

건강기능 식품소재 연구를 위한 in vitro 소화모델의 개발

Development of In Vitro Human Digestion Models for Health Functional Food Research

허선진^{1,*}, 이시경¹, 김영찬², 최인욱²

Sun Jin Hur^{1,*}, Si Kyung Lee¹, Young-Chan Kim², In Wook Choi²

¹건국대학교 분자생명공학과, ²한국식품연구원

¹Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University

²Korean Food Research Institute

I. 서론

소득의 증대와 함께 급격한 고령화는 우리사회의 건강에 대한 관심을 증가시키는 주요한 원인이 되고 있으며, 젊은 세대에서도 또한 건강과 미용에 대한 관심이 크게 증가하고 있다. 이와 함께 베이비부머 세대의 은퇴는 경제력을 갖춘 노령인구의 증가를 가져왔고, 자녀와 독립된 생활을 하는 노령인구의 증가는 결국 건강기능식품 산업을 증가시키는 주요 요인 중의 하나가 되고 있다. 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 건강기능식품 산업은 최근 10여년간 급격하게 성장하는 추세에 있으며, 그 시장규모는 약 3,014 달러에 이르고 있다. 식품의약품안전청 조사에 따르면 국내 건강기능식품의 시장규모도 급격하게 성장하여 2012년 약 1조 3천억 규모로 전년대비 28.2% 성장한 것으로 나타났다. 이러한 건강기능식품 산업의 증가는 건강기능식품 소재를 개발하기 위한 연구 환경에도 큰 변화

를 주고 있으며, 대학뿐만 아니라, 연구소와 기업체에서도 건강기능 식품소재를 개발하기 위한 다양한 실험 protocol들을 개발하고 있다. 최근 건강기능식품 소재 개발을 위한 다양한 실험방법 중 in vitro 소화실험 또는 drug delivery system 등이 크게 주목받고 있다. In vitro 방법은 약제나 건강기능성 식품소재의 구조변화, 소화율 또는 bioavailability 등을 신속하고 저렴하게 screening 할 수 있다는 것이 가장 큰 장점이며, 동물실험이나 인체적용시험 등에 의한 실험윤리 문제에서도 자유로울 수 있다는 장점이 있다. 그러나 in vitro 소화실험은 실험결과의 정확성과 in vivo 실험과의 상관관계에 대한 논란이 있을 수 있으며, 건강기능성 식품소재의 효능평가를 위한 초기 실험에 적절한 protocol 이라 할 수 있다. 따라서 향후 동물실험이나 인체적용시험이 동반되어야 할 필요성도 대두되고 있다. 건강기능성 식품소재 개발에 있어 in vitro 소화실험이란 in vitro 조건하에서 인체의 소화조건과 동

*Corresponding author: Sun Jin Hur
Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University
120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel: 82-2-450-0469
Fax: 82-2-450-3726
E-mail: sjhur@konkuk.ac.kr

일한 또는 유사한 환경을 만든 후 건강기능성 식품소재를 소화시켜 그 소재의 소화/흡수, 구조변화 또는 bioavailability 등을 측정하는 것을 말하며, cell culture를 통한 세포에서의 흡수율, 세포독성 또는 bioavailability 측정 등도 넓은 의미에서 보면 in vitro 소화실험의 분류로 볼 수 있다. In vitro 소화실험에 있어 가장 중요한 요소는 인체의 소화 조건과 최대한 동일한 환경을 구현하는 것으로써 소화효소의 조성과 함량, 전해질의 조성과 함량 및 pH 변화, 소화시간 및 온도 등 매우 다양한 요소를 고려해야 한다.

In vitro 소화실험을 수행하는데 있어 가장 크게 고려되어야 할 부분은 in vivo 실험과의 일치성과 연구결과의 명확성이라는 전제하에서 볼 때 다양한 형태의 in vitro 실험의 결과를 바탕으로한 추가적인 in vivo 실험이 필요할 수 있다고 판단된다. 본 글에서는 건강기능성 식품소재 개발을 위한 in vitro 소화실험의 기본적인 원리와 in vitro 소화실험에 있어 고려되어야 할 기본적인 요소들을 살펴보고, in vitro 소화를 이용한 기능성 식품소재의 bioavailability를 측정할 수 있는 선행 연구 결과들을 살펴보고자 한다.

II. 식품의 생체내 소화와 in vitro 소화

소화는 섭취한 음식이 기계적 소화와 화학적 소화 작용을 통해 잘게 분해되어 장관내로 흡수되는 과정을 말한다. 일반적으로 섭취된 음식의 소화는 혀와 치아를 이용한 저작 과정에 의해 시작되며, 이 과정에서 음식이 타액과 혼합되는데 타액에 함유된 amylase과 mucin 같은 소화 효소의 작용에 의해 소화물은 pH, 이온강도 또는 온도의 변화를 겪게 되고 전분의 소화가 시작된다. 구강에서의 물리적인 소화는 식품이 가지고 있는 고유한 특성에 의해 크게 영향을 받을 수 있으며, 저작 작용에 의한 소화물의 크기변화는 향후 소화에 있어 크게 영향을 미칠 수 있다. 구강에서 삼킬 수 있을 정도의 소화가 끝난 소화물은 식도를 통해 위로 들어가게 되고 위 소화액에 함유된 염산 등에 의해 매우 낮은 pH 환경에 놓이게 된다. 위에 도착한 음식물은 연동운동에 의해 단백질 분해효소인 pepsin과 염산 등과 함께 혼합되는데 단백질의 소화가 비로소 시작되며 사람의 경우 1-2시간 정도가 소요된다. 위 소화액과 혼합된 음식물은 chyme 상태가 되어 십이

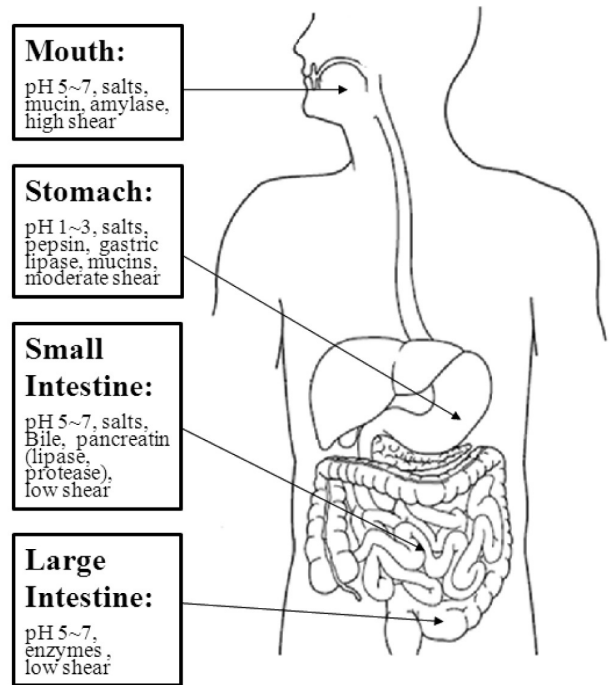


그림 1. 음식물의 소화조건

지장으로 이동하고 이때 췌장에서 분비되는 lipase, pancreatin등과 담낭에서 분비되는 담즙산과 혼합되는데, 약 95% 이상의 음식물이 소장에서 흡수된다. 소장에서 흡수되지 않은 수분과 미네랄 등은 대장에서 흡수되며 대장내에 존재하는 미생물에 의해 비오틴과 비타민 K 등이 생산되어 흡수된다.

인체의 소화가 복잡한 과정을 거치는 만큼 in vitro 소화 과정도 매우 복잡하고 실행하기 어려우며, 연구결과에 대한 해석 또한 어려울 수밖에 없다. 따라서 많은 연구자들은 다양한 in vitro 소화방법들을 개발하고 있으며, 연구자들이 타깃으로 하는 기능성 식품소재의 소화에 관여하는 주요 소화 과정만 선별적으로 선택하여 실험하기도 한다. 예컨대 지방소재의 경우 lipase나 pancreatin 또는 bile salt 만을 이용하여 소장의 조건하에서 실험하고, 탄수화물 소재의 경우 amylase나 pancreatin 만을 이용하여 실험하는 경우 등이 이에 해당한다. 이러한 경우 특정한 소화과정이나 소화효소가 기능성 식품소재의 소화/흡수 또는 bioavailability에 미치는 영향을 좀 더 간략하고 명료하게 해석할 수 있는 장점이 있다. 그러나 특정한 기능성 식품소재의 소화에 직접적으로 관여하지 않는 소화

표 1. 소화기관에서 분비되는 소화액과 그 작용

소화기관	소화액	작용
구강	Lingual lipase	지방의 소화 작용
	Amylase	탄수화물의 소화 작용
	Mucin	음식물의 유동성을 높여 삼키는 작용을 도움
	Lysozyme	박테리아 억제 및 방부 작용
	IgA	박테리아 독소에 대한 방어 작용
	Haptocorrin	위산으로부터 비타민 B ₁₂ 보호 및 흡수 촉진 작용
	Serous glands	수분, 전해질 및 효소 분비 작용
위	Pepsinogen	염산에 의해 pepsin으로 전환되어 단백질 분해 작용
	Hydrochloric acid	단백질 변환, 박테리아와 바이러스 살균 작용
	Intrinsic factor	비타민 B ₁₂ 를 염산으로부터 보호 작용
	Mucin	위산으로부터 위를 보호하는 작용
	Gastrin	염산의 분비를 촉진하는 작용
췌장	Trypsinogen	Trypsin으로 전환되어 단백질을 염기성 아미노산으로 분해하는 작용
	Chymotrypsinogen	Trypsin으로 전환되어 단백질을 방향족 아미노산으로 분해하는 작용
	Carboxypeptidase	단백질을 말단 아미노산으로 분해하는 작용
	Elastase	엘라스틴을 분해하는 작용
	Pancreatic lipase	중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하는 작용
	Cholesterol esterase	콜레스테롤을 분해하는 작용
	Phospholipase	인지질을 분해하는 작용
	Nuclease	핵산을 분해하는 작용
	Pancreatic amylase	탄수화물 (전분, 글리코겐, 셀룰로오스)을 분해하는 작용
	Secretin	위 소화물의 산도가 높을 때 분비되어 pH 조절, 염산의 분비 조절 및 삼투압 조절
췌장	Cholecystokinin	음식물의 단백질(아미노산)과 지방(지방산)에 반응하여 분비되며, 췌장 소화액의 분비 조절 및 포만감 조절 작용
	Gastric inhibitory peptide	음식물의 탄수화물, 단백질 및 지방산의 높은 함량에 반응하여 분비되며, 소화기관의 공복상태를 감소시키는 작용
	Somatostatin	췌장액의 생성을 억제하는 작용
	Secretin	위 소화물의 산도가 높을 때 분비되어 pH 조절, 염산의 분비 조절 및 삼투압 조절
소장	Cholecystokinin	담낭의 수축을 촉진, 장의 활동 감소 및 공복상태를 감소시키는 작용
	Gastric inhibitory peptide	장의 운동성을 감소시키는 작용
	Motilin	장의 운동성을 증가시키는 작용
	Somatostatin	내분비 계통 조절 작용
	Sucrase	자당을 과당이나 포도당으로 가수분해하는 작용
	Lactase	유당을 분해하는 작용
	Maltase	이당류 맥아당을 분해하는 작용

요인 (pH 변화, 이온강도, 다른 식품소재에 관여하는 소화효소 등)이 간접적으로 미칠 수 있는 부분에 관해서는 해석이 불가능하다는 단점이 있을 수 있다. 이와 반대로

구강, 위, 소장 및 대장의 모든 소화 효소를 이용하여 소화과정을 거치는 경우 어떠한 요인이 기능성 식품소재의 소화/흡수나 bioavailability에 영향을 주었는지 정확히 판

단하기 어려울 수 있다. 따라서 *in vitro* 소화실험은 연구의 목적과 시료의 특성에 맞추어 변경할 필요가 있으며, 반대로 동일한 시료에 다른 *in vitro* 소화방법을 적용하여 서로 상이한 연구결과가 나올 수 있는 만큼 표준화된 *in vitro* 소화실험 방법을 개발할 필요성도 있을 것이다.

저자는 선행 연구에서 최근 10여 년간 전 세계의 식품학계에서 수행된 *in vitro* 소화관련 실험 동향을 조사하였다. 연구 조사 결과 *in vitro* 소화실험과 관련된 연구는 제약분야에서 처음 시작되어 식품분야로 점차 확대되고 있는 것으로 나타났으며, *in vitro* 소화 관련 실험이 가장 폭넓게 이용된 식품은 전분, 차, 쌀, 빵 등 식물관련 식품의 연구이며 약 45% 정도를 차지하는 것으로 나타났다. 다음으로 식육과 관련된 연구가 18% 정도를 차지하였고, 낙농식품 (9%), 해양식품 (9%) 및 유화물 (9%) 등의 순으로 *in vitro* 실험을 이용하고 있는 것으로 조사되었다. 이러한 조사 결과는 대부분의 식품연구 분야에서 *in vitro* 소화실험이 이용되고 있으며, 식품의 bioavailability를 빠르게 측정하는 효과적인 방법이 될 수 있다는 것을 의미한다. 또한 *in vitro* 소화 실험의 형태는 실험의 특성에 따라 매우 다양하여, 보편적인 방법 또는 표준방법은 존재하지 않은 것으로 조사되었으며, 시료의 특성이나 실험의 목적에 따라 사용되는 소화 효소나 전해질 등은 매우 다양한 것으로 나타났다. *In vitro* 소화실험에 있어서 가장 보편적으로 사용되는 소화액은 pepsin, pancreatin, trypsin, chymotrypsin, peptidase, α -amylase, lipase,

mucin과 bile salt인 것으로 조사되었다. *In vitro* 소화실험에 이용되는 소화효소나 소화액 등은 돼지, 쥐와 같은 잡식성 동물에게서 추출/획득한 것이 대부분이며, 사람에게서 획득한 소화효소를 이용한 *in vitro* 소화 실험도 일부 보고 되고 있다. 그러나 다양한 *in vitro* 소화실험 방법이 개발 및 응용되고 있지만, 소화온도는 거의 대부분이 37°C 생리적인을 적용하고 있는 것으로 나타났다.

III. *In vitro* 소화실험을 위해 고려해야할 조건

In vitro 소화실험은 복잡한 인체의 소화조건을 시뮬레이션 하는 과정인 만큼 고려해야할 수많은 조건이 있는데, 선행 연구를 통하여 *in vitro* 소화모델 개발을 위한 조건을 정리해보면 다음과 같다.

pH 변화

섭취한 음식물은 소화기내에서 소화되는 동안 다양한 pH의 변화를 겪게 된다. 구강은 약산성의 pH 조건을 나타내며, (5~7), 소장에서는 염산의 분비에 의해 강산성 (1~3)으로 pH가 급격하게 감소하였다가 십이지장에 도달하여 pH가 높은 담즙산 또는 중탄산염의 영향으로 pH가 약산성 (5~7) 수준으로 회복된다. 소화기관내의 pH 수준은 섭취한 음식물이 가지는 고유의 pH에 의해 일시적으로 변화가 일어나지만 소화가 진행되면서 다시 원래의

표 2. *In vitro* 소화실험 수행을 위해 고려해야 할 조건

조건	<i>In vitro</i> 소화를 위해 최소한 고려해야할 항목
시료의 성질	탄수화물 시료 α -amylase와 β -amylase 및 mucin 첨가 또는 함량 증가
	지방질 시료 Lipase, pancreatin 및 bile salt 첨가 또는 함량 증가
	단백질 시료 Pepsin 및 pancreatin 첨가 또는 함량 증가
	무기질 시료 함께 이용되는 시료의 성질 (탄수화물, 지방 및 단백질) 에 맞게 소화액 첨가 또는 함량 증가
시료의 사이즈	사이즈가 커질수록 소화시간을 증가
시료의 량	시료의 량이 많아질수록 소화시간을 증가
소화시간 설정	시료의 사이즈가 클수록 시료의 함량이 많을수록 소화시간을 증가, 일반적인 소화시간은 구강 5분 이내, 위 2시간~4시간 내외, 대장 2시간~6시간 내외로 설정
소화 온도 설정	대부분 37°C로 설정, 단 구강에서의 소화는 이보다 온도가 낮을 수 있다.
소화효소의 함량	시료의 사이즈가 클수록 시료의 함량이 많을수록 소화효소의 함량을 비례하여 증가
pH	구강은 중성 또는 약산성 (pH 5~7), 위는 강산성 (pH 1~3), 소장과 대장은 약산성 또는 중성 (pH 5~7) 조건으로 설정

pH 수준으로 회복이 된다. In vitro 소화모델에 있어 pH의 변화는 매우 중요한 요소가 될 수 있는데, 이러한 이유는 소화기관 내에서 분비되는 소화효소 또는 소화액의 작용이 pH와 밀접한 관련이 있기 때문이다. 예컨대, 단백질 분해효소인 펩신의 경우 위에서 펩시노겐으로 분비된 후 염산에 의해 펩신으로 변환되어 단백질의 소화에 작용하게 된다. 그러므로 위내의 pH가 상승하게 되면 단백질의 소화율이 감소하는 결과를 가져온다. 따라서 in vitro 소화 실험에서 위의 소화조건을 설정한다면 pH는 당연히 낮게 조절해야만 한다. 탄수화물의 분해 효소인 α -amylase와 지방분해 효소인 lipase 또한 그 효소가 작용하는 소화기관의 고유 pH 조건에서 효과적으로 작용할 수 있기 때문에 음식물의 소화에서 pH의 변화는 매우 중요한 요소가 된다. 지방분해 효소인 pancreatic lipase의 경우 중성 pH 또는 pH 8.5 수준에서 가장 높은 activity를 나타낸다. 중성지방의 분해에 의한 유리지방산의 생성은 pKa 상수와 관련된 pH 변화에 크게 영향을 받는데, 유리지방산의 pKa 상수는 약 4.7~4.9 수준을 나타내며 이는 체인사슬의 길이에 영향을 받는다. 탄화수소 사슬의 길이가 증가할수록 유리지방산의 pKa 상수 또한 증가하며, 유리지방산은 중성 pH 조건에서 이온화가 많이 일어난다. 따라서 중성지방의 in vitro 소화를 위한 pH 조건은 중성이 가장 적절할 것이다. Pectin과 alginate와 같은 음이온 다당류의 pKa 상수는 약 3.5이며, 위와 같은 낮은 pH 조건에서는 낮은 음전하를 가진다. 그러나 소장에서 중성의 pH에 도달하면 강한 음전하를 가지게 된다. 이와 반대로 키토산과 같은 양이온 다당류는 pKa 상수가 약 6.5 정도로 낮은 pH 환경에서 높은 양전하를 가지게 되고 중성에서는 낮은 양전하를 가지게 된다. 그러므로 낮은 pH 조건에서 형성된 다당류와 단백질간의 정전기적 복합체는 pH가 등전점 이상 상승할 때 서로 분리되게 되는데 이러한 이유는 단백질 등전점에서 정전기적인 결합력이 약화되기 때문이다. 이와 같이 소화기관에서 pH에 의한 전하의 변화는 음식물의 정전기적 결합과 분해에 중요한 작용을 하기 때문에 음식물의 소화에서 주요한 요인이 된다. 탄수화물 분해효소인 α -amylase의 경우 pH 6.7~7 수준에서 활성이 가장 높으며, β -amylase의 경우 pH 4~4 수준에서 활성이 가장 높게 나타내고, γ -amylase의 경우 pH 3 이하의 조건에서 높은 활성을 나타내므로 이러한 효소를 사용하여 in vitro 소화실험을 수행할 경우 효소에 맞

는 적절한 pH를 조절해 주어야 할 것이다. 예컨대 α -amylase의 경우 pH가 낮은 위에서는 활성이 감소하게 되지만, γ -amylase의 경우 높은 활성을 유지한다. 즉 in vitro 소화모델을 적용할 때 각각의 소화기관과 효소가 가지는 고유한 pH를 적용하고 유지시켜 주는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다.

소화 효소

In vitro 소화실험에 있어 가장 중요한 요소 중의 하나는 소화효소이다. 지방질 시료의 in vitro 소화실험에서는 pancreatic lipase를 가장 널리 이용하고 있는데 이러한 이유는 화학적으로 구조가 잘 밝혀져 있을 뿐만 아니라 실험 간의 변이가 적은 장점이 있기 때문이다. 대표적인 지방분해 효소인 lipase는 gastric lipase와 pancreatic lipase이며 지방의 표면에 흡수되어 중성지방을 유리지방산으로 분해하는 작용을 하므로 유리지방산의 함량을 측정하는 방법 등을 통해 지방의 소화율을 측정하는 연구에서 가장 널리 이용되고 있는 소화효소이다. Pancreatic lipase의 작용은 co-lipase, 인지질, 담즙산 및 칼슘의 영향을 크게 받는다. 특히 칼슘은 지방의 분해를 촉진시키는 작용을 나타내는데 지방기질과 1:1로 결합하며, 이온 복합체 형성에 의해 유리 지방산과 반응하므로 지방구에서 유리지방산을 분리하는 작용을 한다. 그러므로 지방질 시료의 실험에 있어서 칼슘과 같은 전해질의 첨가는 반드시 필요하지만 많은 in vitro 실험에서 이러한 물질에 대한 고려가 부족한 것으로 판단된다. 담즙산과 lipase는 섭취하는 지방의 함량에 반응하여 분비되며, 농도는 5~15mM 수준으로 이는 음식을 섭취한 후 시간에 크게 영향을 받으며, 지방의 가수분해 비율은 lipase와 담즙산의 함량에 크게 영향을 받는다. 따라서 실험 시료내에 지방의 함유량이 높아질수록 지방분해 효소의 함량도 비례하여 증가시키는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

주요 단백질 분해효소는 위에서 분비되는 pepsinogen과 소장에서 분비되는 trypsin과 chymotrypsin 등이 있으며, 단백질을 아미노산으로 분해하는 작용을 담당한다. 평균 성인 한사람의 1일 단백질 섭취량을 75g으로 보았을 때 분비되는 pepsinogen/pepsin의 함량은 10mg 정도 수준이므로 pepsin과 단백질은 1:7500 정도의 비율로 조절하는 것이 바람직하다고 할 수 있다. 선행연구 (Abdel-

Aal, 2008)에서 3가지 단백질 분해효소 (peptidase, trypsin 그리고 chymotrypsin)를 이용하여 소화시킬 경우 2가지 효소 (pepsin과 pancreatin)를 이용하여 소화시킨 경우에 비해 단백질 소화율이 약 39-66% 높은 것으로 나타났다. 따라서 3가지 효소를 이용하는 것이 in vivo 실험에 더욱 근접한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

Amylase는 구강과 위 또는 채장에서 분비되어 전분을 올리고당이나 단당류로 분해하는 작용을 하며, 식물성 소재의 in vitro 소화실험에 가장 많이 이용되는 효소이다. 인체에서 분비되는 대부분의 amylase는 α -amylase이며, 칼슘 금속효소로서 칼슘이 부족할 때 그 활성이 감소하는 특징을 가진다. α -amylase는 특히 알파결합 다당류, 전분 또는 글리코겐의 가수분해에 작용하는 효소인데, 위에서는 낮은 pH에 의해 활성이 감소하며, 염화물이 존재할 때 활성이 가장 높고, 요오드 화합물에서 활성이 감소되며, 황산이나 인산염이 존재할 때 활성이 매우 낮아지는 특징을 가진다. 음식물의 소화 과정에서 식품소재의 특정 성분으로 인해 α -amylase의 활성이 감소하게 되면 인체는 α -amylase의 분비를 증가시키는 반응을 일으키게 된다. 따라서 특정한 전해질 성분이 기능성 식품소재에 함유되어 있을 경우 α -amylase의 첨가량은 증가되어야 하며, 기능성 식품소재 고유의 pH가 낮을 경우 또한 α -amylase의 첨가량을 증가시키거나 pH를 중성으로 조절해야 할 것이다.

온도

In vitro 실험 조건에 있어 가장 단순한 조건은 온도로 할 수 있다. 정상적인 인체의 온도는 37°C이므로 대부분의 in vitro 소화 실험에 있어서 공통적으로 적용되는 온도이다. 음식물이 소화되는데 작용하는 모든 효소나 화학적 작용은 37°C 생리적으로서 최적으로 작용하고 있으므로, in vitro 소화실험에서 역시 37°C \pm 2의 조건에서 실험을 수행하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

소화 시간

In vitro 소화실험에 있어 가장 중요한 요소 중의 하나가 바로 소화시간이라고 할 수 있으며, 기능성 식품소재의 소화/흡수 또는 bioavailability는 소화시간에 크게 영

향을 받을 수 있다. In vitro 소화모델 개발을 위한 선행 연구에서 Christensen 등 (1985)과 Degen과 Philips (1996)는 가장 적절한 in vitro 소화시간으로 구강 5분, 위 2시간, 소장 및 대장에서 각각 2시간을 설정하였다. 그러나 음식물의 특성과 함량에 따라서 이보다 짧은 시간에 소화될 수 있고 이 보다 많은 시간이 요구될 수 있으며, 적절한 in vitro 소화시간이 설정되지 못하면 기능성 소재의 bioavailability가 없는 것으로 나타나거나 또는 이 화학적인 특성이 in vivo 조건과 달라질 가능성이 존재한다. 따라서 각 in vitro 소화 시간대별로 기능성 식품소재의 소화/흡수 또는 bioavailability를 측정 후 최적의 소화시간을 설정하는 선행연구가 필요할 것으로 판단된다. 인체의 여러 단계 소화 과정 중 구강에서의 저작활동을 제외한 다른 소화기관에 작용하는 근육은 불수의근이므로 인간의 의지와 상관없이 소화과정을 진행하게 된다. 따라서 위, 소장과 대장에서의 소화시간은 결국 섭취한 음식물의 양, 농도 또는 성분함량의 특성에 의해 결정된다. 그러나 구강에서의 소화는 음식물의 이화학적 특성뿐만 아니라 인간의 의지에 따라 그 시간이 달라질 수 있으며, 대부분은 하나의 음식을 저작하는 시간이 1~2분을 넘지 않는다. 특히나 액상 음식의 경우 구강내에 머무르는 시간이 매우 짧기 때문에 타액에서 분비되는 α -amylase의 영향은 제한적일 수 있다. 그러므로 액상시료를 이용한 in vitro 소화실험의 경우는 고체 시료와 달리 타액의 α -amylase 함량을 낮추어야 할 뿐만 아니라 in vitro 소화시간도 짧게 설정하는 것이 바람직 할 것이다. 앞서 설명한 이러한 in vitro 소화시간 설정은 누구나 어렵지 않게 예측할 수 있는 실험조건이지만 많은 연구에서 이러한 부분을 간과하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 구강 5분, 위 2시간, 소장 및 대장에서 각각 2시간을 기준시간으로 하여 실험 시료의 특징에 따른 다양한 시간의 소화조건으로 실험을 수행하여 최적의 조건을 설정하는 과정이 필요하다.

시료의 함량

In vitro 소화실험에 있어 중요하게 고려해야 할 부분이 바로 시료의 함량이며, 시료의 함량을 설정하는 것은 소화효소와 소화시간을 고려하는 것과 일치되어야 한다. 즉 in vitro 소화실험을 위한 시료의 함량이 높을수록 소화시간과 소화액의 함량은 함께 증가되어야 한다. 왜냐

하면 인체의 소화기관 또한 섭취한 음식물의 함량증가에 따라 소화액의 함량이 증가하기 때문이다. 그러나 시료의 함량에 따른 소화액의 함량을 설정하는 것은 매우 어려운 일이므로, 소화시간과 소화액의 첨가량을 점차 증가시켜, 소화물의 이화학적 특성 변화가 일어나는 시점과 이화학적인 변화가 정지되는 시점을 찾은 다음 최적의 소화액과 소화시간을 결정하는 과정을 필요로 한다.

IV. In vitro human digestion 적용

현재까지 많은 연구자들이 다양한 in vitro 소화실험을 수행해오고 있으나, 수행방법에 따라 크게 single-step model과 multi-step model로 구분할 수 있다. 먼저 single-step은 구강, 위, 소장 및 대장 등 여러 단계의 소화과정 중 특정 소화기관과 특정 소화 효소만을 선택하여 실험하는 것으로 세포배양 실험이나 pH-stat 방법이 여기에 해당될 수 있다. 세포배양을 통한 in vitro 소화 실험에서 가장 널리 사용되는 cell line 중에 하나는 Caco-2 cell 인데, Caco-2 cell에 기능성 식품소재를 처리하여 배양하면서 세포 흡수율이나 bioavailability를 측정하는 방법 등이 single-step model에 해당된다. pH-stat 방법은

지방의 소화를 측정하는 방법 중의 하나로써 중성지방이 유리지방산으로 분해될 때 유리지방산의 함량을 측정하는 것이다. 그러므로 pH-stat 방법으로 지방의 소화정도를 측정할 경우가 대표적인 single-step model이 될 수 있다. Multi-step 방법은 두 개 혹은 그 이상의 소화단계를 복합적으로 적용하는 소화방법으로 구강, 위, 소장 및 대장의 소화를 동시에 진행하면서 실험하는 방법이 여기에 해당될 수 있다.

그림 2 에서 보는 것처럼 multi-step model 방법은 실험 시료를 타액과 혼합하여 구강소화를 시키고, 다시 여기에 위 소화액을 첨가하여 소화를 시킨 후 다시 소장액

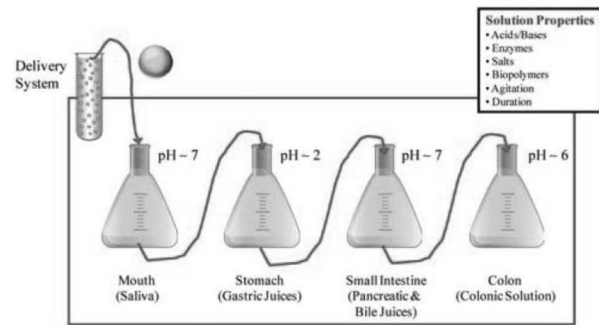


그림 2. Multi-step 소화 모델의 예 (McClements and Li, 2010)

표 3. In vitro human digestion 소화액 조성

	Saliva	Gastric juice	Duodenal juice	Bile juice
Inorganic solution	10 ml KCl 89.6 g/l	15.7 ml NaCl 175.3 g/l	40 ml NaCl 175.3 g/l	30 ml NaCl 175.3 g/l
	10 ml KSCN 20 g/l	3.0 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l	40 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l	68.3 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l
	10 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/l	9.2 ml KCl 89.6 g/l	10 ml KH ₂ PO ₄ 8 g/l	4.2 ml KCl 89.6 g/l
	10 ml NaSO ₄ 57 g/l	18 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l	6.3 ml KCl 89.6 g/l	150 μl HCl 37% g/g
	1.7 ml NaCl 175.3 g/l	10 ml NH ₄ Cl 30.6 g/l	10 ml MgCl ₂ 5 g/l	
Organic solution	20 ml NaHCO ₃ 84.7 g/l	6.5 ml HCl 37% g/g	180 μl HCl 37% g/g	
	8 ml urea 25 g/l	10 ml glucose 65 g/l	4 ml urea 25 g/l	10 ml urea 25 g/l
		10 ml glucuronic acid 2 g/l		
Add to mixture organic + inorganic solution		3.4 ml urea 25 g/l		
		10 ml glucoseamine hydrochloride 33 g/l		
	290 mg α-amylase	1 g BSA	9 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l	10 ml CaCl ₂ · 2H ₂ O 22.2 g/l
15 mg uric acid	2.5 g pepsin	1 g BSA	1.8 g BSA	
25 mg mucin	3 g mucin	9 g pancreatin	30 g bile	
pH	6.8 ± 0.2	1.30 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

과 담즙액을 넣어 소장 조건으로 소화를 시킨 후 최종적으로 대장 소화액을 첨가하여 소화시키는 과정이다. 이러한 multi-step model의 장점은 각각의 소화단계별로 기능성 식품소재의 bioavailability를 측정할 수 있을뿐만 아니라 인체의 소화조건과 매우 유사하다는 장점이 있다. 그러나 multi-step model의 단점으로는 in vitro 소화실험에 적용되는 소화액이나 소화단계가 복잡하여 어떠한 요소(pH, 소화효소, 전해질 등)가 bioavailability에 영향을 주었는지 정확히 해석하기 어려운 단점이 있을 수 있다. 따라서 시료의 특성과 시험을 목적에 맞는 in vitro 소화방법의 선택이 필요할 것으로 판단된다. 저자는 다년간 in vitro 소화실험을 수행한 경험과 선행연구를 통하여 인체의 소화효소와 가장 유사한 in vitro 소화액 조성비를 표 3과 같이 설정한 바 있다. In vitro 소화액은 무기물과 유기물 용액 및 효소로 구성하였으며 타액, 위액, 십이지장액 및 담즙액으로 각각 구성하였으며, in vitro 소화방법은 multi-step 방법을 이용하여 구강에서 소장까지 흡수되는 과정을 시뮬레이션 하면서 각 소화단계별 기능성 식품소재의 소화/흡수 또는 bioavailability를 측정하였다.

1) 시약제조

타액 (Saliva), 위액 (Gastric juice), 소장액 (Duodenal juice) 및 담즙액 (Bile juice)을 제조하는 절차는 모두 동일하다

1. 표에 나와 있는 모든 시약은 1 l 씩 각각 제조한다 (효소 제외)
2. 시약 A: inorganic solution 제조를 위해 표에 표기된 시약을 함량별로 모두 혼합한다.
3. 시약 B: organic solution 제조를 위해 표에 표기된 시약을 함량별로 모두 혼합한다.
4. 시약 C: enzyme을 표에 표기된 함량으로 모두 혼합한다.
5. 시약 A, B 그리고 C를 모두 혼합한 다음 증류수를 이용하여 1 l 로 맞춘다.
6. HCl과 NaOH를 이용하여 타액, 위액, 소장액 및 담즙액의 pH를 6.8, 1.3, 8.1 그리고 8.2로 각각 맞춘다.

2) 실험 순서

- ① 200 ml 삼각 플라스크에 시료 5g 또는 5 ml에 타액 6 ml를 첨가하고 마그네틱바를 넣은 후 파라핀 필름으로 플라스크 입구를 밀봉한다.
- ② 시료를 37°C로 셋팅된 shaking water bath에서 천천히 shaking 시키면서 5분간 소화시킨다.
- ③ 시료에 위액 12 ml를 넣어 잘 혼합하고 밀봉한 다음 shaking water bath에서 천천히 shaking 시키면서 2시간 소화시킨다. 이때 pH가 3 이상으로 증가하면 HCl을 이용하여 pH를 3 이하로 조절한다.
- ④ 시료에 소장액 12 ml와 담즙액 6 ml 그리고 중탄산염 2 ml를 넣어 잘 혼합하고 밀봉한 다음 shaking water bath에서 천천히 shaking 시키면서 2시간 소화시킨다. 이때 pH가 5 이하 이거나 8 이상이 되면 HCl과 NaOH를 이용하여 약산성 또는 약 알칼리 수준이 될 수 있게 조절한다.

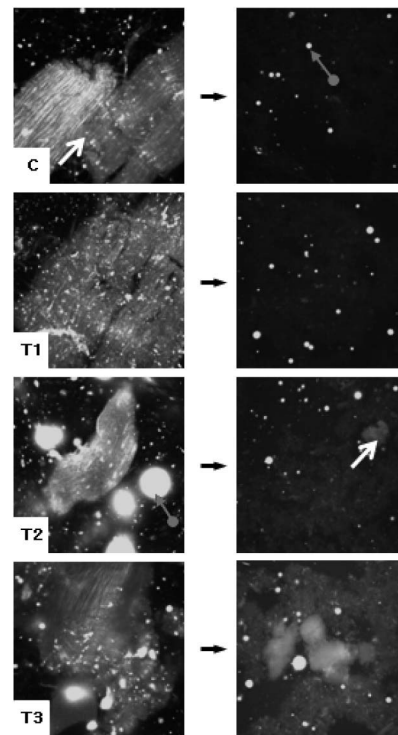


그림 3. 다양한 biopolymer의 첨가가 우유 지방의 in vitro 소화에 미치는 효능 (Hur 등, 2009^b)

- ⑤ 소화가 끝난 시료는 필요에 따라 원심분리 하여 상층을 버리고 하층을 이용하여 분석한다. 소화전과 소화 후 시료의 이화화적인 변화를 측정하였다.

그림 3은 다양한 biopolymer의 첨가가 우유 지방의 in vitro 소화를 억제시키는 효능을 측정된 결과이다. 실험을 위하여 90% 우유과 9.5%의 지방에 0.5%의 biopolymer (cellulose, chitosan 및 pectin)을 첨가하여 patty를 각각 제조한 후 in vitro 조건하에서 소화시키면서, 소화 전후 지방의 in vitro 소화 정도를 측정하였다. In vitro 조건하에서 지방의 소화 정도를 측정하기 위하여 Nile red로 지방만을 염색한 후 confocal microscope를 이용하여 지방의 성상을 측정하였다. 그림에서 초록색은 염색된 지방을 나타내며, 초록색이 상대적으로 많다는 것은 지방이 소화 또는 분해되지 않았다는 것을 의미한다. 본 연구결과 셀룰로오스 (T1)의 첨가는 우유 지방의 소화를 억제시키는 효과가 없는 것으로 나타났으며, 키토산 (T2)과 펙틴 (T3)의 첨가는 우유 지방의 생체내 소화를 억제시키는 것으로 나타났다. 특히 펙틴은 in vitro 조건하에서 우유 지방의 분해 및 흡수를 억제시키는 효능이 매우 큰 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 유리지방산의 함량과 지방산패도 결과 또한 유사한 경향을 나타내었다. 이와 같이 in vitro 소화 실험을 이용하여 biopolymers가 지방의 소화억제에 미치는 효능을 현미경학적인 방법으로 검증할 수 있다.

그림 4는 식물성 지방으로 제조한 유화물의 사이즈와 유화제의 종류가 in vitro 조건하에서 소화되는 정도에 미치는 영향을 confocal 현미경을 이용하여 현미경학적인

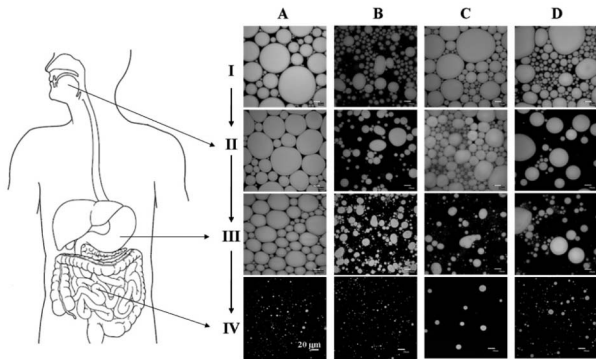


그림 4. 다양한 유화제가 지방의 in vitro 소화에 미치는 효능 (Hur 등, 2009A)

방법으로 구명한 실험이다. 실험을 위하여 1w% 유화제 (Tween 20, lysolecithin, caseinate 및 whey protein)를 이용하여 지방 3% 유화물을 제조한 후 in vitro 조건하에서 소화시키면서, 각 소화단계별 지방의 in vitro 소화 정도를 측정하였다. In vitro 조건하에서 지방의 소화 정도를 측정하기 위하여 Nile red로 지방만을 염색한 후 confocal microscope를 이용하여 지방의 성상을 측정하였다. 본 실험결과 계란의 라이소레시틴을 이용하여 제조한 유화물이 가장 빨리 소화되었고, Tween 20을 이용하여 제조한 지방유화물의 소화가 가장 늦게 이루어지는 것을 발견하였다. 유화물은 소장단계에서 가장 크게 소화되었으며, 유화제의 특성에 따른 초기 유화물의 사이즈가 지방의 소화에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다.

그림 6은 메밀 추출물을 in vitro 조건하에서 소화시킨 후 메밀 추출물이 쥐의 뇌에 존재하는 지방의 산화에 미치는 효능을 측정하였다. 실험을 위하여 쥐의 뇌를 적출한 후 균질화 하고 원심분리 하여 지방층을 취한 다음 메밀 추출물을 in vitro 조건하에서 소화한 후 그 소화물을 쥐의 뇌 지방층에 처리하여 메밀 추출 소화물의 항산화 효능을 측정하였다 (그림 5).

연구결과 메밀 추출물의 항산화 효능은 in vitro 소화에 의해 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 메밀 추출물이 in vitro 소화에 의해 쥐의 뇌에 존재하는 지방의 산화를 감소시키는 효능을 가지는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 메밀 추출물에 다량 함유되어 있는 rutin이 in vitro 소화에 의해 항산화 효능이 더 활발한 quercetin으로 전환되었기 때문인 것으로 나타났다 (그림 6). 본 연구에서 나타났듯이 in vitro 소화 방법을 이용하여 기능성 식품소재의

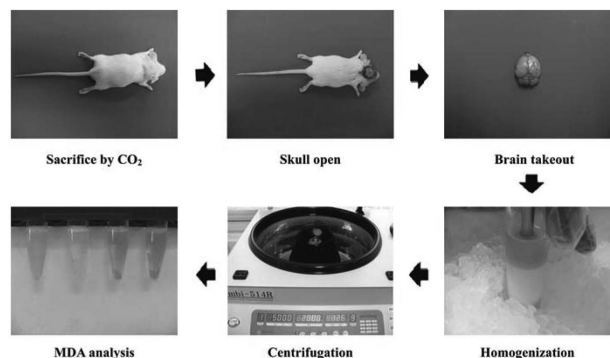


그림 5. 실험쥐의 뇌에서 지방 추출 과정 (Hur 등, 2011)

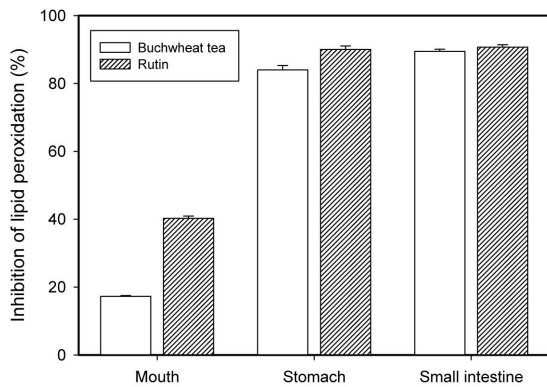


그림 6. In vitro 소화된 메밀 추출물의 쥐 뇌지방에 대한 항산화 효능 (Hur 등, 2011)

생리활성 효능을 빠르게 스크리닝 할 수 있으며, 이러한 in vitro 소화 실험의 결과는 동물실험이나 인체적용 시험 등의 추가 연구를 위한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

V. 결론

본 글에서는 건강기능 식품소재 개발을 위한 in vitro 소화실험의 기본적인 원리와 in vitro 소화모델 개발을 위해 고려해야할 여러 가지 요인들에 관해 살펴보았다. 비록 많은 연구자들이 기능성 식품소재의 개발 또는 식품의 bioavailability를 측정하기 위하여 in vitro 소화모델을 이용하고 있지만 그 정확성과 효율성에 대한 논란이 있는 것이 사실이며, 국내에는 건강기능성 식품소재 개발을 위한 in vitro 소화모델의 연구 활용도가 외국에 비해 매우 낮은 실정이다. 그러나 건강 기능성 식품소재의 개발을 위해서는 오랜 시간과 많은 비용이 요구되기 때문에 초기 연구에서 in vitro 소화방법을 적용하는 것은 건강기능 식품소재의 효능을 빠르게 검증 하므로써 연구의 효율성을 높이는 효과적인 방법이 될 수 있을 것이다.

인체의 소화과정은 매우 복잡하고 정교하기 때문에 정확한 in vitro 소화모델을 개발하기 위해서는 인체의 소화조건을 보다 정확하게 시뮬레이션 할 수 있는 소화액 조성 및 소화방법에 대한 연구가 추가되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Abdel-Aal ESM. Effect of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT-Food Science and Technology*. 41: 1282-1288 (2008).
2. Christensen FN, Davis SS, Hardy JG, Taylor MJ, Whalley DR, Wilson CG. The use of gamma scintigraphy to follow the gastrointestinal transit of pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 37: 91-95.
3. Degen LP, Philips SF. Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men. *Gut*. 39: 299-305.
4. Hur SJ, Park SJ, Jeong CH. Effect of buckwheat extract on the antioxidant activity of lipid in mouse brain and its structural change during in vitro human digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 10699-1074 (2011)
5. Hur SJ, Decker EA, McClements DJ. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*. 114: 253-262 (2009^A).
6. Hur SJ, Lim BO, Park GB, Joo ST. Effect of various fiber additions on lipid digestion during in vitro digestion of beef patties. *Journal of Food Science*. 74: C653-C657 (2009^B).
7. McClements DJ, Li Y. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based system. *Food & Function*. 1: 32-59 (2010).