

최        종  
연구보고서

유가공 제품 내 인슐린 유사 성장촉진인자의  
안정화 및 강화 기술 개발

연구기관

고려대학교 식품과학부  
고려대학교 생명유전공학부  
한국보건산업진흥원 품질평가실

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유가공 제품내 인슐린 유사 성장촉진인자의 안정화 및 강화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 24 일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 김 세 헌

세부연구책임자 : 고 용

연 구 원 : 김 지 옥

연 구 원 : 황 진 영

연 구 원 : 김 영 훈

연 구 원 : 박 순 옥

연 구 원 : 류 양 환

연 구 원 : 김 민 호

연 구 원 : 김 도 희

연 구 원 : 김 원 곤

위탁연구기관명 : 한국보건산업진흥원

위탁연구책임자 : 조 양 희

# 요 약 문

## I. 제 목

유가공 제품내 인슐린 유사 성장촉진인자의 안정화 및 강화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 식품 내 생리활성 물질의 강화는 식품의 고부가가치 창출을 위하여 활발히 진행되고 있으며 식품의 건강보조 효과를 기대하는 소비자 심리와 부합하여 그 시장 확대의 가능성이 매우 크다. 최근에 진행된 생리대사 물질의 연구는 자연에 존재하는 생리활성 물질을 정제하여 필요한 식품에 첨가하는 것이 일반적인 형태이며, 자연적으로 식품에 존재하는 기능성 물질의 활성을 제조과정 중 에서 유지시키는 방안 에 대한 연구진행은 미흡하다. 이러한 생리조절인자 중 인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor: IGF)는 인간을 비롯한 포유동물의 젖에 존재하는 성장촉진물질로서, 미량이 존재하나 태아의 초기성장에 적극적으로 관여하는 생리조절인자이다. 특히 IGFs는 새로 태어난 동물의 신경조직, 내부 소화기관, 근육의 성장 발달에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 성인의 경우 노화에 의하여 발생하는 골절이나 골다공증이 체내에서 합성되는 IGFs의 부족과 관련이 있다는 임상실험 결과가 보고되었다(Rosen, 1999). 이러한 보고는 IGFs의 천연활성이 풍부히 존재하는 유제품의 섭취를 통해 어린이나 성인의 바람직한 생리조절 기능을 기대할 수 있음을 의미한다.

IGFs의 유제품 내로의 강화 방안 중 가장 현실적인 제품화는 활성 IGFs를 보유한 조제분유의 창출이다. 신생아들은 산모가 수유할 수 없는 환경에 있을 경우 조제분유의 섭취가 불가피하나 상업용 조제분유에서는 시유와 달리 IGFs가 발견되지 않았다(Nagashima 등, 1990). 이 결과는 IGFs가 가공과정 중 파괴되었거나 제거되었음을 나타낸다. 이는 식품의 응용을 염두에 두고 볼 때, IGFs의 분

리·정제로부터 시작하여 식품 내 안정화는 매우 중요하나 이에 대한 연구는 국내·외에서 전무한 실정이다. 다만 Donovan 등(1991)은 모유를 56℃에서 30분간 가열할 때 존재하는 IGF-I과 IGF-II의 양에는 변화가 없음을 보고하였으나, 그 생리적 활성의 변화는 검증되지 않았다. 그러나 IGFs는 비교적 열에 안정하기 때문에 유제품에 대한 응용가능성이 크다고 할 수 있다. 또한 가공처리 공정조건에 따른 IGFs와 binding protein의 활성의 변화의 구명은 그 응용가능성을 확대하는데 필수적이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 세부과제 : 유제품내 IGFs의 강화 방안 연구

본 세부과제에서는 경기도 일원의 목장에서 착유된 원유를 대상으로 하여 각 계절별 IGFs의 농도를 조사함으로써 전체적인 발현의 변화를 분석하였고 비유 초기, 중기, 후기에 따른 IGFs의 농도를 비교하였다. 성장인자들의 발현을 분석하기 위하여 제 2 세부과제에서 구축한 ELISA 또는 방사선면역측정법 (radioimmunoassay)을 확보, 이용하여 IGFs의 농도를 분석하였다. 또한 여러 유가공 처리 중에 일어나는 IGFs의 활성 변화를 조사하여 다양한 조건을 비교하여 IGFs의 효과 극대화를 위한 적절한 가공처리 방법을 모색하였고 IGFs의 유제품 강화를 위하여 강화 시기와 강화 방법을 설정하고 검증하여 최적 조건의 확립함과 동시에 안정성을 확보하기 위한 연구가 시도되었다.

#### 제 2 세부과제 : IGFs의 생체내·외에서의 생리화학적 활성 연구

본 세부과제에서는 토끼에서 생산된 IGFs의 특이 항체를 생산하기 위하여 상업용 IGFs를 토끼에 투여하여 항체를 생산하고 이 특이 항체를 이용한 affinity chromatography의 분리 방법을 확보함과 동시에 IGFs의 농도를 측정하는 방사선면역측정법(radioimmunoassay)을 확보하였다. 상업적으로 사용되는 IGFs와 원

유에서 분리된 IGFs와의 생리학적 활성을 근육세포주를 이용하여 특정 배양액에서 농도별, 시기별 IGFs를 첨가함으로써 in vitro상에서 정제된 IGFs의 생리활성도를 조사하였고 실험동물을 이용하여 IGFs의 생리 발달 촉진인자로서의 검증과 근육의 발달과정에서의 영향을 분석하였다.

#### **위탁세부과제 : IGFs의 강화 유제품의 안정성 평가**

본 세부과제에서는 상업용 IGFs의 안정성을 검토하기 위하여 실험동물을 대상으로 하여 독성평가를 실시하고 이 결과에 따른 첨가수준을 결정하였고 분리된 IGFs를 유제품에 강화 시 일어나는 변화를 검토하기 위하여 실험동물을 대상으로 하여 안정성을 검토하였다. 이 결과를 바탕으로 하여 식품 원료, 부원료 또는 첨가물로서의 사용 타당성을 검토하였다.

#### **IV. 연구 개발 결과 및 활용에 관한 건의**

##### **제 1 세부과제 : 유제품내 IGFs의 강화 방안 연구**

본 연구는 우유의 비유시기, 산차, 계절 및 사양조건 등 환경요인에 따른 우유 유청내 인슐린 유사 성장인자의 농도 변화와 시유 및 각종 유제품 (분유, 발효유, 농축유)에 대한 균질, 살균, 농축, 분무건조 및 발효 등 유가공 공정 중에 일어나는 물리 화학적인 변화가 IGF- I의 함량에 미치는 영향을 확립된 방사면역측정법을 이용하여 조사하였다.

본 연구의 결과로, 자연상태에서 존재하는 IGF- I의 농도는 사양조건에 따라 유의적인 상관관계가 있었으나 ( $P < 0.05$ ), 계절, 산차, 비유기별 함량에 있어서 유의적인 상관관계는 발견하지 못하였다.

국내산 유제품별 IGF- I의 평균함량은 시유가 44.6ng/ml, 건조유제품의 경우 전지분유 41.3ng/ml, 탈지분유 55.8ng/ml, 조제분유 32.2ng/ml, 초유강화분말이 516.9ng/ml로 나타났으며, 기타 연유의 경우 83.2ng/ml, 치즈유청의 경우 20.5 ng/ml였으며, 드링크타입의 발효유에서는 12.1ng/ml의 평균 IGF- I 함량을 나타내어 가장 낮은 값을 보였다. 우유의 열처리시간과 온도를 조합하여 열처리 조건이

IGF- I 함량에 미치는 영향을 실험한 결과, 상업적인 열처리구간에서 열처리 후에 함량변화를 고찰한 결과 불규칙적인 패턴을 나타내었으며, 120℃ 15분 간의 습열멸균 조건에서는 대부분의 IGF- I 이 파괴되는 결과를 나타냈다. Lab scale 의 소규모 pilot plant 조건에서 균질유, 살균유, 농축유, 분무건조분유에 있어 IGF- I 의 함량변화를 조사한 결과, 살균처리조건에서 측정된 IGF- I 의 함량이 다소 감소하는 결과를 보였으며, 분무건조 조건에서 IGF- I 은 크게 손실되지 않은 결과를 보였다.

상기 연구결과를 토대로 IGF- I 의 강화수단으로 초유유청을 소재로 한 건식 및 습식강화 형태로 시유, 분유, 발효유 및 미세캡슐화된 발효유를 조제하여 효율적인 강화방법과 저장 안정성에 대해 조사하였다. 초유유청을 건식 또는 습식 첨가 시 시유, 분유의 유통기간 중 IGF- I 함량변화는 유의성이 없는 것으로 나타났으나 ( $P < 0.05$ ), 발효유의 경우 첨가 후 12일 간 저장한 결과 모든 처리군에서 유의적인 IGF- I 함량의 감소경향을 나타내었다. 발효유 제조 시 탈지유 내 IGF- I 의 함량변화와 가열처리 및 스타터 첨가가 IGF- I 함량변화에 미치는 영향을 조사한 결과 탈지유 배지 내 IGF- I 함량은 발효 후 34.2ng/ml에서 5.4 ~ 5.7ng/ml로 크게 감소하였으며, 초유유청분말을 발효유 배지에 첨가시킨 경우에도 IGF- I 함량은 발효 전에 비하여 각각 13.1% 및 5.8% 수준으로 감소하였다.

동결건조 초유유청과 상업용 초유유청분말을 장용성 캡슐제제로 미세캡슐화한 후 전자현미경으로 고찰한 결과 사용된 두 가지 캡슐제제 중 Eudragit L100-55가 Sureteric보다 캡슐화가 우수한 것으로 보였으나, IGF- I 함량유지에서는 유사한 결과를 나타냈는데, 캡슐화 후에는 발효유 내 IGF- I 함량이 유지되는 결과를 보였다. 저장성에 있어서도 초유유청을 상기 두 제제로 캡슐화 하였을 경우 유통기한 이내에서 감소하는 경향을 보였지만 캡슐처리하지 않은 경우보다 IGF- I 함량이 유의적으로 높게 유지되는 결과를 보였다.

## 제 2 세부과제 : IGFs의 생체내·외에서의 생리화학적 활성 연구

고유의 생리 활성을 유지하면서 높은 순도를 나타내는 IGF-I mAb를 다량으로 확보하고 이를 통해 우유 내 IGF-I을 분리하여 IGF-I 강화 유제품에 응용하기 위하여 실험을 진행하였다. 상업적으로 판매되고 있는 rhIGF-I을 항원으로 하여

생쥐에 대하여 면역 실시하였으며 4~6주 후에 면역된 생쥐의 비장을 무균적으로 채취하여 이로부터 비장세포를 분리·회수하여 배양하였다. 면역된 세포의 사멸을 방지하면서 IGF-I mAb를 지속적으로 생산할 수 있도록 하기 위하여 종양세포와의 물리적 세포 융합을 실시하였다. 잡종 세포주에 대해서는 HAT 선택 배양액과 간접 면역형광항체법을 이용하여 2차에 걸친 선별을 실시하여 최종적으로 IGF-I peptide와 특이적 반응을 보이는 4주의 세포주를 선별하였으며 이들을 대량 배양한 후 생쥐에 면역하여 높은 역가를 지닌 복수를 생산하였다.

생산된 복수는 IGF-I peptide에 대하여 특이적인 반응을 나타냄이 Western hybridization과 간접 면역형광항체법에 의해 확인되었으며 특히 대조구로 사용된 rabbit anti-human IGF-I pAb에 상응하는 발현을 보여 복수 내에 높은 역가의 IGF-I mAb가 존재함을 확인할 수 있었다. 생산된 IGF-I mAb를 이용하여 비방사선면역측정법의 반응 조건을 확립하였으며 기존에 사용하던 비방사선면역측정법의 반응 조건을 개선함으로써 IGF-I mAb를 이용한 IGF-I의 정량 방법을 확립하였다.

우유 내의 IGF-I 분리를 위하여 IGF-I mAb를 resin에 부착시킨 column에 gel filtration chromatography를 통해 IGFBP 및 IgG가 제거된 시료를 주입하였으며 desalting chromatography를 통해 salt를 제거하였다.

이후 우유 내에서 분리한 IGF-I peptide가 고유의 생리 활성을 지니고 있으며 또한 유제품에 적용 가능한지 여부를 확인하기 위하여 *in-vitro*와 *in-vivo*의 두 측면에서 그 생리활성을 검증하였다. 다양한 조직에서 유래된 세포주를 이용한 *in-vitro* 실험의 결과 분리된 우유 내 IGF-I은 세포의 성장을 촉진하는 생리 활성을 나타내었으며 특히 상업적으로 판매되고 있는 재조합 IGF-I의 생리 활성과 거의 같은 수준의 반응을 나타냄으로써 우유 내 IGF-I의 생리활성이 매우 강력함을 확인할 수 있었다. 또한 IGF-I에 대한 생리활성의 강도는 다른 조직 사이에 유사하게 나타났으나 특히 근육 세포주에서 특이적으로 강한 반응을 보였다. ICR 생쥐에 IGF-I 강화유를 구강투여한 *in-vivo* 실험에서도 IGF-I 강화유를 투여한 개체들에서 전반적인 체중의 증가 경향이 나타났으며 각종 조직의 무게 역시 IGF-I 강화유를 구강 투여한 개체들에서 높게 나타났다. RIA를 통해 IGF-I 강화유 처리에 의해 IGF-I 및 IGF-II의 발현 양상을 확인한 결과 역시 IGF-I 강

화유를 투여한 개체들에서는 대조구에 비해 IGF-I의 발현이 증가하였으며 특히 근육 및 장에서의 발현은 유의적인 차이를 나타내었다. 이와 같은 결과는 immunohistochemistry에서도 유사하게 나타났는데 특히 근육에서 큰 증가를 나타냈다. 또한 RT-PCR을 실시한 결과 IGF-I 강화유를 투여한 경우에는 IGF-I peptide 뿐만 아니라 IGF-IR mRNA의 반응 또한 증가함이 확인되어 IGF-I 강화유가 체내 IGF system 전체에 걸쳐 영향을 줄 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

### **위탁세부과제 : IGFs의 강화 유제품의 안정성 평가**

상업용 IGFs의 안정성을 검토하기 위하여 실험동물을 대상으로 하여 독성평가를 실시하고 이 결과에 따른 첨가수준을 결정하였다. 동시에 확보된 독성, 안정성 평가를 바탕으로 분리된 IGFs를 유제품에 강화 시 일어나는 변화를 검토하기 위하여 실험동물을 대상으로 하여 안정성을 검토하였다. 우유로부터 분리·정제된 IGF-I을 새로운 기능성식품의 원료로 활용하기 위한 본 연구결과는 IGF-I이 안전성측면에서 기능성원료로서의 사용가능성을 확인할 수 있었으나 이와 같은 원료가 상용화되기 위해서는 관련규정(건강기능식품법)에 적합한 장기적인 시험이 보완되어야 할 것으로 판단되었다.

이상의 결과에 따라 본 연구는 성장인자로서의 우유 또는 초유 IGF-I의 이용에 폭넓은 기초 및 응용자료를 제공하리라 생각되며, 향후 식품첨가물 또는 건강식품으로서의 생체이용성, 안전성 등에 대한 부가적인 연구가 필요하리라 여겨진다.

## SUMMARY

Insulin-like growth Factor-I, namely IGF-I is one of the main growth factors in milk and found in milk produced from all mammalian species. It has 70 amino acids residues cross-linked by 3-disulfid bonds. The structure of bovine IGF-I is identical with that of human's IGF-1. It stimulates growth, differentiation, and metabolism of various cells.

Thus we examined the change of IGF-I content in bovine milk during year lactation period and to identify parameters affecting IGF-I content in bovine milk.

The IGF-I content was determined by radioimmunoassay using  $^{125}\text{I}$  after acid-ethanol treatment. The data were analyzed using GLM and CORR procedures of SAS to examine significant differences ( $P < 0.05$ ) within groups (dairy farms, lactation periods, seasons and parity).

Different feeding pattern between dairy farms may have influenced the IGF-I content in milk. There were about six fold decrease in the concentration of IGF-I (From 2,462.7 to 353.0 ng/ml) in colostrum from 6hr after parturition to that of 18hr after parturition. The acid-neutralized colostrum whey samples were fractionated two peaks (p1 and p2) through Sephadex G-50 gel chromatography (pH 6.64), and IGF-I content of peak fractions were determined. Both of the two pooled fractions of IGF-I content were similar at 6, 12, 18 hr after parturition. When lactation period classified into three groups such as early, middle and late lactation period, IGF-I content did not show significant difference throughout whole lactation periods. Parity did not result in significant difference IGF-I content.

To show the pattern of radioactivity of IGF binding protein complex sephacryl S-100 neutral (pH 7.0) column chromatography after incubation of  $^{125}\text{I}$ IGF-I with milk serum was shown two or three major peaks. The 150- to 200- kDa peak was assumed the complex of IGF-I, Acid Labile Subunit (ALS) and binding proteins and the latter was assumed 50 kDa peak.

And the change of IGF-I content before and after each dairy process was examined. IGF-I content in raw milk and whey was not significantly changed by normal pasteurization conditions. However, IGF-I content in raw milk and whey was greatly decreased after exposure with autoclave condition.

Significant reduction in IGF- I content was found during fermentation with commercial starter culture. IGF- I content decreased from 53.0 to 3.8 ng/ml after incubation for 13 hrs (Final pH of 4.06). In term of commercial dairy products, IGF- I content of market milk was in the range of 32.9 ~ 56.4 ng/ml. Commercial whole milk powder, skim milk powder, infant formula and sweet cheese whey was 41.3, 55.8, 32.2 and 20.5 ng/ml, respectively. However, IGF- I content of yoghurt was relatively lower than that of other dairy products and ranged from 7.7 to 17.4 ng/ml. The changes of IGF- I content in the fortified dairy products during storage were determined. The IGF- I content in the fortified milk and dried milk powder did not show significant difference during the tested storage periods (12 days for milk, 4 weeks for dried milk powder), but the IGF- I content in yogurt was significant decreased ( $P<0.05$ ) during the storage for 12 days.

As a way to improve storage stability, IGF-I was encapsulated by surface reforming process (hybridization) using enteric coating materials (Sureteric and Eudragit L100-55) and the changes of IGF-I content were monitored. When crude IGF-I was coated with enteric wall materials before fortification, the IGF-I content in yogurt was maintained during fermentation and storage, and no significant differences was found. Surface reforming process resulted in significantly higher remained IGF-I content after fermentation compared to that of uncoated control. Therefore, the enteric coating of IGF-I prior to fermentation can be used as an effective way to prevent degradation of IGF-I during fermentation.

For production of IGF-I monoclonal antibody (mAb), Balb/c mouse was immunized with commercial recombinant human IGF-I (rhIGF-I). Immunized cells were harvested from spleen, and fused with carcinoma cells. Selected 4 hybridoma cell lines by HAT selection medium and indirect immunofluorescence were immunized into Balb/c to obtain the highly immunized ascitic fluid. Specific binding of IGF-I mAb to rhIGF-I (7.5 kDa) was shown in Western hybridization and indirect immunofluorescence. Therefore the being of IGF-I mAb in ascitic fluids were confirmed. Binding conditions for radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were modified or established by use of IGF-I mAb. IGF-I peptide in milk were isolated by immunoaffinity chromatography using IGF-I mAb, and their bio-activity was identified, *in-vitro* and *in-vivo*. IGF-I

peptide which was isolated in milk (mIGF-I) treated each cell lines show increased proliferation, especially in myoblast C2C12. For in-vivo test, ICR mice were infused with the IGF-I concentrated milk, and their body weight were increased. Oral treatment of IGF-I concentrated milk also induces the increment of tissue weight, IGFs concentration, and expression of IGF-I and IGF-IR in peripheral tissue. Therefore mIGF-I was seems to have a significant and specific bio-activities.

We also investigated safety evaluation of commercial recombinant Insulin like Growth Factors- I (IGF- I ), IGF- I isolated from bovine colostrum which may be applicable to functional foods as raw materials, and enriched milk with IGF- I . In order to evaluate toxicity of IGF- I , genetic toxicity test, acute toxicity test, and short term toxicity test were executed with recombinant IGF-I obtained from R&D systems company, IGF-I isolated from bovine colostrum and enriched milk with IGF- I isolated from bovine colostrum. As a result, any mutagenic effect of enriched milk with IGF- I isolated from bovine colostrum was not observed in 5 species of *Salmonella typhimurium*. IGF-I treated groups show no significant toxicological findings with changes of body weight, food consumption and water consumption and no pathological findings compared with control groups in genetic toxicity test, acute toxicity test, and short term toxicity test.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	<b>13</b>
1. Research Background .....	14
<b>Chapter 2. Present Condition of Technique</b> .....	<b>17</b>
1. Present Condition and Problem .....	17
2. Prospect .....	19
3. Reasonability .....	20
<b>Chapter 3. Results and Discussion</b> .....	<b>21</b>
1. Part I .....	21
2. Part II .....	61
3. Part III .....	113
4. General Discussion .....	137
<b>Chapter 4. Achievements and Contributions</b> .....	<b>139</b>
1. Part I .....	139
2. Part II .....	140
3. Part III .....	143
<b>Chapter 5. Application</b> .....	<b>145</b>
<b>Chapter 6. International Scientific Information</b> .....	<b>146</b>
<b>Chapter 7. References</b> .....	<b>147</b>

## 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>13</b>
제 1 절 연구 개발의 필요성 .....	14
<b>제 2 장 국내의 기술개발 현황</b> .....	<b>17</b>
제 1 절 국내의 기술현황과 문제점 .....	17
제 2 절 앞으로의 전망 .....	19
제 3 절 기술도입의 타당성 .....	20
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>21</b>
제 1 절 제1세부과제 유제품 내 IGFs의 강화방안연구 .....	21
제 2 절 제2세부과제 IGFs의 생체 내·외에서의 생리화학적 활성 연구 .....	61
제 3 절 위탁연구과제 IGFs 강화 유제품의 안전성평가 .....	113
제 4 절 종합토의 .....	137
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>139</b>
제 1 절 제1세부과제 유제품 내 IGFs의 강화방안연구 .....	139
제 2 절 제2세부과제 IGFs의 생체 내·외에서의 생리화학적 활성 연구 .....	140
제 3 절 위탁연구과제 IGFs 강화 유제품의 안전성평가 .....	143
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b> .....	<b>145</b>
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	<b>146</b>
<b>제 7 장 참고문헌</b> .....	<b>147</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

현재 식품 내 생리활성 물질의 강화는 식품의 고부가가치 창출을 위하여 활발

히 진행되고 있으며 식품의 건강보조 효과를 기대하는 소비자 심리와 부합하여 그 시장 확대의 가능성이 매우 크다. 최근에 진행된 생리대사 물질의 연구는 자연에 존재하는 생리활성 물질을 정제하여 필요한 식품에 첨가하는 것이 일반적인 형태이며, 자연적으로 식품에 존재하는 기능성 물질의 활성을 제조과정 중에서 유지시키는 방안에 대한 연구진행은 미흡하다. 이러한 생리조절인자 중 인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor: IGF)는 인간을 비롯한 포유동물의 젖에 존재하는 성장촉진물질로서, 미량이 존재하나 태아의 초기성장에 적극적으로 관여하는 생리조절인자이다. 특히 IGFs는 새로 태어난 동물의 신경조직, 내부 소화기관, 근육의 성장 발달에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 성인의 경우 노화에 의하여 발생하는 골절이나 골다공증이 체내에서 합성되는 IGFs의 부족과 관련이 있다는 임상실험 결과가 보고되었다(Rosen, 1999). 이러한 보고는 IGFs의 천연활성이 풍부히 존재하는 유제품의 섭취를 통해 어린이나 성인의 바람직한 생리조절 기능을 기대할 수 있음을 의미한다.

IGFs의 유제품 내로의 강화 방안 중 가장 현실적인 제품화는 활성 IGFs를 보유한 조제분유의 창출이다. 신생아들은 산모가 수유할 수 없는 환경에 있을 경우 조제분유의 섭취가 불가피하나 상업용 조제분유에서는 시유와 달리 IGFs가 발견되지 않았다(Nagashima 등, 1990). 이 결과는 IGFs가 가공과정 중 파괴되었거나 제거되었음을 나타낸다. 이는 식품의 응용을 염두에 두고 볼 때, IGFs의 분리·정제로부터 시작하여 식품 내 안정화는 매우 중요하나 이에 대한 연구는 국내·외에서 전무한 실정이다. 다만 Donovan 등(1991)은 모유를 56°C에서 30분간 가열할 때 존재하는 IGF-I과 IGF-II의 양에는 변화가 없음을 보고하였으나, 그 생리적 활성의 변화는 검증되지 않았다. 그러나 IGFs는 비교적 열에 안정하기 때문에 유제품에 대한 응용가능성이 크다고 할 수 있다. 또한 가공처리 공정조건에 따른 IGFs와 binding protein의 활성의 변화의 구명은 그 응용가능성을 확대하는데 필수적이다.

## 제 1 절 연구 개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

자연적으로 우유에 존재하는 모든 생리활성물질이 일정한 가공공정을 거친 후에도 유제품내에서 활력을 유지한다면 바람직 할 것이다. 그러나 우유내에 존재하는 특정 생리활성물질(성장인자, 호르몬, 기타 미량단백질)의 경우 가공공정 중에 대부분이 소실되거나 변질된다고 알려져있다. 따라서 미량이지만 생명체의 생리조절에 크게 영향을 미치는 물질의 경우 가공과정 중에 파괴되거나 변질되지 않도록 안정화할 필요가 있다.

시유를 비롯하여 유제품의 제조과정 중 균질, 살균, 건조, 농축 및 냉각에서 일어나는 주요 유성분의 변화는 많은 연구가 이루어졌으나 IGFs를 비롯한 기타 여러 생리조절인자의 소실 및 활력의 저하에 대한 연구는 상대적으로 미흡하다.

우유에는 여러 가지 형태의 IGFs가 존재하며 그 중 IGF-I의 N-말단 Gly-Pro-Glu이 결여된 형태인 des(1-3)IGF-I은 생체내의 활성이 자연상태의 IGF-I에 비하여 10-100배 가량 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 우유에 존재하는 미량의 des(1-3)IGF-I을 포함한 IGFs를 안정화하고 또한 분리 정제하여 농축하는 기술을 개발하면 다양한 기능성 유제품의 제조에 응용할 수 있을 것이다.

인유에 존재하는 IGF-I의 생리적 수준은 우유에 비하여 4 배 이상 높으며 분만 후에도 일정기간 동안 모유내에 지속적으로 존재함으로써 태아의 초기성장애 필수적인 것으로 간주되고 있다. 우유에서 활성형태의 IGFs의 분리, 회수기술은 가공처리 과정 중 소실된 IGFs를 강화하는데 이용할 수 있으며, *in vitro*와 *in vivo* test를 통한 IGFs의 활성과 안전성을 검증함으로써 식품응용에 대한 토대를 마련할 수 있다.

더욱이, 유전자조작 기술을 이용하여 제조된 식품은 소비자들로부터 외면 받고 있는 현재의 실정을 감안하면 우유 내에 존재하는 물질을 변형 없이 유제품에 다시 이용함으로써 유제품의 기능을 증진시킬 수 있는 안정화 기술의 개발은 유전자조작에 대한 거부감을 줄이고 유제품을 고급화하는 지름길이다. 더불어, 각 가공공정에 의한 IGFs의 활성변화에 대한 추적과 다양한 유제품의 가공공정 특성에 따른 적절한 실활의 방지 또는 최소화하는 기술은 유제품이 가공 후에도 IGFs의 활력수준을 유지하도록 함으로써 생체내 유효한 기능을 발휘하도록 할 수 있는 효율적인 공정을 제시할 수 있다. 또한 분리 정제된 IGFs의 활력을 강화하는 기술은 기존의 우유와는 차별화된 강화 유제품을 생산할 수 있으며, 식품

으로서의 활용가능성을 연구함으로써 가공공정뿐 만 아니라 식품화 신기술을 개발하는 기초사업이 될 것이다. 더 나아가서 식품으로서의 안정성이 인정되었을 때, 차후 이 축적된 기술을 바탕으로 IGFs 강화 유제품을 다양하게 개발할 수 있으며 이를 위해서는 저장 중에 일어날 수 있는 활력의 저하를 방지하고 균일한 첨가효과를 얻기 위한 적절한 강화형태에 대한 연구가 필요할 것이다.

## 2. 경제 산업적 측면

최근 식문화의 변천과 중산층의 증가는 건강식품에 대한 소비자의 관심을 증폭시키고 있으며 식품이 지닌 생리활성의 기능은 소비자가 식품을 선택하는 새로운 기준으로 자리잡고 있다. 이러한 소비자의 관심과 더불어 건강증진 식품 또는 건강보조 식품 등이 꾸준히 개발되고 있는 실정이다.

우유를 소재로 하여 만들어지는 유제품도 그 추세에서 예외일 수는 없으며, 우유의 건강 증진효과를 높임으로써 소비자의 기호도가 높은 고품질 유제품의 생산은 우리나라 낙농산업의 새로운 돌파구가 될 수 있다. 또한 2003년 완전한 수입개방화에 대비하여 우리나라 낙농산업의 기반을 튼튼히 하기 위해서는 첨단 특화된 낙농제품의 개발에 주력할 필요가 있다.

따라서 고품질 유제품 개발의 방안으로서 우유에 존재하는 미량의 생리활성 인자의 활력을 가공처리로부터 보호하고 소멸된 생리활성인자의 활력을 다시 환원시킴으로써 우유 자체가 지닌 고유의 기능성을 향상시키는 방법은 충분한 산업적 가치를 가지고 있다. 특히 우유 및 유제품의 소비는 연령층이 증가함에 따라 감소하고 있으며 인체에서 합성되는 생리활성인자 중 성장인자도 같은 변화 양상을 보이고 있다.

이렇듯 유제품의 다양화와 고품질화로 소비가 저조한 중·장년층을 우유 및 유제품의 소비에 적극 참여시키는 방법은 낙농제품의 소비를 증가시킬 것이며, 아직까지 적극적으로 개발되지 못하고 있는 노년층을 위한 유제품 개발에 자극제로 이용될 것이다.

## 3. 사회 문화적 측면

우유는 완전 식품으로서 우리의 식생활에 널리 이용되어 국민의 건강 증진에

이바지한 바가 크다. 또한 점차적인 식생활의 변화에 부응하여 우유의 소비도 증가하는 추세이다. 하지만 대부분의 낙농사료를 수입에 의존하고 있는 우리나라 낙농업의 현실을 감안할 때, 수입 원유 또는 액상우유의 낮은 가격 경쟁력은 우리나라 낙농업의 침체를 초래할 수 있다.

특히 선진 낙농국가에서는 낙농산업의 발전을 위하여 유전공학적인 첨단기법을 이용하여 human IGF-I을 생산하는 연구가 수행되고 있으며, 이를 다양한 동물에 적용하여 소화기관, 근육, 신경조직 등의 성장 및 발달에 미치는 영향과 그 안전성을 검증하기 위한 연구를 진행 중이다. 하지만 이 같은 연구는 유전적 조작을 토대로한 기법으로서 일반인에게 정서적인 부담감을 주어 소비력 증진에 장애가 될 수 있다.

본 연구에서 제시한 목적 및 방법들은 유전적 조작이 아닌 자연상태의 우유내에 존재하는 특이 물질을 안정화하는 방법이다. 따라서 그 생리활성 능력과 안전성이 입증된다면 일반 소비자들에게 거부감이 없으면서 국제적 경쟁력을 갖는 식품으로서의 가능성을 갖게 된다. 또한 부수적으로 정제 방법의 개발과 공정과정의 특허화로 수출도 제고할 수 있으며, 3차 산업이라 할 수 있는 의료산업에도 의약품으로서의 가능성이 타진될 수도 있다.

따라서 앞서 제시한 바와 같이 우리나라 고유의 낙농시장과 특성화된 가공산업 분야의 개발은 사회적, 시대적 요구에 보다 신속하게 대응할 수 있는 낙농산업 기반의 개선효과를 거둘 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 기술현황과 문제점

기능성 식품의 정의는 일반화되어 있지 않으나 식품의 생리활성을 나타내는 물질을 추출 분리하여, 이를 식품에 첨가 또는 강화시켜 섭취 후 인체에 유용한 기능을 발휘하도록 하는 것이다. 이러한 기능성 식품의 개발은 세계적인 추세이며 1990년대 이후로 개발이 가속화되었다. 기능성 식품의 성공여부는 식품 속에 미량으로 존재하는 기능성 물질의 탐색과 그 기능의 훼손 없이 효과적으로 분리·농축하는 기술의 확립에 달려있다. 그리고 기대되는 효과의 과학적인 모니터링이 동반되어야 함은 물론이다.

현재 유제품에 널리 응용되고 있는 기능성 물질의 종류에는 유산균, EPA,

DHA, 식이섬유, 칼슘, 철 등이 있으며, 이중의 일부는 상업적으로 성공을 거두었다. 이와 같이 기능성 유제품이 성공적으로 개발된다면 기존의 시장 규모만 가지고도 빠른 시장정착을 유도할 수 있어, 앞으로도 기능성 식품의 강세가 유지될 것으로 사료된다.

우유에 존재하는 중요한 생리조절 물질 가운데 대표적인 것의 하나는 성장인자이다. 이러한 성장인자는 호르몬과 비슷한 생리적 효과를 나타내며, 생리적 대사작용을 조절할 뿐만 아니라 세포의 성장과 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이중 insulin-like growth factor(IGF)-I과 -II는 조사된 모든 포유동물의 유즙에서 발견되었으며(Donovan 와 Odle, 1994), 동일 종 내에서는 품종, 산차수, 비유기간에 따라서 발현정도에 차이를 보이고 있다(Simmen 등, 1990; Collier 등, 1991). 전반적으로 초유가 정상유 보다는 성장인자의 발현이 높고 비유기간이 지남에 따라 성장인자의 농도는 감소한다(Odle 등, 1996). 이것은 초유가 갖 태어난 신생동물의 소화기관 및 면역계의 발달 등에 무척 중요한 역할을 하고 있음을 입증한다. 초유와 정상유에 성장인자의 함량이 많다고는 하나 혈청에는 체내에서 합성된 성장인자로 인하여 더 많은 양이 존재하며 대부분 순환계로부터 유래되는 것으로 여겨진다(Burrin, 1997). 이것의 정확한 기작은 현재까지 밝혀지지 않고 있으나 유선조직에서의 type I 과 type II IGFs 수용체의 발현을 근거로 할 때 혈액으로부터 유선세포에 도달한 성장인자는 세포에 있는 수용체와 결합한 후 수용체중재 내포작용에 의하여 유두조에 모이는 것으로 추측된다(Oh 등, 1993). 새로 태어난 소의 장상피세포에서 IGFs수용체가 발현되는 것으로 미루어 음식을 통하여 섭취된 IGFs는 소화 장기의 발달에 직접적인 영향을 주거나 혹은 순환계에 흡수되어 체내생리작용에 관여하는 것으로 예측된다.

따라서 초유에 들어있는 각각의 성장인자들은 새로이 태어난 동물의 발달을 위한 생리대사의 촉진에 관여하고, 이후에는 성장인자들이 활발한 체세포 성장과 발달 등의 신체 대사작용을 위한 매개체로서의 역할을 수행한다. 분만 전 모체의 나쁜 영양상태로 인해 성장발달이 다른 것에 비해 느린 신생개체에게 분만 후 성장인자의 투여는 곧 정상적으로 성장한 다른 개체들과 비슷한 발달수준으로 끌어올렸다는 연구결과들이 보고되었다 (Muaku 등, 1997; Schoknecht 등, 1997). 이는 비정상적 발달형태를 보이는 동물의 보상성장을 의미함과 동시에 어린 동

물의 성장기간동안 우유 안에 함유되어 있는 성장인자의 중요성을 확인케 해주는 결과이다.

IGFs의 종류로는 소의 경우 IGF-I, IGF-II 및 변형체인 des(1-3)IGF-I등이 발견되어 정제되었다. IGF-I과 비교하여 3개의 아미노산이 짧은 des(1-3)IGF-I은 IGFs와 결합하는 결합단백질의 친화력의 감소로 인하여 다른 IGFs보다 더 강한 생물학적 활력을 가지고 있으며, 이것의 초유에서의 상대적 발현정도는 IGF-I: IGF-II: des(1-3)IGF-I이 약 1: 0.05: 2의 비율로 나타나는 것을 근거로 초유에서의 강한 IGFs 활력은 주로 des(1-3)IGF-I에 의한 것으로 알려져 있다. 한편, 혈액내 존재하는 IGFs들은 보통 6 종류의 IGFs 결합단백질 (binding protein ; BP) 과 결합하는데 IGFBP-2와 -3의 존재가 정상유에서 확인되었으며, 약 99%의 IGFs는 BP와 결합된 상태로 존재하며 IGFBP protease system은 IGFs와 BP와의 결합을 제거하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (Ode 등, 1996). 하지만 IGFBP이 장내의 단백질 분해효소나 장내 IGFs 수용체와의 결합을 촉진하는지 여부는 확실히 밝혀지지 않은 상태이며, 효율적인 des(1-3)IGF의 분리정제를 위해서는 IGFBP과 protease system의 상호작용에 대한 다각적인 연구가 요청된다.

Hadsell 등(1996)은 human des(1-3)IGF-I의 over-expression을 위한 transgenic mouse model을 보고하였고, transgenic mouse를 통해 회수된 human des(1-3)IGF-I의 농도는 약 50 µg/ml 수준으로 정상적인 개체에서 보다 수십~수백 배의 높은 수준이다. 따라서 이러한 결과물들을 이용하여 정제와 가공공정 그리고 안전성 검증을 거쳐 의약품의 개발에 이용된다면 IGFs 결핍의 병리현상을 치료하는 교두보를 마련할 것으로 사료된다. 쥐에서의 IGF-I은 casein 유전자 발현과 glucose 운반을 촉진하며, IGFs 투여시 신생개체에서 장내 hydrolyase, 특히 lactase의 활력을 발달시키는 것으로 나타났다. 이 결과는 식이에 함유된 탄수화물의 대사에 IGFs가 관여하여 생리적 기능을 증진시킬 수 있음을 제시하는 것이다(Prosser 등, 1987 ; Burrin, 1997). 혈장내 IGFs의 존재 수준은 성숙 동안 혹은 bone mass가 최고에 이를 때에 최상을 나타내며, 이후 시간이 지남에 따라 IGFs 존재 수준이 혈장내에서 감소하는 경향과 노화에 의한 골질현상의 증가간에는 연관성이 있음이 밝혀졌다(Rosen, 1999). 이는 IGF-I이 뼈세포의 대사

과정에 관여함을 나타내며 노년층에서 늘어나는 골질의 증가는 적정수준의 IGFs의 식품내 강화로도 효과를 나타낼 가능성을 의미한다. IGF-I은 *in vitro*에서 근육발달에도 영향을 미치며 골격근과 평활근에서 지엽적인 조직손상의 복구에 관여하는 것으로 나타났다(Goldspink, 1999).

## 제 2 절 앞으로의 전망

국내 유가공 산업은 1990년대에 꾸준한 성장을 보였으나 97년말 외환위기와 98년의 환율 급등으로 인한 사료비와 원유 생산비의 급격한 상승으로 원유와 유가공 제품의 가격인상이 불가피 하였고, 더욱이 축산물의 수입개방화 결정은 국내 낙농산업의 가격 경쟁력을 떨어뜨려 안정적인 수요기반 조성이 시급히 요청된다. 따라서 외국의 값싼 낙농제품과 경쟁하려면 고품질의 차별화된 유제품의 개발이 필수적이다.

우유 내 존재하는 성장촉진인자의 영양 생리학적 중요성은 동물 및 임상실험에서 이미 입증되었고 정확한 작용기전과 생체 내 각 기관에 미치는 효과의 구명을 위한 노력이 계속되고 있다. 우유에 존재하는 대표적 생리활성 물질중의 하나인 IGFs의 활성을 유제품 가공공정 중 안정화시키는 방안은 연구수행 종료 즉시 현실적으로 적용이 가능하며 우유의 영양적 가치를 증진시켜 고부가가치의 유제품을 생산한다는 전략에 부합된다. 또한 IGFs의 식품 내 첨가가 허용될 경우, 본 연구에서 설정된 강화시기, 강화수준, 강화방법 및 안정성에 대한 관련기술을 산업체에 이전하여 빠른 기간 내에 상업화가 가능할 것이다.

## 제 3 절 기술도입의 타당성

본 연구에 관한 제반기술들은 아직 선진국에서도 조차 연구단계에 있으며 완전히 기술이 정립되어 있지는 않다. 더욱이 성장인자에 대한 식품첨가 및 생리활성 물질로서의 안전성이 검증되지 않은 현 시점에서 선진국의 기술 도입은 불필요하다. 오히려 본 연구에서 생리활성이 유지될 수 있는 적절한 첨가 수준과 그에 따른 안전성이 입증된다면 이 기술들을 선진 낙농국가에 수출할 수 있을 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 제1세부과제 : 유제품내 IGFs의 강화 방안 연구

#### 1. 이론적 접근 방법

우유에 존재하는 중요한 생리조절 물질 가운데 대표적인 것의 하나는 성장인자이다. 이러한 성장인자는 호르몬과 비슷한 생리적 효과를 나타내며, 생리적 대사작용을 조절할 뿐만 아니라 세포의 성장과 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이중 insulin-like growth factor(IGF)-I과 -II는 조사된 모든 포유동물의 유즙에서 발견되었으며(Donovan 와 Odle, 1994), 동일 종 내에서는 품종, 산차수, 비유기간에 따라서 발현정도에 차이를 보이고 있다(Simmen 등, 1990; Collier 등, 1991). 전반적으로 초유가 정상유 보다는 성장인자의 발현이 높고 비유기간이 지남에 따라 성장인자의 농도는 감소한다(Odle 등, 1996). 이것은 초유가 갖 태어난 신생동물의 소화기관 및 면역계의 발달 등에 무척 중요한 역할을 하고 있음을 입증한다. 초유와 정상유에 성장인자의 함량이 많다고는 하나 순혈청에는 체내에서 합성된 성장인자로 인하여 더 많은 양이 존재하며 대부분 순혈청으로부터 유래되는 것으로 여겨진다(Burrin, 1997). 이것의 정확한 기작은 현재까지 밝혀지지 않고 있으나 유선조직에서의 type I 과 type II IGFs 수용체의 발현을 근거로 할 때 혈액으로부터 유선세포에 도달한 성장인자는 세포에 있는 수용체와 결합한 후 수용체중재 내포작용에 의하여 유두조에 모이는 것으로 추측된다(Oh 등, 1993). 새로 태어난 소의 장상피세포에서 IGFs 수용체가 발현되는 것으로 미루어 음식을 통하여 섭취된 IGFs는 소화 장기의 발달에 직접적인 영향을 주거나 혹은 순혈청에 흡수되어 체내생리작용에 관여하는 것으로 예측된다. 따라서 초유에 들어있는 각각의 성장인자들은 새로이 태어난 동물의 발달을 위한 생리대사의 촉진에 관여하고, 이후에는 성장인자들이 활발한 체세포 성장과 발달 등의 신체 대사작용을 위한 매개체로서의 역할을 수행한다. 분만 전 모체의 영양상태로 인해 성장발달이 다른 것에 비해 느린 신생개체에게 분만 후 성장인자의 투여는 곧 정상적으로 성장한 다른 개체들과 비슷한 발달수준으로 끌어올렸다는 연구결과들이 보고되었다(Muaku 등, 1997; Schoknecht 등, 1997). 이는 비정상적 발달형태를 보이는 동물의 보상성장을 의미함과 동시에 어린 동물의 성장기간동안 우유 안에 함유되어 있는 성장인자의 중요성을 확인케 해주는 결과이다.

위와 같은 견지에서 본 연구에서는 유가공제품 내에 첨가될 성장인자인 원유내 IGFs의 존재 특성 및 함량 조사를 통해 그 생리활성 기능을 구명하고 나아가 개발된 유제품을 제조하는데 기초를 확립하기 위한 연구와 국내시판중인 다양한 형태의 유제품에 존재하는 성장인자의 함량을 분석하였으며 원유를 이용하여 열처리, pH 변화, 압력, 농축조건에 따른 IGFs 함량 및 활성의 변화를 lab scale로 조사하여 기초적인 변화 양상을 확인하였다. 또한 다양한 유가공과정 조건에서 일어나는 IGFs의 함량 변화를 조사한 후, 성장인자의 소멸 및 활성저하를 일으키는 구체적 공정을 구명하고 각 단계별 위해 요소를 최소화 할 수 있는 조건에 대하여 연구하였다.

#### 2. 실험적 접근 방법

##### 가. 원유 시료의 확보 및 IGFs의 산차 및 비유기별, 계절별 변화

### 1) 산차별 구분

본 실험에 필요한 원유는 산유능력검정에 참여하고 있는 경기북부지역 (양주군 소재) 각기 다른 두 목장에서 초산우 각각 4, 8두와 다산우 각각 31, 27두로서 35두씩 총 70두를 대상으로 하여 원유를 12개월간 (2000년 9월 - 2001년 8월) 착유시 개체별로 수거하여 시료로 사용하였다.

### 2) 비유기별 구분

비유기별 구분은 3단계로 나누어 분만 후부터 90일까지를 비유전기, 91일부터 180일까지를 비유중기, 181일부터 305일까지를 비유후기로 구분하였다.

### 3) 계절별 구분

12개월간 수거한 시료를 대상으로 3, 4, 5월에 수거를 실시한 시료는 봄, 6, 7, 8월에 수거한 시료는 여름, 9, 10, 11월에 수거한 시료는 가을, 12, 1, 2월에 수거한 시료는 겨울로 구분하였다.

#### 나. 공시우군의 사료급여패턴

공시우군의 사료급여 종류 및 급여량을 조사하여 총 급여량을 백분율로 표시한 결과 및 영양소 함량계산결과는 Table 1과 같다.

**Table 1. Ingredients composition of feed**

**다. 상유 및 초유의 유청분리**

개체별로 채취한 원유에 0.02%의 sodium azide를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 4℃ 에서 20분 동안 원심 분리(9,000 r.p.m) 하여 지방층을 제거하였다. 탈지유로부터 등전침전 (pH 4.6)을 이용하여 침전물(casein)을 제거하였으며 분리수집된 유청은 각각 eppendorf tube에 분주하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 초유는 분만 직후 6시간, 12시간, 18시간 간격으로 해당 개체별 3회씩 수거하여 냉동보관 한 후 실험당일 4℃에서 해동하여 상유와 동일한 방법으로 유청을 분리하여 시료로 사용하였다.

**라. Iodination**

IGF- I 을 0.1 M acetic acid (0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l)에 용해시켜 4℃, 2,500 r.p.m에서 5분간 원심분리한 후 상정액을 중화시키기 위해 0.5 M sodium phosphate (pH=7.0)를 가하고, 0.35mCi Na<sup>125</sup>I 과 산화반응촉매제인 chlamine T 8 $\mu$ l (2.4mg/ml 0.01 M sodium phosphate, pH 7.0)를 첨가하여 25초간 iodination을 실시하였다. 그 후 환원제로서 16 $\mu$ l의 sodium metabisulfite (12mg/ml 0.01M sodium phosphate, pH 7.0)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. Iodination된 혼합물은 0.02%의 sodium

Farm A (Ingredients %, As fed basis)		Farm B (Ingredients%, As fed basis)	
Beet pulp	10.8	Beet pulp	7.7
Cotton	9.0	Alfalfa bale	7.7
Tall fescue	4.3	Cotton	9.6
Corn silage	18.0	Sudan grass hay	15.3
Timothy hay	9.0	Tall fescue	13.4
Oat hay	2.9	Concentrates	46.0
Rice straw	2.9	By-pass fat	0.1
Alfalfa bale	7.2		
Concentrates	36.0		
$\beta$ -carotene	0.1		
Total	100.0	Total	100.0
Calculated analysis(% , DM basis)		Calculated analysis(% , DM basis)	
Dry matter	77.51	Dry matter	88.15
NEI(Mcal)	1.72	NEI(Mcal)	1.71
TDN	73.34	TDN	76.74
Crude Protein	16.36	Crude Protein	17.54
Crude Fiber	17.26	Crude Fiber	18.25
Ca	0.66	Ca	0.71
P	0.39	P	0.46
VitA(IU/kg)	84,374	VitA(IU/kg)	95,057
VitD(IU/kg)	2,782	VitD(IU/kg)	3,134
VitE(IU/kg)	16	VitE(IU/kg)	18

azide가 함유된 1×PBS buffer (132 mM NaCl, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.5)로 미리 평형시킨 Sephadex-G50 column(1×50cm)에 loading하여 [<sup>125</sup>I] IGF- I fraction peak가 용출되는 분획을 수거하여 방사능을 측정 한 후 IGF- I tracer로서 사용하였다.

#### 마. IGF- I 의 함량분석(Radioimmunoassay)

개체별로 얻어진 원유 및 초유의 유청으로부터 Radioimmunoassay(RIA)방법으로 IGF- I 의 양을 다음과 같이 측정하였다. 각 시료들 (100 $\mu$ l)은 400 $\mu$ l의 acid ethanol (87.5% ethanol, 12.5% HCl)과 혼합하여 상온에서 1시간 동안 정치 후 4 $^{\circ}$ C에서 1,800 $\times$ g로 30분간 원심분리하여 IGF- I 을 binding protein으로부터 분리하였다. 상징액 50 $\mu$ l에 RIA buffer (0.035M sodium phosphate, 0.02% protamine sulfate, 0.05% Tween-20, 0.02% sodium azide, pH7.5)를 100 $\mu$ l 첨가하고 0.1ml의 희석된 rabbit anti-Human IGF- I polyclonal antiserum (Gropep Pty Ltd., Austrailia)을 첨가하였다. 각각의 glass tube에 0.1ml 씩 20,000 cpm [ $^{125}$ I] 의 IGF- I 을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 이상 정치 후 희석된 human anti-rabbit IgG antibody (Gropep Pty Ltd., Austrailia)를 0.1ml씩 첨가하여 다시 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치하였다. 침전물을 얻기 위해 normal rabbit serum을 각각의 glass tube에 0.1ml씩 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치시켰다. 그 후 1ml의 RIA 완충액을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C 3,000 x g에서 30분간 원심분리하여 상징액을 제거한 후 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter를 이용하여 시료별로 1분간 방사면역활성도를 측정하였다.

#### 바. Gel filtration chromatography에 의한 초유 whey IGF Binding Protein (IGFBP)내 IGF- I 함량측정

IGFBP로부터 IGF를 분리시키기 위해 Donovan 등(1994)의 방법에 따라 유청 3ml를 동량의 0.2M formic acid로 처리한 뒤 4 $^{\circ}$ C, 3,000 r.p.m에서 15분간 원심분리한 후 상징액 1,500 $\mu$ l를 Sephadex-G50 gel filtration column (0.9 $\times$ 95cm)에 주입하고 0.05 M phosphate buffer로 tube 당 2ml씩 시간 당 20ml의 속도로 용출하였다. Gel filtration이 끝난 시료는 spectrophotometer를 이용하여 280nm 에서 흡광도를 측정하였다. IGFBP과 IGF peptide를 함유한 분획으로 추정되는 38-50ml 구간과 51-66ml의 구간, 그리고 72-108ml 구간을 회수하여 분획별로 1.5ml씩 분주하고, speed vac으로 건조시켰다. 그 후 100 $\mu$ l의 RIA buffer에 시료를 재용해시켜 상기의 방법으로 RIA를 실시하였다.

**사. Sephacryl column chromatography에 의한 초유 whey의 IGF-binding pattern 측정**

Iodine으로 표지된 IGF- I 이 IGFBP 복합체에 결합되는 양상을 보기 위해 초유 유청 600 $\mu$ l를 Iodine labeled IGF- I 60,000cpm과 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 반응시켰다. 이 혼합물을 1 $\times$ PBS buffer로 미리 평형시킨 Sephacryl S-100 column (2.6 $\times$ 13cm)에 가하고 한 튜브 당 20 방울(2ml)씩 시험관에 수집하여 각 시험관의 방사능을 gamma counter를 이용하여 1분간 방사면역활성도를 측정하였다.

**아. 시판 유제품 내 인슐린유사성장인자 분석**

우유 및 유제품 내 IGF- I 함량의 측정을 위하여 실험에 사용된 국내 시유 및 유제품 내역은 Table 2와 같다. 시유는 5개 회사 제품(이하 A, B, C, D, E)이 사용되었고, 전지분유, 탈지분유 및 조제분유(2개 업체) 및 초유분말유제품은 (이하 A, B, C, D, E)로 구분하였으며, 발효유제품의 경우 7개 제품(이하 A, B, C, D, E, F, G)이 농축유는 1개 업체의 가당연유 샘플을 분석 대상으로 하였다.

**Table 2. Classification based on commercial dairy products**

Dairy products	Samples	notes
Market milk	A, B, C, D, E	With no additives and fortified milk
Dried milk products	A, B, C, D, E	A : Whole dried milk B : Dried skim milk C, D : infant formula milk E : Colostrum milk powder
Fermented milk products	A, B, C, D, E, F, G	Plain type yoghurts
Concentrated milk products	A	Sweetened condensed milk

## 1) 시료의 처리

### 가) 시 유

5개 시중제품이 분석에 이용되었으며, 그 중 1개 제품은 72~75 °C 15초간 살균하는 고온장시간살균법(HTST)으로 제조된 제품이고 나머지 4개 제품은 130~135 °C에서 2초간 살균된 초고온순간살균법(UHT)으로 제조된 제품이었다. 시유에 0.02%의 sodium azide를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 4°C 에서 20분 동안 원심 분리(9,000 r.p.m) 하여 지방층을 제거하였다. 탈지유로부터 등전침전 (pH 4.6)을 이용하여 침전물(casein)을 제거하였으며 분리 수집된 유청은 각각 eppendorf tube에 분주하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 나) 발효유

7개 시중제품이 분석에 이용되었으며, 발효유에 0.02%의 sodium azide를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 4°C 에서 20분 동안 원심 분리(9,000 r.p.m) 하여 유청을 분리한 후 분리 수집된 유청을 각각 eppendorf tube에 분주하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 다) 전지분유, 탈지분유, 조제분유 및 초유분말유제품

건조유제품은 최종고형분함량이 10%가 되도록 증류수에 용해, 환원시킨 다음 시유와 동일한 방법으로 전 처리하여 유청을 분리하였다.

### 라) 농축유제품

농축유제품인 가당연유는 예열, 농축 및 가당 등의 공정으로 인한 농축비율만큼 2.5배로 환원한 후 분리된 유청부분을 수거하여 분석에 이용하였다.

#### 마) 치즈유청

치즈 유청은 모짜렐라치즈 제조공정시 커드로부터 유청분리과정 중 생성되는 Sweet whey를 시료로 하여 분석에 이용하였다.

### 자. 원유 제조공정에 따른 IGF- I 의 함량변화

#### 1) 가열처리에 따른 우유 및 유청 내 IGF- I 의 함량변화(집합유)

실험에 사용된 원유는 경기북부지역 목장의 집합유를 수거하여 시료로 사용하였다. 채취한 원유는 0.02%의 sodium azide를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 4℃, 9,000×g에서 20분동안 원심분리하여 탈지유를 조제한 다음 pH를 4.6으로 조정하고 다시 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 케이션과 유청을 분리하였다. 분리 수집된 유청은 각각 eppendorf tube에 분주하여 분석 전까지 -70℃에 저장하였다. 열처리 조건은 유청을 분리하기 전과 분리 한 후에 65℃, 75℃ 및 85℃의 열처리온도구간에서 10분, 20분, 30분 및 autoclave조건(121℃, 15분)에서 각각 실시되었다.

#### 2) 가열처리에 따른 초유 및 우유 유청 내 IGF- I 의 함량변화(개체유)

자. 1)의 실험 결과에 의거하여 개체별 열처리 조건 중 IGF- I 의 활성이 최대로 유지되는 온도구간을 설정한 뒤 초유 및 개체유를 대상으로 각각 수거하여 시료로 사용하였다. 채취한 초유는 탈지 후 동량의 증류수를 첨가한 뒤 자. 1)의 방법에 따라 유청을 분리하였다. 분리 수집된 유청은 각각 cap tube에 분주하였으며, 항온수조를 이용하여 75℃, 30분간 열처리하였다.

#### 3) 균질-살균에 의한 변화

균질 및 살균에 의한 변화는 A우유회사의 Pilot plant에서 이루어지는 과정을 기초로 하여 실험을 수행하였다. 즉, 목장에서 이송된 집합유를 대조군으로 하고,

상업적인 균질이 이루어지는 150bar의 고압으로 유지방을 잘게 부순다음 130 ℃ 2초간 UHT 살균한 샘플을 수거한 후 IGF- I 함량을 분석하였다. 분석은 원유 자체 IGF- I 함량과 유청 분리 후의 함량 두 가지 경우로 나누어 분석하였다.

#### 4) 농축-건조에 의한 변화

농축유는 전지분유 공정 시 분무건조의 전단계 과정에 의거하여 1차 살균부에서 73℃, 2차 살균 부에서 82℃로 살균된 원유를 15초간 holding한 후 4중 효용 농축기에서 진공농축하였으며 스팀압은 13bar, 효용관의 온도범위는 55~ 73 ℃의 범위에서 비중이 1.107~1.108, 총 고형분 함량은 40~45%로 되는 구간에서 샘플을 채취하였다. 그 후 농축유는 150bar의 압력에서 균질된 뒤 75~180℃ 온도구간에서 열풍건조 후 상온인 25℃에서 냉각되어 건조되었다. 분무건조된 분유 샘플을 수거하여 IGF- I 분석에 이용하였다.

#### 5) 연속처리에 의한 원유→균질유→살균유→분유제조공정시 활성변화

IGFs의 구체적인 활성변화를 연속작업으로 알아보고자 고려대학교 부속농장에서 수집된 원유를 수거하여 식품가공라인의 pilot plant 에서 균질유 및 살균유를 개별적으로 회수하여 IGF- I의 활성을 측정하였다. 즉, 상업적인 균질의 조건 구간인 200bar 압력구간에서 원심식 균질기를 이용하여 균질을 실시한 후, 65, 75, 85℃ 15분 및 현재 시제품이 만들어지는 온도구간인 85℃ 3분간 살균처리 한 후 얻어진 원유를 소형분무건조기를 이용하여 140-150℃의 inlet temperature 및 70℃의 outlet temperature 조건에서 분무건조 후 각 단계별로 IGF- I의 활성변화를 추적하였다.

#### 6) 발효유 조제 시 pH 변화에 따른 IGF- I 함량 변화 측정

발효유 제조 시 pH 변화에 따른 IGF- I의 함량변화가 있는지 알아보고자 10% 환원탈지유 배지를 조제한 후 autoclave(121 ℃, 15분)살균조건 및 비살균배지를 만든 후 0.1% 및 1.5%의 mixed yoghurt culture를 starter로 하여 37 ℃에서 약 18~20시간 동안 mild acid production 상태에서 배양하였다. 그 후 pH 변화에 따른 IGF- I 함량수준은 0.1% 스타터 첨가구의 경우 유산균 접종 후 1, 6, 9,

12, 18 hr의 5개 구간으로, 1.5% 스타터 첨가구는 2, 5, 7, 9, 11, 13, 20 hr의 7개 구간으로 나누어 샘플을 수거한 뒤 분석에 이용하였다.

## 7) 초유유청분말의 배지 내 첨가가 발효유 조제시 IGF-I 함량에 미치는 영향

### 가) 시 유

탈지 및 casein의 등전침전에 의해 얻어진 초유유청을 65 °C, 30분간 저온살균한 후, microfiltering하여 제균한 뒤, 저온살균처리한 원유에 20%의 강화 농도로 습식강화샘플을 조제하였다. 건식초유유청분말은 동결건조에 의해 조제한 후, 무지고형분 함량의 20%의 농도로 첨가한 뒤 용해시켰다. 강화된 시유는 재차 유청을 분리한 뒤 저장성실험은 유통기한의 1.5 배인 12일까지 실시하였으며, 4°C의 냉장 상태에서 보존한 후 0일, 4일, 8일, 12일째 수거하여 유청을 분리한 뒤 eppendorf tube에 분주한 후, 분석 전까지 -70 °C에서 냉동시켰다.

### 나) 분 유

상기 동결건조 초유 유청에서 유래한 IGF-I 을 20%의 농도로 강화한 뒤 분무건조 탈지분유와 혼합 후 vacuum sealing한 뒤, 최종고형분함량이 10%가 되도록 증류수에 용해, 환원시킨 다음 시유와 동일한 방법으로 전 처리하여 유청을 분리한 뒤 저장성 실험은 가속화된 저장수명 원리에 입각하여 1개월 간 상온 및 36 °C에서 저장 후 유청을 분리한 뒤 eppendorf tube에 분주한 후, 분석 전까지 -70 °C에서 냉동시켰다.

### 다) 발효유

상업용 균주를 이용하여 발효가 완료된 8% 환원탈지분유 배지에 20%의 건식, 습식으로 초유유래 IGF-I 을 첨가하여 완전히 분쇄시킨 후 샘플을 수거하여 저장성실험은 유통기한의 1.5배인 18일까지 실시하였으며, 4 °C의 냉장 상태에서 보존한 후 0일, 6일, 12일, 18일째 수거하여 eppendorf tube에 분주한 후, 분석 전까지 -70 °C에서 냉동시켰다.

## 차. 초유유청분말의 microencapsulation

발효유 제조 시 초유유청분말의 캡슐화가 IGF- I 함량에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 캡슐을 제조한 뒤 발효 전/발효 후에 첨가한 뒤 캡슐의 재질은 장용성 제제 2가지를 선정하였으며, 캡슐화의 조건은 아래 Table 1과 같다. 일반적으로 Whey의 경우 microencapsulation 에서 carbohydrates와 emulsifying 또는 coating 제제(wall)로 쓰이는 것으로 알려져 있다(Young et al.,1981).

### 1) 사용한 피복제제

Hybridization system을 이용하여 미세캡슐화하는 과정에서 Table 3에 제시된 재료를 이용하였다. 사용된 피복제들은 주로 강산성인 위장 내에서 안정하며 표적기관인 장내에서 용해되는 특성을 가진 장용성 제제를 선택하였다.

**Table 3. Capsulation materials.**

Commercial Name	Specificity	Makers
Eudragit L100-55	pH-dependent enteric film material	Rohm Pharma/Germany
Sureteric	pH-dependent enteric film material	Colorcon/UK

### 2) 주사전자현미경(SEM)에 의한 분체표면분석

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체의 표면을 측정하였다. 관찰 시료는 양면테이프를 알맞은 크기로 잘라 표본대에 부착한 후 그 위에 분말을 가볍게 떨어뜨렸다. 준비된 표본은 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시켰다. 표본의 형태는 15kV의 accelating voltage에서 관찰하였으며 대표적인 화상을 즉석필름(FP-3000B45, 9 × 12 cm, Fuji, Japan)으로 출력하여 비교하였다.

## 카. 통계 분석

Data 분석은 SAS (SAS institute, Carry, NC)를 이용하여 one-way ANOVA와 GLM 방법에 따라 실시하였으며 각 처리구의 평균들 간 차이의 유의성 분석은 Duncan의 다중검정법에 의해 실시하였고 각 항목 간의 상관도를 추정하였다.

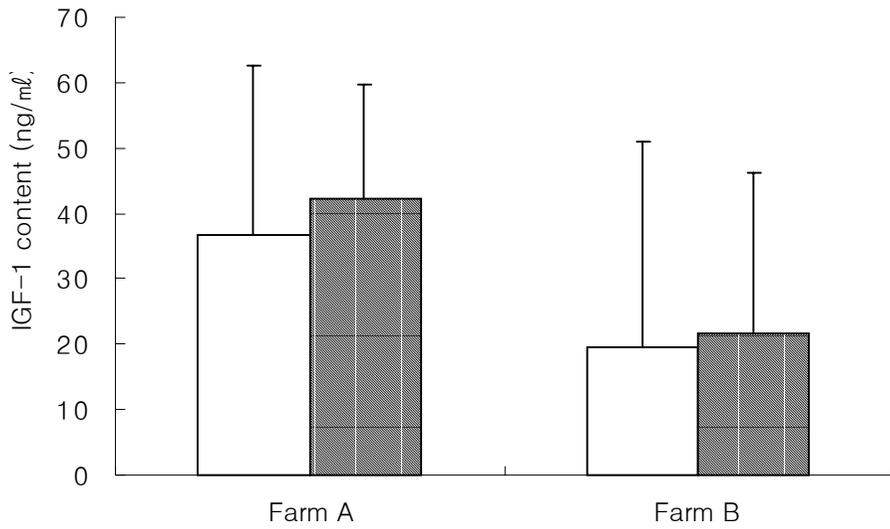
### 3. 연구개발수행 내용 및 결과

#### 가. 환경요인에 따른 우유내 IGFs 존재 수준의 변화

수거된 원유를 대상으로 각 계절별 IGFs의 존재 수준의 변화를 조사하고 비유기간 동안의 각 IGFs의 농도를 비교·분석하였다.

##### 1) 산차별 IGF- I 함량

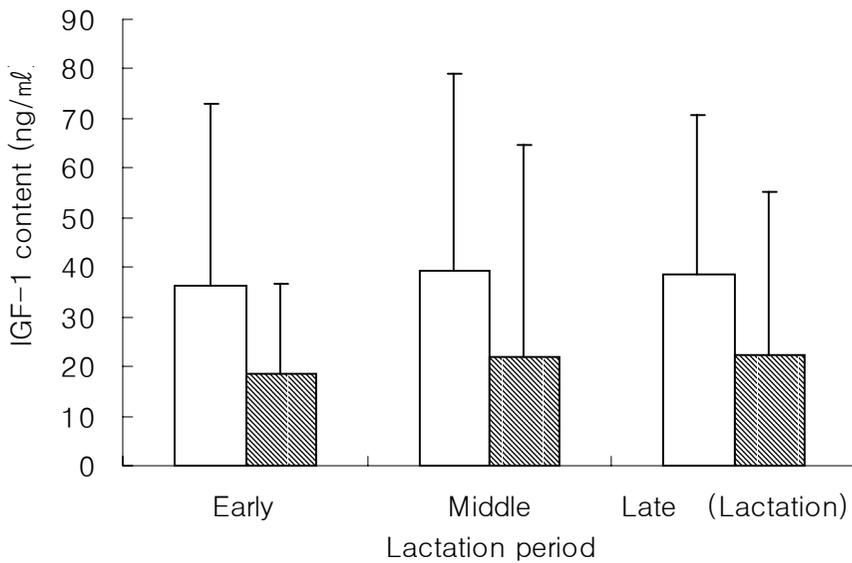
산차별 IGF- I 함량은 에 나타난 바와 같다. 즉, 2000년 9월부터 2001년 8월까지 12개월간 645두의 자료를 분석한 결과 상유 내 IGF- I 함량은 산차가 높아질수록 전반적으로 그 함량이 감소하였다. Collier 등(1991)은 409두의 젖소를 대상으로 우유내 IGF- I 함량을 측정하였는데, 이 중 14% (56두)는 그 함량이 0.3 ng/ml 이하로, 1% (4두)는 12ng/ml 이상으로 나타났다고 하였다. 본 연구에서는 원유내 인슐린 유사성장인자가 다량 분포하고 있는 유청을 별도로 분리한 후 IGF- I 농도를 측정한 결과 상대적으로 그 수치가 높게 분포하는 결과를 보였다. 또 이들은 IGF- I 농도와 산차와의 관계에서 초산우의 경우보다 (2.3ng/ml), 다산우 (2산)의 경우가 (3.0ng/ml)으로 약간 높게 나타났다고 보고하였으나, 본 실험에서는 이와는 반대로 A 목장에서 수거한 시료 중 다산우는 39.7ng/ml이고 초산우의 경우 48.0ng/ml으로 분석되었으며 B목장에서 수거한 시료 중 다산우는 21.7ng/ml인 반면 초산우는 19.5ng/ml의 IGF-I의 함량을 보인 것으로 미루어 산차별 IGF-I의 함량은 유의적인 차이가 없는 것으로 사료되었다.



**Fig. 1.** Mean IGF- I content in primiparous and multiparous milk whey. Open bar represents content of milk IGF- I in primiparous(n=320), and hatched bar represents content of milk IGF- I in multiparous milk whey(n=325).

## 2) 비유기별 IGF- I 함량

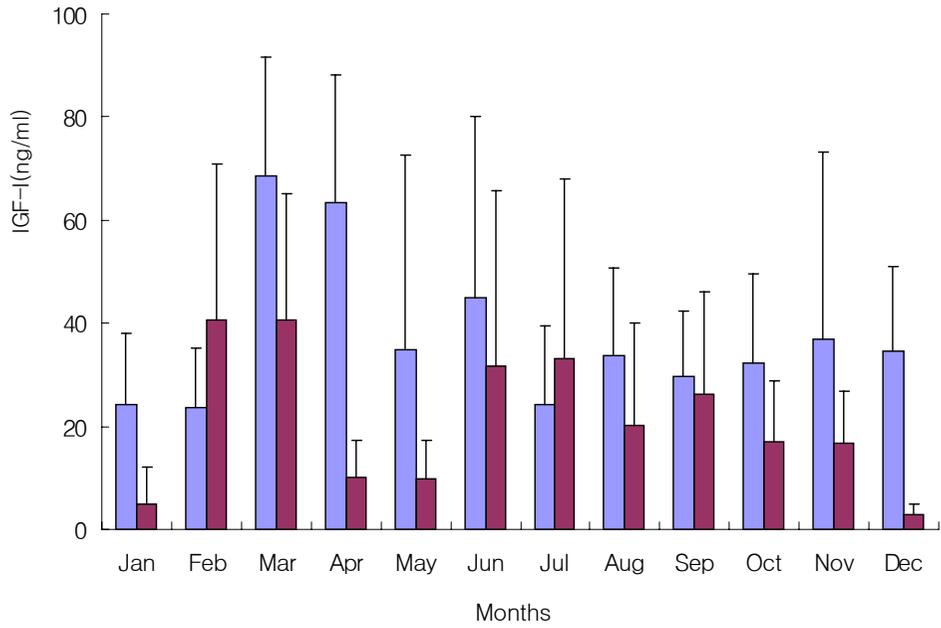
비유기별 IGF- I 함량은 Figure 2와 같다. Collier 등(1991)은 상유내 IGF- I 함량과 비유기에 있어 비유초기(6-15일)의 IGF- I 함량이 평균 6.3ng/ml인 반면, 비유후기에 접어드는 150-210일경에는 그 농도가 평균 1.5ng/ml로 떨어진다고 보고하였다. 본 연구에서 비유 초기의 IGF-I의 함량은 A 목장의 시료의 경우 36.2ng/ml, B 목장은 18.4ng/ml이었고 비유 중기에는 비유초기보다 다소 높게 나타났는데 각각 39.3, 21.9ng/ml로 분석되었다. 비유말기에는 A, B 목장 시료에서 각각 38.5, 22.2ng/ml의 IGF-I의 함량이 분석되었다. 기존 보고와는 달리 본 연구에서는 비유기별 IGF-I의 함량에 있어서 유의적인 차이가 보이지 않았으며 이는 비유시기를 나누는 각기 다른 기준으로 인한 것으로 사료될 수 있다.



**Figure 2.** Mean IGF- I content in milk whey during the entire lactation period. Open bar represents content of milk IGF- I in farm A (n=320), and hatched bar represents content of milk IGF- I in farm B (n=325).

### 3) 계절별 IGF- I 함량

계절별 IGF- I 함량은 Fig. 3과 같다. 본 연구결과 3월, 4월에 그 함량이 각각 68.58ng/ml, 63.49ng/ml로 높게 나타났으며, 1월과 2월에는 24.29ng/ml, 24.76ng/ml로, 봄철이 겨울철보다 높은 결과를 보였다. 그러나 계절에 따른 IGF-I의 함량은 유의적인 차이가 없는 것으로 분석되었다. 이는 IGF-I 함량이 지역별, 계절별로 1 ~ 83ng/ml 수준으로 다양하게 분포한다는 Daxenberger (1998)등의 보고와도 유사한 결과이다.



**Figure 3.** IGF- I concentration in milk whey throughout year period obtained from two different farms. Open bar indicate IGF- I content in milk obtained from farm A (n=320), and hatched bar indicate that from farm B

(n=325).

#### 4) 젖소 초유 내 IGF- I 함량

본 실험에서 나타난 초유 개체별 IGF- I 함량은 Table 4와 같으며, 분만 후 6 시간에 그 함량이 1,300±336~4,615±2,792ng/ml 로 가장 높았으며, 시간이 경과함에 따라 그 함량이 감소하는 추세를 보여, 분만 후 12 시간에는 319±0.3 ~ 2,288±563ng/ml 수준이었으며, 18 시간이 경과된 초유는 513±163 ~ 111±53 ng/ml 까지 감소하였다. 따라서 IGF- I 함량은 분만직후의 경과 시간에 의해 크게 영향을 받음을 알 수 있으며, 다산우의 초유내 IGF- I 함량이 초산우보다 높은 경향을 나타내었다. 이는 Campbell과 Baumrucker(1989)의 보고와 일치하는데, 이들은 산차가 진행될수록 세포당 IGF- I receptor 수의 증가, 유선상피세포 내 IGF- I 수용대사율의 증가, 그리고 대사체중의 증가등에 기인하는 것으로 설명하였다. 한편, 젖소 초유 내 IGF- I 의 함량은 보고자에 따라 200ng/ml, 100-450 ng/ml, 2,000ng/ml, 50-150ng/ml, 450-500ng/ml 등으로 다양한 변이를 보이고 있다. (Donovan 등, 1991; Donovan 등, 1994; Hadley. 1996).

**Table 4.** Concentration of IGF- I in bovine colostrum whey<sup>1)</sup>

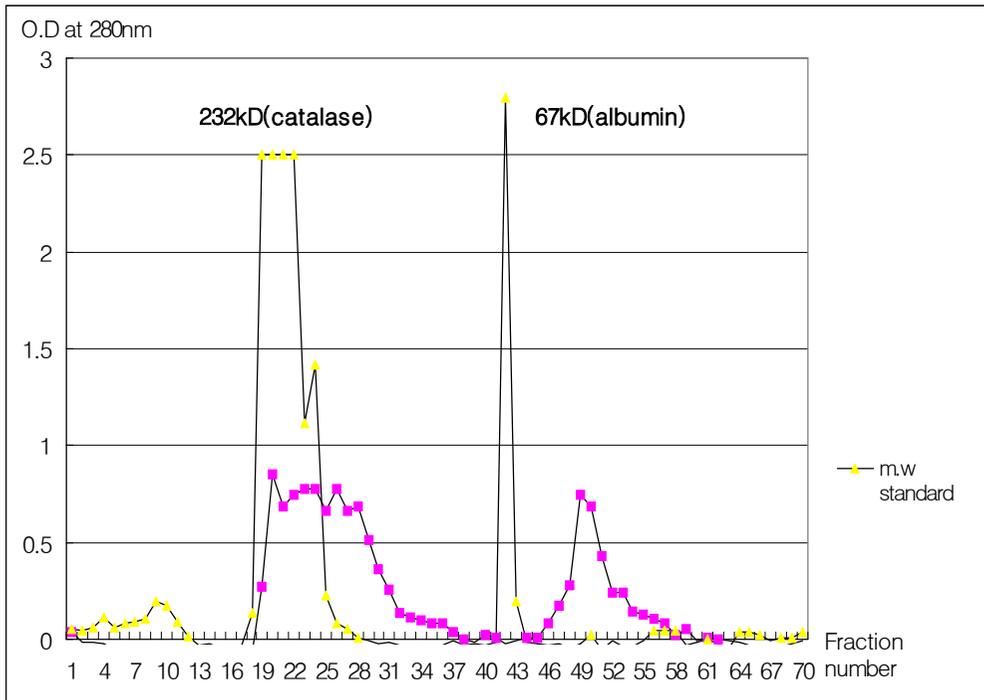
Individual	Parity	IGF- I in colostrum whey after postpartum (ng/ml)		
		6hr	12hr	18hr
1	M	4,615.3	2,288.7	513.9
2	M	1,300.9	1,192.4	433.2
3	M	2,967.0	319.2	111.2
Mean		2,961.1 <sup>a</sup>	1,266.8 <sup>a</sup>	352.8 <sup>a</sup>
1	P	1,548±145	1,112±266	341±84
2	P	1,311±22	319±0.3	374±112
Mean		1,430.5 <sup>b</sup>	716.0 <sup>b</sup>	358.2 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> The values followed by the different within a column are significantly different. M : Multiparous, P : Primiparous.

### 5) Neutral gel filtration chromatography에 의한 초유 whey IGF- I 함량측정

IGF는 친화력이 높은 세포막의 수용체와 결합함은 물론 일군의 IGF-binding protein(IGFBP)과 높은 친화성 및 특이성을 갖고 결합한다. 지금까지 여섯 종류의 IGFBP(IGFBP1~6)가 알려져 있는데, IGFBP는 사람 및 쥐의 혈청 및 소변, 양수, 림프액, 배란전의 난포액, 우유에 존재하고, 이외에도 여러 종양 및 세포주에서도 확인되었다. 혈청에서 가장 많은 IGFBP-3는 IGF- I 이나 IGF- II 의 저장소로 IGF 및 acid labile subunit (ALS)과 결합하여 150 kDa 복합체로 혈중에 존재하고 다른 IGFBP는 IGF와 결합하여 50 kDa 복합체를 형성한다.

IGF- I 은 순환중 특이적인 Binding Protein과 결합하며, 이 결합으로 IGF- I 은 혈청에서의 반감기가 GH보다 훨씬 길어지며, 파동적 변화율 또한 GH에 비해작다. IGFBP은 IGFBP-1~IGFBP-6가 있으며 IGF-1은 주로 IGFBP-3(산에 안정), ALS(acid-labile subunit)와 150~200 kD의 tertiary complex를 이루어 모세혈관을 순환하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 산으로 처리된 초유 유청을 pH 6.65의 중성조건에서 Sephadex-G50 gel filtration column로 용출시킨 결과는 아래와 같다. 첫 번째 peak는 약 200 kD의 분자량에서 용출되었으며 (fractions19-33), 두 번째 peak는 albumin(Mr:67,000)이 용출된 직후 나타난 것으로 미루어(fractions 46-54) IGFs의 약 25%를 차지하는 50 kD complex fraction으로 보인다.



**Figure 4.** Elution profile of formic acid treated colostrum when using

Sephadex-G50 gel filtration chromatography.

각 fraction 구간 중 IGFBP과 IGF peptide를 함유한 분획으로 추정되는 38~66 ml의 구간, 그리고 72~108 ml 구간 내 IGF- I 함량을 RIA방법으로 분석한 결과 그 농도는 각각 1,612ng/ml와 474ng/ml로 나타났다. Rajaram 등 (1997)은 human serum의 경우 150~200kD의 분자량에 존재하는 IGF 함량은 약 75~80%를 차지한다고 보고하였으며, 본 실험에서도 첫 번째 peak에서의 IGF- I 함량이 전체 함량의 약 77%를 차지하였다.

Donovan 등 (1994)은 돼지의 경우 혈청에서 발견되는 IGFBP이 돼지의 유즙에서도 비슷한 분자량으로 존재한다고 하였으며, Vega 등(1991)은 초유 내 높은 IGFBP의 농도는 분만 2~4주전 IGF와 IGFBP의 초유로의 이행 때문이라고 보았다.

#### 6) Sephacryl column chromatography에 의한 초유 whey의 IGF-binding pattern 측정

[<sup>125</sup>I] IGF- I 이 IGF binding protein에 결합되는 양상을 보기위해 초유 whey를 4°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 Sephacryl S-100 column을 통과시킨 결과는 다음과 같다. Molecular size marker를 동일한 column에서 elution시킨 후 280 nm의 흡광도에서 O.D값을 측정한 결과 Fig. 5에 나타나듯이 첫 번째 peak는 분자량이 150 kD의 복합체이고 다음으로 44 kD의 복합체가 존재함을 알 수 있으며, 마지막 peak는 Free IGF- I 이었다. Binding protein은 일반적으로 [<sup>125</sup>I] IGF- I 과 incubation 후 gel filtration하면 보통 두 개의 주요 peak가 얻어진다고 보고되고 있다(Elsasser 등, 1988, 이, 1997). 이 중 순환중인 IGF- I 의 대부분은 6종류의 binding protein 중 IGFBP-3와 결합하여 150 kD의 분자량을, 50 kD의 분자량을 가지는 복합체는 나머지 5개 binding protein 과 결합하여 존재하는 것으로 알려지고 있다.

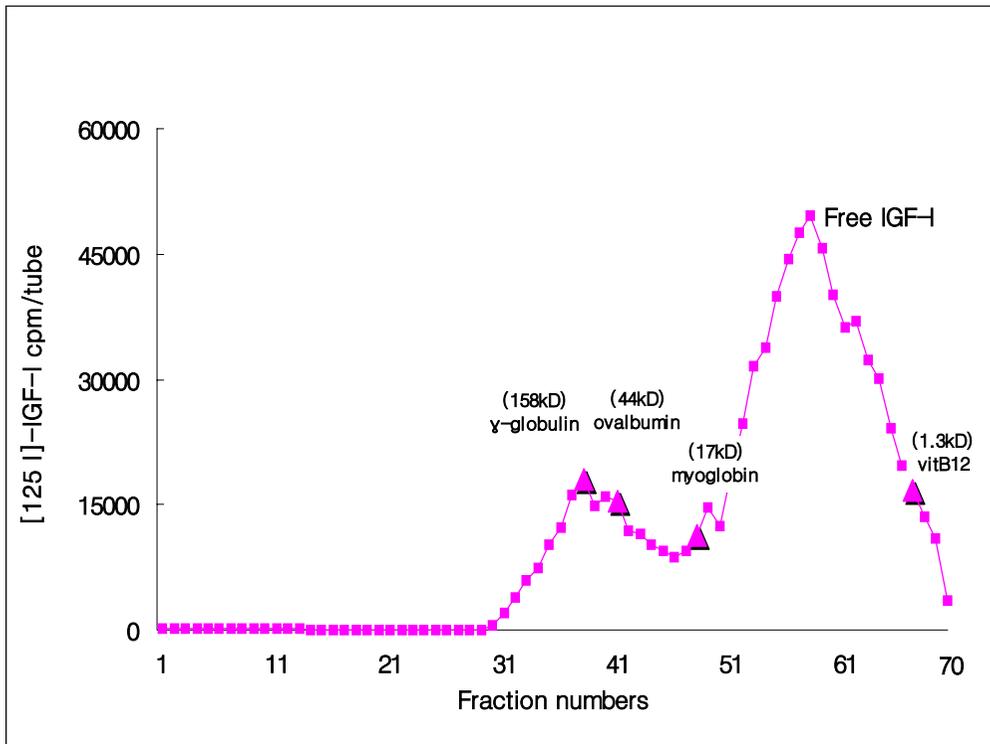


Figure 5. Determination of Free IGF- I binding sites in colostrum whey.

#### 나. 가공 중 일어나는 IGFs의 활성 변화 및 IGFs의 효과 극대화를 위한 적절한 가공 처리 방법의 모색

다양한 형태의 유제품을 수거하여 IGFs의 함량을 조사하고 여러 유가공 공정 중에 IGFs의 활성 변화를 분석하여 각 단계별 성장인자의 소멸 및 활성저하를 일으키는 구체적 공정조건을 규명하였다.

#### 1) 시판 유제품 내 인슐린유사성장인자 분석

##### 가) 시유 유청내 IGF-I 함량

국내산 시유의 유청 내 분석결과 32.9 ~ 56.4ng/ml 의 범위에 IGF- I 함량이 존재하고 있음을 보였다. Table 5에서 보듯이 HTST 처리우유의 경우나 UHT처

리 우유간에 차이를 발견할 수 없었으며, 성장인자의 호르몬적인 양태로 미루어 우균의 영양상태, 사양관리, 비유기, 산차, 계절 등 집합유의 상태에 따라 그 함량이 좌우된다고 볼 수 있을 것이다. Daxenberger 등(1998)은 888두의 검정샘플에서 IGF-I의 함량은 1 ~ 83ng/ml로 광범위하게 존재한다고 하였으며, Collier 등(1991)은 상업적으로 가공된 원유의 IGF-I 함량은 1.27~ 8.10ng/ml 범위에 존재한다고 보고하였는데, 본 실험결과 가공시유의 유청에는 평균함량이 매우 높은 수치를 보였다.

**Table 5.** IGF-I content in domestic market milk whey<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)				
A*	B**	C**	D**	E**
51.5±16.2 <sup>ab</sup>	32.9±5.1 <sup>c</sup>	40.4±8.3 <sup>bc</sup>	56.4±16.1 <sup>a</sup>	50.4±14.9 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> n= 46, All values are expressed as mean±SD.

A, B, D, E, n=9 ; C, n=10

Different letter superscripts indicate differences at  $p < 0.05$ .

\* H.T.S.T. pasteurization(72-75°C for 15 sec)

\*\* UHT treatments(130-135°C for 2 sec)

#### 나) 발효유 내 IGF-I 함량

시판 발효유 내 IGF-I 함량은 Table 6에 나타난 바와 같이 7.7~ 17.4ng/ml 정도로 존재하고 있었으며, 발효유의 성분규격이 업체마다 차이가 있는 점으로 미루어 상대적인 함량비교는 의미가 없는 것으로 생각된다. 단, 시유와 비교하였을 때 그 함량이 감소하는 결과를 보였는데, 이는 유산균에 의한 IGF-I peptide의 free amino acids로의 전환가능성, 발효 미생물자체의 이용 등으로 유추되나 확실치는 않다. 따라서 실험실 조건에서 요구르트 제조 시 발효에 따른 pH 하강과 IGF-I 함량과의 관계에 대한 보완실험 및 IGF-I 함량이 높은 초유 유청으로

배지를 강화하였을 경우 IGF- I 함량을 유지할 수 있는지에 대한 연구를 수행하였다. 발효유제품에 대한 IGF- I 함량은 Guidi 등(2000)이 ELISA 방법 및 RIA 방법을 이용하여 분석하였다는 보고가 있다.

**Table 6.** IGF-I content in domestic fermented milk whey<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)						
A*	B*	C*	D*	E*	F*	G*
14.7±3.0 <sup>ab</sup>	7.7±3.4 <sup>d</sup>	9.4±6.1 <sup>dc</sup>	10.1±8.9 <sup>bcd</sup>	17.3±5.6 <sup>a</sup>	11.3±3.2 <sup>bcd</sup>	13.9±4.5 <sup>abc</sup>

<sup>1)</sup>n= 69, All values are expressed as mean±SD.

A, B, C, E, F, G, n=10 ; D, n=9

Different letter superscripts indicate differences at p <0.05.

\*Raw milk content from A to G(skim milk powder content were not included) are 79.9, 84.2, 62.3, 85.2, 67.8, 67.0 and 81.7 % respectively.

#### 다) 전지분유, 탈지분유, 조제분유 및 초유분말유제품

건조유제품인 전지, 탈지, 조제분유 및 초유분말이 함유된 유제품을 대상으로 IGF-I을 측정된 결과 Table 7에 나타난 바와 같이 전지분유는 41.3ng/ml, 탈지분유는 55.8ng/ml, 조제분유는 27.6 ~ 36.7ng/ml 범위에 존재하고 있었으며, 초유분말제품의 경우는 516.9ng/ml 로 크게 높은 결과를 나타내었다. 최와 김(1994)의 연구에 의하면 국내산 분무건조의 열풍건조 조건에 있어 Udenatured whey protein Nitrogen Index(WPNI)를 측정된 결과 국내제조회사의 열처리의 강도가 다소 낮다고 보고한 바, Low-heat 조건의 분무건조 시에는 실질적으로 유청 내 IGF- I 함량의 활성이 상당량 유지되는 것으로 보인다.

**Table 7.** IGF-I content in Dried milk products<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)				
Whole (A)	Skim(B)	Infant formula (C)	Infant formula (D)	Colostrum powdered meal (E)
41.3±9.5 <sup>b</sup>	55.8±13.3 <sup>b</sup>	27.6±6.6 <sup>b</sup>	36.7±9.9 <sup>b</sup>	516.9±104.6 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>n= 48, All values are expressed as mean±SD.

A, B, n=9 ; C, D, E, n=10.

Different letter superscripts indicate differences at p <0.05.

**라) 농축유제품(가당연유)**

농축유제품인 가당연유의 경우 원유 유청과 농축유 유청, 그리고 원유농축비율로 2.5배 환원시킨 유청에서의 함량은 아래 Table 8과 같이 농축유에서 약간 그 함량이 증가되는 경향을 보였으며, 전체적인 연유제조공정 후에도 그 함량이 유지되는 결과를 보였다.

**Table 8.** IGF-I content in sweetened condensed milk<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)		
Raw milk whey	Condensed milk whey	Diluted*
45.8±13.4 <sup>a</sup>	51.5±46.0 <sup>a</sup>	44.9±9.3 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> n= 20, A, n=10 ; B, C, n=5

All values are expressed as mean±SD.

The letter superscripts indicate differences at p <0.05.

\*Diluted at two and a half fold to separate whey.

### 마) Cheese whey

치즈 유청 내 IGF-I 함량은 20.5ng/ml 정도로 raw milk acid whey의 22.2ng/ml 와 비슷한 수치로 존재하고 있음을 알 수 있으며, 이 결과로 미루어 IGF-I 은 acid whey뿐만 아니라 sweet whey 에서도 그 함량에 큰 변화가 없음을 알 수 있다.

**Table 9.** IGF-I content in Mozzarella cheese whey<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)	
Raw milk acid whey *	Drained sweet cheese whey**
22.2±10.9 <sup>a</sup>	20.5±6.4 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> n= 19, Acid whey, n=10 ; Sweet whey, n=9.

All values are expressed as mean±SD.

The letter superscripts indicate differences at p <0.05.

\*pH = 4.6, \*\*Curd pH=5.2

## 2) 원유 제조공정에 따른 IGF-I 의 함량변화

### 가) 가열처리에 따른 우유 및 유청 내 IGF-I 의 함량변화(집합유)

원유를 사용하여 열처리를 실시하고 유청을 분리하여 온도구간과 시간별 IGF-I의 함량 변화를 조사한 결과는 Table 10과 같다. 열처리하지 않은 집합유의 IGF-I 함량은 61.3ng/ml로 나타났으며, 65℃와 75℃에서 열처리를 실시할 경우, 시간별 차이를 보이지 않았으나 85℃의 경우 처리시간에 따라 그 함량은 유의적으로 상승하였다. 대조구와 각 온도구간 내 동일 처리시간별 함량 변화를 조사한 결과 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이지 않거나 감소하는 경향을 나타내었다. 반면, autoclave 처리 시에는 IGF-I의 존재가 측정되지 않았다.

유청을 분리한 후 열처리를 하였을 경우의 IGF-I 함량변화는 Table 11과 같

다. 75 °C의 열처리구간에서만 시간별 IGF-I 함량 변화를 나타내지 않았다. 또한, 각 온도구간 내 동일 처리시간별 함량변화를 조사한 결과 IGF-I 함량이 대조구에 비하여 증가한 결과를 나타내었으며 autoclave 조건에서는 대조구 함량의 약 7 % 정도가 측정되었다.

이상의 결과를 보았을 때 다양한 온도와 시간처리별 IGF-I의 함량변화는 특정 경향을 나타내지 않았으며 이는 상업적인 살균 온도처리 조건에서 IGF-I의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다는 Juskevich와 Guyer(1990)의 보고와 일치하였다. 따라서, 시유 가공공정 중 저온 장시간 살균(LTLT) 및 고온 단시간 살균법(HTST)에 의해 IGF-I은 크게 손실되지 않는 것으로 판단된다.

또한, Collier 등(1991)이 조제분유 조제 시 121 °C, 5분간의 가열시 IGF-I이 존재하지 않는다고 보고한 것으로 미루어 IGF-I의 원유내 활성은 온화한 조건의 온도에서의 장시간 노출되는 것에는 큰 영향이 없는 반면, 초고온에서는 급격히 파괴되는 것으로 여겨진다. 이는 초고온조건에서는 IGF-I의 immunoreactivity가 급속히 파괴된 것으로 보인다는 Juskevich와 Guyer(1990)의 보고와도 일치하였다.

유청 및 유청단백질 강화유제품의 경우 일반적으로 열처리가 단백질의 물리화학적 품질저하를 일으키므로 열처리 온도와 시간이 유청의 기능 및 관능에 미치는 영향이 크다. 따라서 상유 내에 극미량으로 존재하는 IGF-I을 산업적으로 이용하기 위해서는 상대적으로 많은 량의 IGF-I을 함유한 초유 유청액 또는 초유유청분말을 저온살균처리하여 첨가하는 방안 등이 모색될 수 있을 것으로 보인다. 단, 시유 및 유제품내 IGF-I의 강화에 있어서는 그 허용수준에 대한 면밀한 검토가 있어야 할 것으로 보이며 소 성장호르몬(rBGH)등의 투여에 의해 생산된 우유에 대해 높은 수준으로 존재하는 IGF-I 함량이 인체에 미치는 영향 등의 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 보인다.

**Table 10.** Changes of IGF-I content in milk whey by heating prior to whey preparation.<sup>1)</sup>

Time \ Temp.	IGF-I in milk whey (ng/ml)				
	Control	65°C	75°C	85°C	Autoclaved <sup>3)</sup>
10 min	61.3±31.4 <sup>A</sup>	14.5±6.1 <sup>B</sup>	31.4±1.2 <sup>AB</sup>	17.0±3.7 <sup>CB</sup>	N.D. <sup>2)</sup>
20 min	61.3±31.4	19.3±14.2	35.7±9.8	30.4±6.1 <sup>b</sup>	
30 min	61.3±31.4 <sup>A</sup>	15.2±8.9 <sup>B</sup>	30.7±3.7 <sup>AB</sup>	41.7±8.0 <sup>aAB</sup>	

<sup>1)</sup> n= 41, All values are expressed as mean±SD.

<sup>2)</sup> Not detected.

<sup>3)</sup> Raw milk was autoclaved at 121°C for 15 min

<sup>a~c</sup> Means with different capital letter superscript in the same column represented significant difference at p<0.05.

<sup>A~B</sup> Means with different capital letter superscript in the same row represented significant difference at p<0.05.

**Table 11.** Changes of IGF-I content in milk whey by heating after whey preparation.<sup>1)</sup>

Time \ Temp.	IGF-I in milk whey(ng/ml)				
	Control	65°C	75°C	85°C	Autoclaved <sup>2)</sup>
10 min	61.3±31.4 <sup>B</sup>	72.3±18.3 <sup>bb</sup>	134.9±33.1 <sup>A</sup>	57.5±12.2 <sup>aB</sup>	4.3±6.5
20 min	61.3±31.4 <sup>AB</sup>	39.7±4.2 <sup>cB</sup>	100.6±17.5 <sup>A</sup>	24.1±10.3 <sup>bb</sup>	
30 min	61.3±31.4 <sup>B</sup>	107.8±15.9 <sup>aA</sup>	134.5±15.0 <sup>A</sup>	44.6±7.1 <sup>aB</sup>	

<sup>1)</sup>n= 41, All values are expressed as mean±SD.

<sup>2)</sup> Raw milk was autoclaved at 121°C for 15 min

<sup>a~c</sup> Means with different capital letter superscript in the same column represented significant difference at p<0.05.

<sup>A~B</sup> Means with different capital letter superscript in the same row represented significant difference at p<0.05.

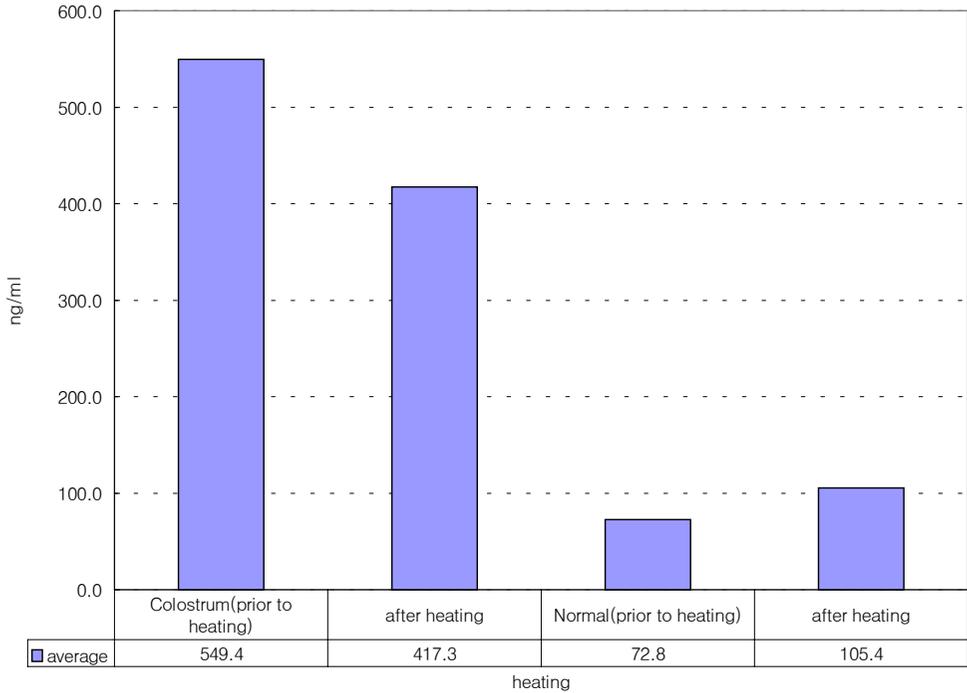
#### 나) 가열처리에 따른 초유 및 개체유 유청 내 IGF-I의 함량변화

초유 및 개체유(상유) 유청을 75 °C에서 30분간 열처리 한 후 IGF-I의 함량 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 초유의 경우 가열처리에 의해 그 함량이 549.4 ng/ml에서 417.3ng/ml로 낮아진 반면, 상유의 경우는 집합유의 경우와 비슷한 경향을 보여 72.8ng/ml에서 105.4ng/ml로 그 함량이 증가된 결과를 보였다.

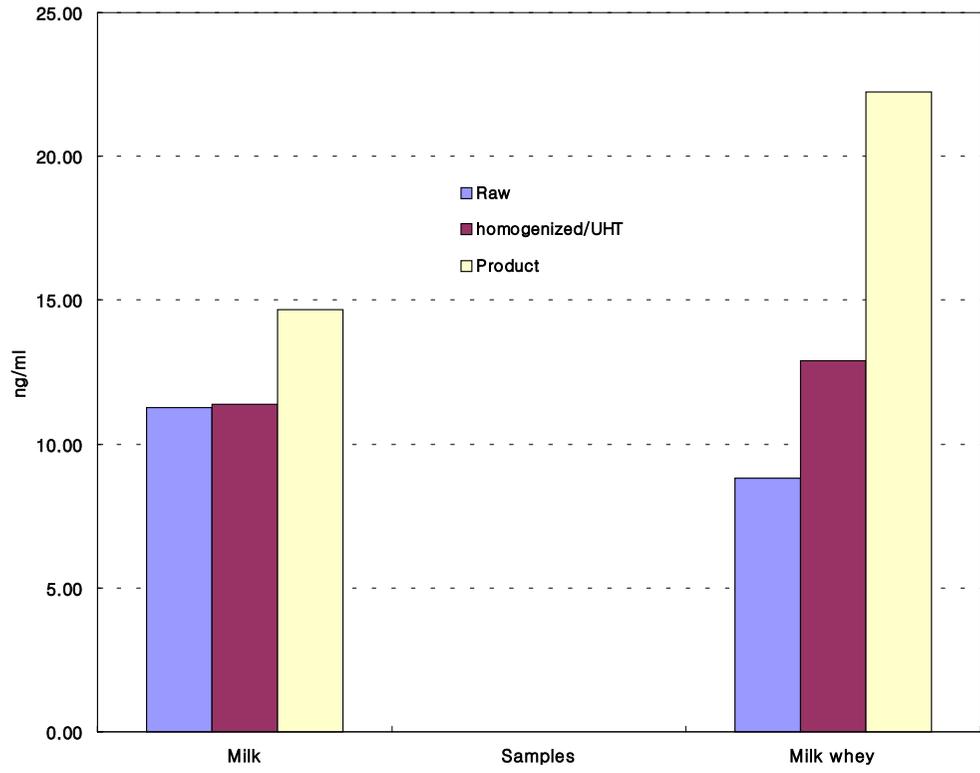
**Figure 6.** Changes of IGF-I content in individual colostrum and milk whey by heating(n=40).

#### 다) 균질-살균에 의한 변화

상업적인 우유 제조과정 중 균질 및 살균과 IGF-I 함량과의 관계는 아래 Fig.



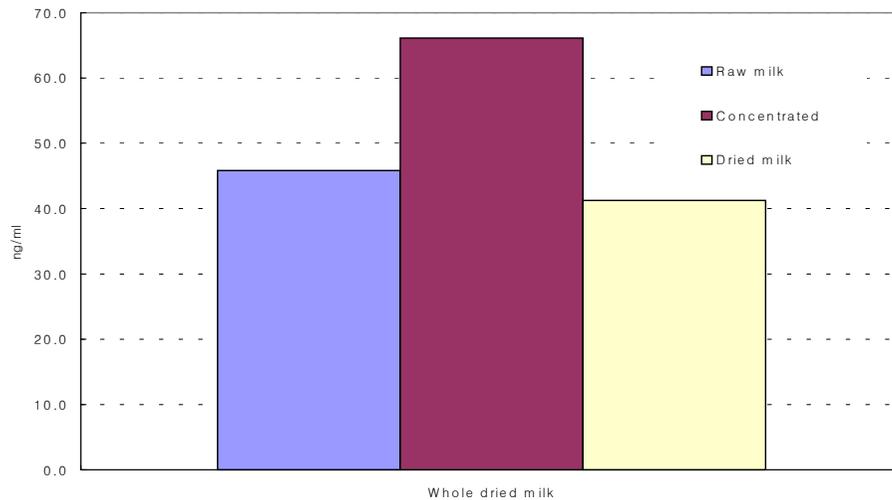
7에 나타내었다. 상기의 결과와 마찬가지로 균질 및 살균과정을 겪은 뒤 IGF- I 함량은 오히려 증가하는 것으로 나타났는데, 그 원인은 분명치 않으나 자연상태의 원유에 존재하는 IGF- I의 경우 binding proteins와 결합된 상태로 존재하고, 그 주종은 Binding protein III임이 알려진 바, 이들 IGF + IGF binding protein complex는 원유 가공공정이 이루어지는 도중 내생 protease인 plasminogen으로부터 유래된 plasmin의 활성화에 의해 가용 free IGF로 분리시키는 역할을 하는 것이 아닌가 추측되어진다. 따라서 원유 내생 plasminogen 활성이 있는 우유를 장기간 보관할 경우 유청 내 IGF-Binding protein III의 degradation이 일어나게 될 것으로 여겨지지만 이것이 생체 이용가능한 free IGF- I 으로의 전환인지는 분명치 않으며 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것이다(Gibson 등 1999 ; Rajaram 등 1997).



**Figure 7.** Changes of IGF- I content in milk and milk whey after homogenization and UHT pasteurization(n=50).

**라) 전지분유 제조시 농축 및 분무건조에 의한 변화**

상업적인 전지분유 제조과정시 농축 및 분무건조와 IGF- I 함량과의 관계는 아래 Fig. 8에 나타내었다. 총 고형분 함량이 40 %에 이르는 농축유의 경우 원유의 비율로 환원하여 측정된 결과 66.1ng/ml로 대조군인 원유의 함량인 45.8 ng/ml보다 높게 나왔으며, 분무건조 후 샘플의 경우 원유와 비슷한 수준인 41.3 ng/ml로 유지되는 결과를 보였다.



**Figure 8.** Changes of IGF- I content during the manufacture of whole dried milk(n=30).

**마) 연속처리에 의한 원유→균질유→살균유→분유제조공정시 활성변화**

원유, 균질유, 살균유의 일반성분 분석결과 유지율 4.61~5.18%, 유단백질 2.99~3.37%, 유당 4.88~4.97%, 총고형분 함량 13.56~14.19% 무지고형분량은 8.58~9.03%의 범위에 존재하였다.

Table 12에 나타나듯이 원유의 IGF- I 함량은 평균 31.5ng/ml이었으며, 균질유는 29.1ng/ml로 나타나 균질 처리에 의해 IGF- I 함량이 영향 받지 않음을 알 수 있으나, 본 실험에서는 고압식 균질이 아닌 원심식 균질방식을 택하였으므로 실지 대규모 유가공 공장에서는 극심한 압력 및 온도조건에 원유가 노출될 경우 활성이 보다 떨어질 것으로 보인다. 균질 후 살균처리유에서 65℃, 15 분간 살균한 원유의 IGF- I 농도가 살균 전 원유보다도 높은 92.5ng/ml으로 높게 나타난 반면, 75℃ 및 85℃에서 15분간 살균하였을 경우 평균 18.8 ~ 22.8ng/ml로 감소하는 것으로 나타났다. 온화한 가열처리에서 IGF- I 이 함량이 높게 측정되는 것은 불분명하나 우유내생 protease인 plasmin이 IGF-binding proteins를 free-IGF- I 으로 유리시키는 작용을 하며, 이 효소의 내열성이 알려진 바, 온화한 살균조건에서는 그 활성이 유지되는 것으로 여겨진다.

85℃ 3분간 열처리 한 원유를 최종 분무 건조하여 IGF- I 함량을 측정한 결과 평균 16.1ng/ml로 나타나 원유의 약 절반수준으로 떨어진 결과를 보였다. 이는 열풍분무건조조건이 IGF- I 을 완전히 파괴시키지 않는 것으로 보인다. 결론적으로 시유의 조제조건에서는 저온살균조건이 IGF- I 의 활성을 유지시키는데 유리할 것으로 판단되며 분유의 조제 시에는 열풍건조보다는 동결건조 등의 방안이 모색되어야 할 것으로 여겨진다.

**Table 12.** IGF-I content in milk whey and milk powder whey according to dairy process<sup>1)</sup>

IGF-I content(ng/ml)						
Raw milk whey	Homogenized milk whey	Pasteurized				Spray Dried
		65°C,15min	75°C,15min	85°C,3min	85°C,15min	
31.5±11.7 <sup>b</sup>	29.1±17.3 <sup>b</sup>	92.5±28.0 <sup>a</sup>	19.5±10.0 <sup>c</sup>	18.8±8.5 <sup>c</sup>	22.8±9.2 <sup>bc</sup>	16.1±6.9 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> n= 139, All values are expressed as mean±SD.

Different letter superscripts indicate differences at  $p < 0.05$ .

#### 바) 발효유 조제시 pH변화에 따른 IGF- I 함량 변화 측정

Table 13에서 보듯이 발효유를 mild acid production이 일어나도록 starter의 량을 0.1%로 조절한 뒤 배지를 autoclave 처리 한 것과 처리 하지 않은 두 실험 구에서 18시간 동안 6개 구간을 설정하여 최종 pH에 도달할 때까지의 IGF- I 함량의 변화를 조사하였다. Starter첨가 후 12시간이 경과된 시점부터 pH 하강 속도가 빠르게 진행되었으며, IGF- I 의 함량도 이에 비례해서 급격히 감소하는 결과를 보였다. 즉, Autoclave처리 한 배지 내 IGF- I 함량은 멸균 전후에 각각 67.9ng/ml와 34.2ng/ml이었으며, 발효 후 12시간 경과 후에도 36.4ng/ml로 그 함량이 유지되다가 ultimate pH이하로 급격히 떨어진 18시간 이후(pH=3.97)에는 그 함량이 5.4ng/ml로 크게 감소하였다. 한편 배지를 autoclave 처리하지 않은 실험 구에서는 발효 전 배지 내 IGF- I 함량이 53.0 ng/ml인 반면에 18시간 경과 후 (pH=3.77) 역시 크게 감소하여 3.9 ng/ml의 수준을 나타내었다. 따라서 IGF- I 함

량은 유산발효가 진행될수록 급격히 떨어짐을 알 수 있는데, 위에서 진술한 바와 같이 국내 발효유제품 유청내 IGF- I 함량이 다른 유제품보다 낮게 나타난 것과 일치하는 결과를 보였다. Table 14에서는 pH가 급격히 떨어지기 시작하는 구간을 세분화하여 Starter culture의 량을 1.5% 수준으로 증량시켰을 경우 단계별 IGF- I 함량을 측정 한 결과인데 배양 후 13시간째에 그 함량이 크게 떨어지는 결과를 보였다.

**Table 13.** IGF- I content in fermented milk according to pH variances

Time		Media					
		control	1hr	6hr	9hr	12hr	18hr
autoclaved*	pH	6.45	6.34	6.20	5.90	5.75	3.97
	IGF- I (ng/ml)	34.2±16.1 <sup>a</sup>	50.0±32.8 <sup>a</sup>	31.8±19.3 <sup>a</sup>	35.6±12.9 <sup>a</sup>	36.4±16.9 <sup>a</sup>	5.4±4.6 <sup>b</sup>
not autoclaved**	pH	6.54	6.50	6.34	5.97	5.77	3.77
	IGF- I (ng/ml)	53.0±17.1 <sup>a</sup>	33.0±23.0 <sup>b</sup>	46.6±27.6 <sup>ab</sup>	50.8±21.6 <sup>a</sup>	39.1±17.7 <sup>ab</sup>	3.9±3.2 <sup>c</sup>

\*n= 55, All values are expressed as mean±SD.

\*\*n= 60, All values are expressed as mean±SD.

Different letter superscripts indicate differences at  $p < 0.05$ .

**Table 14.** IGF- I in fermented milk by adding to 1.5% mixed starter culture<sup>1)</sup>

Time of incubation	control 1 (medium)	control 2*
pH	6.32	3.80
IGF- I (ng/ml)	155.1±26.9 <sup>a</sup>	25.9±4.0

Time of incubation	2hr	5hr	7hr	9hr	11hr	13hr	20hr
pH	5.68	5.02	4.62	4.45	4.20	4.00	3.70
IGF- I (ng/ml)	105.7±30.1 <sup>b</sup>	25.6±21.4 <sup>ed</sup>	63.0±31.4 <sup>c</sup>	35.4±15.9 <sup>d</sup>	25.5±10.4 <sup>ed</sup>	5.7±3.6 <sup>f</sup>	14.8±7.5 <sup>ef</sup>

<sup>1)</sup> n = 79, All values are expressed as mean±SD.

Different letter superscripts indicate differences at  $p < 0.05$ .

\* The medium pH was adjusted by 3.80 value with 2N HCl and the supernatant whey fraction was collected.

#### 사) 초유유청분말의 배지 내 첨가가 발효유 조제시 IGF- I 함량에 미치는 영향

IGF- I 함량이 높은 것으로 알려진 초유유청분말을 발효유 배지에 첨가시켰을 경우, 유산발효가 진행됨에 따라 IGF- I 함량변화 패턴이 어떻게 변화하는지 알아보았다. 탈지분유 배지만으로 제조한 발효유(control)는 발효 전후의 IGF- I 함량이 각각 76.9 및 36.5ng/ml으로 나타났으며, 초유유청분말을 1% 및 2% 강화한 배지의 경우 발효 전 각각 93.6ng/ml 및 94.7ng/ml에서 발효 후에는 12.3±5.0 및 5.5ng/ml로 크게 떨어지는 것으로 나타났다(Table 15). 따라서 배지를 강화하였을 경우에도 발효유 조제 시 초기 배지 내 IGF- I 수준을 유지시키지 못하는 것으로 나타났으며, 이는 발효미생물에 의한 IGF- I의 분해 또는 이용가능성이

있는 것으로 생각된다.

**Table 15.** Changes of IGF- I content in freeze dried milk colostrum whey powder fortified medium during fermentation.<sup>1)</sup>

Fermentative media	pH		IGF- I concentration(ng/ml)	
	Prior to fermentation	After Fermentation	Prior to fermentation	After Fermentation
10% skimmilk powder only (control)	5.55	3.56	76.9±40.6	36.5±17.0
9% skimmilk powder + 1% colostrum whey powder	5.92	3.73	93.6±72.8	12.3±5.0
8% skimmilk powder + 2% colostrum whey powder	6.51	3.80	94.7±37.3	5.5±3.6

<sup>1)</sup> n= 60, All values are expressed as mean±SD.

#### 다. IGFs의 유제품 강화를 위한 최적 조건 확립 및 안정성 확보

유제품 제조 시 강화시기를 설정하고 실제 강화 후 시제품에서 존재하는 IGFs의 함량과 활성을 검증하였다. 강화 방법에 있어서 건식, 습식, 캡슐화를 실시하여 강화 기법을 다각적으로 검토하였으며 유제품의 종류별로 성장인자의 활성을 유지할 수 있는 효율적인 강화 방법을 확보하는 연구가 시도되었다.

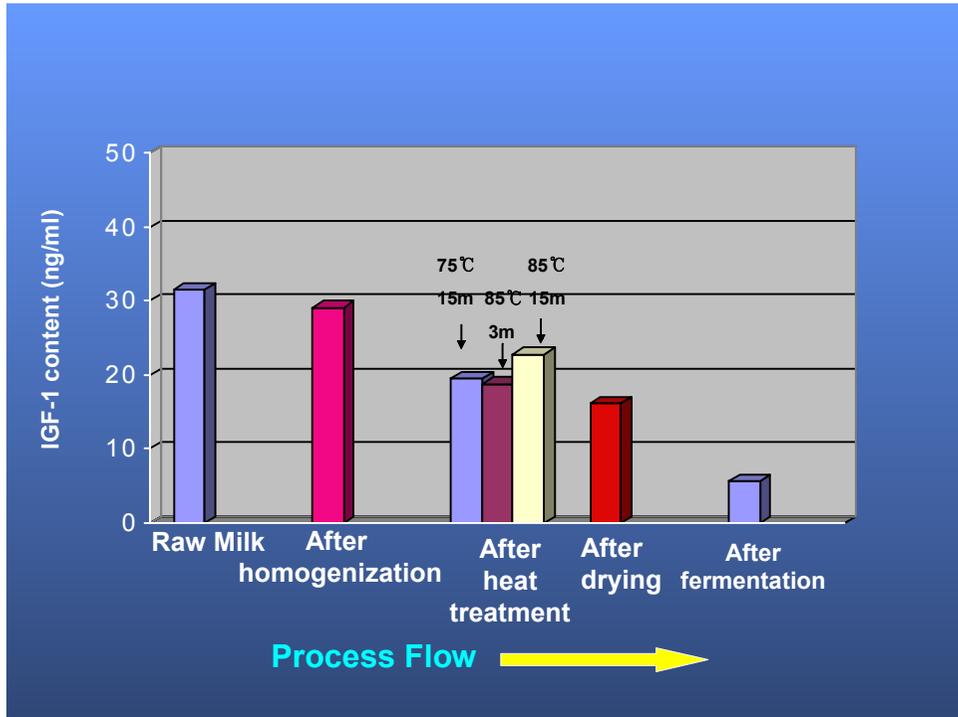
##### 1) 유제품 제조 시 강화 시기 설정 및 검증

고려대학교 pilot plant에서 실시한 원유의 처리 공정에 따른 IGF- I의 활성변화는 아래 Fig. 9와 같다. 가열 처리 전 homogenization 공정은 IGF- I 함량변화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 한편 가열처리 조건 중 다양한 온도와

시간처리별 IGF-I의 함량변화는 특정 경향을 보이지 않았으나, 아래 결과에서 보듯이 75℃ 15분 및 85℃ 15분간의 열처리 조건에서 IGF-I은 크게 손실되지 않는 것으로 나타났고, 반면 autoclave 조건(121℃, 15min)에서는 대조구 함량의 약 7% 또는 측정범위 이하로 존재하는 것으로 나타나 현재 상업적인 UHT공정을 실시하는 시유제품의 경우는 강화된 IGF-I의 대부분이 초고온살균 시 크게 파괴되는 것으로 보인다. 이는 Collier 등(1991)이 조제분유 조제시 121℃, 5분간의 가열시 IGF-I이 존재하지 않는다고 보고한 것과 비슷하였으며, 초고온조건에서는 IGF-I의 immunoreactivity가 급속히 파괴된 것으로 보인다는 Juskevich와 Guyer(1990)의 보고와도 일치하였다. 따라서 본 연구팀은 강화된 IGF-I의 살균 전 첨가는 저온살균조건(65℃, 30min)의 경우를 기준으로 건식 및 습식강화로 검증하기로 하였으며, UHT처리유를 이용할 경우 살균 후 첨가하는 방안이 적합하다는 결과를 얻을 수 있었다. 단 후자의 경우 강화 시 aseptic한 process 또는 IGF-I의 강화 후 다시 저온으로 살균 처리해야 하는 추가공정이 필요할 것으로 보인다.

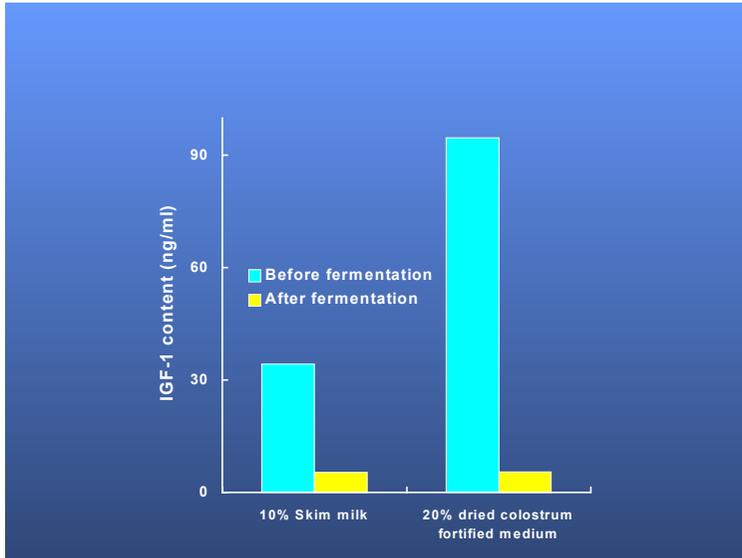
분유의 경우 원유의 분무건조 조건(inlet temperature of about 140℃, outlet temperature of 70℃)에서 IGF-I의 활성은 비교적 유지되는 결과를 나타내었다. 즉, 분무건조 전 원유 내 IGF-I의 함량은 평균 31.5ng/ml 에서 16.1ng/ml 로 51.1% 정도 유지되는 것으로 나타났으나 보다 효율적인 공정을 위해 열처리 조건을 배제한 제균처리 한 동결건조강화 IGF-I을 분무건조유에 혼합하는 방법을 사용하였다.

발효유 제조 시 발효 후 배지 내 IGF-I 함량은 약 5ng/ml 수준으로 낮아지는 것으로 관찰되었다. 이를 초유유청을 강화한 후 발효하였을 경우 IGF-I의 함량이 마찬가지로 떨어지는 것으로 미루어 발효미생물에 의한 IGF-I의 분해 또는 이용가능성이 있는 것으로 생각된다(Fig. 10). 따라서 본 연구에서는 발효가 완료된 후 건식 및 습식으로 믹스, 강화하였을 경우와 초유유청분말 자체를 캡슐화하였을 경우 IGF-I 함량에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다.



**Figure 9.** IGF-I content in milk when according to dairy process<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>n= 120, All values are expressed as mean±SD.



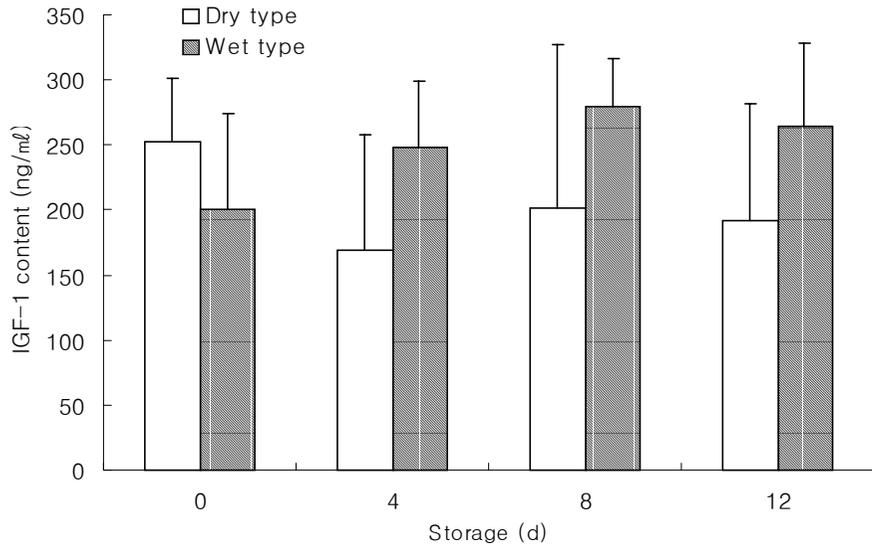
**Figure 10.** Changes of IGF- I content in dried colostrum fortified medium during fermentation

## 2) 강화 방법 및 형태 설정과 저장 안정성

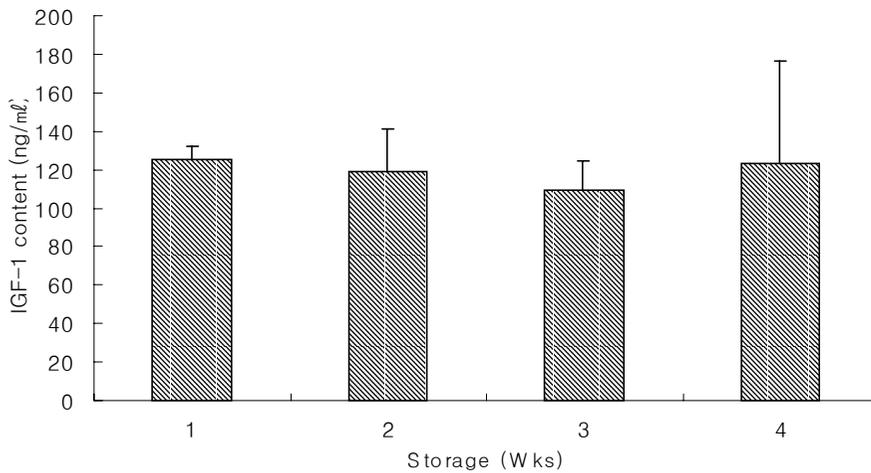
초유를 제공하여 동결 건조한 분말을 건식으로 분리한 유청을 습식으로 하여 시유에 강화하고 유효기간동안 IGF- I의 함량을 분석하였다. 강화 후 4℃ 저장 후 12일 동안 IGF- I의 함량 변화는 Fig. 11에서 볼 수 있듯이 큰 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

무지고형분의 10%로 강화한 분유의 IGF- I의 함량은 109 ~ 126 ng/ml 범위에서 존재하였고 4주간의 저장 기간동안 IGF- I의 함량은 변화가 나타나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 12).

그러나 발효가 완료된 후 IGF- I이 강화된 발효 유제품의 경우 강화 조건에도 불구하고 저장 12일이 경과한 후 IGF-I의 함량이 감소하는 것으로 분석되었다 (Fig. 13).

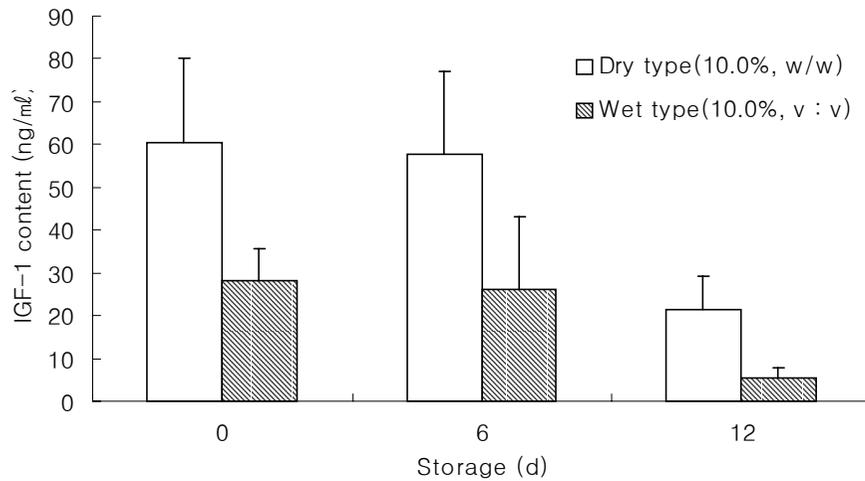


**Figure 11.** Changes of IGF- I content in crude IGF- I fortified market milk



**Figure 12.** Change of IGF- I content in crude IGF- I fortified powdered milk for 4 weeks storage at room temperature. Fortification level

was 10% (w/v).



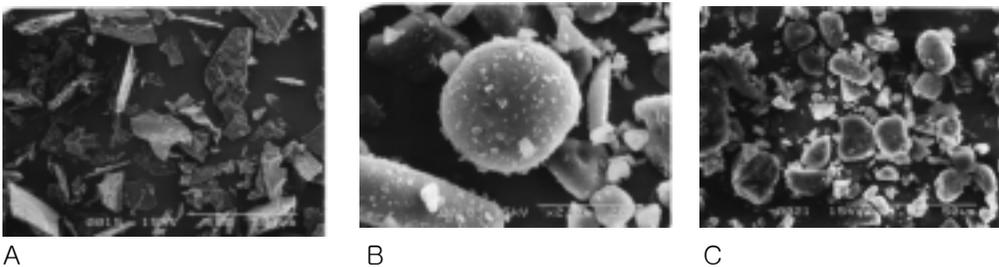
**Figure 13.** Changes of IGF- I content in crude IGF- I fortified yoghurt during shelf life at 4 °C. Each bar represents the least squares mean  $\pm$  SE (A ; n=40, B ; n=42 ).

Fortification level was 10% for dry type (w/v).

Fortification level was 10% for wet type (v/v).

발효가 완료된 후 IGF-I을 강화했을 때도 일정 기간이 지난 후 IGF-I의 함

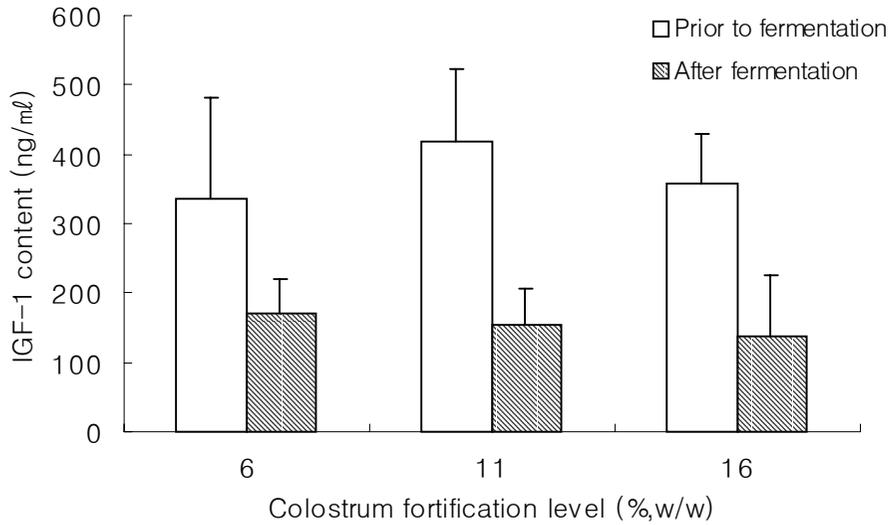
량이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 발효유제품의 경우 다른 유제품과는 달리 저장 안정성이 떨어지는 것을 보완하기 위하여 초유 유청분말에 대하여 캡슐화제제를 이용하여 캡슐화 한 후 이를 전자 현미경으로 형태를 관찰하고 저장성 실험과 같은 방법으로 강화 시 저장 안정성이 유지되는지 관찰하였다. Fig. 5는 초유 분말의 캡슐화 과정을 전자 현미경을 통하여 관찰한 것으로 A는 캡슐화 전 초유분말을 나타내며 B는 캡슐제제를 미첨가 후 수화한 형태를 관찰한 것이다. C1과 C2는 Eudragit L 100-55을 이용하여 초유분말을 캡슐화한 결과이며 약 20  $\mu\text{m}$ 의 직경을 보이는 것을 알 수 있다. D1과 D2는 또 다른 캡슐제재인 Sureteric을 이용하여 캡슐화를 실시한 결과인데 Euragit L 100-55를 사용한 캡슐화 결과와 비교할 때 Euragit L 100-55의 캡슐화가 더 우수한 것으로 보인다.



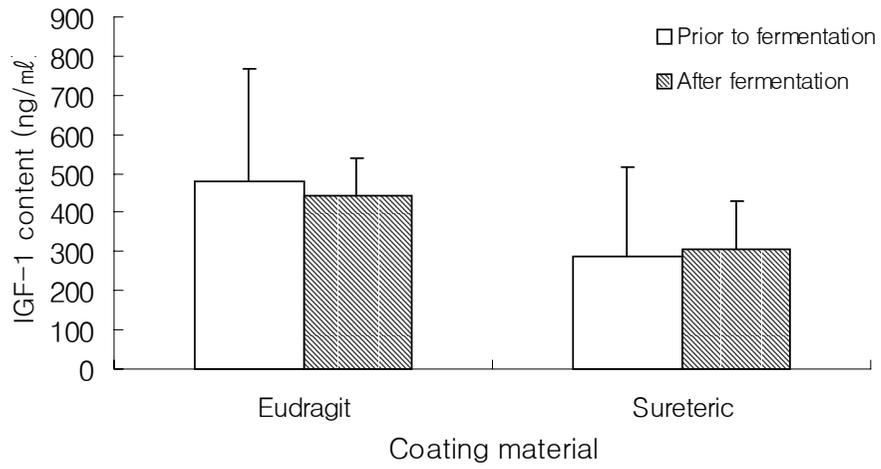
**Figure 14.** Scanning electron micrographs of crude IGF- I coated with different coating materials. Encapsulation was made using Hybridizer system at the ratio of 9:1 (whey : Sureteric or Eudragit L100-55, w/w) with rotor speed of 15,000 rpm for 3 min. A : Crude IGF- I, B : Coated with Eudragit L100-55, C : Coated with Sureteric.

Fig. 15는 초유유청분말을 각기 다른 비율로 강화하였을 때 발효유제품의 발효 전·후의 IGF-I의 함량 비교를 도식화한 것이다. 이전의 실험에서와 마찬가지로 강화 비율과는 관계없이 발효 후 모두 IGF-I의 함량이 감소하는 것으로 나타났으며 캡슐화가 실시된 초유유청분말을 강화한 결과는 Fig. 16과 같다. Eudragit 1 100-55로 캡슐화가 실시된 초유유청분말이 강화된 발효 유제품의 경우 발효 전에는 IGF-I의 함량이 479.4ng/ml이었고 발효 후에는 443.5ng/ml로 나타났다. 이는 초유유청분말의 캡슐화가 성공적으로 이루어졌고 발효 후에도 그 함량이 상

당히 유지되는 것을 나타낸다. Sureteric 제재로 캡슐화한 초유유청분말의 경우에도 이와 같은 경향을 보였다.



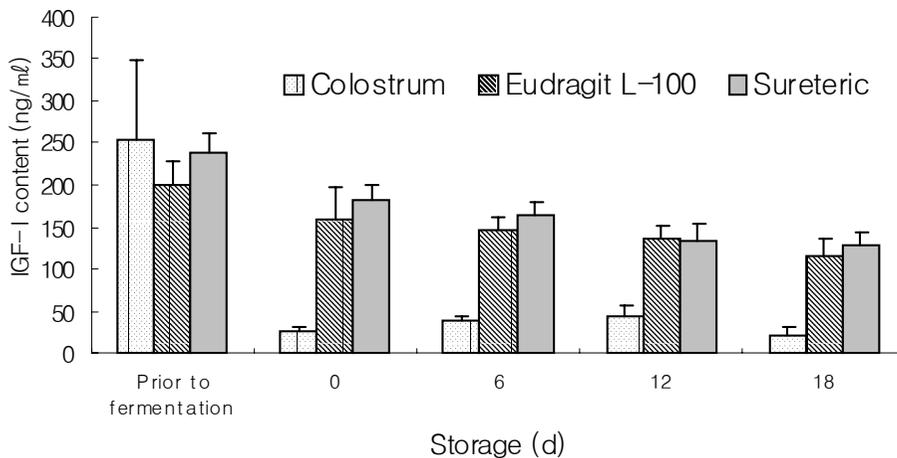
**Figure 15.** The changes of IGF-I content IGF- I fortified yoghurt with different ratio of unencapsulated IGF- I.



**Figure 16.** Changes of IGF- I content in IGF- I fortified yoghurt. 10% of total IGF- I was substituted with encapsulated IGF- I. Each bar represents the least squares mean  $\pm$  SE .

캡슐화를 통해 발효 후에도 그 함량이 유지되는 것으로 확인할 수 있었다. 이에 대한 저장 안정성을 평가하기 위하여 캡슐화를 실시하지 않은 초유유청분말을 대조구로 하여 18일의 저장 기간동안 IGF-I의 함량 변화를 관찰하였다. Fig. 17에서 볼 수 있듯이 캡슐화를 실시한 초유유청분말을 강화 시 그 함량이 1/10로 감소된 대조구에 비해 그 함량이 상당히 유지되는 것으로 나타났다. 캡슐화는 발효 전·후의 IGF-I 함량을 유지시켜줄 뿐만 아니라 저장 기간동안에도 그 활력을 유지할 수 있는 좋은 방법임을 시사한다.

위의 결과는 Meinel(2001) 등이 캡슐화를 실시한 재조합 IGF-I의 뼈 조직 치료함에 있어서 그 활력이 13일까지 유지되었다는 보고를 비추어 볼 때 발효유제품에서도 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료된다.



**Figure 17.** Storage stability of IGF- I in yoghurt containing encapsulated IGF- I. Each bar represents the least squares mean  $\pm$  SE (n=72).

## 제 2 절 제2세부과제

### IGFs의 생체 내·외에서의 생리화학적 활성 연구

#### 1. 이론적 접근 방법

현재 식품 내 생리활성 물질을 강화하려는 노력은 식품의 고부가가치 창출을 위하여 활발히 진행되고 있으며 식품의 건강보조 효과를 기대하는 소비자들의 심리와 부합하여 시장 확대의 가능성이 매우 크다. 또한 생리활성 물질에 대한 최근의 연구는 자연, 특히 생명체 자체에 존재하고 있는 생리활성 물질을 정제하여 이를 식품이나 건강 보조제, 의약품 등 여러 분야에 적용하는 방향으로 진행되고 있다. 이러한 생리활성 물질 중 하나인 인슐린 유사 성장인자(insulin-like growth factors; IGFs)는 다양한 세포에서 발현되어 성장을 비롯한 여러 가지 생리 현상을 조절하는 중요한 인자중의 하나로 보고되고 있으며 특히 인간을 비롯한 포유동물의 젖에서도 발현되는 것으로 알려져 있다. 특히 젖을 통해 자손에 전달된 IGFs는 태아의 초기성장에 직접적으로 관여하며 신경조직, 내부 소화기관, 근육의 성장 및 발달에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 성인의 경우 노화에 의하여 발생하는 골절이나 골다공증 역시 체내에서 합성되는 IGFs의 부족과 관련이 있다는 임상실험 결과가 보고되고 있다(Rosen, 1999). 이러한 보고는 IGFs의 천연활성이 풍부하게 존재하는 유제품의 섭취를 통해 어린이나 성인의 바람직한 생리조절 기능을 기대할 수 있음을 의미한다.

IGFs가 풍부하게 존재하는 유제품을 제조하기 위한 방안으로는 다양한 기법을 생각할 수 있으나 최근 유전자 조작 기술 등을 이용한 식품들이 소비자들로부터 외면 당하고 있는 현실을 감안한다면 원유 내에 존재하는 IGFs를 변형 시키지 않으면서 그 고유의 생리적 활성을 유지하고 있는 상태로 다시 유제품에 이용하는 방법이 가장 현실적인 방법이 될 것으로 생각된다.

전술한 바와 같이 IGFs의 강력한 생리 조절 효과로 인해 여러 분야에서 다양한 방법을 이용하여 이를 분리하려는 시도가 지속적으로 이루어져 왔으며 특히 높은 농도의 IGFs가 발현되는 것으로 알려진 초유에서 이를 분리·정제하려는 노력들이 경주되어 왔으나 그간의 연구들은 여러 차례의 복잡한 과정을 거쳐야

했기 때문에 최종적으로 얻을 수 있는 순수 IGFs의 양도 많이 소실되었으며 이에 따른 비현실적인 경제성을 가지고 있었다. 또한 이렇게 분리·정제한 peptide에 대하여 IGFs peptide라는 확인 과정 외에 생체 내에서의 동일한 생리 활성을 나타내는지를 구명하고자 하는 시도는 미약했다.

따라서 본 연구에서는 IGF-I peptide를 생쥐에 면역하는 기법을 사용하여 IGF-I peptide에 특이적으로 반응하는 항 IGF-I 단일 클론항체(IGF-I mAb)를 대량으로 생산하고 이를 이용하여 immunoaffinity chromatography의 단일 과정에 의해 초유로부터 고순도의 IGF-I을 초유로부터 다량으로 분리하고자 하였다. 또한 이렇게 분리·정제된 우유 내 IGF-I이 정제 과정 이후에도 체내에서의 동일한 생리 활성을 나타내는지를 확인하기 위하여 세포주를 이용한 *in-vitro*와 생쥐를 이용한 *in-vivo* 실험을 실시하였으며 이와 같은 결과를 바탕으로 고유한 생리활성을 그대로 지니고 있는 고순도의 우유 내 IGF-I을 다량으로 분리하였다.

## 2. 실험적 접근 방법

### 가. IGF-I 단일클론항체(IGF-I mAb) 생산

#### 1) 생쥐의 면역

IGF-I mAb의 생산을 위하여 면역용 실험동물인 Balb/c 생쥐의 생체 내에 IGF-I 항원 20 $\mu$ l를 200 $\mu$ l의 면역 보강제(Freund's adjuvant)와 혼합하여 복강 내로 투여하였다. 최초 면역 후, 2주 간격을 두고 항체의 역가를 확인하여 추가적인 면역을 실시함으로써 비장의 면역 임파구(lymphocytes) 활성이 극대화 되도록 하였다.

#### 2) 면역 혈청의 역가 및 효능 시험

IGF-I 항원을 투여한 생쥐에서 생산되는 면역 혈청의 역가 및 그 효능을 시험하기 위하여 면역중인 생쥐의 꼬리로부터 혈청을 분리·회수하여 이용하였으며, 면역 활성화된 비장세포의 추출을 위한 희생 직전의 생쥐 심장으로로부터 혈청을 분리·회수하여 사용하였다. 분리된 혈청의 면역 활성 정도를 확인하기 위하여 간

접면역형광항체법(indirect immunofluorescence)을 사용하였다. 10 $\mu$ l의 면역용 항원인 재조합 human IGF-I peptide (rhIGF-I)를 2% BSA-PBS로 100배 희석하여 poly-L-lysine이 피복되어 있는 slide에 1 $\times$ 1cm로 분산 건조하였으며, 10% normal goat serum을 넣어 blocking하였다. 1% Tween 20-PBS로 3회 세정한 후, 200배로 희석한 혈청과 1시간 동안 반응시킨 후 세정하였으며 goat anti-mouse IgG-FITC와 1시간 동안 반응을 유도하여, 형광 현미경에서 특이 형광반응을 관찰하였다.

### 3) 형질 세포의 회수

IGF-I 항원에 대한 면역 실시 후 4~6주 정도가 경과한 Balb/c 생쥐를 희생하여 비장을 무균적으로 추출하였다. 회수된 비장은 차가운 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)으로 3회 세정한 후 26G 주사바늘을 이용하여 조직을 마쇄하였으며 1,500rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전된 세포를 5ml의 hemolysing 용액에 재부유 시켰다. 15ml의 차가운 DMEM을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 정치한 후 800rpm에서 10분간 원심분리를 실시하였으며 이 과정을 3회 반복하여 회수된 세포를 세정하였다. 1.5 $\times$ 10<sup>7</sup>cells/ml의 세포가 분리·회수되었으며 회수된 세포는 10% fetal calf serum (FCS)이 첨가된 배양액 내에서 배양하였다.

### 4) 세포 융합

세포의 사멸을 방지하면서 IGF-I mAb를 영구히 분비할 수 있는 잡종세포주(hybridoma)를 생산하기 위해 회수된 형질세포와 5 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 P<sub>3</sub>X63-Ag8.653 골수종세포에 polyethylen glycol (PEG) 1500 (Gibco BRL, USA)을 가하여 물리적인 세포 융합을 실시하였다.

### 5) Screening 및 cloning

세포 융합을 통해 확보된 잡종 세포주 중 IGF-I mAb를 분비하는 세포만을 선발하기 위하여 screening을 실시하였다. 융합된 세포는 hypoxantine thymidine (HT) 배양액과 hypoxantine aminopterin thymidine (HAT) 선택 배양액으로 선

별하여 배양하였으며 세포주의 기능 상실이나 괴사 등으로 인한 손실을 막기 위해 세포의 cloning을 실시하였다.

IGF-I mAb 분비 세포주의 검출은 간접면역형광항체법을 이용하여 세포 배양 상층액 내에 함유된 항체의 역가를 측정하는 방법을 사용하였다.

### ① 생쥐 정소 조직에서의 항원-항체 반응 확인

4주령의 생쥐를 희생하여 정소 조직을 무균적으로 회수하였으며 PBS로 3회 세정하였다. 정소 조직은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하여  $4\mu\text{m}$ 로 동결절편한 후 glass slide에 부착하여 0.3% Tween 20-PBS로 세정하였으며 10% normal goat serum을 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 40분간 blocking하였다. 1% Tween 20-PBS로 3회 세정한 후에 세포 배양 상층액과 대조구인 rabbit anti-human IGF-I 복합항체(pAb)를 각각 200배로 희석하여 40분간 반응 후 세정하고 goat anti-mouse IgG-FITC를 2차 항체로 이용하여 1시간 동안 반응시킨 후 형광 현미경에서 특이 형광 반응을 관찰하였다.

### ② HepG2 세포주에서의 항원-항체 반응 확인

Poly-L-lysine 용액이 피복된 slide glass에 HepG2 세포주를 분산 배양하였으며 상온에서 배양 상층액을 건조한 후 잡종 세포주의 세포 배양 상층액, 면역된 생쥐의 면역 혈청 및 대조구인 rabbit anti-human IGF-I pAb에 대한 IGF-I의 항원-항체 반응을 간접면역형광항체법에 의해 확인하였다.

### 6) IGF-I mAb 분비 잡종 세포주의 확립

IGF-I의 발현은 다른 세포주에서 보다 상피세포에서 그 발현율이 높은 것으로 알려져 있다. 그러나 IGF-I의 발현율이 높은 것으로 알려진 HepG2 세포는 집락화(colonization) 현상으로 인하여 IGF-I의 세포 내 국소발현 정도를 관찰하기에 어려움이 있었다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 비교적 높은 IGF-I의 발현이 밝혀진 상피세포 중 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포주를 표본세포로 이용하여 IGF-I mAb 분비 잡종 세포주를 확립하였다. 1차로 선별된 35주의 세포들을 제한희석법(limiting dilution)에 의하여 배양하였으며 3,670개의 단일 세포

에 대해 간접면역형광항체법을 이용하여 배양 상층액 내에 분비된 항체가 IGF-I 과 특이적인 반응을 보이는 세포주만을 선별하였다. MDCK 세포주를 이용한 IGF-I mAb의 발현특성에 따른 세포주의 선별 및 확립을 위해 0.3% Tween 20-PBS로 세정하여 IGF-I의 세포막 표면에서의 국소 발현 여부를 확인하였다. 또한 MDCK 세포 내부에서의 발현 양상을 관찰하기 위하여 0.5% Triton X-100 을 처리하여 특이적 발현 강도가 높은 4주의 잡종세포주를 선별하였으며 대량으로 배양하여 동결 후 액체질소에 보관·이용하였다.

### 7) IGF-I mAb 분비 잡종 세포주의 대량 배양 및 복수의 생산

확립된 4주의 잡종 세포주들은 HAT 선택배양액으로 재선발을 실시한 후 대량 배양하였고, 배양 상층액을 56℃에서 불활성화한 후 300×g에서 10분간 원심 분리하여 그 상층액을 면역반응에 이용하였다. 침전된 세포는 PBS를 이용하여 회수하였고, 2주전에 0.5 ml Freund's incomplete를 복강 내로 주입한 Balb/c 생쥐의 복강 내로 각각의 세포주를  $6 \times 10^7$  cells/ml로 산정하여 주입함으로써 고도로 높은 역가의 항체가 내포된 복수 생산을 유도하였다.

### 8) 생산된 복수 mAb의 정제

복수가 생성된 생쥐의 복강 하부에 18G 주사바늘을 주입하여 3회에 걸쳐 복수를 회수하였으며 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 복강 내 지질을 제거하였다. 복수 10ml과 60mM acetate용액(pH 4.0)을 혼합한 후 1N HCl을 이용하여 pH를 4.8로 조정하고 330μl의 caprylic acid를 30분간 교반하며 첨가하였다. 교반이 완료된 용액은 4℃, 150×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 생리식염수에 투석하였다. 1차 정제된 항체는 4℃와 -70℃에 각각 나누어 보관하며 이용하였다.

## 나. 원유 및 유선에서의 IGF-I 발현 확인

### 1) 유선세포의 분리 배양 및 IGF-I의 발현 확인

원유 내 IGF-I의 발현을 확인하기 위한 방법으로는 유선조직과 유선세포 내 IGF-I의 발현을 면역학적으로 확인하는 조직면역학적 기법이 가능하며 이를 위

해서는 원유 중에 탈락되어 잔존하는 상피세포인 유선세포 내에서 명확한 발현 양상을 관찰하는 것이 선행조건이 된다. 또한 탈락 유선세포에서의 IGF-I 발현 관찰은 생체 내 신호 전달 체계에 의하여 활성화된 세포를 이용하는 것으로서 생리적인 기전을 밝히는데 장점을 가질 수 있다. 이를 위한 기초실험으로 1등급 우유를 생산하는 유우로부터 원유를 확보하여 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하였다. 운반된 우유시료는 10,000×g로 원심분리하여 상층액을 제거한 후 침전물을 PBS로 3회 세정하여 세포를 회수하였다. 분리된 세포는 항생제와 10%의 FCS가 첨가된 DMEM에서 배양한 후 다시 chamber slide glass 위에서 배양하였으며 이를 이용하여 IGF-I mAb 분비 잡종 세포주들의 IGF-I peptide에 대한 반응 정도와 유선세포 내 IGF-I peptide의 발현 양상을 확인하였다.

## 2) 원유 및 원유 내 유선세포에서의 IGF-I 발현 확인

원유 중에 존재하는 IGF-I peptide와 내포된 유선세포들에서의 발현 양상을 관찰하기 위하여 채집된 원유 중 일부를 poly-L-lysine 용액이 피복된 slide glass에 놓고 10분간 정치한 후에 상층액을 제거하여 상온에서 건조하였다. 선별된 4주의 잡종 세포주들의 배양 상층액에 존재하는 IGF-I mAb와 원유 중 IGF-I peptide의 반응 양상은 간접면역형광항체 반응으로 확인하였다.

### 다. IGF-I mAb의 isotyping

IGF-I mAb에 대한 특성화 작업에 기초적인 자료를 제공하고 immunoaffinity chromatography를 위한 면역반응의 규명을 위하여 immunoglobulin의 heavy chain과 light chain의 결정을 시도하였다.

0.1ml의 복수를 4.9ml TBS에 희석하여 희석액 3ml을 typing stick (mouse monoclonal antibody isotyping kit, PIERCE)이 함유된 captube에 넣어 실온에서 15분간 반응하였다. 잡종 세포주의 희석액을 제거하고 5ml의 TBS를 가하여 2분 간격으로 3회 세척한 후 10 $\mu$ l의 peroxidase labeled anti-mouse antibody를 5ml에 희석하였다. 다시 이 희석액을 captube stick에 넣고 15분간 실온에서 반응하였으며 희석액을 제거하고 TBS를 넣어 2분 간격으로 3회 세정하였다. 50ml

TBS에 4-chloro-1-naphthol (3mg in cold methanol) 10ml과 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu$ l를 혼합한 substrate solution으로 15분간 실온에서 발색을 유도하였으며 5 $\mu$ l의 증류수를 넣어 3번 세정한 후 강한 발색의 band를 isotype으로 결정하였다.

## 라. IGF-I mAb의 확인

### 1) Western hybridization

생산된 IGF-I mAb의 특성을 확인하기 위하여 면역용 항원으로 사용한 rhIGF-I을 기질로 사용하여 Western blot을 실시하였다. Schagger 등(1987)에 의해 보고된 방법에 따라 16.5% tris-tricine SDS-PAGE를 이용하여 rhIGF-I을 30mA에서 4시간 동안 전기영동 하였으며 100V에서 2시간 동안 transfer하여 NC-filter에 peptide가 흡착되도록 하였다. NC-filter는 1% blotto를 이용하여 4°C에서 blocking하였으며 1× TBS-Tween 20으로 세정하였다. 선행 실험에서 4개의 세포주를 통해 생산된 각각의 IGF-I mAb를 1:50으로 희석하여 NC-filter에 흡착된 rhIGF-I과 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후 alkaline phosphatase가 conjugate되어 있는 anti-mouse IgG를 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 NC-filter는 substrate solution과 반응시켜 IGF-I mAb의 특이적인 반응을 확인하였다.

### 2) 간접면역형광항체법

착유된 시유 및 유선조직 내의 세포에서 발현되는 IGF-I peptide에 대해 생산된 IGF-I mAb의 결합 여부를 체외에서 확인하기 위해 도축된 유우로부터 유선조직을 채취하여 유선세포를 분리 배양하였다.

#### ① 원유와 원유 및 탈락세포 내에서의 IGF-I 발현 확인

1등급 우유를 생산하는 유우로부터 3L의 원유를 착유하여 4°C를 유지한 상태에서 실험실로 운반하였다. 원유 중에 함유되어 있는 IGF-I 및 내포된 탈락 세포들에서 발현되는 IGF-I peptide와 IGF-I mAb가 결합하는지 여부를 관찰하기 위

하여 채집된 원유 중 일부를 poly-L-lysine 용액이 피복된 slide glass에 놓고 10 분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였으며 상온에서 건조하여 -20℃에 보관하였다. IGF-I mAb를 분비하는 4주의 잡종 세포주들의 배양 상층액에 의한 원유 중 IGF-I의 발현 양상은 간접면역형광항체 반응으로 확인하였다.

### ② 유선 조직의 분리 및 유선상피 세포주 확립

도축 의뢰된 3산차 유우의 유선조직을 무균 상태로 회수하여 2% gentamycine 이 첨가된 PBS (pH 7.4)에 보존하였으며 4℃를 유지한 상태에서 운반하였다. 유선조직의 일부는 동결절편을 위하여 20℃에 보관하였으며 30g 정도의 잔여조직은 오염물을 제거하기 위하여 외부조직을 제거한 후 PBS로 3회 세정하였다. 선별된 조직은 gelatin을 제거하기 위하여 0.22 $\mu$ m 그물망에 유제하여 유선조직으로부터 유선세포피를 분리하였으며 0.25%의 trypsin에서 10분간 교반 후 300 $\times$ g에서 원심분리 하였다. 분리된 세포는 1%의 antibiotics와 10%의 FCS가 첨가된 DMEM 배양액상에서 계대배양 하였으며 전술한 바와 같이 생산된 IGF-I mAb를 이용한 간접면역형광항체법을 통해 IGF-I의 발현을 확인하였다.

### ③ 유선조직의 동결절편 및 IGF-I의 발현 확인

세포배양을 위해 세정된 일부의 유선조직을 -20℃에 동결하여 4 $\mu$ m로 동결 절편한 후 glass slide에 부착하여 0.3% Tween 20-PBS로 세정하였으며 10% normal goat serum을 첨가하여 37℃에서 40분간 blocking하였다. 1% Tween 20-PBS로 3회 세정한 후에 대조구인 rabbit anti-human IGF-I pAb 및 제작된 IGF-I mAb, 생쥐의 면역 혈청을 각각 200배로 희석하여 40분간 반응 후 세정하고 goat anti-mouse IgG-FITC에서 1시간 동안 반응하여 특이 형광반응을 관찰하였다.

### ④ 유선조직의 paraffin 절편 및 IGF-I 발현 확인

유우의 유선조직을 적당한 크기로 절개하고 paraffin으로 포매하여 5 $\mu$ m로 절편한 조직을 glass slide에 부착하였다. 절편 조직 중 한 장은 H&E staining을 실시하여 표본으로 이용하였다. 준비된 glass slide상의 조직은 xylene에 침적하여

paraffin을 제거한 다음 가수처리 하였고, 증류수와 PBS로 세정하여 acetone과 methanol을 1:1로 혼합한 용액에 10분간 고정하였다. 3회의 세정 후에 vectastain ABC kit (Vector Lab, USA)를 이용하여 horse serum으로 blocking하였으며 생산된 IGF-I mAb와 반응을 유도하였다.

Biotinylated mouse anti-mouse IgG를 200배로 희석하여 실온에서 40분간 반응하고 30분전에 미리 준비한 avidin과 biotinylated anti-mouse IgG를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세정하였다. 발색 기질로는 DAB (3,3-Diamino-benzidine tetrahydrochloride) 용액을 사용하였으며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 10분간 발색, 세정 후 IGF-I의 발현을 관찰하였다.

## **마. Immunoaffinity chromatography에 의한 우유 내 IGF-I의 분리**

### **1) Gel filtration chromatography**

우유 특히 초유 내에 많은 양으로 존재하는 immunoglobulin를 제거하고 IGF binding protein (IGFBP)과 결합된 IGF-I을 분리하기 위하여 Donovan 등(1994)에 의해 보고된 방법에 준하여 gel filtration chromatography를 실시하였다. 초유로부터 유청을 분리하기 위하여 6,000rpm으로 30분간 원심분리하여 지질을 제거하였으며 HCl을 이용하여 pH를 4.6으로 조정한 후 6,000rpm에서 1시간 15분간 원심분리를 실시하였다. 2.5×50cm Econo column (Biorad, USA)에 Sephadex G-50 superfine (Sigma, USA)을 240 ml 충전하였으며 회수된 유청을 column에 주입하여 PBS로 세정을 실시하면서 fraction을 회수하였다. Gel filtration이 끝난 시료는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### **2) Immunoaffinity chromatography**

Gel filtration chromatography를 통해 immunoglobulin 및 IGFBP가 제거된 시료에 대하여 생산된 IGF-I mAb가 부착된 affinity column을 통해 chromatography를 실시하여 우유 내 IGF-I을 분리하고자 하였다.

Protein A가 부착된 Sepharose CL-4B (Sigma, USA)에 IGF-I mAb를 함유하

고 있는 복수 20 $\mu$ l를 혼합하여 상온에서 4시간 동안 반응시켰다. 불순물의 제거를 위하여 0.2M의 sodium borate를 가한 후 1,000 $\times$ g에서 원심분리 하였으며 상층액은 제거하고 protein A bead는 0.2 M sodium borate에 재부유하였다. mAb와 protein A의 결합을 강화시키기 위해 dimethylpimelimidate(DMP) 5.1 mg을 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 반응의 종료를 위해 1,000 $\times$ g에서 원심분리를 실시하였으며 상층액을 제거하고 resin만을 0.2M ethanolamine에 재부유하였다. 그리고 위에서와 동일한 방법으로 원심분리를 통해 세정을 실시하였다. 산처리를 통해 분리된 유청의 pH를 8.45로 중화한 후 mAb가 coupling된 resin과 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 우유 내 IGF-I이 mAb에 결합되도록 하였다. 반응이 완료된 후 column에 부어 resin을 충전하였으며 20 bed volume의 buffer A로 column을 세정하였다. Elution buffer로는 LiCl을 사용하였으며 농도는 0.5M에서 5.0M까지 순차적으로 높여 elution을 실시함으로써 mAb와 결합된 IGF-I을 분리시켜 fraction으로 회수하였다.

### 3) Desalting chromatography

Immunoaffinity chromatography를 통해 회수된 fraction에는 elution buffer에서 유래된 높은 농도의 salt가 함유되어 있기 때문에 이의 제거를 위해 desalting chromatography를 실시하였다. Column을 Sephadex G-25 superfine (Sigma, USA)으로 충전하였으며 immunoaffinity chromatography를 통해 회수된 시료를 주입하여 PBS로 세정하면서 fraction을 회수함으로써 salt가 제거된 순수한 IGF-I을 분리하였다.

## 바. IGF-I mAb를 이용한 방사선 및 비방사선면역면역측정법의 개선

### 1) 방사선면역측정법(RIA)

우유 내 IGF-I의 농도를 측정하기 위해서 [ $^{125}$ I]IGF-I과 IGF-I mAb를 이용한 방사선면역측정법을 사용하였다. rhIGF-I은 1mCi Na $^{125}$ I(Amersh, Arlington Heights, IL)를 chloramine T 방법을 이용하여, specific activity가 약 300  $\mu$ Ci/ $\mu$ g

이 되도록 iodination시켰다. 각 시료(100 $\mu$ l)들은 400 $\mu$ l acid-ethanol (87.5% ethanol, 12.5% HCl)과 상온에서 1시간 동안 정치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 1,800 $\times$ g로 30분간 원심분리하여 IGF-I을 IGFBP로부터 분리하였다. IGF-I이 함유된 상층액을 50 $\mu$ l 추출하여 RIA 완충액(30mM sodium phosphate, 0.02% protamine sulfate, 10mM EDTA, 0.05% Tween-20, 0.02% sodium azide, pH 7.5)을 100 $\mu$ l 첨가하고, 0.1ml의 IGF-I mAb을 추가하였으며, 각각의 glass tube에 0.1ml의 15,000cpm [ $^{125}$ I]IGF-I을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 이상 정치시켰다. 정치 후 1:20으로 희석된 goat anti-mouse IgG antibody (GroPep Pty Ltd, Australia)를 0.1ml씩 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치한 후, 침전물을 얻기 위해 normal rabbit serum (1:30)을 각각의 glass tube에 0.1ml씩 추가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 다시 1시간 정치시켰다. 1시간 후 RIA 완충액(1ml)을 첨가하고 4 $^{\circ}$ C, 3,000 $\times$ g에서 30분간 원심분리시켜 상층액과 침전물을 분리시켰다. 분리된 상층액은 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter로 측정하였으며, 측정에 들어간 시료 및 단백질의 양을 고려하여 농도를 보정하였다.

## 2) 비방사선면역측정법(ELISA)

비방사선면역측정법을 통해 우유 내에 존재하는 IGF-I을 정량분석하기 위하여 antibody capture assay법을 사용하여 분석법을 확립하고자 하였다. 우유 시료를 acidification시켜 casein 등의 물질을 분리·제거한 후, 100 $\mu$ l씩 96-well plate에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 약 16시간 동안 건조시켰다. Plate를 PBST (PBS+0.05% Tween 20)를 이용하여 2회 세정하였다. 150 $\mu$ l의 blocking solution (2% BSA-PBS)을 넣은 후, 실온에서 2시간 동안 반응을 유도하였으며 blocking solution을 제거한 후, PBST로 다시 2회 세정하였다. 적정 titer의 1차 항체 100 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응 하였으며 반응액을 제거한 후, 5번에 걸쳐 PBST로 세척하였다. Horse-raddish peroxidase가 부착된 2차 항체를 100 $\mu$ l 분주하고 1시간 동안 incubation하였다. PBST로 5차례 세정한 후, 30% H $_2$ O $_2$ 가 첨가된 substrate solution (OPD, o-phenylenediamine dihydrochloride)을 넣고 어두운 곳에서 반응을 시키면서 발색 변화를 관찰하였으며 2M H $_2$ SO $_4$ 를 첨가하여 반응을 중지한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 사. 분리된 우유 내 IGF-I의 *in-vitro*에서의 생리활성 검증

### 1) 세포주의 확립

Immunoaffinity chromatography를 통해 분리된 우유 내 IGF-I mAb의 *in-vitro*에서의 생리 활성을 검증하기 위하여 기존의 보고를 통해 IGF-I에 대한 반응을 나타낸 세포주를 선택·결정하였다. 세포주는 근육(C2C12), 신경(HCN-1A), 자궁(Hec-1B), 유선(MCF-7), 간(HepG2) 세포의 총 5가지 종류로 하였으며 ATCC (USA)로부터 직접 구입하여 확보하였다. 모든 세포주는 10%의 FCS가 첨가된 DMEM 배양액에서 배양하였으며 Hec-1B 세포주에는 1%의 비필수 아미노산을 첨가하였다.

### 2) 세포주의 무단백(serum free) 배양 조건 확립

우유 내에서 분리된 IGF-I의 생리활성을 상업적으로 판매되고 있는 재조합 IGF-I의 생리활성과 비교하기 위하여 세포의 무단백 배양조건을 확립하였다. 완전 배양액 내에서 3세대 이상 계대배양을 실시하여 완전히 확립된 세포주를 완전배양액과 무단백 배양액을 1:1로 혼합한 배양액에서 배양하였다. 세포가  $5 \times 10^5$  cells/ml 이상의 밀도까지 증식된 후 동량의 무단백 배양액에 1:2로 split하였으며 동일한 방법으로 2세대를 계대배양하여 무단백 배양 조건을 확립하였다.

### 3) 세포 성장 곡선의 확인

우유 내 IGF-I 및 rhIGF-I을 각각 농도를 달리하여 배양액에 첨가한 후 세포의 밀도를  $5 \times 10^4$  cells/ml부터 시작하여 매일 5일간 혈구계산판을 이용하여 세포수를 측정 후 세포의 성장 곡선을 통해 세포의 성장 양상을 비교·관찰하였다.

### 4) BrdU cell proliferation assay

세포 증식의 증거로 DNA의 합성 정도를 측정하기 위하여 BrdU assay를 실시하였다. 우유 내 IGF-I과 rhIGF-I을 각각 농도를 달리하여 첨가한 배양액을 96-well plate에 각 well당  $150 \mu\text{l}$ 씩 가하고 각 세포주를 48시간 후 각 well당  $10 \mu\text{l}$ 의 BrdU 용액으로 세포를 표지하여 2시간 동안 정치하였다. 표지된 배양액을

제거하고 200 $\mu$ l의 fixing solution으로 표지를 고정한 후 상온에서 20분동안 정치하였다. Fixing solution을 제거하고 100 $\mu$ l의 anti-BrdU-POD를 처리한 후 상온에서 다시 90분 동안 정치하였다. Washing solution으로 2~3회 세정하고 substrate solution 100 $\mu$ l를 가하여 발색을 유도하였다. 상온에서 20분 동안 정치한 후 25 $\mu$ l의 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 발색 반응을 정지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였으며 65nm를 reference wavelength로 사용하였다.

### 5) MTT assay

세포 증식의 다른 한가지 증거로 세포 내 물질 대사의 활성도를 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 우유 내 IGF-I과 rhIGF-I을 각각 농도를 달리하여 첨가한 배양액을 96-well plate에 각 well당 100 $\mu$ l씩 가하고 각 세포주를 48시간 배양한 후 각 well당 50 $\mu$ l의 MTT를 첨가하였다. 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 150 $\mu$ l의 DMSO를 첨가하여 발색을 유도하였으며 plate를 잘 흔들어 준 후 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 아. 분리된 우유 내 IGF-I의 *in-vivo*에서의 생리활성 검증

#### 1) 공시동물

이유 후 3주령의 ICR 생쥐를 확보하여 1주일간의 적응기간을 두었으며 1 $\mu$ g/g body weight/day의 IGF-I 강화유 및 초유를 3일 간격으로 14일간 구강투여하였다.

#### 2) 성장 발달 분석

구강 투여한 IGF-I의 *in-vivo*에서의 생리 효과를 확인하기 위하여 매일 체중을 측정하였으며 IGF-I 강화유 및 초유 투여 후 1주일 간격으로 개체를 희생하여 조직의 무게를 측정하였다.

#### 3) 혈액 채취 및 혈청 분리

IGF-I 강화유 및 초유 투여에 의한 혈중 IGF-I의 발현을 확인하기 위해 1주일 간격으로 개체를 희생하여 심장에서 1ml의 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 실온에서 1~2시간 정치시킨 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 회수하였다. 실험상의 오차로 나타날 수 있는 반복구간을 최소화하기 위해 일정량의 시료가 준비될 때까지 혈청을 -20°C에서 보관하였다.

#### 4) 단백질의 분리

일주일 간격으로 개체를 희생하여 간, 뇌, 소장, 근육 시료를 무균적으로 채취하였으며, 채취된 근육 시료에서 IGFs의 농도와 IGF-I 및 IGF-IR mRNA의 발현을 살펴보기 위하여 단백질을 추출하였다. 시료를 세절한 후 조직 0.1g당 100  $\mu$ l의 RIPA buffer(1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris·Cl(pH 7.5), 10mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 10mM potassium acetate, 1mM DTT, 1× aprotinin, 1mM PMSF)를 혼합하여 4°C에서 2시간 동안 정치한 후 100,000×g에서 15분 동안 원심분리를 실시하였으며 상층액을 분리하여 분석시까지 -70°C에서 보관하였다.

#### 5) 방사선면역측정법(RIA)

조직에서 분리한 단백질 및 혈청 내 IGF-I의 농도를 측정하기 위해 [<sup>125</sup>I]IGF-I 과 polyclonal IGF-I 항체를 이용한 방사선면역측정법을 사용하였다(Daughday 등, 1980). rhIGF-I은 1mCi Na<sup>125</sup>I (Amersham, Arlington Heights, IL)를 chloramine T 방법을 이용하여 specific activity가 270~300  $\mu$ Ci/ $\mu$ g이 되도록 iodination시켰다. 각 그룹의 시료(200 $\mu$ l)들은 800 $\mu$ l acid-ethanol (87.5% ethanol, 12.5% HCl)과 상온에서 1시간 동안 정치한 후 4°C에서 1,800×g로 30분간 원심분리하여 IGF-I을 binding protein으로부터 분리하였다. IGF-Idl 함유된 상층액을 10 $\mu$ l 추출하여 RIA 완충액(0.035M sodium phosphate, 0.02% protamine sulfate, 0.05% Tween-20, 0.02% sodium azide, pH 7.5)을 190 $\mu$ l 첨가하고, 0.1ml의 1:120,000으로 희석된 rabbit anti-human IGF-I polyclonal antiserum (GroPep Pty Ltd, Australia)을 추가하였으며, 각각의 시험관에 0.1ml의 30,000cpm [<sup>125</sup>I]IGF-I을 첨가하여, 4°C에서 18시간 이상 정치시켰다. 정치 후 1:10으로 희석

된 goat anti-rabbit IgG antibody (GroPep Pty Ltd, Australia)를 0.1ml씩 첨가하여 4°C에서 1시간 정치한 후, 침전물을 얻기 위해 normal rabbit serum (1:100)을 시험관에 0.1ml씩 추가한 후 4°C에서 다시 1시간 정치시켰다. 1시간 후 RIA 완충액(1ml)을 첨가하고 4°C에서 3,000×g로 30분간 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하였다. 분리된 상층액을 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter로 측정하였으며, 사용된 시료의 양을 고려하여 농도를 보정하였다.

## 6) IGF-I 유전정보의 발현

각 조직에서의 IGF-I 및 IGF type I receptor (IGF-IR)의 조직 내에서의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하여 mRNA의 발현을 확인하였다.

### ① RNA extraction

Total RNA의 분리는 Chomzynski와 Sacchi (1987)에 의해 보고된 guanidine thiocyanate 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 각 조직의 시료를 액체질소 하에서 마쇄하여 1ml의 RNA extraction buffer [20ml denaturing solution (4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl), 0.144ml β-mercaptoethanol, 2ml 2M sodium acetate (pH 4.0), 22ml water-saturated phenol]를 가하여 세포를 lysis시킨 후 microfuge tube로 옮겼다. 이후 100μl의 chloroform을 가한 후 4°C에서 15분간 정치하여 반응을 유도하였다. 4°C, 5,000×g에서 30분간 원심분리를 실시한 후 상층액을 취하였으며 1ml의 isopropanol을 가하고 -20°C에서 2시간 동안 정치하여 total RNA를 응축하였다. 이후 4°C, 8,000×g에서 30분간 원심분리를 실시하여 응축된 total RNA를 pellet으로 회수하였으며, 상층액을 제거한 후 70% ethanol을 가하고 4°C, 8,000×g에서 15분간 원심분리를 실시하여 total RNA를 세정하였다. 최종적으로 회수된 total RNA는 처리한 70% ethanol을 완전히 제거한 후 50μl의 DEPC water에 resuspension 시켰으며 A260에서 농도를 측정한 후 곧바로 cDNA를 합성하였다.

### ② Complementary DNA (cDNA) 합성

cDNA는 250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 1mM dNTP, RNase 20U가 포함되어 있는 총 부피 20 $\mu$ l의 AccuPower™ RT premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 합성하였다. RT premix에 260nm의 흡광도 측정을 통하여 구한 RNA 1 $\mu$ g과 0.3 $\mu$ g의 random primer를 첨가한 후 3차 증류수를 사용하여 최종 부피를 20 $\mu$ l로 조정하였다. 57°C에서 10분간 RNA 변성을 실시하였으며, 42°C에서 60분간 역전사 반응을 유도하였고, RTase의 불활성화를 위하여 94°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

### ③ PCR 증폭

cDNA 합성 후 RNA 분리 및 cDNA의 균일한 합성을 알아보기 위하여  $\beta$ -actin primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1U DNA polymerase, 1mM dNTP가 포함되어 있는 AccuPower™ PCR premix (Bioneer, Korea)에 20pM의 primer와 5 $\mu$ l의 cDNA를 넣은 후 3차 증류수를 이용하여 총 부피를 20 $\mu$ l가 되도록 조정하여 실시하였으며, GeneAmp PCR System 200 (Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하여 증폭하였다. 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다. IGF-IR 5' sense primer: 5'-ACTGACCTCATGCGCATGTGCTGG-3', IGF-IR 3' antisense primer: 5'-CTCGTTCTTGCGGCCCGTTCAT-3', IGF-I 5' sense primer: 5'-GGACCAGAGACCCTTTGCGGGG-3', IGF-I 3' antisense primer: 5'-GGCTGCTTTTGTAGGCTTCAGTGG-3'. 또한 각 유전자의 증폭조건은 Oomizu 등(1998)의 보고에 준하여 94°C에서 2분간 반응한 후 94°C에서 45초, 60°C에서 45초 동안의 반응 과정을 35회 반복하였으며 마지막 cycle의 종료 후 72°C에서 7분간 elongation을 실시하였다. 전술한 바와 같은 조건에 의해 생산된 PCR product의 크기는 IGF-I과 IGF-IR가 각각 210bp와 345bp를 나타내었으며 2% agarose gel에서 20분간 분리하여 발현의 정도를 확인하였다.

### 7) Immunohistochemistry

회수된 각 조직(뇌, 소장, 간, 근육) 내 IGF-I의 발현을 관찰하기 위하여 polyclonal IGF-I 항체를 이용하여 조직면역화학법(immunohistochemistry)을 실

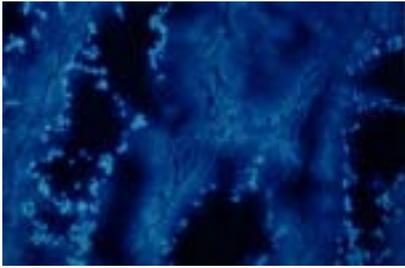
시하였다(Kelly 등, 2001). 조직은 희생 직후 관류기를 이용하여 6시간 동안 phosphate 완충액(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 관류시킨 후 조직을 10 $\mu$ m 정도의 두께로 절편하였다. 절편된 조직은 4% paraformaldehyde 용액에서 4시간 정치시킨 후 TissueTek O.C.T. (Bayer Corporation, USA)를 이용하여 -70°C에서 정치시켰다. 이후 증류수와 phosphate 완충액으로 세척을 실시하고 0.5% hydrogen peroxide 용액에서 10분간 정치시켰으며 이어서 mouse serum에서 10분간 정치시켜 phosphate 완충액으로 5분씩 3회 세척하였다. Polyclonal anti-human IGF-I antibody (Groppe Pty Ltd, Australia)를 1:100으로 희석하여 4°C에서 14시간 반응시켰으며 phosphate 완충액을 이용하여 각 5분씩 3회 세척한 후 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase 희석 용액에서 1시간 정치시켰다. Streptavidin을 phosphate 완충액으로 희석한 용액에 조직을 45분간 정치시킨 후 다시 5분씩 phosphate 완충액으로 3회 세척하여 DAB 용액에서 5분간 정치시키고 증류수를 이용하여 절편을 세척하였다. Ethanol과 xylene을 70%, 80%, 90%, 95%, 100%로 하여 각각 처리한 후 현미경을 이용하여 IGF-I의 발현을 관찰하였다.

## 8. 연구개발수행 내용 및 결과

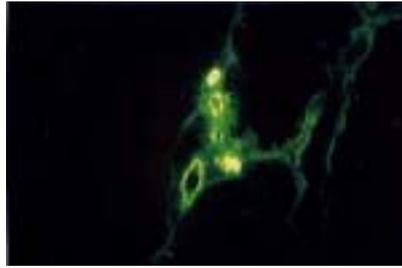
### 가. IGF-I mAb 생산

#### 1) 면역 혈청의 역가 및 효능 시험

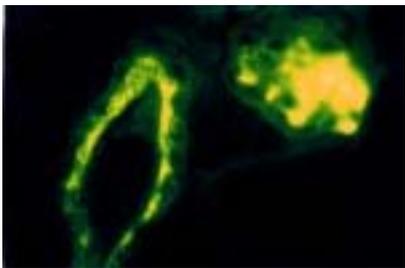
면역된 생쥐의 혈청 내에 존재하는 항체의 역가 및 IGF-I에 반응하는지 여부를 확인하기 위하여 생쥐의 정소 조직을 이용한 간접면역형광항체법을 실시하였다. 전체적으로 강한 역가를 나타내었으며 특히 정소세관 상피세포와 혈관부 그리고 정소상체의 미부관 내 상피세포에서 그 발현이 강하게 나타났다. 또한 면역 혈청 내에 존재하는 항체에 의한 특이 형광발현이 조직 위치의 특성에 따라 다른 양상을 보여 그 특이성을 인정할 수 있었다(Fig. 18).



(A) DAPI 200×



(B) FITC 200×



(C) FITC 400×

**Figure 18.** Reactions of immunized mouse serum in several seminiferous tubules of mouse testis.

## 2) Screening

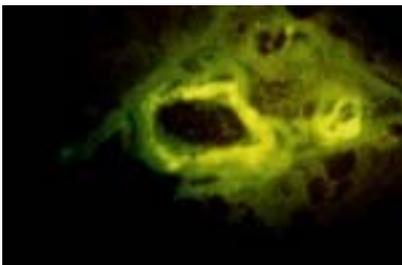
생쥐의 정소 조직 및 HepG2 세포주를 이용하여 잡종 세포주들의 배양 상층액 내에 존재하는 IGF-I mAb에 의한 항원-항체 반응을 조직 특이적으로 확인하여 강한 발현을 나타내는 잡종 세포주를 선별하였다. 확립된 잡종 세포주 중 특히 1C3 잡종 세포주의 배양 상층액을 사용한 경우 강한 형광 발현이 확인 되었으며 또한 동일 조직에서 rabbit anti-human IGF-I pAb를 사용했을 때의 결과와 유사한 형광반응을 보여 1차적인 선별을 완료할 수 있었다(Fig. 20, 21).



(A) DAPI 200×

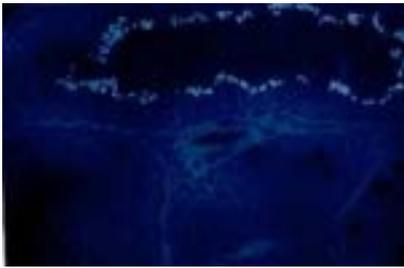


(B) FITC 200×

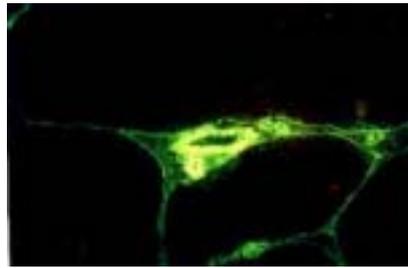


(C) FITC 400×

**Figure 19.** Reactions of rabbit anti-human IGF-I pAb in several seminiferous tubules of mouse testis.



(A) DAPI 200×

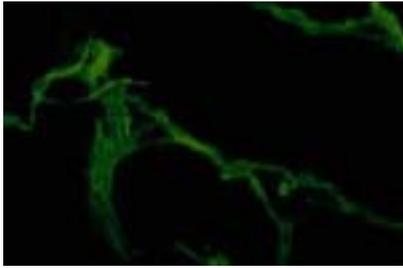


(B) FITC 200×

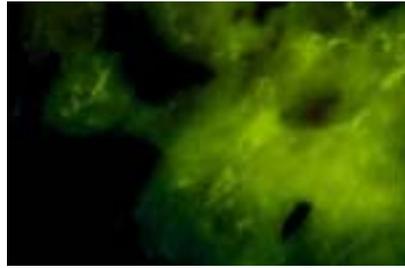


(C) FITC 400×

**Figure 20.** Reactions of the supernatant from the hybridoma culture medium (1C3) in several seminiferous tubules of mouse testis.

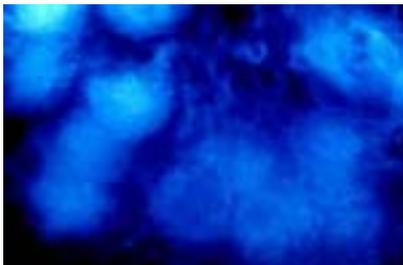


(A) 200×

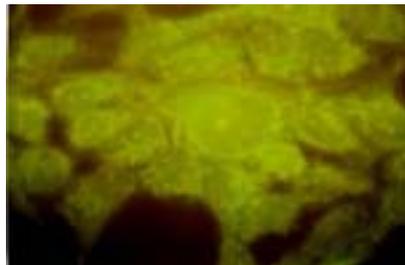


(B) 400×

**Figure 21.** Reactions of the supernatant from the hybridoma culture medium (1C3) in ductus epididymidis of mouse testis.



(A) DAPI

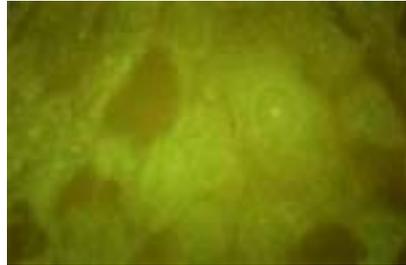


(B) FITC

**Figure 22.** Reactions of hybridoma culture medium (1C3) in HepG2 cells.



(A) DAPI



(B) FITC

**Figure 23.** Reactions of rabbit anti-human IGF-I pAb in HepG2 cells.

### 3) IGF-I mAb 분비 잡종 세포주의 확립

IGF-I mAb 분비 잡종세포주의 선발은 MDCK 세포를 이용한 간접면역형광 항체법에 의하여 세포 내의 각기 다른 위치에서의 발현이나 발현 정도의 확인을 통해 실시하였다. 대조구로는 상업용으로 시판되고 있는 rabbit anti-human IGF-I pAb(Fig. 24) 및 앞선 실험에서 분리된 생쥐의 면역 혈청(Fig. 25)을 사용하였으며 선별된 잡종세포주의 배양 상층액 내 항체의 역가를 이들과 비교하여 2차적인 선별을 실시하였다. 실험 결과 1E6E8 세포주에서만 Tween-20으로 세정한 세포들에서 미약한 국부적 형광 반응을 확인할 수 있었다(Fig. 27). Triton X-100의 처리에 의한 세포 내부에서의 발현 양상은 DAPI의 염색과 녹색형광을 동시에 염색하여 관찰하였다. 3F8B5 잡종 세포주의 배양 상층액을 이용한 경우 세포의 핵과 핵소질에서의 발현 양상은 관찰되지 않았으며 세포질 내에서만 강한 spot 형태로 특이 반응이 관찰되었다. 3F8B3 잡종 세포주의 배양 상층액을 이용한 경우에는 세포질 전체에 산재된 발현을 보였다. 또한 triton X-100을 처리하지 않은 실험군에서는 3F8C6 잡종 세포주의 배양 상층액을 이용한 경우에 특이적 반응이 확인되어 이상 총 4주의 잡종 세포주들을 2차적으로 선별하였다. 한편, 잡종 세포주의 발육을 위하여 배양액에 첨가한 FCS 내에 함유되어 있는 IGF-I에 의한 비특이적 발현 유무를 확인하기 위하여, 배양액을 별도의 대조구와 시험한 결과 발현 양상은 관찰되지 않았다.



(A) 20×



(B) 100×

**Figure 24.** FITC reactions of rabbit anti-human IGF-I pAb in MDCK cells.

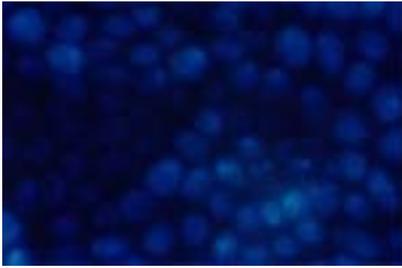


(A) 20×



(B) 100×

**Figure 25.** FITC reactions of immunized mouse serum in MDCK cells.



(A) DAPI

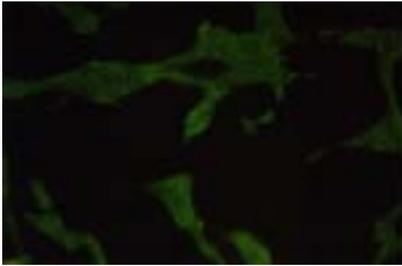


(B) Co-localization



(C) FITC

**Figure 26.** FITC reactions and co-localized reactions of the supernatant from hybridoma (3F8C6) culture medium in MDCK cells (100 $\times$ ).



(A) 3F8B5



(B) 1E6E8



(C) 3F8B3

**Figure 27.** Reactions of the supernatants from different types of hybridoma culture medium in MDCK cells (100 $\times$ ).

#### 4) IGF-I mAb 분비 잡종 세포주의 대량배양 및 복수의 생산

위와 같이 선별된 4주의 잡종 세포주들은 HAT 선택배양액으로 재배양하여 항체를 분비하지 않는 변이 세포들을 제거하였다. 선택된 세포들은 대량배양 후 원심분리하고 상층액은 IGF-I의 항체 검출에 이용하였으며 침전된 4종의 세포주들은 복수의 생산을 위하여 각각 5마리의 Balb/c 생쥐 복강 내로 주입하였다. 복수의 형성은 잡종 세포주의 주입 7일차부터 형성되었으며 잔여세포는 동결하여 액체질소에 보존하였다.

#### **나. 원유 및 유선에서의 IGF-I 발현 확인**

##### **1) 유선세포의 분리 배양 및 IGF-I의 발현 확인**

유선의 유선세포 내에서 발현되는 IGF-I 검출을 위한 조직 내에서의 조직 면역학적 반응 확인 및 분리된 유선세포에서의 immunocytochemistry 기법을 위한 유선조직의 초대 배양(primary culture)을 수행하기 위하여, 채집된 원유 중에 탈락되어 내포된 유선세포를 분리하였으며 이를 이용하여 생체 내에서 신호전달 체계가 적용되어 활성화된 세포 내 IGF-I의 활성을 탐색하였다. Chamber slide glass에 배양된 세포내의 형광발현 양상은 유선 상피세포의 발육 저조와 실험 중의 세정 과정으로 인한 소실로 극히 미약한 발현만을 나타내었다. 이 과정에서 세포가 부착되었던 위치에서의 세부 잔여물로 보이는 강력한 형광발현 양상이 관찰되었다.

##### **2) 원유 내 유선세포에서의 IGF-I 발현 확인**

IGF-I mAb의 선별과정의 한 방법으로서, 또한 현장에서 사용할 수 있는 간편한 IGF-I 정량방법 확립을 위한 기초실험의 일환으로서 slide glass에 직접 원유를 포매하여 IGF-I의 발현을 분석하였다. 분석 결과 원유 내에 존재하는 IGF-I의 발현은 IGF-I mAb들과 대조구인 rabbit anti-human IGF-I pAb 모두에서 극히 미세한 발현을 나타내어 비특이적인 발현과의 구분이 명확히 나타나지 않았다.

#### **다. IGF-I mAb의 isotyping**

제작된 mAb들의 isotype을 결정하기 위하여 ELISA법을 이용하여 isotyping을 실시하였으며 immunoglobulin의 heavy chain과 light chain의 type을 결정하였다. 생산된 mAb들의 light chain은 모두  $\kappa$ -chain으로 나타났으며 heavy chain은 각각 다른 IgG isotype으로 확인되었다(Table 18).

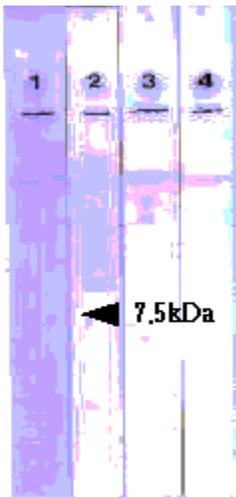
**Table 18.** Isotypes of monoclonal antibodies against human IGF-I (antibodies were used in 1:10 dilution)

Monoclonal antibodies	Isotypes	
	H chain	L chain
3F8B5	IgG <sub>2b</sub>	κ
1E6E8	IgG <sub>1</sub>	κ
3F8C6	IgM	κ
3F8B3	IgG <sub>2b</sub>	κ

## 라. IGF-I mAb의 확인

### 1) Western hybridization

제작된 IGF-I mAb가 실제로 IGF-I peptide와 특이적인 반응을 하는지 여부를 확인하기 위해 4주의 잡종 세포주로부터 생산된 복수에 대해 Western blot을 실시하였다. 1E6E8 잡종 세포주의 복수에서는 7.5kDa의 위치에서 band를 확인할 수 있었으나 3F8B3, 3F8B5, 3F8C6 잡종 세포주의 복수에서는 발현이 매우 미약하여 세포주간에 mAb의 발현 양상에 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig 28). 이는 실험에 이용한 잡종 세포주에서 mAb의 생산 양상이 잡종 세포주간에 차이가 있기 때문으로 생각된다. 따라서 높은 발현을 보인 1E6E8 잡종 세포주에 대해 집중적으로 복수를 생산하여 확보된 IGF-I mAb를 이후의 실험에 이용하였다.



**Figure 28.** Western blotting for IGF-I mAb

- 1) 1E6E8 ascitic fluid
- 2) 3F8B3 ascitic fluid
- 3) 3F8B5 ascitic fluid
- 4) 3F8C6 ascitic fluid

## 2) 간접면역형광항체법

### 가) 원유 내 IGF-I의 발현 확인

채집된 원유 중에 탈락되어 내포한 유선세포를 분리 이용함으로써 생체 내에서 신호 전달체계가 적용되어 활성화된 세포 내에서의 IGF-I 활성을 탐색하였다. Slide glass에 포매된 원유와 세포들에서의 분석 결과 IGF-I mAb들과 대조구인 rabbit anti-human IGF-I pAb들에 의한 발현 양상은 비 특이적인 발현과 명확

히 구분되지 않는 미세한 발현을 나타내었다(Fig. 29).

Chamber slide glass에서 배양된 세포내 특이 형광발현 양상은 유선상피세포의 발육양상이 저조하여 극히 미약한 발현을 나타내었으며 세정과정으로 인한 소실로 유의성 있는 관찰이 불가능하였다. 또한 세포가 부착되었던 위치에서의 잔여물로 보이는 강력한 형광발현 양상을 관찰할 수 있었다.



**Figure 29.** FITC reactions of rabbit anti-human IGF-I pAb at unknown cells in milk.

#### 나) 유선세포의 분리배양 및 IGF-I 발현 확인

유우의 유선세포 내에서 IGF-I mAb에 의해 IGF-I peptide를 검출하기 위하여 분리된 유선세포에서 immunocytochemistry를 실시하였다. 유선조직 구성 세포의 초대 배양 시도에서는 세포 생리환경의 급격한 변화와 성장인자의 결여, 분화 완료된 세포로서의 발육양상 저조로 인하여 이용이 어려웠다(Fig. 30).

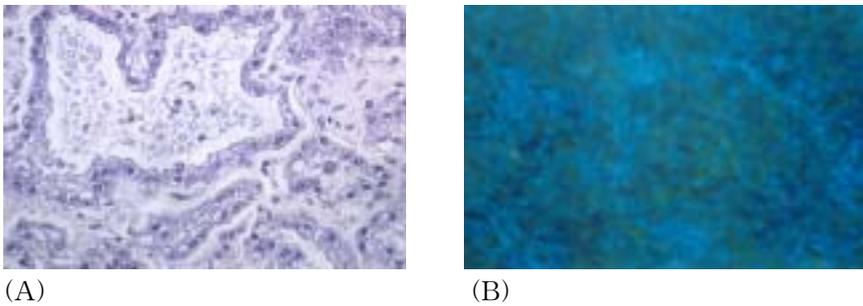


**Figure 30.** Different types of isolated bovine mammary gland cells.

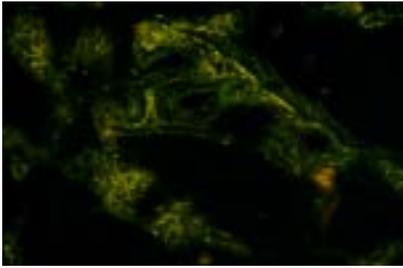
#### 다) 유선 동결 조직 내 IGF-I mAb의 특성 확인

유선 조직 내 IGF-I의 발현 확인을 위한 조직면역학적 반응은 도축된 유우(3산차)로부터 유방조직을 채취한 후 동결절편하여 이용하였으며 간접면역형광항체법에 의하여 유선조직 내에서 발현의 위치나 정도를 확인하였다. 유즙 생성 조직에서의 IGF-I peptide와 IGF-I mAb들의 반응을 확인한 결과 특이 형광 반응은 조직의 상피세포로 보여지는 위치에서 가장 강한 발현을 나타내었다.

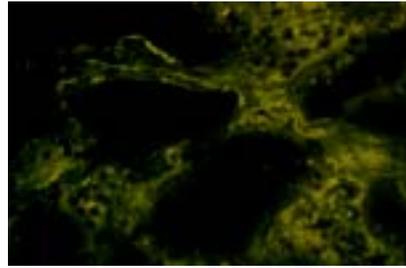
세포를 이용한 결과에서와 동일하게 DAPI 염색에 의한 비교에서 조직 내 세포의 핵과 핵소질에서의 발현양상은 관찰되지 않았으며(Fig. 31) 세포 표면에서는 대조구로 사용된  $\alpha$ -tubulin mAb 및 rabbit anti-human IGF-I pAb에 의한 발현 양상보다 국소적인 발현을 나타내었다(Fig. 32). 제작된 IGF-I mAb에 의한 IGF-I peptide의 발현 양상은 세포에 대한 실험결과와 동일하게 각기 다른 위치나 발현 양상을 나타내어 잡종 세포주의 종류에 따라 다른 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 33).



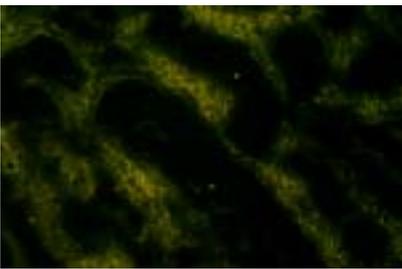
**Figure 31.** H&E staining at paraffin section of bovine mammary gland tissues, co-localization of nucleus for DAPI stain at bovine mammary gland cryosection tissue. (A) Bovine mammary glad tissue paraffin section (B) Co-localization of nucleus for DAPI stain.



(A)  $\alpha$ -tub mAb

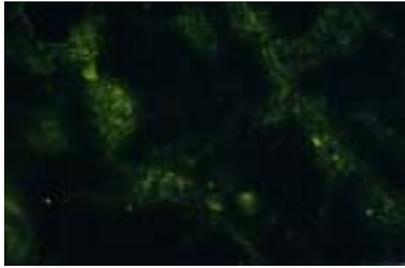


(B) Rabbit anti-human IGF-I pAb

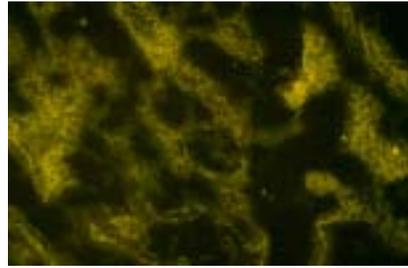


(C) Mouse anti-human IGF-I pAb

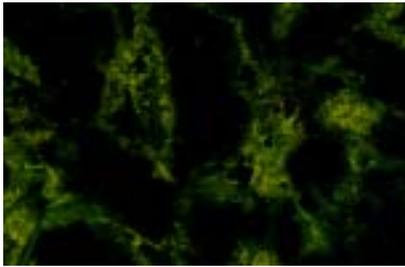
**Figure 32.** FITC reactions of various control antibodies at bovine mammary gland tissue.



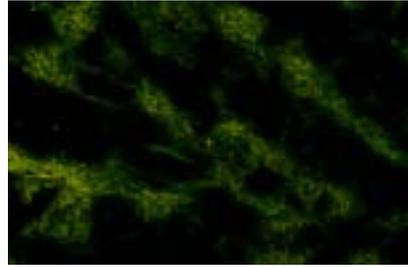
(A) 3F8B3



(B) 1E6E8



(C) 3F8B5



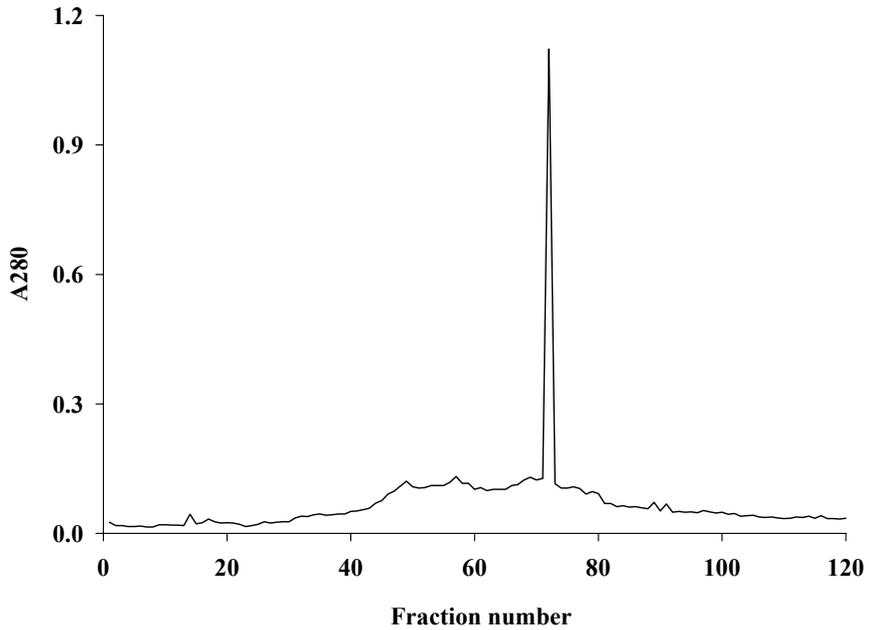
(D) 3F8C6

**Figure 33.** FITC reactions of IGF-I mAb at bovine mammary gland tissue.

마. Immunoaffinity chromatography에 의한 우유 내 IGF-I의 분리

### 1) Gel filtration chromatography

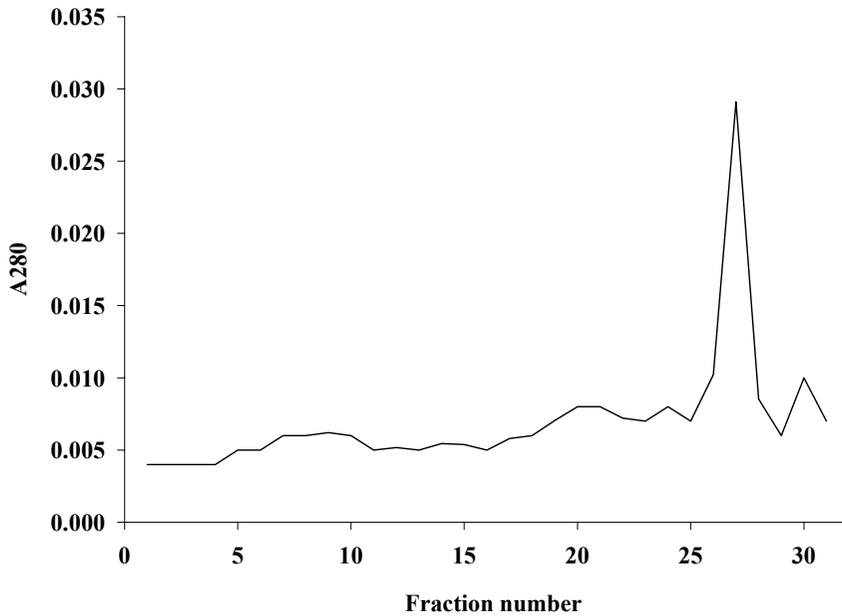
우유 내에 높은 농도로 존재하는 immunoglobulin은 affinity chromatography 과정에서 비특이적 반응을 유발하여 불순물을 함께 분리되도록 하는 요인으로 작용할 수 있다. 따라서 우유 내의 immunoglobulin을 제거하고 IGF-I을 IGFBP로부터 분리하기 위해 Sephadex G-50 superfine resin (Sigma, USA)을 이용하여 gel filtration chromatography를 실시하였다(Fig. 34). Fraction 70~74 사이에서 immunoglobulin의 peak가 검출되었으며 따라서 80번 이후의 fraction을 immunoaffinity chromatography에 이용하였다.



**Figure 34.** Gel filtration chromatography for removal of milk immunoglobulin and IGFBP.

## 2) Immunoaffinity chromatography

Gel filtration chromatography를 통해 우유 내 immunoglobulin과 IGFBP을 제거한 시료에 대하여 IGF-I mAb를 이용한 immunoaffinity chromatography를 실시하였다. 26~29번 fraction에서 IGF-I의 peak가 검출되었다(Fig. 35). 해당 fraction은 desalting chromatography를 이용하여 salt를 제거한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 세포주를 이용한 생리활성 검증 실험에 사용하였다.



**Figure 35.** Immunoaffinity chromatography for isolation of milk IGF-I.

바. IGF-I mAb를 이용한 방사선 및 비방사선면역측정법의 개선

1) 방사선면역측정법(RIA)

Rabbit anti-human IGF-I pAb를 이용하여 방사선면역측정법을 수행하였으며 IGF-I mAb를 이용하여 진행된 동일 실험과 비교하여 선별된 IGF-I mAb에 의한 RIA의 실험 조건을 Table 19와 같이 개선하였다.

**Table 19.** Experimental conditions of RIA

Experimental factors	Rabbit anti-human IGF-I pAb	IGF-I mAb
Primary Ab dilution	1:100,000	1:50,000
[ <sup>125</sup> I] IGF-I	20,000 cpm	10,000 cpm
Goat anti-rabbit IgG dilution	1:20,000	1:10,000
Incubation	18 h, 4°C	18 h, 4°C

2) 비방사선면역측정법(ELISA)

상업용 IGF-I pAb를 이용하여 확립된 ELISA의 조건은 아래와 같다.

- 가공처리가 되지 않은 우유와 acidification 처리가 된 우유에 대하여 시료로서의 적합성을 연구한 결과, acidification한 시료에서 신뢰도가 높은 결과를 획득하였다.
- 실온과 37°C에서의 건조조건을 비교한 결과, 별다른 차이점을 발견할 수 없었다.
- Tris buffer와 phosphate buffer를 비교한 결과, phosphate buffer에서 반복성이 있는 결과가 나타났다.
- 상업용 1차 항체의 여러 titer를 조사한 결과, 1:4,000의 희석배율이 가장 좋은 결과를 나타내었다.

- Substrate를 넣고 발색 변화의 반응시간을 조사한 결과, 약 20분간 반응시키는 것이 가장 적절한 것으로 평가되었다.
- 2차 항체의 적정 titer를 조사한 결과, 1:1,000의 희석배율에서 가장 좋은 결과를 확인할 수 있었다.
- Substrate를 넣고 발색 변화 및 반응시간을 조사한 결과, 약 20분간 반응시키는 것이 가장 적절한 것으로 평가되었다.

제작된 mAb를 이용한 ELISA의 조건은 위의 결과에 추가적으로 IGF-I mAb의 및 2차 항체의 적정 titer를 각각 1:3,000과 1:1,000으로 조정하였으며 substrate와의 반응시간은 25분으로 개선하였다.

#### 사. 분리된 우유 내 IGF-I의 *in-vitro*에서의 생리활성 검증

##### 1) 세포 성장 곡선의 확인

우유에서 분리된 IGF-I (mIGF-I)의 생리활성을 검증하고 상업용으로 판매되고 있는 rhIGF-I과의 생리활성을 비교하기 위해 유선, 자궁, 근육, 간, 신경에서 유래된 세포주를 ATCC로부터 직접 구입하여 두 종류의 IGF-I을 농도에 따라 처리해 보고 이에 따른 세포의 증식을 cell number counting을 통해 확인해 보았다.

각 세포주마다 정도의 차이는 있었으나 모두 비처리구에 비해 세포의 증식이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며 우유에서 분리된 IGF-I은 rhIGF-I에 비해 생리활성이 약간 감소하는 경향을 보였으나 그 차이가 크게 나타나지는 않았다(Fig. 36). IGF-I에 대한 세포 증식의 효과는 근육세포주인 C2C12에서 가장

크게 나타났으며 신경세포주인 HCN-1A는 0.1ng/ml을 첨가한 경우와 control에서 3일째에 세포가 사멸하는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 신경세포가 최종적인 분화가 완료되어 추가적인 증식이 불가능한 세포이기 때문에 IGF-I에 의한 증식 효과를 나타내지 못한 것으로 생각된다.

전체적으로 0.1ng/ml의 IGF-I을 첨가하였을 때는 세포의 증식 효과가 거의 나타나지 않거나 미약하게 나타난 반면 1ng/ml 이상을 첨가하였을 때는 유의적인 세포 증식 효과를 나타내었다. 근육세포주인 C2C12와 자궁세포주인 HEC-1B에서는 1ng/ml에서 보다는 10ng/ml의 첨가에서 더욱 유의적인 세포 증식의 증가를 보였으나 유선상피 세포주인 MCF-7에서는 1ng/ml의 첨가시와 10ng/ml의 첨가시에 세포 증식 효과의 차이가 적게 나타났다.

mIGF-I에 의한 세포의 증식은 대조구인 rhIGF-I 처리구와 거의 같은 생리 활성을 나타내었으며 또한 세포 증식의 경향도 동일하게 나타나 우유 내 IGF-I의 분리가 성공적으로 수행되었음을 세포수준에서 확인할 수 있었다.

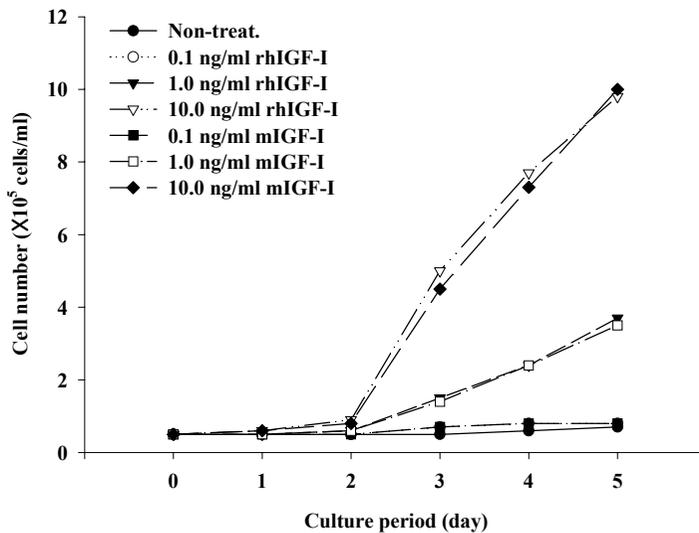


Figure 36. Cell proliferation curves for mIGF-I and rhIGF-I in C2C12 cells.

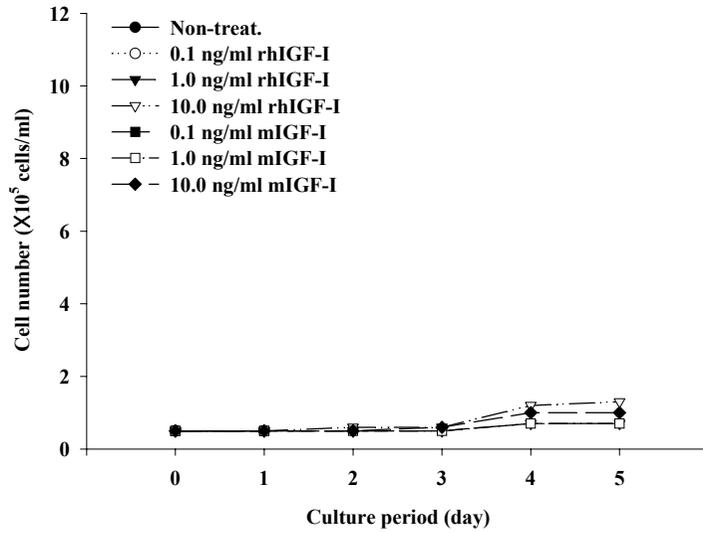


Figure 37. Cell proliferation curves for mIGF-I and rhIGF-I in HCN-1A cells.

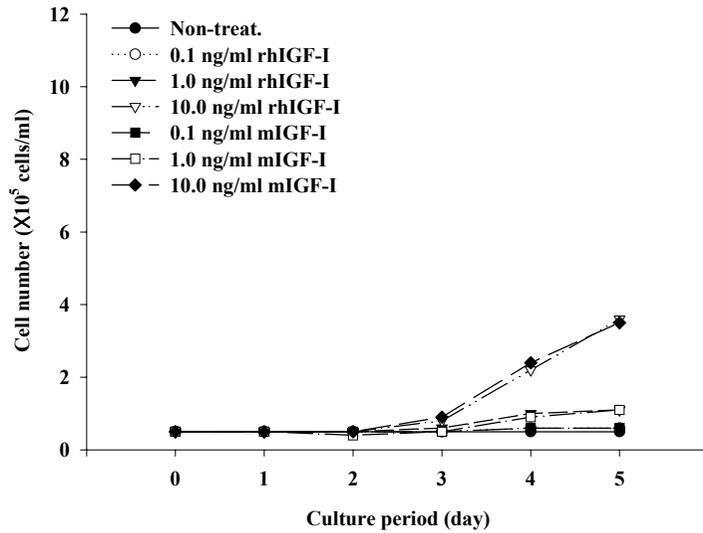


Figure 38. Cell proliferation curves for mIGF-I and rhIGF-I in Hec-1B cells.

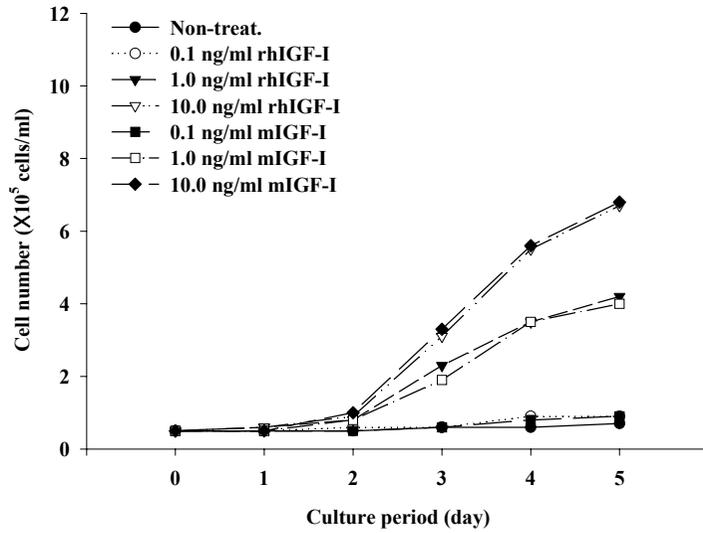


Figure 39. Cell proliferation curves for mIGF-I and rhIGF-I in MCF-7 cells.

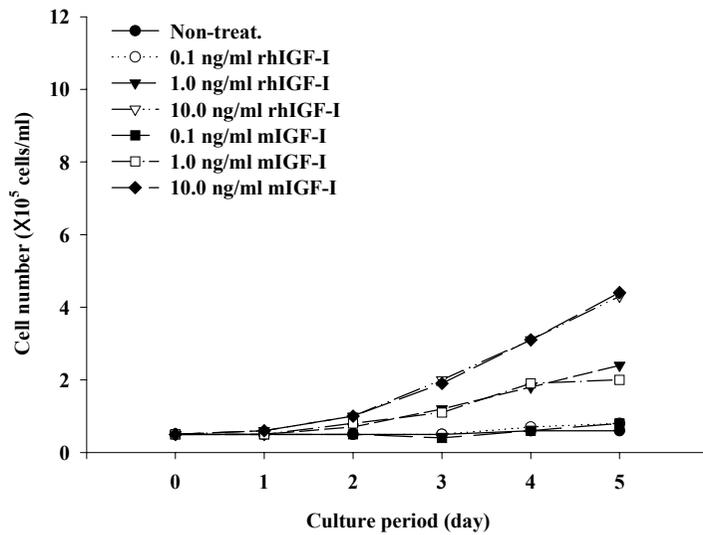


Figure 40. Cell proliferation curves for mIGF-I and rhIGF-I in HepG2 cells.

## 2) BrdU cell proliferation assay

세포 증식에 대한 증거를 DNA 합성량을 통해 확인해 보고자 BrdU ELISA 방법을 이용하여 각 세포주에서 IGF-I의 농도에 따른 DNA의 합성 정도를 확인해보았다. 각 세포주마다 정도의 차이는 있었으나 전체적으로 모든 세포주에서 비처리구에 비해 mIGF-I을 세포주에서 DNA의 합성이 mIGF-I의 처리 농도에 따라 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 그 정도는 세포주에 따라 세포 성장 곡선에서와 유사한 경향을 나타내어 DNA 합성에 의한 세포의 증식을 성공적으로 설명할 수 있었다. 본 결과에서도 세포 성장 곡선에서와 동일하게 근육세포주인 C2C12에서 가장 높은 DNA 합성이 확인되었다. 또한 mIGF-I과 rhIGF-I 사이의 차이 또한 매우 미약하여 우유 내에서 분리된 IGF-I이 상업용 제조합 IGF-I과 거의 유사한 수준의 생리 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

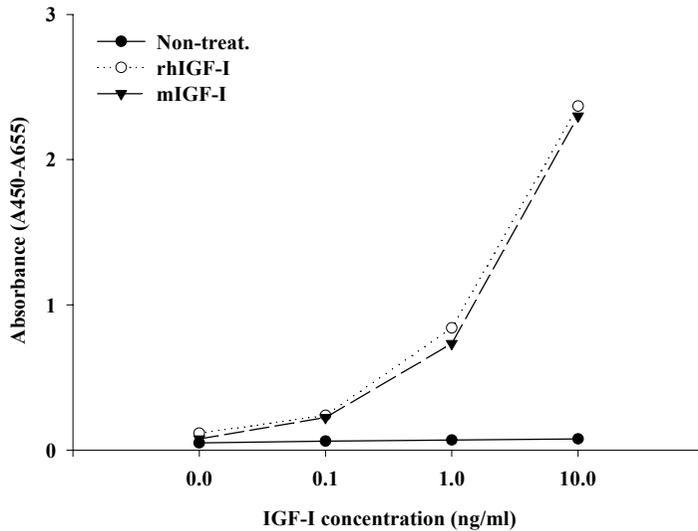


Figure 41. BrdU ELISA for mIGF-I and rhIGF-I in C2C12 cells.

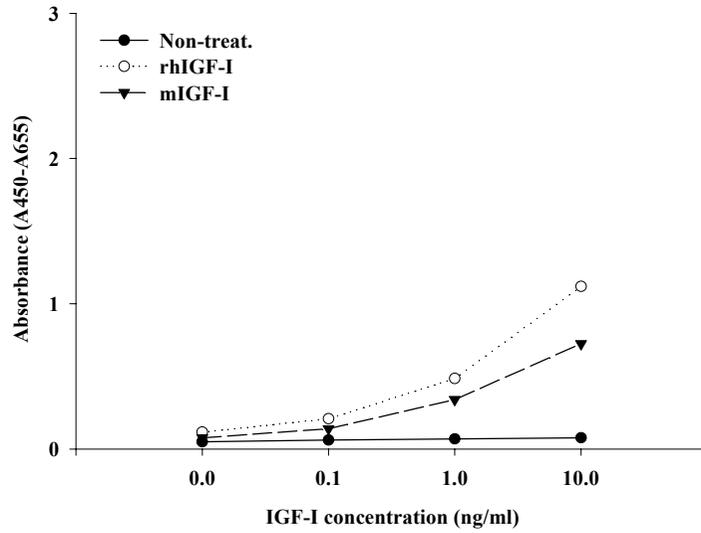


Figure 42. BrdU ELISA for mIGF-I and rhIGF-I in HCN-1A cells.

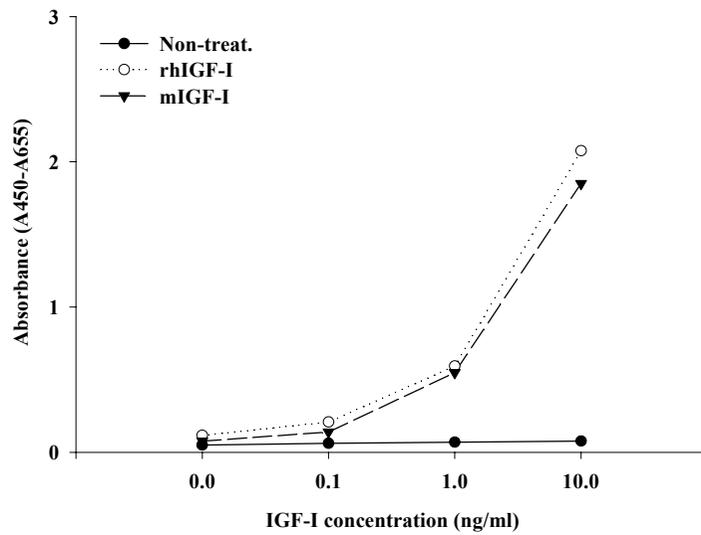
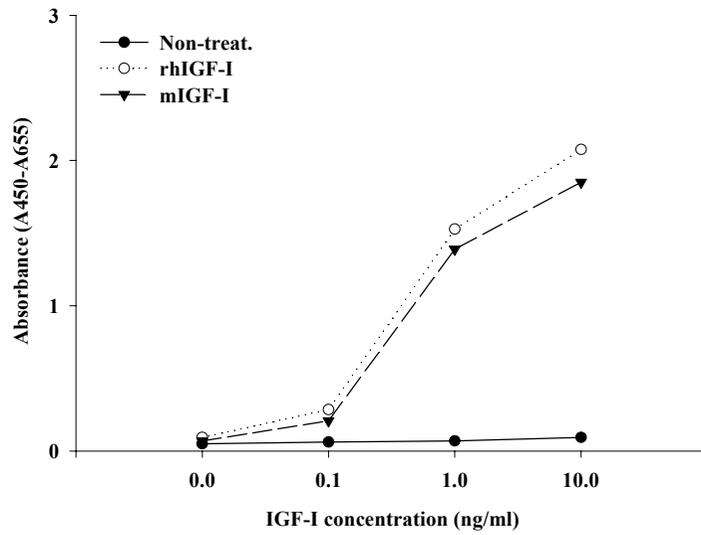
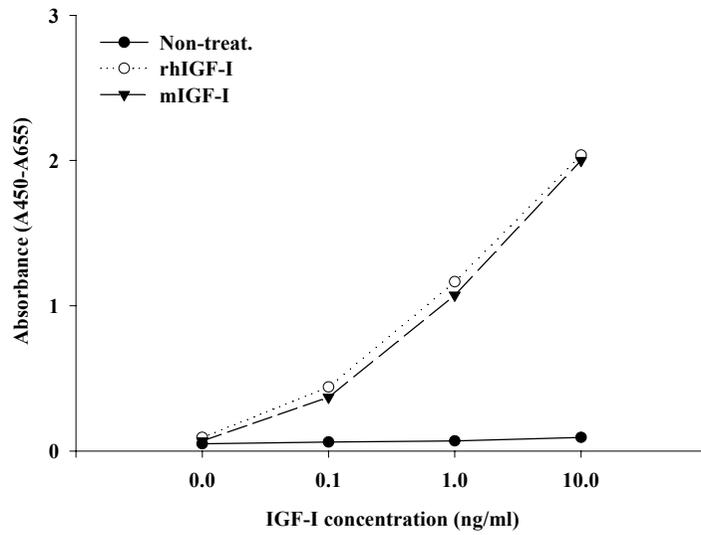


Figure 43. BrdU ELISA for mIGF-I and rhIGF-I in Hec-1B cells.



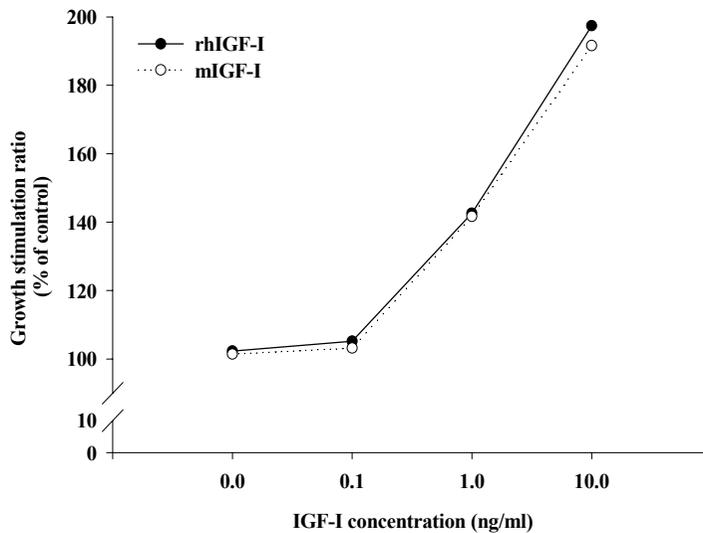
**Figure 44.** BrdU ELISA for mIGF-I and rhIGF-I in MCF-7 cells.



**Figure 45.** BrdU ELISA for mIGF-I and rhIGF-I in HepG2 cells.

### 3) MTT assay

세포증식의 또 다른 증거로 세포 내 물질대사의 정도를 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 전체적인 경향이 모두 선행 실험들과 동일하게 농도 의존적으로 세포의 증식이 증가하는 양상을 나타내어 mIGF-I의 생리 활성을 확인할 수 있었고 또한 이의 생리 활성이 rhIGF-I의 생리활성과 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 본 실험에서도 근육세포주인 C2C12에서 가장 높은 정도의 세포 내 물질대사가 관찰되었으며 신경세포주인 HCN-1A에서는 물질대사의 증가가 관찰되기는 하였으나 그 정도가 매우 미미하였다. 이는 세포주 자체의 증식능력이 매우 낮기 때문에 IGF-I에 의한 성장 촉진 효과에도 불구하고 다른 세포주에 비해 물질대사의 증가가 약했던 것으로 생각된다.



**Figure 46.** MTT assay for mIGF-I and rhIGF-I in C2C12 cells.

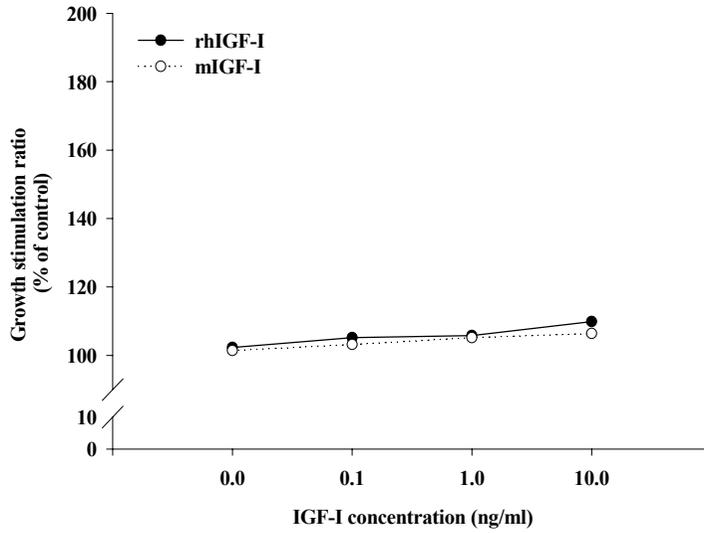


Figure 47. MTT assay for mIGF-I and rhIGF-I in HCN-1A cells.

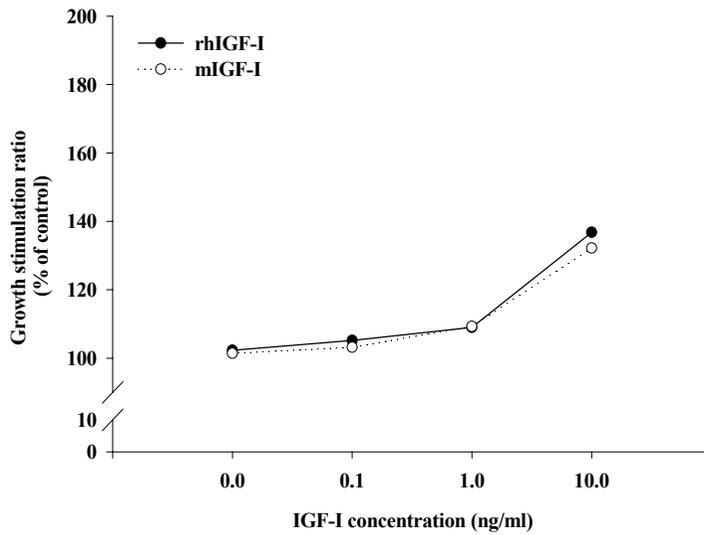


Figure 48. MTT assay for mIGF-I and rhIGF-I in Hec-1B cells.

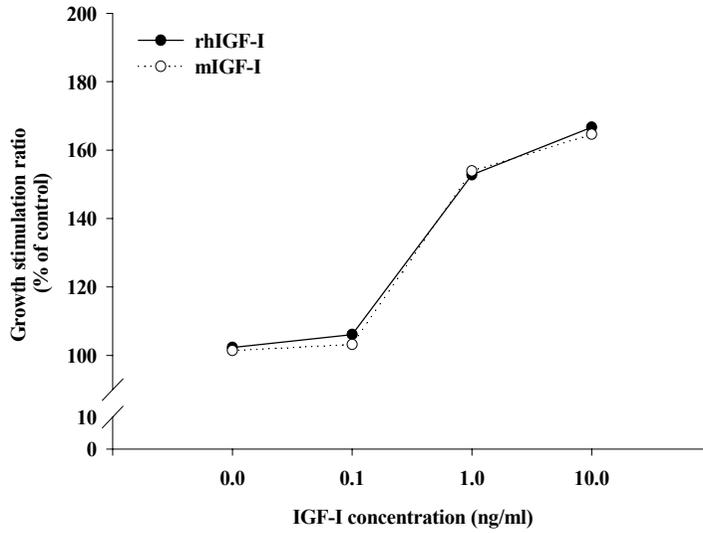


Figure 49. MTT assay for mIGF-I and rhIGF-I in MCF-7 cells.

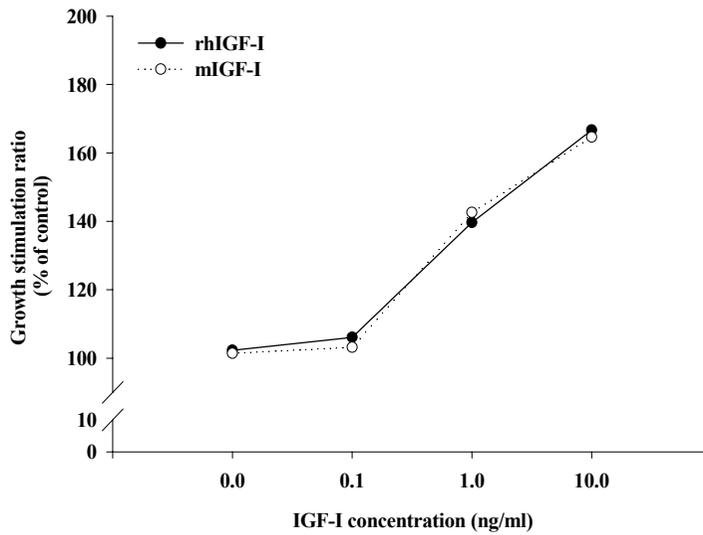
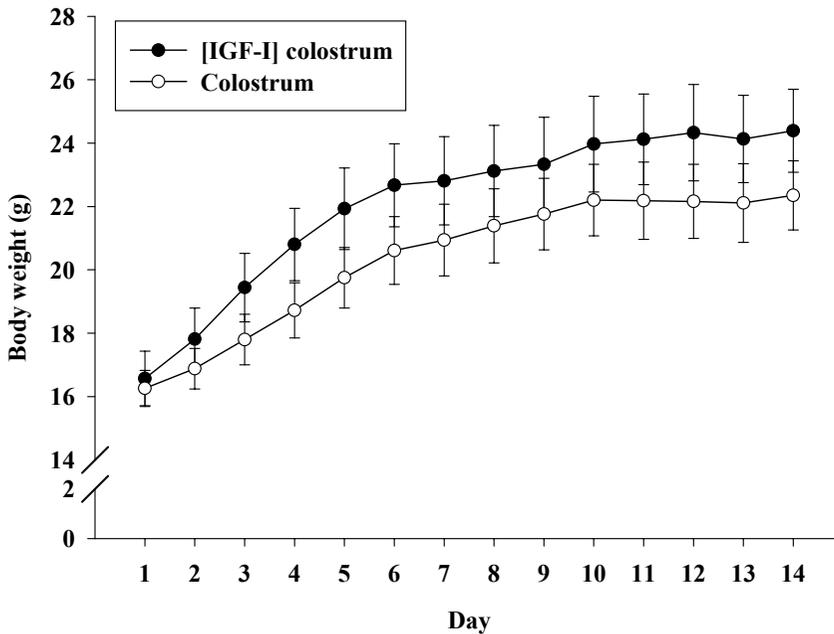


Figure 50. MTT assay for mIGF-I and rhIGF-I in HepG2 cells.

아. 분리된 우유 내 IGF-I의 *in-vivo*에서의 생리활성 검증

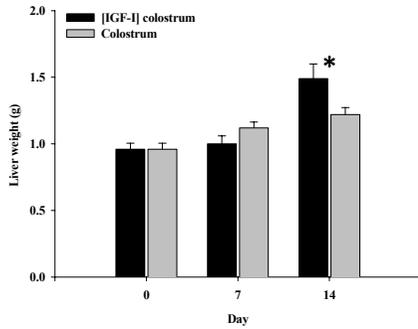
1) 성장 발달 분석

IGF-I 강화유와 초유의 경구투여시 체중 및 조직의 변화를 조사하기 위하여 실험기간 동안 매일 동일한 시간에 체중을 측정하였으며 IGF-I 강화유 투여 후 1주일 간격으로 개체를 희생하여 조직의 무게를 측정하였다. 체중은 전반적으로 IGF-I 강화유를 투여한 그룹에서 높게 나타났으며(Fig. 51), 그러나 개체 간 변이가 크게 나타나 유의적 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 52).

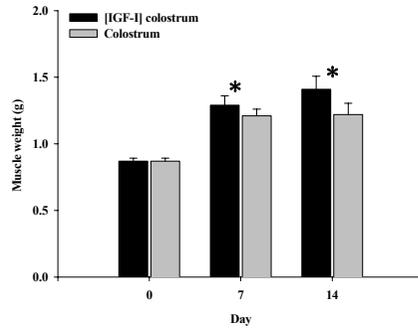


**Figure 51.** Comparison of body weight between IGF-I concentrated milk treatment and colostrum treatment groups. Values are the mean±S.E.

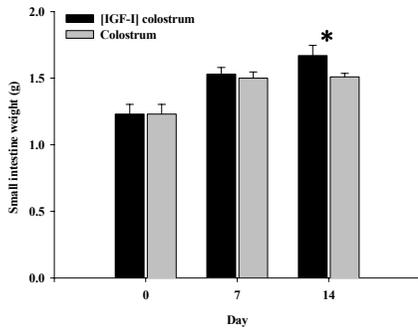
조직의 무게는 전체적으로 초유를 투여한 개체보다 IGF-I 강화유를 투여한 개체에서 높게 나타났으며 처리 14일 후에 희생한 개체들에서는 유의적인 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 52). 따라서 IGF-I 강화유가 일반 초유보다 성장 촉진효과가 크며 장기간 투여시에 그 효과는 더욱 높아질 것으로 생각된다.



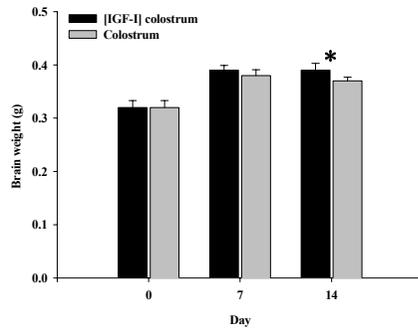
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figure 52.** Comparison of liver (A), leg muscle (B), small intestine (C), and brain (D) weight between IGF-I concentrated milk treatment and colostrum treatment groups. Values are the mean±S.E.

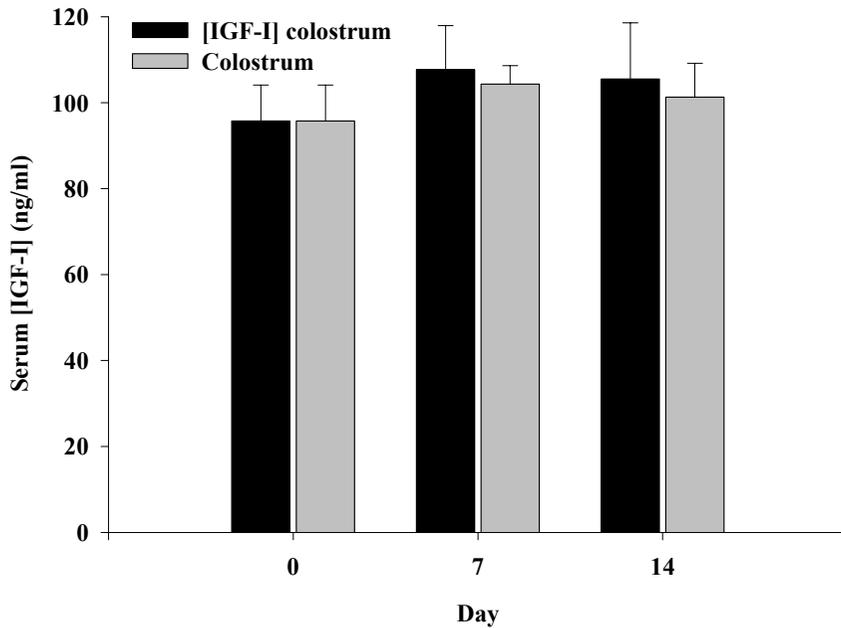
\* Indicates the mean differed ( $p < 0.05$ ) from colostrum treatment group.

## 2) 방사선면역측정법(RIA)

IGF-I 강화유의 경구 투여에 따른 혈액 및 조직 내 IGFs의 발현을 분석하기 위하여 방사선면역측정법을 이용하여 혈액 및 조직 내 IGFs의 발현을 분석하였다.

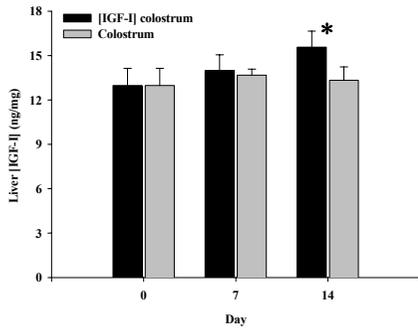
### 1) IGF-I의 농도

혈중 IGF-I의 농도는 처리 후 7일과 14일에서 IGF-I을 투여한 개체들이 약간 높은 경향을 나타내었으나 개체간의 변이가 커 유의적 차이는 확인할 수 없었다.

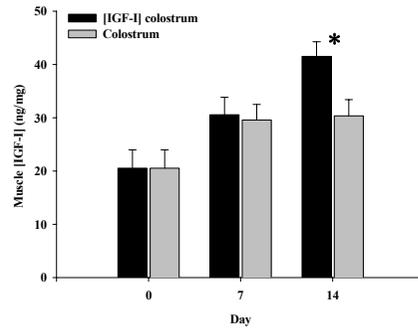


**Figure 53.** Comparison of serum IGF-I concentration between IGF-I concentrated milk treatment and colostrum treatment groups. Values are the mean±S.E.

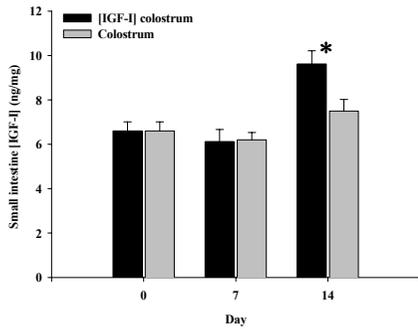
조직에서의 IGF-I의 발현은 IGF-I 강화유를 투여한 그룹에서 조직의 무게와 유사하게 IGF-I의 발현이 높게 나타났다(Fig. 53). 특히 투여 14일 후에 희생된 개체들에서는 모든 조직에서 두 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나 조직의 무게에서와 동일한 양상을 보였다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 IGF-I의 경구투여로 인하여 혈중 및 조직 내 IGF-I의 발현이 증가하게 되고 이러한 생리적 변화가 조직의 성장을 촉진한 것으로 사료된다.



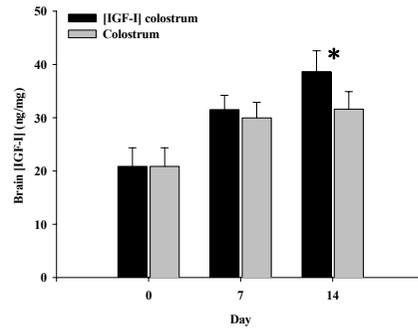
(A)



(B)



(C)



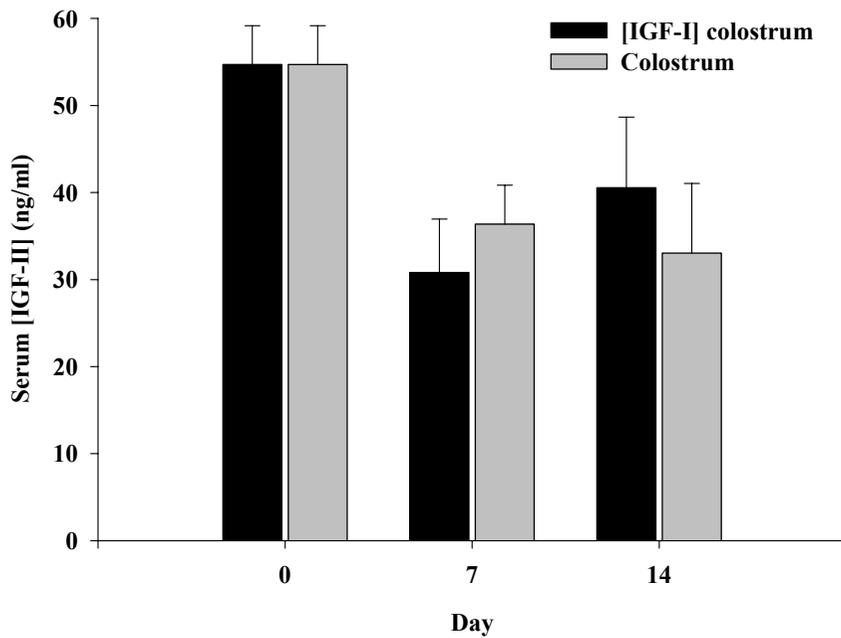
(D)

**Figure 54.** Comparison of liver (A), leg muscle (B), small intestine (C), and brain (D) IGF-I concentrations between IGF-I concentrated milk treatment and colostrum treatment groups. Values are the mean $\pm$ S.E

\* Indicates the mean differed ( $p < 0.05$ ) from colostrum treatment group.

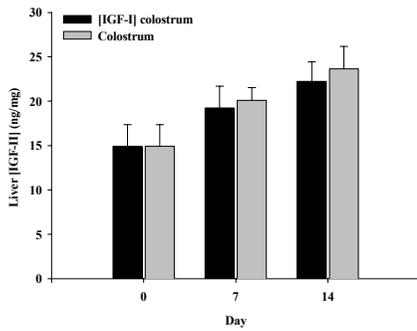
## 2) IGF-II의 농도

혈중 IGF-II의 농도는 IGF-I과는 반대로 일러이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 기존의 보고와 일치하는 양상을 나타내었다(Fig. 55). 그러나 두 투여 그룹간에 유의적 차이는 확인할 수 없었다.

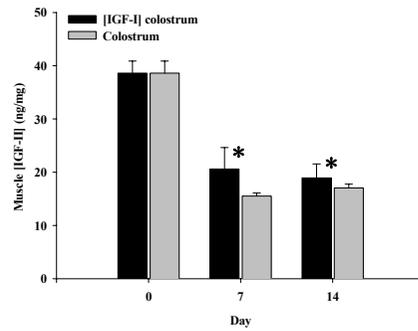


**Figure 55.** Comparison of IGF-II concentration between IGF-II treatment and non-treatment (colostrum) groups. Values are the mean±S.E.

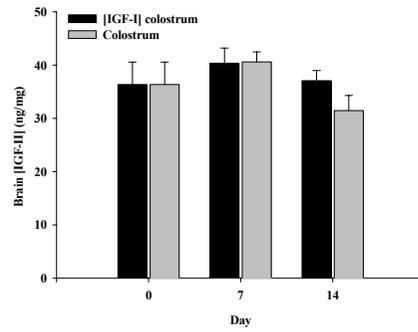
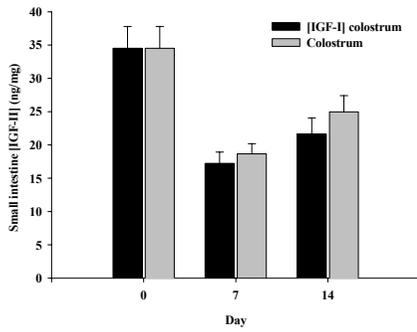
일령이 증가함에 따라 조직에서 발현되는 IGF-II의 농도는 간을 제외한 모든 조직에서 IGF-I과는 반대의 경향을 나타내어 IGF-I과 IGF-II의 생리적 기능이 서로 다름을 간접적으로 확인할 수 있었다(Fig. 56). 또한 두 투여 그룹간의 비교에서는 처리 14일 후 희생된 개체들의 근육과 뇌에서 IGF-I 강화유를 투여한 개체들이 대조구에 비해 유의적으로 높은 IGF-II의 발현을 나타내었다.



(A)



(B)



(C)

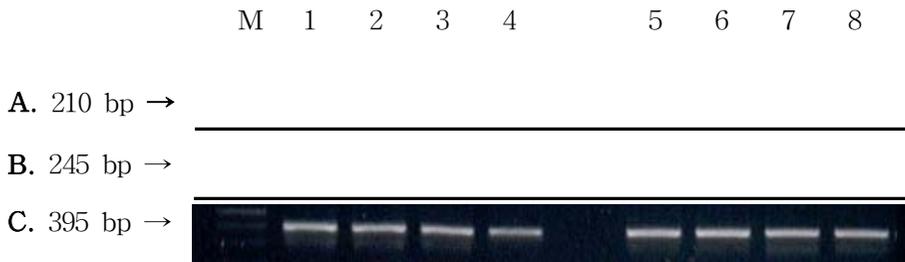
(D)

**Figure 56.** Comparison of liver (A), leg muscle (B), small intestine (C), and brain (D) of IGF-II concentrations between IGF-I concentrated milk treatment and colostrum treatment groups. Values are the mean±S.E

\* Indicates the mean differed ( $p < 0.05$ ) from colostrum treatment group.

### 3) IGF-I 유전정보의 발현

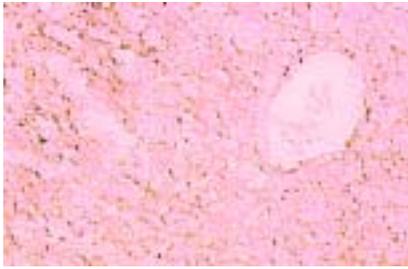
IGF-I 강화유 및 초유의 경구투여로 인한 조직 내 IGF-I 및 IGF-I Receptor (IGF-IR)의 mRNA 발현을 분석하기 위하여 total RNA 추출 후 조직 내 IGF 및 IGF-IR의 발현을 분석하였다. Fig. 57에서 나타나듯이 IGF-I 강화유 투여로 인하여 조직 내 IGF-IR의 발현이 증가됨을 알 수 있다. 특히 근육과 뇌에서의 IGF-IR의 발현은 단백질 수준과 비슷하게 높은 수준의 발현을 나타내었다. 이는 IGF-I 강화유의 투여가 조직 내 IGF-I의 발현 뿐만 아니라 IGF-IR의 발현에도 영향을 끼친다는 것을 알 수 있으며 증가된 IGF system에 의하여 전체적으로 조직의 성장에 영향을 미칠 것으로 사료된다.



**Figure 57.** Messenger RNA expression of IGF-I (A), IGF-I receptor (B), and  $\beta$ -actin (C) between IGF-I treatment (1-4) and non-treatment (5-8) groups. M: size marker, lanes 1 and 5: liver, lanes 2 and 6: muscle, lane 3 and 7: small intestine, lane 4 and 8: brain.

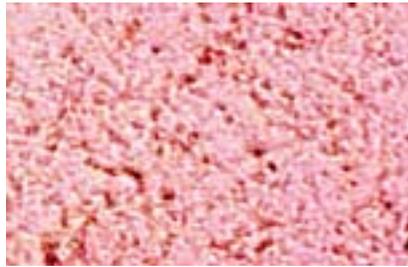
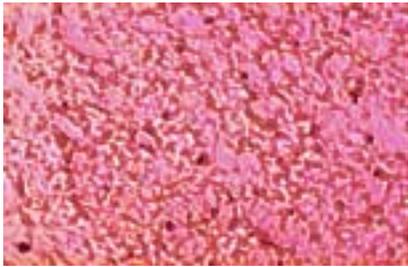
### 4) Immunohistochemistry

IGF-I 강화유 및 초유를 경구투여 하였을 경우 간 및 근육 내 IGF-I의 발현을 생체조직학적 방법으로 분석하기 위하여 immunohistochemistry을 실시하였다. 전체적으로 IGF-I 강화유를 투여한 개체들에서 IGF-I의 발현이 높게 나타남을 알 수 있으며(Fig. 58, 59) 이러한 결과는 조직 내에서의 RIA 결과와 유사한 경향이였다. 이를 통해 IGF-I의 강화유는 초유에 비해 국부 조직에서 IGF-I의 발현을 증가시키며 내분비적 기작 보다는 이를 통한 축분비 또는 방분비적인 기작에 의해 그 생리 활성을 나타내는 것으로 생각된다.



(A)

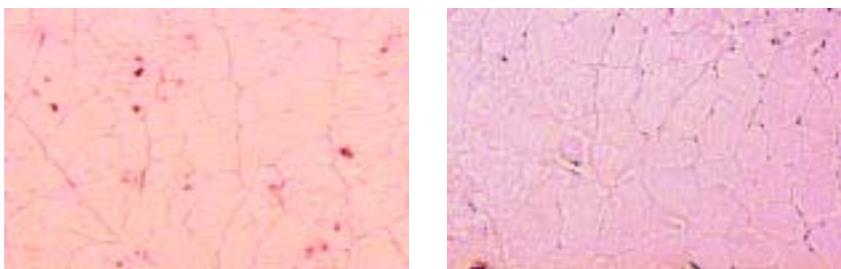
(B)



(C)

(D)

**Figure 58.** Immunohistochemical staining of IGF-I expression in mouse liver between IGF-I concentrated milk treatment (A and C) and colostrum treatment (B and D). Representative sections are shown A and B ( $\times 100$ ) and C and D ( $\times 400$ ).



(A)

(B)



(C)

(D)

**Figure 59.** Immunohistochemical staining of IGF-I expression in mouse muscle between IGF-I concentrated milk treatment (A and C) and colostrum treatment (B and D). Representative sections are shown A and B ( $\times 100$ ) and C and D ( $\times 400$ ).

## 제 3 절 위탁연구과제

### : IGFs 강화 유제품의 안정성 평가

#### 1. 이론적 접근 방법

일본, 미국, OECD 등에서 설정하고 있는 반복투여독성시험지침 및 그에 관련된 자료조사와 우유 내의 IGFs의 생화학적 특성을 조사하여 분리·정제된 IGFs에 적용할 수 있는 독성평가방법을 선정하였다. 분리·정제된 IGFs를 시험물질로 하여 14일 반복투여독성시험 및 미생물복귀돌연변이시험을 실시하여 분리·정제된 IGFs의 안전성을 평가하였고 이 결과에 따른 우유 IGFs의 첨가수준을 검토하였다.

#### 2. 실험적 접근 방법

##### 가. 상업용 IGF- I 의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test).

##### 1) 시료

상업용 IGFs는 R&D Systems社의 Recombinant Human IGF- I (250 $\mu$ g)을 구입하여 pH를 7.4로 조정된 0.2M Sodium phosphate buffer로 용해한 후 이것을 반복적으로 희석하여 4단계의 농도를 가진 시료를 얻었다.

실험용 균주는 *Salmonella typhimurium*에서 TA98과 TA100은 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받았고 TA1535, TA1537, TA1538은 한국생활용품시험연구원에서 분양 받아 균주검사를 실시한 후 사용하였다.

##### 2) 실험방법

##### 가) 균주검사(conforming genotype of tester strains)

Nutrient broth에 실험용 균주를 15시간동안 배양하여 균주검사를 실시하였다.

##### (1) Histidine requirement test

0.1mM histidine을 각 0.1ml씩 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 균주의 성장여부를 확인하였는데 5가지의 모든 균주는 chromosome의 uvr부위가 deletion되어 있는 균주이므로 0.5mM biotin 0.1ml을 첨가하여 성장을 확인하였다.

### **(2) Crystal violet sensitivity test**

Top agar 2ml에 균주 0.1ml를 잘 섞고 Nutrient broth에 부어두고 1mg/ml 농도의 crystal violet 10 $\mu$ l를 함유한 여과지를 배지 위에 놓고 37 $^{\circ}$ C에서 12hr동안 배양하여 여과지 주위에 원형의 clear zone이 형성되는가를 확인하였다.

### **(3) Ampicillin resistance test**

TA98과 TA100에는 Ampicillin 내성인자인 Ampicillin resistance pKM101이라는 R-factor plasmid가 존재하므로 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장하는지를 확인하였고 Ampicillin이외의 다른 항생물질로는 tetracycline이 존재하는 배지에서 성장하는지를 확인하였다. 또한 TA1535, TA1537, TA1538은 Ampicillin의 저항성을 지닌 R-factor plasmid가 존재하지 않는다.

### **(4) uvrB deletion test**

균주를 접종한 plate에 33cm 간격을 두고 plate의 반쪽을 가린 상태에서 6초동안 U.V.살균램프로 조사한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24hr동안 배양하여 성장이 일어나는가를 확인하였다.

### **(5) spontaneous reversion test**

TA98은 spontaneous mutation rate가 20~50이고 TA100은 80~200인 균주를 사용하여야 한다. 따라서 Nutient broth에서 37 $^{\circ}$ C에서 24hr동안 배양하여 spontaneous mutation rate를 확인하였다.

## **나) 시약의 조제**

### (1) Vogel & Bonner medium

45°C의 증류수 670ml에 magnesium sulfate 10g을 완전히 녹인 후 citric acid monohydrate 100g, potassium phosphate dibasic 500g, sodium ammonium phosphate 175g을 넣어 용해하고 멸균하여 사용한다.

### (2) MGA(minimal glucose agar) 배지

증류수 465ml에 agar 15g을 혼합하고 멸균한 후 45°C를 유지하면서 40% glucose 25ml과 VB salt 20ml을 넣고 골고루 혼합한다.

### (3) S9 mix

S9 2.0ml을 증류수 19.75ml로 녹이고 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4) 25.0ml, 0.1M NADP 2.0ml, 1M glucose 6-phosphate 0.25ml, 0.4M MgCl<sub>2</sub>와 1.65M KCl salts의 혼합액 1.0ml를 순서대로 넣어준다.

### 다) 균주의 배양

5가지의 실험용 균주를 2~3 colony 취하여 각각 Nutrient broth 10ml에 접종한 후 진탕배양기에서 37°C, 150rpm의 조건으로 12hr동안 배양하여 균주배양물을 준비하고 4°C에서 보관한다.

### 라) 본 시험

(1) 시험물질인 상업용 IGF-I을 미리 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4)에 반복적으로 희석하여 원액, 1/2, 1/4, 1/8의 4단계의 농도를 가진 시험물질을 준비하였다.

(2) S9 mix 0.5ml과 균주배양물 0.1ml 그리고 상업용 IGF-I 0.1ml을 4단계의 농도별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 12개의 대사활성시험군을 준비하였다.

(3) 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4) 0.5ml과 균주배양물 0.1ml 그리고 상업용 IGF-I 0.1ml을 4단계의 농도별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 12개의 비활성시험군을 준비하였다.

(4) 대사활성시험군과 비활성시험군을 진탕배양기에서 37°C, 150rpm의 조건으로 30분간 배양한 후 top agar 2ml씩 넣고 혼합하여 MGA 배지에 넣고 각 방향으로 3~4회 기울여 골고루 퍼지도록 한 후 37°C의 incubator에서 3일간 배양하였다.

## 나. 상업용 IGF- I 의 급성독성시험(단회투여독성시험)

### 1) 시험물질

동물실험의 시험물질은 R&D Systems社의 Recombinant Human IGF- I (250 µg)을 구입하여 투여용량에 따라 0.9% 생리식염수를 용매로 하여 시험 당일 투여 전에 조제하여 사용하였다.

### 2) 실험동물

생후 4주된 Sprague-Dawley계(♂) 흰쥐(rat)를 1주일동안 고형사료로 적응시킨 뒤 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물 중에서 12마리를 선별하여 무작위법을 이용 각 3마리씩 4군으로 나누어 시험하였다.

### 3) 투여경로

투여경로는 정맥투여로 0.9% 생리식염수를 용매로 하여 실험동물의 꼬리정맥에 주사하여 투여하였다.

### 4) 투여용량

- 대조군 : 용매로 사용한 0.9% 생리식염수만을 1ml씩 투여하였다.
- 실험군 1 : IGF- I 의 농도를 10µg/ml로 한 시액을 1ml씩 투여하였다.
- 실험군 2 : IGF- I 의 농도를 20µg/ml로 한 시액을 1ml씩 투여하였다.
- 실험군 3 : IGF- I 의 농도를 50µg/ml로 한 시액을 1ml씩 투여하였다.

### 5) 관찰기간

가) 정맥투여 후 실험동물을 20일동안 면밀히 관찰하고 독성증상과 회복증

상을 기록하였다.

나) 만약 명확한 독성증상이 지속되거나 사망이 지연될 때는 관찰기간을 연장하였다.

#### 6)관찰 및 기록

가) 일반증상, 체중, 사료섭취량, 물섭취량을 관찰하고 기록하였다.

나) 모든 실험동물에 대하여 일반증상을 매일 관찰하였다.

다) 사망동물 발생 시 사망시간은 가능한 한 정확히 기록하였다.

라) 실험동물의 체중은 투여전일, 매 4일에 1회, 시험종료 직후에 측정하였다.

마) 사료섭취량 및 물섭취량은 투여전일부터 시험종료일까지 1일 1회 측정하였다.

#### 7)병리조직검사

실험종료 후 모든 실험동물을 부검하고 육안검사 및 병리조직검사를 실시하여 표적장기에 대한 독성작용을 확인하였다.

### 다. 우유 IGF- I 의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)

#### 1) 시험물질

동 과제의 제2세부과제에서 우유로부터 분리·정제한 IGF- I 을 받아 pH를 7.4로 조정한 0.2M Sodium phosphate buffer를 용매로 하여 반복적으로 희석하여 4단계의 농도를 가진 시료를 얻었다.

실험용 균주는 *Salmonella typhimurium*에서 TA98과 TA100은 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받았고 TA1535, TA1537, TA1538은 한국생활용품시험연구원에서 분양 받아 균주검사를 실시한 후 사용하였다.

#### 2) 실험방법

가. 2) 실험방법 가), 나), 다)와 동일

## 라) 본 시험

(1) 분리·정제된 IGF-I 을 미리 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4)에 반복적으로 희석하여 원액, 1/2, 1/4, 1/8의 4단계의 농도를 가진 시험물질을 준비하였다.

(2) S9 mix 0.5ml, 균주배양물 0.1ml, 및 분리된 IGF-I 0.1ml을 4단계의 농도별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 12개의 대사활성시험군을 준비하였다.

(3) 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4) 0.5ml, 균주배양물 0.1ml, 및 분리된 IGF-I 0.1ml을 4단계의 농도별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 12개의 비활성시험군을 준비하였다.

(4) 대사활성시험군과 비활성시험군을 진탕배양기에서 37°C, 150rpm의 조건으로 30분간 배양한 후 top agar 2ml씩 넣고 혼합하여 MGA 배지에 넣고 각 방향으로 3~4회 기울여 골고루 퍼지도록 한 후 37°C의 incubator에서 3일간 배양하였다.

## 라. 우유 IGF-I 의 반복투여독성시험

### 1) 시험물질

동 과제의 제2세부과제에서 우유로부터 분리·정제한 IGF-I 을 받아 투여용량에 따라 0.9% 생리식염수를 용매로 하여 시험개시일 투여 전에 조제하여 deep freezer (-40°C)에 보관하면서 사용하였다.

### 2) 실험동물

4주령의 Sprague-Dawley계(♂) 흰쥐(rat)를 1주일동안 고형사료로 적응시킨 뒤 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물 중에서 12마리를 선별하여 무작위법을 이용 각 3마리씩 4군으로 나누어 시험하였다.

### 3) 투여경로

투여경로는 경구투여로 0.9% 생리식염수를 용매로 하여 실험동물에 1일 1회

14일간 강제투여방식으로 투여하였다.

#### 4) 투여용량

- 대조군 : 용매로 사용한 0.9% 생리식염수만을 1ml씩 투여하였다.
- 실험군 1 : IGF- I 의 농도를 5 $\mu$ g/ml로 한 시액을 마리당 1일 1ml씩 투여함.
- 실험군 2 : IGF- I 의 농도를 10 $\mu$ g/ml로 한 시액을 마리당 1일 1ml씩 투여함.
- 실험군 3 : IGF- I 의 농도를 15 $\mu$ g/ml로 한 시액을 마리당 1일 1ml씩 투여함.

#### 5) 관찰기간

- 가) 실험동물을 14일간 면밀히 관찰하고 독성증상과 회복증상을 기록하였다.
- 나) 만약 명확한 독성증상이 지속되거나 사망이 지연될 때는 관찰기간을 연장하였다.

#### 6) 관찰 및 기록

- 가) 일반증상, 체중, 사료섭취량, 물섭취량을 관찰하고 기록하였다.
- 나) 모든 실험동물에 대하여 일반증상을 매일 관찰하였다.
- 다) 사망동물 발생 시 사망일자 및 시간을 가능한 한 정확히 기록하였다.
- 라) 실험동물의 체중은 시험개시전일, 시험개시일, 매 4일에 1회, 시험종료 직후에 측정하였다.
- 마) 사료섭취량 및 물섭취량은 시험개시전일부터 시험종료 직후까지 1일 1회 측정하였다.

#### 7) 병리조직검사

투여기간 종료 후 모든 실험동물을 부검하여 육안검사를 실시하고 표적장기에 대한 병리조직검사를 실시하여 독성작용을 확인하였다.

마. IGF- I 강화유의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)

## 1) 시험물질

동 과제의 제2세부과제에서 IGF- I 을 상유(약 10ng/ml)의 100, 200, 300배로 강화하여 1,000ng/ml, 2,000ng/ml, 3,000ng/ml으로 맞춘 3가지 농도의 시유를 받아 pH7.4로 조정된 0.2M Sodium phosphate buffer로 희석하여 시험물질로 사용하였다. 실험용 균주는 *Salmonella typhimurium*에서 TA98과 TA100은 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받았고 TA102, TA1535, TA1537은 한국생활용품 시험연구원에서 분양 받아 균주검사를 실시한 후 사용하였다.

## 2) 실험방법

### 가. 2) 실험방법 가), 나), 다)와 동일

#### 라) 본 시험

(1) 시험물질인 IGF- I 을 강화한 3가지 농도의 시유원액을 시험물질로 하였고 원액을 희석한 액(1/2, 1/4, 1/8)은 원액에서 유전독성이 확인되지 않을 경우 별도의 시험을 수행하지 않았다.

(2) S9 mix 0.5ml, 균주배양물 0.1ml 및 IGF- I 강화유 0.1ml을 시험물질별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 9개의 대사활성시험균을 준비하였다.

(3) 0.2M sodium phosphate buffer(pH7.4) 0.5ml, 균주배양물 0.1ml 및 IGF- I 강화유 0.1ml을 시험물질별로 각각 혼합하고 이를 3반복하여 균주별로 9개의 비활성시험균을 준비하였다.

(4) 음성대조물질로 0.1ml의 0.9% NaCl solution을 시험물질 대신 혼합한 대사활성음성대조균과 비활성음성대조균을 각각 3개씩 준비하였고 양성대조물질로 유전독성을 지닌 2.0 $\mu$ g의 Sodium Azide를 시험물질 대신 혼합한 대사활성양성대조균과 비활성양성대조균을 각각 3개씩 준비하였다.

(5) 대사활성균과 비활성균을 진탕배양기에서 37 $^{\circ}$ C, 150rpm의 조건으로 30분간 배양한 후 top agar 2ml씩 넣고 혼합하여 MGA 배지에 넣고 각 방향으로 3~4회 기울여 골고루 퍼지도록 한 후 37 $^{\circ}$ C의 incubator에서 3일간 배양하였다.

## 바. IGF- I 강화유의 반복투여독성시험

### 1) 시험물질

동 과제의 제2세부과제에서 IGF- I 을 강화한 3가지 농도의 시유를 받아 투여 용량에 따라 시험개시일 투여 전에 분주하여 deep freezer (-40℃)에 보관하면서 사용하였다.

### 2) 실험동물

5주령의 Sprague-Dawley계(♂) 흰쥐(rat)를 1주일동안 고형사료로 적응시킨 뒤 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물 중에서 28마리를 선별하여 무작위법을 이용 각 7마리씩 4군으로 나누어 시험하였다.

### 3) 투여경로

투여경로는 경구투여로 실험동물에 1일 1회 14일간 투여하였다.

### 4) 투여용량

- 대조군 : IGF- I 을 강화하지 않은 일반 시유를 마리당 1일 10ml씩 투여함.
- 실험군 1 : IGF- I 의 농도를 1,000ng/ml로 한 시유를 마리당 1일 10ml씩 투여함.
- 실험군 2 : IGF- I 의 농도를 2,000ng/ml로 한 시유를 마리당 1일 10ml씩 투여함.
- 실험군 3 : IGF- I 의 농도를 3,000ng/ml로 한 시유를 마리당 1일 10ml씩 투여함.

### 5) 관찰기간

가) 실험동물을 투여기간동안 면밀히 관찰하여 독성증상과 회복증상을 확인하였다.

나) 반복투여기간이 종료 후, 명확한 독성증상이 지속되거나 사망발생의 가

능성이 있을 때는 관찰기간을 연장하기로 하였다.

#### 6) 관찰

가) 일반증상, 체중변화, 사료섭취량 및 물섭취량을 관찰하였다.

나) 모든 실험동물에 대하여 일반증상을 매일 관찰하였다.

다) 사망동물 발생 시 사망일자 및 시간을 가능한 한 정확히 기록하기로 하였다.

라) 실험동물의 체중은 시험개시일부터 시험종료일까지 3일간격으로 측정하였다.

마) 사료섭취량 및 물섭취량은 시험개시일부터 시험종료일까지 1일 1회 측정하였다.]

#### 7) 병리조직검사

투여기간 종료 후, 모든 실험동물을 부검하고 육안검사를 수행하였다. 또한 시험물질이 체내에서 면역작용에 관여하므로 표적장기로서 간, 신장, 비장을 적출하여 병리조직검사를 수행하여 장기에 대한 독성작용을 확인하였다.

### 3. 연구개발수행 내용 및 결과

#### 가. 상업용 IGF- I 의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)

##### 1) 균주검사(conforming genotype of tester strain

##### 가) Histidine requirement test

TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538을 각각 0.1mM histidine과 0.5mM biotin을 0.1ml씩 첨가한 배지와 histidine만을 0.1ml씩 첨가한 배지, 그리고 biotin만을 0.1ml씩 첨가한 배지에서 배양한 결과 5가지 균주가 histidine과 biotin을 모두 첨가한 배지에서만 성장하여 Histidine requirement 가지고 있는 것으로 확인되었다.

#### 나) Crystal violet sensitivity test

5가지 균주를 배양한 결과로 crystal violet를 함유한 여과지 주위에 원형의 clear zone이 형성된 것을 확인하였다. 따라서 bacteria 표면의 LPS barrier를 부분적으로 파괴하여 분자량이 큰 물질의 투과성을 높여주는 mutation이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

#### 다) Ampicillin resistance test

TA98과 TA100이 모두 Ampicillin이 존재하는 배지에서 생장이 확인되었고 tetracycline이 존재하는 배지에서는 성장하지 않아 Ampicillin resistance R-factor가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 반면 TA1535, TA1537, TA1538은 Ampicillin의 저항성을 지닌 R-factor plasmid가 존재하지 않아 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장하지 않았다.

#### 라) uvrB deletion test

5가지 균주를 접종한 각각의 plate에 각각 6초간 U.V.살균램프로 조사한 경우 5가지 균주 모두가 성장하지 않았다. 따라서 DNA repair enzyme을 합성시키는 gene coding이 손상되어 DNA excision repair system이 손실된 mutagen으로 확인되어 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

#### 마) spontaneous reversion test

Nutrient broth에서 37℃에서 24시간동안 배양한 결과 TA98은 spontaneous mutation rate가 31~47이고 TA100은 114~186로 나타나 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

### 2) 본 시험

대사활성시험균과 비활성시험균을 37℃의 incubator에서 3일간 배양한 후 복귀된 colony를 계수하고 colony의 외형을 관찰하였다. 대사활성시험균과 비활성시험균의 모든 plate에서 colony가 형성되었으며 colony의 외형에는 특별한 이상이 관찰되지 않았다.

Table 20에서는 대사활성시험군, 비활성시험군으로 구분하여 시험물질군, 음성대조군, 양성대조군에 대한 colony 계수값의 평균을 구하고 F값(시험물질평균/음성대조평균)을 산출하였다.

Ames test에서는 복귀돌연변이율(F)이 2.0이상으로 나타날 경우 유전독성이 있는 것으로 판단할 수 있는데 Table 21에 정리된 시험물질에 대한 5가지 *Salmonella typhimurium* 균주의 복귀돌연변이율(F)은 모두 2.0미만으로 상업용 IGF- I 은 특별한 유전독성이 없는 것으로 확인되었다.

**Table 20.** The summary results of *salmonella typhimurium* reversion assay with recombinant human IGF- I

살모넬라시험균주										
TA98		TA100		TA1535		TA1537		TA1538		
CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	
음성대조	36	36.0	138	136.3	28	31.3	22	22.0	25	20.7
	35		145		32		18		18	
	37		126		34		26		19	
음성대조 +S9Mix	42	41.0	142	142.0	37	33.7	25	26.7	21	22.0
	42		139		29		29		19	
	39		145		35		26		26	
시험물질	27	26.3	132	137.0	35	31.7	18	20.7	19	20.0
	28	( F =	140	( F =	27	( F =	23	( F =	18	( F =
	24	0.7)	139	1.0)	33	1.0)	21	0.9)	23	1.0)
시험물질 +S9Mix	36	34.3	146	144.7	36	34.7	24	25.7	22	23.7
	35	( F =	148	( F =	34	( F =	25	( F =	24	( F =
	32	0.8)	140	1.0)	34	1.0)	28	1.0)	25	1.1)
양성대조	621	613.3	870	855.3	589	620.7	328	323.3	288	299.7
	608	( F =	837	( F =	623	( F =	298	( F =	312	( F =
	611	17.0)	859	6.3)	650	19.8)	344	14.7)	299	14.5)
양성대조 +S9Mix	650	663.0	872	864.0	680	661.7	382	366.7	312	307.7
	684	( F =	868	( F =	645	( F =	352	( F =	322	( F =
	655	16.2)	852	6.1)	660	19.6)	366	13.7)	289	14.0)

CFTP : Count from triplicate plate Ave : CFTP/3

F : 시험물질평균/음성대조평균

**Table 21.** Safety evaluation of the results obtained from *salmonella typhimurium* reversion assay with recombinant human IGF- I

F \ 균주명	TA 98	TA100	TA1535	TA1537	TA1538
복귀돌연변이율(F) (S9- / S9+)	0.7/0.8	1.0/1.0	1.0/1.0	0.9/1.0	1.0/1.1

#### 나. 상업용 IGF- I 의 급성독성시험(단회투여독성시험)

##### 1) 시험물질의 특성

IGFs는 성장호르몬의 자극에 의하여 간을 비롯한 생체의 거의 모든 조직에서 발견되어 내분비 혹은 국소호르몬의 형태로 작용하여 성장호르몬의 성장촉진작용을 매개하는 성장인자이며 거의 모든 체액에서 발견되는데 초유, 정액, 혈액 중에 특히 농도가 높다. IGF system은 IGF- I, IGF- II와 2종류의 IGF receptors, 6종류의 IGFBPs, 1개의 secondary IGFBP를 포함한다. IGF- I (Somatomedin C)은 70개의 아미노산으로 구성된 7649Da의 분자량을 가진 염기성의 polypeptide이다. GF- I 은 생후동물에서는 성장호르몬의 체성장 촉진작용을 매개하는 역할을 한다.

##### 2) 임상증상의 관찰

시험물질의 정맥투여 후 실험군별로 20일간 독성증상과 회복증상을 면밀히 관찰하였다. 실험종료 시까지 사망동물이 발생하지 않았으며 비정상적인 임상증상을 나타내는 개체가 관찰되지 않았다. 대조군과 비교하여 시험물질투여군에서 유의적인 차이를 나타내는 체중변화, 사료섭취량 및 물섭취량의 변화가 관찰되지

않았다.

### 3) 병리조직검사

실험종료 후 모든 실험동물을 부검하여 육안검사를 실시한 결과, 유의성을 나타내는 이상소견이 없었다. 육안검사 후 모든 실험동물의 간장, 신장, 비장을 적출하여 병리조직검사를 실시한 결과도 병변을 지닌 세포조직이 관찰되지 않아 본 연구의 모든 투여농도에서 상업용 IGF- I 에 대한 급성독성이 확인되지 않았다.

## 다. 우유 IGF- I 의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)

### 1) 균주검사(conforming genotype of tester strains)

#### 가) Histidine requirement test

TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538을 각각 0.1mM histidine과 0.5mM biotin을 0.1ml씩 첨가한 배지와 histidine만을 0.1ml씩 첨가한 배지, 그리고 biotin만을 0.1ml씩 첨가한 배지에서 배양한 결과 5가지 균주가 histidine과 biotin을 모두 첨가한 배지에서만 성장하여 Histidine requirement 가지고 있는 것으로 확인되었다.

#### 나) Crystal violet sensitivity test

5가지 균주를 배양한 결과로 crystal violet를 함유한 여과지 주위에 원형의 clear zone이 형성된 것을 확인하였다. 따라서 bacteria 표면의 LPS barrier를 부분적으로 파괴하여 분자량이 큰 물질의 투과성을 높여주는 mutation이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

#### 다) Ampicillin resistance test

TA98과 TA100이 모두 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장이 확인되었고 tetracycline이 존재하는 배지에서는 성장하지 않아 Ampicillin resistance

R-factor가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 반면 TA1535, TA1537, TA1538은 Ampicillin의 저항성을 지닌 R-factor plasmid가 존재하지 않아 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장하지 않았다.

#### 라) *uvrB* deletion test

5가지 균주를 접종한 각각의 plate에 각각 6초간 U.V.살균램프로 조사한 경우 5가지 균주 모두가 성장하지 않았다. 따라서 DNA repair enzyme을 합성시키는 gene coding이 손상되어 DNA excision repair system이 손실된 mutagen으로 확인되어 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

#### 마) spontaneous reversion test

Nutrient broth에서 37°C에서 24시간동안 배양한 결과 TA98은 spontaneous mutation rate가 32~46이고 TA100은 114~185로 나타나 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

### 2) 본 시험

대사활성시험균과 비활성시험균을 37°C의 incubator에서 3일간 배양한 후 복귀된 colony를 계수하고 colony의 외형을 관찰하였다. 대사활성시험균과 비활성시험균의 모든 plate에서 colony가 형성되었으며 colony의 외형에는 특별한 이상이 관찰되지 않았다. Table 22에서는 대사활성시험균, 비활성시험균으로 구분하여 시험물질균, 음성대조균, 양성대조균에 대한 colony 계수값의 평균을 구하고 F값(시험물질평균/음성대조평균)을 산출하였다.

Ames test에서는 복귀돌연변이율(F)이 2.0이상으로 나타날 경우 유전독성이 있는 것으로 판단할 수 있는데 Table 23에 정리된 시험물질에 대한 5가지 *Salmonella typhimurium* 균주의 복귀돌연변이율(F)은 모두 2.0미만으로 우유로부터 분리·정제된 IGF-I은 특별한 유전독성이 없는 것으로 확인되었다.

**Table 22.** The summary results of *salmonella typhimurium* reversion assay with IGF- I isolated from bovine milk

	살모넬라시험균주									
	TA98		TA100		TA1535		TA1537		TA1538	
	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.
음성대조	36	36.0	138	136.3	28	31.3	22	22.0	25	20.7
	35		145		32		18		18	
	37		126		34		26		19	
음성대조 +S9Mix	42	41.0	142	142.0	37	33.7	25	26.7	21	22.0
	42		139		29		29		19	
	39		145		35		26		26	
시험물질	26	25.7	136	142.7	33	30.7	20	21.3	18	19.7
	24	( F =	144	(F=	28	( F =	22	( F =	20	( F =
	27	0.7)	148	1.0)	31	1.0)	22	1.0)	21	1.0)
시험물질 +S9Mix	34	33.0	155	149.0	33	33.0	23	25.7	23	21.3
	32	( F =	142	( F =	32	( F =	26	( F =	20	( F =
	33	0.8)	150	1.0)	34	1.0)	28	1.0)	21	1.0)
양성대조	621	613.3	870	855.3	589	620.7	328	323.3	288	299.7
	608	( F =	837	( F =	623	( F =	298	( F =	312	( F =
	611	17.0)	859	6.3)	650	19.8)	344	14.7)	299	14.5)
양성대조 +S9Mix	650	663.0	872	864.0	680	661.7	382	366.7	312	307.7
	684	( F =	868	( F =	645	( F =	352	( F =	322	( F =
	655	16.2)	852	6.1)	660	19.6)	366	13.7)	289	14.0)

CFTP : Count from triplicate plate Ave : CFTP/3

F : 시험물질평균/음성대조평균

**Table 23.** Safety evaluation of the results obtained from *salmonella typhimurium* reversion assay with IGF- I isolated from bovine milk

F \ 균주명	TA 98	TA100	TA1535	TA1537	TA1538
복귀돌연변이율(F) (S9- / S9+)	0.7 / 0.8	1.0 / 1.0	1.0 / 1.0	1.0 / 1.0	1.0 / 1.0

## 라. 우유 IGF- I 의 반복투여독성시험

### 1) 임상증상의 관찰

시험물질의 투여 후 14일간 모든 실험동물에 대한 일반증상, 독성증상, 회복증상 및 사망발현의 유무를 면밀히 관찰한 결과, 사망동물이 발생하지 않았으며 명확한 독성증상의 발현이나 사망이 지연되는 경우도 나타나지 않았다. 일부 시험군에서 운동성 감소를 보이는 실험동물이 관찰되었으나 유의성을 보이는 관찰소견은 나타나지 않았다. 결과적으로 일반증상의 관찰결과로는 뚜렷한 이상증상이 발견되지 않았다.

### 2) 실험동물의 체중변화 측정

모든 실험동물에 대한 시험물질 투여에 따른 체중변화를 측정하였으나 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

### 3) 실험동물의 사료섭취량 및 물섭취량의 측정

실험동물에 대하여 시험개시 7일전부터 실험동물용 고품사료와 멸균음용수를 자유로이 공급하였으며 시험개시일부터 시험종료일까지 대조군, 실험군1, 실험군2, 실험군3으로 나누어 개체별 사료섭취량 및 물섭취량을 측정하고 검토하였으나 유의성을 보이는 관찰 소견은 확인되지 않았다.

### 4) 병리조직검사

실험기간 종료 후 사망동물이 발생하지 않았으며 명확한 독성증상의 발현이 나타나지 않았고 모든 실험동물을 부검하여 육안검사를 실시한 결과도 명확한 이상소견이 나타나지 않았다. 육안검사 후 모든 실험동물의 간장, 신장, 비장을 적출하여 병리조직검사를 실시한 결과도 병변을 지닌 세포조직이 관찰되지 않아 본 연구의 모든 투여농도에서 우유로부터 분리·정제된 IGF- I 에 대한 독성작용이 확인되지 않았다.

## 마. IGF- I 강화유의 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)

## 1) 균주검사

### 가) Histidine requirement test

TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537을 각각 0.1mM histidine과 0.5mM biotin을 0.1ml씩 첨가한 배지와 histidine만을 0.1ml씩 첨가한 배지, 그리고 biotin만을 0.1ml씩 첨가한 배지에서 배양한 결과 5가지 균주가 histidine과 biotin을 모두 첨가한 배지에서만 성장하여 Histidine requirement를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

### 나) Crystal violet sensitivity test

5가지 균주를 배양한 결과로 crystal violet를 함유한 여과지 주위에 원형의 clear zone이 형성된 것을 확인하였다. 따라서 bacteria 표면의 LPS barrier를 부분적으로 파괴하여 분자량이 큰 물질의 투과성을 높여주는 mutation이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

### 다) Ampicillin resistance test

TA98과 TA100이 모두 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장이 확인되었고 tetracycline이 존재하는 배지에서는 성장하지 않아 Ampicillin resistance R-factor가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 반면 TA102, TA1535, TA1537은 Ampicillin의 저항성을 지닌 R-factor plasmid가 존재하지 않아 Ampicillin이 존재하는 배지에서 성장하지 않았다.

### 라) uvrB deletion test

5가지 균주를 접종한 각각의 plate에 각각 6초간 U.V.살균램프로 조사한 경우 5가지 균주 모두가 성장하지 않았다. 따라서 DNA repair enzyme을 합성시키는 gene coding이 손상되어 DNA excision repair system이 손실된 mutagen으로 확인되어 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

### 마) spontaneous reversion test

Nutrient broth에서 37°C에서 24시간동안 배양한 결과 TA98은 spontaneous

mutation rate가 31~46이고 TA100은 115~186로 나타나 Ames test에 적합한 균주로 판단되었다.

## 2) 본 시험

대사활성시험균과 비활성시험균을 37°C의 incubator에서 3일간 배양한 후 복귀된 colony를 계수하고 colony의 외형을 관찰하였다. 대사활성시험균과 비활성시험균의 모든 plate에서 colony가 형성되었으며 colony의 외형에는 특별한 이상이 관찰되지 않았다. Table 24에는 비활성시험균의 시험물질균, 음성대조균, 양성대조균에 대한 colony 계수값의 평균을 나타내었고 Table 26에는 대사활성시험균의 시험물질균, 음성대조균, 양성대조균에 대한 colony 계수값의 평균을 나타내었다.

Table 25과 Table 27에서는 Table 24와 Table 26의 결과에 의한 복귀돌연변이율(시험물질평균/음성대조평균)을 산출하여 나타내었다.

Ames test에서는 복귀돌연변이율(F)이 2.0이상으로 나타날 경우 유전독성이 있는 것으로 판단할 수 있는데 모든 농도의 시험물질에 대한 5가지 *Salmonella typhimurium* 균주의 복귀돌연변이율(F)은 모두 2.0미만으로 IGF- I 을 강화한 시유는 명확한 유전독성이 없는 것으로 확인되었다.

유전독성을 지닌 Sodium Azide를 첨가한 양성대조균의 경우는 모두 2.0이상의 매우 높은 복귀돌연변이율이 나타나 본 연구에서 수행된 Ames test가 적절히 수행된 것을 확인할 수 있었다.

**Table 24.** The summary results of *salmonella typhimurium* reversion assay with enriched milk with IGF- I (-S9mix)

살모넬라시험균주										
	TA98		TA100		TA102		TA1535		TA1537	
	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.
음성대조 (0.9% NaCl)	22	21.33	125	124.33	141	129.33	26	24.33	29	28.67
	23		119		126		28		33	
	19		129		121		19		24	
시험물질 1. (1,000ng)	21	18.00	136	128.33	148	139.33	32	26.00	29	28.33
	14		125		129		22		34	
	19		124		141		24		22	
시험물질 2. (2,000ng)	20	15.33	126	122.33	164	146.00	25	29.33	24	27.00
	16		118		133		29		26	
	10		123		141		34		31	
시험물질 3. (3,000ng)	18	20.00	131	126.33	136	138.00	32	33.33	30	29.33
	20		126		146		40		34	
	22		122		132		28		24	
양성대조 (Sodium Azde)	689	677.00	985	1035.33	945	886.66	261	259.33	290	296.00
	721		1106		827		272		276	
	621		1015		888		245		322	

CFTP : Count from triplicate plate Ave : CFTP/3

**Table 25.** Safety evaluation of the results obtained from *salmonella typhimurium* reversion assay with enriched milk with IGF- I (-S9mix)

균주명		TA 98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
F						
복귀돌연변이율 (F)	1,000ng	0.8	1.0	1.1	1.1	1.0
	2,000ng	0.7	1.0	1.1	1.2	0.9
	3,000ng	0.9	1.0	1.1	1.4	1.0
	양성대조	31.7	8.3	6.9	10.7	10.3

**Table 26.** The summary results of *salmonella typhimurium* reversion assay with enriched milk with IGF- I (+S9mix)

살모넬라시험균주										
	TA98		TA100		TA102		TA1535		TA1537	
	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.	CFTP	Ave.
음성대조 (0.9% NaCl)	24	22.33	154	154.67	176	158.33	23	20.00	22	26.33
	22		162		154		18		33	
	21		148		145		19		24	
시험물질 1. (1,000ng)	25	23.67	148	147.33	181	169.00	26	21.67	25	26.00
	23		138		171		15		24	
	23		156		155		24		29	
시험물질 2. (2,000ng)	20	17.33	132	146.33	169	153.33	28	24.67	28	27.67
	17		141		152		26		31	
	15		166		139		20		24	
시험물질 3. (3,000ng)	22	21.33	156	143.67	155	153.33	27	22.67	26	26.67
	23		146		177		21		24	
	19		129		128		20		30	
양성대조 (Sodium Azde)	372	382.00	932	926.00	965	921.66	642	600.66	643	602.33
	362		895		868		594		559	
	412		951		932		566		605	

CFTP : Count from triplicate plate Ave : CFTP/3

**Table 27.** Safety evaluation of the results obtained from *salmonella typhimurium* reversion assay with enriched milk with IGF- I (+S9mix)

균주명		TA 98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
F						
복귀돌연변이율 (F)	1,000ng	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0
	2,000ng	0.8	0.9	1.0	1.2	1.1
	3,000ng	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0
	양성대조	17.1	6.0	5.8	30.0	22.9

#### 바. IGF- I 강화유의 반복투여독성시험

##### 1) 임상증상의 관찰

시험물질의 투여 후 14일간 모든 실험동물에 대한 일반증상, 독성증상, 회복증상 및 사망발현의 유무를 면밀히 관찰한 결과, 사망동물이 발생하지 않았으며 명확한 독성증상의 발현이나 관찰기간 종료후의 사망발생가능성이 나타나지 않았다.

일부 시험군에서 운동성 감소를 보이는 실험동물이 관찰되었으나 독성증상이라 할 수 있는 관찰소견은 나타나지 않았다. 결과적으로 일반증상의 관찰결과로는 뚜렷한 이상증상이 발견되지 않았다.

## 2) 실험동물의 체중변화 측정

모든 실험동물에 대한 시험물질 투여에 따른 체중변화를 측정하였으나 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

## 3) 실험동물의 사료섭취량 및 물섭취량의 측정

실험동물에 대하여 시험개시 7일전부터 실험동물용 고품사료와 멸균음용수를 자유로이 공급하였으며 시험개시일부터 시험종료일까지 대조군, 실험군1, 실험군2, 실험군3으로 나누어 개체별 사료섭취량 및 물섭취량을 측정하고 사료효율을 검토하였으나 명확한 독성증상으로 보이는 결과가 확인되지 않았다.

## 4) 통계처리

실험기간동안에 실험동물의 체중변화 및 장기무게를 측정된 결과값에 대한 Duncan's Multiple Range test를 Alpha값 0.05(신뢰성 95%)로 통계처리한 결과, 대조군과 시험군의 유의적 차이가 확인되지 않았다.

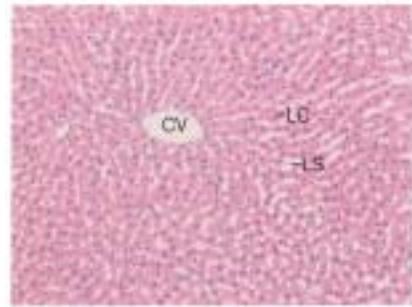
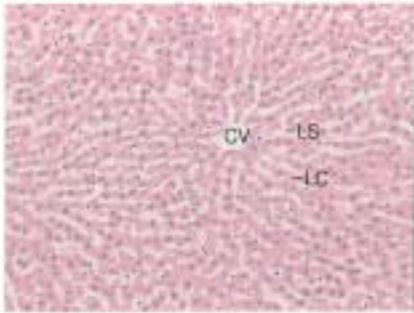
## 5) 병리조직검사의 결과

실험기간 종료 후 사망동물이 발생하지 않았으며 모든 실험군에서 명확한 독성증상의 발현이 나타나지 않았다. 모든 실험동물을 부검하여 육안검사를 실시한 결과, 명확한 이상소견이 나타나지 않았다. 모든 실험동물의 간장, 신장, 비장을 적출하여 병리조직검사를 수행한 결과도 대조군과 실험군의 모든 세포조직에서 병변이 확인되지 않았다.

Figure 60은 간장세포조직으로 중심정맥(central vein)으로부터 방사상으로 배열된 간세포띠(liver cell cord) 및 동모양혈관(liver sinusoid)에서 광학현미경적으로 인정할 만한 형태학적 변화를 관찰할 수 없었다.

Figure 61는 신장세포조직으로 사구체(glomerulus), 보우만주머니(Bowman's capsule), 세뇨관(tubules)에서 인정할 만한 형태학적 변화를 관찰할 수 없었다.

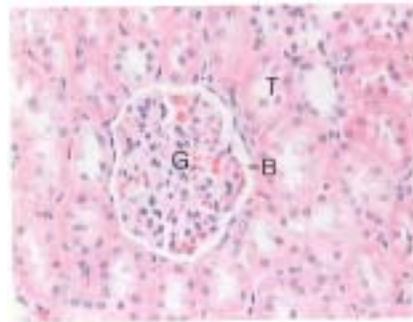
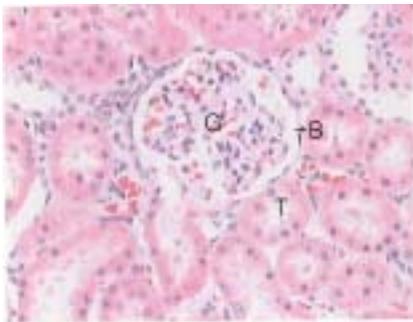
Figure 62는 비장세포조직으로 림프소절(lymphnode), 가장자리구역(marginal zone) 및 적색수질(red pulp)에서 광학현미경으로 인정할만한 형태학적 변화를 관찰할 수 없었다.



Control

Group 3.

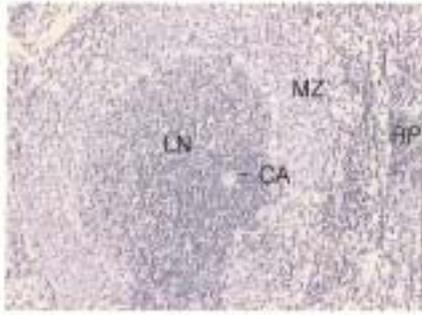
**Figure 60.** The photomicrograph of liver cell after feeding with enriched milk with IGF- I



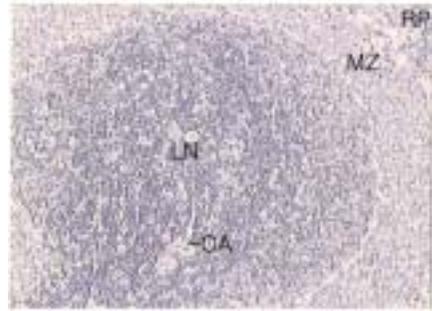
Control

Group 3.

**Figure 61.** The photomicrograph of kidney cell after feeding with enriched milk with IGF- I



Control



Group 3.

**Figure 62.** The photomicrograph of liver cell after feeding with enriched milk with IGF- I

## 제 4 절 종합토의

총괄적으로 본 연구에서 살펴본 IGFs는 환경적 요인과 동물의 상태에 따라 그 함량이 다양해질 수 있다. 특히 IGF- I 이 풍부한 것으로 분석된 초유는 분만 이후 시간 경과에 따라 그 함량이 빠르게 감소하는 것으로 분석되었다. 다양한 유가공 공정 중 일어날 수 있는 IGFs의 활성 변화를 조사한 결과 IGF- I 는 일반적인 살균 조건에서는 부분적으로 파괴되나 스팀멸균조건과 같은 극심한 조건에서는 IGF- I 가 대부분 파괴되는 것으로 나타났다. 특히 여러 유가공 공정 중 발효 후 IGF- I 의 함량이 크게 감소되는 것으로 나타났는데 이는 초유 유청분말을 강화한 후 분석된 시료에도 그 변화가 동일하게 나타났다. 감소된 IGF- I 은 발효 동안에 질소원으로서는 IGFs 또는 IGFBP를 이용할 수 있는 유산균의 활동에 의한 것으로 보인다. 이러한 감소를 보완하기 위하여 캡슐제제를 이용하여 캡슐화를 실시하였다. 이를 강화한 발효 유제품에 첨가하여 발효 후 IGF- I 함량을 분석한 결과 그 함량이 유지되는 것으로 나타난바 캡슐화가 발효 중 IGF- I 이 감소하는 것을 막는 긍정적인 방법임을 알 수 있었다. 더불어 우유로부터 분리·정제된 IGF- I 을 강화한 유제품은 안전한 것으로 확인되었다. 그러나 우유로부터

터 분리·정제된 IGF-I 을 기능성식품의 원료로 활용하기 위해서는 이에 대한 유효성평가가 수행되어야 할 것이며 본 연구결과에 의하여 IGF-I 은 안전성측면에서 기능성원료로서의 사용가능성을 확인할 수 있었으나 이와 같은 원료가 상용화되기 위해서는 관련규정(건강기능식품법)에 적합한 시험이 보완되어야 할 것으로 판단되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 제1세부과제 : 유제품내 IGFs의 강화 방안 연구

본 연구과제에서는 유가공제품내에 첨가될 성장인자인 원유내 IGFs의 존재 특성 및 함량 조사를 통해 그 생리활성 기능을 구명하고 나아가 개발된 유제품을 제조하는데 기초를 확립하기 위한 실험이 수행되었다. 이를 위하여 환경 요인에 따른 우유 내 IGFs 존재 수준의 변화를 살펴보았는데 우군의 개체별로 계절, 산차, 비유기에 따른 상유 IGF-I의 000 발현양상을 조사하여 성장인자와의 상관관계가 존재하는지 조사하였고 젖소 초유 내 IGF-I 함량측정과 Binding protein의 분별특성을 Size exclusion chromatography를 통해 조사하고 일부 특성을 분석하였다. 특히 본 연구 수행에 필수적인 방사면역측정법(Radioimmunoassay)에 의한 원유 내 IGFs의 정량법을 성공적으로 확립하였다. 우군의 개체별로 환경에 따른 우유 내 IGFs의 변화 양상을 살펴본 결과 계절, 산차, 비유기에 따른 IGF-I 함량과의 상관 관계는 존재하지 않는 것으로 나타났으나 각기 다른 급여 패턴에 따른 변화가 보였으며 초유의 경우 상유의 IGF-I의 함량보다 100배가 넘는 것으로 분석되었고 이는 분만 후 6, 12, 18 시간 후 측정하였을 때 시간이 경과할수록 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

가공 중에 일어나는 IGFs의 활성 변화 및 IGFs의 효과 극대화를 위한 적절한 가공 처리 방법의 모색을 도모하기 위해 시판 유제품의 함량 조사를 실시하였고 유제품의 각 공정 별 시료를 수거하여 IGF-I의 함량을 분석하였다. 이는 비교적 열처리에 안정한 것으로 나타났으며 온도구간내 동일 처리시간별 함량변화를 조사한 결과 IGF-I 함량이 대조구에 비하여 증가한 결과를 나타내었으며 극심한 조건인 고온습윤멸균 상태에서는 대부분 파괴한다는 대조구 함량의 약 7% 정도가 측정되었다.

다양한 온도와 시간처리별 IGF-I의 함량변화는 특정 경향을 나타내지 않았으며 이는 상업적인 살균 온도처리 조건에서 IGF-I의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다는 Juskevich와 Guyer(1990)의 보고와 일치하였다. 또한, Collier 등(1991)이 조제분유 조제 시 121°C, 5분간의 가열시 IGF-I이 존재하지 않는다고 보고한 것으로 미루어 IGF-I의 원유내 활성은 온화한 조건의 온도에서의 장시간 노출되는 것에는 큰 영향이 없는 반면, 초고온에서는 급격히 파괴되는 것으로 여겨진다. 이는 초고온조건에서는 IGF-I의 immunoreactivity가 급속히 파괴된 것으로 보인다는 Juskevich와 Guyer(1990)의 보고와도 일치하였다. 유가공 공정 중 발효유의 경우 IGF-I 수준이 낮게 나타났다. 상유 내에 극미량으로 존재하는 IGF-I을 산업적으로 이용하기 위해서는 상대적으로 많은 양의 IGF-I을 함유한 초유 유청액 또는 초유유청분말을 저온살균처리하여 첨가하는 방안, 캡슐화 등이

모색되었다. 이 중 초유유청분말을 캡슐화 하여 실험한 결과 그 함량이 변하지 않는 안정된 수치를 보이는 것으로 나타났다. 본 연구에서 캡슐화를 통한 IGF-I의 저장 기간 중 안정화는 매우 긍정적인 효과를 보여준 것으로 새로운 방법을 제시한 것이라 판단된다.

이렇게 제시된 근거를 바탕으로 하여 인체에 전혀 해가 없는 천연물 신소재를 이용한 기능성 식품을 생산할 수 있는 대량화 조건을 확립할 수 있을 것이다. 그래서 최근 각광받고 있는 천연물 소재 기능성 식품을 유제품에도 적용한다면 원유 과잉 현상과 같은 현상을 줄일 수 있을 것이다. 또한 IGF-I를 이용한 기능성 유제품이 성공한다면 빠른 시장 규모를 형성할 것이라 사료된다.

종합적으로 본 연구에서는 지금까지 구체적인 연구가 미비한 IGFs 함량 변화에 대하여 분석을 시도하였다. 특히 성장인자로서 잘 알려지고 식품 산업이나 의약 대체재로서의 미래성을 가지는 IGF-I에 대한 연구는 그 함량과 여러 활성에 대한 양상과 원인을 밝혀려 알아봄으로써 강화 유제품을 생산할 수 있도록 하는 기초 자료를 제공할 수 있게 되었다.

## 제 2 절 제2세부과제 : IGFs의 생체내·외에서의 생리화학적 활성 연구

사람을 비롯한 많은 생물체에 있어 다양한 조직에서 발현하여 수많은 생리 활성의 조절에 관여하는 IGFs를 그 고유의 생리 활성을 보존하면서 고순도, 다량으로 확보하여 유제품에 응용하기 위하여 본 실험을 진행하였다.

상업적으로 판매되고 있는 rhIGF-I을 항원으로 하여 생쥐에 대하여 면역 실험을 실시하였으며 최초 면역 후 4~6주 후에 면역을 실시한 생쥐를 희생하여 비장세포로부터 면역된 비장세포를 분리·회수하여 배양하였다. 면역된 세포의 사멸을 방지하면서 IGF-I mAb를 지속적으로 생산할 수 있도록 하기 위하여 P<sub>3</sub>X63-Ag8.653 골수종세포를 이용하여 물리적 세포 융합을 실시하였다. 융합을 실시하여 확립된 잡종 세포주에 대해서는 HAT 선택 배양액을 이용하여 1차적으로 선별을 실시하였다. 더욱 정확한 선별을 위하여 생쥐의 정소 조직 및 IGF-I

peptide를 분비하는 것으로 알려진 HepG2 세포주를 이용하여 잡종 세포주의 배양 상층액에 대한 간접 면역형광항체법을 실시하였으며 대조구로 사용된 rabbit anti-human IGF-I pAb와 유사한 반응을 나타내어 IGF-I mAb의 존재 여부를 간접적으로 확인한 4주의 잡종 세포주를 최종적으로 선별하여 대량 배양을 실시하였다. 최종 선별된 잡종 세포주의 배양 상층액은 복수의 생산을 위하여 면역 반응에 이용하였으며 높은 역가를 지닌 IGF-I mAb를 생산하였다. 제작된 mAb의 isotype을 확인한 결과 light chain은 모두  $\kappa$ -chain으로 나타났으며 heavy chain은 각각 다른 IgG isotype을 나타내었다.

생쥐의 면역을 통해 생산된 IGF-I mAb의 IGF-I peptide에 대한 특이적 반응을 확인하기 위하여 면역 항원으로 사용한 rhIGF-I을 기질로 하여 Western hybridization을 실시하여 7.5kDa의 위치에서 band를 확인하였으며 특히 1E6E8 세포주에서 가장 강한 반응이 나타내어 복수 내의 IGF-I mAb의 존재를 성공적으로 확인할 수 있었다. 간접 면역형광항체법을 통한 특이 반응에서는 강한 반응을 나타내지는 않았으나 대조구로 사용된 rabbit anti-human IGF-I pAb와 유사한 발현 양상을 나타내어 역시 IGF-I mAb의 존재 여부를 확인할 수 있었다. 생쥐의 면역 통해 제작된 IGF-I mAb를 이용하여 비방사선면역측정법인 ELISA 기법의 조건을 확립하였으며 기존에 통상적으로 사용하던 방사선면역측정법(RIA)의 기법에 IGF-I mAb를 적용할 수 있도록 반응 조건을 개선하여 IGF-I을 정량할 수 있었다.

본 과제 of 궁극적인 목적인 우유 내 IGF-I을 immunoaffinity chromatography에 의해 분리하기 위한 선행 실험으로 Sephadex G-50 superfine resin을 이용한 gel filtration chromatography를 통해 IGF-I peptide를 IGF-BP로부터 분리하였으며 또한 초유 내에 높은 수준으로 존재하는 IgG를 제거하여 이후의 immunoaffinity chromatography 과정에서의 비특이적 결합을 방지하였다. IGF-I mAb를 affinity column에 충전한 후 gel filtration chromatography를 통해 회수된 시료를 주입하여 순수한 IGF-I만을 분리하였으며 280nm에서 흡광도를 측정하여 그 peak를 확인할 수 있었다. 회수된 우유 내 IGF-I은 desalting chromatography 과정을 통해 높은 농도의 salt를 제거하여 그 순도를 높여 이후의 생리활성 검증 실험에 이용하였다.

우유 내에서 분리된 IGF-I이 그 고유의 생리활성을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위하여 우선적으로 여러 종류의 세포주들을 이용한 bioassay를 실시하였다. 간, 유선, 자궁, 근육, 신경으로부터 유래된 세포주들을 ATCC로부터 구입하여 배양 조건을 확립하였으며 우유 내 IGF-I과 rhIGF-I의 생리 활성 차이를 세포의 증식을 통해 확인하였다. 세포의 증식 여부는 세포의 성장 곡선, DNA 합성의 증가, 그리고 세포 내 물질대사의 활성화 정도를 통해 확인하였으며 신경세포를 제외한 모든 세포주에서 우유내 IGF-I과 rhIGF-I 모두 세포의 증식을 증가시키는 생리활성을 보여 주었으며 특히 근육 세포주에서 가장 강한 생리활성을 나타내었다. 또한 우유 내 IGF-I과 rhIGF-I의 생리활성에는 차이가 거의 나타나지 않아 우유에서 분리된 IGF-I의 순도가 높으며 그 생리활성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 신경세포에서 IGF-I의 생리 활성이 나타나지 않은 것은 신경세포 자체가 이미 최종적인 분화를 마친 세포주로서 그 증식이 매우 미약하기 때문인 것으로 생각된다.

세포주들은 이용한 *in-vitro*에서의 결과를 바탕으로 ICR mouse를 공시동물로 하여 *in-vivo*에서의 우유 내 IGF-I의 생리활성을 검증하였다. IGF-I이 높은 농도로 함유되도록 제조된 IGF-I 강화유를 공시동물에 구강 투여할 경우 대조구인 비처리구에 비해 체중이 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며 각종 조직(뇌, 간, 근육, 소장)의 무게 역시 IGF-I 강화유를 구강투여한 그룹에서 높게 나타나 IGF-I 강화유가 동물의 성장에 있어 그 생리활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. IGF-I 강화유를 처리한 후 혈액과 조직 내에서 IGF-I 및 IGF-II의 발현을 RIA를 통해 확인한 결과 IGF-I 강화유의 처리가 IGF-I의 발현을 증가시킴을 관찰할 수 있었으며 특히 근육 및 장에서의 IGF-I의 발현은 유의적인 차이를 나타내어 *in-vitro*에서와 유사한 결과를 보였다. 그러나 IGF-II의 농도는 IGF-I 강화유의 처리에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 IGF-I peptide의 정량 결과는 immunohistochemistry에서도 유사한 경향을 나타내어 IGF-I 강화유의 처리에 의해 국소 조직에서의 IGF-I 발현이 증가함을 정성적으로 확인할 수 있었다. IGF-I 강화유의 구강 투여에 의한 IGF-I 및 IGF-IR mRNA의 발현은 대조구인 비처리구에 비해 높은 수준으로 나타났으며 전술한 실험 결과와 동일하게 근육에서 가장 높은 생리 활성을 나타내었다. 또한 이와 같은 결과는 IGF-I

peptide 뿐만 아니라 IGF-IR mRNA에서도 나타나 IGF-I 강화유의 투여가 IGF-I peptide 자체의 발현 뿐 아니라 그 수용체의 발현에도 관여하는 높은 수준의 생리활성을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구 과제에서 생산된 IGF-I mAb는 이후의 IGF-I 정량 실험에 효과적으로 응용되어 IGF-I의 농도 분석 효율을 더욱 향상시킬 것으로 기대된다. 또한 제작된 IGF-I mAb를 이용하여 분리한 우유 내 IGF-I 은 상업적으로 판매되는 rhIGF-I에 상응하는 높은 생리활성을 in-vitro와 in-vivo 모두에서 나타내었으며 이를 이용한 유제품인 IGF-I 강화유 역시 강한 생리활성을 나타내었다. 따라서 분리된 IGF-I이 성장 촉진의 생리활성을 나타낼 수 있을 것으로 기대되며 더 나아가 다른 식품 뿐만 아니라 의약품 또는 건강 보조제와 같은 다른 분야에도 충분히 응용이 가능할 것으로 기대된다.

### 제 3 절 위탁연구과제 : IGFs 강화 유제품의 안정성 평가

일본, 미국, OECD 등에서 설정하고 있는 반복투여독성시험지침 및 그에 관련된 자료조사와 우유 내의 IGFs의 생화학적 특성을 조사하여 분리·정제된 IGFs에 적용할 수 있는 독성평가방법을 선정하였다. 상업용 IGFs와 우유로부터 분리·정제된 IGFs를 시험물질로 하여 14일 반복투여독성시험 및 미생물복귀돌연변이시험을 실시하여 분리·정제된 IGFs의 안전성을 평가하였고 이 결과에 따른 우유 IGFs의 첨가수준을 검토한 결과 시험기간 종료 후 실험 동물 중 사망동물이 발생하지 않았으며 모든 실험군에서 명확한 독성증상의 발현이 나타나지 않았다. 모든 실험동물을 부검하여 육안검사를 실시한 결과, 명확한 이상소견이 나타나지 않았다. 모든 실험동물의 간장, 신장, 비장을 적출하여 병리조직검사를 수행한 결과도 대조군과 실험군의 모든 세포조직에서 병변이 확인되지 않았다. 우유로부터 분리·정제된 IGF-I을 강화한 유제품에 대한 안정성을 평가한 결과는 안전한 것으로 확인되었다. 안정성 평가를 통해 확립된 방법은 기능성 신소재 개발과 유용한 물질을 이용한 새로운 식품의 안정성 평가에 대한 표준 모델로서 활용할 수 있는 방법을 제시하였고 다양한 식품의 안정성을 검증하는 방법으로

서 활용할 수 있을 것이다.

## 제 5장 연구개발결과의 활용 계획

분석된 환경 요인에 따른 IGFs 함량 변화와 상유, 초유 내 존재하는 IGF- I의 함량은 성장인자를 강화한 기능성 식품 개발에 기초 자료를 제공할 수 있으며 성장 촉진인자의 섭취가 필요한 유아 및 노약자에게도 음용 또는 식용될 수 있는 조제분유의 제조 및 노약자 특이식 등의 제조에 이용될 수 있을 것이라 판단된다. 또한 우유의 고유 생리활성물질을 함유한 차별화된 유제품의 개발을 통하여 낙농산업의 새로운 활로를 개척하고 고품질 유제품 섭취를 통하여 국민의 건강에 이바지할 수 있으며 생리활성물질의 효과를 과학적으로 입증할 수 있는 모니터링 시스템을 구축함으로써 우유 내 존재하는 기타 유용단백질 및 기능성 물질들의 선별 및 안전성 검증에 표준 모델로 이용될 수 있다.

상업적으로는 우유 내 존재하는 특이 성장인자의 분리 시스템을 대형화시킴으로써 대량생산 체계를 구축하여 의약품 및 기능성 식품의 소재화를 이룩할 수 있는 기초 자료를 제공하며 생리활성 물질의 강화 및 안정화 방법은 기타 기능성 물질의 저장 중 안정성증진에 활용될 수 있다.

식품 내에 존재하는 기능성물질을 이용한 식품의 개발을 위해서는 신소재의 안전성 평가가 수행되었으며 차별화 된 유제품개발을 위한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구결과는 우유 내 존재하는 기타 유용단백질 및 기능성물질을 이용한 식품의 안전성 평가의 표준모델로 활용될 수 있을 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

우유는 많은 생리학적 활성 인자를 가지고 있고 본 연구에서 연구된 IGFs는 우유 내 존재하는 주 성장인자로서 포유동물 대부분에서 발견된다. 우유의 IGF- I 은 인유의 IGF- I 과 동일한 구조를 가지는 것으로 밝혀졌다(Honegger and Humbel, 1986).

지금까지 우유 또는 인유의 IGF- I 농도에 관하여 많은 연구가 이루어진 바 보고마다 함량의 차이는 있지만 경향은 비슷하였으며 특히 초유에 상유보다 훨씬 많은 IGF- I 이 있는 것으로 알려져 있으며 실제로 초유를 바탕으로 한 식품을 섭취한 사람의 혈장에서 IGF- I 의 농도가 높은 것으로 보고되었다(Mero, 1995). 본 연구에서도 이와 유사한 분포를 가지는 IGF- I 의 농도를 우유 내에서 확인하였다.

Donovan 과 Odle(1994)등은 구강 섭취된 IGF- I 이 장에까지 도달하고 고유의 수용체들이 있어 세포의 분화에 작용한다고 하였다. 특히 Houle(1997)등은 하루 200 $\mu$ g/kg 씩의 IGF- I 을 구강 섭취한 자돈이 이당분해효소와 장섬모의 길이가 향상되었다고 보고하였다. 이와 더불어 IGF- I 을 바탕으로 하여 기능성 식품 생산을 시도하는 연구가 진행됨을 알 수 있었고 특히 Rajaram(1997)등이 보고한 IGF와 IGFBP, 그에 따른 protease의 특이성에 관한 논문은 IGFs의 이해를 높이는 데 중요한 지식이 되었다. 이러한 연구들은 본 연구를 수행함에 있어서 IGF- I 의 중요성을 확인해주는 밑바탕이 되는 것이었다.

혈중 내분비인자와 호르몬을 분석하기 위해 Daughaday(1980) 등이 보고한 방사선면역측정법(radioimmunoassay)는 본 연구에 주요점인 IGF의 농도를 측정하는 방법을 제시한 논문으로서 가치가 높다.

## 제 7 장 참고문헌

Adams, N. R., J. R. Briegel., M. J. Thompson, and L. M. Sammels. 2000. Metabolic hormones and tissue concentrations of mRNA for IGF- I in lines of sheep that differ in their protein synthesis response to feed intake. *J. Endocrinol.* 167 : 315-320.

Ballard, F. J., J. C. Wallace, G. L. Francis, L. C. Read, and F. M. Tomas. 1996. Des(1-3)IGF- I : a truncated form of insulin-like growth factor- I . *Int. J. Biochem. Cell Biol* 28(10) :1085-1087.

Bassett, N. S., M. J. Currie, B. H. Breier, M. Klempt, S. H. Min, S. N.McCutcheon, D. D. S. MacKenzie, and P. D. Gluckman. 1998. The effects of ovine placental lactogen and bovine growth hormone on hepatic and mammary gene expression in lactating sheep. *Growth Hormone and IGF Research.* 8 : 439-446.

Bastian, E. D and R. J. Brown. 1996. Plasmin in milk and dairy products : an Update. *Int. Dairy Journal.* 6 : 435-457.

Baxter, R. C., Z. Zaltsman, and J. R. Turtle. 1984. Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk. *J. Clin. Endocrinol Metab* 58 : 955-959.

Beckett, P. R., W. W. Wong, and C. K. Copeland. 1998. Developmental changes in the relationship between IGF- I and body composition during puberty. *Growth hormone and IGF research.* 8 : 283-288.

Bell, A. W., D. E. Bauman, D. H . Beerman, and R. J. Harrel. 1998.

Nutrition, development and efficacy of growth modifiers in livestock species. *J. Nutrition*. 128 : 360-363.

Beshkova, D. M., E. D. Simova, G. I. Frengova, Z. I. Simov, and E. F. Adilov. 1998. Production of amino acids by yogurt bacteria. *Biotechnol. Prog.* 14 : 963-965.

Blum, J. W., and C. R. Baumrucker. 2002. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances : Mammary gland and neonatal(intestinal and systemic) targets. *Domestic Animal Endocrinology*. 23 : 101-110.

Burrin, D. G. 1997. Is milk-borne insulin-like growth factor- I essential for neonatal development. *J. Nutr.* 127 : 975-979.

Bury, D., P. Jelen, and K. Kimura. 1998. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal*. 8 : 149-151.

Campbell, P. G., and C. R. Baumrucker. 1989. Insulin-like growth factor- I and its association with binding proteins in bovine milk. *J. Endocrinol.* 120 : 21-29.

Campbell, P.G., J. F. Novak., T. B. Yanosick and J. H. McMaster. 1992. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology*. 130 : 1401-1412.

Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C. H., and M. Pollak. 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 279 : 563566.

Chaurasia, O. P., S. P. Marcuard, and E. R. Seidel. 1994. Insulin-like growth factor I increases intestinal mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* 270 : 1085-1091.

Choi, J. H. and Y. K. Kim. 1994. Studies on the physico-chemical properties of the dried skim milk. *Korean J. Dairy Sci.* 16(3) : 228-240.

Clemmons, D. R., and J. J. Van Wyk. 1984. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13 : 113-143.

Clemmons, D. R., L. E. Underwood, R. N. Dickerson, R. O. Brown, L. J. Hak, R. D. MacPhee, and W. D. Heize. 1985. Use of plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. *Am J Clin Nutr.* 41: 191-198.

Collier, R. J. et al., 1988. Unpublished report MSL 8671 (Monsanto Agricultural Co., St. Louis, MO).

Collier, R. J., M. A. Miller, J. R. Hildebrandt, A. R. Torkelson, T. C. White, K. S. Madsen, J. L. Vicini, P. J. Eppard, and G. M. Lanza. 1991. Factors affecting insulin-like growth factor-I concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 74 : 2905.

Coombes, J. S., M. Conacher., S. K. Austen., and P. A. Marshall. 2002. *Official Journal of the American College of Sports Medicine.* 1184-1188.

Costigan, D. C., H. J. Guyda, and B. I. Posner. 1988. Free insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in human saliva. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66

: 104.

Davies, S. R., P. D. Gluckman, S. C. Hodgkinson, V. C. Farr, B. H. Breier, and B. D. Burleigh. 1989. Comparison of the effects of administration of recombinant bovine growth hormone or N-Met Insulin-like growth factor- I to lactating goats. *J. Endocrinol.* 123 : 33-39.

Daxenberger, A., B. H. Breier, and H. Sauerwein. 1998. Increased milk levels of insulin-like growth factor 1(IGF-1) for the identification of bovine somatotropin(bST) treated cows. *Analyst.* 123 : 2429-2435.

Donovan, S. M., L. K. McNeil, R.J. Flores, and J. Odle. 1994. Insulin-Like Growth Factors and Insulin-Like Growth Factor Binding proteins in Porcine serum and Milk throughout Lactation. *Pediatric Research.* 36 : 159-168.

Donovan, S. M., R. L. Hintz, and R. G. Rosenfeld. 1991. Insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human milk : Effect of heat treatment on IGF and IGF binding protein stability. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 13(3) : 242-253(Abstract).

Donovan, S. M., R. L. Hintz, D. M. Wilson, and R. G. Rosenfeld. 1991. Insulin-Like Growth Factors I and II and Their Binding proteins in Rat Milk. *Pediatric Research.* 29 : 50-55.

Donovan, S. M., and J. Odle. 1994. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annual Reviews Inc.* pp 147-167.

Eriksson, U., G. Duc, E. R. Froesch, and J. Zapf. 1993. Insulin-like growth factors(IGF) I and II and IGF binding proteins(IGFBPs) in human

colostrum/transitory milk during the 1st week postpartum : Comparison with neonatal and maternal serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 196(1) : 267-273(abstract).

Faulkner, A. 1999. Changes in plasma and milk concentrations of glucose and IGF- I in response to exogenous growth hormone in lactating goats. *J. Dairy Res.* 66 : 207-214.

Flint, D. J., E. Tonner, and G. J. Allan. 2000. Insulin-like growth factor binding proteins : IGF-dependent and independent effects in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 5 : 65-73.

Forbes, G. B., M. R. Brown, S. L. Welle, and L. E. Underwood. 1989. Hormonal response to overfeeding. *Am J. Clin Nutr.* 49 : 608-611.

Francis, G. L., F. M. Upton, F. J. Ballard, K. A. McNeil, and J. C. Wallace. 1988. Insulin-like growth factors I and II in bovine colostrum. *Biochemical Journal*. 251 : 95-103.

Francis, G. L., G. O. Regester, H. A. Webb, and F. J. Ballard. 1995. Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *J. Dairy Sci.* 78 : 1209-1218.

Furlanetto, R. M. 1980. The somatomedin C binding protein : evidence for a heterogenous subunit structure. *J. Clin Endocrinol Metab.* 51 : 12-19.

Gibson, C. A., M. D Staley, and C. R. Baumrucker. 1999. Identification of IGF Binding proteins in Bovine Milk and the Demonstration of IGFBP-3 Synthesis and Release by Bovine mammary Epithelial Cells. *J. Anim. Sci.* 77 :

1547-1557.

Griffin, J. E., and S. R. Ojeda. 1996. Textbook of Endocrine Physiology (3rd ed.). Oxford University Press. Newyork. p 250-251.

Guidi, A., L. Laricchia-Robbio, L. Anichini, and D. Gianfaldoni. 2000. Detection of insulin-like growth factor(IGF- I ) in commercial dairy products. Second International Conference on Protein Stabilisation(Poster abstract).

Guler, H. P., J. Zapf, C. Schmid, and E. R. Froesch. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. Acta. Endocrinol (Copenh) 121 : 753-758.

Hadley, Mac. E. 1996. Endocrinology, 4th ed. Univ of Arizona Tucson, Arizona. US.

Hankinson, S. E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Michaud, D. S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F. E. and M. Pollak. 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. Lancet. 351 :13931396.

Hayes, K. D. and S. S. Nielson. 2000. Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. J. Dairy Sci. 83 : 387-394.

Heaney, R. P., D. A. McCarron, B. Dawson-Hughes, S. Oparil, S. L. Berga, J. S. Stern, S. I. Barr, and C. J. Rosen. 1999. Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. J. American Dietetic Association. 99 : 1228-1233.

Honegger, A., and R. Humbel. 1986. Insulin-Like Growth Factors I and II in fetal and bovine serum. *J. Biological Chem.* 261(2) : 569-575.

Houle, V. M., E. A. Schroeder, J. Odle, and S. M. Donovan. 1997. Small intestinal disaccharidase activity and ileal villus height are increased in piglets consuming formula containing recombinant human insulin-like growth factor-I. *Pediatric Research.* 42 : 78-86(abstract).

Huffman, L. M. 1996. Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technology.* February. 49-52.

Humbert, G. and C. Alais. 1979. Review of the Progress of Dairy Science : The milk proteinase system. *J. Dairy Res.* 46 : 559-571.

Juskevich, J. C., and C. G. Guyer. 1990. Bovine growth hormone : human food safety evaluation. *Science.* 249 : 875-884.

Kang, S. H., Kim, J. W., Imm, J. Y., Oh, S. J. and Kim S. H. 2002. Effect of dairy process on insulin-like growth factor-I content and its concentration in several commercial dairy products, *J. Dairy Sci.* 85: Suppl. 1. 60.

Kong, W., A. F. Phillips, B. Dvorak., G. Anderson., M. Lake and O. Koldovski. 1995. Presence of insulin-like growth factor-I but absence of the binding proteins in the bile of rats. *Am. J. Physiol.* 268 : 266-271.

Kuipers, H., E. V. Breda., G. Verlaan, and R. Smeets. 2002. Effects of oral bovine colostrum supplementation on serum insulin-like growth factor-I levels. *Nutrition.* 18 : 566-567.

Lee, C. Y., and D. M. Henricks. 1990. Comparisons of various acidic treatments of bovine serum on insulin-like growth factor-I immunoreactivity and binding activity. *J. Endocrinol.* 127: 139-148.

Lee, C. Y., H. H. Head, C. R. Feinstein, J. Hayen, and F. A. Simmen. 1995. Endocrine changes and circulating Insulin-like growth factors in newborn calves fed colostrum, milk or milk replacer. *AJAS.* 8(1) : 51-58.

Ley, B. M. 1997. Colostrum : Nature's gift to the immune system. BL publications, Aliso Viejo, CA, US.

Liebe, A., and D. Schams. 1998. Growth factors in milk : interrelationships with somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 65 : 93-100.

Malven, P. V., H. H. Head, R. J. Collier, and F. C. Buonomo. 1987. Periparturient changes in secretion and mammary uptake of insulin and in concentrations of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70 : 2254-2265.

Meinel, L., O. E. Illi, J. Zapf., M. Malfanti., H. P. Merkle., and B. Gander 2001. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 70 : 193-202.

Mero, A. 1995. A dietary supplement based on bovine colostrum increases the serum IGF-I concentration in male athletes during a short-term strength and speed training period. Congress abstract : The VIIIth FIMS European Congress of Sport Medicine. Granada. Spain. p 292.

Mero, A., J. Khknen., T. Nyknen., T. Parviainen., I. Jokinen., T. Takala., T.

Nikula., S. Rasi., and J. Leppluoto. 2002. IGF- I, IgA, and IgG responses to bovine colostrums supplementation during training. *J. Appl. Physiol.* 93 : 732-739.

Miller, M. A. et al. 1989. unpublished report MSL 8673 (Monsanto Agricultural Co., St. Louis, MO).

Mulvihill, D. M. 1992. Production, functional properties and utilization of milk protein products. *Advanced dairy chemistry-1(2nd ed.) Proteins.* Edited by P. F. Fox. Elsevier applied science. London. p 378-381.

Nagashima, K., K. Itoh and Kuroume, T. 1990. Levels of insulin-like growth factor I in full- and preterm human milk in comparison to levels in cow's milk and in milk formulas. *Biol. Neonate* 58: 343.

Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 2001. Seventh revised edition, National Academy Press. Washington, D. C.

OECD. 1993. OECD Guidelines for the testing of chemicals Vol 1 & 2, Organisation for Economic Co-operation and Development.

Pakkanen, R., and J. Aalto. 1997. Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *Int.Dairy Journal.* 7 : 285-297.

Philipps, A. F., G. G. Anderson, B. Dvorak, C. S. Williams, M. Lake, A. V. Lebouton, and O. Koldovsky. 1997. Growth of artificially fed infant rats : effect of supplementation with IGF- I. *Am. J. Physiol.* 272 : 1532-1539.

Playford, R. J., C. E. Macdonald, and W. S. Johnson. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal

disorders. *Am. J. Clin Nutr.* 72 : 5-14.

Prosser, C. G., A. J. Davies, I. R. Fleet, and L. H. Rees. 1987. Mechanism of transfer of IGF- I into milk. *J. Endocrinol.* 131 : 459-466.

Prosser, C. G., C. Royle, I. R. Fleet, and T. B. Mepham. 1991. The galactopoietic effect of bovine growth hormone in goats is associated with increased concentrations of insulin-like growth factor-I in milk and mammary tissue. *J. Endocrinol.* 128 : 457-463.

Purup, S., M. Vestergaard, and K. Sejrsen. 1996. The influence of feeding level and exogenous bST on mammary tissue sensitivity to IGF- I in prepubertal heifers. *J. Dairy Sci.* 79 : (suppl. 1), p 195(Abstract).

Puyol, P., M. D. Perez, and D.S. Horne. 2001. Heat-induced gelation of whey protein isolates(WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids.* 15 : 233-237.

Rajaram, S., D. J. Baylink and S. Mohan. 1997. Insulin-Like Growth Factor Binding proteins in serum and other biological fluids : Regulation and Functions. *Endocrine reviews.* 18(6) : 801-831.

Read, L. C., F. M. Upton, G. L. Francis, J. C. Wallace, G. F. Dahlenberg, and F. J. Ballard. 1984. Changes in the growth promoting activity of human milk during lactation. *Pediatr. Res.* 18 : 133.

Read, L. C., G. L. Francis, J. C. Wallace, and F. J. Ballard. 1985. Growth factor concentrations and growth-promoting activity in human milk following premature birth. *J. Dev. Biol.* 7 : 135.

Rechler, M. M., and A. L. Brown. 1988. Insulin-like growth factor binding proteins : gene structure and expression. *Growth Reg.* 2 : 55-68.

Richardson, N. A., A. J. Anderson., and V. R. Sara. 1997. The effects of insulin/IGF- I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish(*Cherax quadricarinatus*). *General and Comparative Endocrinology.* 105 : 287-293.

Rinderknecht, E., and R. Humbel. 1978. The amino sequence of human Insulin-Like Growth Factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biological Chem.* 253(8) : 2769-2776.

Ronge, H., and J. W. Blum. 1988. Somatomedin C and other hormones in dairy cows around parturition, in newborn calves and in milk. *J. Animal Physiology and Animal Nutrition* 60 : 168-174.

Rosen, C. J. and C. Conover. 1999. Growth hormon/insulin-like growth factor-I axis in aging: a summary of a national institute of aging-sponsored symposium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3919.

Ross, C. 1997. The somatogenic hormones and Insulin-Like Growth Factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocrine Reviews.* 18(2) : 157-179.

Salminen, S. and A. V. Wright. 1998. Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, NY, US.

SAS. 1995. SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute, Cary, NC, U.S.A

Sejrsen, K., and S. Purup. 1997. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers : a review. *J. Anim. Sci.* 75 : 828-835.

Sharma, B.K., M. J. Vendehaar, N. K. Ames,. 1994. Expression of insulin-like growth factor I in cows at different stage of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. *J. Dairy Sci.* 77 : 2232-2241.

Sheu, T.-Y. and M. Rosenberg. 1995. Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *J. Food Sci.* 60 (1) : 98-103.

Shin, J. H., T. W. Kim., and M. H. Kim. 1989. Plasma IGF-binding proteins in short stature with growth hormone deficiency and acromegaly. *J. Kor Soc Endocrinol.* 4 : 132-136.

Simmen, F. A., R. C. M. Simmen, and G. Reinhart. 1988. Maternal and neonatal somatomedin-C/insulin-like growth factor binding proteins during early lactation in the pig. *Dev Biol* 130 : 16.

Skaar, T. C., J. R. Vega, S. N. Pyke, and C. R. Baumrucker. 1991. Changes in insulin-like growth factor-binding proteins in bovine mammary secretions associated with pregnancy and parturition. *J. Endocrinology.* 131 : 127-133.

Smith, W. J, L. E. Underwood, and D. R. Clemmons. 1995. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J. Clin Endocrinol Metab.* 80 : 443-449.

Suikkari, A. M. 1989. Insulin-like growth factor (IGF-I) and its low molecular weight binding protein in human milk. *Eur J. Obstet Gynecol Reprod Biol.*

30 : 19-25.

The Ministry of Health and Welfare (Japan). 1996. Guidelines for designation of food additives, and for revision of standards for use of food additives.

Vega, J. R., C. A. Gibson, T. C. Skaar, D. L. Hadsell, and C. R. Baumrucker. 1991. Insulin-like growth factor (IGF)- I and -II and IGF binding proteins in serum and mammary secretions during the dry period and early lactation in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69 : 2538-2547.

Vestergaard, M., S. Purup, and K. Sejrsen. 1995. Influence of bovine growth hormone and feeding level on growth and endocrine status of prepubertal heifers. *J. Anim. Sci.* 73 : (Suppl. 1), p 148(Abstract).

Weber, M. S., S. Purup., M. Vestergaard., R. M. Akers., and K. Sejrsen. 2000. Regulation of local synthesis of Insulin-Like Growth Factor- I and binding proteins in mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 83 : 30-37.

Xian, C. J., C. A. Shoubridge., and L. C. Read. 1995. Degradation of IGF- I in the adult rat gastrointestinal tract limited by a specific antiserum or the dietary protein casein. *J. Endocrinol.* 146 : 215-225.

Xu. R. J. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrums/milk intake : a review. 1996. *Reprod Fertil Dev.* 8(1) : 35-48(Abstract).

Young, S. L., X. Sarda., and M. Rosenberg. 1993. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with

carbohydrates. J. Dairy Sci. 76 : 2878-2885.

Zapf, J., C. Schmidt, and E. Froesch. 1984. Biological and immunological properties of insulin-like growth factors IGF-I and II. Clin Endocrinol. 13 : 3-30.

Zapf, J., M. Waldvogel, and E. R. Froesch. 1975. Binding of nonsuppressible insulin-like activity to human serum. Evidence for a carrier protein. Arch Biochem Biophys. 168 : 638-645(Abstract).

식품의약품안전청.1998. 의약품등의독성시험기준,식품의약품안전청고시 제1998-56호.

## 주 의

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