

최 종
연구보고서

항염 및 면역활성을 촉진하는
기능성 유제품 개발

Development of Formulated Milk
Containing Anti-inflammatory and
Immunostimulating Biological

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “항염 및 면역활성을 촉진하는 기능성 유제품 개발에 관한 연구” 과제 (제1세부과제: 모유 및 원유에 함유된 생리활성물질 (TGF- β)의 정량 및 분석, 제2세부과제: 초유로부터 TGF- β 의 추출 및 조제유 개발에 관한 연구)의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 고 준 수

연 구 원 : 김 평 현

연 구 원 : 남 명 수

연 구 원 : 유 근 형

연 구 원 : 전 성 기

연 구 원 : 염 선 용

연 구 원 : 배 형 철

연 구 원 : 김 두 형

요 약 문

I. 제 목 : 총괄제목 : 항염 및 면역활성을 촉진하는 기능성 유제품 개발

제1세부과제 : 모유 및 원유에 함유된 생리활성물질 (TGF- β)의 정량 및 분석

제2세부과제 : 초유로부터 TGF- β 의 추출 및 조제유 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우유는 자축의 성장에 필요한 모든 영양 성분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 면역성분을 비롯한 다양한 생리활성 물질이 함유되고 있는 것으로 밝혀지고 있어 식품의 가치를 더욱 높여 주고 있다. 우유는 우유가 내재적으로 지니고 있는 식품의 가치는 물론, 섭취 후 직접적으로 효과를 주는 생리활성 물질들 (현재성 인자)과 체내에서 소화된 후 효과를 나타내는 잠재성 인자들이 밝혀지고 있다.

본 연구에서 관심을 갖는 생리활성물질인 TGF- β 는 다양한 면역조절 기능, 특히 항염 작용을 강력하게 나타내는 물질로 잘 알려져 있다. TGF- β 는 이와 같은 작용을 포함하여 다 기능적 특성으로 90년대 들어 가장 주목받고 있는 cytokine 중의 하나이다. 체내에 존재하는 절대량으로 보면 IgA가 전체 항체 class 중 80% 정도이며 이들은 대부분 점액 분비 조직 (mucosal secretions)에 존재한다. IgA 항체는 장내 점막면역에서 가장 중요한 성분으로 알려져 있고, TGF- β 는 IgA 합성을 선택적으로 증가시킨다고 보고되고 있다.

모유, 특히 초유는 인체에서 가장 많은 TGF- β 를 함유하고 있으나, 우유에는 비교적 소량의 TGF- β 가 존재한다고 알려져 있다. 그런데 우유 속에 존재하는 TGF- β 는 다른 cytokine (TGF- α , EGF)과 같이 조제분유에서는 파괴되어 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. 아직까지 유아용 조제분유에 TGF- β 가 첨가된 우수한 기능성 제품이 개발되어 있지 않다. 따라서 조제분유에 결핍된 TGF- β 를 첨가하여 모유에 가까운 유아용 기능성 조제분유를 개발할 필요가 있다.

III 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제: 본 연구는 항염 및 면역활성 기능이 탁월한 TGF- β 가 첨가된 유아용 기능성 유제품 개발에 요구되는 초유와 모유의 분석 및 추출된 TGF- β 의 생물학적, 생화학적 기능을 분석하였다.

- 1) 모유, 원유 및 분유에 함유된 생리활성물질 (TGF- β)의 정량 및 분석
- 2) 생리활성물질 (TGF- β)의 장내 항염, 면역활성 조사
- 3) 생리활성물질 (TGF- β) 첨가 유제품의 기능 평가
- 4) 초유 및 원유로부터 TGF- β 의 분리 공정 확립
- 5) 분리된 TGF- β 의 생화학적, 생물학적 특성 규명
- 6) 최종적으로 각종 기능, 안정성 평가 후 TGF- β 함유 유제품의 개발 및 임상실험

2. 제2세부과제: 본 연구는 항염 및 면역활성 기능이 탁월한 TGF- β 를 소 초유에서 분리 추출하는 공정을 확립하여 TGF- β 를 함유한 기능성 유제품을 개발하고자 한다.

- 1) 초유 및 원유로부터 TGF- β 의 분리 공정 확립
- 2) 분리된 TGF- β 의 생화학적, 생물학적 특성 규명
- 3) 최종적으로 각종 기능, 안정성 평가 후 TGF- β 함유 유제품의 개발 및 임상실험

IV 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 제1세부과제

초유 내에 포함된 TGF- β 를 isotype별로 정량하기 위하여 먼저 면역화학적인 방법으로 TGF- β_1 과 TGF- β_2 에 대한 ELISA 방법을 정착하였다. 정착된 TGF- β_1 과 TGF- β_2 ELISA 방법이 높은 민감도를 보였고 이러한 방법으로 초유나 모유에 존재하는 TGF- β 를 양호하게 정량할 수 있었다.

소와 사람의 초유를 지방과 casein등의 성분을 제거한 후 초유에 함유된 TGF- β_1 과 TGF- β_2 를 정량한 결과 모두 높은 농도로 검출되었고 그 양은 사간이 지나감에 따라 감소하였다. 그러나 TGF- β 의 소와 사람에서의 발현 양상은 다르게 나타내었다 : 소에서는 TGF- β_1 보다 TGF- β_2 가 더 많이 함유되어 있고 사람의 경우는 반대이다.

초유 내에 포함된 TGF- β 의 생리활성은 여러 가지 방법으로 확인하였다. 우선 MV1LU 세포를 이용하여 TGF- β 의 성장억제 효과를 확인한 결과, 예상대로 초유에 함유된 TGF- β 도 MV1LU세포의 성장을 억제하였다. 두 번째 실험으로 초유가 면역세포의 성장에 미치

는 영향을 확인하였으며, 적당한 농도의 초유 시료로 처리된 mouse spleen cell의 성장이 억제됨을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 mouse spleen cell과 mesenteric lymph node cell을 초유로 처리하면 선택적으로 IgA의 분비 양이 증가됨을 알 수 있었고 GL Ca promoter reporter assay로 확인한 결과도 초유 시료가 Ca promoter의 발현을 촉진함을 확인하였다. 즉 초유 내에 함유된 TGF- β 가 선택적으로 장내면역에서 중요한 작용을 하는 IgA를 촉진시킬 수 있음을 시사한다. 한편 면역세포인 T cell에 대한 초유에서 분리한 TGF- β 로 처리한 결과 초기염증반응에 관여하는 TNF- α 와 IL-6의 발현을 감소시켰으며, T cell 증식에 관여하는 IL-2 그리고 대식세포의 활성화에 관여하는 IL-10의 발현을 감소시켰다. 이와 같은 결과는 초유 내에 함유된 TGF- β 가 cytokine 발현 조절에 참여할 수 있으며 특히 염증반응을 감소시킬 수 있음을 시사한다. 시판 우유에 TGF- β 를 첨가한 후 TGF- β 의 안정성을 조사한 결과, 4°C에서 TGF- β 가 8일까지 안정적으로 존재할 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 획득된 정보는 적정량의 TGF- β 가 함유된 조제분유개발 및 기능성 유제품의 개발에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 제2세부과제

TGF- β 1은 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있으며, 따라서 기능성식품 및 의약품 소재로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 bovine colostrum milk로부터 TGF- β 1을 분리정제하기 위해서 Gel-filtration chromatography, AF-heparin column chromatography 및 AF-heparin column rechromatography를 수행하여 TGF- β 1을 정제하였다. 정제된 TGF- β 1은 비환원조건하에서 전기영동을 수행하여 표준 TGF- β 1과 같은 위치에 단일 band가 나타남으로 TGF- β 1임을 확인하였다. 또 환원조건하에서 Western blot을 수행한 결과 TGF- β 1 단일크론항체와 결합하는 monomer 형태의 밴드를 확인하였으며, 정제된 TGF- β 1의 회수율은 8.4% 였다. 유아용 조제분유 Formular 결정은 TGF- β 함량이 분말 100g 당 10ng으로 결정하였다. 또한 제품의 안정성 검사를 수행하여 안정성에 이상이 없음을 확인하였다.

본 연구를 통해서 얻은 기술은 TGF- β 를 비롯한 다양한 생리활성물질을 우유로부터 분리하는 연구에 이용될 수 있는 정제 시스템 개발에 기여 할 것으로 사료되며 유아용 조제분유의 기능성을 향상시키고 나아가 다양한 유제품 제조 및 상업화에 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

SUMMARY

Subject 1: Characterization of TGF- β present in human and bovine colostrum

1. Purpose of Study

In order to evaluate the value of TGF- β present in human and bovine colostrum.

2. Results and Conclusion

Colostrum contains various kinds of cytokines including TGF- β which is known to be multifunctional in immune response and act as an anti-inflammatory agent. First, we measured the amount of TGF- β in bovine and human colostrums. Expression pattern of TGF- β isotypes was dramatically different between human and bovine colostrum samples. Bovine colostrums collected on day 1 post-delivery retained 41.79 \pm 16.96 ng/ml of TGF- β_1 and 108.4 \pm 78.65 ng/ml of TGF- β_2 while in human, 284 \pm 124.75 ng/ml of TGF- β_1 and 29.75 \pm 6.73 ng/ml of TGF- β_2 . Thus, TGF- β_2 is the predominant TGF- β isotype in bovine colostrums and vice versa in human colostrums. Both TGF- β isotypes diminished significantly in human and bovine colostrums with time. Next, biological activity of colostrum samples was examined in vitro. Both human and bovine colostrums increased IgA synthesis by LPS-activated mouse spleen B cells, which is a typical effect of TGF- β on the mouse B cell differentiation. In addition, both human and bovine colostrums increased the germline (GL) Ca promoter activity. We confirmed that an increase of GL Ca promoter activity is due to TGF- β_1 and TGF- β_2 retained in the colostrum samples, since these activities were abrogated by anti-TGF- β_1 and anti-TGF- β_2 antibody but not by anti-TGF- β_3 antibody. Furthermore, we found that anti-proliferative activity in MV1LU cells by colostrum samples disappeared by addition of anti-TGF- β_1 and anti-TGF- β_2 antibody.

To determine if TGF- β can retain in milk stably, we added isolated TGF- β to bovine milk and incubation at various temperature for 8 days and measured the concentration of TGF- β retained in milk. immunochemical property of isolated TGF- β

was maintained in milk at 4°C for 8 days without any significant degradation. We also measured the pattern of cytokine expression following the treatment of T cell line with isolated TGF- β . It was found that isolated TGF- β downregulates proinflammatory cytokines.

In conclusion, there are substantial amounts of biologically active TGF- β_1 and TGF- β_2 in bovine and human colostrums. The data from the present study shows that isolated TGF- β present in bovine colostrum could be utilized for the development of value-added dairy products.

Subject 2: Purification of TGF- β from bovine colostrum and development of value-added formulated milk

1. Purpose of Study: In order to establish the purification process of TGF- β from bovine colostrum and to obtain the information for the development of TGF- β added formulated milk.

2. Results and Conclusion:

The highest concentration of TGF- β_1 was measured within 48 h after parturition in bovine colostrum using ELISA kit. Purification of TGF- β_1 from whey protein was carried out by the gel-filtration, gel filtration rechromatography and ion-exchange chromatography. After finishing QAE-Sephadex ion-exchange (final step), about 2,291pg/ml of TGF- β_1 was purified from bovine colostrum milk. Purification of TGF- β_1 from whey protein was carried out by the gel-filtration, AF-heparin chromatography, AF-heparin rechromatography and RP-HPLC. After final purification step, TGF- β_1 with a molecular weight of 25 kD was obtained, which were confirmed by silver staining, western blotting and reducing form SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). Finally, TGF- β_1 was identified native form of 25 kD and reducing form of 12.5 kD by reducing agent. About 24 ng purified TGF- β_1 was obtained from bovine colostrum milk. Concentration of added TGF- β_1 in Infant formula

was determined 100 g/ng. Also stability of infant formula added TGF- β_1 was identified very well.

In conclusion, purification system of biologically active TGF- β_1 and another in bovine colostrums could be utilized for the development of value-added dairy products.

Contents

Chapter I . Introduction -----	10
Chapter II . Research Background -----	13
Chapter III. Research Contents and Results	
Section 1. Materials and methods -----	15
Section 2. Results and discussion -----	23
Chapter IV. Achievement of Research Goal and Its Contribution -----	74
Chapter V. Application Plan of Research Results -----	77
Chapter VI. References -----	78

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 연구수행 방법 -----	15
제 2 절 연구수행 결과 -----	23
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	74
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	77
제 6 장 참고문헌 -----	78

제 1 장 연구개발과제의 개요

모유는 가축과 사람의 성장에 필요한 모든 영양 성분 뿐 아니라 다양한 growth factor, cytokine, vitamin 그리고 fatty acid 등 생리활성 물질을 함유하고 있어서 내재적으로 충분한 식품의 가치를 지니고 있다 (1~6). 이러한 물질은 가축과 사람의 성장, 면역방어, 면역체계와 위장관의 발달 등 중요한 의미를 갖는다. 90년대 이후 초유나 우유에는 면역 조절 기능이 있음이 밝혀지고 있다. 모유로 양육된 신생아와 보통 우유로 양육된 신생아의 건강 상태를 비교해본 결과, 모유로 양육된 신생아가 유년기에 insulin-dependent diabetes, Crohns disease 그리고 여러 가지 암에 대해서 더 강한 저항성을 나타낸다 (7~9). 뿐만 아니라 모유로 양육된 아이는 respiratory syncytial virus와 같은 호흡성 virus 감염 대해서도 높은 저항성을 갖고 있고 (10) secretory immunity도 보통 아이보다 높다 (11, 12).

모유는 면역 활성 요소와 억제 요소를 가지고 있는데 이들은 감염에 대한 allergy나 염증 반응을 억제하는 방어 기능을 담당한다. 모유에 함유된 다양한 cytokine을 통하여 면역 반응이 자극되고 그 외에도 α -tocopherol, β -casomorphins, 그리고 prolactin 등이 면역 조절 인자로 작용한다 (13, 14). 이질의 증상을 보이는 모체로부터 수유한 신생아는 이질균에 노출되어도 병적 증상은 보이지 않는다. 이와 같은 현상은 모유에 존재하는 항 미생물 요소들의 직접적인 작용에 의한 무염증 반응 기작에 의해 방어된 것으로 볼 수 있다. 사람 모유에 존재하는 cytokine 중에는 염증을 억제하는 기능이 있으며 lactoferrin과 sIgA는 endotoxin에 의해 유도된 염증 유발 cytokine의 분비를 억제한다 (15, 16).

모유, 특히 초유는 인체에서 가장 많은 TGF- β_1 과 TGF- β_2 를 함유하고 있다 (1, 17~20). 또한 소의 초유에도 다량의 TGF- β 가 존재한다고 알려져 있다 (21, 22). TGF- β 는 다양한 면역조절 기능, 특히 항염작용을 강력하게 억제하는 물질로 잘 알려져 있다. 이와 같은 작용을 포함한 다기능적 특성으로 TGF- β 는 90년대 들어 가장 주목받고 있는 cytokine 중의 하나이다. TGF- β 의 기능을 살펴보면, 중요한 면역억제 작용으로는 T cell, B cell, NK cell 그리고 대식세포의 성장을 억제한다 (23~25). 또한 만성염증 작용을 억제하며, 특히 자가면역질환의 염증반응을 선택적으로 억제하는 기능도 있어 의학계에서 주목을 받고 있다 (26, 27). 항염 효과에 주효하다는 직접적인 증거로는 TGF- β_1 결핍 마우스 (TGF- β_1 knock-out mouse)의 경우 심한 염증질환을 보이는데, 태어난다 해도 3주 이상 생존하지 못함이 관찰된 바 있다 (28-30). 그러나 이러한 TGF- β_1 knock-out mouse를 초유로 양육하

면 정상적으로 생존할 수 있다는 사실이 관찰되었다 (31). 그밖에 TGF- β 특히 TGF- β_2 가 상처치유에 놀라운 효과를 보여 현재 치료제로서 개발되고 있다 (32).

체내에 존재하는 절대량으로 보면 IgA가 전체 항체 class 중 80% 정도를 차지하며 이들은 대부분 점액 분비 조직 (mucosal secretions)에 존재한다. 특히 IgA는 장내에서 일반적인 감염에 대한 비특이적인 선천성면역 (innate immunity)과 특정항원에 대한 특이적인 적응성 면역 (adaptive immunity)에 모두 중요한 역할을 담당한다. IgA 결핍증은 가장 흔하게 관찰되는 면역 결핍증 (immunodeficiency syndrome)으로 잘 알려져 있다 (33, 34).

TGF- β_1 은 IgA isotype switching에 있어서 중요한 factor로 작용한다고 잘 알려져 있다. TGF- β_1 은 polyclonal activator인 LPS로 자극시킨 마우스 spleen B cell에서 IgA 합성을 증가시키며 (35) 세포의 클론 수준에서 IgA 합성세포의 모세포 빈도수를 증가시킨다 (36). 사람의 B cell에서도 TGF- β_1 은 IgA 합성을 선택적으로 증가시킨다고 보고되었다 (37). 또 TGF- β_1 이 항원 특이적인 IgA 합성도 선택적으로 증가시킨다고 보고된 바 있다. 이상과 같이 TGF- β_1 은 in vitro에서 IgA 항체 합성을 증가시킨다. In vivo에서도 TGF- β_1 은 IgA 합성유도에 결정적인 역할을 한다. B cell에 존재하는 TGF- β 수용체를 제거하면 이 B cell은 IgA 항체를 분비하지 않는다 (38). 이와 같은 결과는 TGF- β_1 이 체내에서 생리적인 IgA 유도인자로 작용할 수 있음을 시사한다. 장내 면역방어에 결정적인 역할을 담당하는 IgA 항체의 합성에 TGF- β 가 중요한 유도인자로 작용한다는 보고와 초유와 모유에 다량의 TGF- β 가 존재한다는 보고는 매우 흥미롭고 시사하는 바가 크다. 이와 관련하여 최근 초유나 모유에서 발견되는 TGF- β 는 신생아에서 위장관 환경에서 중요한 생리조절작용을 할 것이라고 보고된다 바 있다 (17).

아직까지 조제분유에 TGF- β 가 첨가된 기능성 제품이 개발되어 있지 않다. 따라서 조제분유에 결핍된 TGF- β 를 첨가하여 모유에 가까운 기능성 조제분유를 개발할 필요성이 있다. 식이와 영양이 인체의 건강에 가장 중요한 요인이 된다는 사실에 영양학계, 식품산업계, 의약품 산업계 등에서 의견의 일치를 보이고 있으나 기능성 물질과 기능성 식품에 대하여서는 각각 다른 입장에서 관심을 갖게 되었다. 소비자의 요구 즉 풍미가 우수하고 건강에 도움이 되는 식품을 기대하는 심리가 식품의 부가가치를 증진하는 계기가 되고 있다.

식품에 함유된 생리활성물질에 대하여 과학적으로 밝혀지는 새로운 사실들에 대한 소비자들의 이해도가 높아지면서 식품산업계는 이러한 신뢰와 기대를 충족시킬 수 있는 새로운 상품을 개발하여 시장 창출 기회를 얻게 되었으며, 첨가물 생산업체와 의약품업체에서는 기능성물질의 생산을 위한 신기술 개발 영역을 넓힐 수 있게 되었다.

특히, 우유의 성분은 여러 종류의 기능성 물질을 함유하고 있는 보고라는 사실이 밝혀지면서 유가공산업계는 우유를 이용한 부가가치를 높일 수 있는 방법에 관하여 다각도로 연구하고 제품 개발에 노력하고 있다.

우유 및 유제품의 가치를 증진시키는 방안으로 유성분의 기능적 성질을 밝히거나 타 식품유래 기능성 성분의 강화 등을 통하여 우유가공기술 (살균법의 발전, 농축/건조기술, 발효기술, 포장기술 등)의 향상이 이루어 질 수 있다고 생각한다.

국내 기술로 개발된 건강기능성 유제품을 생산하여 소비자의 신뢰를 획득하고, 우유와 유제품의 소비를 증대하여 낙농가의 소득증대를 확대할 수 있으며, 현재 우리 나라는 우유 판매 부진으로 분유의 재고 누적이 심각한 실정에 있으며, 유제품의 판매 부진을 타개하기 위하여 새로운 기능성 유제품을 개발하여 유제품의 소비를 증대하고 낙농가의 어려움을 해결할 수 있을 것으로 믿는다.

본 연구는 항염 및 면역활성 기능이 탁월한 TGF- β_1 이 첨가된 기능성 유제품을 개발하여 유가공 분야의 저변 확대를 도모하는데 기여하고자 하며 유업체의 경쟁력을 향상시킬 수 있는 토대가 될 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 세계적인 개발 현황을 보면 다양한 성분이 첨가된 기능성 유제품이 시판되고 있으나 아직까지 모유에 함유되어 있는 cytokine이 첨가된 제품은 개발되어있지 않다. 또한 우유에 함유되어 있는 TGF- β 정제에 관한 연구는 국내에서 본 연구가 처음이다. 본 연구에서 개발하고자 하는 TGF- β 첨가 기능성 유제품이 세계 최초로 완성되면 그 파급효과는 지대할 것으로 예상된다. 먼저 모유의 장내 항염 및 면역조절기능이 보완된 조제분유에 응용이 되고 다른 유제품에도 원유에 포함된 생리활성물질이 그대로 유지될 수 있는 기술이 확보될 것이며 TGF- β 외에 다양한 cytokine이 적정량 함유된 유제품 개발에 시금석이 될 것으로 기대된다. 최근 우리나라에서 시판되고 있는 기능성 유제품 개발 현황을 보면 표1과 같다.

표1 국내에서 시판되는 기능성 유제품의 개발현황

요소	함유량	유제품
DHA	3mg/100m	아인슈타인 우유, 매일 1등급 우유, 엘리트 고칼슘 우유, 어린이우유 앙팡, 대관령 고원우유, 산록우유, 파스퇴르 DHA우유, 윈스턴 우유, 뉴-싱싱우유, 매일 마더 밀크, 어린이우유 또래, 팔도우유 플러스
비타민 D ₃	40IU	
비타민 A	200IU	
비타민 E	10 μ g/L	
비타민 B	0.06mg	
Nicotinamide	0.8mg	
칼슘	0.8mg	
철분	120mg	
활성 유산균 (<i>Bifidus</i> , <i>Acidophilus</i>)	20-100억/L	비피더스 우유
해바라기유 혼합제 인삼추출액 유크림+버터유 분말	(lactase분해) 500mg (올리고당 첨가) 2.54%	하트 세이버 인삼우유 빙그레 생크림 4.3, 삼양 바이칼 우유, 매일 4.2 우유, 남양 4.5 우유, 엘리트 4.3 우유, 4.3 DHA 서울우유, 두산 4.6 우유, 산록 4.3 우유, 비락 산정우유 4.5
유지방 제거	(천연타우린 15mg/L, 트립토판 6mg 첨가)	덴마크 Low-fat우유, 파스퇴르 Low fat, 서울리듬우유, 강성원 저지방우유
혼합분유+탈지분유 Chrorella growth factor	비타민 A, 비타민 D ₃ 170mg/100ml (젖산칼슘, 콜라겐 파우더)	생칼슘 알파 생크림 롱키우유

위 표에서 보는 바와 같이 다양한 성분이 첨가된 유제품이 시판되고 있으나 아직까지 요구되는 cytokine이 첨가된 제품은 개발되어 있지 않다.

유아용 조제유로 개발하여 국내에서 생산되고 있는 조제분유는 액상으로 용해하였을 때 모유와 유사한 조성을 갖도록 여러 가지 원료들을 배합하여 건조시킨 분유이다. 우리 나라 식품법규에서 조제분유라 함은 "원유 또는 유가공품을 주원료로 하고 이에 영유아의 성장발육에 필요한 영양소를 첨가하여 모유의 성분과 유사하게 제조한 것을 말한다"고 하였다.

FAO/WHO의 Codex 규격에는 유아용 조제유(infant formula milk)의 정의를 "유아의 정상적인 영양소 요구량을 충족시키기 위해 필요시에 모유의 대체물로서 사용되는 액상 또는 분말상의 조제식품"이라고 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 제 1 세부과제

가. 초유의 분리

1) Bovine 초유의 whey 분리

소 초유를 4℃에서 15,000g로 1시간 동안 초고속 원심 분리하여 지방층을 제거하였다. 지방이 제거된 skim milk를 다시 4℃에서 30,000g로 1시간 30분 동안 초고속 원심 분리한 후 상정액을 whatman paper로 여과시켰다. 이와 같이 획득한 whey에 pH 2가 될 때까지 2.5N HCl를 첨가하여 30분 동안 상온에 방치하여 활성화시켰다. 활성화된 whey를 다시 3N NaOH로 중화시켜 실험 전까지 -20℃에 보관하며 사용하였다..

2) Human 초유의 whey 분리

산모 초유를 4℃에서 1700g로 10분 동안 원심 분리한 후 지방층을 제거하였다. 지방이 제거된 skim milk를 whatman paper로 여과시켜 획득한 whey에 pH 2가 될 때까지 2.5N HCl를 첨가하여 30분 동안 상온에 방치하여 활성화시켰다. 활성화된 whey를 다시 3N NaOH로 중화시켜 실험 전까지 -20℃에 보관하며 사용하였다.

나. TGF-β₁과 TGF-β₂의 정량법

초유 내에 존재하는 TGF-β₁과 TGF-β₂는 Sandwich ELISA 방법을 통하여 정량하였다. Anti-mouse-TGF-β₁ monoclonal antibody (Anti-mouse-TGF-β₂ monoclonal antibody)를 1.2 μg/ml의 농도로 sodium bicarbonate buffer (pH 9.3)에 준비하여 96-well plate (Costar, CA# 3690, Cambridge, MA)에 well당 50 μl씩 첨가하여 4℃에서 overnight 하였다. Plate를 PBST로 세 번 세척한 후 blocking solution (1% gelatin)을 넣고 37℃에서 1시간 동안 방치하였다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후 standard porcine TGF-β₁ (porcine TGF-β₂)과 초유 시료를 여러 가지 농도로 희석하여 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 incubation하고 세척한 뒤 primary antibody인 anti-TGF-β₁ neutralizing antibody 3 μg/ml (anti-TGF-β₂ neutralizing antibody의 경우 0.5 μg/ml)의 농도로 50 μl/well 넣어 incubation한 후 세척하

였다. Secondary antibody인 HRPO-conjugated rabbit anti-chicken-IgG antibody를 1:2000 (HRPO-conjugated rabbit anti-goat IgG antibody의 경우 1:3000)으로 희석하여 처리한 뒤 37°C에서 1시간 동안 incubation 하였다. PBST로 3번 세척하고 다시 3차 증류수로 3번 세척한 뒤 기질인 ABTS를 첨가하여 발색반응 정도를 405 nm의 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

TGF- β_1 과 TGF- β_2 사이의 cross-reactivity를 측정하기 위해서, TGF- β_2 ELISA를 이용하여 TGF- β_1 을 측정하였다. Positive control인 porcine TGF- β_2 와 porcine TGF- β_1 을 10 ng/ml부터 serial dilution하여 ELISA를 수행하였으며 반응정도는 405 nm의 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

다. 초유와 모유 함유 TGF- β 의 특성 비교 및 kinetics 조사

위에서 개발된 TGF- β 정량법을 사용하여 먼저 사람의 초유와 모유에 존재하는 TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 양을 결정하고 그 특성을 비교하였다. 초유와 모유는 춘천 소재 한림대학교 부속병원과 단국대학교의 산부인과와 소아과의 협조를 얻어 획득하였다. 먼저 초유의 경우 1일 - 4일 까지 시료를 대상으로 하고, 모유의 경우는 1주일 간격으로 채취하여 정량에 사용하였다. 획득된 sample은 원심분리와 filtration을 통해 유청액을 얻었다. 본 연구를 통해 시간 경과에 따른 TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 존재량을 결정할 수 있었으며 이 결과는 바로 제품개발시 첨가량을 결정하는데 중요한 자료로 사용될 것이다.

다음 단계로는 원유와 시판 중인 조제분유에 존재하는 TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 양을 결정하고자 한다. 지금까지 알려진 바에 의하면 원유에는 사람의 모유보다 적은 양의 TGF- β 가 존재하고 있다. 또한 조제분유에는 더 원유보다 훨씬 적은 양이 존재한다고 알려져 있다. 따라서 수유 시 적절한 양의 TGF- β 를 첨가하기 위해서는 본 조사가 필수적이라 판단된다.

라. 세포군의 준비

마우스로부터 spleen과 mesenteric lymph node (MLN)를 적출하여 20 ml의 0.01 M PBS가 담긴 petri dish에 옮긴 다음 핀셋을 이용하여 세포를 얻었으며 얻은 세포를 5분간 방치하여 상정액을 취하여 500g에서 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포에 0.83% NH₄Cl 5 ml을 넣어 5분간 정치시켜 적혈구를 파괴하였고, HBSS로 3번 세척한 후 세포를 얻어 RPMI-1640에 현탁시켰다. Spleen cell은 초유가 spleen cell의 viability, 항체분비에 미치는

영향을 조사하는 실험에 이용하였고, MLN cell은 항체분비 실험에 이용하였다.

마. [³H]thymidine 흡수 정량

다양한 농도의 porcine TGF-β와 TGF-β가 포함된 초유를 well 당 2×10^5 cells (in 5% FBS, DMEM배지)로 준비된 MV1LU cell에 넣고, 37°C에서 5% CO₂가 존재하는 incubator에서 20 시간 동안 배양하였다. 최종 농도가 20 μCi/ml의 [³H]thymidine 50 μl를 각 well에 넣고 6 시간 동안 배양하였으며 세포는 0.05% trypsin으로 처리한 후 cell harvester (Cell-Harvester IH-110-96, Inotech, Switzerland)로 거두었고 [³H]thymidine의 흡수는 liquid scintillation counter (WALLAC 1410, Pharmacia, Finland)로 측정하였다.

Porcine TGF-β와 TGF-β가 함유된 초유로 처리하기 전에 anti-TGF-β antibody로 sample내에 존재하는 TGF-β를 중화시키고 위와 같은 실험을 수행하였으며, Anti-TGF-β의 농도는 실험조건에 따라 Neutralization Dose₅₀(ND₅₀) 농도보다 2~10배 높은 농도로 사용하였고 실온에서 1시간 중화시킨 후 첨가하였다.

바. 마우스 spleen cell을 이용한 초유의 생활성 측정

초유 내에 포함된 TGF-β의 활성을 측정하기 위하여 소와 사람의 초유를 이용해서 마우스 spleen cell의 viability에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 BALB/c mouse로부터 spleen 세포 분리하고 0.83%의 NH₄Cl로 적혈구를 제거한 다음에 96well plate에 spleen 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 well당 100 μl씩 첨가하였으며 LPS는 최종농도 12.5 μg/ml가 되게 각 well에 넣어주었다. 37°C에서 LPS로 12시간 spleen 세포를 activation시킨 후, sample를 최종 희석배율이 1/25, 1/125, 1/625되게 각 well당 100 μl씩 첨가하고 37°C에서 5% CO₂가 존재하는 환경에서 8일간 배양하였다. 총 8일 동안 하루에 한 번씩 살아있는 spleen cell과 죽은 spleen cell을 구분하여 계수하였다.

사. 초유에 포함된 TGF-β가 항체합성에 미치는 영향 조사

BALB/c mouse로부터 spleen cell과 MLN cell을 96well plate에 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 well당 100 μl씩 첨가하였으며 LPS는 최종농도 12.5 μg/ml가 되게 각 well에 첨가하였다. 37°C에서 LPS로 12시간 활성화시킨 후, sample을 최종 희석배율이 1:10²부터 1:10⁶ 되게 well 당 100 μl씩 첨가하고 37°C에서 5% CO₂가 존재하는 환경에서 7일간 배양하였다. 8일째 상정액을 걷고 ELISA로 항체의 분비를 조사하였다.

아. Ig isotype-specific ELISA

초유에 함유된 TGF- β 가 항체분비에 미치는 영향을 ELISA로 정량하였다. IgA와 IgM ELISA의 경우는 첫 단계로 capture antibody로 unlabeled goat anti-mouse IgA (또는 goat anti-mouse IgM 또는 goat anti-mouse IgG₁) 항체 (1.2 μ g/ml)를 bicarbonate buffer (pH 9.3)에 준비하여 96-well plate (Costar, CA# 3690, Cambridge, MA)에 well 당 50 μ l 씩 첨가하여 4°C에 하룻밤 동안 coating하였다. PBST로 3번 씻은 후 gelatin blocking solution (BLOCKING REAGENTS, Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 1시간 동안 blocking시켰으며 PBST로 3번 씻어주고 0.5% gelatin으로 희석한 IgA (또는 IgM 또는 IgG₁) 표준용액 또는 세포배양 상등액을 넣었다. PBST로 3번 씻고, HRPO conjugated goat anti-IgA (또는 IgM 또는 IgG₁)를 1:1000으로 희석한 후 well 당 50 μ l씩 넣어, 37°C에서 1시간 incubation하였으며 PBST로 3번 씻고, 다시 3차 증류수로 3번 씻은 후, ABTS substrate solution을 well당 50 μ l씩 넣어 실온에서 약 5~10분간 반응시켰다. 반응정도는 405 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

자. Flow Cytometry 분석

분리한 mouse spleen cell을 LPS (12.5 μ g/ml)로 활성화시킨 후, 여러 농도로 희석된 초유 시료와 TGF- β ₁ 표준용액을 처리하여 37°C에서 3일간 배양한 다음 FITC-conjugated goat-anti-mouse-IgA (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 염색하고 다시 buffer로 세척한 다음 1% formalin이 함유된 0.01 M PBS로 고정시켜 FACS (Fluorescence activated cell sorting)을 이용하여 surface IgA의 발현을 측정하였다.

차. Germ line Ca Reporter 정량

초유 내 포함된 TGF- β 의 활성을 분자수준에서 확인하기 위하여 reporter assay를 수행하였다. Electroporater (Gene Pulser II, BIO-RAD, U.S.A)를 이용해서 950 μ F, 330 Volt에서 germ line Ca promoter reporter인 Ca-130/+14를 50 μ g을 3×10^7 cells/ml 농도의 A20.3 cell (pre B cell line)에 transfection하였고 6-well plate에 well당 300 μ l 씩 transfection된 A20.3 세포를 넣고, TGF- β ₁ 표준액과 TGF- β ₁이 가장 많이 포함된 초유 sample인 CF1을 여러 가지 배율로 희석한 후 첨가한 다음 well 당 최종 부피 5 ml 되게 RPMI-1640 배지를 넣어줬다. 37°C에서 5% CO₂가 존재하는 환경에서 16 시간 배양한 후 세포와 상정액을 15 ml tube에 옮기고 1,200 rpm에서 원심분리하여 세포를 거두었으며 PBS

로 한번 씻어준 다음 각 조건 당 lysis buffer 150 μ l 씩 첨가하여 세포를 lysis시킨 다음 얼음에서 10분간 incubation한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상정액을 새 tube에 넣고 -70°C 에서 보관하며 분석하였다.

TGF- β 에 의한 germline Ca promoter의 발현정도는 luciferase assay를 통해서 측정하였으며 세포 lysis액 20 μ l과 luciferin 100 μ l 잘 섞은 후 10초 정도 반응시킨 다음 luminometer (Berthold Multi-Biolumat LB9505C, Laboratorium, Germany)로 측정하였다.

카. 시판 우유에 첨가된 TGF- β 의 안정성 측정

정량된 소 초유시료 중 TGF- β 가 가장 많이 포함되어 있는 시료를 시판 우유에 첨가하여 TGF- β 의 안정성을 조사하였다. 소 초유시료를 시판 우유에 첨가한 후 각각 4°C , 20°C , 37°C 에서 24시간 동안 보관한 다음 온도에 따른 TGF- β 의 안정성을 ELISA 방법으로 측정하였다. 우유는 보통 4°C 에서 냉장보관 하기 때문에 시판 우유에 소 초유시료를 첨가한 후 4°C 에서 8일까지 보관하여 2일 간격으로 시료를 채취하여 시간경과에 따른 TGF- β 의 안정성을 측정하였다.

타. 사람 분변시료 분석

모유로 양육된 유아와 분유로 양육된 유아의 분변시료 내에 포함된 TGF- β 와 IgA의 양을 ELISA로 정량하였다. 모유로 양육된 아이 분변시료는 생 후 30일부터 채취하였으며 분유로 양육된 아이 분변시료는 생 후 10일부터 채취하였다.

파. RNA 분리와 RT-PCR

Thymocyte cell line인 EL-4 cell line을 gel filtration으로 분리된 샘플로 처리한 후 여러 가지 cytokine의 발현을 RT-PCR로 확인하였다.

1) RNA 분리

EL-4의 RNA 분리는 1×10^7 cell를 RNAwiz로 처리하여 RNA pellet을 얻은 후 DEPC (Diethyl pyrocarbonate)- H_2O 로 용해시켰다. RNA 농도는 UV spectrophotometer로 측정하였고 전기 영동하여 확인한 후 500 ng/ μ l가 되도록 희석하여 -70°C 에 보관하였다.

2) Reverse Transcription

준비된 각 RNA를 10 mM의 Tris-HCl, 50 mM의 KCl, 5 mM의 MgCl_2 , 각각 1 mM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 20 U의 RNasin (ribonuclease inhibitor : Promega), 0.1 μ g의

oligodT (Boehringer Mannheim)과 50 U의 MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL, USA)가 있는 조건하에서 RNA를 1 μ g을 넣어 37°C에서 1시간동안 reverse transcription시킨 후 95°C에서 10분간 heat inactivation시켰고 4°C에서 안정화시켰다.

3) 본 실험에서 사용한 primer의 준비를 보면

가) β -actin primer

3' primer : 3' - TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA

5' primer : 5' - CTAGAAGCACTGCGGTGGACGATGGAGGG

나) IL-2 primer

3' primer : 3' - CTTATGTGTTGTAAGCAGGAGGTAC

5' primer : 5' - CCTGAGCAGGATGGAGAATTACAG

다) IL-6 primer

3' primer : 3' - CTGTTAGGAGAGCATTGGAAATTG

5' primer : 5' - GAACGATAGTCAATTCCAGAAACC

라) IL-10 primer

3' primer : 3' - TCATTCATGGCCTTGTAGACAC

5' primer : 5' - AGCTGGACAACATACTGCTAACC

마) TGF- β_1 primer

3' primer : 3' - CTGCTCCACCTTGGGCTTGCAGACCCAC

5' primer : 5' - CGGGGCGACCTGGGCACCATCCATGAC

바) TNF- α primer

3' primer : 3' - TACAGGCTTGTCACCTCGAATT

5' primer : 5' - ATGAGCACAGAAAGCATGATC

4) Polymerase Chain Reaction

RT가 끝난 cDNA products를 PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 각각 200 μ M dATP, dCTP, dGTP와 dTTP)에 넣고 해당된 primer를 각각 25 pmol의 농도로 넣은 후 mineral oil을 첨가해 증발되지 않도록 하여 PCR을 수행하였는데 이때 specificity를 높이기 위해 'hot start PCR' 방법을 이용하였다. PCR의 temperature profile은 95°C에서 1 분간 denaturation, 55°C에서 1 분간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension하여 35 cycle을 수행하였으며 PCR product는 2% agarose gel 상에서 확인하였다.

2. 제 2 세부과제

본 연구과제는 젖소초유로부터 기능성 유제품에 첨가될 TGF- β_1 의 분리공정을 확립하고 궁극적으로 TGF- β_1 을 분리 정제하여 TGF- β_1 이 함유된 기능성 조제분유를 개발하는데 그 목적이 있다.

가. 초유수집 및 보존

실험에 필요한 젖소 초유는 대학 부설 목장을 비롯하여 여러 지역 목장에서 송아지 분만 후 96시간 이내의 초유를 수집하여 -80℃ 냉동고에 저장하면서 실험을 수행하였다.

나. 초유로부터 케이신과 유청단백질 분리

초유에 함유되어 있는 TGF- β_1 양을 측정하고 초유를 20℃로 가온하여 원심분리 (6,000 RPM) 하고 유지방을 제거하여 탈지유를 얻었다. 탈지유는 1N HCl 로 우유 등전점 pH 4.6 으로 조정하고 원심분리 (6,000 RPM) 하여 케이신을 제거하였으며 유청에 1N HCl을 첨가하여 pH 2로 조정후 약 4시간 정도 방치하였다. Cut off 10 kD의 투석막을 이용하여 유청에 포함되어 있는 염 및 분자량 10 kD 이하의 단백질을 완전히 제거한 다음 동결건조하여 실험에 사용하였다.

다. TGF- β_1 정량

유청을 연속희석방법으로 희석시켜 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 의 sandwich 방법으로 TGF- β_1 양을 측정했다. 표준 TGF- β_1 는 R&D Systems, Inc. (U.S.A) 의 것을 사용하였다.

라. Gel filtration chromatography

Sephadex-75 gel filtration용 resin(Pharmacia-Biotech, alameda, CA)을 채운 column (2.5 ×95cm)에 동결건조한 유청단백질 100 mg을 주입하고 1차 gel filtration 를 수행했다. 유속은 10 ml/hr, volume 은 1.5 ml/tube 를 취했다. Gel filtration 이 끝난 샘플은 spectrophotometer 를 이용하여 280 nm 에서 흡광도를 측정해서 그래프를 그렸다. 2차 gel filtration 은 1차 결과에서 TGF- β_1 양을 많이 포함하고 있는 분획을 모아서 1차와 같은 방법으로 수행했고 280 nm에서 흡광도를 측정했다.

마. Ion-exchange chromatography

음이온 교환수지인 QAE-Sephadex 50-120 (Sigma, St. Louis, MO)에 다량의 sodium-phosphate buffer(10mM, pH 7.0)를 넣고 완전히 팽창시켰으며 완전히 팽창된 resin을 column (2.5×30 cm) 채운 다음 sodium-phosphate buffer로 평형화시킨 다음 bovine whey protein 100 mg을 column에 완전히 흡착시키고 starting buffer 280 ml과 1.0M NaCl을 함유한 동일한 완충용액 280 ml를 continuous linear gradient로 시간당 20 ml의 유속으로 용출하고 3 ml씩 fraction collector에 분획하였다.

바. 전기영동

각 fraction을 흡광도 측정을 한 다음 전기영동을 할 fraction을 200 μ l를 취해서 speed vac으로 농축시켜 12.5% Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행했다.

사. Silver staining

전기영동을 수행한 gel를 silver stain 방법에 따라 수행했다.

아. AF-Heparin chromatography

AF-Heparine(Pharmacia-Biotech)을 충전하여 column(1.0×10 cm)을 만든후 1M acetic acid 용액으로 평형화시켰다. Gel-filtration chromatography에서 TGF- β 가 많은 분획을 회수하여 AF-Heparin column에 완전히 흡착시킨 후 OD값이 0.00이 될 때까지 충분히 column을 세척한 후 1M acetic acid에 0.1M, 0.3M, 0.5M, 1.0M의 CH₃COONa를 함유하는 용액으로 stepwise gradient로 시간당 30 ml의 유속으로 용출하고 3 ml씩 fraction collector에 분획하였다. AF-Heparin rechromatography도 같은 방법으로 수행하였다.

자. RP-HPLC chromatography

AF-Heparin chromatography로 정제한 TGF- β 분획을 0.1% TFA로 평형을 시킨 RP-HPLC C4 narrow bore column(Vydac 214TP52, 0.21×25cm, 5 μ m support, CA, U.S.A)에 주입한 다음 0.1% TFA가 섞인 acetonitrile 0-70% linear gradient로 유속 60 ml/hr을 용출시켰다.

차. TGF- β 의 Western blot

RP-HPLC로 분리된 TGF- β_1 의 non-reducing form과 reducing form을 확인하기 위하여 2-mercaptoethanol을 사용하여 reducing시킨 후 전기영동 수행한 다음 western blot 방법에 따라 Rabbit anti-human TGF- β monoclonal antibody(R&D Systems, Inc. U.S.A)를 이용하여 Western blot을 실시하였다.

카. 조제분유 formula 결정

현재 시판되고 있는 유업회사 조제분유 formula의 기준에 따랐다. 즉 한국 에보트 주식회사의 씨밀락 조제분유의 formula인 단백질 12%, 지방 28%, 탄수화물 55%, 회분 3.0%, 수분 2.2%로 하였고 TGF- β 함량은 분말 100g당 10ng으로 결정하였다.

타. TGF- β 함유 조제분유의 안정성 검사

TGF- β 함유 조제분유의 안정성 검사는 TGF- β 가 함유된 조제분유를 실온에 저장하면서 저장 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 및 5개월에 걸쳐 1개월 간격으로 저장기간별 TGF- β 활성 시험하고 있다.

제 2 절 연구수행 결과

1. 제 1 세부과제

1) TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 면역정량법 확립

TGF- β 는 5 종류의 isotype이 존재하는데 사람의 모유나 우유에는 주로 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 존재한다고 알려져 있다. 본 논문에서 제안한 초유 및 우유의 특성연구를 성공적으로 수행하기 위한 첫 번째 조건은 두 종류의 TGF- β 를 정확하게 정량할 수 있는 방법을 정착하는 일이다. 면역화학적 방법으로 TGF- β_1 과 TGF- β_2 에 각각 특이적이고 민감한 ELISA를 정착시키고자 하였다 (Figure 1). Figure 1A에서 보듯 600 pg/ml 정도의 민감도로 TGF- β_1 이 검출될 수 있다. 또한 Figure 1B에서 보듯 TGF- β_2 의 경우는 1 ng/ml 정도의 민감도를 보였다. 이와 같은 정도의 민감도는 초유나 모유에 존재하는 TGF- β 를 양호하게 정량할 수 있었다 (Figure 2, 3, 4, 5). TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 구조적으로 85% 이상의

유사성을 갖고 있기 때문에 다음은 개발된 정량법이 각각 TGF- β_1 과 TGF- β_2 를 선택적으로 검출하는지를 조사하였다. 특이도는 TGF- β_2 ELISA가 TGF- β_1 에 대한 cross-reactivity를 보이는지를 통하여 알아보았다. Figure 1C에서 보듯, TGF- β_2 ELISA는 실제로 TGF- β_1 에 대해 거의 반응하지 않았다. 즉, 높은 농도 (10 ng/ml)의 TGF- β_1 에 대해서도 거의 background에 해당되는 OD 값을 나타내었다. 이상의 결과는 두 종류의 sandwich ELISA가 만족할만한 수준의 특이도로 TGF- β_1 과 TGF- β_2 를 검출할 수 있음을 의미한다. 정착된 TGF- β_1 과 TGF- β_2 sandwich ELISA는 다음 단계 소 초유와 사람의 초유 시료분석에 사용하였다.

2) 초유 내에 포함된 TGF- β 정량

가) 소의 초유에 존재하는 TGF- β 의 정량

소 초유를 얻어 whey를 분리하여 whey내에 포함된 TGF- β 를 정량하였다 (Figure 2: TGF- β_1 , Figure 3: TGF- β_2). TGF- β 의 양은 개체에 따라서 차이가 심하였으나 TGF- β_1 의 경우 분만 첫날의 whey에 최고 121.6 ng/ml 정도의 높은 농도가 검출되었고 TGF- β_2 는 574 μ g/ml 정도의 높은 농도가 검출되었다 (Figure 2E, Figure 3B). 분만후 시간이 지날수록 TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 양은 전반적으로 감소하였다 (Figure 2G, Figure 3G). 본 실험의 결과는 소 초유에는 TGF- β_2 가 TGF- β_1 보다 훨씬 많은 양이 존재하며 두 TGF- β isotype은 모두 시간이 지남에 따라 감소됨을 알 수 있다.

나) 사람의 초유에 존재하는 TGF- β 의 정량

6명의 산모로부터 초유를 얻고 whey를 분리하여 TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 양을 측정해 본 결과, 개인마다 TGF- β 의 양이 약간의 차이는 있었으나 소 초유와 비슷하게 분만후 첫날에 TGF- β 가 가장 많이 함유되어 있었으며 시간이 지날수록 TGF- β 의 양이 감소하였다 (Figure 4: TGF- β_1 , Figure 5: TGF- β_2). 분만후 첫날의 whey내에 존재하는 TGF- β_1 은 약 37 ng/ml에서 900 ng/ml 정도였으며 (Figure 4), TGF- β_2 는 약 6 ng/ml에서 63 ng/ml 정도였다 (Figure 5). 본 결과는 소의 초유와는 다른 양상이다. 즉 사람의 초유에는 TGF- β_1 이 TGF- β_2 보다 다량 함유되어 있으며, TGF- β 의 발현 양상은 소 초유와 동일하게 두 TGF- β isotype이 모두 시간에 따라 감소한다는 것을 본 연구를 통해서 알 수 있었다 (Figure 4G, Figure 5G).

3) 초유 내에 포함된 TGF- β 의 생리활성 측정

TGF- β 는 세포의 성장을 억제하는 특성을 가지고 있으며 특히 MV1LU 세포가 TGF- β 에 대해서 높은 민감성을 보인다. 소와 사람의 초유 내에 포함된 TGF- β 가 실제로 생물학적 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 MV1LU 세포를 이용해서 성장저해 정도를 확인하였다. 본 실험에서 먼저 porcine TGF- β_1 과 porcine TGF- β_2 를 이용해서 이러한 억제현상을 확인하였으며 Figure 6A와 B에서 보듯, TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 농도가 증가함에 따라 MV1LU세포의 성장은 일관성이 있게 감소하였다. 이러한 초유에 의한 억제현상이 과연 TGF- β 에 의하여 일어난 현상인지 확인하기 위해서 TGF- β 로 MV1LU세포를 처리하기 전에 우선 anti-TGF- β_1 과 anti-TGF β_2 로 TGF- β 를 중화시키고 MV1LU세포에 첨가하였으며 원래 보였던 억제 현상이 anti-TGF- β_1 과 anti-TGF β_2 을 첨가함에 따라 사라졌다 (data not show). 따라서 TGF- β_1 과 TGF- β_2 는 MV1LU세포의 성장을 저해할 수 있고, TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 활성이 anti-TGF- β_1 과 anti-TGF- β_2 에 의해서 중화될 수 있음을 확인할 수 있었다. 소의 초유를 이용해서 같은 실험을 수행해 본 결과, TGF- β 가 가장 많이 포함된 초유 시료인 CB1 (TGF- β_1 67.20 ng/ml; TGF- β_2 574 μ g/ml)의 경우에는 standard와 동일한 경향성이 보였다 (Figure 6C). 즉 CB1 시료농도가 증가함에 따라 세포 성장은 감소하는 반면 TGF- β 가 거의 포함되지 않는 초유 시료인 CC4 (TGF- β_1 0.11 ng/ml; TGF- β_2 N.D)의 경우는 CC4 시료가 MV1LU 세포의 성장을 억제하지 못하였다 (Figure 6D). 초유 시료 내에 많은 단백질이 포함되어 있어 CB1에 의한 MV1LU 세포의 성장 억제 현상이 과연 CB1내에 존재하는 TGF- β 에 의해서 일어난 현상인지 확인하기 위하여 CB1으로 MV1LU 세포를 처리하기 전에 적절한 비율로 희석한 다음에 TGF- β Neutralization Dose 50 (ND₅₀) 농도 보다 2~10배 높은 농도의 anti-TGF- β_1 과 anti-TGF- β_2 antibody를 이용하여 CB1내에 존재하는 TGF- β 를 중화시켰다. CB1에 의한 MV1LU 세포의 성장 억제 능력은 anti-TGF- β_2 antibody에 의해서 부분적으로 중화되었고 anti-TGF- β_1 에 의해서는 거의 변화가 없었다 (Figure 7A). 사람의 초유 시료인 HB6-4 (TGF- β_1 366.4 ng/ml; TGF- β_2 47.82 ng/ml)를 이용해서 같은 시험을 수행한 결과, HB6-4도 MV1LU cell의 성장을 억제하였고 (data not show) HB6-4에 존재하는 TGF- β 를 anti-TGF- β_1 과 anti-TGF- β_2 로 중화시킨 결과, HB6-4 시료가 MV1LU 세포의 성장 억제능력은 소의 초유와 달리, anti-TGF- β_1 에 의해서 중화되었고 anti-TGF- β_2 는 거의 영향을 주지 못하였다 (Figure 7B).

4) 초유가 면역세포의 성장에 미치는 영향

TGF- β 는 다양한 면역조절 기능을 지니고 있으며, 특히 염증 작용을 강력하게 나타내는 물질로 잘 알려져 있다. 중요한 면역억제 작용으로는 T cell, B cell, NK cell, 대식세포의 성장을 억제한다. 초유 내에 포함되어 있는 TGF- β 도 이러한 억제 기능을 갖고 있는지 확인하기 위해서 초유나 모유에 포함된 TGF- β 가 마우스의 spleen cell의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 8에서 보듯, TGF- β 로 처리하지 않는 spleen cell의 성장에 비하여 porcine TGF- β 로 처리한 spleen cell의 성장은 억제되었다. TGF- β 가 가장 많이 포함된 소 초유 시료인 CB1 (TGF- β_1 : 67.20 ng/ml, TGF- β_2 : 574 μ g/ml)과 TGF- β 거의 없는 시료인 CC4 (TGF- β_1 : 0.11ng/ml, TGF- β_2 : not detectable)를 이용해서 실험을 수행한 결과, CC4보다 CB1 시료가 spleen cell의 성장을 더 많이 억제하였다 (Figure 8). 이러한 현상이 모유 시료로 수행된 실험에서도 관찰되었으며 특히 배양 후 4일째 뚜렷하게 보였다 (Figure 8). 이와 같은 결과는 초유나 모유 속에 있는 TGF- β 가 온전한 활성을 지니고 있음을 보여준다.

5) 항체합성에 대한 초유에 포함된 TGF- β 의 영향

지금까지의 연구를 통해서 소의 초유와 사람의 초유에는 상당량의 TGF- β 가 존재함을 확인할 수 있었다. 초유에 포함된 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 면역세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 마우스 spleen cell을 이용하여 항체합성을 측정하였으며 Figure 9에서 보는 바와 같이 점막 면역에 중요한 기능을 담당하는 항체인 IgA의 분비는 소의 초유나 사람의 초유 (Figure 9A)가 존재하는 조건하에서 합성정도가 standard 만큼 높지 않지만 media 조건 보다 높은 수준으로 분비되었다. 즉 적절한 양의 TGF- β 가 존재하는 조건하에서는 IgA의 합성이 촉진됨을 알 수 있었다. 같은 초유시료로 spleen cell을 처리하여 IgM (Figure 9B)과 IgG₁ (Figure 9C)의 분비도 조사하였다. IgM 항체합성의 경우 IgA 합성을 증가시킨 농도의 초유는 IgM을 증가시키지 않았다. IgG₁의 분비는 IgA 합성의 증가 정도만큼은 아니지만 초유에 의해서 어느 정도 증가되었다. 이러한 현상은 정상적인 mouse mesenteric lymph node를 이용해서 실험할 때도 관찰되었다 (Figure 10). 본 연구 결과는 초유에 함유된 TGF- β_1 이 비교적 선택적으로 IgA 항체합성을 증가시킴을 보여준다.

6) Surface IgA의 발현에 대한 초유에 포함된 TGF- β 의 영향

B cell의 IgA 분비가 초유 sample에 의해서 증가됨을 위 실험을 통해서 확인할 수 있었

으며 B cell 표면에 발현된 IgA도 초유에 의하여 증가되는지 FACScan으로 시험 조사하였다. 마우스 spleen B cell을 여러 가지 농도의 소 초유시료인 CB1 (TGF- β_1 : 67.20 ng/ml, TGF- β_2 : 574 μ g/ml)으로 3일간 처리한 후 surface IgA의 발현을 FACScan을 이용해서 측정하였다 (Figure 11). Surface IgA의 발현은 1:10², 1:10³로 희석된 CB1에 의해서 약간 증가되었고 더 낮은 농도의 소 초유 sample에 의해서는 큰 차이는 관찰되지 않았다 (data not show). 이와 같은 결과는 IgA 분비와는 약간 다른 양상인데, 비슷한 결과가 순수분리된 TGF- β_1 에 대해 보고된바가 있다 (Kim and Kagnoff, 1990).

7) 초유에 존재하는 TGF- β 에 의한 germline Ca reporter의 활성화 조사

TGF- β 가 IgA isotype switching에 있어서 중요한 조절인자로 작용하고, switching의 전조인 germline Ca transcripts를 증가시킨다는 것이 이미 보고되었다. 따라서 초유에 포함된 TGF- β 도 이러한 생물학적인 활성을 지니고 있는지 분자수준에서 확인하고자 하였으며 Germline Ca promoter의 -130~+14 부위를 포함하고 luciferase 유전자를 포함하는 reporter를 이용하여 초유내의 TGF- β 에 의해 유도되는 전사 활성을 조사하였다. 먼저 A20.3 세포에 germline Ca promoter를 transfection하고 TGF- β_1 을 가장 많이 포함하고 있는 초유 sample인 CF1을 첨가하고 16시간 배양한 후 luciferase 활성을 측정하였다 (Figure 12A). Figure 12A에서 보듯, germline Ca promoter의 전사는 초유 sample에 의해서 향상되었고 초유 sample이 희석됨에 따라 점차 감소되었다. TGF- β_2 가 가장 많이 포함된 초유 sample도 유사한 경향성이 보였으며 (Figure 12B) 이러한 현상이 과연 초유에 포함된 TGF- β 에 의해서 나타난 현상인지 확인하기 위해서 초유 sample을 transfection전에 각각 anti-TGF- β_1 , 2, 3 antibody를 sample과 먼저 반응시킨 후 실험을 수행하였다. 초유에 의해 증가되었던 germline Ca promoter의 전사활성은 anti-TGF- β_1 antibody와 anti-TGF- β_2 antibody에 의해 제거되었으나, anti-TGF- β_3 antibody는 중화 효과가 없었다 (Figure 12C). 본 연구 결과는 초유 내에 존재하는 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 germline Ca promoter의 활성을 증가시킴을 시사한다.

8) 초유로부터 분리된 유청단백질 TGF- β 의 함량 및 생리활성

초유에 함유되어 있는 TGF- β 양을 측정하고 gel filtration을 수행하여 TGF- β 를 많이 함유하고 있는 분획을 얻고 포함된 TGF- β 가 분리한 분획에서도 높은 농도로 존재하는지, 즉 분리과정 중에서 파괴되었는지를 알기 위해서 분리된 분획을 다시 PBS에 녹여 포함된

TGF- β_1 과 TGF- β_2 의 농도를 ELISA를 이용하여 정량하였다 (Figure 13A, Figure 14A). Gel filtration을 한 후 얻은 분획 (Ig-G40)에서도 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 높은 농도로 존재하며 분리하기전과 같은 양상으로 TGF- β_2 가 더 높은 농도로 포함되어 있음을 알 수 있었다 (TGF- β_1 : 11.52 mg/100 mg powder, TGF- β_2 : 461 mg/100 mg powder. Figure 13 B, Figure 14 B). 분획에 포함된 TGF- β 가 온전한 생리활성을 갖고 있는지 bioassay를 이용하여 확인하였으며 일반적으로 TGF- β 가 분비될 때 latent form으로 분비되고 산성조건에서 active form로 전환되어 정상적인 생리활성을 갖게된다고 한다. 따라서 bioassay 실험을 수행하기 전에 우선 acidification 방법으로 TGF- β 를 활성화시켜야 하는데 이러한 과정 중에서 첨가된 산과 배지가 반응하여 세포의 성장을 억제시키는 물질이 생성되는지 먼저 확인하였다. 상업적으로 구입한 purified TGF- β_2 가 높은 농도에서 MV1LU 세포의 성장을 완전히 억제시키는 반면 (Figure 15), acidification과정 중에서 산과 배지의 반응으로는 세포 성장을 억제하지 못하였다 (Figure 16 A, B). 즉 이러한 방법으로 TGF- β 를 활성화시키는 것이 세포 성장을 저해하는 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 따라서 이러한 방법으로 분획 내에 포함된 TGF- β 를 활성화시킨 후 bioassay를 수행한 결과, positive control (Figure 15)과 유사하게 분획 sample (Ig-G40)이 MV1LU 세포의 성장을 억제하였고 acidification한 sample과 그러지 않은 sample이 세포 성장을 억제하는데 거의 차이가 없었다 (Figure 17, Figure 18). 따라서 분획 내에 포함된 TGF- β 가 온전한 생리활성을 갖고 있음을 알 수 있고 acidified sample과 non-acidified sample에 차이가 없는 이유는 초유에 분비된 TGF- β 는 active한 form으로 분비되거나 분리 정제하는 과정 중에서 active form으로 전환되었다고 생각된다.

9) 시판우유에 첨가된 TGF- β 의 안정성

본 실험의 최종적인 목적은 우유/분유에 TGF- β 를 첨가하여 기능성 유제품과 유아를 위한 조제유를 개발하는 것인데 본 연구에서는 첨가된 TGF- β 가 안정적으로 우유에 존재할 수 있는지에 대해서 시험 조사하였다. 우유에 TGF- β 를 첨가한 후 ELISA로 측정하기 전 여러 가지 전처리가 필요하므로 어떠한 처리방법이 가장 적당한지 먼저 조사하였으며 (Figure 20). TGF- β 가 첨가되지 않은 시판우유는 negative control로 이용되고, 앞에서 언급한 Ig-G40 sample을 PBS에 첨가하여 positive control로 이용하였다. 전처리 방법은: 1) 우유에 Ig-G40 sample만 첨가; 2) 우유에 Ig-G40 sample을 첨가한 후 acidification 방법으로 우유 내에 포함된 지방 및 단백질 성분을 제거; 3) 먼저 우유에 포함된 지방 및 단백질

성분을 제거하고 Ig-G40 sample을 첨가. 이러한 방법으로 처리하고 ELISA로 측정 한 결과 1번 방법을 이용할 때 positive control과 가장 유사한 결과를 얻었다. 따라서 안정성 조사 시 가장 간편하게 측정할 수 있는 1번 방법이 다음단계의 실험에 이용되었다.

먼저 온도에 따라 첨가된 TGF- β 의 안정성을 조사하였다 (Figure 21 A). Ig-G40 sample을 우유에 첨가한 후 4°C, 실온 (20°C) 과 37°C에서 24시간 보관한 다음 ELISA로 TGF- β_2 정량한 결과, 예상대로 4°C에서 가장 높은 TGF- β_2 가 검출되었다. 즉 4°C에서 TGF- β_2 가 가장 안정적으로 우유 속에 존재함을 알 수 있었다. 일반적으로 유제품을 보관할 때 4°C에서 보관하므로 4°C에서 TGF- β_2 가 며칠까지 안정적으로 존재할 수 있는지를 조사하였으며 4°C에서 총 8일 보관하는 동안 2일 간격으로 sample을 채취하여 ELISA로 정량하였다 (Figure 21 B). 저장 8일 동안 TGF- β_2 가 거의 같은 농도로 검출되었으며 이 결과는 첨가된 TGF- β_2 가 4°C에서 적어도 8일까지 안정적으로 유지될 수 있음을 보여준다.

10) 모유와 분유로 양육된 유아 분변 분석

모유섭취 유아 (3명)와 분유섭취 유아 (2명) 분변 내에 포함된 TGF β_1 과 IgA의 분비량을 ELISA방법으로 측정하였다 (Figure 22, Figure 23). 개체에 따라서 분석결과와 차이는 크나 전체적으로 보았을 때 TGF- β_1 의 경우 모유섭취 유아의 분변에서 더 높은 농도로 검출되었다. TGF- β_1 은 모유인 경우 최고 25.8 ng/ml로 검출되었고 (Figure 22 B, 35일), 분유인 경우는 최고 5.36 ng/ml로 검출되었다 (Figure 22C, 19일). IgA도 역시 개체에 따라서 워낙 차이가 심하였고 양쪽 유아에 따른 뚜렷한 경향성은 관찰되지 않았다 (Figure 23). 분변 분석에 대해서는 좀더 엄격한 채취와 함께 보관 그리고 처리 기법이 일관성 있게 적용되어야 할 것으로 사료된다.

11) 초유 내에 포함된 TGF- β 의 의한 여러 가지 cytokine의 발현

TGF- β 는 염증반응을 억제하는 cytokine으로 알려져 있는데 초유 내에 포함된 TGF- β 가 TNF- α , IL-2와 같은 염증반응에 관여하는 cytokine의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 실험은 Ig-G40 sample을 thymocyte cell line인 EL-4 cell에 첨가하여 24시간 배양한 후 여러 가지 cytokine의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. Figure 24에서 보듯, TGF- β 가 함유된 Ig-G40는 초기염증반응에 관여하는 TNF- α 와 IL-6의 발현을 감소시켰으며, T cell 증식에 관여하는 IL-2 그리고 대식세포의 활성화에 관여하는 IL-10의 발현을 감소시켰다. 이와 같은 결과는 초유 내에 포함된 TGF- β 가 cytokine 발현 조절에 참여할 수

있으며 특히 염증반응을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

지금까지의 연구결과를 종합하면:

- 1) 초유 내에 상당한 양의 TGF- β_1 과 TGF- β_2 가 존재하며 그 양은 분만후 시간이 경과함에 따라 감소한다.
- 2) 소와 사람의 초유 속에 있는 TGF- β 는 온전한 활성을 지니고 있으며 장내 면역에서 중요한 역할을 담당하는 IgA 항체의 분비를 촉진시킨다.
- 3) 초유에서 분리 정제된 TGF- β 도 온전한 생리학적 활성을 지니고 있다.
- 4) 시판우유 내에 TGF- β 가 많이 포함된 초유 sample을 첨가하여 실험해본 결과, 첨가된 TGF- β 가 오래 시간 동안 안정적으로 존재할 수 있다.
- 5) 모유와 분유로 양육된 유아의 분변을 비교해본 결과 모유로 양육된 유아의 분변 내에 더 많은 TGF- β 가 함유되어 있기 때문에 분유로 양육된 유아보다 더 강한 점막면역성이 보일 것으로 예상된다.

본 연구과제에서는 초유 내에 존재하는 TGF- β 의 특성 조사를 통해 그 생리활성 기능을 구명하였다. 아직까지 조제분유에 TGF- β 가 첨가된 기능성 제품이 개발되어 있지 않다. 따라서 본 실험결과를 기초자료로 활용하여 조제분유에 결핍된 TGF- β 를 첨가하여 모유에 가까운 기능성 조제분유를 개발할 필요성이 있다고 사료된다.

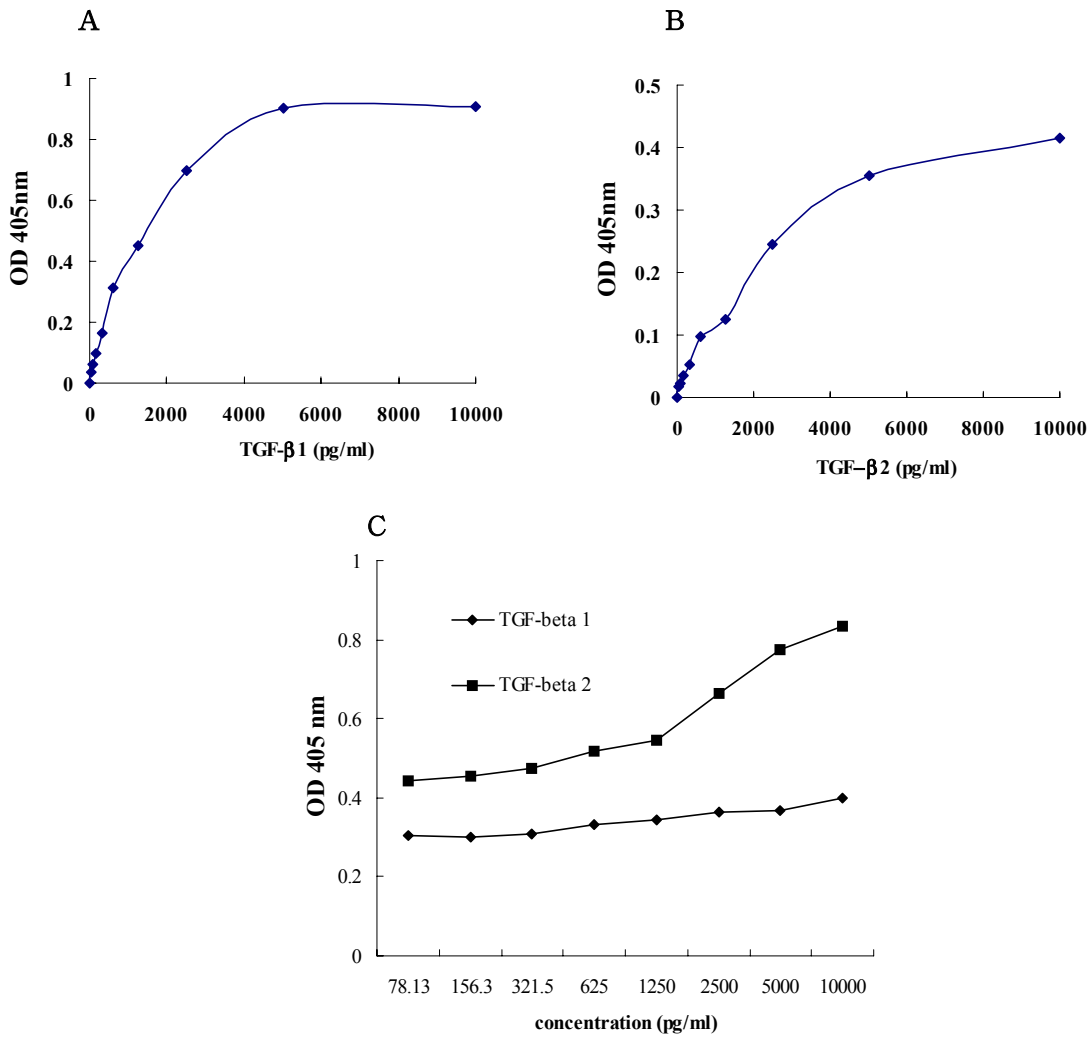


Figure 1. ELISA specific to TGF-β isotype. (A) and (B) are the standard curve of TGF-β₁ and TGF-β₂, respectively. Purified porcine TGF-β₁ and TGF-β₂ were used and diluted by two folds from 10 ng/ml. (C) Cross activity between TGF-β₁ and TGF-β₂ ELISA. Cross reactivity of TGF-β₁ was measured by TGF-β₂ ELISA.

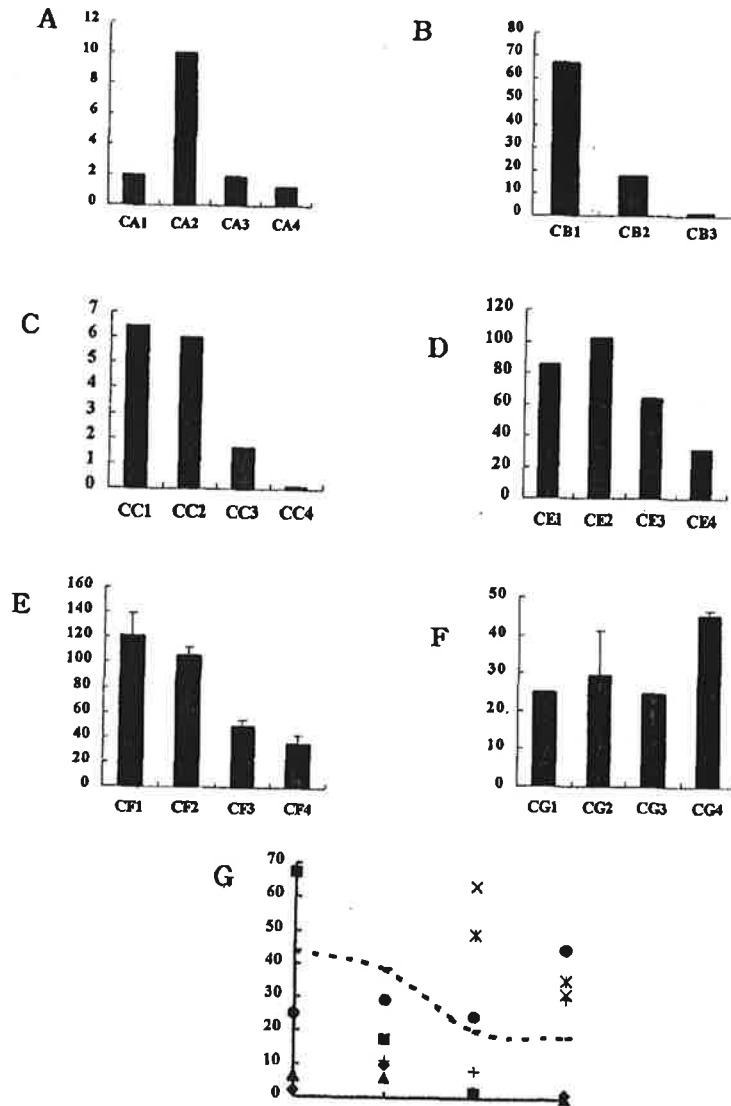


Figure 2. Detection of TGF- β_1 retained in bovine colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 3~4 day of the delivery. (G), Kinetics of TGF- β_1 retained in bovine colostrial samples.

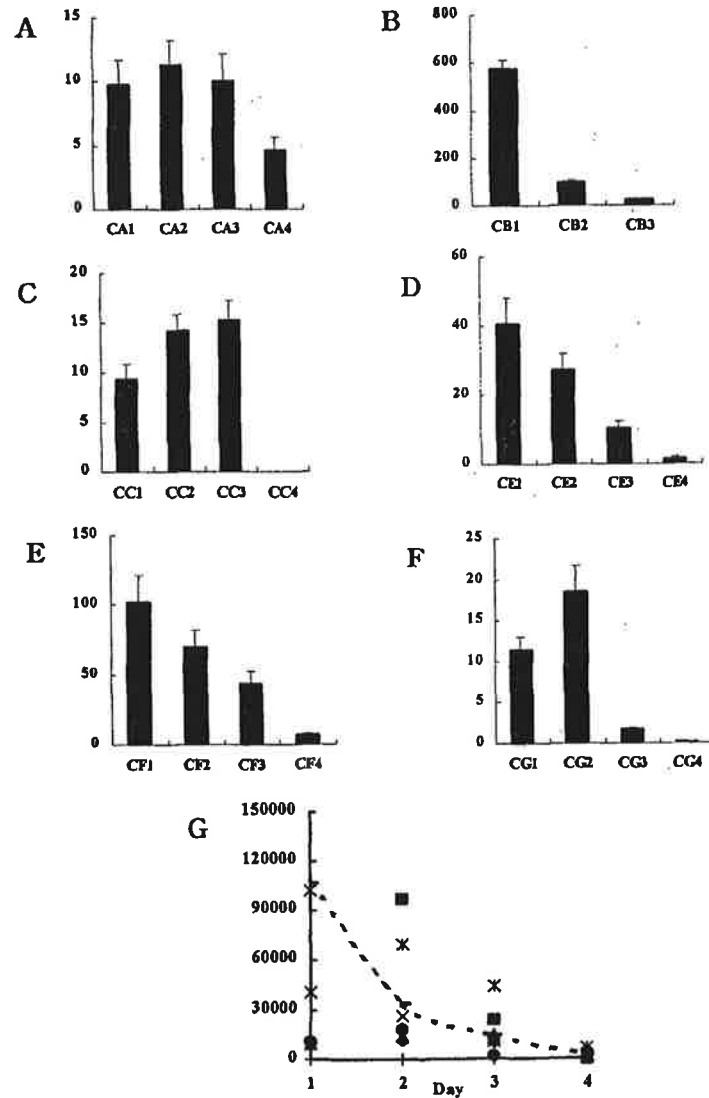


Figure 3. Detection of TGF- β_2 retained in bovine colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 3~4 day of the delivery. (G), Kinetics of TGF- β_2 retained in bovine colostrial samples.

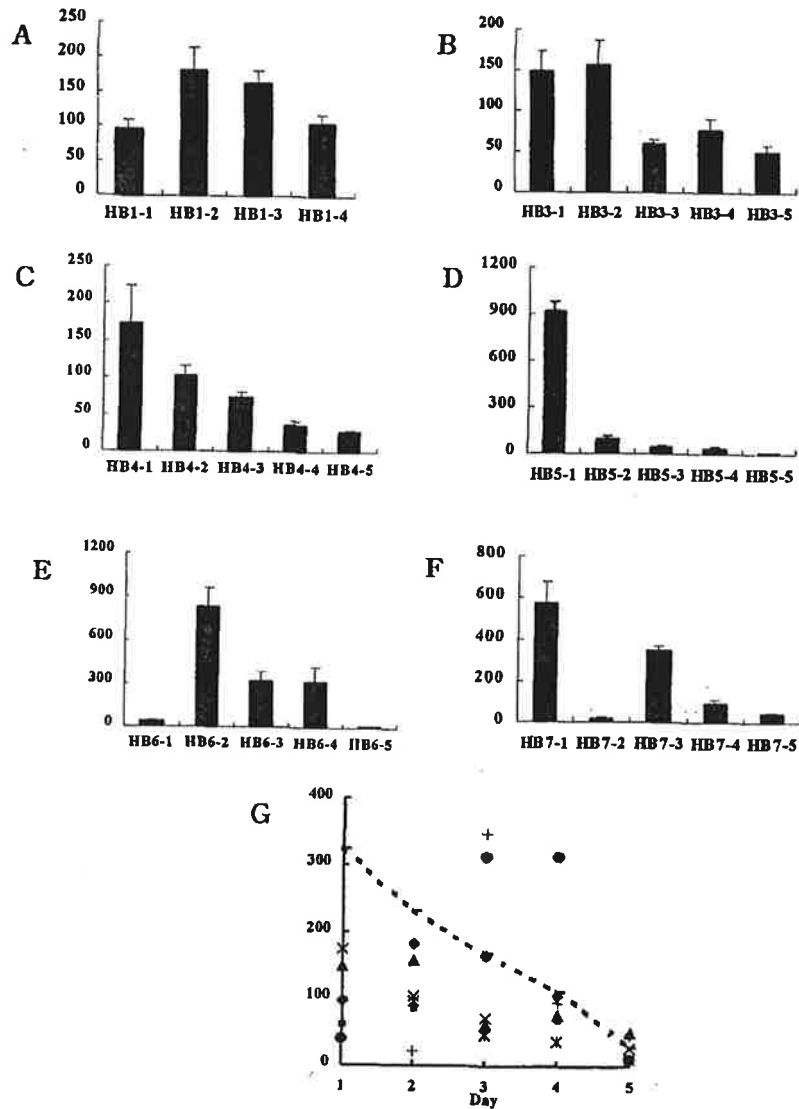


Figure 4. Measurement of TGF- β_1 in human colostrums by ELISA. (A)~(F) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 4~5 day of the delivery. (G), Kinetics of TGF- β_1 retained in human colostrial samples.

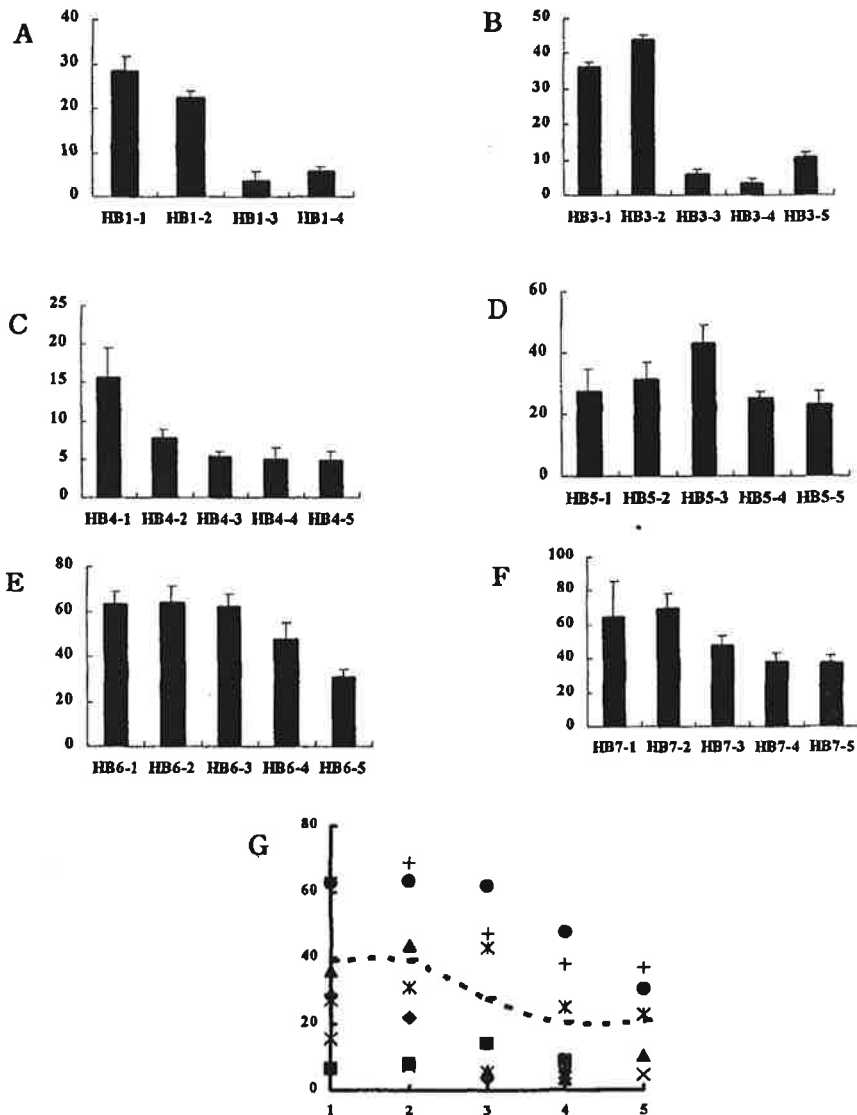


Figure 5. Measurement of TGF- β_2 in human colostrums by ELISA. (A)~(G) samples were acquired from different individuals. Colostrial samples were collected up to the 4~5 day of the delivery. (G), Kinetics of TGF- β_2 retained in human colostrial samples.

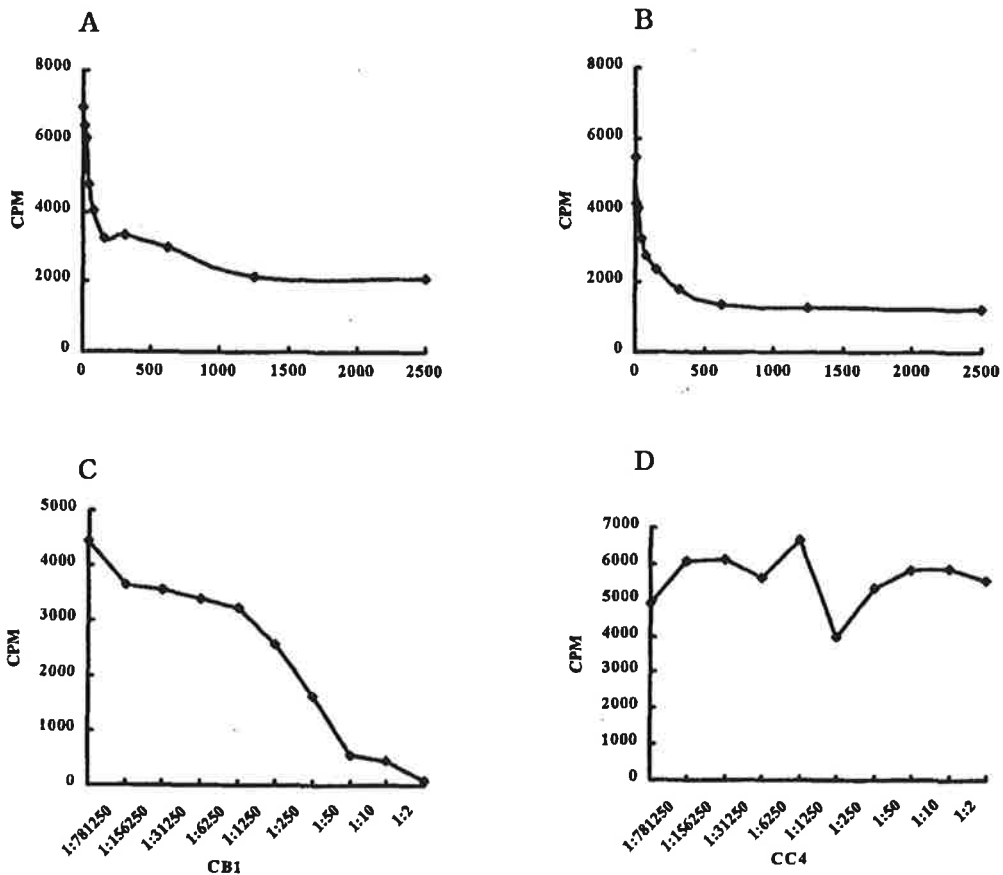


Figure 6. Bioassay of TGF-β in bovine colostrums using MV1LU cells. (A) and (B), Purified porcine TGF-β₁ and TGF-β₂ were diluted by two folds from 2 ng/ml and used as positive control. (C) CB1 is a bovine colostrial sample which contains the greatest amount of TGF-β (TGF-β₁: 67.20 ng/ml, TGF-β₂: 574 mg/ml), whereas (D) CC4 contains the smallest amount of TGF-β (TGF-β₁: 0.11 ng/ml, TGF-β₂: not detectable) among colostrums examined.

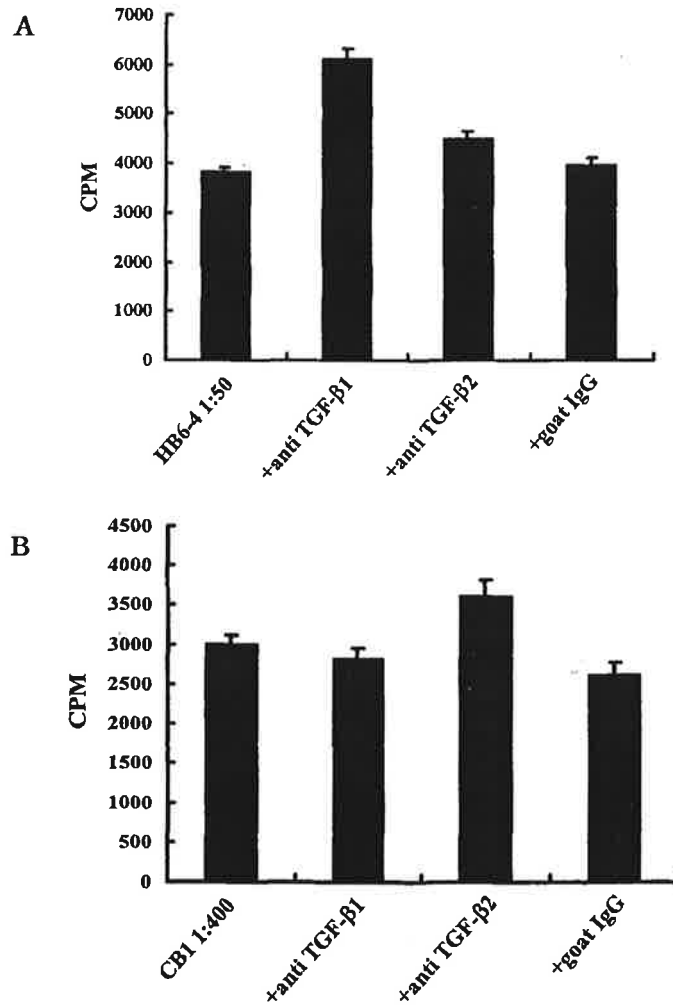


Figure 7. Effect of anti-TGF- β antibody on the proliferation inhibition by bovine and human colostrum. To determine whether the inhibition effect of MV1LU cells is due to the TGF- β contained in colostrums, bovine (A) and human (B) colostrum samples were incubated with anti-TGF- β_1 antibody and anti-TGF- β_2 antibody before addition to MV1LU cells. goat IgG antibody was used as negative control.

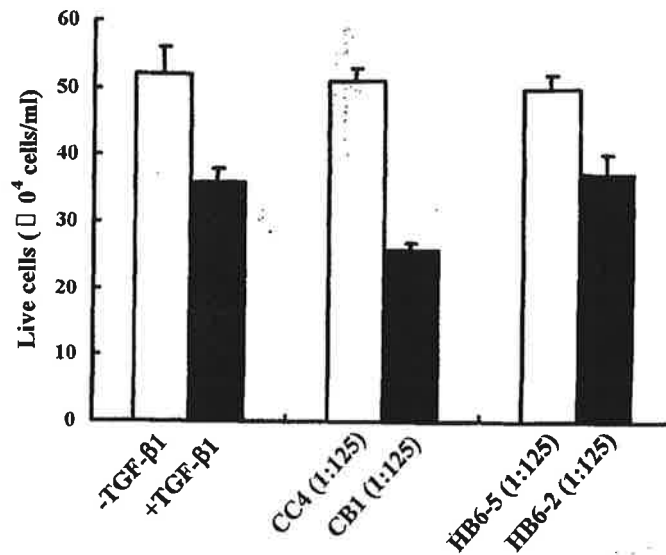


Figure 8. Viable cells at 4th day after culture with TGF- β_1 and colostrum samples. 0.2 ng/ml of porcine TGF- β_1 was used as positive control and media was added as negative control. CB1 (TGF- β_1 : 67.20 ng/ml, TGF- β_2 : 574 mg/ml) and CC4 (TGF- β_1 : 0.11 ng/ml, TGF- β_2 : not detectable) present the bovine colostrum samples which contains the greatest and the smallest samples, respectively. Whereas HB6-2 (TGF- β_1 : 810.89 ng/ml, TGF- β_2 : 63.77 ng/ml), and HB 6-5 (TGF- β_1 : 9.66 ng/ml, TGF- β_2 : 30.52 ng/ml) present the human colostrum samples which contains the greatest and the smallest samples, respectively. All of colostrum samples were 1:125 diluted before added to spleen cells.

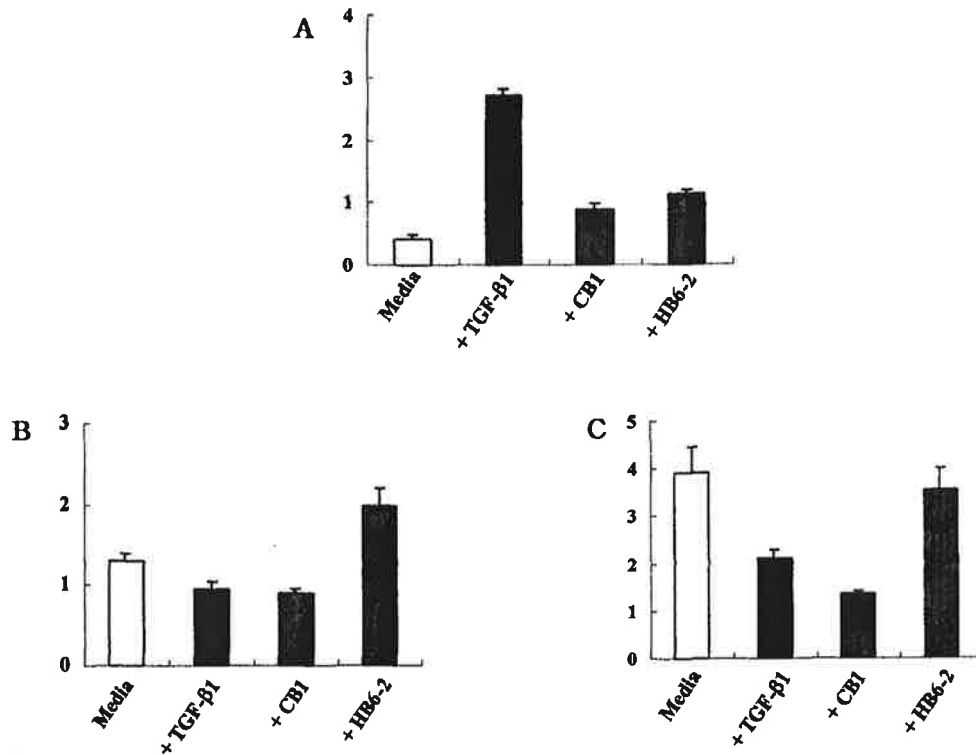


Figure 9. Measurement of immunoglobulin secretion by LPS-stimulated normal mouse spleen cells. 2 ng/ml of purified porcine TGF- β_1 was used as positive control, and samples were diluted in PBS before added. Spleen cells were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C and supernatants were collected at day 8. Production of immunoglobulin was determined by isotype-specific ELISA. CBI is bovine colostrum (TGF- β_1 , 67.20 ng/ml; TGF- β_2 , 574 mg/ml) and used after 1:10³ dilution. HB6-2 is human colostrum (TGF- β_1 , 810.89 ng/ml; TGF- β_2 , 63.77 ng/ml) and used after 1:10² dilution. (A), (B) and (C) are IgA, IgM and IgG₁ secretion, respectively.

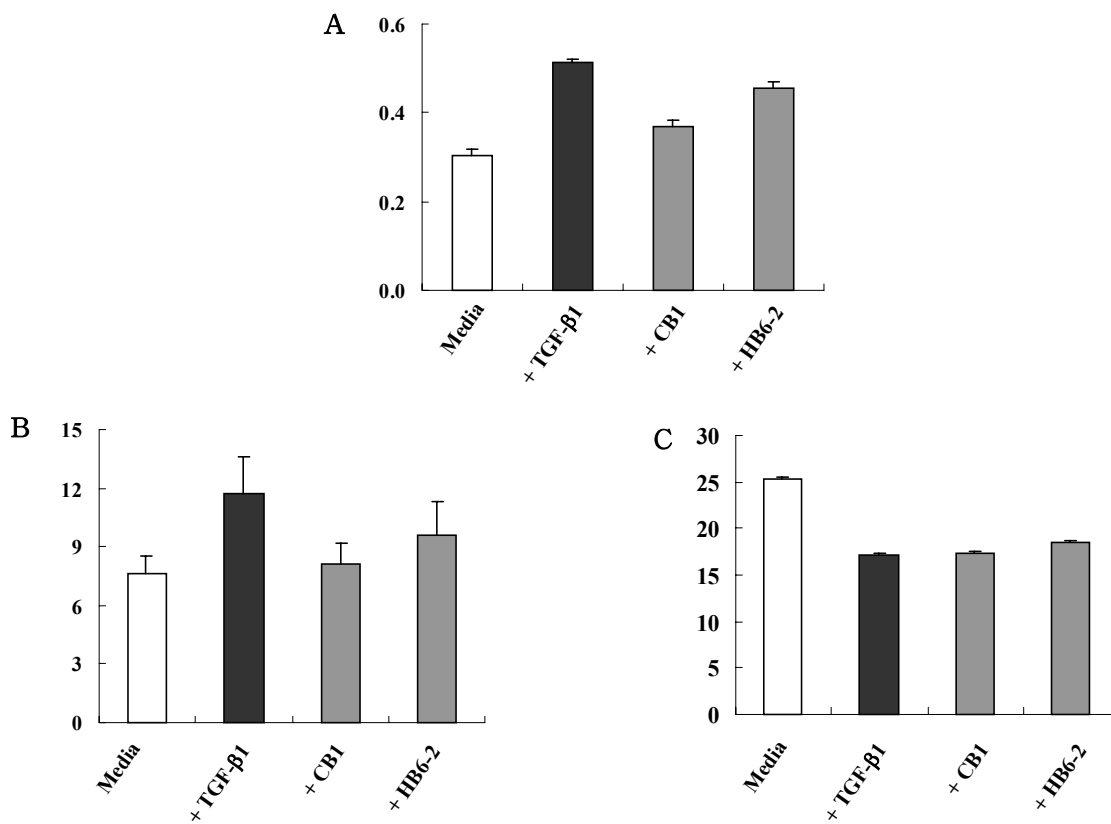


Figure 10. Measurement of immunoglobulin secretion by LPS-stimulated normal mouse mesenteric lymph node cells. 2 ng/ml of purified porcine TGF- β ₁ was used as positive control, and samples were diluted in PBS before added. MLN cells were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C and supernatants were collected at day 8. Production of immunoglobulin was determined by isotype-specific ELISA. CB1 is bovine colostrum (TGF- β ₁, 67.20 ng/ml; TGF- β ₂, 574 mg/ml) and HB6-2 is human colostrum (TGF- β ₁, 810.89 ng/ml; TGF- β ₂, 63.77 ng/ml). All of the colostrum samples were used after 1:105 dilution. (A), (B) and (C) are IgA, IgM and IgG1 secretion, respectively.

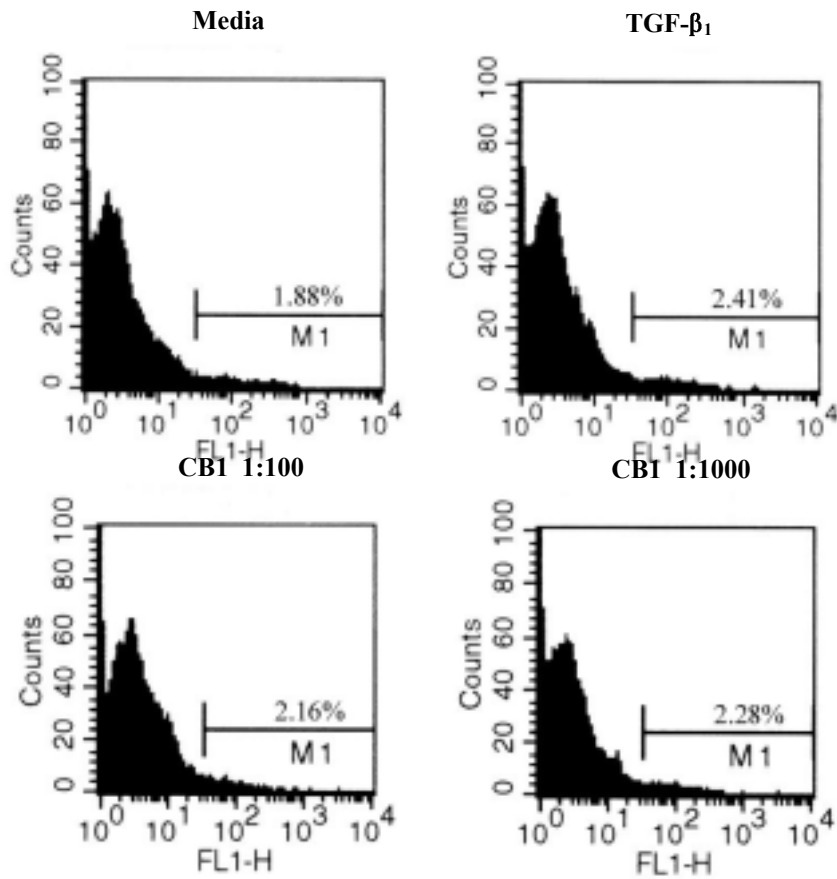


Figure 11. Effect of bovine colostrum on the surface IgA expression by mouse spleen cells. Normal mouse spleen cells were activated with LPS (12.5 mg/ml), or with various concentrations of bovine colostrum samples. porcine TGF-β₁ (1 ng/ml) was used as positive control. Cells were then incubated for 3 days. Cells were stained with FITC-labeled anti-mouse IgA antibody and cytofluorometric analysis was carried out using FACScan.

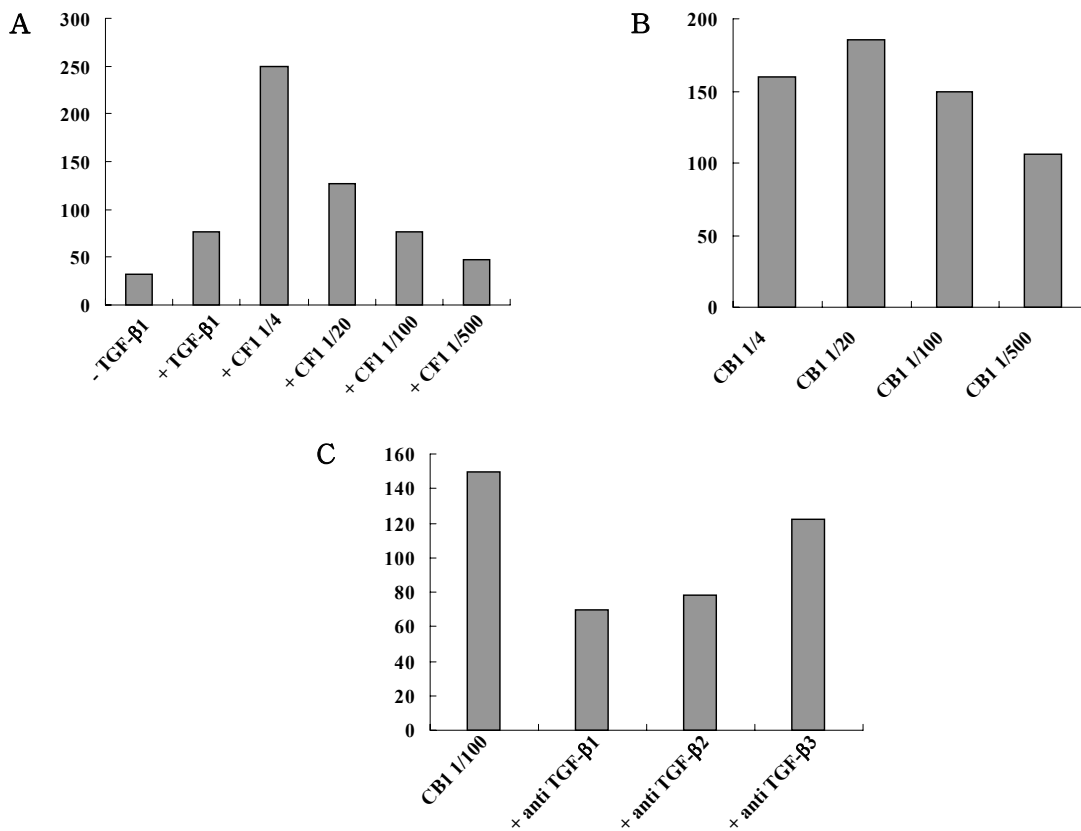


Figure 12. Effect of bovine colostrums on the germline Ca reporter activity. Reporter plasmid contained Ca-130/+14 DNA was transfected into A20.3 cells. After transfection, A20.3 cells were cultured with 2 ng/ml of human TGF- β ₁ as positive control or with various concentrations of bovine colostrums. (A) CF1 presents the bovine colostrum which contains the greatest amount of TGF- β ₁ (TGF- β ₁, 121.6 ng/ml; TGF- β ₂, 102 mg/ml); (B) CB1 presents the bovine colostrum which contains the greatest amount of TGF- β ₂ (TGF- β ₁, 67.20 ng/ml; TGF- β ₂, 574 mg/ml); (C) To determine whether the effect of the bovine colostrum on the Ca promoter activity is due to the TGF- β , bovine colostrums were incubated with 1 μ g/ml of anti-TGF- β ₁, 0.2 mg/ml of anti-TGF- β ₂, or anti-TGF- β ₃ antibodies before addition to cultures. Luciferase activity was measured following 16 hour incubation.

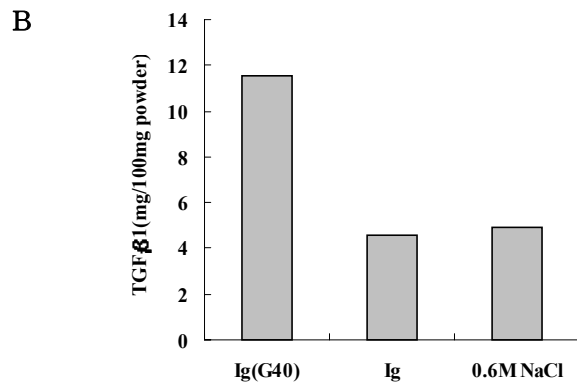
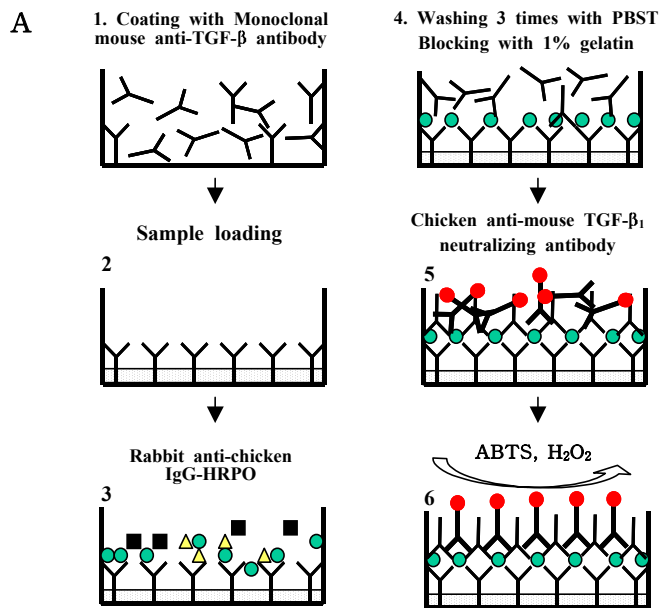


Figure 13. Detection of TGF- β_1 from bovine colostrum by ELISA.

A) TGF- β_1 ELISA used in this study. B) Purified TGF- β sample from bovine colostrum by gel filtration.

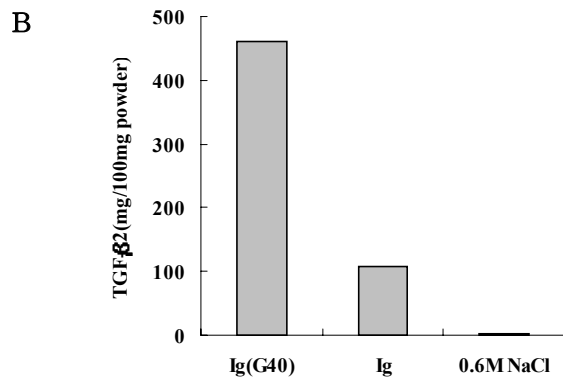
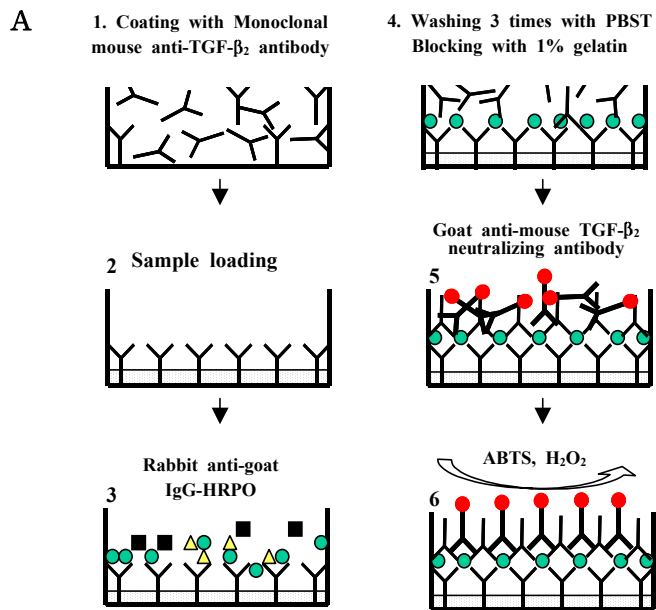


Figure 14. Detection of purified TGF- β_2 from bovine colostrum by ELISA.

A) TGF- β_2 ELISA used in this study. B) Purified TGF- β sample from bovine colostrum by gel filtration.

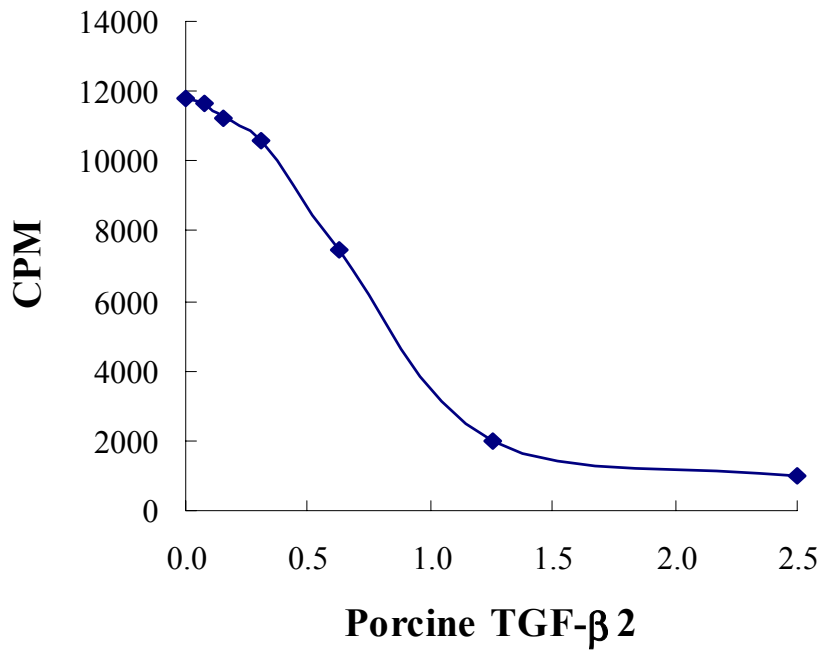


Figure 15. TGF-β₂ inhibits the proliferation of MV1LU cells. Purified porcine TGF-β₂ were diluted by 2 folds from 2.5 ng/ml and used as positive control.

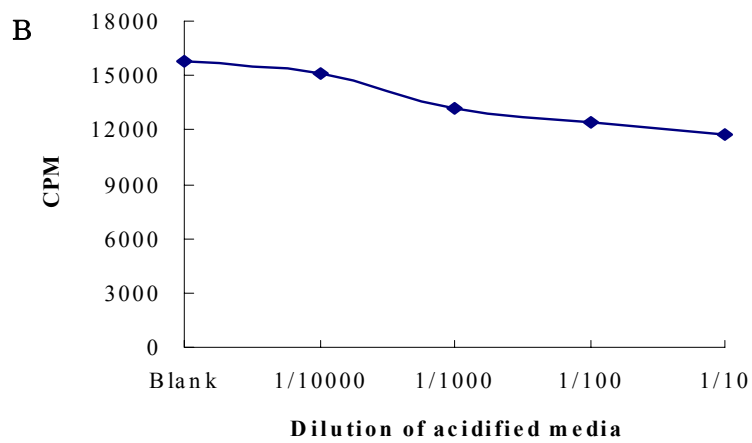
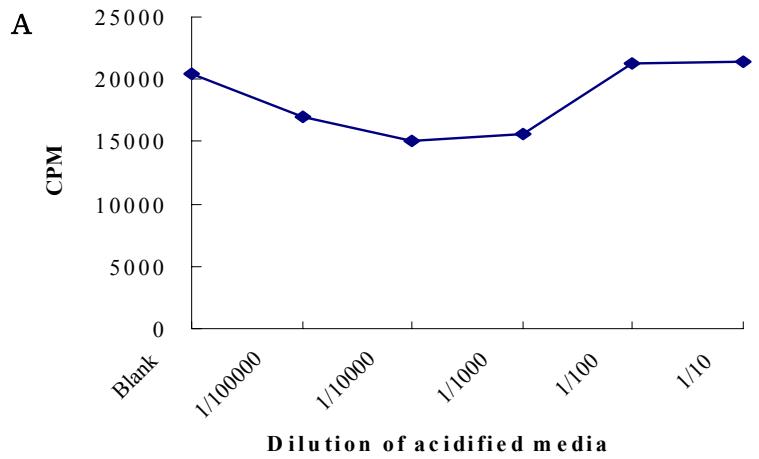


Figure 16. Acidified RPMI medium have no significant effect on the proliferation of MV1LU cells. A and B are data from two independent experiments.

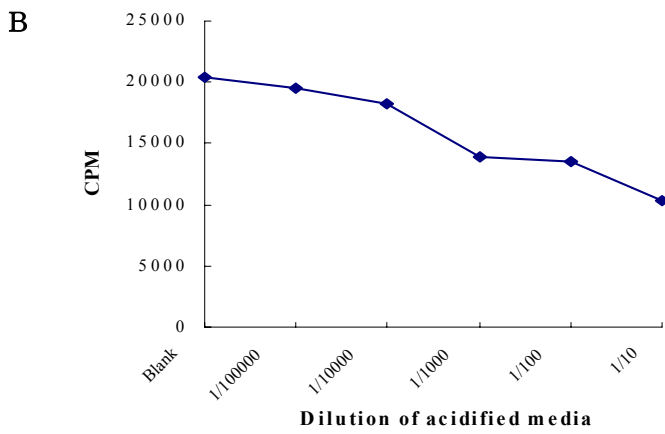
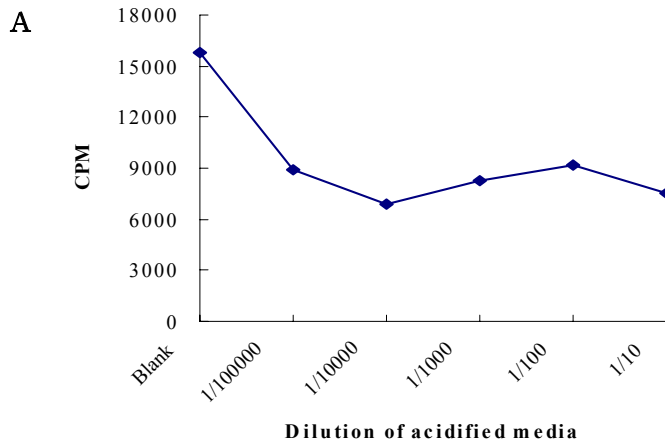


Figure 17. Effect of bovine colostrum gelfiltration sample (Ig-G40) on proliferation of MV1LU cells. A and B are data from three independent experiments.

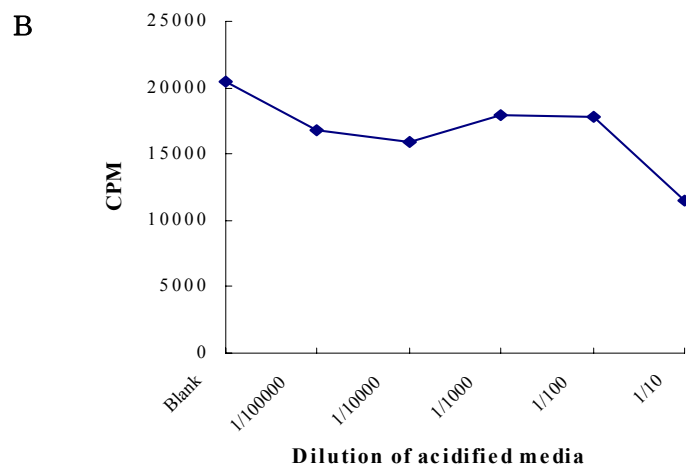
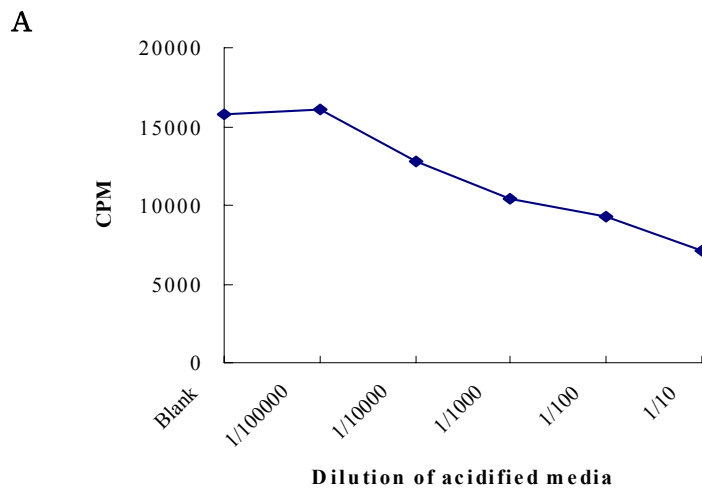


Figure 18. Effect of Ig-G40 on the proliferation of MV1LU cells after acidification. A and B are data from two independent experiments.

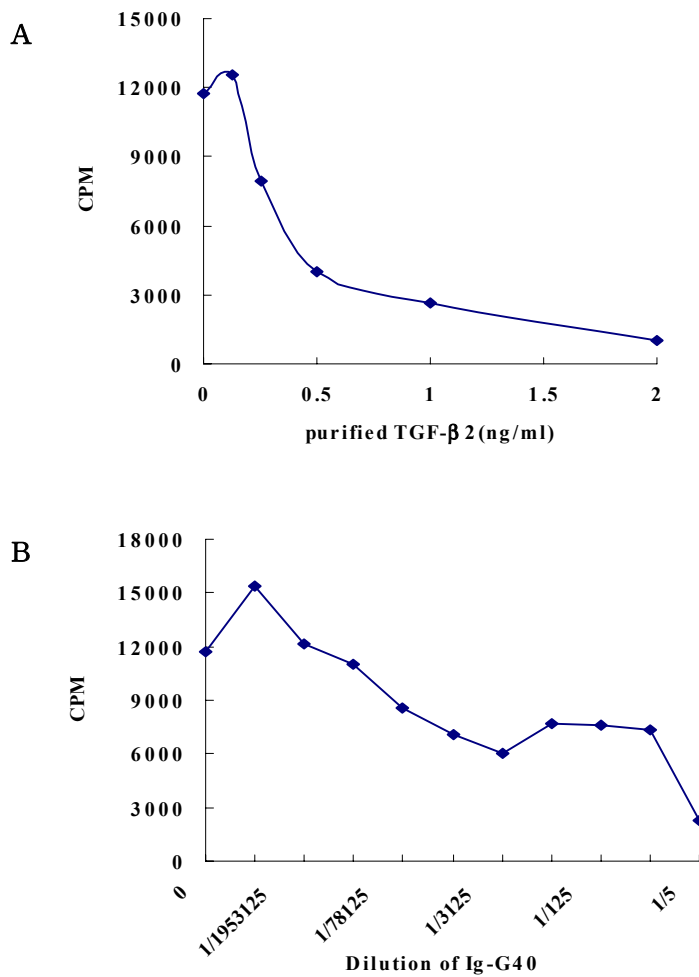


Figure 19. Bioassay of TGF- β contained in bovine colostrum sample. A) Purchased TGF- β ₂ inhibits the proliferation of MV1LU cells (positive control). B) Effect of Ig-G40 on the proliferation of MV1LU cells. Ig-G40 was dissolved in PBS to 100 mg/ml. Ig-G40 was further diluted with DMEM by 5 fold and added to MV1LU cells.

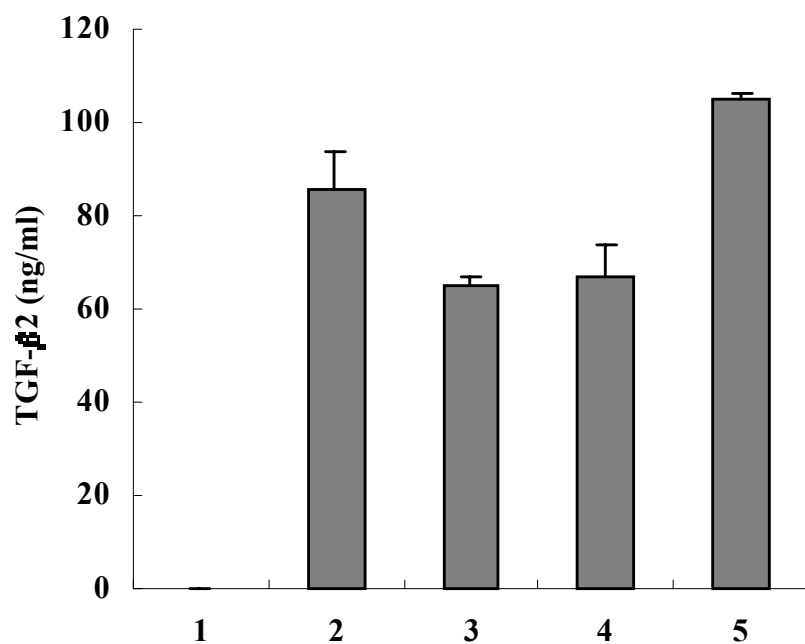


Figure 20. Detection of TGF-β₂ remained in Ig-G40 samples following various treatments. 1) Pasteurized milk purchased from market with no treatment. 2) Ig-G40 was added to pasteurized milk with no treatment. 3) Ig-G40 was added to pasteurized milk and fat/casein was removed as described in Materials and Methods. 4) Ig-G40 was added to pasteurized milk which had been treated to remove fat/casein. 5) Ig-G40 was diluted to PBS. All samples adjusted to contain equal amounts of TGF-β₂ based on calculation using ELISA.

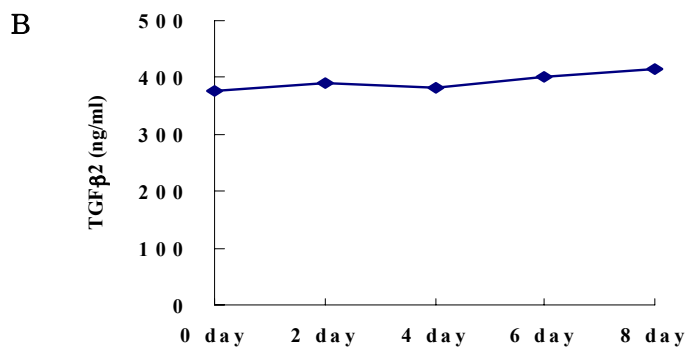
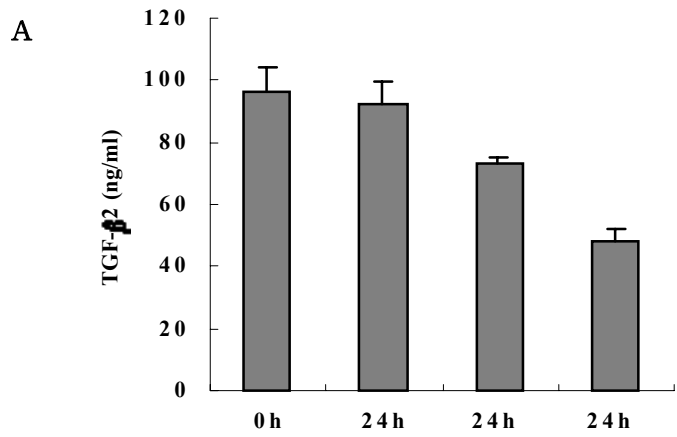


Figure 21. Temperature stability of TGF-β₂ retained in Ig-G40. A) Ig-G40 was added to pasteurized milk, and was kept at 4°C, 20°C and 37°C for 24 hours and TGF-β₂ retained in the samples were detected by ELISA. B) Stability of TGF-β₂ with time. Samples were kept at 4°C for 8 days and collected every 2 days.

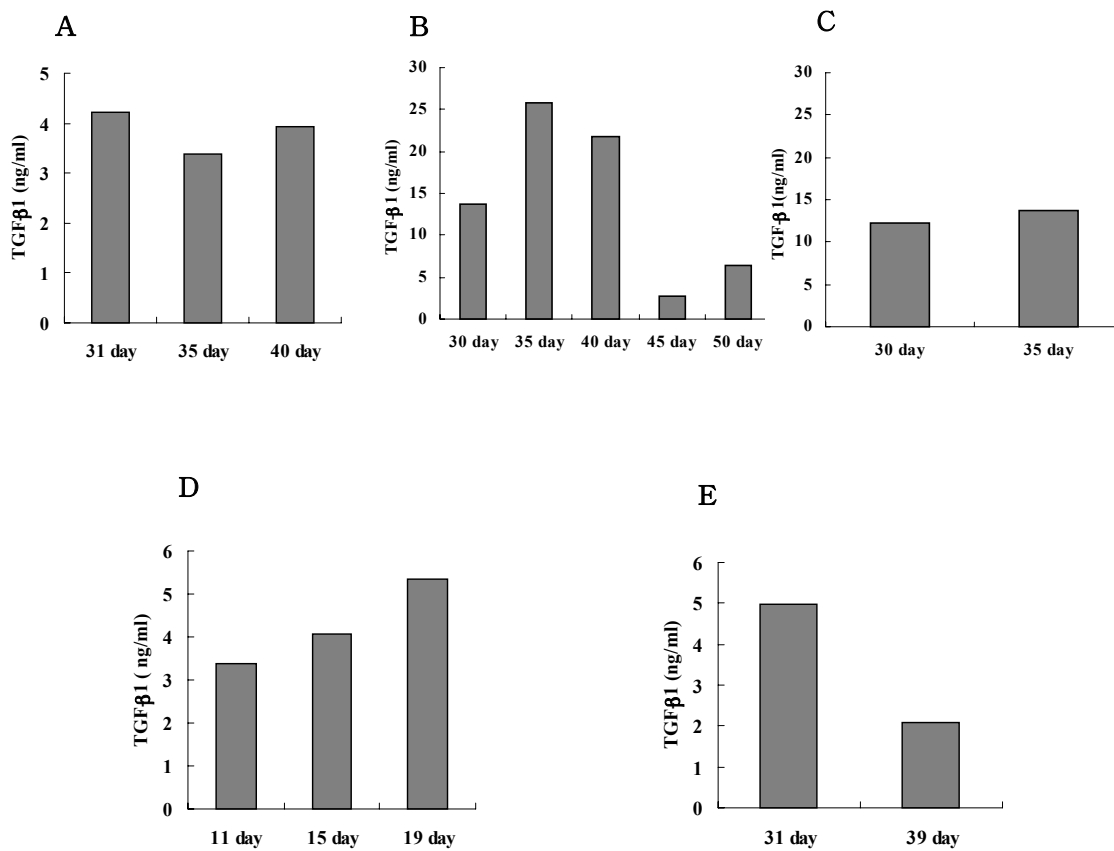


Figure 22. Measurement of TGF-β₁ retained in human faecal specimens collected from bottle-fed and breast-fed infants. A) ~ C), Faecal specimens obtained from breast-fed infants after one month of birth. D) and E), Faecal specimens obtained from bottle-fed infants after ten days and one month of birth, respectively.

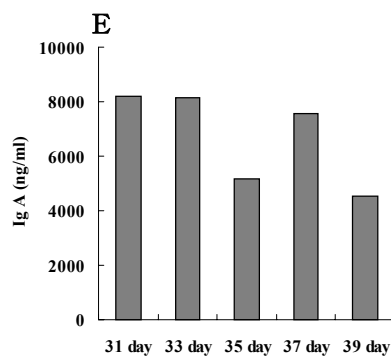
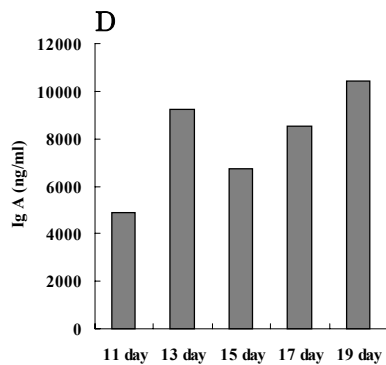
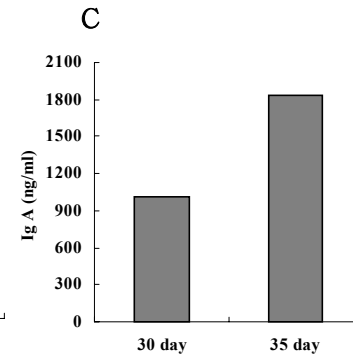
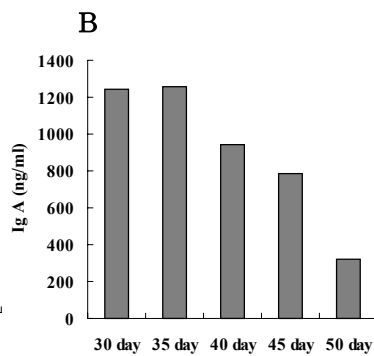
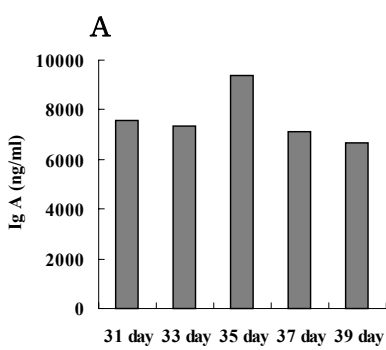
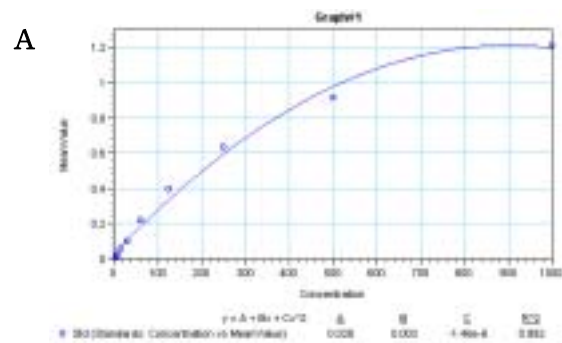


Figure 23. Measurement of IgA in human faecal specimens collected from bottle-fed and breast-fed infants. A) Standard curve of human IgA ELISA. Purified human IgA was diluted by two fold from 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. B), C) and D), Faecal specimens from breast-fed infants after one month of birth. E) and F), Faecal specimens from bottle-fed infants.

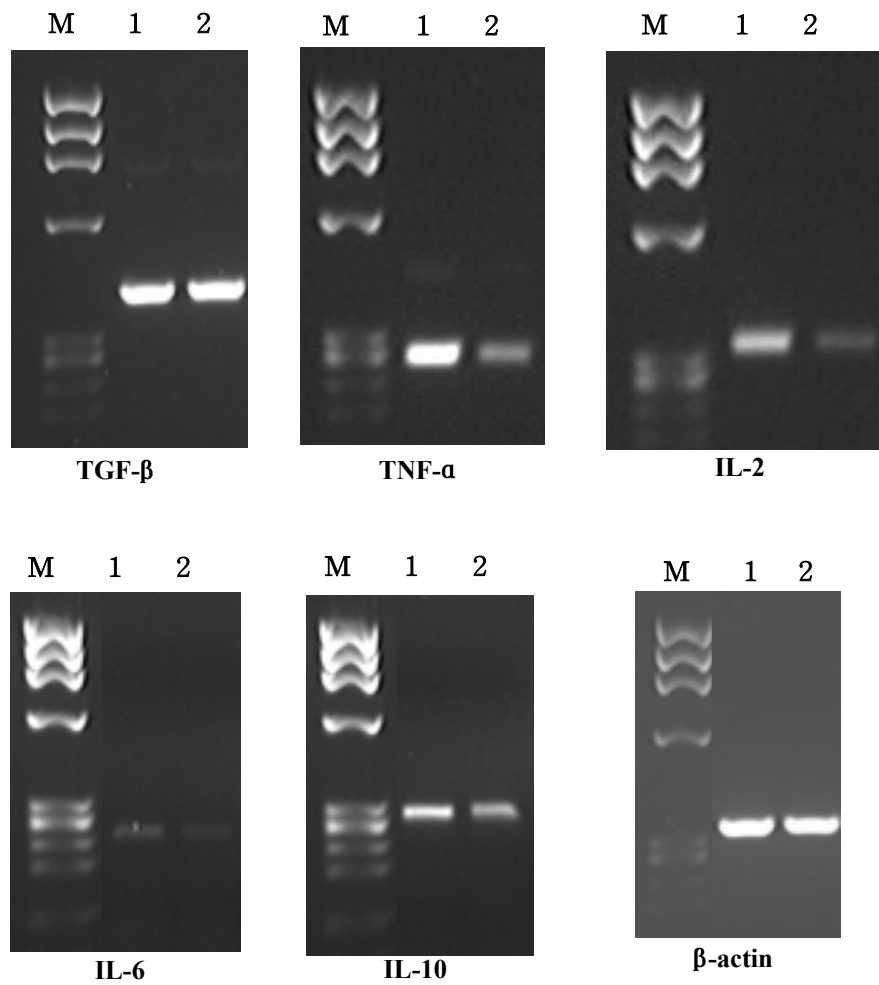


Figure 24. Effect of Ig-G40 on various cytokine transcriptional levels in EL-4 T cell line. EL-4 cells were stimulated by Ig-G40. After 24 hours culture, cells were harvested and total RNA was extracted by using RNAwiz. After reverse transcription, cDNA was amplified by PCR using cytokine specific primers as described in Materials and Methods. M, marker; lane1, media condition; lane2, stimulated by Ig-G40.

2. 제 2 세부과제

1) 초유에서 TGF- β_1 의 함량

강원대학교 목장에서 송아지 분만 후 1일째 아침과 저녁, 2일째 아침과 저녁, 3일째 아침과 저녁, 4일째 아침과 저녁에 각각 초유를 수집하여 TGF- β_1 의 함량을 sandwich ELISA 방법으로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 분만 후 1일째 아침은 약 150 $\mu\text{g/ml}$, 저녁은 약 90 $\mu\text{g/ml}$ 함유하고 있었고 2일째 아침은 약 115 $\mu\text{g/ml}$, 저녁은 95 $\mu\text{g/ml}$ 함유하고 있었다. 분만 후 3일째, 4일째는 TGF- β_1 의 함량이 급격히 떨어져서 약 40-50 $\mu\text{g/ml}$ 정도 함유하고 있음을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서 사용하는 초유는 TGF- β_1 의 함량을 가장 많이 함유하고 있는 1일째와 2일째 초유를 이용하였다.

2) Sephadex G-75 Gel filtration과 전기영동

유청을 투석하여 동결건조한 유청단백질 100 mg을 Sephadex 75 gel filtration column 에 주입하고 1차 gel filtration을 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서 나타난 것과 같이 좁고 길게 나타난 첫 번째 peak와 넓고 낮게 나타난 2번째, 3번째 peak 그리고 넓고 완만한 곡선으로 나타난 peak가 있다. 이러한 peak들에서 흡광도가 높고 낮은 분획을 취해서 TGF- β_1 의 함량을 측정된 결과를 Fig. 2에서 보면 90번 fraction이 가장 높은 3,600 pg/ml 이었고 전체적으로 볼 때 82-98번 분획이 가장 높게 나타났다. Fig. 3의 전기영동을 수행하여 silver stain 한 결과를 보면 첫 번째 peak 즉 lane 4와 5의 46번과 50번 분획은 분자량이 큰 lactoferrin과 serum albumin의 밴드가 보이고 lane 7의 72번 분획은 β -lactoglobulin의 밴드가 보이고 lane 8의 98번 fraction은 분자량 약 25 kD의 TGF- β_1 로 추정되는 밴드와 β -lactoglobulin, α -lactalbumin 밴드를 볼 수 있다. Silver stain 결과에서 보는 바와 같이 TGF- β_1 으로 추정되는 밴드는 β -lactoglobulin이나 α -lactalbumin 밴드에 비해 상당히 약하게 나타남을 알 수 있었다.

3) Rechromatography 와 전기영동

Fig. 2의 결과 TGF- β_1 이 들어있는 분획 즉, 44-62번과 82-114번 분획들을 모아서 gel filtration rechromatography와 전기영동을 수행한 결과는 Fig. 4와 5에 나타나 있다. Fig. 4에서 보는바와 같이 흡광도가 높고 좁은 첫 번째 peak와 흡광도가 낮고 완만한 곡선의 넓은 peak를 보이고 있다. Fig. 5는 전기영동을 수행하여 silver stain 한 결과로 첫 번째 peak

에 해당하는 lane 2와 3의 40번 fraction과 44번 분획은 serum albumin의 밴드를 보이고 lane 7, 8, 9의 82번, 88번, 98번 분획은 TGF- β_1 의 밴드를 각각 보이고 있다. 특히 98번 분획은 ml당 약 4,700 pg의 TGF- β_1 이 들어 있음을 확인하였다.

4) Ion-exchange chromatography

Rechromatography 한 82-102번 분획을 모아서 동결건조한 300 mg의 단백질을 sodium phosphate buffer에 용해하여 음이온 교환수지인 QAE-Sephadex 50-120 column에 흡착시켜 용출한 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 그림에서와 같이 4개의 큰 peak와 하나의 작은 peak로 나타내고 있는데 이 peak들을 TGF- β_1 함량을 측정 한 결과 242번 분획이 TGF- β_1 을 2,291 pg/ml 정도로 가장 많이 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 이 peak들을 silver stain하여 밴드를 확인하기 위해서 각 peak에서 300 μ l씩 취해서 speed vac으로 건조시킨 다음 silver stain 한 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 분획 88, 108, 124, 134, 140, 150 번은 β -lactoglobulin, serum albumin, β -lactoglobulin, β -lactoglobulin, α -lactalbumin의 밴드가 확인되었고 242번 분획은 단일밴드의 TGF- β_1 유사 단백질을 확인하였다.

5) 정제된 TGF- β_1 의 확인

TGF- β_1 유사단백질인 242번 분획을 표준 TGF- β_1 (R&D Systems, Inc. USA)과 비교하여 확인하기 위해서 silver stain 한 결과는 Fig. 8에 나타난 바와 같다. Lane 2는 표준 TGF- β_1 (밴드가 끌려서 상태가 좋지 않음)이고 lane 3는 TGF- β_1 유사단백질로 이 단백질을 비교하여 보면 분자량이 거의 비슷한 25kD로 나타났다. 이러한 결과를 볼 때 ion-exchange chromatography를 해서 용출된 단일밴드가 TGF- β_1 임을 확인하였다.

위 연구결과를 종합하여보면 Bovine colostrum를 학교목장에서 수집하여 냉동 보관하면서 실험을 수행했고 샘플준비는 casein과 whey를 분리하는 전처리 과정을 수행했다. TGF- β_1 고함유 초유의 정량은 ELISA 방법을 통해서 결정했는데 분만후 48시간 이내의 초유가 TGF- β_1 고함유 초유로 확인되었다. TGF- β_1 의 함유 분획 조건을 결정하기 위해서 gel filtration과 ion-exchange chromatography을 수행했다. Gel filtration결과 tube 당 분획량은 2ml이 적당하고 시간당 분획량은 10 ml가 적당한 것으로 확인되었다. 분획된 샘플에서 가장 높은 TGF- β_1 의 함량은 4,744 pg/ml으로 확인되고 아울러 전기영동 결과에서도 TGF- β_1 의

밴드가 확인되었다. 또한 음이온 교환수지인 Q-Sephadex column을 이용하여 ion-exchange chromatography를 수행하여 나타난 결과는 TGF- β 1임을 확인하였다. 정제하는 과정에서 TGF- β 1 양이 미량이어서 정제에 많은 시간과 노력이 필요한데 정제의 효율성을 증대시키기 위해서 column을 바꾸어 실험을 해 볼 필요가 있다고 사료된다.

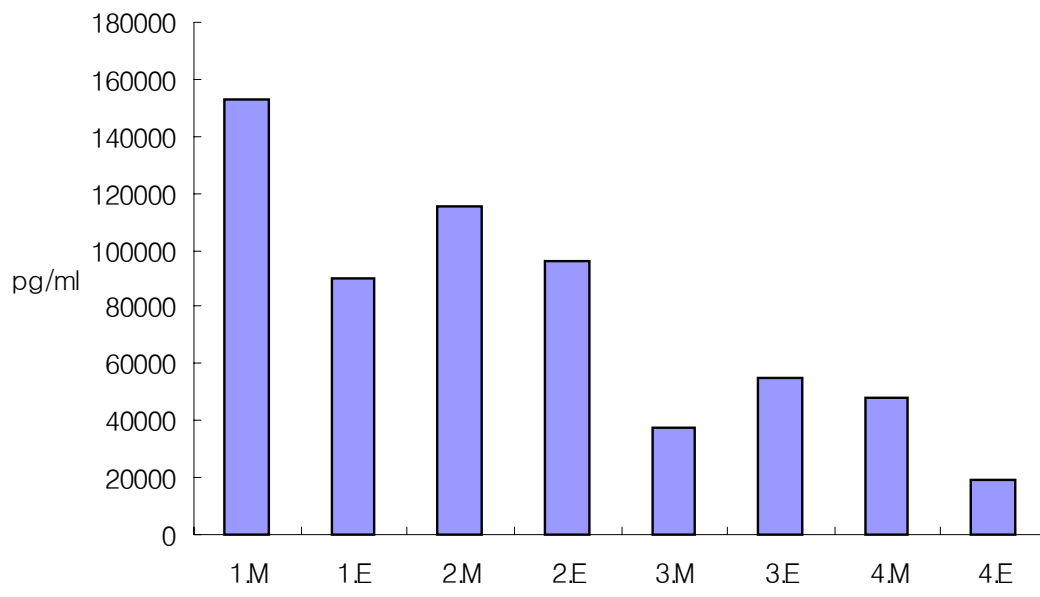


Figure 1. TGF-β₁ contents of bovine colostrum whey within 1st day, 2nd day, 3rd day and 4th day after parturition. TGF-β₁ assay was carried out by sandwich ELISA method. M: morning; E: evening

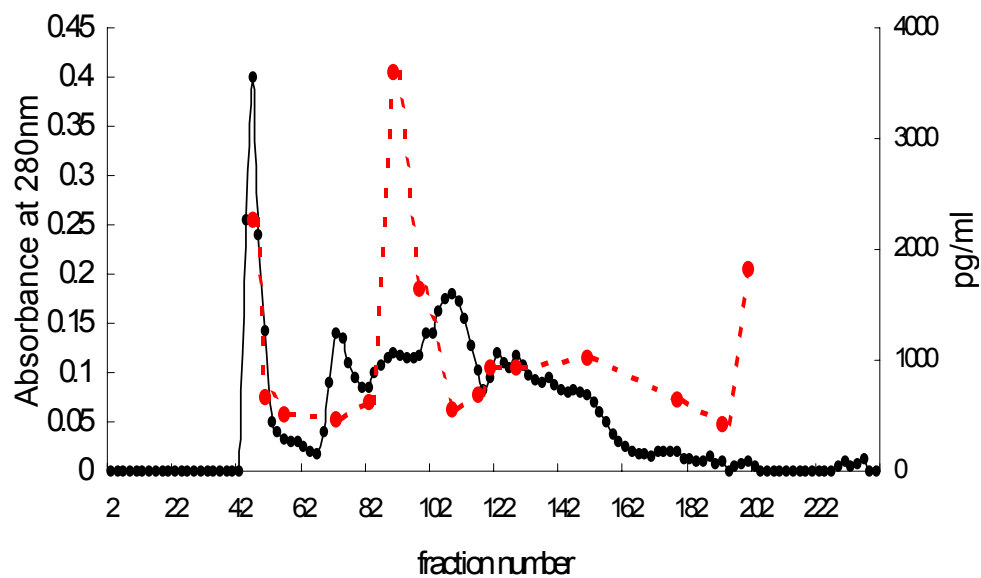


Figure 2. Gel filtration chromatography of the bovine colostrum whey on Sephad-ex G-75 column. The bovine colostrum whey(100 mg protein) was applied to a column(2.5×100 mm). The column was eluted with PBS at the flow rate of 10 ml/hr. Fraction volume was 2 ml/tube and was assayed for TGF-β₁ concentration by ELISA.

1. Absorbance at 280 nm (—),
2. TGF-β₁ content (---)

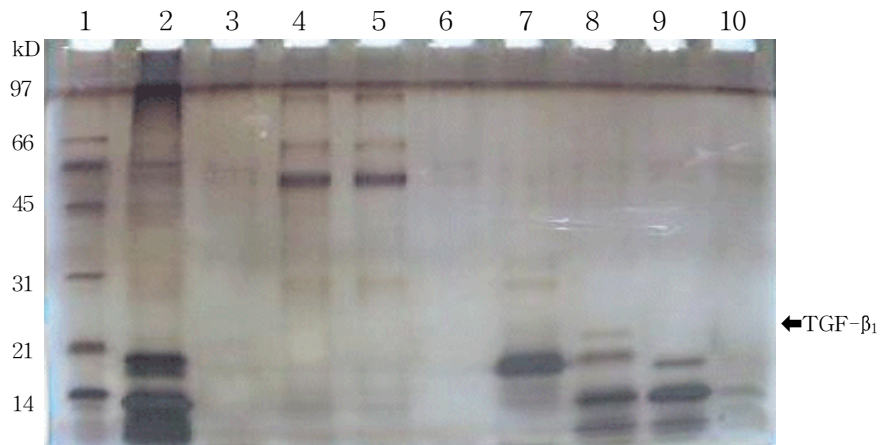


Figure 3. Silver-stained SDS-PAGE of the gel filtration chromatography. Protein was separated in 12.5% polyacrylamide gel.

lane 1 : Standard molecular weight marker

lane 5 : 50

lane 8 : 98

lane 2 : whey

lane 6 : 56

lane 9 : 108

lane 3 : Fraction No.40

lane 7 : 72

lane 10 : 122

lane 4 : 46

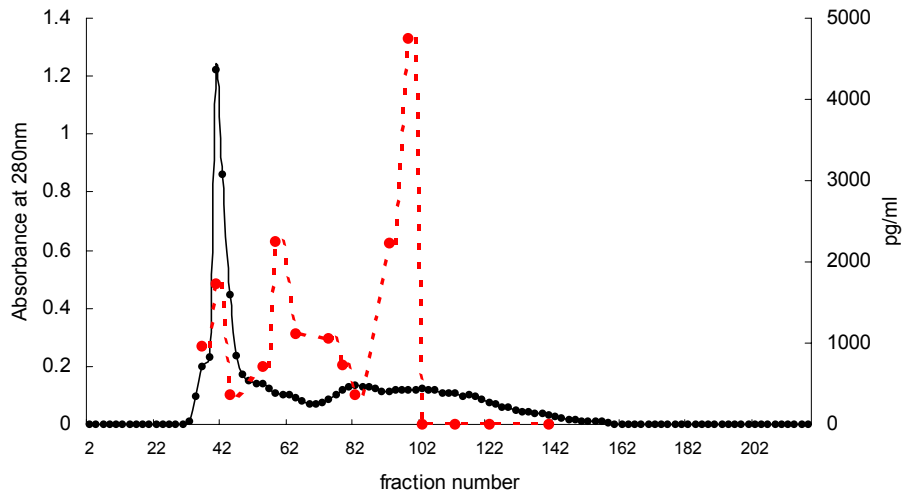


Figure 4. Rechromatography of the TGF- β_1 pooled fractions on Sephadex G-75 column. The pooled fraction (80 mg protein) were applied to a column (2.5 \times 100 mm). The column was eluted with PBS at the flow rate of 10 ml/hr. Fraction volume was 2 ml/tube and was assayed for TGF- β_1 concentration by ELISA.

1. Absorbance at 280 nm (—)
2. TGF- β_1 content (---)

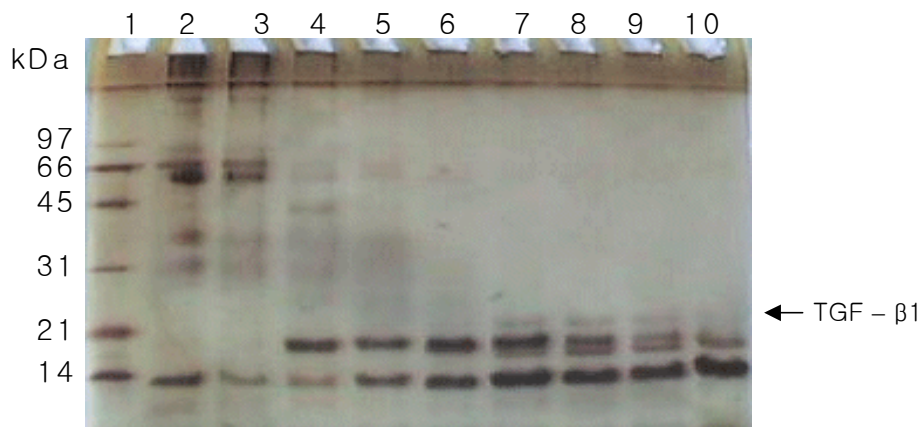


Figure 5. Silver-stained SDS-PAGE of the TGF- β_1 pooled fractions. Protein was separated in 12.5% polyacrylamide gel.

lane 1 : standard molecular weight marker	lane 5 : 60	lane 8 : 88
lane 2 : fraction No. 40	lane 6 : 74	lane 9 : 92
lane 3 : 44	lane 7 : 82	lane 10 : 102
lane 4 : 58		

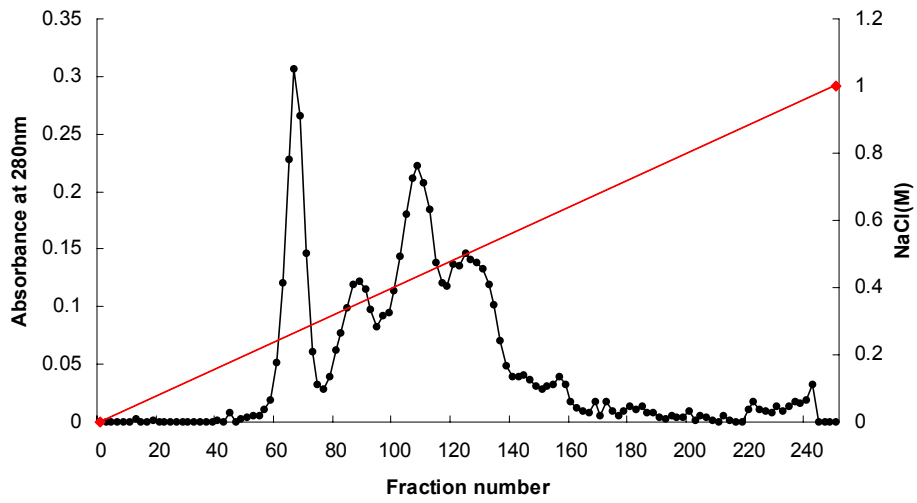


Figure 6. QAE-Sephadex 50-120 ion-exchange chromatography profile of whey protein. The column was eluted with a linear gradient of 0-1.0M NaCl in 0.1mM sodium phosphate buffer at a flow rate of 20 ml/hr. Fraction were collected, and was assayed for TGF- β_1 concentration by ELISA.

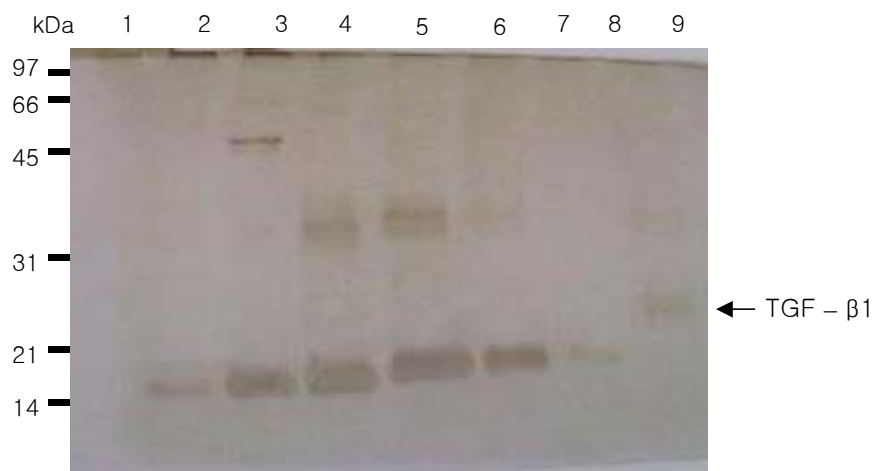


Figure 7. Silver-stained SDS-PAGE under non-reducing condition of the ion-exchange chromatography.

lane 1 : Standard molecular weight marker

lane 2 : fraction No. 66

lane 3 : 88

lane 4 : 108

lane 5 : 124

lane 6 : 134

lane 7 : 140

lane 8 : 150

lane 9 : 242

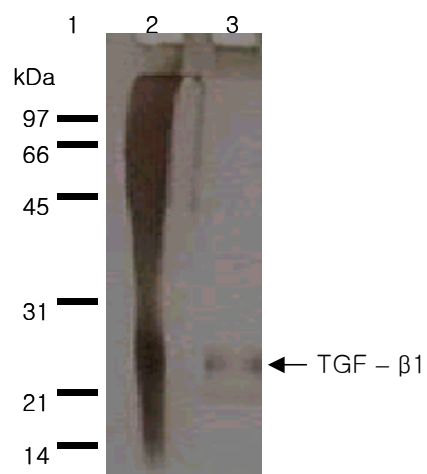


Figure 8. Silver-stained SDS-PAGE under non-reducing condition of the standard TGF- β_1 and purified TGF- β_1 .

lane 1 : standard molecular weight marker

lane 2 : standard TGF- β_1

lane 3 : purified TGF- β_1

6) Sephadex G-50 gel filtration과 전기영동

TGF- β_1 의 정제 효율성을 증대시키기 위해서 이미 실험해온 whole whey protein을 column을 바꾸어 실험을 수행했다. 동결건조한 whole whey protein 50 mg을 Sephadex G-50 gel filtration column 에 주입하고 gel filtration을 수행한 결과는 Fig. 9과 같다. 그림에서 나타난 것과 같이 좁고 높게 나타난 첫 번째 peak와 넓고 낮게 나타난 2번째 peak가 있다. 이러한 peak들에서 흡광도가 높고 낮은 분획을 취해서 TGF- β 의 함량을 측정한 결과는 Fig. 9의 막대그래프에 나타난 바와 같다. 76번 분획이 가장 높은 34,000 pg/ml 이었고 전체적으로 볼 때 첫 번째 peak에서 높게 나타났다. Fig. 10은 각 분획을 전기영동하여 silver stain 한 결과로 첫 번째 peak 즉 68, 72, 76 분획은 immunoglobulin, lactoferrin, serum albumin, β -lactoglobulin의 band가 보이고 분자량 약 25 kD의 TGF- β 로 추정되는 band도 볼 수 있다. 84, 90, 94, 98, 104번 분획은 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin의 band가 주로 보였다. Silver stain 결과에서 보는 바와 같이 TGF- β 로 추정되는 band는 β -lactoglobulin이나 α -lactalbumin band에 비해 약하게 나타남을 알 수 있었다.

7) AF-Heparin chromatography

Gel filtration chromatography에서 TGF- β 가 많이 함유된 분획(64-78번 분획)을 회수하여 동결건조 시킨 다음 AF-Heparin column에 완전히 흡착시키고 OD 값이 0.00이 될 때까지 충분히 column을 세척한 후 1M acetic acid에 0.1M, 0.3M, 0.5M, 1.0M의 CH₃COONa를 함유하는 용액으로 stepwise gradient로 시간당 30 ml의 유속으로 용출한 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 그림에서와 같이 3개의 작은 peak와 하나의 큰 peak로 나타나고 있는데 이 peak들을 TGF- β_1 함량을 측정한 결과는 12번 분획이 TGF- β_1 을 6,900 pg/ml 정도로 가장 많이 함유하고 있는 것으로 확인되었고 0.3M CH₃COONa에서 용출되었다. 각각의 분획들을 silver stain을 위해서 시료를 적당량 취해서 speed vac으로 건조시킨 다음 silver stain 한 결과는 Fig. 12에 나타난 바와 같다. 12 분획은 TGF- β_1 의 band가 보이고 8, 20, 22, 23은 serum albumin과 β -lactoglobulin, 25, 26, 27 분획은 β -lactoglobulin과 serum albumin의 band가 확인되었다.

8) AF-Heparin rechromatography

AF-Heparin rechromatography를 수행한 결과는 Fig. 13에 나타난바와 같다. AF-Heparine chromatography로 분리 정제한 12번 분획을 AF-Heparine

rechromatography 하여 전기영동을 수행한 결과는 Fig. 14에 나타난 바와 같다. Fig. 14에서 보는 바와 같이 lane 15 번과 lane 16번은 약 25 kD의 단일 밴드인 TGF- β_1 이 나타남을 알 수 있었다.

9) RP-HPLC chromatography

Fig. 15는 HPLC chromatography를 수행한 결과이다. AF-Heparin chromatography로 정제한 TGF- β_1 분획을 0.1% TFA로 평형을 시킨 RP-HPLC C4 narrow bore column(Vydac 214TP52, 0.21×25cm, 5 μ m support)에 주입한 다음 0.1% TFA가 섞인 acetonitrile 0-70% linear gradient로 RP-HPLC를 수행하였다. 그림에 나타난 바와 같이 retention time 31분에서 높은 단일 peak가 보이는데 이 peak가 TGF- β_1 이다.

10) Western blot

Fig. 16은 RP-HPLC로 정제한 TGF- β 를 western blotting한 것으로 정제한 TGF- β 를 환원제로 환원시킨 후 전기영동하여 western blot를 수행하였다. Non-reducing form의 TGF- β_1 은 dimer 상태로 존재하고 reducing form은 monomer 상태로 변하기 때문에 이를 확인한 결과다. Dimer 형태로 존재하는 TGF- β 는 환원제에 의해 monomer 형태로 되어 약 13 kD의 밴드가 확인되었다.

11) 정제단계별 TGF- β_1 회수율

Table 1은 정제단계별 TGF- β_1 회수율을 나타낸 것이다. 286 ng의 TGF- β_1 이 함유된 50 mg의 whey protein을 gel filtration column에 흡착시켜 TGF- β_1 이 다량 함유되어 있는 분획들을 모아서 TGF- β_1 의 함량을 측정한 결과 회수율 49.6%인 142 ng이었다.

Gel filtration chromatography에서 TGF- β_1 이 다량 함유된 분획들을 모아서 AF-Heparin column에 흡착하여 TGF- β_1 을 정제하였다. AF-Heparin column chromatography를 수행하여 얻은 TGF- β_1 분획들을 모아서 TGF- β_1 의 함량을 측정한 결과 회수율 43.6%인 62 ng이었다. RP-HPLC chromatography에서는 TGF- β_1 의 회수율은 8.4%로 24 ng 이었다.

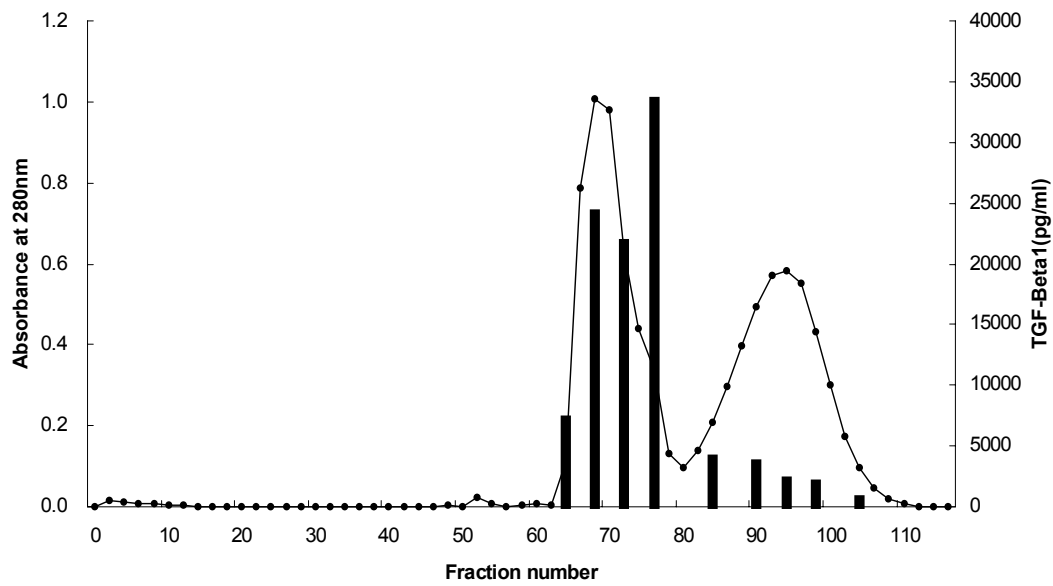


Figure 9. Gel filtration chromatography of the bovine whey protein on Sephadex G-50 in 1M-acetic acid. The bovine whey protein(50 mg) was applied to a column (2.5×1,000 mm) previously equilibrated with 1M-acetic acid. The column was eluted with 1M acetic acid at a flow rate of 16 ml/hr. Each fraction was 2.3 ml, of which 0.5 ml was assayed for transforming growth factor(TGF-β₁) concentration by ELISA.

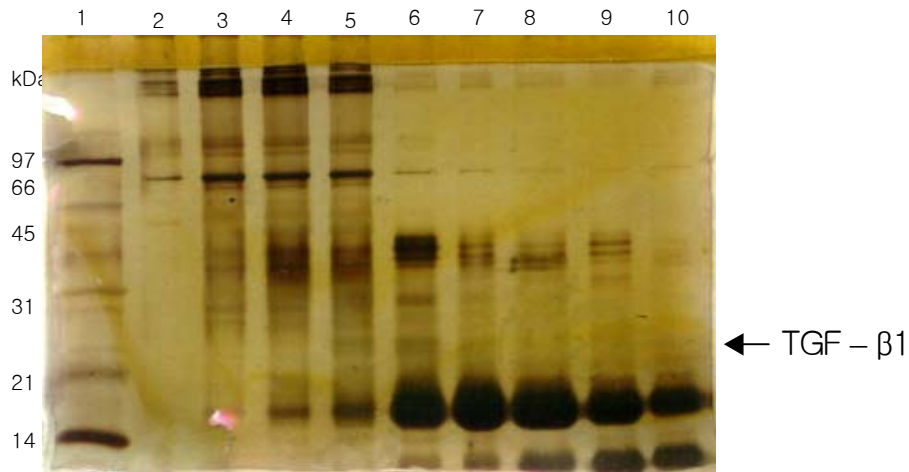


Figure 10. Silver-stained SDS-PAGE(12.5%) analysis of selected column fraction from Gel filtration chromatography.

lane 1. Standard molecular weight marker	lane 6. 84
lane 2. 64	lane 7. 90
lane 3. 68	lane 8. 94
lane 4. 72	lane 9. 98
lane 5. 76	lane 10. 104

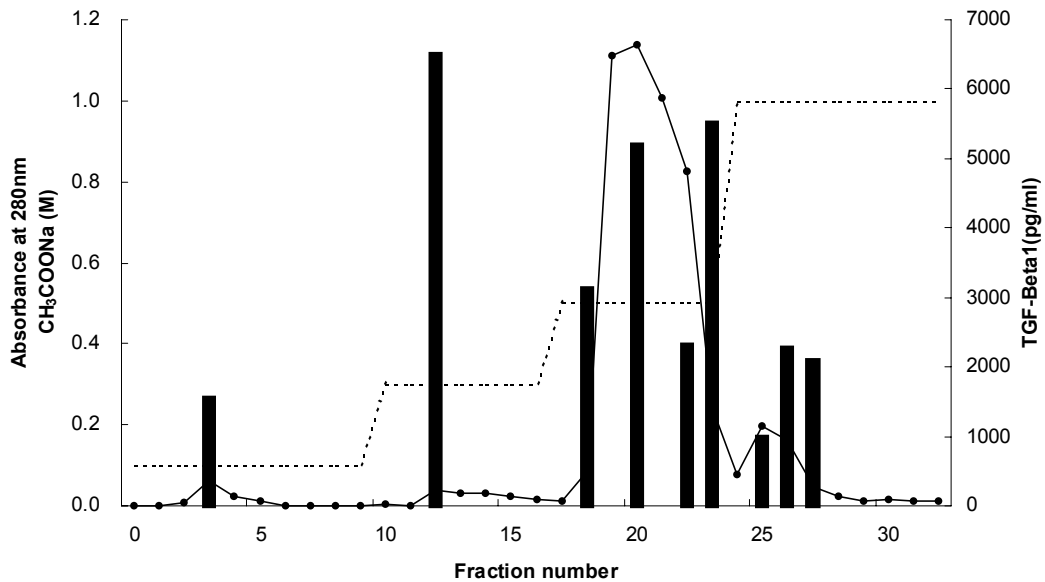


Figure 11. AF-heparin chromatography of eluant from gel filtration chromatography. Samples from Sephadex G-50 column were loaded into a AF-heparin column equilibrated with 1M-acetic acid. The column was eluted with a step gradient of 0.1M, 0.3M, 0.5M and 1.0M $\text{COOH}_3\text{Na}(\dots\dots)$ in 1M acetic acid at a flow rate of 40 ml/hr. Each fraction was 2.3 ml, of which 0.5 ml was assayed for transforming growth factor(TGF- β_1) concentration by ELISA.

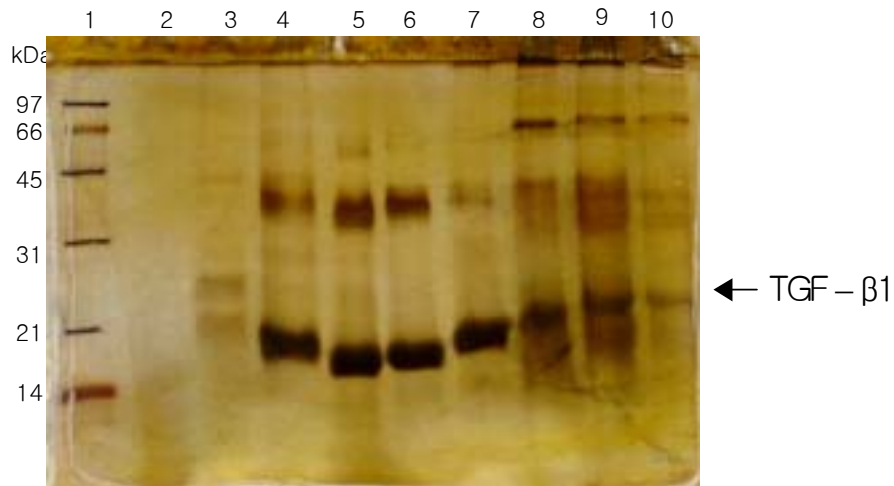


Figure 12. Silver-stained SDS-PAGE(12.5%) analysis of selected column fraction from AF-Heparin column chromatography.

lane 1. Standard marker	lane 6. 22
lane 2. 3	lane 7. 23
lane 3. 12	lane 8. 25
lane 4. 18	lane 9. 26
lane 5. 20	lane 10. 27

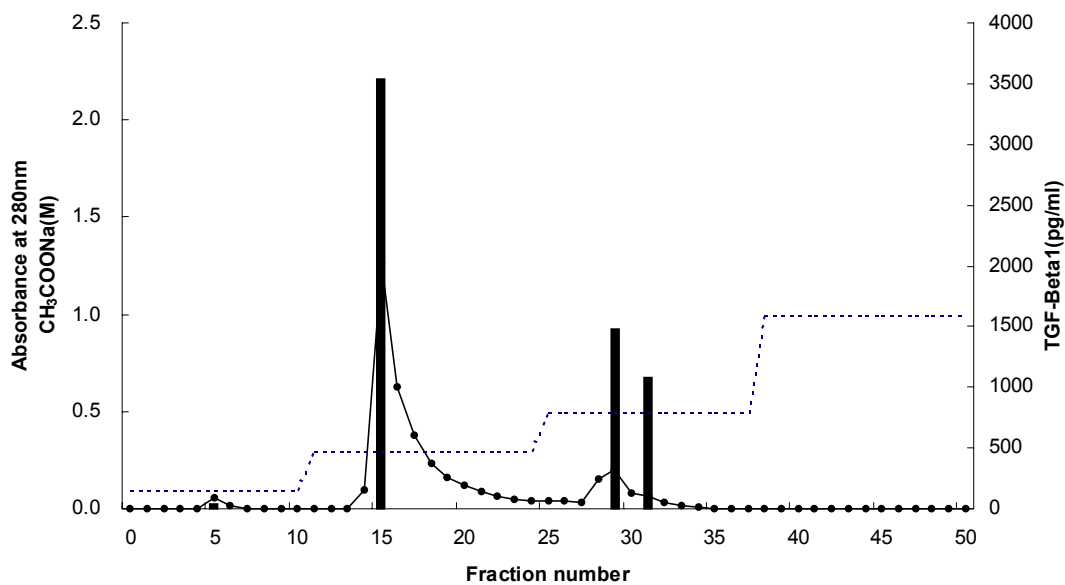


Figure 13. AF-Heparin rechromatography of eluant from AF-Heparin chromatography. Samples from AF-Heparin column were loaded into a AF-Heparin column equilibrated with 1M-acetic acid. The column was eluted with a step gradient of 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M and 1.0 M CH₃COONa(.....) in 1M acetic acid at a flow rate of 40 ml/hr. Each fraction was 2.3 ml, of which 0.5 ml was assayed for transforming growth factor(TGF-β₁) concentration by ELISA.

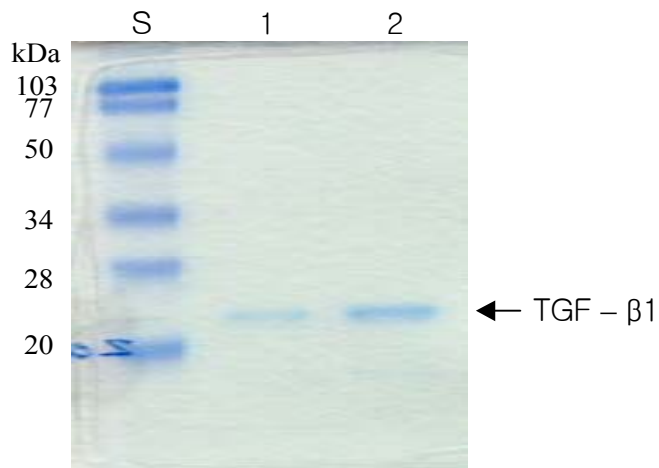


Figure 14. SDS-PAGE(12.5%) analysis of selected column fraction from AF-Heparin column chromatography.

S : standard molecular weight marker

1 : fraction no. 15

2 : fraction no. 16

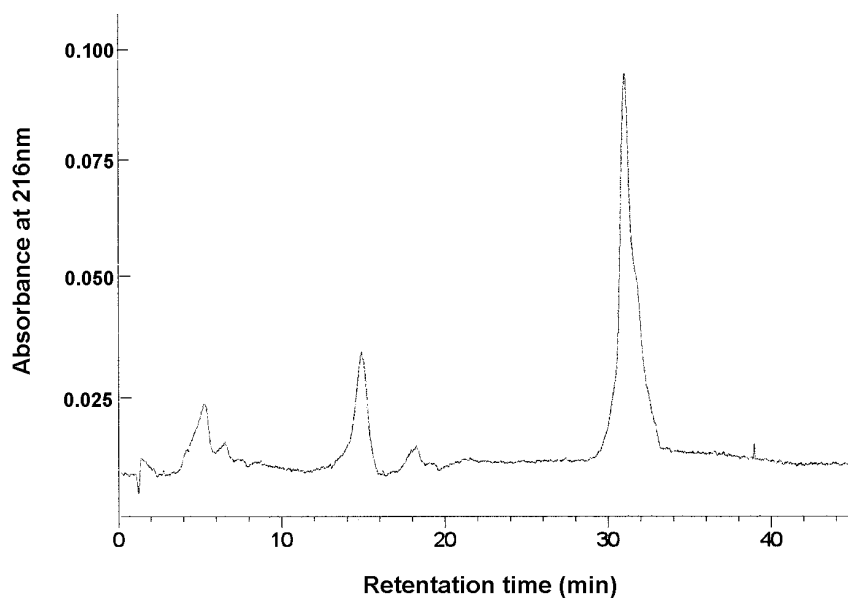


Figure 15. RP-HPLC analysis of purified TGF- β from AF-Heparin column. The elution was carried out with a linear gradient of 0-70% acetonitrile in 45 min at 1 ml/min.

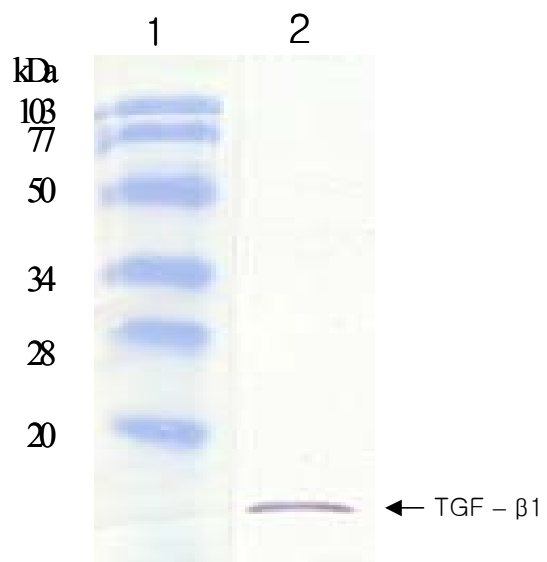


Figure 16. Western blot analysis under reducing condition of purified TGF- β_1 from bovine milk.

1 : prestained standard molecular weight marker

2 : purified TGF- β_1 from bovine milk

Table 1. Purification of TGF- β_1 from bovine colostrum milk

Purification Step	Recovery(ng) (TGF- β)	Yield(%)	
		step	overall
Whey Protein Powder	286	100	100
G-50 Sephadex	142	49.6	49.6
AF-Heparine	62	43.6	21.6
RP-HPLC	24	38.7	8.4

12) 조제분유 formula 결정

현재 시판되고 있는 유업회사 조제분유 formula의 기준에 따랐다.

즉 단백질 12%, 지방 28%, 탄수화물 55%, 회분 3.0%, 수분 2.2%로 하였고 TGF- β 함량은 분말 100g 당 10ng으로 결정하였다. 조제분유 formula는 Table 2와 같다.

13) TGF- β 함유 조제분유의 안정성 검사

TGF- β 함유 조제분유의 안정성 검사는 TGF- β 가 함유된 조제분유를 실온에 저장하면서 저장 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 간격으로 저장 기간별로 TGF- β 활성 실험을 수행중이다.

Table 2. 조제분유 Formula 【한국 에보트(주), 씨밀락 조제분유】

	분말100g 당	표준희석액 100ml 당
단백질	12	2g
지방(리놀레산)	28(5)	4g(1g)
탄수화물	55	7g
타우린	34	4.5mg
수분	2.2	90.1g
열량	515	70kcal
회분	3	0.4g
무기질		
칼슘	425	56mg
인	311	41mg
마그네슘	41	5.4mg
나트륨	160	20mg
칼륨	607	80mg
염소	380	50mg
아연	3.8	0.5mg
철분	9.1	1.2mg
구리	357	47mcg
망간	39	5.2mcg
요오드	76	10mcg
비타민		
비타민A	606	80mcg RE
비타민D	7.6	1.0mcg
비타민E	8.6	1mg α-TE
비타민K ₁	42	5.5mcg
비타민C	53	7mg
비타민B ₁	494	65mcg
비타민B ₂	911	120mcg
비타민B ₆	304	40mcg
비타민B ₁₂	1.14	0.15mcg
나이아신	5.3	0.7mg NE
판토텐산	3.8	0.5mg
엽산	76	10mcg
비오틴	23	3mcg
콜린	38	5mg
TGF-β	10	3ng

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

가. 제 1 세부과제

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1999)	모유와 원유에 함유된 생리 활성 물질 (TGF- β)의 정량 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> - TGF-β_1과 TGF-β_2의 정량법 확립 - 초유와 모유 함유 TGF-β의 kinetics 조사 - 원유와 조제분유 속에 존재하는 TGF-β의 정량 및 특성 조사
2차 년도 (2000)	생리활성물질 (TGF- β)의 장내 항염, 면역활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 모유, 초유, 원유에 포함된 TGF-β이 B cell의 IgA 합성능 조사: ELISA, FACS - 포함된 TGF-β의 생물학적 활성 조사: Bioassay
3차 년도 (2001)	생리활성물질 (TGF- β) 첨가 유제품의 기능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 초유와 보통 시판우유로 양육된 신생아의 장내 면역 비교 - TGF-β를 유제품에 첨가한 후의 안정성 조사, TGF-β 첨가 유제품의 항염, 면역활성 기능을 전년도에 정착된 방법으로 조사

나. 제 2 세부과제

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1999)	초유로부터 TGF-β ₁ 함유 분획 분리	- 초유수집 · 보존 - 초유성분 분석 - TGF-β ₁ 함유 분획 조건 확립 - TGF-β ₁ 분리 · 정제 - 조제 분유 성분 분석
2차 년도 (2000)	생물학적, 생화학적 특성 규명	- 분리된 TGF-β ₁ 의 순도 측정 · Silver staining · SDS-PAGE · Western blot.
3차 년도 (2001)	TGF-β ₁ 분획 함유 조제분유 기능 조사	- 유아용 조제분유 Formula 결정 - 조제분유의 캔화 - 제품의 안정성 검사 및 임상 실험 실시

2. 연구개발 목표의 달성도

가. 제 1 세부과제:

본 연구에서는 소와 사람의 초유 내에 포함된 TGF-β의 생리활성 기능을 구명하고자 한다. 즉 초유 내에 함유된 TGF-β가 면역세포 성장에 미치는 영향, 항체 분비에 미치는 영향 등의 특성조사를 통해 그 생리활성 기능을 밝히고자 한다. 본 연구를 토대로 궁극적으로는 적절한 양의 TGF-β가 함유된 기능성 유제품을 개발하고자 하며 수행된 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

- 면역화학적 방법을 통한 모유와 초유에 함유된 TGF-β의 정량
- 분리된 초유의 세포성장 억제효과 평가
- Mouse spleen, MLN을 이용한 항체합성 효과 평가, thymocyte를 이용한 cytokine 발

현 효과 평가

- 모유와 조제분유를 섭취한 유아의 분변 내 IgA 함량 비교
- TGF- β 를 시판 우유에 첨가한 후 안정성 평가

나. 제 2 세부과제

본 연구과제에서는 총괄 연구에서 개발하고자 하는 기능성 유제품에 첨가될 TGF- β_1 분리 공정 확립을 통해 TGF- β_1 함유 조제유 개발 및 기능평가를 하고자 하였다. 본 연구에서는 다양한 기능을 지니고 있는 TGF- β 를 분리 정제하여 첨가한 조제분유 제조기술을 확립하였다. 초유수집 및 보존, 초유성분 분석 및 TGF- β_1 함유 분획 조건 확립, 생물학적 생화학적 특성규명, 유아용 조제분유 Formular결정, 제품의 안정성 검사 등을 수행하였다. 본 연구를 통해서 얻은 기술은 다양한 생리활성물질을 우유로부터 분리하는 연구에 이용될 수 있는 정제 시스템 개발에 일익을 할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 조제분유에 결핍된 생리활성물질을 첨가하여 모유에 가까운 기능성 조제분유를 개발한다.
2. 모유나 우유에 함유한 수많은 생리활성 조절 물질의 구체적인 기능을 이해하여 용도에 따라 기존 유제품의 기능성을 향상시킨다.
3. 현재 순수 분리된 TGF- β 는 1 μ g에 30 만원 이상으로 수입 판매되고 있어 제품개발에 성공할 때 수입대체의 부수적인 효과도 기대된다.
4. 본 기술은 먼저 조제분유의 기능성을 향상시키고 나아가 다양한 유제품 제조 및 상업화에 효율적으로 활용할 예정이다.

제 6 장 참고 문헌

1. Hawkes, J.S., et al., **Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum.** *Pediatr Res*, 1999.46(2):p.194-9.
2. Garofalo, R.P. and A.S. Goldman, **Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update.** *Biol Neonate*, 1998.74(2):p.134-42.
3. Parodi, P.W., **Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents.** *J Nutr*, 1997.127(6):p.1055-60.
4. Srivastava, M.D., et al., **Cytokines in human milk.** *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1996.93(3):p.263-87.
5. Canfield, L.M., et al., **Vitamin K in colostrum and mature human milk over the lactation period-- a cross-sectional study.** *Am J Clin Nutr*, 1991.53(3):p.730-5.
6. Boersma, E.R., et al., **Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study.** *Am J Clin Nutr*, 1991.53(5):p.1197-204.
7. Koletzko, S., et al., **Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood.** *Bmj*, 1989.298(6688):p.1617-8.
8. Magnani, C., G. Pastore, and B. Terracini, **Infant feeding and childhood cancer.** *Lancet*, 1988.2(8620):p.1136.
9. Mayer, E.J., et al., **Reduced risk of IDDM among breast-fed children.** *The Colorado IDDM Registry. Diabetes*, 1988.37(12):p.1625-32.
10. Chiba, Y., et al., **Effect of breast feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection.** *J Med Virol*, 1987.21(1):p.7-14.
11. Stephens, S., **Development of secretory immunity in breast fed and bottle fed infants.** *Arch Dis Child*, 1986.61(3):p.263-269.
12. Goldblum, R.M., et al., **Human milk feeding enhances the urinary excretion of immunologic factors in low birth weight infants.** *Pediatr Res*,

1989.25(2):p.184-188.

13. Koldovsky, O.. **Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling.** *J Nutr*, 1989.119(11):p.1543-1551.
14. Schams, D., Karg H., **Hormones in milk.** *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1986.464:p.75-86.
15. Goldman, A. S., Thorpe, L. W., and Goldblum, R. M., **Anti-inflammatory properties of human milk.** *Acta Paediatr Scand*, 1986.75:p.689-695.
16. Hanson, L. A., Mattsby-Baltzer, I., Engberg, I., Roseanu, A., Elverfors, J., and Motas, C., **Anti-inflammatory capacities of human milk: lactoferrin and secretory IgA inhibit endotoxin-induced cytokine release.** *Adv Exp Med Biol*, 1995.371A:p.669-672.
17. Xu, R., Q.C. Doan, and G.O. Regester, **Detection and characterisation of transforming growth factor-beta in porcine colostrum.** *Biol Neonate*, 1999.75(1):p.59-64.
18. Penttila, I.A., et al., **Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum.** *Pediatr Res*, 1998.44(4):p.524-31.
19. Pakkanen, R., **Determination of transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2) in bovine colostrum samples.** *J Immunoassay*, 1998.19(1):p.23-37.
20. Ginjala, V. and R. Pakkanen, **Determination of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples.** *J Immunoassay*, 1998.19(2-3):p.195-207.
21. Armond, S., and Goldman, A. S., **The immune system of human milk : antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties.** *Pediatr Infect Dis J*, 1993.12:p.664-671.
22. Rogers, M. L., Goddard, C., Regester, G. O., Ballard, F. J., and Belford, D. A., **Transforming growth factor β in bovine milk: concentration, stability and molecular mass forms.** *J Endocrinology*, 1996.151:p.77-86.
23. Su, H. C., Leite-Morris, K. A., Braun, L., and Biron, C. A., **A role for transforming growth factor- β 1 in regulating natural killer cells and T lymphocytes proliferative responses during acute infection with lymphocytic**

- choriomeningitis virus.** *J Immunol*, 1991.147:p.2712-2727.
24. Range, G. E., Figari, I. S., Espevik, T., and Palladino, M. A., **Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor- β and reversal by recombinant tumor necrosis factor- α .** *J Exp Med*, 1987.166:p.571-576.
 25. Koo, G. C., Manyak, C. L., Dasch, J., Ellingsworth, L., and Shultz, L. D., **Suppressive effects of monocytic cells and transforming growth factor- β on natural killer cell differentiation in autoimmune viable motheaten mutant mice.** *J Immunol*, 1991.147:p.1197-1200.
 26. Liblau, R. S., Singer, S. M., and McDevitt, H. O., **Th1 and Th2 cells in the Pathogenesis of organ-specific autoimmune disease.** *Immunology Today*, 1995.16:p.34-38.
 27. Miller, J. F., and Flavell, R. A., **T cell tolerance and autoimmunity in transgenic models of central and peripheral tolerance.** *Curr Opin Immunol*, 1994.6(6):p.892-899.
 28. Kulkarni, A.B., et al., **Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders.** *Am J Pathol*, 1995.146(1):p.264-275.
 29. Kulkarni, A.B., et al., **Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993.90(2):p.770-774.
 30. Shull, M.M., et al., **Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.** *Nature*, 1992.359(6397):p.693-699.
 31. Letterio, J.J., et al., **Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice.** *Science*, 1994.264(5167):p.1936-1938.
 32. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Ythomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B., and Deuel, T. F., **Transforming growth factor type beta induces accelerated healing of incisional wound in rats.** *Science*, 1987.237:p.1333-1336.
 33. Zenone, T., Souillet, G., **Cancer and primary humoral immunodeficiency.** *Bull Cancer*, 1997.84(8):p.813-821.
 34. Brandtzaeg, P., Nilssen, D. E., Rognum, T. O., and Thrane, P. S., **Ontogeny of the**

- mucosal immune system and IgA deficiency. *Gastroenterol Clin North Am*, 1991.20(3):p.397-439.
35. Lebman, D. A., Lee, F. D. and Coffman, R. L., **Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures.** *J Immunol*, 1990.144(3):p.952-959.
36. Kim, P.-H., and Kagnoff, M. F., **Transforming growth factor- β 1 increases IgA isotype switching at the clonal level.** *J Immunol*, 1990b.145:p.3773-3778.
37. Van Vlasselaer, P., Punnonen, J., and de Vries, J. E., **Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells.** *J Immunol*, 1992.148:p.2062-2067.
38. Balthazar, B., Cazac and Jurgen Roes. **TGF- β Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA In Vivo.** *Immunity*, 2000.13:p.443-451.