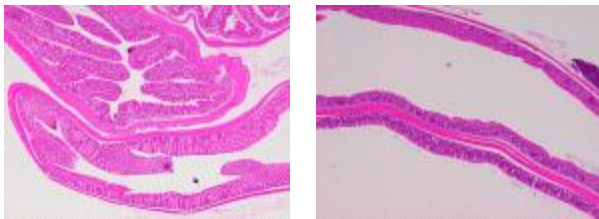
(C-3) *C. perfringens* + Gc-Glc 4B15



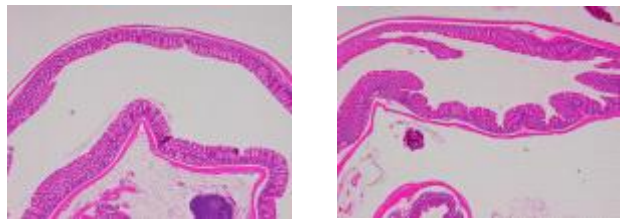
(C-4) *C. perfringens* + Gc-Gal 4B15



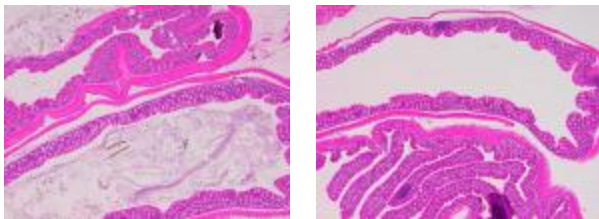
(D-1) *B. fragilis* + control



(D-2) *B. fragilis* + Gw-Gal 4B15



(D-3) *B. fragilis* + Gc-Glc 4B15



(D-4) *B. fragilis* + Gc-Gal 4B15

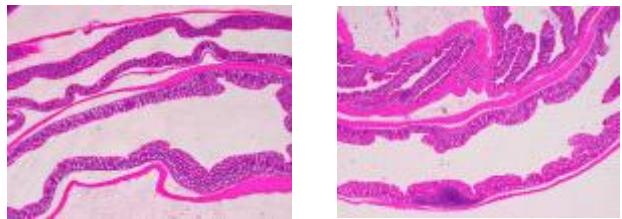


그림 4-7. 장내 저병원성 세균 마우스 모델의 발효 당화 유단백질 투여 마우스 대장에서의 조직병리 결과

나. 유해세균(식중독세균, 부패세균)에 대한 발효 당화유단백질 항균활성 분석 및 발효 당화유단백질 적용을 통한 유제품의 안전성 확보기술 개발

(1) 실험 내용

(가) 식중독세균(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, 병원성 *Escherichia coli* 등) 및 부패미생물(*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* 등)에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 확인

① 항균효과 실험을 통한 농도별 항균활성 확인

- 식중독 세균 및 부패미생물 시험균액의 준비

㉠ *S. aureus*, *E. coli*, *Sal. Typhimurium* 시험균액의 제조: *S. aureus* ATCC13565, *S. aureus* ATCC14458, *S. aureus* ATCC23235, *S. aureus* ATCC27664, *S. aureus* NCCP10826, *E. coli* NCCP11142, *Sal. Typhimurium* NCCP10725, NCCP10812, NCCP10438을 각각 10 ml의 tryptic soy broth(TSB)에 24 시간 동안 37°C에서 배양 후, 다시 새로운 10 ml TSB에 24 시간 동안 37°C에서 배양함. 배양액을 각 세균끼리 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 15 분, 4°C)하여 동량의 phosphate buffer solution(PBS)으로 2 회 세척하여 균 원액을 얻음. 원액의 흡광도를 UV-spectrophotometer기로 측정 후, PBS로 optical density(O.D)를 0.01 (세균 수; 5-6 logCFU/ml)로 조절된 균액을 접종원으로 사용하였음

㉡ *L. monocytogenes* 시험균액의 제조: *L. monocytogenes* NCCP10808, *L. monocytogenes* NCCP10809, *L. monocytogenes* NCCP10810을 10 ml의 TSBYE broth에서 24 시간 동안 30°C에서 배양한 후, 다시 새로운 10 ml의 TSBYE broth에 24 시간 동안 30°C에서 배양함. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 15 분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2 회 세척하여 균 원액을 얻음. 원액의 흡광도를 UV-spectrophotometer기로 측정 후, PBS로 O.D를 0.01로 조절함

㉢ *P. aeruginosa* 시험균액의 제조: *P. aeruginosa* K3, *P. aeruginosa* K58, *P. aeruginosa* PAO1을 각각 5 ml의 Luria-Bertani broth(LB broth)에 37°C에서 24 시간 동안 shaking incubator에서 배양한 후, 다시 새로운 5 ml의 LB broth에 37°C에서 24 시간 동안 배양함. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 15 분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2 회 세척하여 균 원액을 얻음. 원액의 흡광도를 UV-spectrophotometer기로 측정 후, PBS로 O.D를 0.01로 조절함

㉣ *C. perfringens* 시험균액의 제조: *C. perfringens* NCCP10846, *C. perfringens* NCCP10858, *C. perfringens* NCCP10347, *C. perfringens* NCCP15911, *C. perfringens* NCCP15912, *C. perfringens* NCCP10976을 각각 10 ml의 cook meat medium (CMM)에서 gas pack (AnaeroGen, Oxiod, UK)과 함께 37°C에서 24 시간 동안 혐기 배양한 후, 배양액 1

ml을 9 ml의 Brain heart infusion(BHI) broth에 gas pack과 함께 24 시간 동안 37oC에서 혐기 배양함. 배양액을 conical tube에 모든 strain을 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 15 분, 4oC)하여 동량의 PBS로 2 회 세척 후 vortex하여 균액을 얻음. 균액의 흡광도를 UV-spectrophotometer기로 측정하고, PBS로 O.D를 0.01로 조절함

- ㉞ *B. fragilis* 시험균액의 제조: *B. fragilis* ATCC43858, *B. fragilis* ATCC43859, *B. fragilis* ATCC43860을 각각 9 ml의 pre-reduced BHI broth에서 gas pack과 함께 37oC에서 48 시간 동안 혐기배양한 후, 배양액 1 ml을 다시 새로운 9 ml의 BHI broth에 gas pack과 함께 37oC에서 48 시간 동안 혐기 배양함. 배양액을 conical tube에 모든 strain을 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 15 분, 4oC)하여 동량의 PBS로 2 회 세척 후 vortex하여 균액을 얻음. 균액의 흡광도를 UV-spectrophotometer기로 측정하고, PBS로 O.D를 0.01로 조절함. O.D를 맞춘 균액을 발효 당화유단백질에 접종할 시험균액으로 사용하였음

- 항균 효과 실험

- ㉠ 발효 당화유단백질(FMRP w/o LAB)과 대조균인 당화유단백질(Gc-Gal, Gc-Glc, Gw-Gal, Gw-Glc)을 증류수와 해당 세균의 액체 배지(TSB, TSBYE, LB broth, BHI broth)에 용해하여 농도별(50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg/ml)로 준비하고, 위와 같은 방법으로 제조된 시험균액을 접종하여 24 시간(*B. fragilis*는 48 시간) 배양하였음
- ㉡ 각 세균의 선택 배지에 위의 배양액을 patch한 후, 30oC 또는 37oC에서 배양하였음. *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *B. fragilis*의 선택배지로 각각 MacConkey I agar(Mac I), mannitol salt agar(MSA), PALCAM agar, xylose lysine deoxycholate(XLD) agar, cetrinide agar, tryptose sulfite cycloserine(TSC) agar, bacteroides bile esculin(BBE) agar을 사용하였음
- ㉢ 배양 후 플레이트에 균이 성장하지 않았을 때 항균효과가 있는 것으로 판단하였음

② 유해세균의 성장 패턴 확인을 통한 발효 당화유단백질의 항균활성 측정

㉠ 시험 균액의 제조

- 위의 시험균액 준비 방법과 동일함

㉡ 대조균(양성 대조균, 음성 대조균)과 실험균 준비

- 양성 대조균에 *Lb. rhamnosus* 4B15, *Lb. gasserii* 4M13 균주를 사용하였음. 해당 균주는 10 ml의 deMan, Rogosa and Sharpe(MRS) broth에 37oC에서 24 시간 배양한 후, 이 중 100 μl를 새로운 MRS broth에 접종하여 37oC에서 24 시간 배양하였음. 배양액을 MRS broth에 희석하여 7 log CFU/ml가 되도록 한 후, 동결 건조하여 준비하였음
- 음성 대조균에 발효되지 않은 당화유단백질인 Gc-Gal, Gc-Glc, Gw-Gal, Gw-Glc를 사용하였음
- 실험균에는 발효균체가 포함되어 있는 발효 당화유단백질(FMRP w/ LAB;

Gc-Gal-4B15, Gc-Gal-4M13, Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4B15, Gw-Glc-4M13)와 발효균체가 포함되어 있지 않은 발효 당화유단백질 (FMRP w/o LAB; 위와 동일)을 사용하였음

- 실험균과 대조균에 사용한 당화유단백질과 발효 당화유단백질의 농도는 앞서 시행한 패치(Patch) 실험의 결과에 따라 항균 효과를 보일 것으로 사료되는 농도인 100 mg/ml을 준비하여 사용하였음

㉔ 발효 유단백질에 노출된 유해세균의 성장 패턴 확인

- 액체배지에 용해하여 100 mg/ml이 되도록 제조한 시료를 각각 24-well plate에 900 μ l 씩 분주하고, 위와 같이 준비한 시험균액 100 μ l를 접종하여 30°C 또는 37°C에서 배양하였음. 배양 후 0, 12, 24 시간에 세균의 성장패턴을 확인하였음. 모든 대조균과 실험균의 배양액을 pipetting하여 균질화하였으며, buffered peptone water(BPW) 900 μ l에 희석하여 각 세균의 선택배지에 분주 및 도말 후, 24 시간 동안 (*B. fragilis*는 48 시간) 배양하였음. 플레이트에 성장한 집락을 계수하여 발효 당화유단백질로 인한 유해세균의 성장 패턴 변화를 파악 및 비교하였음
- *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*, *C. perfringens*, *B. fragilis*, *P. aeruginosa*의 선택배지로 각각 Mac I, MSA, PALCAM agar, XLD agar, TSC agar, BBE agar, cetrimide agar을 사용하였음

③ 발효 당화유단백질 액상 및 분말 시제품(Gc-Glc-4B15)의 항균활성 측정

㉔ 시험 균액의 제조

- 위의 성장패턴 실험에서 항균효과를 보인 *B. fragilis*, *C. perfringens*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*을 선정하여 항균 활성을 측정하였으며 시험 균액 제조 방법은 위의 방법과 동일함

㉔ 시료 준비

- 액상 및 분말 시제품은 주관 기관으로부터 전달 및 제공 받았음. 분말 시제품은 액상 시제품을 동결 건조 후 분말화하여 실험에 사용하였으며, 그 농도는 100 mg/ml로 위의 성장 패턴 실험과 동일하게 진행하였음. 액상 시제품은 주관 기관으로부터 전달받은 형태로 실험에 사용하였음

㉔ 발효 유단백질에 노출된 유해세균의 성장 패턴 확인

- 시제품 시료를 각각 24-well plate에 900 μ l 씩 분주하고, 위와 같이 준비한 시험균액 100 μ l를 접종하여 30°C 또는 37°C에서 배양하였음. 배양 후 0, 12, 24 시간에 세균의 성장패턴을 확인하였음. 모든 대조균과 실험균의 배양액을 pipetting하여 균질화하였으며, buffered peptone water(BPW) 900 μ l에 희석하여 각 세균의 선택배지에 분주 및 도말 후, 24 시간 동안 (*B. fragilis*는 48 시간) 배양하였음. 플레이트에 성장한 집락을 계수하여 발효 당화유단백질로 인한 유해세균의 성장 패턴 변화를 파악 및 비교하였음

- *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium*, *C. perfringens*, *B. fragilis*, *P. aeruginosa*의 선택배지로 각각 PALCAM agar, XLD agar, TSC agar, BBE agar, cetrimide agar을 사용하였음

(나) 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 항균활성 및 저해원인 분석

① 산성도(pH) 측정

- ㉔ 세균은 pH의 영향을 받기 때문에 발효 당화유단백질이 갖는 항균효과가 pH의 영향인지 보기 위해 진행하였음.
- ㉔ 시료 준비 및 pH 측정은 다음과 같이 진행하였음
 - 대조군인 양성 대조군(*Lb. rhamnosus* 4B15, *Lb. gasseri* 4M13), 음성 대조군 (Gc-Gal, Gc-Glc, Gw-Gal, Gw-Glc)과 실험군인 발효 당화유단백질(FMRP w/ LAB, FMRP w/o LAB)을 100 mg/ml이 되도록 증류수에 용해시켜 실험에 사용하였음
 - 37°C 조건을 유지시키면서 0, 12, 24 시간마다 pH 측정기(Thermo Scientific™ Orion™ Star A211 pH Benchtop Meter)로 pH를 측정하였음

② Iron chelation assay를 이용한 항균 기작 분석

- ㉔ 메일라드 반응 물질이 철 킬레이션 활성(iron chelation activity)을 가져 항균 효과를 지닌다고 보고된 바 있음. 세균의 성장에는 철, 칼슘, 마그네슘 등의 금속이온이 필수적 요소 중 하나이기 때문에 어떠한 물질에 금속 이온 킬레이션 활성이 있는 경우 세균이 사용할 수 있는 금속 이온이 제한적이게 되어 성장에 영향을 줄 수 있음
- ㉔ 이처럼 발효 당화유단백질의 항균활성이 킬레이션 작용에 의한 것인지 파악하기 위해 iron chelation assay를 진행하였음
- ㉔ 실험 방법은 다음과 같음
 - 100 mg/ml의 음성 대조군(Gc-Gal, Gc-Glc, Gw-Gal, Gw-Glc), 발효 당화유단백질(FMRP w/ LAB, FMRP w/o LAB)을 5 배 희석한 후, 희석시료 100 μ l에 증류수 600 μ l와 100 μ l의 0.2 mM 염화철을 첨가하여 30초 간 반응시켰음. Chelation 대조군(Blank solution)에는 시료 대신에 증류수 100 μ l를 첨가하고 나머지 시약들은 동일하게 첨가하였음
 - 0.1 mM ferrozine 200 μ l을 넣어 10분 간 반응시킨 후, UV-spectrophotometer로 562 nm에서 흡광도를 측정하였음. 측정 시 blank는 시료 100 μ l에 ferrozine과 염화철 대신 증류수를 900 μ l 첨가한 용액을 사용하였음

③ 단백질 유출량 실험

- ㉔ 항균 활성을 갖는 발효 당화유단백질을 대상으로 항균효과가 세균의 세포막에 대한 영향으로 인한 결과인지 확인하기 위해 단백질 유출량 실험을 진행하였음
 - 세균을 액체배지에 24 시간 또는 48 시간 배양시킨 후, 이를 다시 새로운 액체배지에

접종하여 대수기(O.D=0.7 ~ 1.0)가 되도록 배양하였음. 1.5 ml tube에 배양액을 1 ml씩 담아 1분 간 10,000×g에서 원심분리하고 균체를 얻은 후, 발효 당화유단백질 150 μl로 균체를 현탁하였음. 이를 30oC 또는 37oC에 배양하면서 0, 3, 6, 12, 24 시간에 10,000×g에서 10분 간 원심분리 후 상층액 100 μl을 취해 UVmax™ 96-well microplate(SPL)에 옮긴 후, 마이크로플레이트 분광광도계(Epoch™ Microplate Spectrophotometer, Biotek)를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였음

- 세균의 단백질 유출량은 대조군의 흡광도를 빼 값으로 나타냄

④ FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 측정을 통한 세포막의 손상 관찰

㉠ 발효 당화유단백질이 세균 세포막의 pore 생성으로 항균 활성을 갖는지 확인하기 위해 FACS를 이용하여 propidium iodide에 의해 염색된 nucleic acid를 측정하였음. propidium iodide는 정상 cell에서는 투과하지 못해 결합이 불가능하지만 세포막의 손상이 일어났을 때 cell에서 유출된 nucleic acid와 결합하는 원리를 이용하였음

- 위의 발효 당화유단백질 성장 패턴 실험에서 생장이 억제되었던 *C. perfringens*, *B. fragilis*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*를 실험에 사용하였음. Overnight으로 배양 후 1.5 ml tube에 배양액 1 ml을 담아 1분 간 10,000×g에서 원심분리하고 균체만 얻은 후 발효 당화유단백질 1 ml로 균체를 현탁하였음. 이를 각 세균의 최적 배양 온도에 따라 1 시간 동안 배양한 후 배양액 50 μl을 950 μl의 PBS에 희석하여 FACS tube(BD)에 담고 propidium iodide(Sigma Aldrich)를 최종 농도가 10 μg/ml이 되도록 첨가하였다. 폴고루 현탁한 후 FACS (BD FACSCanto™ II)로 염색된 nucleic acid를 측정하였음

- 손상 여부는 대조군과 실험군의 FACS 그래프를 동일 지점을 기준으로 구획하여 propidium iodide 퍼센트(PE-A)의 차이를 비교하여 판단하였음

⑤ Field Emission Scanning electronic microscopy(FE-SEM)을 이용한 형태학적 분석

㉠ 위의 성장 패턴 실험에서 항균 효과를 보인 세균을 선정하여 실험하였음. 시료 선정은 *L. monocytogenes*는 FMRP w/o LAB의 Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4B15, Gw-Glc-4M13으로 하였으며, *B. fragilis*와 *C. perfringens*는 FMRP w/, w/o LAB 모든 시료를 선정하였음. *P. aeruginosa*는 FMRP w/ LAB 시료 중 Gc-Gal-4B15, Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Glc-4B15와 FMRP w/o LAB 시료 중 Gc-Gal-4M13, Gc-Glc-4B15, Gw-Gal-4B15, Gw-Glc-4B15를 선정하여 분석하였음. 성장 패턴 실험과 동일한 조건 및 방법을 사용하여 배양액을 준비하였으며 이 배양액에 슬라이드 글라스 조각을 넣어 세균이 정착하여 성장하도록 하였음. 대조군은 배지와 세균만 넣어 배양한 것과 MRP를 사용하였음

㉡ 시료의 전처리

- 세균이 자란 슬라이드 글라스 조각 위에 1.8% glutaraldehyde solution(Sigma Aldrich)

- 을 떨어뜨린 후 30분 간 상온에서 반응시켜 1차 고정시키고 증류수에 3번 세척한 후 2% osmium tetroxide 용액으로 20분 간 반응시켜 2차 고정시켰음
- 2차 고정 후 증류수에 3번 세척하고, 에탄올 25%, 50%, 75%, 90%, 100%에서 각각 5분 간 건조시켰음. 100% 에탄올에서 슬라이드 글라스를 꺼내 상온에서 충분히 건조시킨 다음 Hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma Aldrich)를 슬라이드 글라스 위에 한 방울 떨어뜨리고 완전히 건조시켰음

㉔ FE-SEM 관찰

- 세균이 부착된 슬라이드 글라스에 전도성을 부여하기 위해 스퍼터 코터(sputter coater)로 금속 코팅한 후 FE-SEM(JEOL JSM-7600F)으로 형태학적 분석을 위해 세균의 길이와 세포막을 관찰하였음

(2) 연구 결과

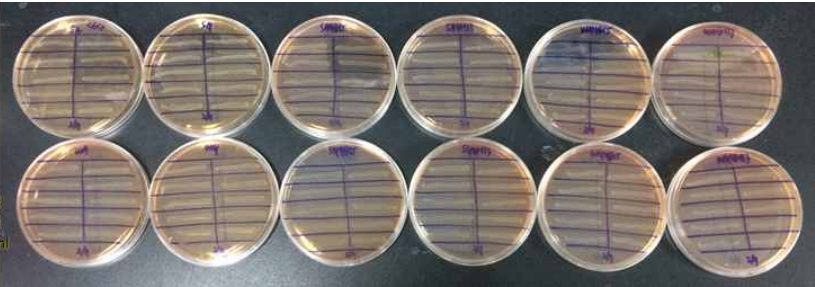
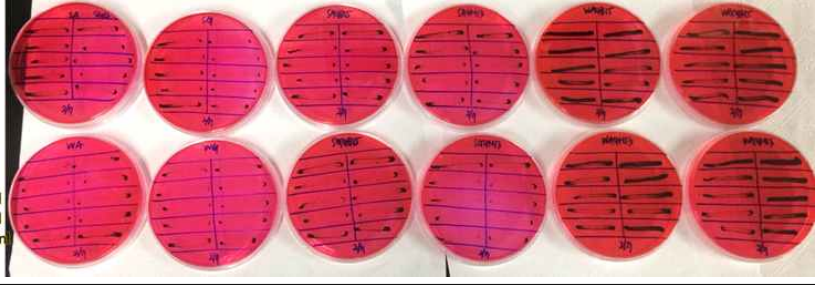
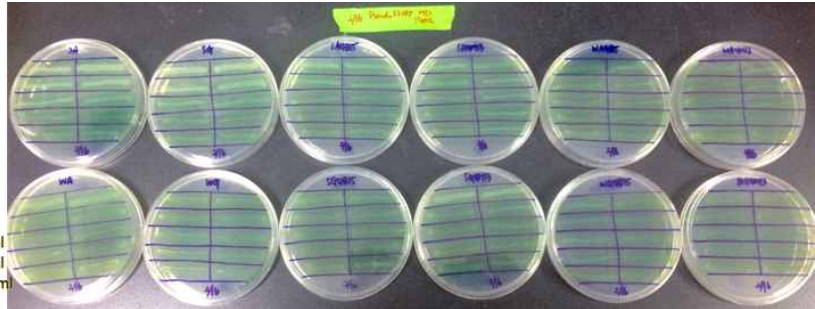
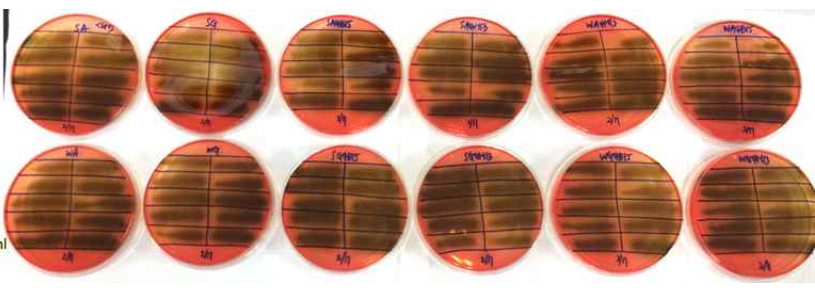
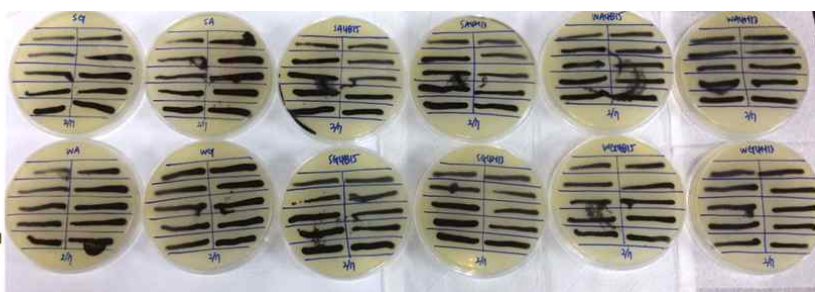
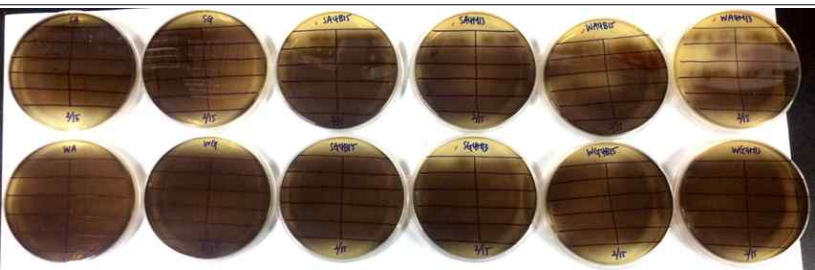
(가) 식중독세균(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, 병원성 *Escherichia coli* 등) 및 부패미생물(*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* 등)에 대한 발효 당화유단백질의 항균 활성 확인

① 항균 효과 실험을 통한 농도별 항균활성 확인

- 발효 당화유단백질의 항균 효과를 확인하기 위해 Patch 실험을 실시함
- Patch 결과는 아래 표 4-3과 같음

표 4-3. 발효 당화유단백질의 농도별 항균 효과

세균	Patch 결과	비고
<i>S. aureus</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음
<i>E. coli</i>		효과 없음

	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	
<i>Sal. Typhimurium</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음
<i>P. aeruginosa</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음
<i>L. monocytogenes</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음
<i>C. perfringens</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음
<i>B. fragilis</i>	 <p>50mg/ml 25mg/ml 12.5mg/ml 6.25mg/ml 3.125mg/ml</p>	효과 없음

(SA; Gc-Gal, SG; Gc-Glc, WA; Gw-Gal, WG; Gw-Glc)

- *S. aureus*, *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*에서는 발효가 이뤄지지 않은 당화유단백질을 포함하여 발효 당화유단백질 또한 항균효과를 보이지 않았음
- *B. fragilis*의 경우, Gc-Gal-4B15, Gc-Gal-4M13, Gc-Glc-4M13, Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13 (50 mg/ml)로 인한 성장 억제가 관찰되었음
- 종합적으로 발효균체가 없는 발효 당화유단백질이 50 mg/ml의 농도에서 일부 세균을 억제하는 경향을 보였으나 완전한 항균 효과는 나타내지 않았음. 이후 세균의 성장 패턴 분석을 통한 항균효과 확인 실험에서는 100 mg/ml 농도의 시료를 사용하였음

② 발효 당화유단백질 노출로 인한 식중독 세균 및 부패 미생물의 성장 패턴 확인

- ㉑ 대조군(양성 대조군; *Lb. rhamnosus* 4B15, *Lb. gasseri* 4M13, 음성 대조군; Gc-Gal, Gc-Glc, Gw-Gal, Gw-Glc)과 실험군(발효 당화유단백질; FMRP w/ LAB, FMRP w/o LAB)이 시료로 사용되었음
- *S. aureus*는 일반 배지에서의 성장 패턴과 비교했을 때 당화유단백질에 영향을 받지 않음. 발효균체가 포함되어 있는 발효 당화유단백질(FMRP w/ LAB)의 경우에는 12 시간 까지 일반적인 패턴으로 성장하다가 24 시간에서 일부 시료(Gc-Gal-4M13)에서 12 시간 보다 세균수가 감소함. 발효균체가 포함되어 있지 않은 발효 당화유단백질(FMRP w/o LAB)은 12 시간에 일부 시료에서 생장이 억제되었고 24 시간에 모든 시료에서 세균이 다시 성장하여 어느 정도의 항균효과를 보이는 것으로 판단됨 (그림 4-8)

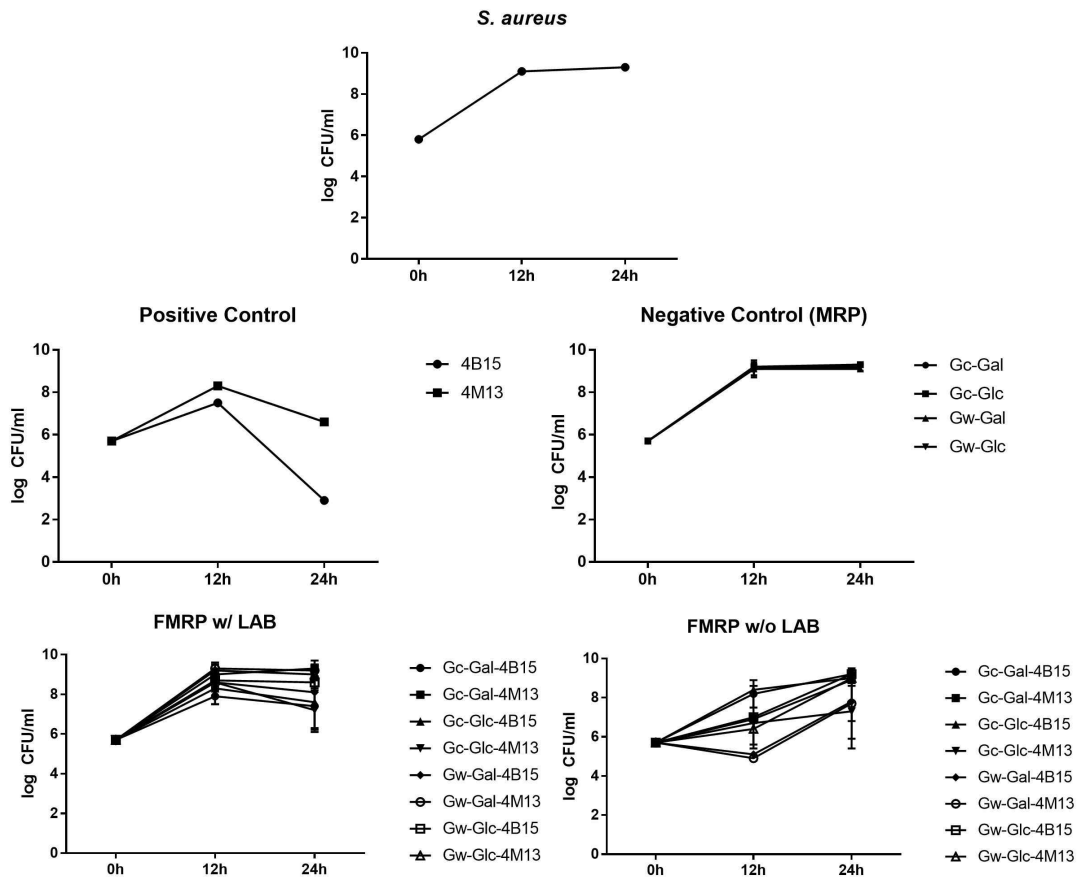


그림 4-8. 발효 당화유단백질에 대한 *S. aureus*의 성장 패턴

- *E. coli*의 경우, 음성 대조군(negative control)과 FMRP w/ LAB에서 영향을 받지 않아 성장 패턴은 일반 배지에서의 세균 성장 패턴과 유사한 형태를 나타냄
- FMRP w/o LAB은 *E. coli*가 12 시간에서 일부 시료(Gc-Gal-4M13, Gw-Glc-4M13, Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13)에서 생장이 억제된 것으로 보이나, 모든 시료가 24 시간에서는 세균의 성장을 억제하지 못하고 다시 최대 성장균수를 보여 일부 시료에서 *E. coli*에 대해 어느 정도의 항균효과를 보이는 것으로 판단됨(그림 4-9)

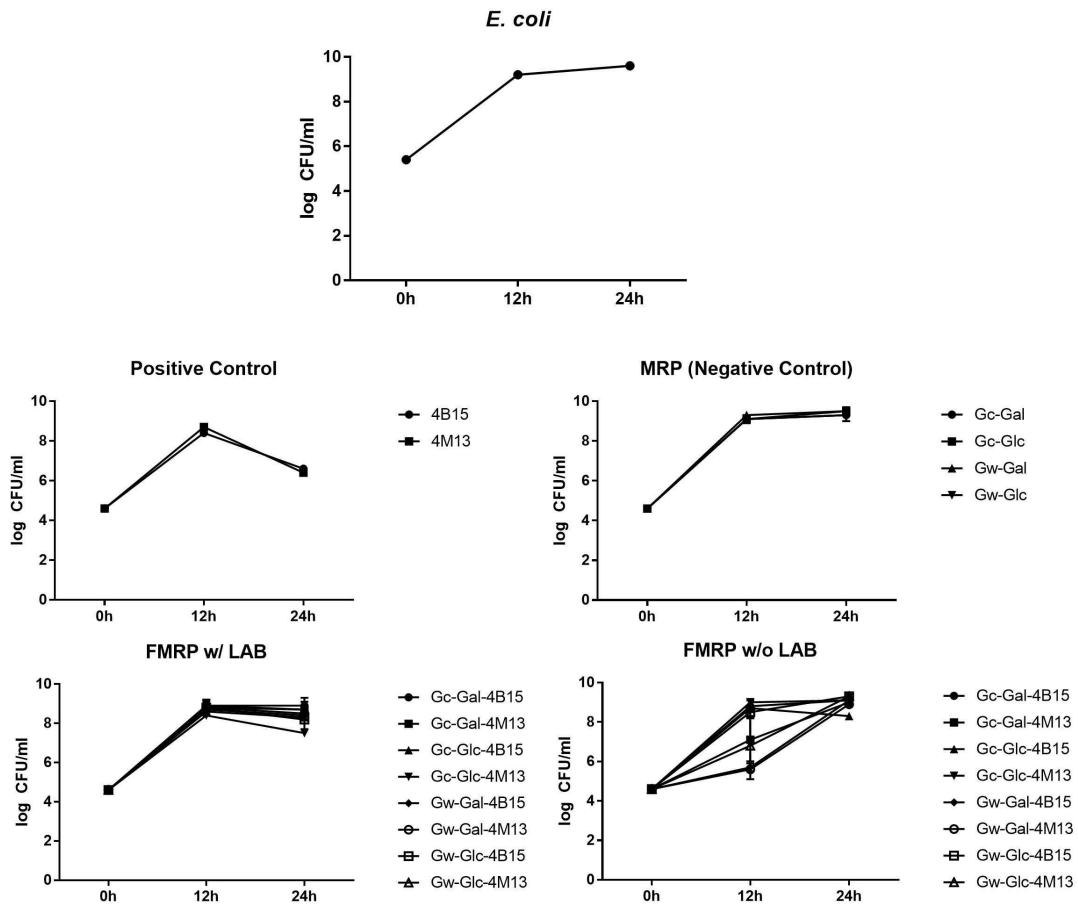


그림 4-9. 발효 당화유단백질에 대한 *E. coli*의 성장 패턴

- *Sal. Typhimurium*은 음성 대조군(당화유단백질)의 영향을 받지 않아 균 자체 성장 패턴과 유사하게 나타났음
- FMRP w/ LAB의 경우 12 시간에서 균의 성장을 억제시킨 Gc-Glc-4B15을 제외한 모든 시료에서 *Sal. Typhimurium*이 본래 성장 패턴으로 성장하였음. 24 시간에는 최종적으로 Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Gal-4B15, Gw-Glc-4B15에서 생장이 억제되었음. LAB와 패턴이 유사한 것으로 보아 이는 LAB 성장으로 인한 것으로 판단됨
- FMRP w/o LAB은 12 시간에서 Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Glc-4B15를 제외한 시료에서 세균의 생장이 초기 균수만큼 유지되다가, 24 시간에서 모든 시료가 초기 균수 이상 또는 세균의 최대 성장 균수까지 성장하는 패턴을 보였음(그림 4-10)

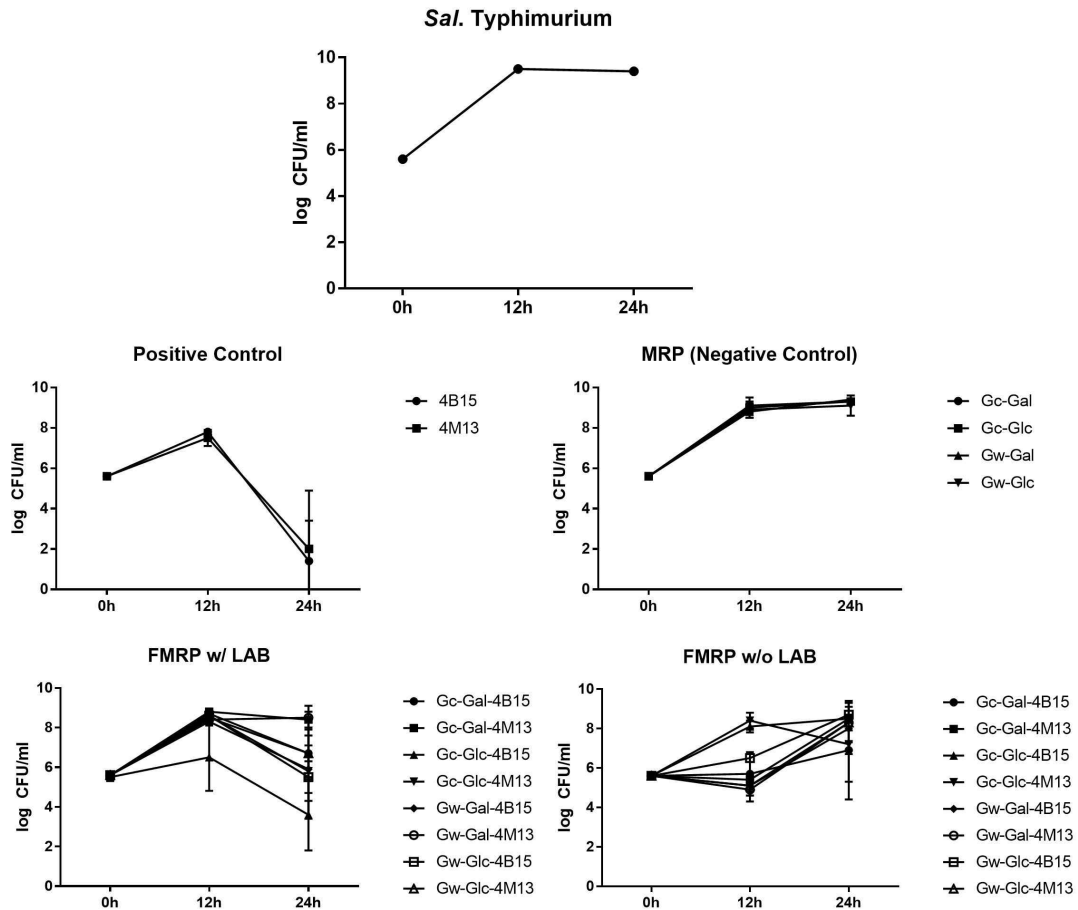


그림 4-10. 발효 당화유단백질에 대한 *Sal. Typhimurium*의 성장 패턴

- *L. monocytogenes*는 앞서 분석한 세균과는 특이적으로 양성 대조군(positive control)에서 다른 성장 패턴을 보이고 있음. 젖산균의 항균 효과와 관련된 논문들에 따르면 대부분의 세균은 젖산균과 함께 배양되었을 때 생장이 억제되는 패턴을 일반적으로 보이게 되는데, 본 연구에서는 *L. monocytogenes*의 경우 억제가 되지 않고 시간이 지남에 따라 성장하는 패턴을 보임
- 다른 세균과 달리 *L. monocytogenes*는 균 자체의 성장 패턴과 비교했을 때 음성 대조군에서 오히려 생장이 감소하였음
- FMRP w/ LAB에서 균은 Gc-Glc-4B15에 의해 12 시간부터 24 시간까지 초기 균수 정도로 생장이 유지되어 항균효과가 있음을 확인함. 나머지 시료들은 시간 경과에 따라 최대 균수까지 성장하는 패턴을 보임
- FMRP w/o LAB에서 *L. monocytogenes*는 12 시간까지는 성장하다가 24 시간에서는 Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4B15, Gw-Glc-4M13이 성장 억제 효과가 있었음 (그림 4-11)

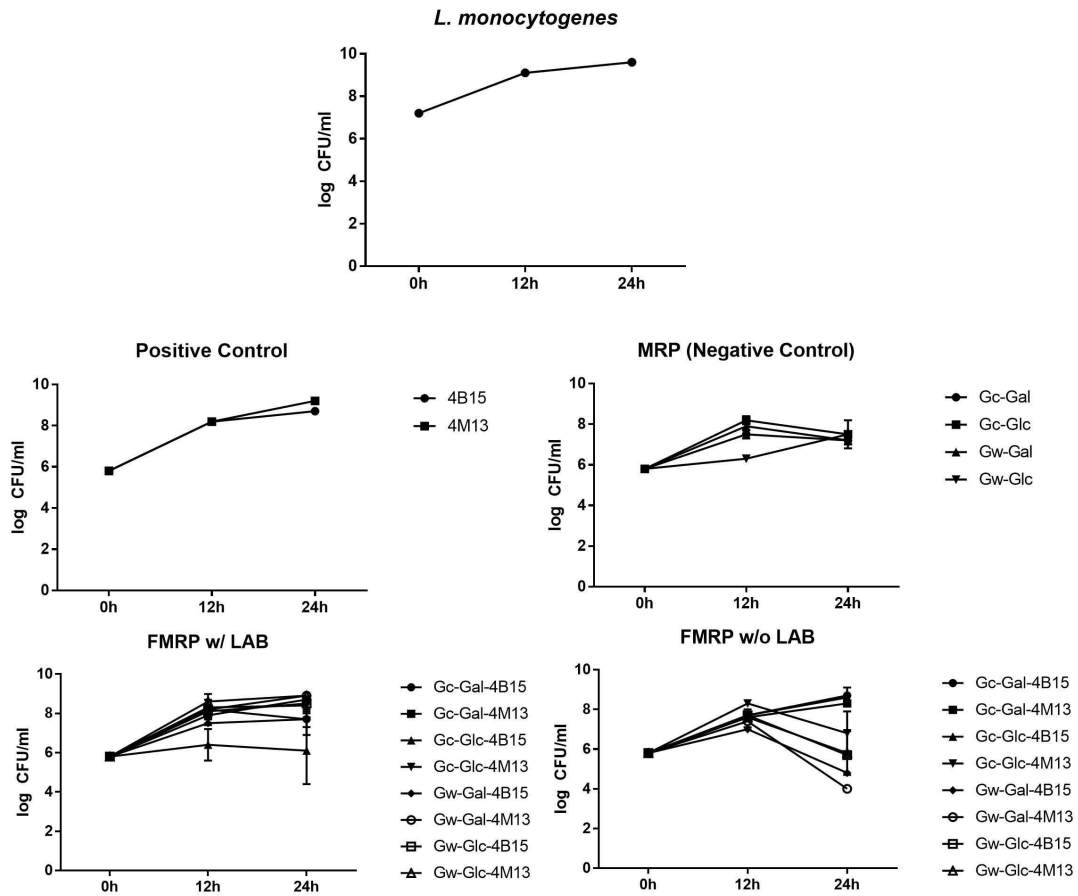


그림 4-11. 발효 당화유단백질에 대한 *L. monocytogenes*의 성장 패턴

- *C. perfringens*는 젖산균(양성 대조군)에 의해 완전히 제어가 되며, 젖산균이 없는 당화유단백질(음성 대조군)에서는 제어되지 않았음
- 또한, 모든 FMRP 시료(FMRP w/, w/o LAB)에 의해 생장이 억제가 되어 FMRP의 *C. perfringens*에 대한 항균효과를 파악함. FMRP w/ LAB 시료의 경우 LAB와 패턴이 유사한 것으로 보아 이는 LAB 성장으로 인한 것으로 판단됨. FMRP w/o LAB 시료가 LAB가 없음에도 불구하고 FMRP w/ LAB와 비슷한 현상은 LAB 발효로 인한 낮은 pH, LAB의 bacteriocin과 같은 항균 펩타이드 등 복합적인 작용이 있을 것으로 사료됨 (그림 4-12)

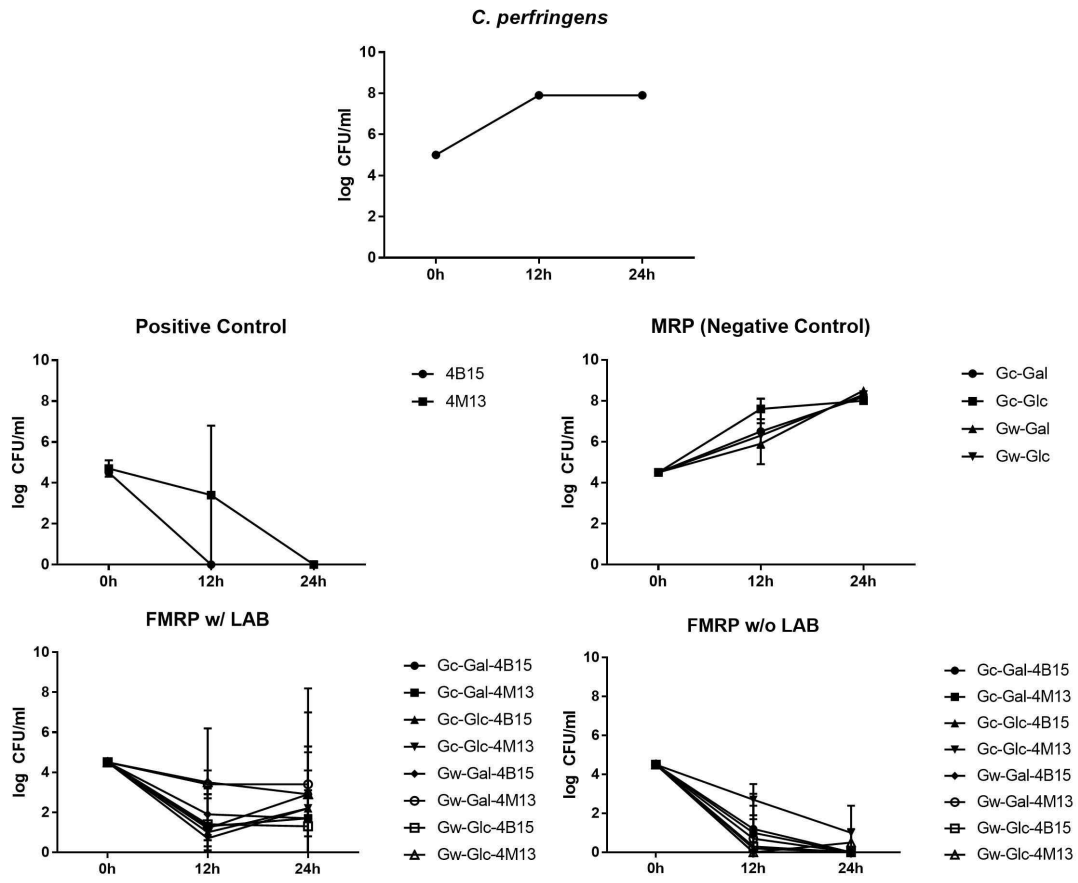


그림 4-12. 발효 당화유단백질에 대한 *C. perfringens*의 성장 패턴

- *B. fragilis*는 앞서 언급한 *C. perfringens*와 마찬가지로 젖산균에 의해서 억제되며, 모든 FMRP 시료(FMRP w/, w/o LAB)에 의해 억제가 되어 항균활성이 있다고 판단하였음. *B. fragilis* 또한 FMRP w/ LAB 시료의 경우 LAB와 패턴이 유사한 것으로 보아 이는 LAB 생장으로 인한 것으로 판단됨(그림 4-13)

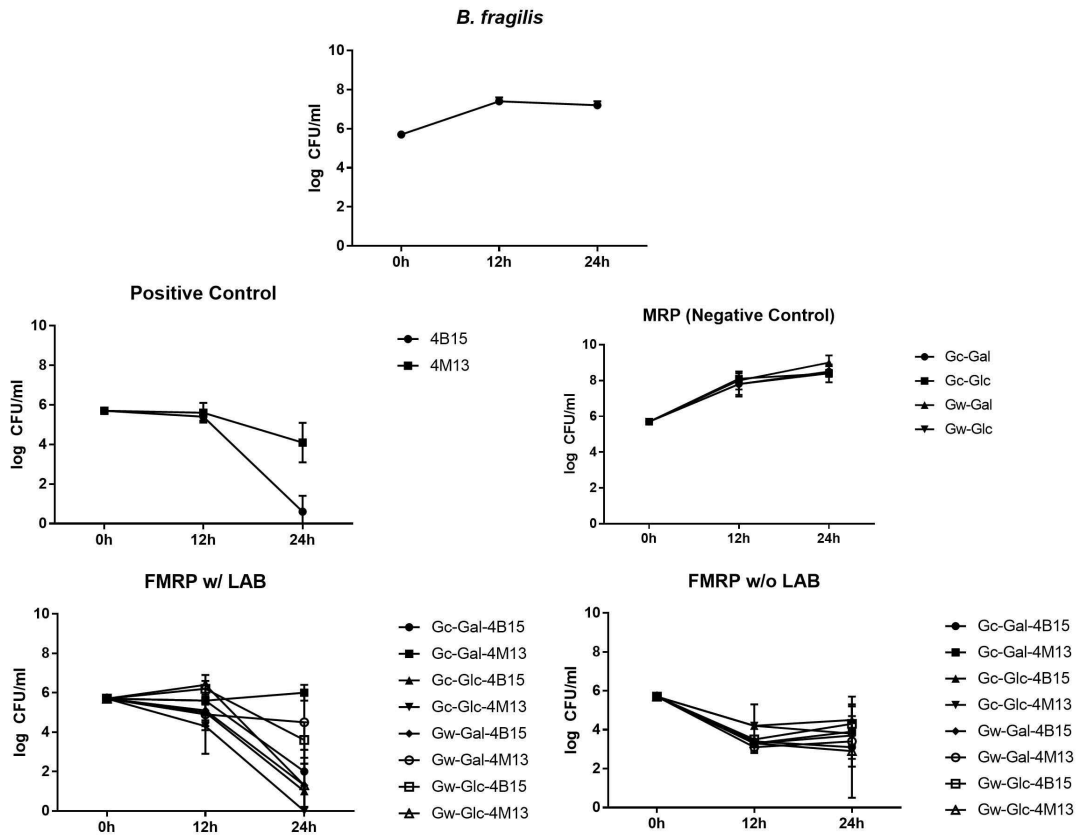


그림 4-13. 발효 당화유단백질에 대한 *B. fragilis*의 성장 패턴

- *P. aeruginosa*는 대부분의 FMRP 시료(FMRP w/, w/o LAB)에 의해 억제가 되어 항균 활성이 있다고 판단하였음. *P. aeruginosa*는 LAB에 의해서 억제되며, FMRP w/ LAB 시료 중 일부가 LAB와 패턴이 유사한 것으로 보아 이는 LAB 성장으로 인한 것으로 판단됨. Gc-Gal-4B15와 Gc-Glc-4M13은 LAB가 있을 때 효과를 보이지만 LAB 군체가 없을 때는 항균효과를 보이지 않았으며, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4M13은 LAB 유무에 상관없이 항균효과를 보이지 않았음. 반면에 Gc-Gal-4M13, Gw-Gal-4B15는 LAB가 있을 때 *P. aeruginosa*를 억제했지만 LAB가 없을 때 오히려 효과를 보였음. 이는 세균의 성장에 LAB가 직접적으로 영향을 주기도 하지만 발효 균체로부터의 대사물질에 의해서도 영향을 받는 것으로 사료됨 (그림 4-14)

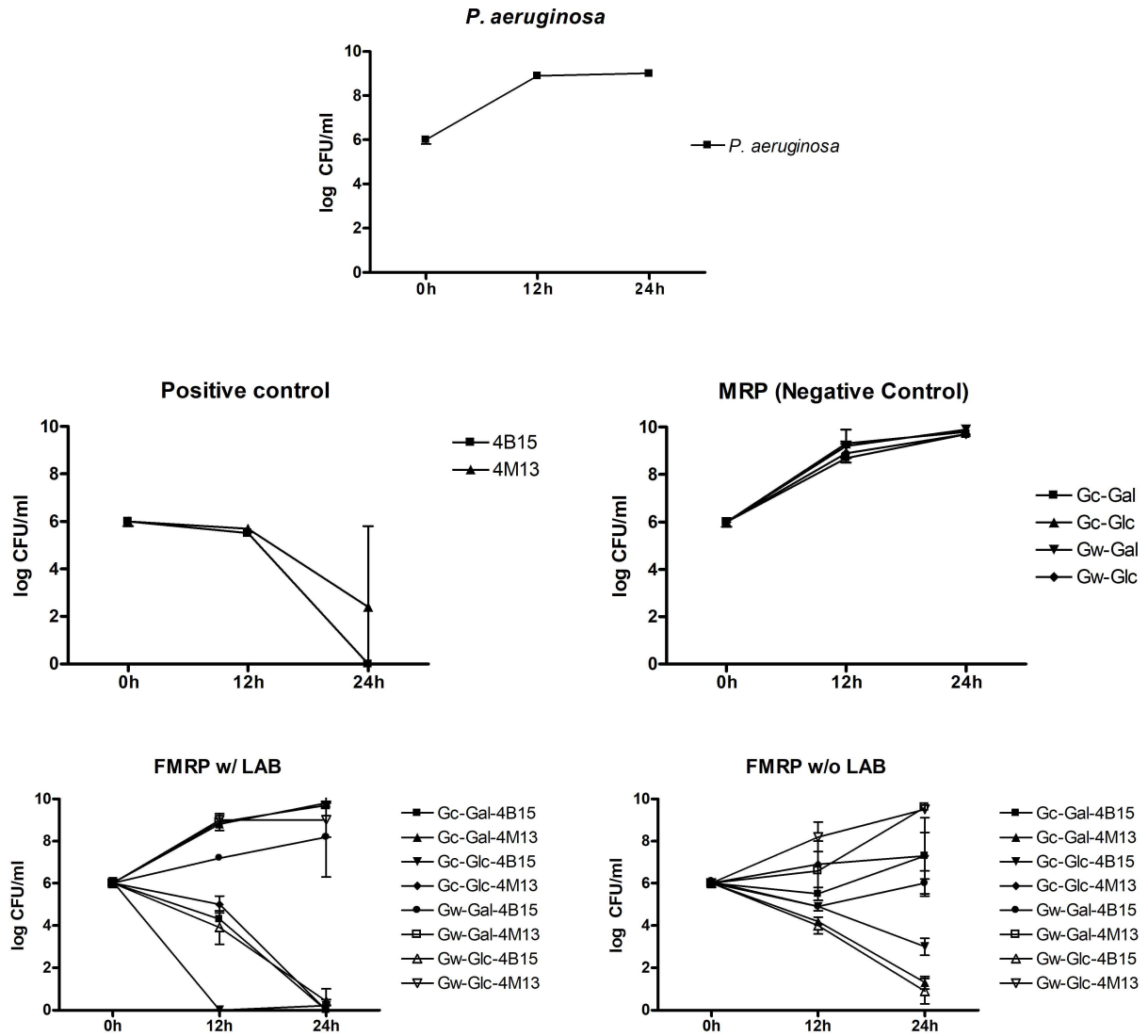


그림 4-14. 발효 당화유단백질에 대한 *P. aeruginosa*의 성장 패턴

㉔ 결론적으로, 초기 균수와 비교하여 초기 균수와 유사하거나 이하인 경우를 항균효과가 있는 것으로 판단했을 때, 모든 발효 당화유단백질에 의해 생장이 억제되는 균은 *C. perfringens*와 *B. fragilis*이며, 부분적으로 발효 당화유단백질이 *Sal. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*에 항균활성을 가짐. 종합적으로, 발효 당화유단백질이 일부 저병원성 세균 및 유해세균과 우유 부패세균에 대해 항균활성을 갖는 것을 확인할 수 있었음

③ 발효 당화유단백질 액상 및 분말 시제품(Gc-Glc-4B15)의 항균활성 측정

㉕ 다음 그림 4-15 발효 당화유단백질 시제품 시료에 노출된 각 세균의 성장 패턴을 나타냄

- 액상 시제품과 분말 시제품에서 세균의 성장을 모두 억제하는 것을 확인하였음. 액상

시제품에서는 *P. aeruginosa*가 12, 24 시간 모두에서 생장이 1 log CFU/ml 이하로 감소하여 억제 효과가 큰 것으로 판단하였으며, 24 시간에서 *B. fragilis*와 *Sal. Typhimurium*, *P. aeruginosa*가 0 시간 대비 1 log CFU/ml 이상 감소하였음. 분말 시제품에서는 모든 세균의 생장이 억제되었음. 특히 24 시간에서는 *L. monocytogenes*를 제외하고 모두 0 log CFU/ml로 제어되었음. 이는 시제품을 동결 건조한 후 분말화하였기 때문에 같은 농도라도 유효 성분이 분말 시제품에 농축되었을 것으로 사료됨

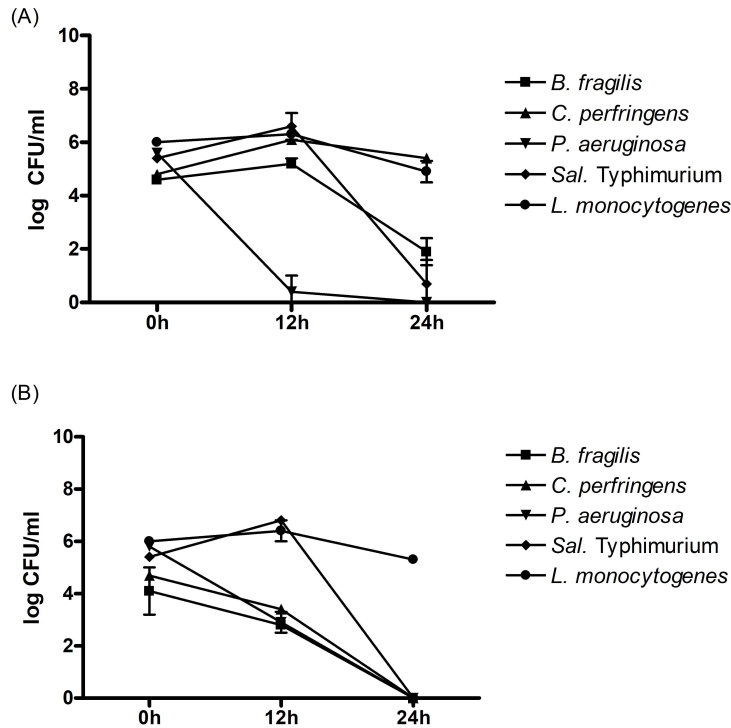


그림 4-15. 발효 당화유단백질 시제품에 노출된 대상 세균(*C. perfringens*, *B. fragilis*, *Sal. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*)의 성장 패턴
(A) 액상, (B) 분말 시제품

(나) 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 항균활성 확인 및 저해원인 분석

① 산성도(pH) 측정

- 증류수로 용해시킨 100 mg/ml의 시료를 37°C에서 0, 12, 24 시간 배양한 후 pH 측정기로 pH를 측정함. 시간에 따른 pH의 변화는 다음 그림 4-16과 같음
- 평균적으로 각 균의 pH는 LAB가 가장 낮으며 이는 젖산균이 배양됨에 따라 유기산이 생성된 결과로 사료됨. 발효 과정을 거치지 않은 MRP 시료가 가장 높은 pH를 나타내고 있음. FMRP w/ LAB에는 균체가 남아있어 FMRP w/o LAB 보다 낮은 pH를 나타냄 (그림 4-16)

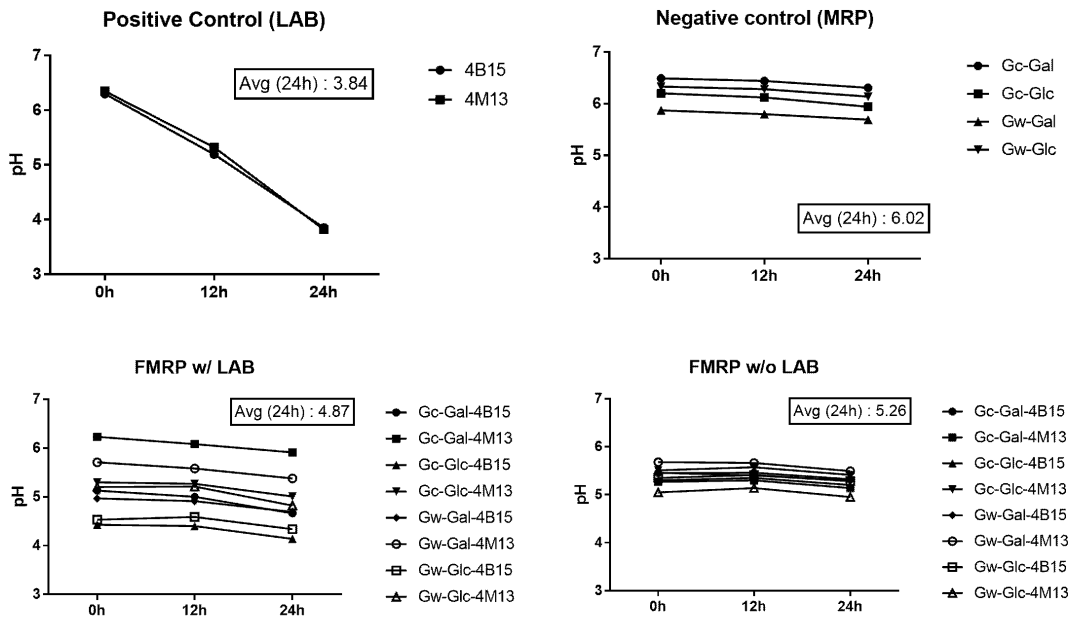


그림 4-16. 시간에 따른 pH의 변화

- 양성 대조군에서 생장이 억제되지 않은 *L. monocytogenes*를 제외한 나머지. 세균은 양성 대조군에서 생장이 억제되어 pH의 영향을 받았다고 볼 수 있음
- FMRP w/ LAB에서 pH 5 이하인 Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Gal-4B15, Gw-Glc-4B15가 *Sal. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. fragilis*에 항균활성을 갖지만, pH 5 이하인 Gc-Gal-4B15는 위의 세균의 생장에 영향을 미치지 않았음
- 또한 FMRP w/o LAB의 경우, *L. monocytogenes*의 생장을 억제하는 Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4B15, Gw-Glc-4M13는 pH 5 이상이므로 세균의 생장에 pH가 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨
- 따라서, 항균활성의 요소 및 원인에는 pH 외에 다른 기작들이 존재할 것으로 사료됨

② Iron chelation assay를 이용한 항균 기작 분석

- 발효 당화유단백질의 항균 활성이 Iron chelation 작용이 원인이 되는지 보기 위해 실험을 진행하였음. Iron chelation activity는 다음 표 4-4와 같이 측정되었음

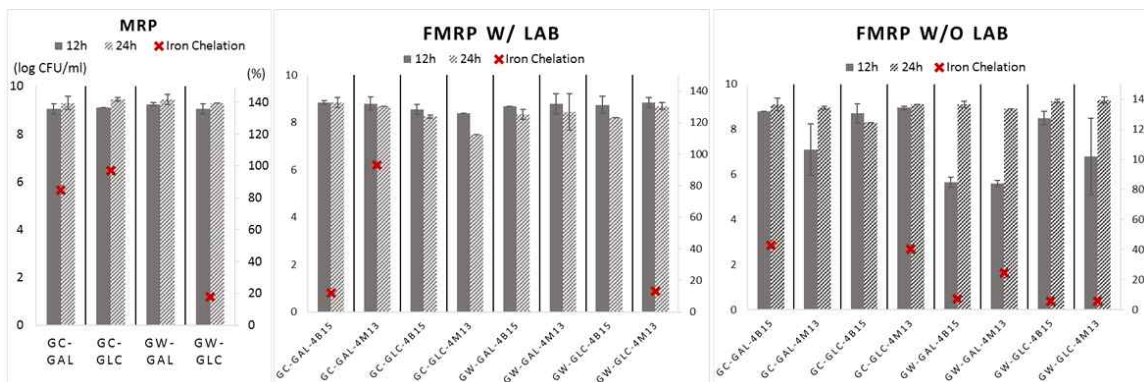
표 4-4. Iron chelation activity

시료	Iron chelation activity (%)	
MRP	Gc-Gal	84.81
	Gc-Glc	96.84
	Gw-Gal	O.R.
	Gw-Glc	17.71
FMRP w/ LAB	Gc-Gal-4B15	12.03
	Gc-Gal-4M13	93.04
	Gc-Glc-4B15	O.R.
	Gc-Glc-4M13	O.R.
	Gw-Gal-4B15	O.R.
	Gw-Gal-4M13	O.R.
	Gw-Glc-4B15	O.R.
	Gw-Glc-4M13	13.29
FMRP w/o LAB	Gc-Gal-4B15	43.04
	Gc-Gal-4M13	O.R.
	Gc-Glc-4B15	O.R.
	Gc-Glc-4M13	40.51
	Gw-Gal-4B15	7.59
	Gw-Gal-4M13	24.68
	Gw-Glc-4B15	5.70
	Gw-Glc-4M13	5.70

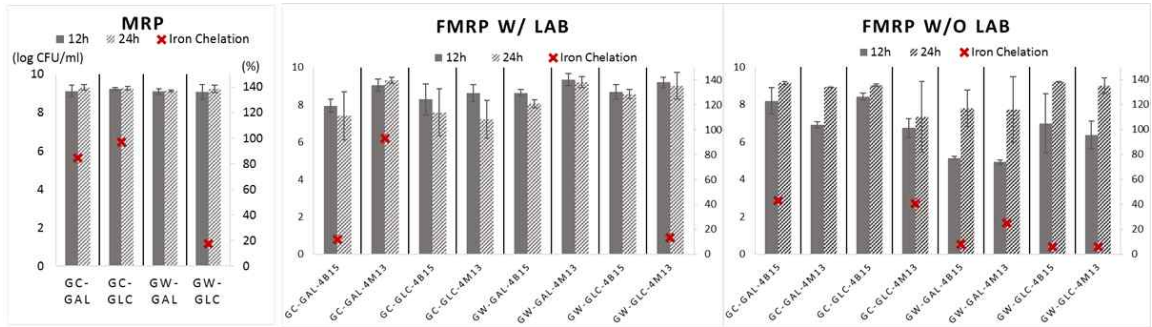
(O.R.; Out of Range)

- 이를 세균의 성장 패턴 실험 결과와 비교했을 때 관련성이 없음을 확인하였음(그림 4-17). Iron chelation activity가 높을수록 세균이 사용 가능한 철 이온이 감소하여 세균의 생장이 억제되므로 균수는 적어야 하지만 이러한 반비례 관계가 성립하지 않음

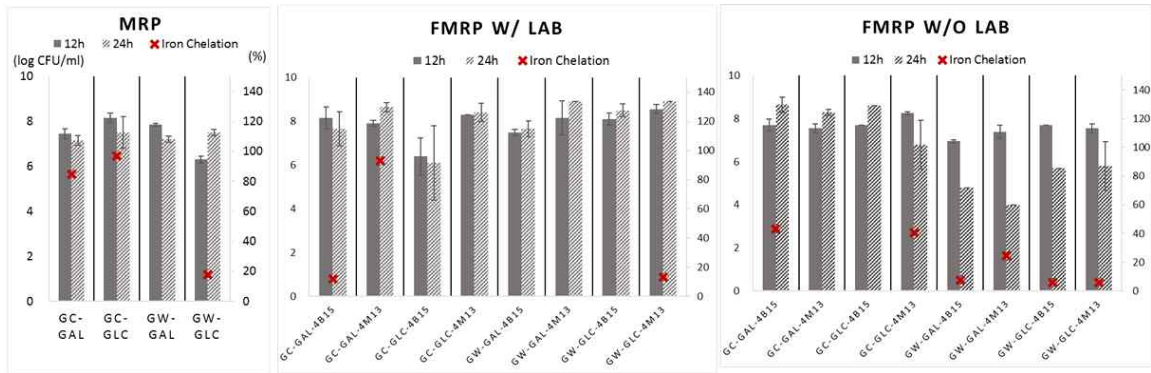
[*E. coli*]



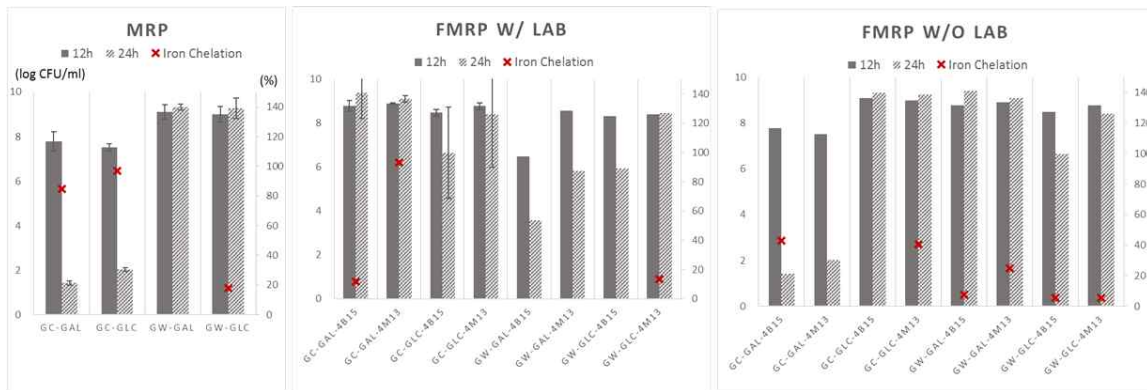
[*S. aureus*]



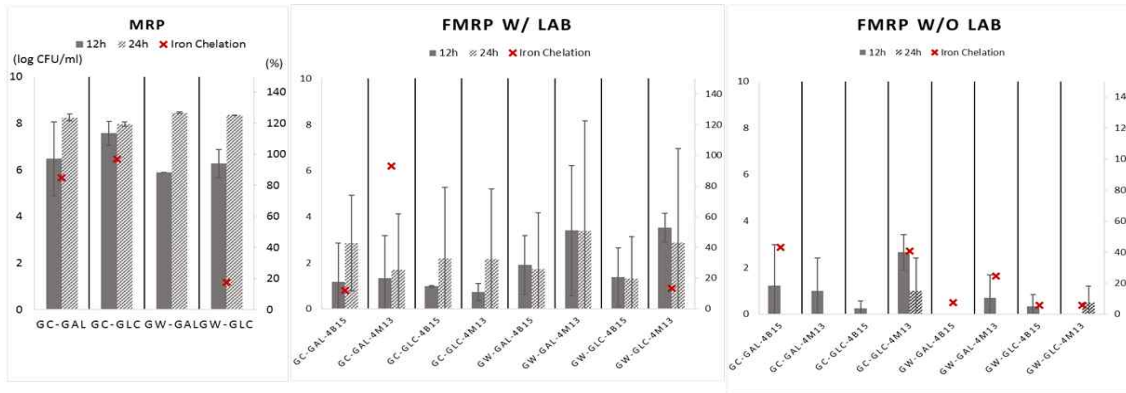
[*L. monocytogenes*]



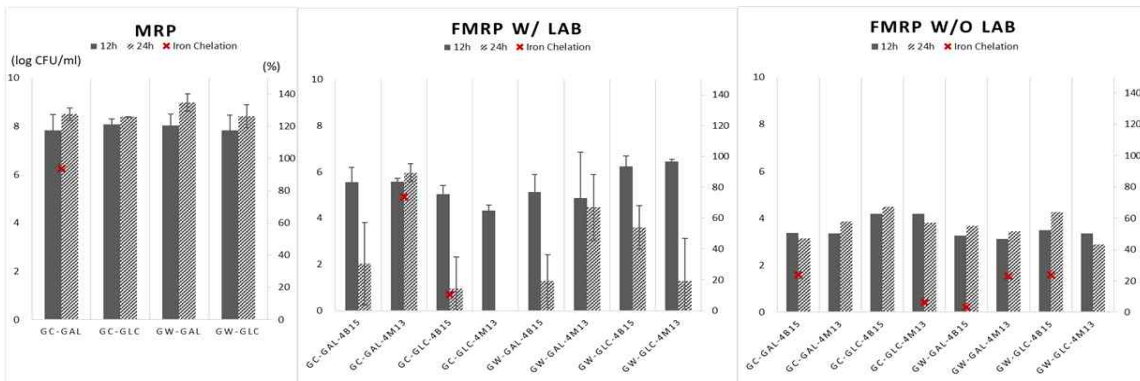
[*Sal. Typhimurium*]



[*C. perfringens*]



[*B. fragilis*]



[*P. aeruginosa*]

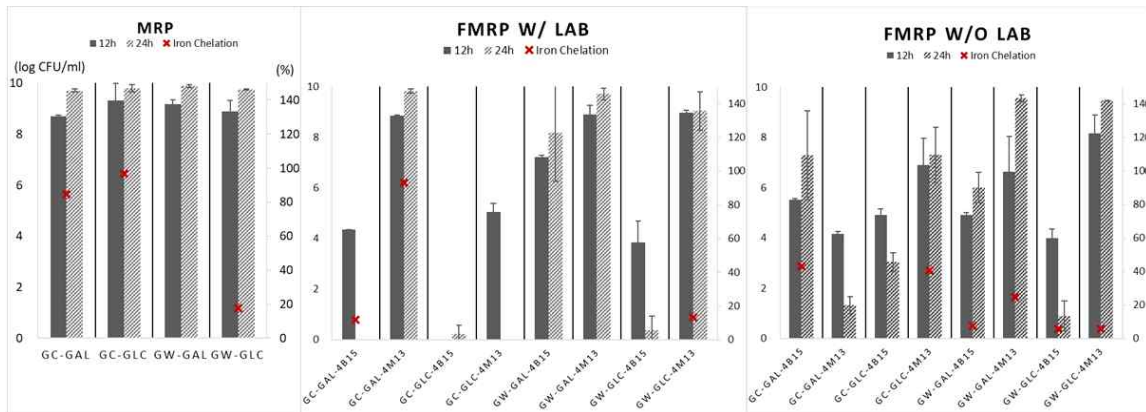


그림 4-17. 세균의 성장과 iron chelation activity의 상관성

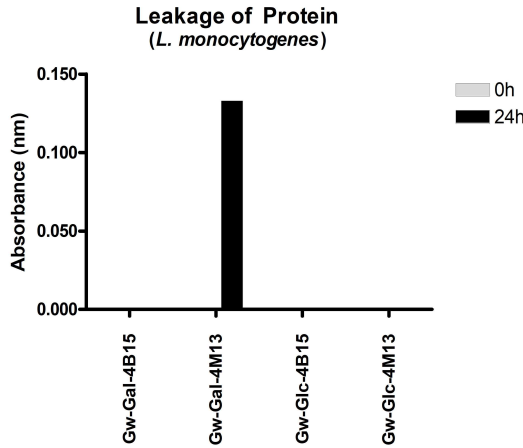
(×; Iron chelation activity(%), ■; 12 시간에서의 세균수(log CFU/ml), ▨; 24 시간에서의 세균수(log CFU/ml))

③ 단백질 유출량 실험

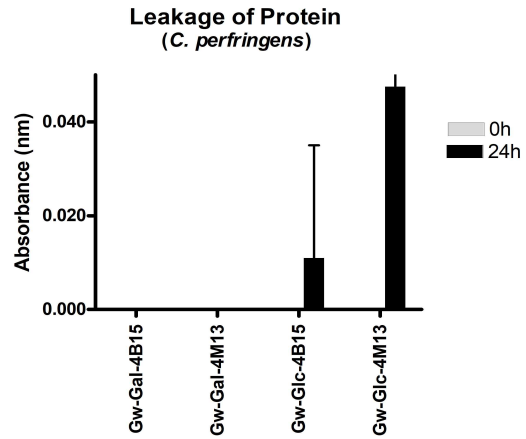
- 발효 당화유단백질(FMRP)이 세포막에 손상을 입힘으로써 항균활성을 나타내는지 확인하기 위해 세포막 손상으로 유출된 단백질을 260 nm에서 흡광도를 측정하였음. FMRP만의 효과를 분석하기 위해 LAB가 없는 FMRP를 사용하였으며, 단백질 유출량은 실험군(FMRP + 대상 세균)의 흡광도에서 대조군(FMRP)의 흡광도를 뺀 값으로 나타내었

음. 24 시간 경과 후 단백질 유출량은 일부 시료에서 0 시간과 비교했을 때 증가하였음(그림 4-18)

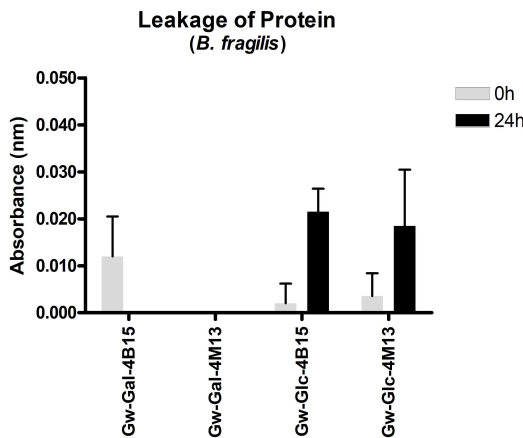
(가) *L. monocytogenes*



(나) *C. perfringens*



(다) *B. fragilis*



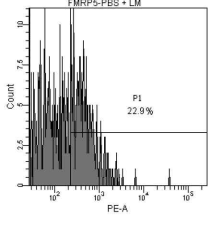
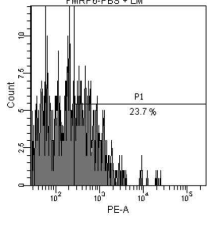
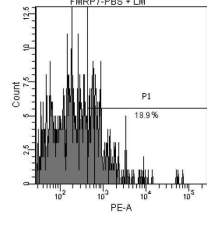
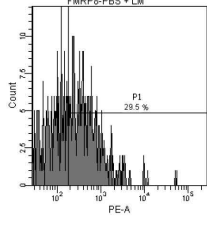
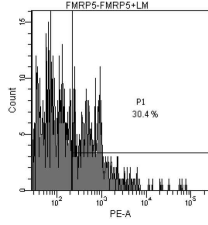
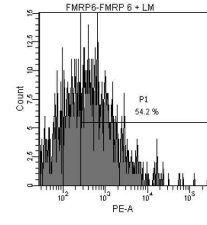
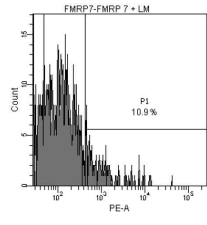
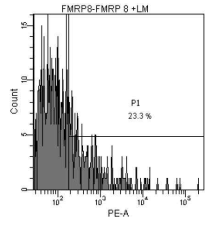
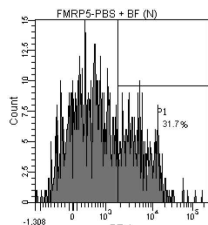
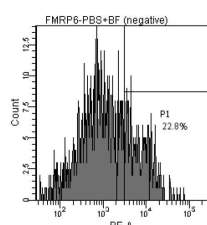
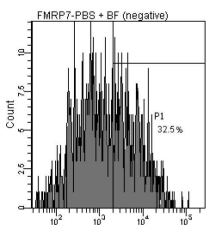
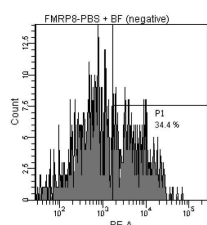
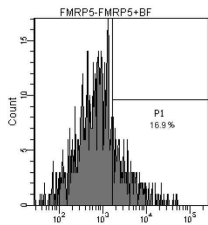
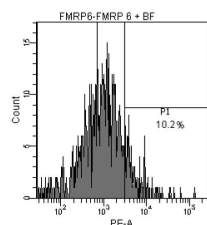
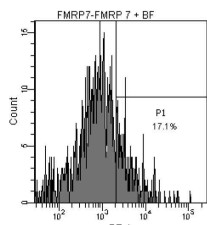
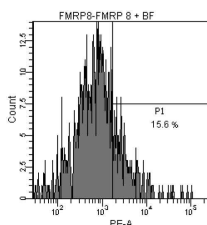
(라) *P. aeruginosa*

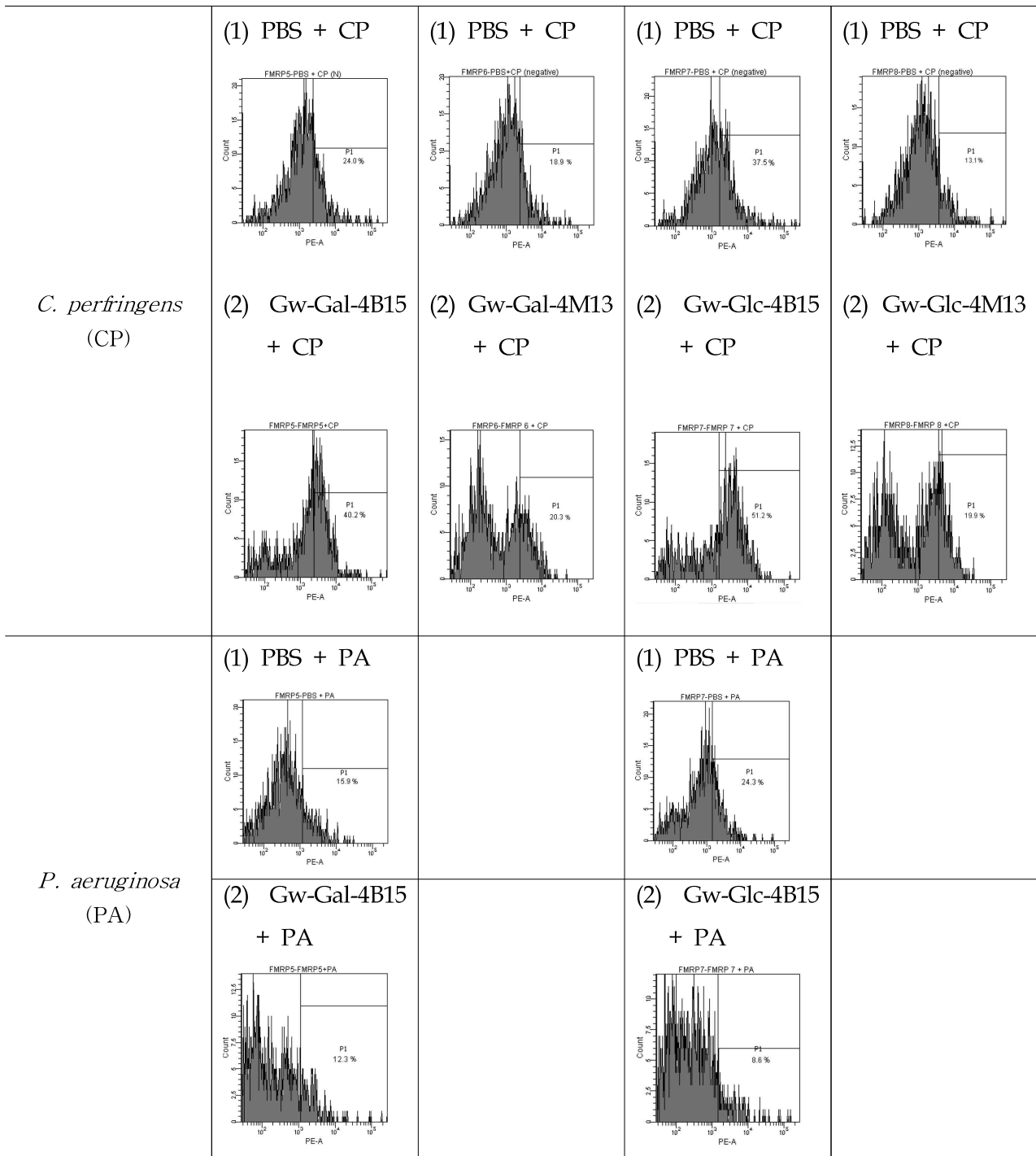
그림 4-18. 발효 당화유단백질 노출 후 단백질 유출량

④ FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 측정을 통한 세포막의 손상 관찰

- 세포막이 손상되면 PI의 흡수량이 높아짐에 따라 그래프가 오른쪽으로 이동하게 됨. *L. monocytogenes*와 *C. perfringens*의 경우 일부 FMRP 시료에서 PBS에 노출시킨 균의 그래프보다 FMRP에 노출시킨 균의 그래프가 오른쪽으로 치우쳐 있어 세포막에 손상이 가해졌다고 판단하였음. 이에 반해 *B. fragilis*와 *P. aeruginosa*의 경우 그래프의 이동이 나타나지 않아 세포막의 손상이 있다고 판단할 수 없었음(그림 4-19)

그림 4-19. FMRP에 노출된 세균의 FACS 분석

	Gw-Gal-4B15	Gw-Gal-4M13	Gw-Glc-4B15	Gw-Glc-4M13
<i>L. monocytogenes</i> (LM)	(1) PBS + LM 	(1) PBS + LM 	(1) PBS + LM 	(1) PBS + LM 
	(2) Gw-Gal-4B15 + LM 	(2) Gw-Gal-4M13 + LM 	(2) Gw-Glc-4B15 + LM 	(2) Gw-Glc-4M13 + LM 
<i>B. fragilis</i> (BF)	(1) PBS + BF 	(1) PBS + BF 	(1) PBS + BF 	(1) PBS + BF 
	(2) Gw-Gal-4B15 + BF 	(2) Gw-Gal-4M13 + BF 	(2) Gw-Glc-4B15 + BF 	(2) Gw-Glc-4M13 + BF 



⑤ Field emission scanning electron microscopy(FE-SEM)를 이용한 형태학적 분석

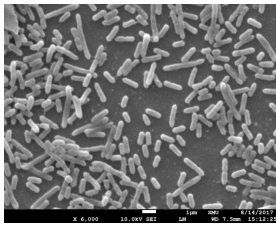
- 위의 생장 패턴 실험에서 항균 효과가 있었던 FMRP와 대상 세균에 대해 실험하였음.
- 시료 선정은 *L. monocytogenes*는 FMRP w/o LAB의 Gw-Gal-4B15, Gw-Gal-4M13, Gw-Glc-4B15, Gw-Glc-4M13으로 하였으며, *B. fragilis*와 *C. perfringens*는 FMRP w/, w/o LAB 모든 시료를 선정하였음. *P. aeruginosa*는 FMRP w/ LAB 시료 중 Gc-Gal-4B15, Gc-Glc-4B15, Gc-Glc-4M13, Gw-Glc-4B15와 FMRP w/o LAB 시료 중 Gc-Gal-4M13, Gc-Glc-4B15, Gw-Gal-4B15, Gw-Glc-4B15를 선정하여 분석하여 항균활성

을 형태학적으로 파악하고자 하였음

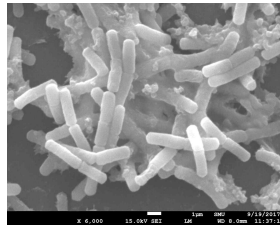
- 배지에 배양시킨 세균과 발효 당화유단백질을 첨가해 배양시킨 세균을 FE-SEM으로 각각 촬영하였음
- 액체 배지에 배양한 경우 *L. monocytogenes*의 세균수가 현저히 많지만, 액체 배지에 발효 당화유단백질을 첨가하여 배양한 경우 같은 배율에서 관찰할 때 동일 면적 당 세균수가 적음(그림 4-19). 또한 그림 4-19의 가. Gw-Gal-4B15 시료를 관찰했을 때 형태학적으로 일반적인 *L. monocytogenes*(0.5~2 μm)보다 긴 형태(4.16 μm)를 보임. 이는 세균의 스트레스 환경 노출에 의한 것으로 사료됨
- *C. perfringens*의 경우 MRP에서 길이의 변화가 나타난 것이 보이나 세균의 세포막 변형은 관찰되지 않았음. 전반적으로 FMRP 시료에서 세포막의 변형을 관찰할 수 있었음. *B. fragilis* 또한 세포의 길이 변화가 두드러졌으며 찌그러진 듯한 형태의 변화를 관찰할 수 있었음. 길이 변화는 시료의 특성(pH 등)에 따른 스트레스 환경에 의한 것으로 사료됨

가. *L. monocytogenes* FE-SEM 결과

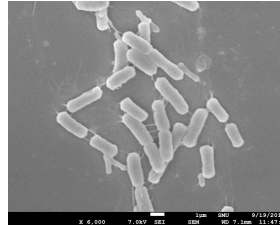
L. monocytogenes



Gw-Gal

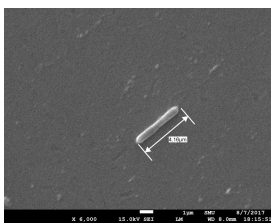


Gw-Glc

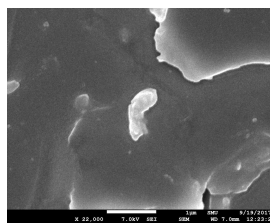


< FMRP w/ LAB >

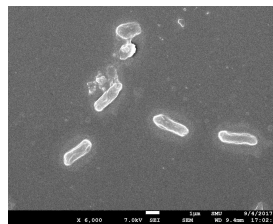
Gw-Gal-4B15



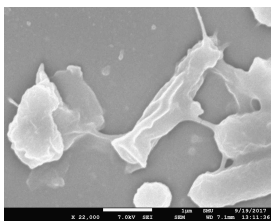
Gw-Gal-4M13



Gw-Glc-4B15

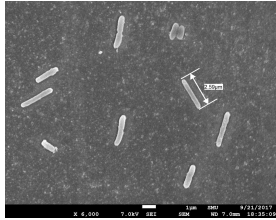


Gw-Glc-4M13



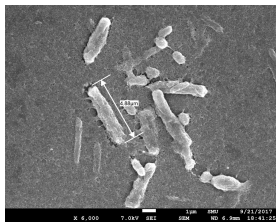
나. *B. fragilis* FE-SEM 결과

B. fragilis

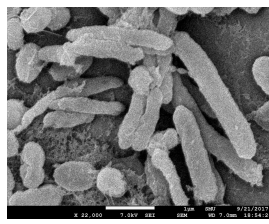


< MRP >

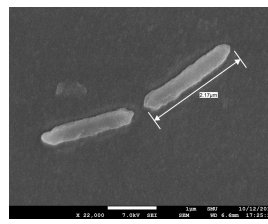
Gc-Gal



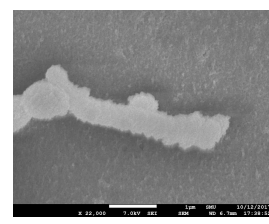
Gc-Glc



Gw-Gal

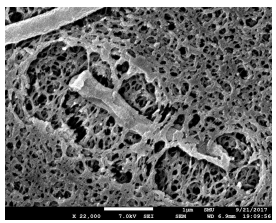


Gw-Glc

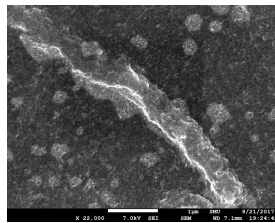


< FMRP w/ LAB >

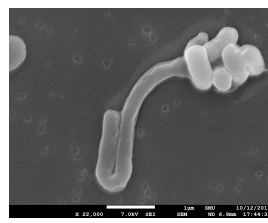
Gc-Gal-4B15



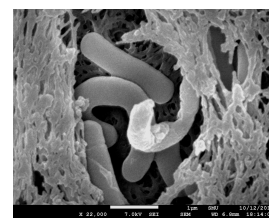
Gc-Gal-4M13



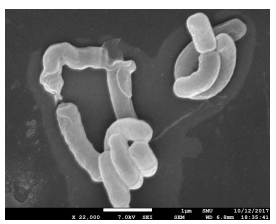
Gc-Glc-4B15



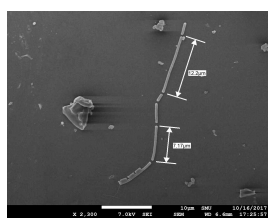
Gc-Glc-4M13



Gw-Gal-4B15



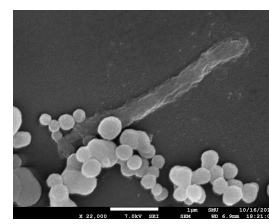
Gw-Gal-4M13



Gw-Glc-4B15

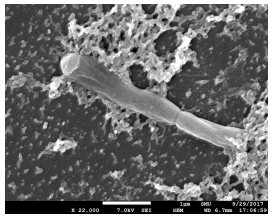


Gw-Glc-4M13

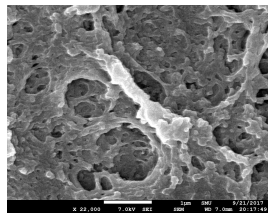


< FMRP w/o LAB >

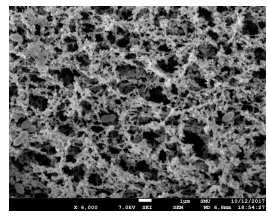
Gc-Gal-4B15



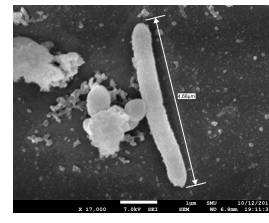
Gc-Gal-4M13



Gc-Glc-4B15



Gc-Glc-4M13

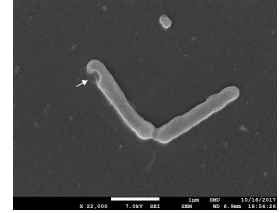
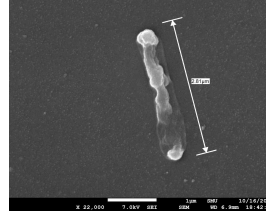
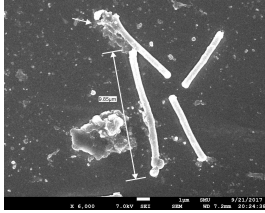


Gw-Gal-4B15

Gw-Gal-4M13

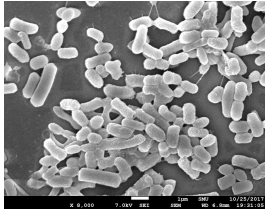
Gw-Glc-4B15

Gw-Glc-4M13



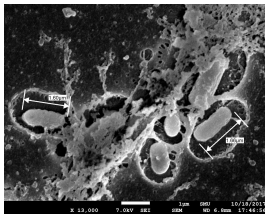
다. *C. perfringens* FE-SEM 결과

C. perfringens

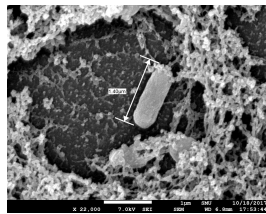


< MRP >

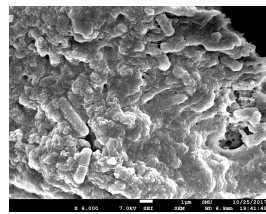
Gc-Gal



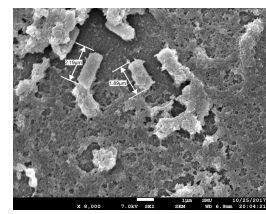
Gc-Glc



Gw-Gal

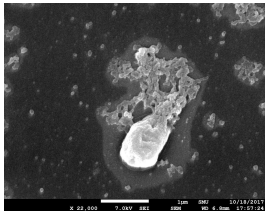


Gw-Glc

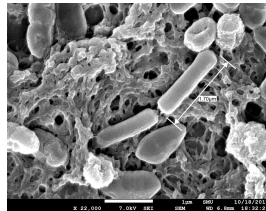


< FMRP w/ LAB >

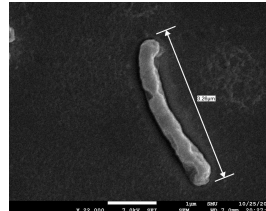
Gc-Gal-4B15



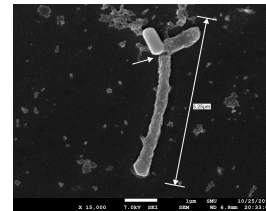
Gc-Gal-4M13



Gc-Glc-4B15



Gc-Glc-4M13



Gw-Gal-4B15

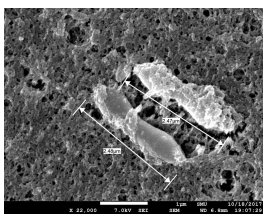
Gw-Gal-4M13

Gw-Glc-4B15

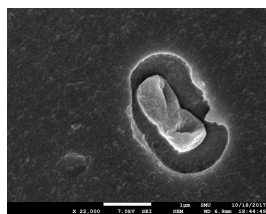
Gw-Glc-4M13

< FMRP w/o LAB >

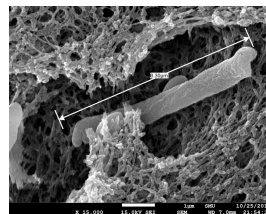
Gc-Gal-4B15



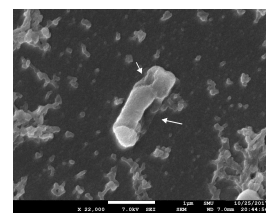
Gc-Gal-4M13



Gc-Glc-4B15



Gc-Glc-4M13



Gw-Gal-4B15

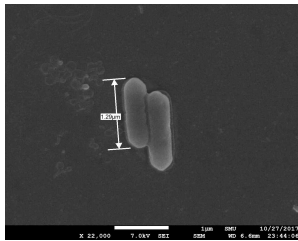
Gw-Gal-4M13

Gw-Glc-4B15

Gw-Glc-4M13

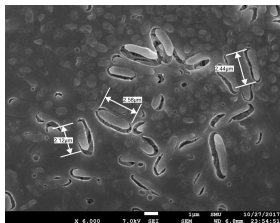
라. *P. aeruginosa* FE-SEM 결과

P. aeruginosa

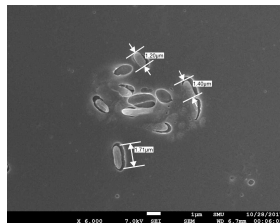


< MRP >

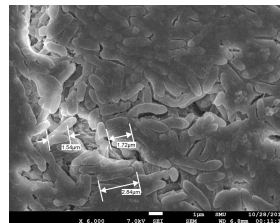
Gc-Gal



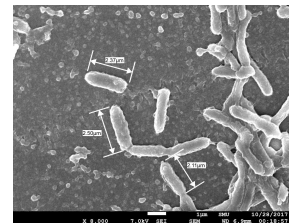
Gc-Glc



Gw-Gal



Gw-Glc

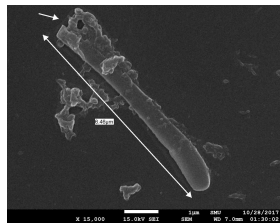


< FMRP w/ LAB >

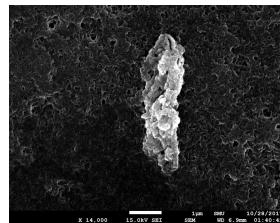
Gc-Gal-4B15



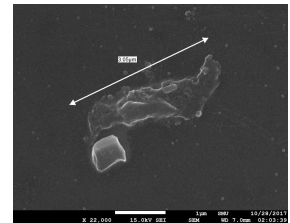
Gc-Glc-4B15



Gc-Glc-4M13

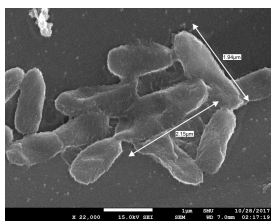


Gw-Glc-4B15



< FMRP w/o LAB >

Gw-Gal-4B15



Gw-Glc-4B15

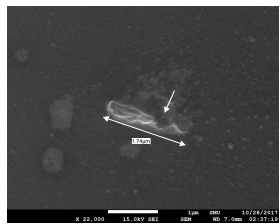


그림 4-20. FE-SEM을 이용한 항균 FMRP에 대한 세균의 형태학적 관찰

다. 발효 당화유단백질 함유 유제품 급여를 통한 동물모델의 장내 저병원성 세균 제어 효과 및 기저성 질환 개선 효과 확인

(1) 실험 내용

(가) 발효 당화유단백질 함유 유제품 급여 동물모델의 장내 저병원성 세균 제어 효과 및 기저성 질환 지표 개선 효과 확인과 관련 메커니즘 규명

① 마우스 구입 및 사육환경

- 장내 저병원성 세균의 기저성 질환 발생 확인을 위하여 5 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험에 사용하였음
- 사육은 개체의 체중을 측정 후 그룹 간 체중의 차이가 최소화 되도록 균 분리를 실시한 후, 식별번호 부여 후 한 케이지당 3~4 마리씩 사육하였음(표 4-5). 감염 동물실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도 20~23°C, 습도 40~60%로 유지하였음. 모든 식이는 알트로민(Altromin)에서 생산하는 실험동물용 사료를 기본 공급하였고, 깔짚은 주 1회 교체하였음

표 4-5. 장내 저병원성 세균 제어 효과 및 기저성 질환 개선 효과 실험 그룹

Group	Treatment	n
Control	PBS	3
SA	<i>S. aureus</i>	3
BF	<i>B. fragilis</i>	2
CP	<i>C. perfringens</i>	6
SA + FMRP	<i>S. aureus</i> + 발효 당화유단백질 함유 유제품	5
BF + FMRP	<i>B. fragilis</i> + 발효 당화유단백질 함유 유제품	7
CP + FMRP	<i>C. perfringens</i> + 발효 당화유단백질 함유 유제품	4

* *S. aureus* : 8~9 Log CFU/ml

* *B. fragilis* : 8 Log CFU/ml

* *C. perfringens* : 8 Log CFU/ml

* 발효 당화유단백질 함유 유제품 : 100 mg/ml

② 장내 저병원성 세균 및 발효 당화유단백질 투여

㉠ 시험 균액의 제조

- *S. aureus* 시험균액의 제조: *S. aureus* ATCC13565, *S. aureus* ATCC14458, *S. aureus* ATCC23235, *S. aureus* ATCC27664, *S. aureus* NCCP10826을 각각 10 ml의 tryptic soy broth(TSB)에서 37°C, 24 시간 배양한 후, 다시 새로운 10 ml TSB에 37°C, 24 시간 배양함. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 10 분, 4°C)하여 동량의

phosphate buffer solution(PBS)로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 균질화하여 이를 시험균액으로 사용하였음

- *B. fragilis* 시험균액의 제조: *B. fragilis* ATCC43858, *B. fragilis* ATCC43859, *B. fragilis* ATCC43860을 각각 10 ml의 BHI broth에서 gas pack과 함께 37°C에서 48 시간 혐기 배양한 후, 배양액을 다시 새로운 10 ml의 BHI broth에 gas pack과 함께 37°C에서 48 시간 혐기배양함
- *C. perfringens* 시험균액의 제조: *C. perfringens* NCCP10846, *C. perfringens* NCCP10858, *C. perfringens* NCCP10347, *C. perfringens* NCCP15911, *C. perfringens* NCCP15912, *C. perfringens* NCCP10970을 각각 10 ml의 cook meat medium (CMM)에서 gas pack (AnaeroGen, Oxiod, UK)과 함께 37°C에서 24 시간 혐기배양한 후, 배양액 1 ml을 9 ml의 Brain Heart Infusion (BHI) broth에 gas pack과 함께 37°C에서 24 시간 혐기 배양함. 배양액을 conical tube에 각각 3 strain씩 섞은 후 원심분리 (1,912×g, 10 분, 4°C) 하여 15 ml의 PBS로 녹여 이를 다시 섞음. 다시 원심 분리 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험균액으로 사용하였음. 배양액을 conical tube에 모두 섞은 후 원심분리(1,912×g, 10 분, 4°C)하여 동량의 PBS로 2 회 세척 후 최종 pellet을 1 ml의 PBS로 녹여 이를 시험 균액으로 사용하였음

㉠ 발효 당화유단백질의 제조: 발효 당화유단백질은 2차년도 연구를 통해 선별한 Gc-Glc-4B15로 선정하였음. 2차년도 시제품 항균활성 결과에 따라 발효 당화유단백질 100 mg/ml의 농도로 제조하여 경구 투여에 사용하였음

㉡ 1주일간의 순화기간 후 6 주령의 마우스에게 1주일간 항생제 식수를 투여 후 *S. aureus*, *B. fragilis*, *C. perfringens*를 각각 감염시킨 마우스에서 장내에서의 균집화 여부를 확인하기 위해 분변 분석을 시행하였음. 주 1회 각 군의 마우스 분변을 채취하여 배지에 평판도말한 후 배양시켜 세균 집락을 계수하였으며 이를 통해 균집화를 확인하였음. 이를 통해 장내 저병원성 세균이 장내에 정착된 것으로 판단하고 장내 저병원성 세균으로 인한 기저성 질환 확인 및 당화유단백질의 개선효과를 확인하기 위해 2 일 간격으로 8주 동안 시험균액 100 μ l를 경구 투여 한 후, 발효 당화 유단백질을 100 μ l를 경구 투여함. 실험 대조군의 경우 실험군의 경구투여 용량과 동량의 PBS를 경구투여함

③ 마우스 부검 및 기저성 질환 지표 분석

- 경구 투여 종료 다음 날 부검을 실시하였음. 혈액 채취 및 장기(대장, 소장, 맹장, 간, 비장)을 적출함. 장기는 적출한 즉시 장내 저병원성 세균의 독성 및 염증 발생 가능성을 판단하기 위해 간과 비장은 무게를 측정하고, 대장과 소장은 길이를 측정하였음
- 발효 당화유단백질 함유 유제품 급여를 통한 기저성 질환 지표 개선효과 확인 및 관련 매커니즘 규명을 위하여 결장, 간, 뇌 조직에서 각 질환 지표를 RT-PCR 방법을 통해

mRNA 수준으로 분석을 진행함. 또한 PGE2 분석은 결장 단백질을 추출하여 Western blot을 통해 확인하였음

④ 혈액 분석

- 혈액 채취 후 serum sep clot activator tube에 넣고 상온에서 30 분에서 1 시간 방치 후, 원심분리(5,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 혈청을 얻어 이를 혈액 분석에 사용하였음

⑤ 조직병리학적 분석

- ㉠ 대장은 기저성 질환의 발생유무 확인을 위해 스위스롤 방법을 이용하여 조직병리분석을 실시하였음
- 조직병리학적 검사를 위한 검체는 대장 조직을 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리과정을 거쳐 제작하며, Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고, 광학 현미경 (Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였음

(2) 연구 결과

(가) 마우스 분변을 통한 장내 저병원성 세균 군집화 확인

- ① 발효 당화유단백질 함유 유제품 급여를 통해 장내 저병원성 세균 제어 효과를 확인하고자 마우스 분변을 이용하여 장내 저병원성 세균 군집화를 확인하였음(표 4-6)
- ② *S. aureus*의 경우 균액 투여군과 균액+발효 당화유단백질 투여군 간 유사한 수준을 보였음. 하지만 경구투여 7주 경과 시, 장내에서 *S. aureus*가 발효 당화유단백질에 의해 억제되는 것을 통해 발효 당화유단백질의 장기간 투여 시 *S. aureus* 억제 가능성이 있음
- ③ *B. fragilis*는 대조군을 제외한 균액 투여군, 균액+발효 당화유단백질 투여군에서 비슷한 수준으로 군집을 형성한 것을 확인하였음. 그러나 6-7주부터 균액+발효 당화유단백질 투여군에서 *B. fragilis*의 군집화가 점차 감소하여 장기간 투여 시 *B. fragilis* 억제 가능성이 있음
- ④ *C. perfringens*의 경우 대조군, 균액 투여군, 균액+발효 당화유단백질 투여군과 비교한 결과 군 간의 차이는 크지 않았음. 발효 당화유단백질의 투여가 마우스 장내 *C. perfringens*에 대한 항균 효과가 크지 않은 것으로 사료됨

표 4-6. 마우스 분변을 통한 장내 저병원성 세균 군수 (log CFU/g) 확인

(mean±SD)

	week						
	1	2	3	4	5	6	7
Con(SA)	-*	-	-	-	-	-	-
Con(BF)	2.8±0.2	-	-	-	2.2±0.0	-	-
Con(CP)	-	6.3±0.2	-	1.9±0.0	5.3±0.0	7.3±0.0	-
SA	-	5.2±0.0	4.2±0.1	3.0±0.3	3.4±0.1	3.1±0.2	6.6±0.0
BF	2.0±2.0	2.6±0.1	3.5±0.2	3.1±0.3	2.2±0.1	2.4±0.1	-
CP	-	6.1±0.1	6.8±0.3	4.6±0.3	5.9±0.2	3.5±0.1	3.7±0.4
SA+FMRP	-	5.7±0.3	4.8±0.1	3.0±0.2	2.9±0.5	3.5±0.0	-
BF+FMRP	-	2.6±0.1	3.4±0.1	3.8±0.2	2.3±0.1	1.3±0.5	1.1±0.5
CP+FMRP	1.1±0.6	6.1±0.1	6.9±0.2	5.9±0.3	5.0±0.2	5.5±0.2	4.0±0.3

* 세균 수가 측정되지 않음

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*; BF: *B. fragilis*; CP: *C. perfringens*; SA+FMRP; *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

(나) 장기 조직의 무게 및 길이

- ① 저병원성 세균 감염에 따른 마우스의 물리적 변화를 측정하기 위해 부검 직 후 체중, 간 무게, 비장 무게, 소장 길이, 대장 길이를 측정하였음 (표 4-7)
- ② 체중의 경우 실험군과 대조군 간의 차이를 나타내지 않았음
- ③ 간의 무게는 대조군과 비교하였을 때, *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군에서 다소 적게 나왔고 비장의 무게는 대조군과 비교하였을 때, 실험군과 차이를 보이지 않았음
- ④ 균 투여군과 균+발효 당화유단백질 투여군의 대장과 소장 길이는 PBS를 투여한 대조군에 비해 모두 짧게 나타났음. 부검 시 기타 이상소견은 발견되지 않아 이는 외부의 스트레스나 염증에 의한 것으로 사료됨

표 4-7. PBS 및 장내 저병원성 세균, 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스의 물리적 지표

(mean±SD)

	무게(g)			길이(cm)	
	체중	간	비장	소장	대장
Con	24.10±0.56	1.06±0.03	0.06±0.01	34.23±1.66	8.27±4.14
SA	23.93±0.06	1.05±0.05	0.06±0.01	33.40±0.78	5.13±1.35
BF	23.30±1.13	1.07±0.04	0.06±0.01	33.65±0.49	5.60±0.85
CP	24.17±0.83	1.04±0.07	0.06±0.01	33.35±2.60	5.55±1.05
SA+FMRP	24.24±1.27	1.06±0.06	0.05±0.01	32.84±2.73	6.18±1.42
BF+FMRP	24.64±0.81	1.08±0.08	0.06±0.00	29.57±2.62	5.86±1.11
CP+FMRP	23.75±0.47	0.99±0.01	0.05±0.01	32.63±0.48	5.63±0.25

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*; BF: *B. fragilis*; CP: *C. perfringens*; SA+FMRP; *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

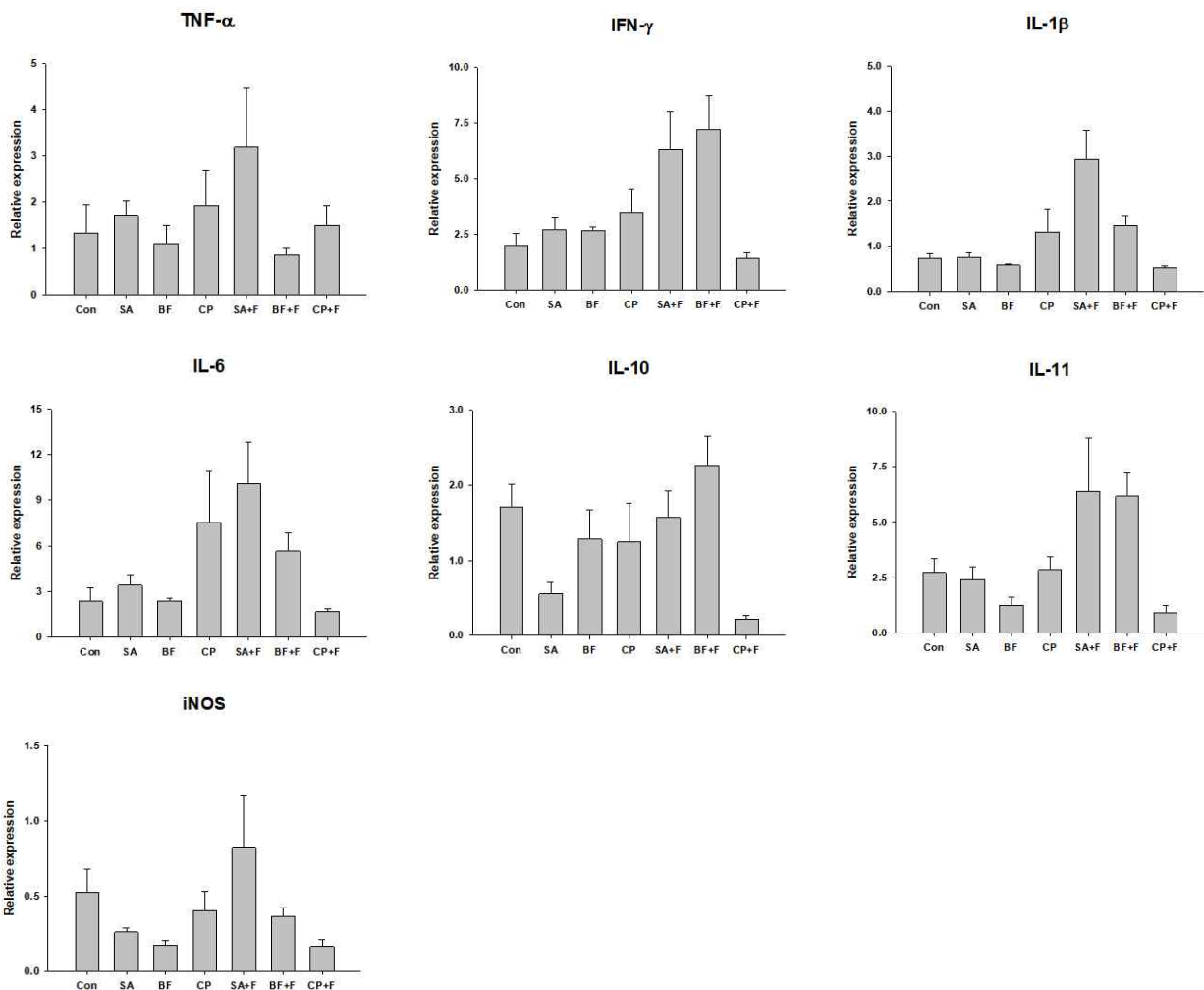
(다) 기저성 질환 지표 분석

- ① 저병원성 세균 감염에 따른 마우스에서의 기저성 질환 발생을 확인 및 관련 매커니즘 규명을 위하여 결장, 간, 뇌 조직에서 각 질환 지표를 mRNA 수준으로 분석을 진행함
- ② 결장 조직에서 염증 발현 마커 사이토카인으로 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-11, iNOS, 대장암 지표로는 β -catenin, Cyclin D1, COX-2, E-cadherin, APC, 노화 지표로 β -galactosidase, catalase (CAT) activity, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase activity (GPx), tight junction protein 관련해서 TJP, Claudin-3, Occludin, ZO-1을 분석함(그림 4-21)
 - 결장 조직에서는 pro-inflammatory와 anti-inflammatory 지표를 분석한 결과, *C. perfringens* 투여군에서 염증이 발생한 것을 확인하였고, *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군에서 염증이 감소한 것으로 보아 장기간의 발효 당화유단백질 투여가 마우스의 장내 *C. perfringens*에 의한 염증반응을 억제하는 것으로 판단됨
 - 항산화 지표 분석 결과, *C. perfringens* 투여군 대비 *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군에서 항산화 관련 유전자의 발현이 감소한 것으로 보아 발효 당화유단백질이 *C. perfringens*에 대하여 항산화 역할을 하는 것으로 판단됨
 - 발효 당화유단백질을 투여한 모든 개체군에서 종양의 형성을 억제하는 것으로 알려진 APC gene의 발현이 장내 저병원성 세균 투여군에 비하여 높게 나타남(Zhang et al., 2017). 또한 대장암 혹은 염증 발생 시 발현이 증가하는 COX-2의 경우, 장내 저병원성 세균에 의해 발현량이 증가하나, 발효 당화유단백질 투여 후 모든 군에서 발현량이 감소하였음(Wang and DuBois, 2010). 따라서 결장 조직에서 발효 당화유단백질이 *C.*

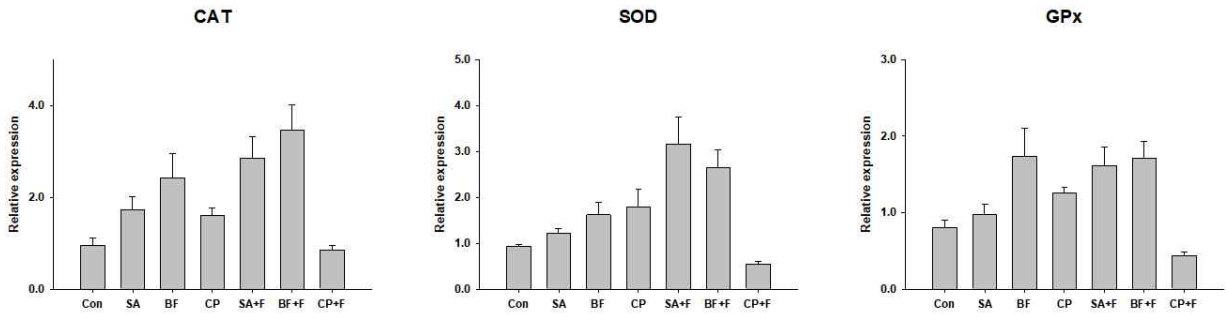
*perfringens*에 대해 암 발생 억제 효과 가능성이 있음. 반면, β -catenin, Cyclin D1, Cadherin은 이와 같은 경향성을 보이지 않음

- Tight junction protein과 관련하여, TJP의 결과를 통해 균이 TJP에 손상을 일으키나 발효 당화유단백질이 균에 인한 손상을 억제함을 확인하였음. Claudin-3는 과도하게 발현되는 경우 종양 및 암과 관련되어 있는 것으로 알려져있는데 본 연구에서 *S. aureus*, *C. perfringens* 투여군에서 증가하였으나, *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군에서 대조군 수준으로 발현이 감소하였음(Tokuhara et al., 2018). 이를 통해 *C. perfringens*가 대장 내에서 종양 가능성을 높이거나 발효 당화유단백질이 *C. perfringens*를 억제하여 그 가능성을 낮춰줄 수 있음. 반면, 발효 당화유단백질의 투여는 장내에서 *S. aureus*와 *B. fragilis*를 억제하지 않음

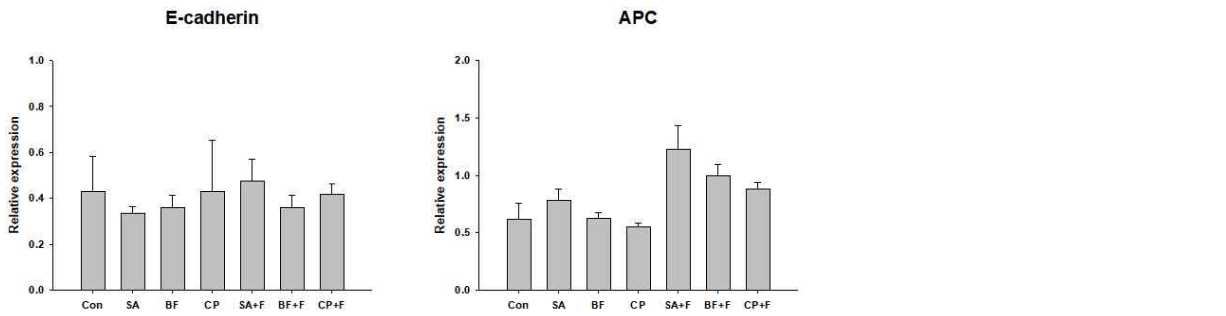
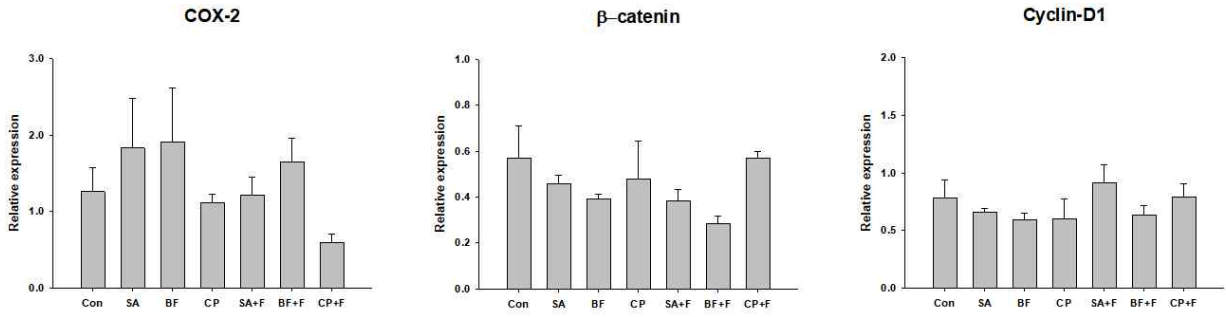
(A) 염증 지표



(B) 항산화 및 노화 지표



(C) 암화 지표



(D) Tight junction protein 지표

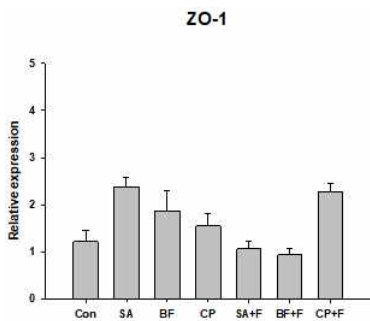
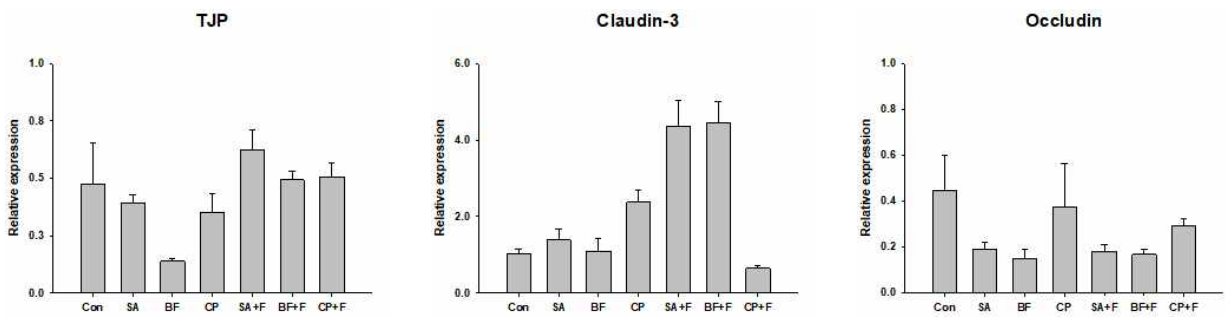


그림 4-21. 장내 저병원성 세균 및 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스 결장에서 유전자

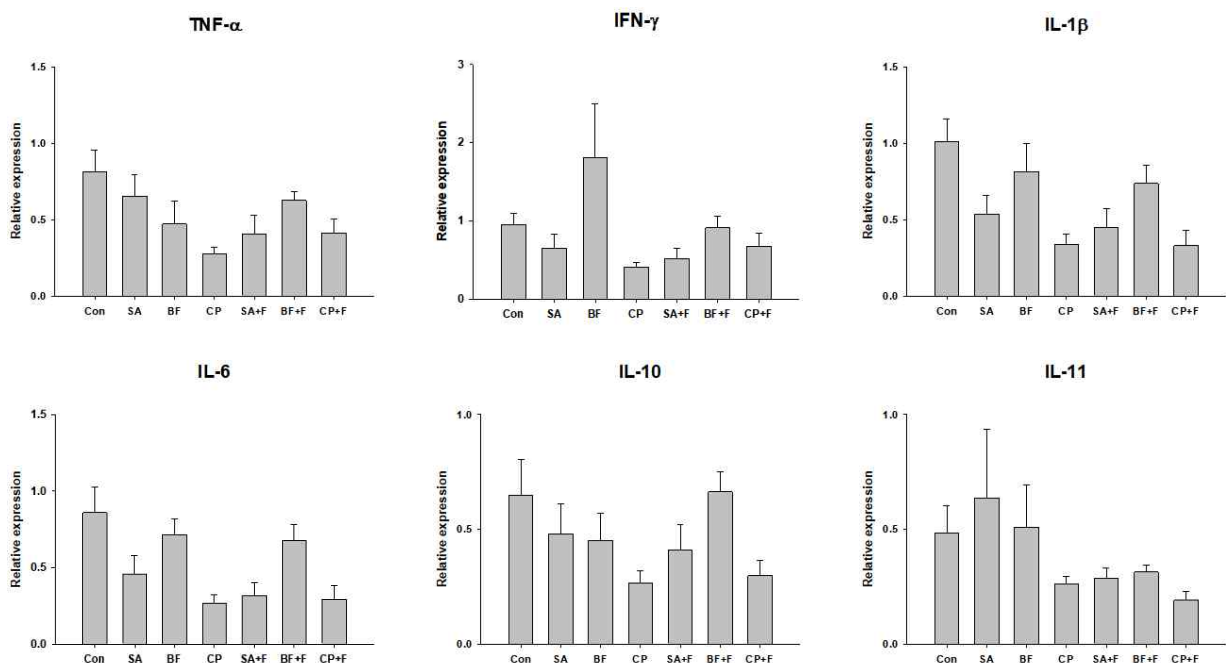
발현 분석

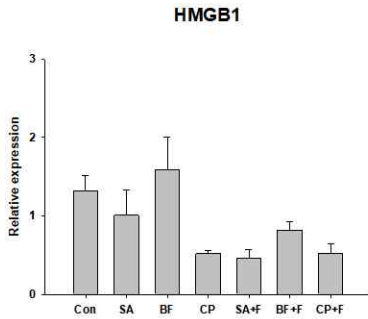
Con: control (PBS); SA: *S. aureus*; BF: *B. fragilis*; CP: *C. perfringens*; SA+FMRP;
S. aureus+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

③ 뇌에서 염증 발현 사이토카인으로 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-11, apoptosis와 관련된 HMGB1, 항산화 및 노화 지표로 CAT, SOD, tight junction protein과 관련하여 TJP, Occludin, Claudin-1을 분석함(그림 4-22)

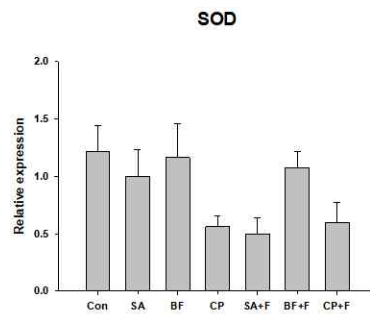
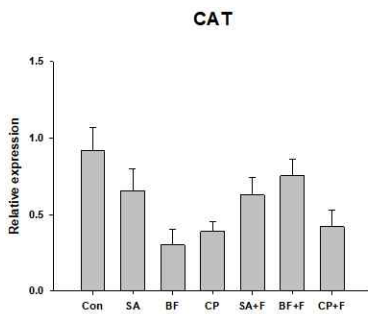
- 염증 지표에서 전반적으로 실험군이 대조군 대비 낮은 발현을 보이고 있으나, 발효 당화유단백질 투여군에서 염증 지표 중 IL-1 β , IL-6, IL-11, HMGB1의 감소 경향을 나타내었음. 발효 당화유단백질의 투여는 뇌에서 염증 완화의 가능성이 있음
- Tight junction protein 지표를 통해 장내 저병원성 세균이 전반으로 blood-brain barrier의 tight junction protein의 손실을 일으키며 발효 당화유단백질은 이에 대한 완화 효과를 보이지 않았음. 하지만, Claudin-1의 경우 *B. fragilis*와 *C. perfringens*에 의해 손실되었으나 발효 당화유단백질을 투여했을 때 회복되는 것을 확인하였음. 특히, *B. fragilis*+발효 당화유단백질 투여군에서 대조군 수준으로 회복되는 것을 통해 장기간의 발효 당화유단백질 투여가 마우스 뇌의 blood-brain barrier에 대한 *B. fragilis*의 작용을 억제할 수 있을 것으로 사료됨
- 항산화 지표를 통해 장내 저병원성 세균이 뇌에서 산화적 스트레스를 일으키지 않는 것을 확인하였음

(A) 염증 지표





(B) 항산화 및 노화 지표



(D) Tight junction protein 지표

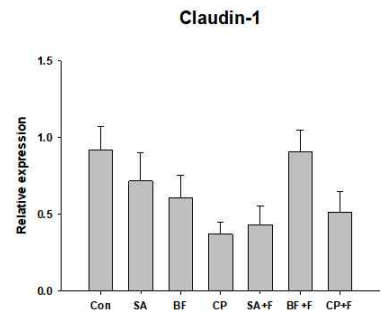
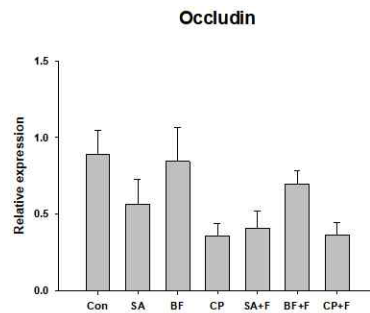
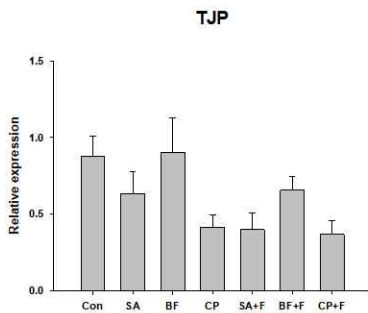


그림 4-22. 장내 저병원성 세균 및 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스 뇌에서의 유전자 발현 분석

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*; BF: *B. fragilis*; CP: *C. perfringens*;

SA+FMRP; *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질;

CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

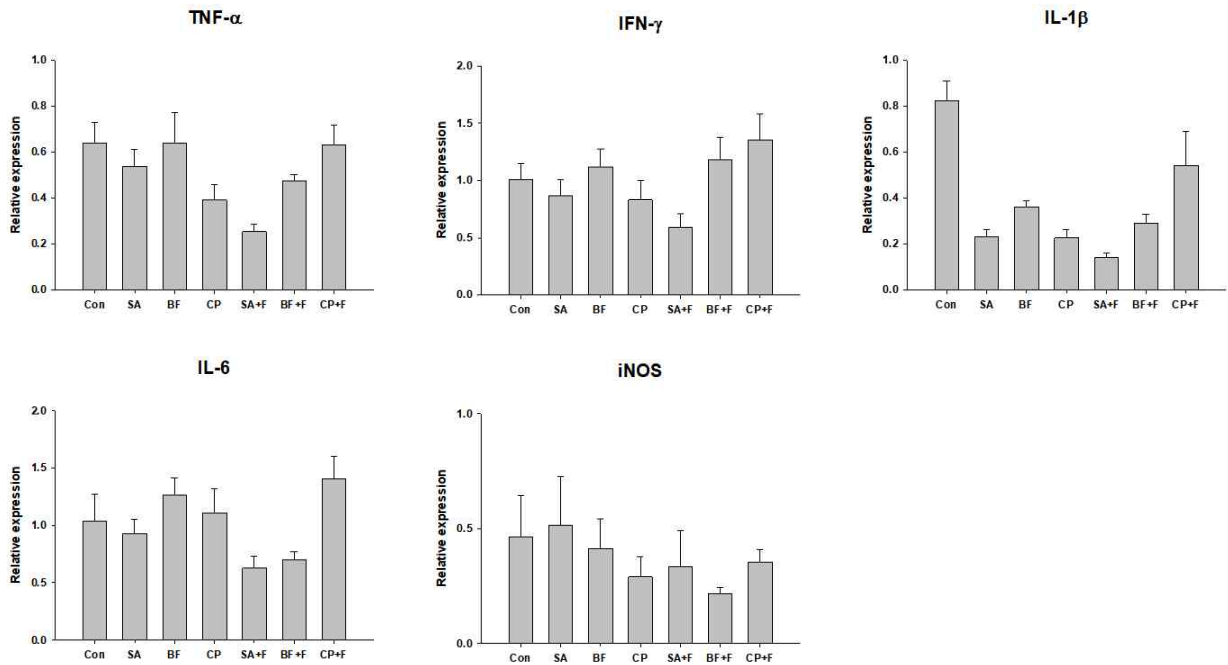
④ 간에서 염증 발현 사이토카인으로 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, iNOS, 노화 지표로 CAT, SOD, tumor marker와 관련하여 COX-2를 분석함(그림 4-23)

- 염증 지표와 노화 지표 모두 전반적으로 실험군이 대조군보다 유사하거나 낮은 수준을 보여 장내 저병원성 세균과 FMRP에 의한 간의 손상과 산화적 스트레스는 나타나지 않음을 확인하였음

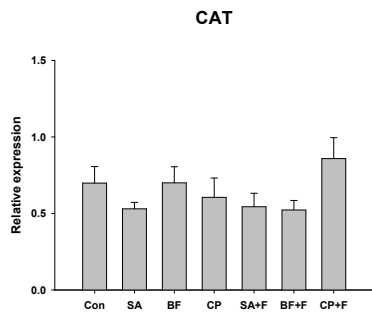
- 모든 실험군이 대조군과 유사하거나 그 이하로 COX-2가 발현되어 간에서 염증 및 tumor 형성에 장내 저병원성 세균이 영향을 미치지 않았음. 하지만 발효 당화유단백질

을 함께 투여했을 때 *S. aureus*+발효당화유단백질 투여군과 *B. fragilis*+발효 당화유단백질 투여군의 COX-2 지표가 감소함에 따라 발효 당화유단백질이 간에서 염증 및 tumor 형성 완화 가능성이 있음

(A) 염증 지표



(B) 노화 지표



(C) 암화 지표

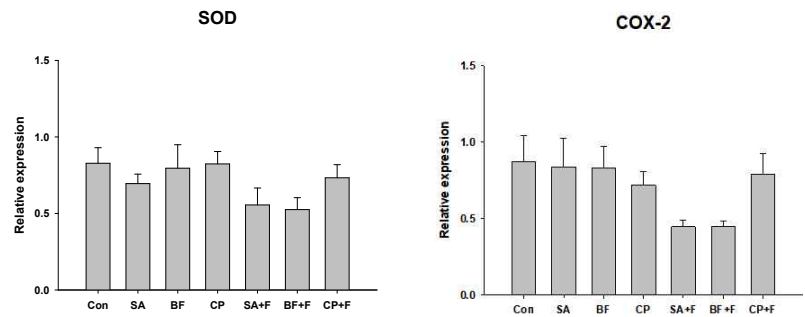


그림 4-23. 장내 저병원성 세균 및 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스 간에서의 유전자 발현 분석

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*, BF: *B. fragilis*, CP: *C. perfringens*, SA+FMRP: *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

⑤ PGE₂는 프로스타글란딘 계통의 신호분자로서 발열을 포함한 염증반응에 관여할 뿐만 아니라, 결합이 있는 세포를 공격하는 면역시스템의 정상적인 작용을 방해하여 암 발생을 돕는 기전으로 작용함(Nakanishi and Rosenberg, 2013)(그림 4-24)

- 결장 조직에서 PGE₂ 분석 결과, *C. perfringens* 투여군의 PGE₂ 단백질의 발현이 대조군, *S. aureus*, *B. fragilis* 투여군 대비 높은 것으로 보아, *C. perfringens*은 결장조직에서 염증 발생을 촉진시키는 것으로 사료되며 발효 당화유단백질을 함께 투여했을 때 염증 완화 가능성이 있음

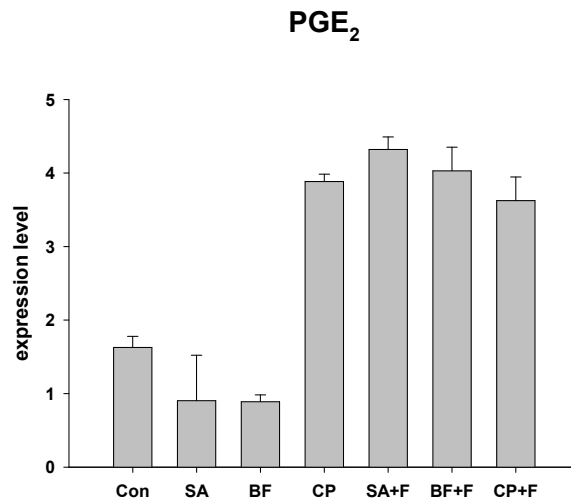


그림 4-24. 장내 저병원성 세균 투여 및 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스 결장에서의 PGE₂ 분석

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*, BF: *B. fragilis*, CP: *C. perfringens*, SA+FMRP; *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

(라) 혈액 분석

- ① 장내 저병원성 세균 감염 마우스 모델의 장내 기저성 질환 및 발효 당화유단백질 투여에 따른 마우스의 기저성 질환 관련 혈액 지표 변화를 측정하기 위해 혈액 분석을 실시하였음. Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), 총 콜레스테롤 (T-Chol), 중성지방(TG), 혈당(GLU), HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 확인하였음(그림 4-25)
- ② 혈액 분석 결과, 대조군 대비 *S. aureus* 투여군, *B. fragilis* 투여군, *C. perfringens* 투여군에서 ALT 수치가 높아 균에 의한 간 손상을 확인하였음. 또한, 균액+발효 당화유단백질 투여군 중 *C. perfringens*+발효 당화유단백질 군에서만 수치가 감소하여 발효 당화유단백질이 간에서 염증을 감소시키는 것을 확인하였음. 균 투여로 혈중 AST, 총 콜레스테롤, 혈당, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤에 변화를 일으키지 않았음

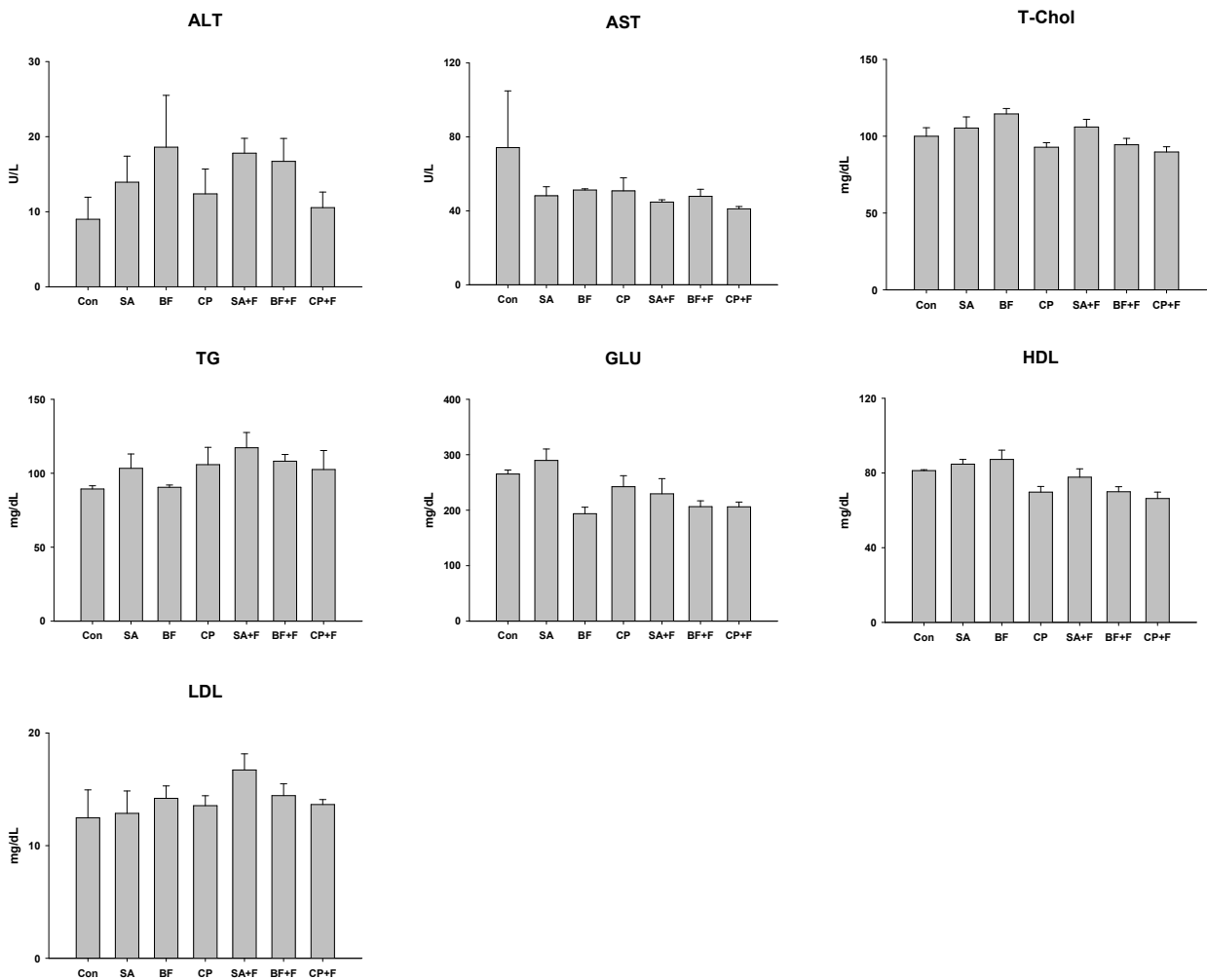


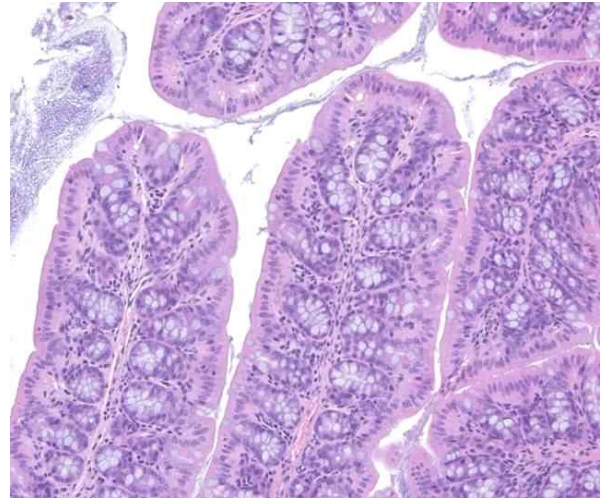
그림 4-25. 장내 저병원성 세균 투여 및 세균+발효 당화유단백질 투여 마우스 혈액분석

Con: control (PBS); SA: *S. aureus*; BF: *B. fragilis*; CP: *C. perfringens*; SA+FMRP; *S. aureus*+발효 당화유단백질; BF+FMRP: *B. fragilis*+발효 당화유단백질; CP+FMRP: *C. perfringens*+발효 당화유단백질

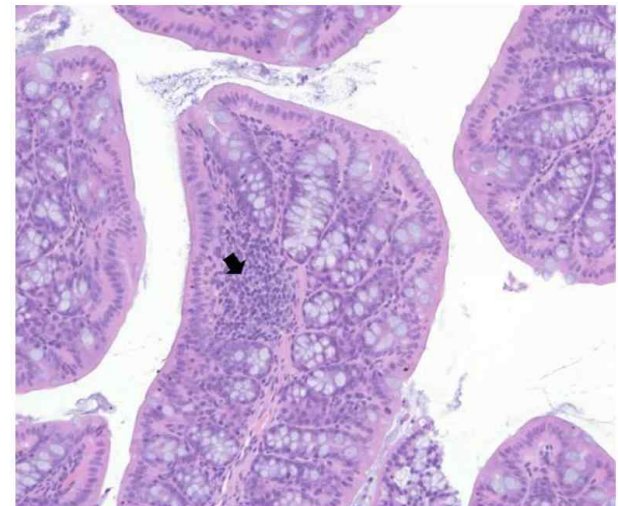
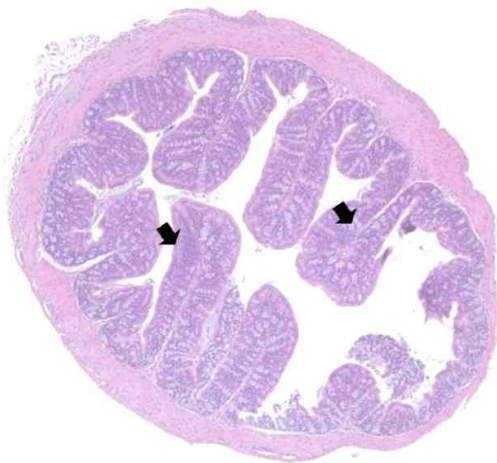
(마) 조직 병리학적 분석

- ① 조직 내 염증 반응 및 유도된 장염의 스크리닝 목적으로 스위스틀 방법을 이용하여 조직 병리학적 분석을 수행하였음(그림 4-26)
- ② 검경 결과, 대조군에서는 병변이 관찰되지 않았으나, *S. aureus* 투여군, *C. perfringens* 투여군, *B. fragilis* 투여군, *S. aureus*+발효 당화유단백질 투여군, *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군, *B. fragilis*+발효 당화유단백질 투여군에서는 점막에서 괴사, 점액세포 비대, 단핵세포 침윤, 호중구 침윤 또는 호산구 침윤이 관찰되었음
- ③ *S. aureus*+발효 당화유단백질 투여군이 *S. aureus* 투여군보다 병변 정도가 조금 심하였으나, *B. fragilis* 투여군과 *B. fragilis*+발효 당화유단백질 투여군 및 *C. perfringens* 투여군과 *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군에서 큰 차이는 없었음

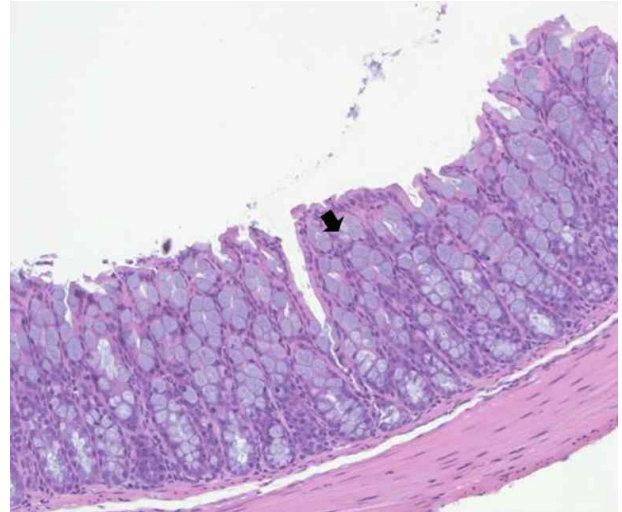
(A) 대조군



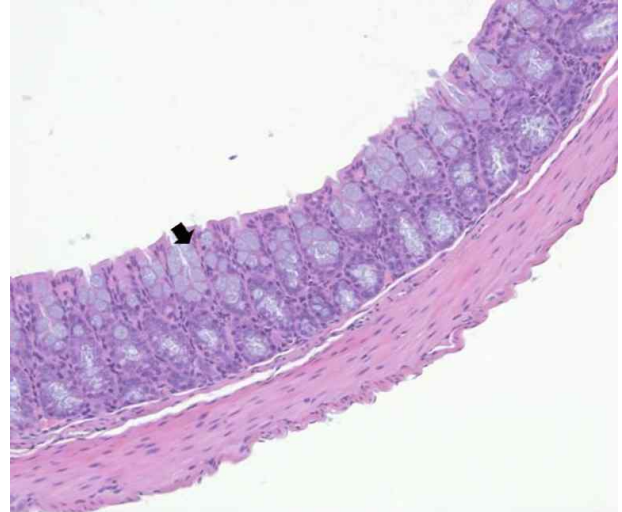
(B) *S. aureus* 투여군



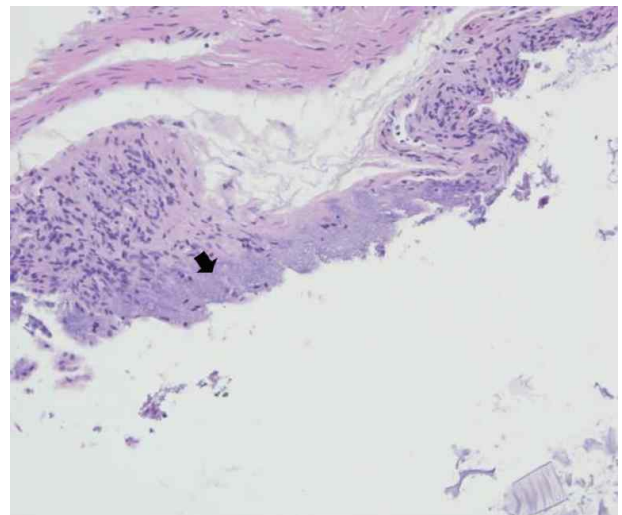
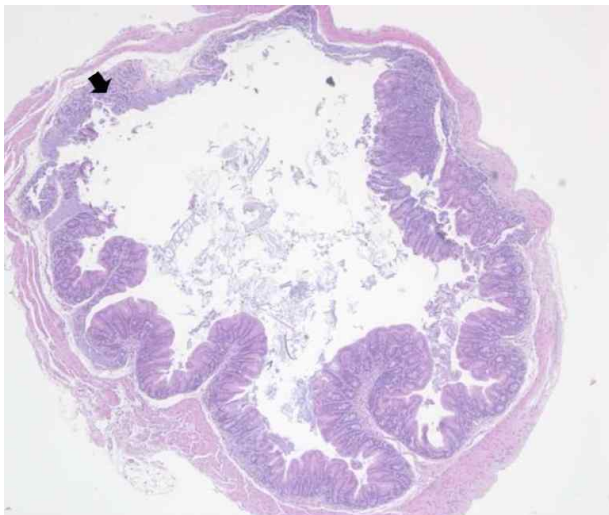
(C) *B. fragilis* 투여군



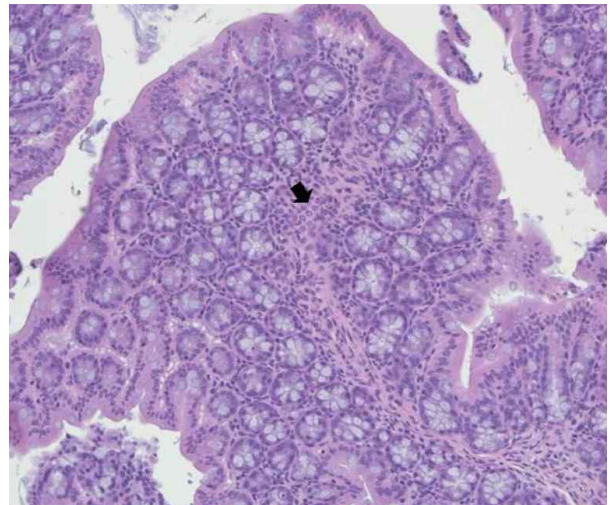
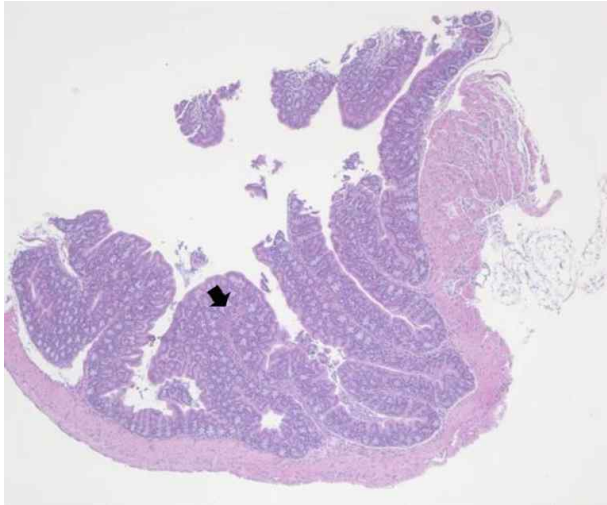
(D) *C. perfringens* 투여군



(E) *S. aureus*+발효 당화유단백질 투여군



(F) *B. fragilis*+발효 당화유단백질 투여군



(G) *C. perfringens*+발효 당화유단백질 투여군

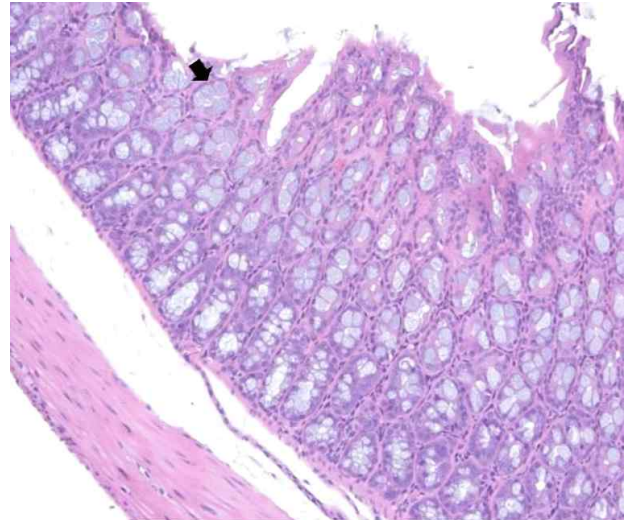
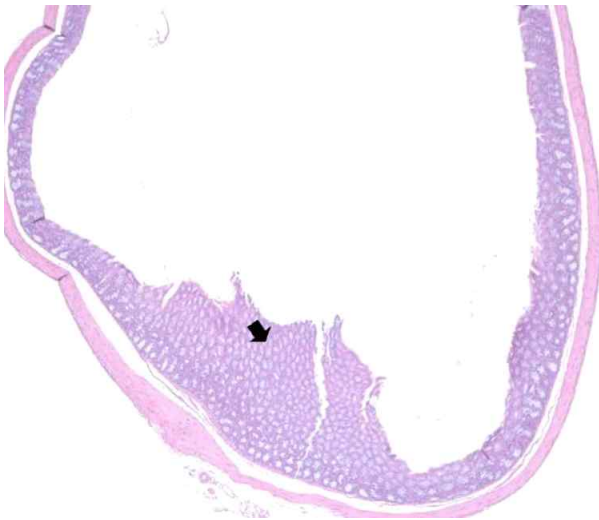


그림 4-26. PBS 및 저병원성 세균 투여군과 발효 당화유단백질 투여군의 대장 조직병리 결과

2-2. 연구개발 성과

가. 논문게재 및 학술대회 발표

(1) 논문게재

번호	논문명	주저자명	학술지명	Vol. (No.)	게재일	국명/SCI여부
1	Hypolipidemic and anti-inflammatory effects of fermented Maillard reaction products by <i>Lactobacillus fermentum</i> H9 in animal model	오남수	Journal of Dairy Science	99(12): 9415-9423	2016. 10.19	USA SCI
2	Enhancement of antioxidative and intestinal anti-inflammatory activities of glycated milk casein after fermentation with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	오남수, 정재연	Journal of Agricultural and Food Chemistry	65(23): 4744-4754	2017. 5.16	USA SCI
3	Supplementation of fermented Maillard-reactive whey protein enhances immunity by increasing NK cell activity	오남수	Food & Function	8(4): 1718-1725	2017. 4.19	UK SCI
4	Probiotic and anti-inflammatory potential of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 and <i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13 isolated from infant feces	오남수, 정재연	PLoS ONE	13(2): e0192021	2018. 2.14	USA SCI
5	<i>Lactobacillus gasseri</i> 505를 사용한 꾸지뽕잎 추출물 첨가 신바이오틱스 발효유의 면역활성 조절 연구	이지영, 김수경	Journal of milk science and biotechnology	36(1): 39-48	2018. 3.31	KOREA 비SCI
6	Regulatory mechanisms of probiotic fermented milk protein on the brain-gut-microbiota axis under chronic stress in mice	오남수, 정재연	PNAS	In submission	-	USA SCI
7	Production of galactooligosaccharides enriched skim milk and applied to potentially synbiotic fermented milk with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	오남수	Journal of Dairy Science	In submission	-	USA SCI
8	Anti-inflammatory effects of Maillard reaction products from whey protein isolate and galactose fermented by <i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13 in RAW 264.7 cells	김다현	Journal of Dairy Science	In submission	-	USA SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

번	발표제목	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
---	------	------	-----	------	----	----

호						
1	Transcriptome analysis for invasive <i>Staphylococcus aureus</i> strains by next generation sequencing	International Association for Food Protection	이희영	2016.08.02.	St. Louis	USA
2	Immune modulating activity of Maillard reaction products from milk proteins concentrate with lactose by nitric oxide reduction on macrophage	Experimental biology	김다현	2016.04.06	샌디에고	미국
3	Identification of lactose binding sites from Maillard reaction products having immune-enhancing effect on macrophage	Food and Applied Bioscience	전수현	2016.02.05	치앙마이	태국
4	Plantamajoside from <i>Plantago asiatica</i> decrease endothelial cell dysfunction by glyceraldehyde-induced advanced glycation endproducts via MAPK/NF-kB	International Union of Food Science and Technology	이광원	2016.08.24	더블린	아일랜드
5	Enhancement of antioxidative and intestinal anti-inflammatory activities of glycated milk casein after fermentation with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	한국식품과학회	오남수	2017.6.23	제주 ICC	대한민국
6	Anti-inflammatory effect of fermented Maillard reaction product of whey protein and galactose in LPS-induced inflamed macrophage	한국응용생명화학회	김다현	2017.6.18	부산	대한민국
7	Anti-inflammatory effect of <i>Lactobacillus</i> fermented Maillard reaction product of whey protein and galactose on	한국생명공학연합회 제2회 심포지엄	김다현	2017.8.22	홍천	대한민국

	RAW264.7 and Caco-2					
8	Fermented maillard reaction products of whey protein and galactose ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation	한국생명공학연합회 제2회 심포지엄	정유진	2017.8.22	홍천	대한민국
9	Evaluation of antimicrobial activity of fermented Maillard reaction products (FMRP) by lactic acid bacteria isolated from infants' feces	The International Conference of KoSFA and 49th Annual Meeting	김유진	2017.5.19	천안 상록리조트	대한민국
10	Anti-anxiety effects of Lactobacillus rhamnosus 4B15 in chronic stress-induced anxiety mice	Food Microbiology	이지선	2017.11.30	마드리드	스페인
11	Effects of lactic acid bacteria on barrier function and inflammation in intestine in chronic stress-induced mice	Food Microbiology	서연정	2017.11.30	마드리드	스페인
12	Enhancement of Brain Function and Gut Health by Glycation and Fermentation of Milk Casein	유가공기술과학회	오남수	2018.5.11	숙명여자대학교	대한민국
13	Preventive effect of fermented glycoprotein from milk casein with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 on chronic stress-induced abnormal brain function in mice	한국축산식품학회	오남수	2018.5.26	제주대학교	대한민국
14	Effects of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15-fermented product on ileum in Unpredic된 chronic mild	유가공학회	김성은	2018.4.13	숙명여대	대한민국

	stress mice model					
15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 improves Gut-Brain axis abnormalities in chronic stress-induced mice	한국축산식품학회	이지선	2018.5.25	제주대학교	대한민국
16	Maillard Reaction Products fermented by <i>L.rhamnosus</i> 4B15 protect against stress-related disorders via modulation of gut-brain axis	The 12 th IPC (International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health)	김세현	2018.6.15	Budapest	헝가리
17	Fermented Maillard Reaction Product by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 alleviates gut dysfunction in combination of chronic stress and dextran sulfate sodium-induced colitis mice model	한국식품과학회	서연정	2018.6.28.-29	부산 Bexco	대한민국
18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 ameliorates chronic stress-induced anxiety by enhancing anxiety like behavior and attenuating testicular dysfunction in mice though hypothalamic-pituitary-testicular axis	한국식품과학회	이지선	2018.6.28.-29	부산 Bexco	대한민국
19	Maillard Reaction Product fermented by lactic acid bacteria	I.C.O.B.M (International Conference On Beneficial Microbes)	김세현	2018.7.29	Kuching	말레이시아
20	Effects of fermented maillard reaction products on brain function in a colitis mice model with stressed condition	I.C.O.B.M (International Conference On Beneficial Microbes)	김성은	2018.7.30	Kuching	말레이시아
21	Fermented Maillard reaction products ameliorate intestinal permeability and	한국식품과학회	정유진	2018.6.27.-29	부산	한국

	inflammation in inflammatory bowel diseases					
22	Fermented maillard reaction products of whey protein and galactose improve intestinal barrier function and reduce inflammation in dextran sulfate sodium-induced mice's colitis	ISMR 13 International Maillard Reaction Society	정유진	2018.9.10.-13	몬트리올	캐나다
23	Antimicrobial Activity of Fermented Milk Protein after Maillard Reaction to Enteropathogenic Bacteria	2018 International Association for Food Protection	김유진	2018.7.9.	Salt lake city	미국

(3) 포상 및 수상 실적

번호	포상명	포상내용	포상자	포상일자	포상기관
1	포스터상	최우수상	오남수	2018.5.25	한국축산식품학회
2	우수 포스터 상	상장	김성은	2018.4.13	유가공학회
3	우수 포스터 상	상장	이지선	2018.5.25	한국축산식품과학회
4	우수논문상	상장	정유진	2017.8.22	한국생명공학연합회
5	Traveling award	상장	정유진	2018.09.13	ISMR 13 International Maillard Reaction Society

나. 특허 출원

번호	특허명	출원번호	출원일
1	케이신 당화반응물을 포함하는 장 염증 및 장내 방어벽 기능 개선 조성물	10-2018-0125030	2018.10.19
2	케이신 당화 반응물을 포함하는 스트레스로 인한 뇌 기능 저하 예방 조성물	10-2018-0125022	2018.10.19

다. 기술실시

번호	기술명	실시기관	기술실시일
1	기저성 염증 억제 및 뇌 기능 개선 효과를 지니는 발효 당화유 단백질활용 유제품의 제조	서울우유협동조합	2018.12.13

라. 사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	비고
1	기저성 염증 개선 고령친화 발효유	기저성 염증 개선 고령친화 발효유	서울우유협동조합	시제품 완료 (사업화 예정)
2	뇌 기능 개선 고령친화 발효음료	뇌 기능 개선 고령친화 발효음료	서울우유협동조합	시제품 완료 (사업화 예정)
3	뇌 기능 개선 고령친화 분말제제	뇌 기능 개선 고령친화 분말제제	서울우유협동조합	시제품 완료 (사업화 예정)

마. 기타 실적

(1) 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	산업지	축산식품과학과 산업	우유 유래 고령친화 및 뇌질환 예방 식품소재 및 제품개발	2016, Vol.5, No.1
2	산업지	축산식품과학과 산업	인지능력 개선 응용기술 및 프로바이오틱스 적용 식품 소재 개발	2018, Vol.7, No.1

(2) 고용창출

번호	고용창출명	고용창출년도	고용창출내용
1	서찬원	2017	신규인력 채용
2	박정규	2017	신규인력 채용
3	오수경	2017	신규인력 채용

(3) 인력양성

번호	인력양성명	인력양성년도	인력양성내용
1	양성용	2016	박사 학위 취득
2	이경원	2016	석사 학위 취득
3	김다현	2018	석사 학위 취득
4	김유진	2018	석사 학위 취득

(4) 생명자원(생명정보)

번호	생명자원명	등록번호	등록기관명	등록일
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15	KCCM11983P	한국미생물보존센터	2017.2.28
2	<i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13	KCCM11984P	한국미생물보존센터	2017.2.28

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 및 목표 달성여부

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	[주관] 발효 당화유단백질의 최적 제조 조건 확립 및 이화학적 특성 확인	당화유단백질의 제조 및 최적 조건 확립	100	- 유단백질과 당을 이용한 당화반응 모 델시스템 확립
		발효 당화유단백질 소재의 이화학적 특성 분석	100	- 이화학적 특성 분석 - MAIDI-TOF/MS를 이용한 발효 당화 유단백질의 분석 연구
	[제1협동] 기저성 염증 유래 뇌기능저하 개선 목적 당화유단백질 발효 균주의 선별	기저성 염증 유래 뇌기능저하 개선목적 프로바이오틱스 선별	100	- 프로바이오틱스 능력 기준에 부합하 는 <i>in vitro</i> 실험을 통해 최종적으로 두 균주 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15, <i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13)선발, 한국 세포주 은행(KTCC)에 등록 완료함. - 우선적으로는 위산배지에 견디는 내 산성, 담즙산배지에 견디는 내담성 테 스트를 통해 37개의 유산균주를 1차 선발함. - 이후 안정성 테스트와 장 부착능 실 험을 통해 균주 선발한 뒤, 유단백질 분해활성을 측정하여 최종 선발함.
		프로바이오틱스를 이용한 발효 당화유단백질 제조	100	- <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 와 <i>Lactobacillus gasseri</i> 4M13, 두 균주를 이용하여 발효당화유단백질 제조 완 료함.
		인체 세포주를 이용한 tight junction강화효과 검증(<i>in vitro</i>)	100	- 인체 대장 세포주 (Caco-2 cell)에 LPS를 처리한 후, 흡광도 측정 및 RT-PCR을 통해 세포 손상 정도를 확 인함. - LPS 처리 전, 발효당화유단백질을 처 리한 그룹에서는, LPS와 MTT에 의해 감소된 tight junction 유전자의 발현 이 회복된 것을 확인함으로써, 발효당 화유단백질의 tight junction 강화효과 를 확인함. - 인체 뇌 세포주 (SH-SY5Y cell)에 MTT 용액을 처리하여, 흡광도 및 RT-PCR을 통해 세포 손상 정도를 확 인함.

				- MTT 용액 처리 전, 발효당화유단백질을 처리한 그룹에서는, MTT 용액에 의해 증가하는 세포자멸인자의 발현이 낮아져있는 것을 확인함으로써, 발효당화유단백질의 뇌 세포의 세포자멸 억제 기능을 <i>in vitro</i> 실험으로 확인함.
[제2협동] 발효 당화유단백질의 장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인 (<i>in vitro</i> co-culture study)	염증 억제 활성 스크리닝	100		- 다양한 조건으로 제조 및 발효된 발효 당화유단백질의 염증 억제 활성 (NO assay 이용) 및 세포독성 (MTT assay 이용)을 통한 스크리닝을 진행하여 염증 억제 효과가 가장 클 것으로 예상되는 샘플 선발
	장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인	100		- 장 모델에서 독성을 일으키지 않는 농도범위를 결정한 후 발효 당화유단백질을 처리하여 세포 생존율을 측정 - Caco-2 단독배양 후 염증 유도 시 샘플의 염증성 사이토카인 발현량 감소 확인을 통해 효과 확인 - RAW 264.7 세포와 Caco-2의 공동배양을 이용하여 장내 환경과 유사한 <i>in vitro</i> 장 모델을 이용하여 샘플의 염증 완화 및 장내 tight junction 유지 효과 증명 - 공동 배양을 통해 면역세포의 염증 유발 시 TEER 저항 값의 유지 및 상승으로 장의 tight junction의 무너짐을 예방함을 확인 - 장 세포 (Caco-2)에 기저성 염증의 원인인 TNF- α 는 ERK의 인산화를 촉진함. 발효 당화유단백질은 ERK의 인산화를 막음으로 염증 유발억제 확인
[제3협동] 장내 기저성 질환 관련 저병원성 세균 감염 동물모델에 대한 발효 당화유단백질 항균활성 분석	장내 저병원성 세균(<i>Staphylococcus aureus</i> strains, <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides fragilis</i> 등)의 기저성 질환(염증성 질환, 대장암, 노화 등) 발생 확인	100		- 염증관련 cytokine 분석으로 장내 저병원성 세균에 의한 염증 및 기저성 질환 발생 확인 - 장내 저병원성 세균으로 인한 조직내 염증 반응 및 장염 유도 스크리닝 목적으로 조직 병리학적 분석 수행
	장내 저병원성 세균의 omics 분석을 통한 질환	100		- 장내 저병원성 세균의 병원성 유전자 확인

		발생원인 분석		- 장내 저병원성 세균으로 인한 동물모델의 장내 기저성 질환 확인 및 발효당화유단백질의 개선효과 분석
--	--	---------	--	--

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도	[주관] 발효 당화유단백질 소재 적용 유제품의 제조공정 확립 및 발효 당화유단백질에 의한 장내균총 분석	발효 당화유단백질에 의한 장내 미생물 분석	100	- 제 2협동으로부터 마우스 분변샘플을 제공받았으며, 스트레스성 뇌기능 저 하 및 발효 당화유단백질 섭취에 의 한 장내 균총의 변화를 확인 - 마우스 분변샘플 내 metabolites 및 proteolytic activity 측정을 통해 작용 기전 규명
		기능성 소재의 유제품 적용 검토 및 발효특성 평가 시스템 확립	100	- 기능성 소재 적용 유제품 소량 배합 실험 - 발효 및 관능 특성 평가 - 기능성 소재 적용 유제품의 기능성 평가
		Scale-up을 통한 대량생산 공정 개발	100	- Pilot scale 시제품 생산 실험 - 배합 조건에 따른 제품의 미생물학적, 이화학적 및 관능 특성 평가
	[제1협동] 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 발효 당화유단백질의 스트레스 모델을 통한 생체 기능 검증 (<i>in vivo</i> study)	뇌 기능의 저하 유도	100	- 4주령 C57BL/6 male mice에 12가지 비반복적 테스트를 10주 동안 실시해 만성 스트레스를 유도함. - 인지능력, 기억능력, 불안증세, 운동능 력 등을 측정하는 행동실험 결과, 대 조구에 비해 만성 스트레스를 처리한 그룹에서 유의적으로 인지능력과 기 억능력이 감소하고, 불안증세가 증가 한 것을 확인함. 또한 Brain의 RT-PCR 분석을 통해 스트레스 처리 그룹에서 염증성 사이토카인과 세포 자멸인자의 발현량이 감소한 것을 확 인함. 이를 통해 뇌 기능의 저하가 유 도됨을 확인함. - 또한, 장의 조직학적 구조와 유전자 발현을 측정함으로써, 만성 스트레스 가 장에서의 기저성 염증을 일으키는 것을 확인함.
		뇌기능 개선 기능성 검증	100	- 발효당화유단백질을 스트레스 전 3주 동안 처리한 타겟 그룹에서 만성 스 트레스 동물 모델에서의 발효당화유

			<ul style="list-style-type: none"> 단백질 섭취를 통한 행동 및 분자 수준에서의 개선 기능성을 확인함. - 스트레스 처리에 의해 유의적으로 증가한 혈중 스트레스 호르몬이 발효당화유단백질의 - Brain 염증성 사이토카인과 세포자멸 인자의 발현량이 발효당화유단백질을 전처리한 그룹에서 유의적으로 낮아진 것을 확인함. - 또한 Colon 및 ileum 염증관련 인자 및 tight junction의 발현량도 발효당화유단백질을 전처리한 그룹에서 유의적으로 회복되는 것을 확인함.
<p>[제2협동] 발효 당화유단백질의 안전성 및 장내 기저성 염증 개선 기능성 연구 (<i>in vivo</i> study)</p>	<p>발효 당화유단백질의 안전성 검증</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 모델을 이용하여 단회 독성 (1500 mg/kg b.w.) 및 다회 독성 (15, 150, 1500 mg/kg b.w.)을 시행함으로 발효 당화유단백질에 의한 급성 및 아급성 독성 없음을 확인
	<p>장내 기저성 염증 억제 조절 기능 확인</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 모델에 14일간의 발효 당화유단백질의 투여와 7일간의 DSS 자율급수를 통해 장내 염증을 유발시켜 진행 - 희생을 통해 얻은 결장 조직을 이용하여 항산화 효소(MPO, CAT, SOD, GPx) 및 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 발현정도를 확인하고 NO 생성 및 조직 병리학적 검사를 통해 조직의 염증 정도 확인 - 위 사항을 통해 발효 당화유단백질의 장내 염증 예방 효과 확인
<p>[제3협동] 유해세균(식중독 세균, 부패세균) 발효 당화유단백질 항균활성 분석 및 발효 당화유단백질 적용을 통한 유제품의 안전성 확보기술 개발</p>	<p>식중독 세균(<i>Listeria monocytogenes</i>, <i>S. aureus</i>, <i>Salmonella</i>, 병원성 <i>E. coli</i> 등) 및 부패미생물(<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Flavobacterium</i> 등)에 대한 발효 당화유단백질의 항균활성 확인</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효 당화유단백질의 항균 활성 농도 확인 - 발효 당화유단백질에 의한 식중독세균 및 부패미생물의 성장 패턴 확인
	<p>발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 항균활성 분석</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품의 항균활성 확인 및 저해원인 분석 - 발효 당화유단백질을 첨가한 유제품

				의 유해세균 성장패턴 비교 분석 - Omics 분석 및 microscopic technique을 통한 저해원인 분석
--	--	--	--	---

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도	[주관] 기저성 염증 개선 기능성의 발효 당화유단백질 고령친화 유제품의 대량시험 및 시제품 생산	현장시험 통한 대량생산 공정 개발	100	- Pilot scale test를 통한 현장시험 공정 및 배합비 확립
		제품의 화학적, 미생물학적 및 관능 특성 평가	100	- 제품 내 프로바이오틱스 균수 측정 - 주관기관인 서울우유협동조합 사내외 관능 평가
		시제품 내 기저성 염증 개선 기능성 물질 함량 평가	100	- 제품 내 기능성 지표물질인 펩타이드 분석
		기능성 표시기준 및 관련 법령 검토	100	- 식품의 기준 및 규격, 건강기능식품의 기준 및 규격 법령 검토를 통한 제품 규격 및 표시기준 설정
		최종 시제품 생산 (고령친화 특수의료용도등식품 액상타입 1종 및 분말타입 1종)	100	- 발효 당화유단백질 적용 발효유, 발효 음료 및 분말제제 시제품 제작
	[제1협동] 기저성 염증 유래 뇌기능 저하 개선 발효 당화유단백질의 뇌 노화 모델을 통한 생체기능 검증 (<i>in vivo</i> study)	뇌의 노화 유도 모델을 통한 뇌기능의 저하 유도	100	<ul style="list-style-type: none"> - 뇌의 노화 유도 모델 대신 2차년도 실험에 대한 연장선으로 만성 스트레스 동물 모델에 기저성 염증을 함께 유도하여 뇌기능 저하 유도함. - 3차년도 계획에는 노화된 rat 모델을 사용하려 했으나, 만성스트레스 모델에 대한 추후 연구모델을 사용함에 따라 C57BL6 mice를 사용함. - 스트레스 처리와 함께 1.5 % DSS를 간헐적으로 투여하는 모델을 사용하여 장기능 저하를 통한 뇌기능의 저하도 함께 유도함. - 2차년도와 실험과 동일한 12가지 만성 스트레스를 주어 뇌기능의 저하를 유도하였고, 인지관련, 학습관련, 우울 관련 행동 실험 분석을 통해 뇌기능의 경미한 저하를 확인함. - 혈중 스트레스 호르몬의 수치와 대장 길이, Brain 및 intestine의 염증관련

			인자를 확인한 결과, 뇌 기능이 저하되었음을 확인함.
	뇌기능 개선 기능성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 장염증을 일으킨 만성 스트레스 모델에서 발효당화유단백질에 의한 개선 가능성을 확인함. - <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 균주를 경구 투여한 그룹을 추가함으로써, 발효당화유단백질의 뇌기능 개선 기능성에 대한 발효 균주의 기여도 확인. - 행동실험 결과, 그룹간 통계적으로 유의한 차이는 없었지만, 균주 및 발효당화유단백질을 투여한 그룹에서 스트레스가 완화되는 경향성을 확인함. - 혈중 스트레스 호르몬 수치 및 Brain, intestine에서 발효당화유단백질 투여한 그룹이 저하된 뇌 기능을 회복시키는 것을 확인함. 특히, 발효당화유단백질이 스트레스와 DSS에 의해 증가된 inflammatory cytokine의 발현을 낮추고, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4B15 균주의 구강투여 그룹을 통해 뇌 neruendocrine인자를 증가시키는 것을 확인함.
[제2협동] 발효 당화유단백질 및 시제품의 장내 기저성 염증 및 질환 개선 기능성 연구(<i>in vivo</i> study)	기능성 시제품의 안전성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 동물 모델을 이용하여 단회 독성 (1500 mg/kg b.w.) 및 다회 독성 (15, 150, 1500 mg/kg b.w.)을 시행함으로 발효 당화유단백질의 시제품에 의한 급성 및 아급성 독성이 없음을 확인
	장내 기저성 염증 및 질환 개선 기능 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> - 당뇨 동물 모델에 5일간의 DSS 자율 급수를 통해 장내 염증 유발 - IPGTT를 통해 저농도의 샘플에서 장내 기저성 염증질환 모델에서 혈당저하의 기능 확인 - 결장, 간, 신장 조직을 이용하여 항산화 효소, 염증성 사이토카인 측정 및 PPARs의 발현 결과를 통해 저/고농도의 발효 당화유단백질에서 염증을 억제하는 것으로 판단되며, 당뇨 개선은 저농도의 발효 당화유단백질에서만 일부 기능성을 나타내는 것으로 확인

				- 제 2형 당뇨 동물 모델을 이용하여 장내 기저성 염증 및 질환 개선 확인
	<p>[제3협동] 발효 당화유단백질 함유 유제품의 급여를 통한 저병원성 세균 감염 동물모델의 장내 기저성 질환 개선 효과 연구</p>	발효 당화유단백질 함유 유제품 급여를 통한 동물모델의 장내 저병원성 세균 제어 효과 및 기저성 질환 개선효과 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> - 발효 당화유단백질 함유 유제품을 급여한 동물모델의 기저성 질환 관련 장내 저병원성 세균 제어효과 확인 - 발효 당화유단백질함유 유제품 급여를 통한 기저성 질환(염증성 질환, 대장암, 노화 등) 지표 개선효과 확인 및 관련 메커니즘 규명

3-2. 관련분야 기여도

- 우유 및 유제품 또는 단백질 보충제 등으로 많은 소비가 이루어지는 유단백질을 활용한 스트레스성 뇌 기능 저하 완화 및 기저성 염증 개선 효과를 가지는 기능성 소재 개발
- 신규 식품 소재 및 유제품 적용 공정을 개발하고, 뇌 기능 및 염증 개선 기능성 연구 및 식품 안전성 연구를 통하여 국제 시장에서 유단백질의 우수성을 알리고 고부가가치의 상품을 수출할 수 있음
- 발효 당화유단백질 소재를 활용한 기능성 고부가가치 유제품의 개발을 통해 우유 및 우유 내 부산물의 부가가치 상승 기대
- 우유의 부산물인 유단백질의 부가가치 향상으로 인한 낙농가소득 증대 도모
- 고령 노인 질환의 주범인 염증성 장 질환의 동물 모델 표본 및 효과 검증을 위한 연구 시스템 확립
- 국내외적으로 약 20% 정도가 겪고 있는 면역질환의 예방과 고령화 시대에 대비한 고령 친화 기능성 식품 소재 및 적용 유제품 개발을 통해 국민건강 증진에 기여할 것으로 사료됨

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구결과의 활용계획

- 우유 유래 고기능성 발효 당화유단백질 소재 및 적용 유제품 개발
 - 고령 친화 스트레스성 뇌 기능 저하 예방 및 기저성 염증 개선 효과를 갖는 식품 소재 및 유제품의 개발 (발효유, 발효음료, 분말 제제)
 - 주관연구기관인 서울우유협동조합의 유통망을 통하여 제품을 출시하고 홍보할 예정
 - 본 연구과제의 수행 결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화 실시
 - 인체적용시험을 통한 기능성 검증 및 개별인정형 원료의 획득을 추진 할 계획
- 초고령 사회 진입에 따른 복합 질환 동물모델 시스템 구축
 - 기저성 염증 및 스트레스 복합 동물모델과 당뇨 및 염증성 장 질환 복합 동물모델을 구축함으로써 질환 예방 및 치료에 실마리를 제공할 수 있는 병리 연구에 활용 가능
 - 구축된 동물모델과 행동실험 연구 시스템은 신규 발굴될 기능성 소재의 증상 개선 효과 검증에 활용 가능하며, 기능성 식품 소재의 선별 시스템으로 활용이 가능

4-2. 기술이전을 통한 사업화 실시

- 본 연구과제의 수행결과를 통해서 주관연구기관인 서울우유협동조합에서 기술이전 자체사업화를 위하여 기술실시 계약 체결
- 현재 발효 당화유단백질 적용 발효유, 발효음료 및 분말제제의 시제품 제작을 완료하였으며, 출시 예정 제품의 스케일업을 통한 대량생산 재실험을 진행하여 최적화된 공정을 완성할 계획임. 또한, 유통·저장 중의 안정성 및 안전성 연구 및 외부관능검사[초점그룹인터뷰(FGI) 및 소비자 기호도조사]와 제품의 스토리텔링을 통한 마케팅 방안 설정할 예정임.
- 국내 프로바이오틱스 제품은 장기능 및 소화 개선 등의 효과를 지니는 제품에 초점이 맞추어지고 있으며, 이를 확대하여 장기능 개선, 면역 조절 및 스트레스성 뇌 기능 저하 예방 효능을 나타낼 수 있는 기능성 유제품의 개발을 통해 유제품의 활용 가능성을 증대시켜 고부가가치의 시장을 창출할 것으로 사료됨.

붙임. 참고문헌

- Nakanishi, M., & Rosenberg, D. W. 2013. Multifaceted roles of PGE 2 in inflammation and cancer. *Seminars in immunopathology*, 35 (2), 123-137.
- Tokuhara, Y., Morinishi, T., Matsunaga, T., Sakai, M., Sakai, T., Ohsaki, H., ... & Hirakawa, E. 2018. Nuclear expression of claudin 3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. *Oncology letters*, 15(1), 99-108.
- Wang, D., & DuBois, R. N. 2010. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*, 29(6), 781.
- Zhang, L., & Shay, J. W. 2017. Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8).
- Pehrsson, P. R., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., Perry, C. R. & Beckler, D. G. USDA's national food and nutrient analysis program: food sampling. *J Food Compos Anal* 13, 379-389 (2000).
- Jensen, R. G., Ferris, A. M. & Lammi-Keefe, C. J. The composition of milk fat. *J Dairy Sci* 74, 3228-3243, doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78509-3 (1991).
- Chevalier, F., Chobert, J. M., Genot, C. & Haertle, T. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of beta-lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J Agric Food Chem* 49, 5031-5038 (2001).
- Fox, P. & McSweeney, P. L. H. Milk proteins: general and historical behaviour. 3 edn, Vol. 1 47-48 (Kluwer Academic/Plenum, 2003).
- Marshall, K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev* 9, 136-156 (2004).
- Horne, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr Opin Colloid In* 11, 148-153 (2006).
- Beydoun, M. A., Gary, T. L., Caballero, B. H., Lawrence, R. S., Cheskin, L. J., & Wang, Y. Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their association with obesity, central obesity, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 87, 1914-1925, doi:10.1093/ajcn/87.6.1914 (2008).
- Fumeron, F., Lamri, A., Abi Khalil, C., Jaziri, R., Porchay-Balderelli, I., Lantieri, O., Vol, S., Balkau, B., & Marre, M. Dairy consumption and the incidence of hyperglycemia and the metabolic syndrome: results from a french prospective study, Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care* 34,

813-817, doi:10.2337/dc10-1772 (2011).

- Milkovska-Stamenova, S. & Hoffmann, R. Hexose-derived glycation sites in processed bovine milk. *J Proteomics* 134, 102-111, doi:10.1016/j.jprot.2015.12.022 (2016).
- Liu, J., Ru, Q. & Ding, Y. Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review. *Food Res Int* 49, 170-183 (2012).
- Arribas-Lorenzo, G. & Morales, F. J. Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants. *J Agric Food Chem* 58, 2966-2972, doi:10.1021/jf902815p (2010).
- Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., Baynes, J. W. & O'Brien, J. Maillard reactions in chemistry, food and health. (Elsevier, 1998).
- Ledl, F. & Schleicher, E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie* 29, 565-594 (1990).
- Friedman, M. Food browning and its prevention: An overview. *J Agric Food Chem* 44, 631-653 (1996).
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F. & Van Boekel, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends Food Sci Technol* 11, 364-373 (2001).
- Zhang, Y. & Zhang, Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47, 521-542, doi:10.1080/10408390600920070 (2007).
- Rabbani N. & Thornalley P. J. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* 42, 1087 - 1096 (2012).
- Tuohy, K. M., Hinton, D. J., Davies, S. J., Crabbe, M. J., Gibson, G. R., & Ames, J. M. Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota: implications for health. *Mol Nutr Food Res* 50, 847-857 (2006).
- Borrelli, R. C. & Fogliano, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol Nutr Food Res* 49, 673-678, doi:10.1002/mnfr.200500011 (2005).
- Summa, C., McCourt, J., Cammerer, B., Fiala, A., Probst, M., Kun, S., Anklam, E., & Wagner, K. H. Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of cocoa bean Maillard reaction products with degree of roasting. *Mol Nutr Food Res* 52, 342-351, doi:10.1002/mnfr.200700403 (2008).
- Daglia, M., Tarsi, R., Papetti, A., Grisoli, P., Dacarro, C., Pruzzo, C., & Gazzani, G.

- Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* 50, 1225-1229 (2002).
- Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita, Y., Nagase, M., Suzuki, Y., Nobuta, Y., Sudou, Y., Nakamura, O., Kagaya, I., Goshima, H., Kodama, Y., Icatro, F. C., Koizumi, W., Saigenji, K., Miura, S., Sugiyama, T., & Kimura, N. Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter* 9, 429-435, doi:10.1111/j.1083-4389.2004.00263.x (2004).
 - Seiquer, I., Ruiz-Roca, B., Mesías, M., Muñoz Hoyos, A., Galdó, G., Ochoa, J. J., & Navarro, M. P. The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. In vitro and in vivo comparative study. *J Sci Food Agric* 88, 1245-1252 (2008).
 - Korhonen, H. & Pihlanto, A. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr Pharm Des* 13, 829-843 (2007).
 - Meisel, H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J* 8, 363-373 (1998).
 - Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S. & Sahu, P. S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi J Biol Sci* 23, 577-583, doi:10.1016/j.sjbs.2015.06.005 (2016).
 - Brantl, V. Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins. *Eur J Pharmacol* 106, 213-214 (1984).
 - Dziuba, J., Minkiewicz, P., Nalecz, D. & Iwaniak, A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung* 43, 190-195, doi:10.1002/(SICI)1521-3803(19990601)43:3<190::AID-FOOD190>3.0.CO;2-A (1999).
 - Molina, P. E. & Abumrad, N. N. Metabolic effects of opiates and opioid peptides. *Adv Neuroimmunol* 4, 105-116 (1994).
 - Calvo, C. F., Cesselin, F., Gelman, M. & Glowinski, J. Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration. *Eur J Neurosci* 12, 2676-2684 (2000).

주 의

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