

## 우리밀의 면역증강능 규명

최 면<sup>†</sup> · 박재봉\* · 김현숙\*\*

강원대학교 축산가공학과

\*한림대학교 의과대학 생화학교실

\*\*강원대학교 한국영양과학연구소

## Screening of Immune-Enhancing Substance(s) from Korean Wheats

Myeon Choe<sup>†</sup>, Jae-Bong Park\* and Hyun-Sook Kim\*\*

Dept. of Animal Products Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

\*College of Medicine, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

\*\*Institute of Korea Nutritional Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### Abstract

The purpose of this study was to identify excellent immune-enhancing substance from Korean wheats (Eunpa, Gueru, Alchan, Topdong, Suwon 267, Gobun) compared with imported ones (Australian standard white, ASW; Dark northern spring, DNS). Phagocytic activities of PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) and EA (ethanol-acetic acid) extracts from the wheats were determined using mouse macrophage J774 cell line. In order to set the optimal experimental condition up, the cultured cells were tested in varying experimental conditions. About two to five times higher phagocytic activity was shown in EA extract of Korean wheats compared to that of imported wheats. PBS extracts of wheats did not show increased phagocytic activity compared to control that did not add any extract. The EA extract of Gobun wheat showed the highest phagocytic activity. From the experiment we found that the optimal experimental condition was shown in two hours of reaction time and 0.05 mg amount of EA extract added to J774 cells.

**Key words:** Korean wheat, phagocytic activity, immune-enhancing, J774 macrophage

### 서 론

밀(*Triticum aestivum*)은 쌀 다음으로 많이 먹는 제2의 식량으로 소비량은 꾸준히 증가하고 있다(1). 그러나 밀의 자급률은 75년 5.7%, 88년 0.1%, 91년에는 0.012%로 점차 감소하여 우리는 중요한 식량자원인 밀 438만톤을 전량 외국에서 수입하고 있다(2).

우리밀은 수입밀과는 생육 환경이 달라 독특한 특성을 가지고 있다. 일반적 특징으로는 파종에서 수확까지 노동력이 아주 덜 드는 곡물이고 재배가 쉬우며, 재배 범위가 넓다. 유전적 특징으로는 세계에서 생육기간이 가장 짧은 조숙성이며, 겨울철 추위에 가장 잘 견디어 영하 14°C 이상이면 재배 가능하다(2). 따라서 독특한 생육 환경에서 생산되는 우리밀만이 가지는 생리적 기능성 물질을 체계적으로 탐색하고 이들 성분의 본질과 효능을 확인하는 연구는 여러 가지로 의미가 있다고 판단된다. 또한 우리밀이 특수한 건강 기능성 물질이 함유되어 있다는 것이 과학적으로 입증되면 우리밀의 생산 확대와 이용도 증가에

도 크게 기여할 수 있다고 생각한다.

한편, 지금까지 발표된 우리밀에 관한 연구는 품종별 이화학적, 물리적 특성 및 성분조성(3-5), 그리고 가공적성(6,7)에 대한 것이 대부분으로 우리밀의 특수 성분에 대한 과학적인 생리 기능성 연구는 전무한 실정이다. 생리 기능에 대한 연구는 Ham 등(8)이 산채 및 해조분말을 첨가한 우리밀의 항돌연변이원성 및 암세포 성장억제 효과에 대하여 보고한 것이 전부이나 순수한 우리밀의 생리 활성에 대한 연구는 아니라고 판단된다.

이에 본 연구에서는 우리밀로부터 수용성 및 지용성 성분들을 추출하여 대식세포의 식작용 활성 증강효과를 수입밀과 비교함으로써 우리밀의 면역 증강능을 확인하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 추출물의 제조

본 연구에 사용된 밀은 우리밀 6종(은파밀, 그루밀, 알

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

찬밀, 탑동밀, 고분밀, 수원 267호)과 수입밀 2종(Australian standard white, ASW; Dark northern spring, DNS)으로써 원맥을 농촌진흥청 작물시험장에서 분양받아 밀가루를 직접 제분하여 사용하였다.

밀의 수용성 성분을 추출하기 위해 각각의 밀가루 50 g에 PBS(pH 7.4) 용액 100 mL를 가하여 4°C, 300 rpm에서 12시간 동안 교반한 후 8,000 rpm의 속도로 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 초고속원심분리기로 4°C에서 50,000 rpm로 원심분리한 후 PBS 추출물을 얻었다. 분리된 PBS 추출물은 대식세포의 식작용 활성 측정을 위해 0.45 µm membrane filter로 여과하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

밀의 지용성 성분은 각각의 밀가루 200 g에 ethanol:acetic acid (100:1, EA) 용액 400 mL를 넣은 후 PBS 추출물과 동일한 방법으로 제조하였다. 분리된 EA 추출물은 용매에 의한 세포독성을 제거하기 위하여 질소 가스를 주입하면서 감압농축기로 건조시킨 후 냉동 보관하면서 식작용 활성 측정에 사용하였다.

#### 대식세포 활성의 최적 조건 결정

실험 전반을 원활히 수행하기 위하여 실험의 최적 조건을 확립하는 것이 필요하였으므로 대식세포의 식작용 활성 증강효과가 가장 크다고 판단되는 추출물의 농도와 배양 시간에 따른 식작용 활성을 측정하였다.

#### 추출물의 최적 농도 결정

추출물의 최종 농도가 0.5 mg, 0.05 mg, 0.005 mg, 0.0005 mg, 0.00005 mg이 되도록 에탄올로 희석하여 각각의 배양 접시에 첨가한 후 농도에 따른 대식세포의 식작용 활성이 극대화되는 농도를 결정하였다.

밀 추출물 첨가후 반응 시간에 따른 대식세포 수의 변화 밀 추출물이 첨가된 후 각 실험군별로 대식세포의 증가 정도가 서로 다르면 안되므로 2~48시간 동안 대식세포 수의 변화 추이를 측정하여 가장 안정된 시간을 결정하였다.

#### 최적 반응시간 결정

추출물을 첨가한 후 1~6시간 동안 J774 macrophage를 배양하면서 반응 시간에 따른 대식세포의 식작용 활성이 극대화되는 반응시간을 결정하였다.

#### 추출물의 대식세포 식작용 활성 증강효과 검증

밀 추출물의 대식세포의 식작용 활성 증강효과를 측정하기 위하여 macrophage 세포주인 J774 cell이 yeast를 탐식하는 정도를 측정하였다. J774 cell line을 10% fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하면서  $1 \times 10^4$  cells이 되도록 배

양한 후 각 추출물을 0.05 mg/10 µL씩 주입하고 2시간 동안 반응시켰고, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated yeast를 5 µL 첨가하여 탐식작용이 일어나도록 1시간 동안 배양하였다. J774 macrophage에 탐식되지 않은 yeast를 PBS로 3번 세척한 후 형광현미경을 이용하여 세포 수를 세었고, 대식세포속에 탐식된 yeast의 수를 세어 yeast/macrophage로 대식세포의 식작용 활성을 비교하였다(9,10).

본 실험에 사용된 yeast는 *saccharomyces cerevisiae*로서 autoclave에서 멸균하여 활성을 제거한 후 사용하였다. FITC를 yeast에 결합시키는 방법은 PBS로 잘 씻은 yeast를 10% dimethylsulfoxide(DMSO), 0.25 M sodium carbonate(pH 9.0), 0.1 M sodium chloride에 0.01 g/mL 농도로 FITC를 녹인 용액을 섞어 4°C에서 48시간 회전하며 반응시키고 yeast를 PBS로 7회 이상 잘 씻는다. 이것을 마우스 혈청에 섞어서 4°C에 보관하며 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### PBS 및 EA 추출물의 수율

PBS 추출물의 수율은 Table 1에서와 같이 PBS 추출물의 경우 은파밀 75 mL, 그루밀 68 mL, 알찬밀 74 mL, 탑동밀 85 mL, 고분밀 72 mL, 수원 267 68 mL로 우리밀종 탑동밀이 가장 높았으며, 수입밀은 ASW 78 mL, DNS 80 mL로 DNS가 더 많았다.

EA 추출물의 수율은 완전 건조후 은파밀 1.37 g, 그루밀 1.54 g, 알찬밀 1.34 g, 탑동밀 1.32 g, 고분밀 1.12 g, 수원 267이 2.97 g으로 수원 267이 가장 높았으며, ASW 2.09 g, DNS 1.80 g으로 ASW가 높았다.

### 대식세포 활성 최적 조건 결정

대식세포의 식작용을 가장 크게 활성화하는 추출물은 우리밀종 고분밀의 EA 추출물이었으므로, 고분밀과 수입밀로 ASW의 EA 추출물을 중심으로 농도와 반응 시간

Table 1. The yield of PBS and EA extract from wheats

Kinds	PBS extract obtained from 50 g wheats (mL)	Dried EA extract obtained from 200 g wheats (g)
Korean wheat		
Eunpa	75	1.37
Gueru	68	1.54
Alchan	74	1.34
Topdong	85	1.32
Gobun	72	1.12
Suwon 267	68	2.97
Imported wheat		
ASW	78	2.09
DNS	80	1.80

에 따른 식작용 활성 변화 등을 측정하여 실험을 위한 최적 조건을 확립하고자 하였다.

추출물 농도에 따른 대식세포의 식작용 활성 변화

농도에 따른 식작용 활성의 차이를 알아보기 위하여 고분밀과 ASW EA 추출물의 최종 농도가 0.5 mg, 0.05 mg, 0.005 mg, 0.0005 mg, 0.00005 mg 되도록 희석하여 각각의 배양 접시에 넣고 식작용 활성 변화를 측정하였다.

Fig. 1에서와 같이 고분밀 EA 추출물의 식작용 활성은 각 농도별로 대조군에 비해 높게 나타났지만, ASW의 식작용 활성은 대조군보다 낮았다. 고분밀 EA 추출물의 식작용 활성은 0.00005 mg, 0.0005 mg, 0.005 mg 농도에서는 대조군과 비교해 별 차이가 없었지만, 0.05 mg 및 0.5 mg 농도에서 식작용 활성이 크게 증가하였다. ASW는 추출물 농도에 의한 영향을 받지 않아 각 농도별로 비슷한 식작용 활성을 보였다.

그러므로 고분밀의 대식세포의 식작용 활성 증강효과는 추출물의 농도 0.05 mg에서 가장 강하다는 것을 확인할 수 있었다.

EA 추출물 첨가 후 반응시간에 따른 대식세포 수의 변화

EA 추출물을 첨가한 후 반응시간에 따른 배양기내의 세포 수의 변화를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 고분밀과 ASW의 EA 추출물을 첨가한 후 6시간까지는 변화가 없었으나, 6시간 이후 세포 수가 증가하기 시작하여 24시간 이후에는 무첨가군인 대조군보다 세포의 성장이 더 빨라지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 36시간 이후에는 고분밀 첨가군이 ASW 첨가군보다 더 빨리 성장하기 시작하면서 48시간에는 ASW보다 15%, 무첨가군인 대조군보다는 21% 더 많이 성장함을 확인할 수 있었다.

그러므로 대식세포의 식작용 활성 측정을 위한 실험 조건의 균일성을 위해 세포수의 변화가 일어나지 않는 2~6시간에서 대식세포의 활성을 측정하는 것이 적합함을 확인하여 반응시간은 2시간으로 결정하였다.

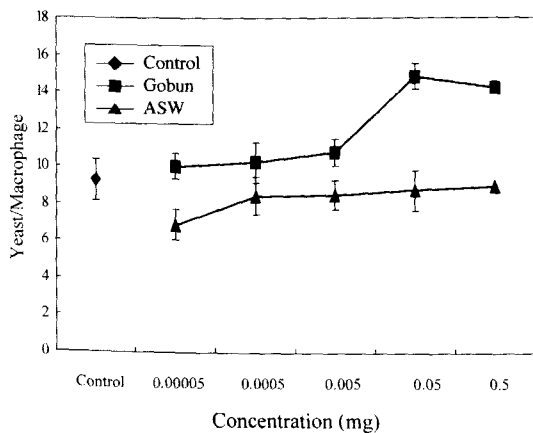


Fig. 1. Dosage dependent phagocytic activity stimulated by EA extract of wheat.

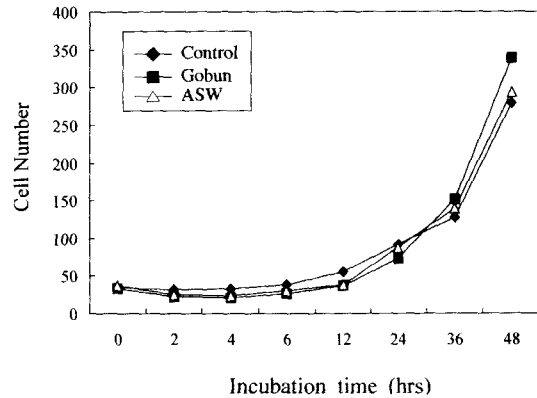


Fig. 2. The change of macrophage cell number by incubation time.

추출물 첨가후 반응시간에 따른 대식세포의 식작용 활성 변화

반응 시간에 따른 대식세포의 식작용 활성 증강효과를 알아보기 위하여 고분밀과 ASW EA 추출물 0.05 mg을 배양액에 주입한 후 반응 시간별로 식작용 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 고분밀 EA 추출물을 첨가한 후 식작용 활성은 시간대별로 모두 대조군보다 높았으며, ASW EA 추출물을 첨가한 군은 모든 시간대별로 대조군보다 낮았다. 배양 시간에 따른 식작용 활성의 패턴은 고분밀과 ASW가 반응시간에 관계없이 일정한 양상을 보였으므로 최적의 반응시간은 2시간으로 결정하였다.

결론적으로 고분밀의 EA 추출물의 대식세포의 식작용 활성 증강효과는 농도 0.05 mg, 반응시간 2시간에서 가장 적합한 최적의 조건임을 확인하였다.

PBS 및 EA 추출물의 대식세포의 식작용 활성 증강효과

PBS 추출물

PBS 추출물의 대식세포의 식작용 활성 증강효과를 측

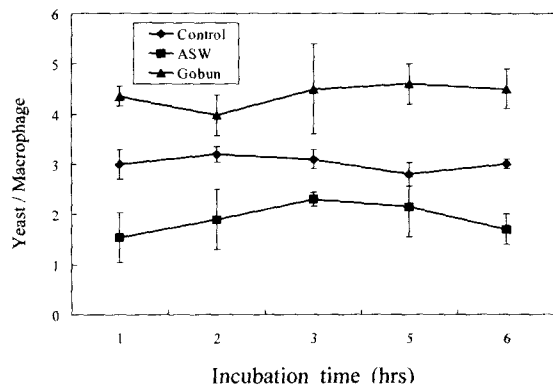


Fig. 3. Time dependent phagocytic activity stimulated by EA extract of wheat.

정한 결과는 Fig. 4와 같다. 밀 추출물을 넣었을 때 우리밀인 은파밀, 그루밀, 알찬밀, 탑동밀, 수원 267의 식작용 활성은 어떠한 첨가물도 넣지 않는 대조군에 비해 약간 낮은 활성을 나타냈지만 고분밀은 대조군에 비하여 약간의 상승 효과를 나타내었다. 그러나 수입밀인 ASW와 DNS의 식작용 활성은 대조군의 50~60% 수준에 불과한 아주 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 우리밀과 수입밀의 PBS 추출물 모두 대조군과 비교할 때 대식세포의 식작용을 유의적으로 증가시키지 않아 PBS 추출물은 대식세포의 식작용 활성 증강효과가 없다고 판단하였다.

EA 추출물

EA 추출물의 식작용 활성은 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 우리밀 EA 추출물의 대식세포에 대한 식작용 활성 증강효과는 고분밀>알찬밀>그루밀>탑동밀=수원 267>은파밀 순으로 나타나 6종 모두 어떠한 첨가물도 넣지 않는 대조군이나 positive control인 에탄올 첨가군에 비해 높은 식작용 활성을 나타냈다. 그러나 수입밀인 ASW 및 DNS는 대조군에 비해 53%, 23%의 아주 낮은 식작용 활성을 나타내어 PBS 추출물의 경우와 마찬가지로 오히려 식작용 활성이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 반면 우리밀 추출물의 대식세포의 식작용 활성 증강효과는 수입밀에 비해 2~10배 이상 높다는 것을 알 수 있었다. 특히 대조

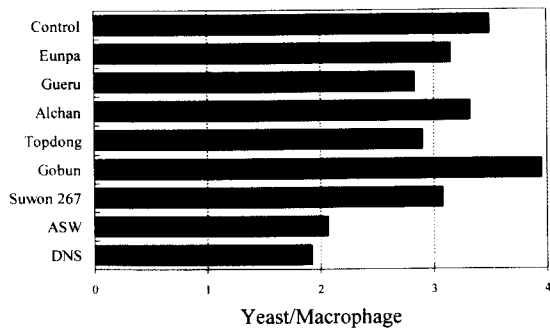


Fig. 4. Phagocytic activity stimulated by PBS extract of wheats.

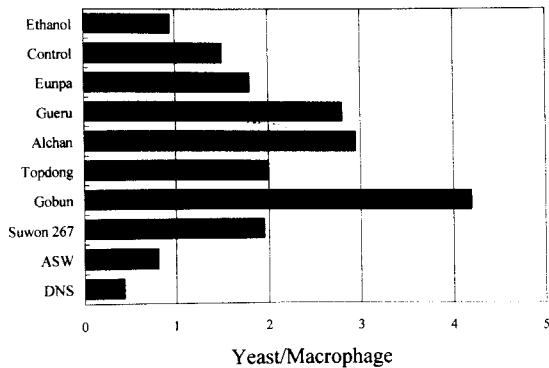


Fig. 5. Phagocytic activity stimulated by EA extract of wheats.

군과 비교할 때 고분밀은 276% 증강효과를 보였으며, 수입밀인 DNS 및 ASW와 비교할 때 각각 1020%, 480% 정도 증가된 식작용 활성 증강효과를 보였다.

우리밀중 식작용 활성이 가장 강하였던 고분밀의 EA 추출물에 대한 식작용 활성을 수입밀인 ASW와 비교하기 위하여 형광현미경을 통하여 촬영한 사진은 Fig. 6과 같다. A는 식작용이 일어나지 않은 상태의 J774 macrophage이며, 고분밀을 첨가한 대식세포의 식작용 활성(C)은 아무것도 첨가하지 않은 대조군(B)이나 ASW 첨가군(D)에 비하여 각각의 대식세포에 탐식된 yeast의 수가 월등히 많음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 PBS 추출물은 대식세포를 활성화하는 효과가 거의 없었으나, EA 추출물이 대식세포를 크게 활성화시킴을 확인할 수 있었으며, 특히 고분밀의 EA 추출물이 대식세포의 식작용을 가장 잘 활성화시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

대식세포 식작용에 대한 연구에서 Michal 등(11)과 Cook 등(12)은 conjugated linoleic acid(CLA)를 돼지 lymphocyte에 넣고 *in vitro*에서 배양했을 때 lymphocyte blastogenesis, cytotoxic activity 및 macrophage killing ability를 증가시켰다고 보고하여 CLA의 식작용 효능을 입증한 바 있다. Lin 등(13)은 *in vitro* 첨가한 해조 추출물에 의하여 마우스 비장세포 증식이 증가하였고 B 림프구로부터 항체 생성과 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 생성

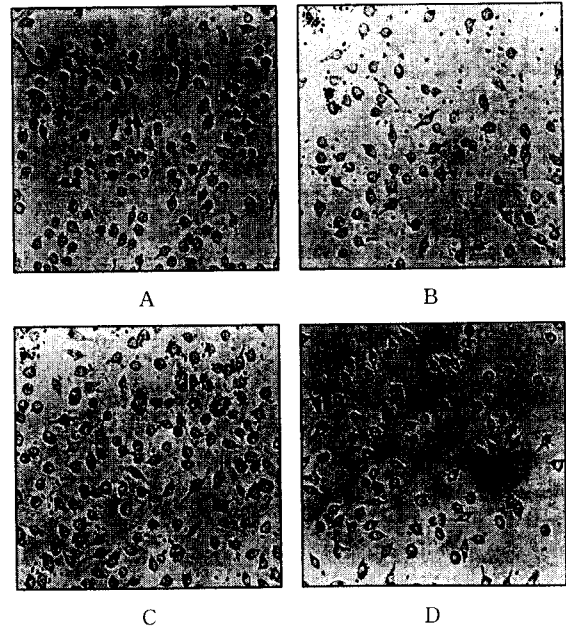


Fig. 6. Photograph of phagocytic activity stimulated by EA extract wheats (Magnification  $\times 200$ ).  
 A. J774 macrophage (without yeast addition)  
 B. Control (without any stimulus)  
 C. Macrophage stimulated by EA extract of Gobun wheat  
 D. Macrophage stimulated by EA extract of ASW

도 증가하였다고 하였으며, Choi 등(9), Jeong 등(14), Park 등(15)은 김치 추출물, linoleic acid와 ursolic acid 및 *Mycoplasma hominis*가 대식세포의 탐식기능 상승으로 면역 활성을 증가시켰다고 하였고, 이는 시료가 숙주의 대식세포 활성화와 이에 따른 세포 면역기전의 활성화 등에 기인된 것으로 보고하였다. 또한 Lee와 Ha(16)는 10여종의 생약 열수 추출물이 면역세포 활성화에 미치는 영향을 살펴본 결과, 복분자가 대식세포를 자극하여 TNF와 neopterin을 가장 많이 유리하는 것으로 나타났는데, 이들은 생약제에 함유된 lectin 성분이 대식세포를 비특이적으로 활성화시키기 때문이라 하였다. 한편, 복강 대식세포에 대한 연구에서 백삼의 total saponin이나 ginsenoside Rb<sub>2</sub> 성분을 마우스 복강에 첨가하였을 때 phagocytic activity와 반응 산소 중간 물질의 생성능이 증가하였고(17), TNF와 IL-1의 발현이 증가됨을 확인하였으며, 흰쥐에 대한 다시마의 보충급여는 대식세포능을 증진시켰다고 하였다(18). Kim과 Kim(19)은 영지버섯으로부터 분리 배양한 균사체를 알카리 추출하여 얻은 다당체가 BALB/c 마우스 복강 대식세포의 활성을 증가시킴을 보고한 것을 볼 때 식물의 특수 성분이 대식세포 활성을 통한 면역 기능증강에 관여할 것으로 추측된다.

## 요 약

본 연구는 우리밀 6종과 수입밀 2종의 PBS 및 ethanol:acetic acid (100:1, EA) 추출물을 제조하여 J774 macrophage를 대상으로 식작용 활성 증강 효과를 검증하였다. 각 용매 추출물의 대식 세포의 식작용 활성 증강효과를 비교했을 때 PBS보다는 EA 추출물의 식작용 활성이 크게 나타났고, 고분밀>알찬밀>그루밀>탑동밀<수원 267<은파밀>대조군>ASW>DNS순이었다. 실험 조건의 최적화를 위하여 EA 추출물의 농도와 배양 시간에 따른 식작용 활성을 측정된 결과, 고분밀의 대식세포의 식작용 활성은 EA 추출물의 최종 농도 0.05 mg에서 가장 강하였고 안전한 조건에서 대식세포의 식작용 활성을 측정하기 위한 최적의 배양 시간은 2시간으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의하여 지원되었음.

## 문 헌

1. 보건복지부: 97 보건복지백서 (1997)
2. 정성현: 우리밀 살리기 운동 5년 성과와 전망. 한국맥류학회지, 4, 24-26 (1997)
3. Kim, S. K.: Physicochemical studies on the hard and soft wheats flours. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 11, 13-17 (1979)
4. Rhee, C.: A study on rheological properties of dough and whole wheat bread-baking test of wheat variety "Cho-Kwang". *Korean J. Food Sci. Technol.*, 15, 215-219 (1983)
5. Kim, C.T., Cho, S.J., Hwang, J.K. and Kim, C.J.: Composition of amino acids, sugars and minerals of domestic wheat varieties. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 229-235 (1997)
6. Chang, H.G., Shin, H.S. and Kim, S.S.: Relation of physicochemical properties and cookie baking potentialities of Korean wheat flours. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16, 149-152 (1984)
7. Lee, S.Y., Hur, H.S., Song, J.C., Park, N.K., Chung, W.K., Nam, J.H. and Chang, H.G.: Comparison of noodle-related characteristics of domestic and imported wheat. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 44-50 (1997)
8. Ham, S.S., Lee, S.Y., Choe, M. and Hwang Bo, H.J.: Antimutagenicity and cytotoxicity effects of *Woorimill* wheat flour extracts added with wild herb and seaweed powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27, 1177-1182 (1998)
9. Choi, M.W., Kim, K.H. and Park, K.Y.: Effects of *kimchi* extracts on the growth of sarcoma-180 cells and phagocytic activity of mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 254-260 (1997)
10. Smith, D.L. and Rommel, F.: A rapid method for the simultaneous determination of phagocytic microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro*. *J. Immunol. Methods*, 17, 241-247 (1977)
11. Michal, J.J., Chew, B.P., Schultz, T.D., Wong, T.S. and Magnuson, N.S.: Interaction of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid with  $\beta$ -carotene on cellular host defense. *FASEB J.*, 6, A1102 (1992)
12. Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y. and Pariza, M.: Immune modulation by altered nutrient metabolism control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci.*, 72, 1301-1305 (1993)
13. Lin, J.N., Yoshida, Y., Wang, M.Q., Okai, Y. and Yamashita, U.: B-cell stimulating activity of seaweed extracts. *Int. J. Immunopharm.*, 19, 135 (1997)
14. Jeong, J.H., Kim, K.H., Chang, M.W., Lee, S.D. and Seo, J.K.: The influence of linoleic acid and ursolic acid on mouse peritoneal macrophage activity. *Kor. J. Immunol.*, 15, 53-60 (1993)
15. Park, M.I., Kim, K.H. and Chang, M.W.: Anti-tumor effect of *Mycoplasma hominis* on transplanted sarcoma 180 in mice. *J. Kor. Cancer Association*, 26, 484-494 (1994)
16. Lee, I.S. and Ha, Y.D.: Effect of edible and medicinal plants on the activation of immune cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 23, 150-155 (1994)
17. Bae, J.H.: Effect of white ginseng on the function of mouse peritoneal macrophages and their gene expression. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 1252-1257 (1997)
18. Cho, S.H., Yang, K.M., Bae, B.S., Im, S.A. and Yu, R.N.: Effect of sea tangle intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27, 952-959 (1998)
19. Kim, S.W. and Kim, E.S.: Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 254-260 (1997)

(1999년 12월 16일 접수)