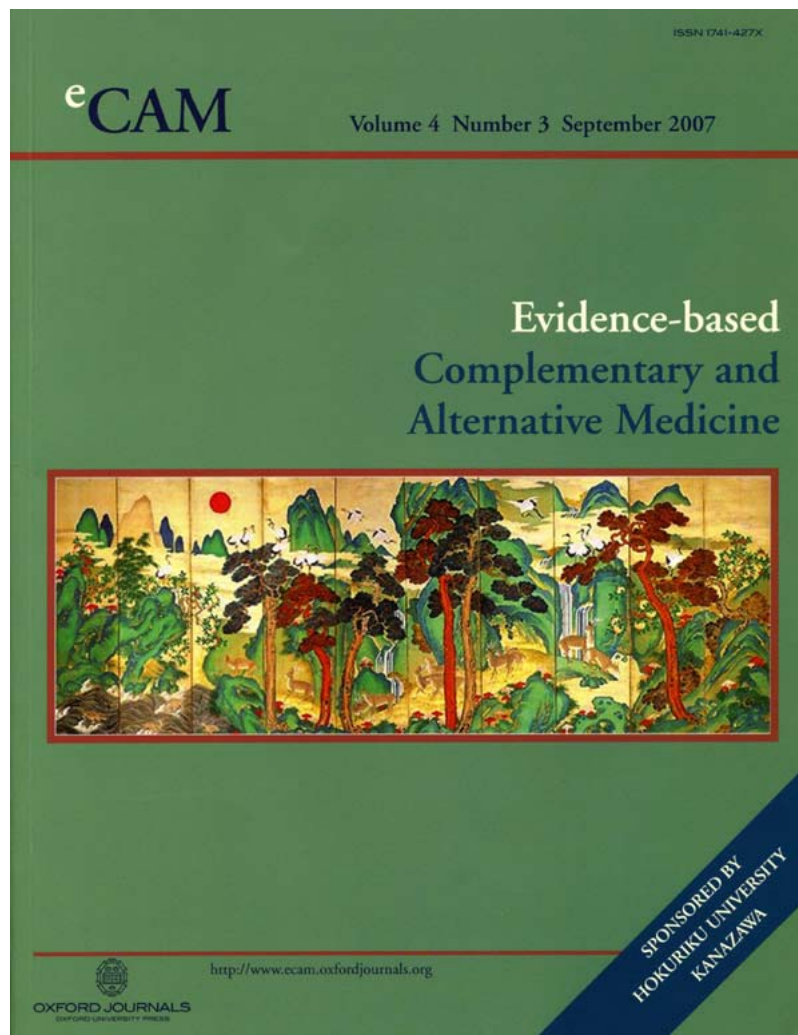


의도적으로 유발된 쥐의 간과 신장 장애에
유산균생산물질 (Biofermentics™)이 미치는
개선 효과

-Ryiochi Shin¹, Momoyo Suzuki¹, Takeo Mizutani¹ and Nobuyuki Susa²



영국 옥스포드 저널 2007년 Septembers 전자판

의도적으로 유발된 쥐의 간과 신장 장애에 유산균생산물질 (Biofermentics™)이 미치는 개선 효과

Ryiochi Shin¹, Momoyo Suzuki¹, Takeo Mizutani¹ and Nobuyuki Susa²

1Central Institute for Health Science, A.L.A. Corporation 40-14 Kitamachi, Seya-ku, Yokohama-city, Kanagawa, 246-0002 and 2Department of Veterinary Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada, Aomori, 034-8628 Japan

유산균생산물질 (Biofermentics™; BF)이 간장과 신장 장애를 가진 실험 모델에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생체 내 (in vivo)와 생체 외 (in vitro) 실험을 시행하였다. 쥐에게 디옥시콜산 (deoxycholic acid; DCA, 0.5 wt/wt, n=6) 섭취 혹은 D-galactosamine (GMN, 500mg.body, wt, n=6)의 복강 투여로 간염을 유발하였을 때, 건조된 BF가 5% 포함된 식이를 투여하자 혈청 AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase) 수치가 유의하게 억제되었다 (P<0.05). 게다가, 대조군과 비교하였을 때 BF를 복용한 쥐들에게서 요소질소 (BUN) 농도가 더욱 낮게 나타났으며 소변의 양은 더욱 많은 것으로 측정되었다. 중크롬산염 (K₂Cr₂O₇)에 대한 노출에 앞서 쥐의 간과 신장 세포의 1차 세포 배양을 BF로 전처리 하자 중크롬산염에 의해 유도된 세포 독성이 확연히 감소한 것을 유산 탈수소 효소 (lactate dehydrogenase)의 유출로 평가하였다. 말론디알데히드 (malondialdehyde)의 형성으로 평가한 중크롬산염에 의한 지질 과산화 수치 또한 간세포를 BF로 전처리 한 후에 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 BF가 간과 신장 장애에 특정 역할을 나타내며, 인간의 건강 유지에 효과적일 수 있음을 제시한다.

핵심어: 항산화, 발효, 간염, 유산균, 효모

서론

통합 의학에 식이 보충제를 포함시키는 것은 이제 세계적인 추세이며 (1) 근거 중심 의학 (EBM)은 이러한 보충제의 인식과 수용을 위하여 필요하다. 대두가 인체에 유익한 성분인 대두단백, 펩티드, 올리고당, 인지질, 이소플라본, 사포닌, 무기질과 비타민 등을 포함하고 있다는 사실은 이미 널리 알려져 있다 (4). 대두를 발효하게 되면 다양한 구성과 기능의 변화가 나타나며 광범위한 종류의 펩티드와 아미노산이 유산균을 포함하고 있는 여러 종류의 미생물을 통해 대두단백으로부터 생성된다. 이소플라본 혹은 사포닌 글리코시드 (glycoside)의 아글리콘 (aglycone)은 곰팡이와 유산균의 β-glucosidase로부터 방출된다 (5,6). 아글리콘형 이소플라본과 사포닌은 글리코시드보다 몸속 흡수력이 높다 (7).

미생물에 의하여 발효된 전통적인 대두 제품들은 특히 동아시아 국가에서 많이 찾아 볼 수 있다. 예를 들면 간장 (유산균과 효모) (8), ‘나또’ (Bacillus subtilis natto) (9)와 템페 (Rhizopus sp.) (10) 등이 있다. 이러한 제품들은 주로 부식토, 효모, 박테리아 혹은 이러한 미생물들의 조합에 의하여 발효된다. 그러나, 최근 몇 가지의 두유 제품을 제외한 유산균만을 이용하여 발효된 몇몇 제품들이 있다. 이들은 대부분 단일 순수 비피더스균 (11) 혹은 유산균 (12)을 프로바이오틱 식품으로 접목하여 발효된 것이다.

이 연구의 목적은 여러 종의 유산균과 효모의 조합에 의하여 발효된 대두를 포함한 새로운 식이 보충제인 Biofermentics™ (BF)의 효과를 간과 신장 장애를 유발한 쥐를 통해 생체 내와 생체 외에서 평가하기 위함이다.

실험 방법

유산균생산물질의 준비 (Biofermentics™; BF)

두유는 일본 북부의 홋카이도 지역에서 저농약을 사용하여 재배한 ‘Tsurunoko’ 종의 대두로 생성되었다. 대두는 물에 담근 후에 갈아서 98 °C에서 30분간 열처리를 하고 리넨 (linen)을 통하여 짜냈다. 여과액은 두유로 사용되었다. 두유의 발효에는 Lactobacillus plantarum, L. casei, L. reuteri와 Lactococcus lactis 등의 냉동된 12 종류와 4 종류의 효모 Saccharomyces cerevisiae가 사용되었다. 이들은 A, B, C, D의 네 가지 그룹의 종자 배양으로 분류되었다. 각 그룹은 두 종류의 Lactobacillus와 한 종류의 Lactococcus 그리고 한 종류의 S.cerevisiae를 포함하였다. 종자 배양을 위해서 각 그룹의 냉동된 원료 (스탁; stock)를 적당한 양의 두유에 섞어 넣어 이를 동안 37 °C에서 배양하였다.

유산균과 효모 접종물의 크기는 각각 $\sim 1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 과 $\sim 1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 로 조정되었으며 이는 미리 측정된 냉동 스탱 내의 세포 수를 바탕으로 한 값이다. 그 후, 네 종류의 종자 배양을 서로 섞어서 접종물의 약 100 배가 되는 많은 양의 신선한 두유에 접종하여 37 °C에서 4일간 배양하였다. 대량의 발효된 두유에 30분간 98 °C까지 열을 가한 후, 실온으로 식힌 다음 에틸 알코올을 첨가하여 약 2주 동안 최종 농도가 14% v/v가 되도록 추출하였다. 추출물은 여과지를 통해 분리되었다. 여과물과 침전물은 둘 다 다른 유산균-발효 두유 추출물 제품 (Biofermentics; BF)에 이용되었다. 이는 대부분 냉동-건조되었다.

쥐

도쿄의 Charles River Co.에서 구입한 생후 5주된 수컷 Wistar 쥐에게 일주일 간 온도 23 ±1°C, 습도 50±5%, 광주기 12h light/12h dark (12 시간 명/ 12시간 암) 조건인 양육실에서 MF 가루 사료 (Oriental Yeast Co., Ltd., 도쿄)를 먹였다.

쥐의 양육과 처리는 실험실 동물의 양육과 사용을 주관하는 일본 과학 위원회의 방침에 따른 동물 윤리 원칙에 의거하여 이루어졌다.

디옥시콜산(DCA)-유도된 간과 신장 이상에 대한 BF의 구강 투여

생후 6주에 쥐를 6마리씩 두 그룹 (실험군과 대조군)으로 분류하였으며 두 그룹 간 체중의 평균과 편차는 거의 같았다. 대조군에게는 6주 동안 0.5% DCA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 오사카)만 함유한 MF 사료를 주었으며, 실험군에게는 5% BF와 0.5% DCA를 둘 다 함유한 가루 사료를 주었다. 사료와 식수는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급되었다. 각 쥐의 혈액은 꼬리의 정맥에서 0.5ml씩 실험 0, 2, 4, 6 주째 되는 시점에서 채취하였으며 혈청에서 분리되었다. 혈청의 L-aspartate 아미노전이효소 (AST), L-alanine 아미노전이효소 (ALT), 요소질소 (BUN), 요산 (UA), 총 콜레스테롤 (T-CHL) 수치는 효소 검사 키트 (C-test, Wako; Wako pure Chemical Industries, Ltd., 오사카)를 사용하여 측정되었다.

실험 기간의 마지막 주에 각 쥐를 대사볼릭 케이지 (metabolic cage)에 넣어 일일 소변량과 소변 내의 전해물 농도를 측정하였다. 최종적으로 쥐들을 CO² 봉지로 마취시킨 후에, 즉시 복부의 대정맥에서 주사로 채혈하고 장기의 무게를 측정하였다. 다층 필름 분석 물질인 dri-chem colorimetric analyzer 3030 (Fuji Photo Film Co., Ltd., 도쿄)를 사용하여 채취한 혈청의 총단백 (TP), 알칼리 포스파테이즈 (alkali phosphatase, ALP), γ -glutamyl 펩티드 전이효소 (γ -GTP), 류신 아미노전이효소 (leucine aminopeptidase; LAP), 글루코스 (GLU)를 측정하였다. 과산화 지질 (LPO), β -지단백 (β -LP)과 총 담즙산 (T-BA)의 농도는 효소 검사 키트 (C-test, Wako; Wako pure Chemical Industries, Ltd., 오사카)를 이용하여 측정되었다.

D-Galactosamine (GMN)-유도된 간장 이상에 대한 BF의 구강 투여

생후 6주된 수컷 Wistar 쥐들은 두 그룹으로 분류되었으며 두 그룹 간 체중의 평균과 편차는 거의 같았다. 대조군 (n=7)에게는 MF 사료만 주었으며 BF 그룹 (n=6)에게는 5% BF가 함유된 MF 사료를 주었다. 3주 동안 사료와 식수는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급되었다. 실험 기간 마지막 주의 초에 모든 쥐들에게 500 mgkg⁻¹ 체중의 농도인 GMN-(Wako pure Chemical Industries, Ltd., 오사카) 용액을 복강 내 주입하였다. 혈액은 꼬리의 정맥에서 0.5ml 채취하였으며, 혈청 AST 활동성은 GMN 투여 후 1,2,3,6 일째 되는 날 측정하였다.

세포 독성 평가

중크롬산염 (K₂Cr₂O₇; Kanto Chemical Co., Tokyo)에 대한 노출로 인한 세포 독성은 앞서 설명하였듯이 쥐의 간세포와 신장 세포의 초기 배양에서 유출된 유산 탈수소 효소 (LDH)(lactate dehydrogenase)의 농도로 평가하였다 (13-16). 간단히 설명하자면, 배지 E에 있는 약 2 x 10⁶ collagenase (Wako pure Chemical Industries, Ltd., 오사카)가 산재하는 쥐 간세포를 60-mm 지름의 Corning 배양 접시 (Iwaki Glass, Ltd., Chiba, Japan)에 넣고, 37°C, 5% CO₂와 95% 공기인 상태에서 3시간 동안 배양하였다. 그 후, 1차 배양 배지에

2.5, 5.0 혹은 $1\mu\text{ml}^{-1}$ 의 BF를 첨가하여 20시간 동안 배양하였다. 20시간이 지난 후 배지를 제거하고 1차 세포층에 중크롬산염 (1mM)과 위에 언급한 3 가지 농도의 BF를 함유한 염분-글루코스 배지 {SGM: 50Mm 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinesulfonic acid buffer (pH 7.2)와 100mM NaCl, 5mM KCl, 2m CaCl 그리고 5mM 글루코스}로 같고 37 °C에서 8 시간 배양하였다. 배양 접시의 SGM은 4°C에서 5분간 1000rpm으로 원심 분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고 표층액으로는 Mitchell et al. (17)이 설명한 방법으로 세포에서 분비된 LDH를 평가하였다.

대조용 1차 배양은 BF와 중크롬산염에 대한 노출이 전혀 없었으며 SGM과 함께 냉동 된 후 해동하였다. 이러한 냉동-해동 과정은 3번 반복되었다. 그 후, 세포층을 고무 주걱으로 긁어내고, Handy Sonic model UR-20P (Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo)로 1분간 강도 8로 초음파 처리하였다. 이는 다시 4°C에서 10분간 10000rpm으로 원심분리 되었다. 표층액은 대조군 간세포의 총 LDH를 분석하기 위하여 사용되었다. BF와 중크롬산염 처리된 세포에서 분비된 LDH의 백분율은 대조군 간세포에서 분비된 총 LDH를 기준으로 계산되었다. 쥐의 신장 세포의 1차 배양에 대한 중크롬산염 유도된 세포 독성에 BF가 미치는 영향은 간세포와 유사한 방법으로 평가되었다. 신장 세포에서의 LDH 분비는 SGM에 분비된 BF-처리된 세포와 처리되지 않은 세포의 LDH 분비량 비율로 평가하였다.

지질 과산화 분석

중크롬산염 화합물이 독립된 간세포에서 지질 과산화를 통해 malondialdehyde (MDA)의 형성을 용이하게 하기 때문에 (18), 앞서 설명하였듯이 쥐 간세포 1차 배양을 통해 MDA 형성에 BF가 미치는 영향을 알아보았다 (19). 간단히 설명하자면, 앞의 실험과 같이 중크롬산염을 처리한 후, 세포를 얼음같이 찬 인산완충용액 (PBS)로 두 번 행구고 배양 접시에서 긁어내었다. 세포를 매우 찬 PBS에 다시 푼 후에 초음파 처리하고 이는 MDA 형성을 토대로 지질 과산화 된 세포의 정도를 평가하기 위하여 이용되었다.

통계학적인 분석

데이터의 평균 값의 차이는 등분산은 Student's t-test, 이분산은 Welch's t-test를 사용하였다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 쥐 실험의 경우에 AST 혹은 ALT의 비대칭 분포 때문에 데이터는 대부분 대수변형으로 표준화되어 추후 통계 분석을 거치게 된다. 그러나 '결과' 부분에 변형된 값은 표기되지 않았다.

결과

DCA-유도된 간과 신장 이상의 개선

그림 1A에 나타나듯이, DCA-투여가 제한된 그룹에서는 혈청 AST 활동성이 2주된 시점에서 785 ± 475 IU/1로 급속히 상승하였으며 4주 쯤 2469 ± 2182 IU/1으로 최고치로 올라갔다

가 6주 째 722±502 IU/1로 급격히 감소하였다. 그러나 이런 빠르게 상승된 활동성은 BF-와 DCA-복용 그룹의 수치에서는 195±105 IU/1 (2주), 788±744 IU/1 (4주), 147±67 IU/1 (6 주) 유의하게 감소되었다. 그리하여, DCA에 의하여 상승된 AST 활동성은 BF 투여에 의하여 분명히 감소하였으며 2주와 6주 째 감소는 통계학적으로 유의하였다 (P<0.05). ALT의 경우에도 이와 유사하게 BF 투여군에서는 대조군에 비하여 활동성이 낮게 나타났으며 (그림 1B) 2주 째 값은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하였다 (P<0.05).

표 1에 보이듯이, BF와 DCA-복용 그룹의 4주와 6주의 혈청 BUN 수치는 대조군에 비하여 유의하게 낮았다 (P<0.01). UA와 T-CHL의 경우에는 BF 투여에 의하여 유의한 영향이 나타나지 않았다. 혈청의 생화학적인 분석에서는 대조군과 투여군의 TP, ALP, γ-GTP, LAP, GLU, LPO, β-LP 수치에 유의한 차이가 나타나지 않았다 (표2). 그러나 대조군의 혈청 T-BA 수치 (81±36 nmol ml⁻¹)은 BF 투여군 (46±34 nmol ml⁻¹)과 차이를 보였다. 이는 BF 투여군이 대조군에 비하여 T-BA 수치가 낮다는 것을 나타낸다. 비록 대조군에 비하여 BF 투여군의 소변량이 더 많았으나, 소변 전해질 (Na, K, Cl)의 농도에는 차이가 없었다.

GMN-유도된 간장 이상의 개선

그림 2에 보여지듯이, 대조군의 혈청 AST 활동성은 GMN 투여 1일 째 3172±2379 IU/1, 2일 째 2811±2210 IU/1으로 급격히 상승한 후, 3일 째 372±323 IU/1으로 급격히 감소하였다. BF 투여군의 AST는 1423 1857 (1일), 1009 1385 (2일), 142 161 (3일)으로 유의하게 감소하였으며 (P<0.05), 이는 대조군에 비하여 ~45% 정도의 수치이다.

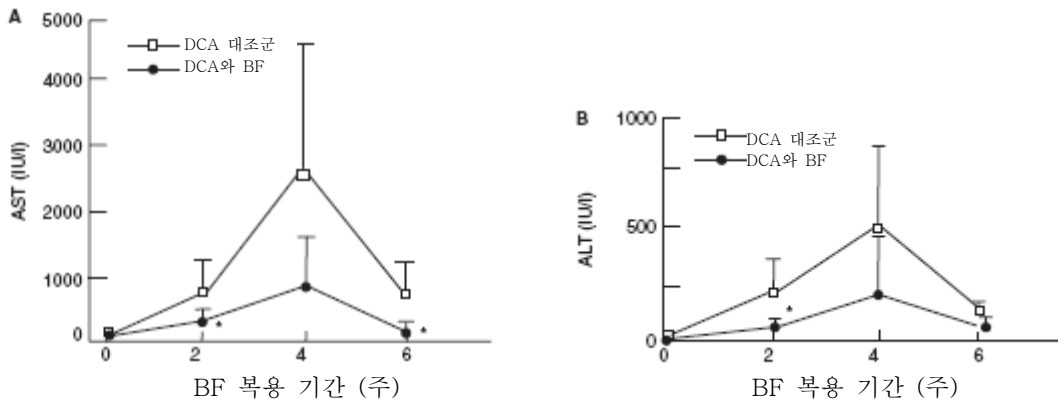


그림 1. DCA 유도된 간장 이상 쥐의 혈청 AST (A)와 ALT (B) 활동성에 구강 BF 투여가 미치는 영향. DCA 대조군 (비어있는 사각형)에게는 0.5% DCA만 함유된 MF 가루 사료를 공급하였으며, DCA와 BF 그룹 (색칠된 원)에게는 0.5% DCA와 5% BF가 함유된 MF 가루 사료를 공급하였다. 수치는 평균±표준편차 (n=6)를 나타낸다. * 각 대조군의 수치에 비하여 P<0.05. BF, Biofermentics™ (유산균생산물질); AST, L-asparat 아미노전이효소; ALT, L-alanine 아미노전이효소; DCA, 디옥시콜산 (간병증 유도체)

표 1. DCA만 복용한 쥐와 DCA와 BF를 함께 복용한 쥐의 혈청에 대한 생화학적인 분석

분석항목	그룹	복용기간(주)			
		0	2	4	6
BUN (mg/dl)	DCA-복용	27.8±2.3	28.0±7.9	27.1±3.0	25.0±2.5
	DCA-와 BF-복용	26.2±1.2	25.6±4.8	21.9±2.2*	19.8±1.1*
UA (mg/dl)	DCA-복용	2.2±0.6	2.4±0.4	2.0±0.5	2.3±0.6
	DCA-와 BF-복용	2.2±0.5	2.4±0.7	1.7±0.5	2.2±0.5
T-CHL (mg/dl)	DCA-복용	69±11	121±28	162±65	118±12
	DCA-와 BF-복용	78±11	122±17	129±12	127±16

*DCA 투여군에 비하여 상대적인 수치가 P<0.05.

BF, Biofermentics™ (유산균생산물질); BUN, 요소질소; UA, 요산; T-CHL, T-CHL; DCA, 디옥시콜산

세포독성

그림 3에 나타나듯이, 간세포에 1mM 중크롬산염을 처리하자 이는 세포 손상을 유발하였으며 정상 세포 총 LDH의 18%에 해당되는 LDH가 유출되었다. 그러나, 세포에 중크롬산염과 BF를 동시에 처리한 경우에는 대조군에 비하여 LDH의 유출이 7.0% 정도로 억제되었다. 이는 BF가 중크롬산염에 의한 세포독성에 보호 작용이 있음을 나타낸다. 이 실험에서 처리한 BF 농도의 범위 내에서는 부작용이 전혀 나타나지 않았다.

그림 4는 BF를 신장 세포에 2.5 μml^{-1} 이상의 농도로 16시간 처리하는 것 또한 중크롬산염에 의한 세포독성을 억제함을 보여준다 (P<0.07).

표 2. DCA만 복용한 쥐와 DCA와 BF를 함께 복용한 쥐의 혈청에 대한 생화학적인 분석

분석 항목

분석항목	DCA-복용군	DCA-와 BF-복용군
혈청		
총단백 (g/dl)	7.0±0.3	7.4±0.3
알칼리 포스파테이즈 (ALP, IU/l)	694±143	635±127
γ -glutamyl 펩티드전이효소 (γ -GTP)	5.0±1.7	5.2±1.8
류신 아미노전이효소 (LAP)	397±199	363±156
글루코스 (GLU)	156±55	172±25
과산화 지질 (LPO)	2.3±2.4	1.7±1.4
β -지단백 (β -LP)	47±32	53±34
총 담즙산 (T-BA)	81±36	46±34

소변	소변량 (ml/1일)	21±14	30±10
	소변/물 섭취량 (%)	56±7	69±18
	소변 내 전해질 (mEq/1일):Na	1.4±0.7	2.1±1.1
	K	2.9±1.3	4.6±2.2
	Cl	1.7±0.8	2.7±1.7

DCA, 디옥시콜산; BF, Biofermentics™ (유산균생산물질)

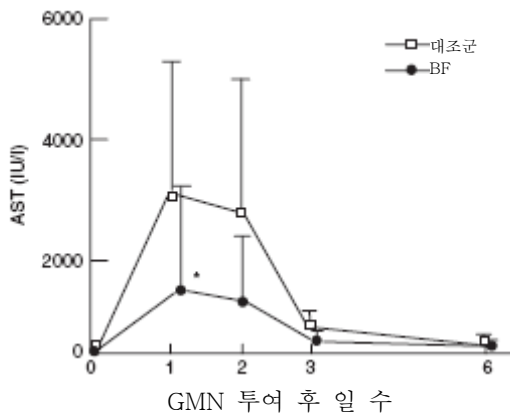


그림 2. GMN 유도된 간장 이상 쥐의 혈청 AST 활동성에 구강 BF 투여가 미치는 영향. 대조군 (비어있는 사각형)에게는 3주 동안 MF 가루 사료를 공급하였으며, BF 그룹 (색칠된 원)에게는 5% BF가 함유된 MF 가루 사료를 공급하였다. 실험 기간의 4주차 첫째 날에 대조군과 실험군의 모든 쥐에게 복강 내로 GMN 용액을 투여하였다 (500 mg/kg 체중). 혈청 AST는 GMN 투여 후 1, 2, 3, 6일 째 되는 날에 측정하였다. 수치는 평균±표준편차 (n=7)를 나타낸다. * 각 대조군의 수치에 비하여 P<0.05. BF, Biofermentics™ (유산균생산물질)

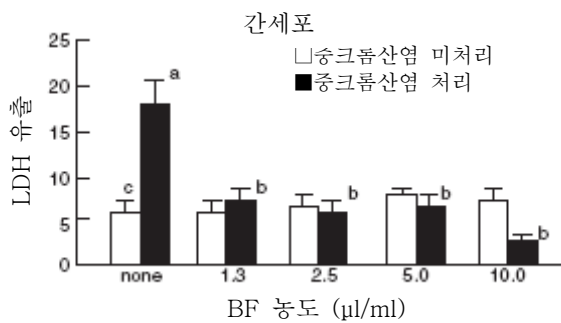


그림 3. 쥐 간 세포 1차 배양의 중크롬산염 유도된 세포독성에 BF 투여가 미치는 영향. 간세포는 BF 단독 처리 (비어있는 사각형) 또는 BF와 중크롬산염 복합 처리 (1mM) (색칠된 원)를 거쳐 37 °C SGM 내에 8시간 배양되었다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군 간세포의

총 LDH에 비하여 BF 처리된 그룹의 LDH 유출이 적게 나타났다. 그래프의 막대는 평균±표준편차 (n=4)를 나타낸다. 기호 b와 c를 기호 a와 비교하였을 때 P<0.05. BF, Biofermentics™ (유산균생산물질). LDH, 유산 탈수소 효소

지질 과산화

그림 5에 보여지듯이, 간세포에 8시간 동안 중크롬산염 1mM 단독 처리한 세포의 MDA 형성은 1.7 nmol mg⁻¹ 단백질로서 아무런 처리를 하지 않은 대조군 세포의 MDA 형성인 0.3 nmol mg⁻¹ 단백질에 비하여 유의하게 높았다 (P<0.05). 그러나 중크롬산염에 5 혹은 10 μl/ml 농도의 BF를 추가하여 세포에 처리하자 MDA 형성이 유의하게 (50% 이상) 억제되었다 (P<0.05). 이는 BF가 중크롬산염에 의한 세포독성에 보호작용이 있음을 나타낸다. BF 실험 범위인 1.3-10 μl ml⁻¹ 의 농도로 단독 처리된 세포의 MDA 형성은 증가하지 않았다.

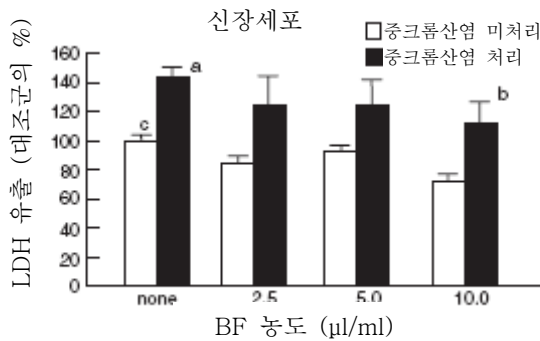


그림 4. 쥐 신장세포 1차 배양의 중크롬산염 유도된 세포독성에 BF 투여가 미치는 영향. 신장세포는 BF 단독 처리 (비어있는 사각형) 또는 BF와 중크롬산염 복합 처리 (1mM) (색칠된 원)를 거쳐 37 °C SGM 내에 8시간 배양되었다. BF의 효과는 BF와 중크롬산염을 처리한 신장 세포의 LDH 유출에 대한 수치 감소로 평가하였다. 그래프의 막대는 평균±표준편차 (n=4)를 나타낸다. 기호 c에 대한 기호 a는 P<0.05. 기호 a에 대한 기호 b는 P<0.07. BF, Biofermentics™ (유산균생산물질).

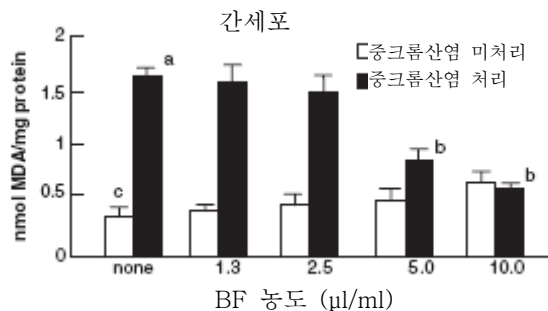


그림 5. 중크롬산염 유도된 지질 과산화에 BF 투여가 미치는 영향. 간세포는 BF 단독 처리 (비어있는 사각형) 또는 BF와 중크롬산염 복합 처리 (1mM) (색칠된 사각형)를 거쳐 37 °C SGM 내에 8시간 배양되었다. BF의 효과는 지질 과산화를 통한 MDA 형성이 감소되는 것으로 평가하였다. 그래프의 막대는 평균±표준편차 (n=4)를 나타낸다. 기호 c에 대한 기호 a는 P<0.05. 기호 a에 대한 기호 b는 P<0.05. BF, Biofermentics™ (유산균생산물질).

고찰

DCA는 2차 담즙산으로서 독성이 강하며 실험 동물에게 담즙정체성 간병증을 유발한다 (21). 담즙산의 농도가 간세포의 시토졸 (cytosol)에 위치하는 결합 단백질의 결합 용량을 초과하면, 담즙산은 미토콘드리아를 손상시켜 아포토시스 (apoptosis)와 네크로시스 (necrosis)를 유발한다 (22). 소수성 (hydrophobic) 담즙산은 미토콘드리아 호흡과 탈분극의 장애와 연관성이 있는 세포막 유동성의 변화를 유발한다. 이 논문에서는 간세포의 담즙산 농도를 억제하는 것은 BF가 간세포의 손상을 감소시킬 수 있는 하나의 기전으로 고려되었다. 우리는 BF 투여군에서 혈청의 총 담즙산 농도가 대조군에 비하여 낮게 나타나는 경향을 발견하였다 (표 2). 간세포의 담즙산 농도가 BF에 의하여 억제된 이유는 아마도 담즙산과 아미노산의 결합이 억제되고, 장점막 내 담즙의 운송 활동 저하로 인해 장점막의 DCA 흡수가 감소되었기 때문일 것으로 추정된다. 하지만 이러한 추측은 아직 분명하지 않으며 추후 연구를 요한다.

인체 바이러스성 간염 모델의 경우, GMN은 간세포 내 단백질과 핵산의 합성을 억제한다 (23, 24). L-serine, L-asparagine, L-histidine, L-lysine, L-tyrosine, L-glycine, L-glutamine 등의 다양한 식이 아미노산들은 GMN-유도된 손상으로부터 쥐들을 보호하는 작용이 있는 것으로 보고되었다 (25). 게다가, 올리고당과 식이섬유의 효능은 GMN-유도된 간손상을 방지하는 것으로 나타났다 (26). 그러므로, 우리는 두유를 근원으로 하는 BF의 성분인 아미노산과 올리고당은 GMN-유도된 간손상을 부분적으로 방지할 수 있다고 생각한다.

6가 크롬 (hexavalent chromium)은 간과 신장 세포 내에서 안정적인 형태인 3가 크롬 (trivalent chromium)으로 바뀐다 (15). 이러한 세포에서 생성되는 활성 산소 (hydroxyl radical•OH)는 지질 과산화를 통해 세포막과 DNA에 손상을 유발한다. 또한 두유의 성분인 사포닌 혹은 이소플라본 글리코시드 (isoflavone glycosides)의 아글리콘 (aglycone)은 유산균의 β -glucosidase에 의하여 분비된다 (5,6). 이리하여 우리는 BF의 항산화 효능은 이 실험의 유산균과 효모의 혼합 배양을 발효하는 과정에서 유지되는 것으로 추측해 볼 수 있다. 그러므로 BF의 항산화 효능은 크롬에 의한 지질 과산화를 방지하며, BF의 항산화 작용은 카테킨 (catechin), 클로로겐산 (chlorogenic acid), 비타민 E, 멜라토닌 (melatonin)과 같은 다른 항산화 물질들과 유사한 것으로 생각된다 (14, 15, 19). 허브식물과 과실의 치료 효능 특히 항산화 작용에 대한 보고들이 많이 존재한다 (27-29). 따라서 이 논문에 사용된 BF와 같은 발효된 두유 추출물을 항산화제로 매일 복용하면, 이는 인간의 전반적인 건강에

기여할 수 있을 것이다.

각기 다른 미생물을 이용하여 발효한 대두의 기능성에 대한 논문들도 있다 (30, 31). 게다가, 두 종류 이상의 박테리아로 발효하는 것은 단일 종류의 박테리아를 사용하는 것보다 더욱 복잡한 것으로 고려된다 (32, 33). 비록 우리는 이 연구에서 BF 생성을 위하여 사용된 각 박테리아의 발효 물질을 다 실험해보지는 못했지만, 단일 그리고 복합-배양에 대한 추후 연구를 통해 BF의 항산화 작용을 나타내는 특정 발효 물질을 가려내야 한다.

결과적으로, 이 연구는 BF가 간과 신장 장애 개선을 위하여 사용될 수 있으며 BF는 인체 건강에 또 다른 유익을 줄 수 있음을 제시한다.

감사의 글

임상적인 식견으로 이 논문을 검토해 주신 Morie Sekiguchi (M.D., Ph.D., F.A.C.C.) 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

참고 문헌.

1. Eisenberg DM, Davis R B, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. 미국에서 사용되는 대체 의학의 경향, 1990-1997: 전국 설문 조사 추적 결과. *JAMA* 1998;280:1569-75.
2. Kaminogawa S, Nanno M. 음식에 의한 면역 기능의 변화. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004;1:241-50.
3. Naylor CD. 임상 처치의 그레이존 (gray zone): 근거중심의학의 몇 가지 한계. *Lancet* 1995;345:840-2.
4. Csáky I, Fekete S. 대두: 식이의 질과 안전성. 1부” 생물학적 활성 성분. *Acta Veterinaria Hungarica* 2004;52:299-313.
5. Matsuda S, Miyazaki T, Matsumoto Y, Ohba R, Teramoto Y, Ohta N, et al. *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* IFO 3425에 의한 대두로 조리된 시럽 내 이소플라본의 가수분해. *J Ferment Bioeng* 1992;74:301-4.
6. Coulon S, Chemardin P, Gueguen Y, Arnaud A, Galzy P. *Lactobacillus casei* ATCC 393의 세포 내 β -glucosidase에 대한 정제와 특징 부여. *App Biochem Biotech* 1998;74:105-14.
7. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, et al. 인체에서 대두 이소플라본 아글리콘 (aglycone)이 글루코시다아제 (glucosidase) 에 비하여 흡수가 빠르며 흡수량도 많다. *J Nutr* 2000;130:1695-9.
8. Kataoka S. 일본식으로 발효된 간장 (Shoyu)과 구성 성분들의 기능적인 효능. *J Biosci Bioeng* 2005;100:227-34.
9. Katsuyama H, Ideguchi S, Fukunaga M, Fukinaga T, Saijoh K, Sunami S. 발효된 대두 (Natto)의 섭취가 폐경 전 여성의 골형성을 촉진. *J Nutr Sci Vitaminol*

- 2004;50:114-20.
10. Nakajima N, Nozaki N, Ishihara K, Ishikawa A, Tsuji H. 발효된 대두인 tempeh의 이소플라본 성분 에 대한 분석과 이소플라본-강화된 새로운 tempeh의 준비. *J Biosci Bioeng* 2005;100:685-7.
 11. Shimakawa Y, Matsubara S, Yuki N, Ikeda M, Ishikawa F. 야쿠르트 (yakult)-발효된 두유 *bifidobacterium breve* 종에 대한 프로바이오틱 (probiotic) 음식으로서의 평가. *Int J Food Microbiol* 2003;81:131-6..
 12. Beasley S, Tuorila H, Saris PEJ. *Lactococcus lactis*으로 단일 배양한 발효 두유. *Int J Food Microbiol* 2003;81:159-62.
 13. Susa N, Ueno S, Furukawa Y. 간세포의 1차 배양에 대한 6가 크롬과 3가 크롬의 세포독성의 비교 실험. *Kitasato Arch Exp Med* 1989;62:53-7
 14. Susa N, Ueno S, Furukawa Y. 크롬산염-유도된 독성에 대한 *in vitro*와 *in vivo* 상황에서 티올 (thiol) 화합물의 보호 작용. *Environ Health Perspect* 1994;102:247-50.
 15. Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. 쥐 간세포의 1차 배양 내 크롬(VI)-유도된 세포독성과 지질 과산화에 대한 비타민 E의 보호 작용. *Arch Toxicol* 1996;71:20-4
 16. Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. 쥐 간세포의 1차 배양 내 크롬(VI)-유도된 DNA 단 사절단과 세포독성 그리고 지질 과산화에 대한 데페록사민 (deferoxamine)의 보호 작용. *Arch Toxicol* 1997;71:345-50.
 17. Mitchell DB, Santone KS, Acosta D. 효소 유출에 통한 배양 세포의 세포독성 평가. *J Tissue Cult Method* 1980;6:113-6.
 18. Ueno S, Susa N, Furukawa Y, Akikawa K, Itagaki I, Komiyama T, et al. 쥐의 크롬으로 유도된 독성과 지질 과산화 형성 간의 관계. *Kitasato Arch Exp Med* 1988;61:137-47.
 19. Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Ueda J, Sugiyama M, 쥐 간세포의 1차 배양 내 크롬(VI)-유도된 DNA 단 사절단과 세포독성 그리고 지질 과산화에 대한 멜라토닌 (melatonin) 강력한 보호 작용. *Toxicol App Pharmacol* 1997;144:377-84.
 20. Buege JA, Aust S. 미세소체 (microsomal) 지질 과산화. *Methods Enzymol* 1987;52:302-10.
 21. Shiina T, Shin R, Ishihara K, Isoda M. 디옥시콜산 (deoxycholic acid) 식이를 복용한 쥐에 대한 장내 유산균의 열처리 세포의 효능. *Jikken Dobutsu* 1990;39:325-35 (영문 초록, 본문은 일어).
 22. Palmeria CM, Rolo AP. 담즙산의 미토콘드리아로 유발된 독성. *Toxicol* 2004;203:1-15.
 23. Keppler DOR, Rudigier JFM, Bischoff E, Decker KFA. D-galactosamine, D-

- glucosamine과 2-deoxy-D-galactose에 의한 우리딘 인산 (uridine phosphate)의 트래핑 (trapping). Galactosamine 간염의 기전에 대한 연구. *Eur J Biochem* 1970;17:246-53.
24. Decker K, Keppler D. Galactosamine 간염: 세포 손상과 세포사의 병인에 대한 뉴클레오티드 (nucleotide) 결핍 시기의 주요 역할. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1974;71:78-106.
25. Wang B, Ishihara M, Egashira Y, Ohta T, Sanada H. 쥐에서 D-galactosamine의 간독성 활동에 대한 다양한 식이 아미노산의 효능. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:319-22.
26. Daizo A, Egashira Y, Sanada H. 쥐에서 D-galactosamine으로 유발된 신장 손상에 대한 옥수수겨 헤미셀룰로오스 (hemicellulose)의 억제 작용. *Nutrition* 2005;21:1044-51.
27. Gupta V, Gupta A, Saggi S, Divekar HM, Grover SK, Kumar R. L-arginine 보충의 항스트레스와 적응력 증진 효과. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:93-7.
28. Azaizeh H, Ljubuncic P, Portnaya I, Said O, Cogan U, Bomzon A. 전통 아랍 의학에서 사용된 약용 식물의 발효로 유발된 성장 변수와 항산화 작용의 변화. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:549-56.
29. Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Teucrium polium의 수용성 추출물의 in vitro에서 보이는 강력한 항산화 작용. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3:329-38.
30. Cheng IC, Shang HF, Lin TF, Wang TH, Lin HS, Lin SH. 장내 세균 생태에 발효된 두유가 미치는 영향. *World J Gastroenterol* 2005;11:1225-7.
31. Wang YC, Yu RC, Chou CC. 유산균과 비피더스균에 의하여 발효된 두유의 항산화 작용. *Food Microbiol* 2006;23:128-35.
32. Lin FM, Chiu CH, Pan TM. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101과 *Bifidobacterium longum*의 새로운 종류로 발효한 우유-두유와 *Lyceum chinense* Miller 혼합물. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:559-64.
33. Chien HL, Huang HY, Chou CC. 유산균과 비피더스균으로 두유를 발효하는 과정에서 나타나는 이소플라본 피토에스트로젠 (phytoestrogen)의 변형. *Food Microbiol* 2006;23:772-8.

수신일 2006년 10월 12일

수용일 2007년 6월 14일