

귤피로부터 분리한 마우스의 장관면역 활성 다당류의 검색

양현석¹ · 유광원² · 최양문^{3*}

¹CJ(주) 식품안전연구센터

²청주과학대학 김치식품과학과

³신성대학 호텔식품계열

Isolation of Polysaccharides Modulating Mouse's Intestinal Immune System from Peels of *Citrus unshiu*

Hyun-Seuk Yang¹, Kwang-Won Yu² and Yang-Mun Choi^{3*}

¹Food Safety Research Center, CJ Corporation, Seoul 152-050, Korea

²Dept. Kimchi and Food Science, Chongju National College of Science and Technology, Chungbuk 368-701, Korea

³Dept. Food Service Industry, Shinsung College, Chungnam 343-861, Korea

Abstract

Of solvent-extracts prepared from the 90 kinds of Korean traditional tea and rice gruel plants, cold-water extract from peels of *Citrus unshiu* (CUI-0) showed the most potent intestinal immune system modulating activity through Peyer's patch whereas other extracts did not have the activity except for cold-water extracts of *Laminaria japonica*, *Polygonatum japonicum*, *Poncirus trifoliata*, and hot-water extracts of *Gardenia jasminoides*, *Lycium chinense* having intermediate activity. CUI-0 was further fractionated into MeOH-soluble fraction (CUI-1), MeOH insoluble and EtOH-soluble fraction (CUI-2), and crude polysaccharide fraction (CUI-3). Among these fractions, CUI-3 showed the most potent stimulating activity for the proliferation of bone marrow cells mediated by Peyer's patch cells, and contained arabinose, galacturonic acid, galactose, glucose, glucuronic acid and rhamnose (molar ratio; 1.00:0.53:0.45:0.28:0.28:0.19) as the major sugars, and a small quantity of protein (9.4%). In treatments of CUI-3 with pronase and periodate (NaIO₄), the intestinal immune system modulating activity of CUI-3 was significantly reduced, and the activity of CUI-3 was affected by periodate oxidation particularly. The potently active carbohydrate-rich fraction, CUI-3IIb-3-2 was further purified by anion-exchange chromatography on DEAE-Sephacryl FF, Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200. CUI-3IIb-3-2 was eluted as a single peak on HPLC and its molecular weight was estimated to be 18,000 Da. CUI-3IIb-3-2 was consisted mainly of arabinose, galactose, rhamnose, galacturonic acid and glucuronic acid (molar ratio; 1.00:0.54:0.28:1.45:0.63) in addition to a small amount of proteins (3.2%). In addition, CUI-3IIb-3-2 showed the activity only through Peyer's patch cells, but this fraction did not directly stimulate proliferation of bone marrow cells. It may be concluded that intestinal immune system modulating activity of peels from *C. unshiu* is caused by pectic polysaccharides having a polygalacturonan moiety with neutral sugars such as arabinose and galactose.

Key words: *Citrus unshiu*, Rutaceae, intestinal immune system modulating activity, pectic polysaccharide, Peyer's patch

서론

2차(혹은 말초) 림프조직계(비장, 림프절 및 점막림프기관 등) 중 생체림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막림프기관은 수많은 필수 영양소들의 소화와 흡수의 중추적인 장소이면서 유해한 이물질들과 병원성 미생물들에 대한 물질적인 장벽역할을 수행할 뿐만 아니라 면역방어계에서 중요한 면역학적 장벽기능을 담당하고 있다(1). 이러한 점막림프기관 중 장관림프상 조직(gut associated lymphoid tissue,

GALT)은 생체 내에서 가장 큰 림프상 조직으로 장관의 점막부위에 존재하며 장관면역계 내 IgA 면역반응을 비롯하여 생체방어에서 대단히 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(2). 한편, GALT에서의 여러 면역기관 중 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 유도부위(inductive site)로 알려져 있으며(3), lumen dome은 항원의 흡수에 중요한 전문화된 M cell로 구성된 flattered epithelium으로 덮여 있다(4). 이와 같은 M cell은 lumen으로부터 가용성 항원, 세균과 바이러스 등을

*Corresponding author. E-mail: ymczoi@hanmail.net
Phone: 82-41-350-1461, Fax: 82-41-350-1165

음작용(pinocytosis)이나 식세포작용(phagocytosis)에 의해 포식(engulfment)하여 림프세포에 이동시킴으로써 세포의 활성화에 기여한다(5). 즉, 장관 내에 있는 Peyer's patch의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원과 반응하여 활성화된 후 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하여 장관막림프절(mesenteric lymph node, MLN)을 거쳐 체내를 순환하게 된다(6). 결국 Peyer's patch를 포함한 장관면역계는 장관의 면역학적 방어계에 기여할 뿐만 아니라 전신성 염증(systemic inflammation)을 조절하여 결과적으로 알레르기 반응, 자가면역질환 등을 효과적으로 억제할 수 있는 것이다.

산업화와 더불어 과학의 발달로 식품은 단지 생명유지의 수단이 아닌 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절 기능을 가진 기능성 물질로서 대두되고 있으며, 특히 한약재가 대부분인 굴피, 둥글레, 구기자, 대추, 솔잎 등의 전통 차 및 호박, 차조기, 고구마, 도라지 등의 죽류용 식물에 대한 효능과 기능성이 과학적인 입증에 의해 점차적으로 밝혀지고 있다(7). 또한 이러한 식물은 저분자 및 고분자 물질을 모두 함유하고 있으며, 영양적인 가치 이외에도 심장질환(8)이나 뇌질환에 대한 억제작용(9), 항산화작용(10), 항미생물작용(11) 및 항암작용(12) 등의 면역작용 등 거의 모든 생리활성에 있어서 그 효과가 입증되었고, 이들을 차 또는 죽으로 섭취할 경우, 열수추출에 의한 섭취가 대부분이므로 고분자 및 저분자 모두의 약리효과는 매우 효과적인 것으로 보고된 바 있다(13). 본 연구에 사용된 감골 껍질, 즉 굴피는 기능성 물질을 많이 포함하고 있는 훌륭한 식품이면서 의약품 소재로서의 연구가치도 높은 것으로 알려져 있는데, 이미 보고된 바와 같이 비타민 C 이외에 여러 기능성 물질들이 알려지면서 이의 이용에 대한 필요성 또한 증대되고 있다. 특히, 굴피에 다량 분포하는 것으로 널리 보고된 펙틴은 그 구조적 특성으로 인해 인체 내에서 다이옥신 등의 유해물질의 제거(14), 대장암 예방효과(15), 전립선암 억제효과(16), 그리고 항콜레스테롤(17) 등의 작용이 알려져 있다. 또한 TNF- α , IL-1 생성능(18) 이외에도 항암작용을 지닌 limonene(19), 항염증, 항콜레스테롤 그리고 항산화 등의 기능을 가진 naringin, hesperidin(20,21) 등의 flavonoid glycoside 등 저분자 물질 또한 굴피에 다량 존재하는 것으로 보고되고 있다.

그러므로 본 연구에서는 이처럼 높은 부가가치를 가진 제품의 원료이면서 과즙음료 제조과정 등에서 발생하는 폐자원의 활용이라는 산업적인 관점에서(22) 전신면역력의 조절에 큰 영향을 미치는 장관면역체계, 특히 Peyer's patch를 매개로 굴피로부터 골수세포의 증식에 기여하는 물질을 분리, 정제하고 그 특성을 살펴, 이러한 소재를 활용한 기능성 식품의 개발에 보다 적극적인 연구와 기술개발의 필요성이 더욱 증대되도록 하고자 한다. 또한 지금까지 굴피로부터 생리활성을 갖는 성분으로 보고된 물질들은 대부분 저분자

로서 그 함량이 극히 적으나 굴피의 상당량을 차지하는 펙틴 등의 고분자 물질에 관하여는 거의 보고된 바 없는 실정으로 고분자 물질의 생리활성을 밝힌다는 점에서 본 실험의 또 다른 의의가 있다고 하겠다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 90여종의 전통 차 및 죽류용 식물은 경동시장에서 구입하였거나 농협대학으로부터 공급받아 사용하였다. 한편, 장관면역 활성이 가장 높은 식물로서 성분분리에 이용된 굴피는 제주산 온주밀감의 껍질로서, (주)한국신과과학기술센터(제주, 남제주군)에서 공급받아 사용하였다. DEAE-Sepharose FF, Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200은 Pharmacia Biotech.(Uppsala, Sweden) 회사로부터 구입하여 사용하였으며, 활성측정에 사용된 RPMI-1640 medium과 Hank's balanced salt solution(HBSS), fetal bovine serum(FBS) 등은 Gibco(Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였다. 또한 penicillin-streptomycin과 amphotericin B는 Flow Lab.(Irvine, Scotland)의 회사로부터 구입하였고 골수세포 증식을 측정하는 형광시약인 Alamar BlueTM은 Alamar Bio-Sciences Inc.(Sacramento, CA, USA) 업체의 제품을 사용하였다.

실험동물

생후 5주령의 건강상태가 양호한 C3H/He의 암컷 마우스를 (주)대한실험동물센터(충북, 음성군)로부터 구입하여 사용하였다. 사료는 실험동물용 사료를(삼양사료, 인천), 물은 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며 환경은 항온, 항습 조건(온도 22±0.5°C, 상대습도 55±5%) 및 인공조명에서 명암교대 1일 12시간씩(오전 9시~오후 9시)을 유지하였다.

일반성분 및 구성당 분석

총당, 산성당 및 단백질 함량은 각각 galactose, galacturonic acid 및 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(23), *m*-hydroxybiphenyl법(24)과 Lowry법(25)으로 각각 정량하였다. 한편, 각각의 분리 및 정제단계에서 얻은 시료에 대하여 중성당의 경우 Jones와 Albersheim(26)의 방법으로 2.0 M TFA(trifluoroacetic acid)로 121°C에서 1.5시간 동안 시료를 가수분해시킨 후 NaBH₄를 이용하여 중성당을 alditol로 환원시키고, (CH₃CO)₂O를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 SP-2380 column(0.2 μm film, 0.25 mm i.d×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas-liquid chromatography(HP-6890 II GLC, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)로 구성당을 분석하였다. 또한 산성당의 경우에 있어서는 0.1 M TFA로 100°C에서 1시간 동안 가수분해시킨 후 NaBD₄를 이용하여 중성당의 경우와 유사한 조건으로 alditol acetate 유도체

로 전환시켜 GLC를 실시하였다(27). 구성당 분석을 위한 GLC의 온도조건은 injector 250°C, detector 250°C이었고 column은 60°C에서 1분이 경과하면 30°C/분의 속도로 220°C까지 상승시킨 후 12분간 유지하고 다시 8°C/분의 속도로 250°C까지 상승시켜 15분을 유지하는 조건이었으며, 표준 당류의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였고 구성당의 mol%는 각 peak들의 면적비와 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산한 후 molar ratio로 표기하였다.

장관면역 활성검색을 위한 각종 식물류의 용매추출물 조제 동결건조한 각각의 전통 차 및 죽류용 식물에 대하여 homogenizer(Ultra-turrax T-50, Janke & Kunkel GmbH & Co., KG-IKA-Labortechnik, Staufen, Germany)로 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 분쇄하고 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후 그 상등액을 냉수추출물로 하였다. 침전물은 동결건조 후 다양한 용매의 극성도 순서에 따라 hexane, MeOH과 열수로 2시간씩 환류추출한 후 상등액을 동결건조하여 각각 hexane추출물, MeOH추출물 및 열수추출물로 조제하였다. 또한 장관면역 활성 검색결과, 높은 활성을 보인 동결건조 후 분쇄한 껍질에 대해서는 hexane, butanol, ethylacetate, EtOH, MeOH 및 증류수(냉수와 열수) 등 극성도가 각각 0.0, 3.9, 4.3, 5.2, 6.6, 9.0인 다양한 용매에 의해 2시간씩 환류추출하고, 상등

액과 침전으로 분리한 후 상등액을 동결건조하여 각각의 용매추출물로 제조하였다.

장관면역 활성검색을 통해 선정된 껍질 냉수추출물의 분획

전통 차 및 죽류용 식물의 다양한 종류로부터 장관면역 활성검색을 통해 최적의 시료로 선정된 껍질 1 kg에 대해 20배 부피의 증류수를 첨가하고 분쇄, 교반한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 상등액은 냉수추출물(CUI-0, 수율; 33.8%)로 조제하기 위하여 동결건조하였으며, 잔사에 대해서는 동결건조 후 decoction 처리를 실시하고, 원심분리 및 여과하여 얻은 상등액을 투석, 감압농축 및 동결건조하여 열수추출물(CUIV-0, 수율; 15.7%)로 조제하였다. CUIV-0은 다시 물에 용해한 후, EtOH을 첨가하여 교반하고 상등액(CUIV-2, 수율; 1.0%)과 침전으로 분리한 후, 침전물은 증류수에 재용해하고 동결건조하여 열수추출물의 조다당 획분(CUIV-3, 수율; 3.4%)으로 조제하였다. 한편, CUI-0은 MeOH로 1시간씩 3회 환류하고 원심분리하여 MeOH-가용성 획분(CUI-1, 수율; 9.1%)과 비가용성 획분으로 분리한 후, 비가용성 획분은 다시 증류수에 녹이고 4배 부피의 EtOH을 가하여 다시 상등액(CUI-2, 수율; 1.0%)과 침전으로 나누었고, 침전물에 대하여 투석, 농축 및 동결건조 과정을 거쳐 냉수추출물 조다당 획분(CUI-3, 수율; 4.9%)을 조제하였다(Fig. 1).

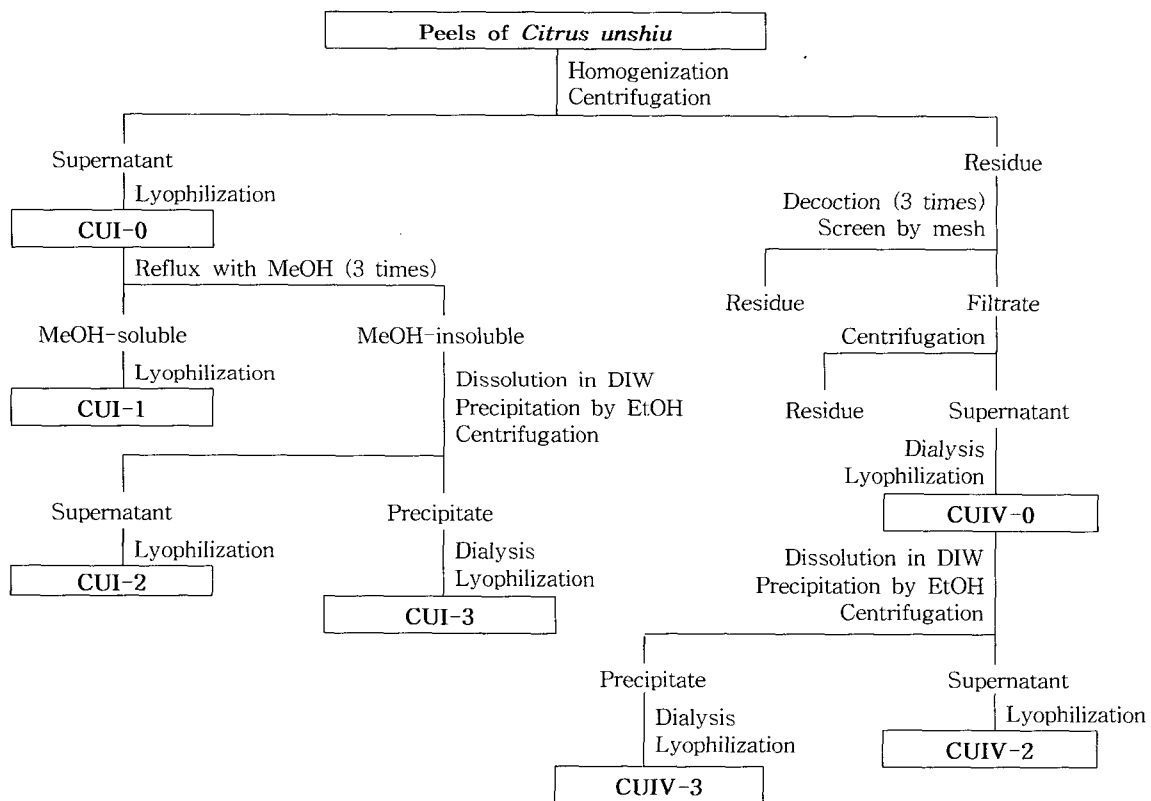


Fig. 1. Preparation of crude polysaccharide fraction from peels of *C. unshiu*.

굴피 냉수추출물의 조다당 획분(CUI-3)으로부터 장관면역 활성성분의 정제

굴피 냉수추출물의 조다당 획분인 CUI-3(1 g)을 증류수에 녹여 증류수로 평형화시킨 DEAE-Sephrose FF column (Cl⁻ form, 4.0×30 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 각 획분을 투석, 농축 및 동결건조하여 4개의 획분, 즉 증류수 용출 획분(CUI-3I, 수율; 0.3%), 0.1 M NaCl 용출획분(CUI-3IIa, 수율; 0.5%), 0.2 M NaCl 용출획분(CUI-3IIb, 수율; 2.4%)과 0.3 M NaCl 용출획분(CUI-3IIc, 수율; 0.4%)을 얻었다. 이러한 획분들 중 가장 활성이 높은 CUI-3IIb에 대하여 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column(2.5×94 cm)에서 gel filtration chromatography를 실행하여 3개의 획분을 얻었으며(CUI-3IIb-1, 0.17%; CUI-3IIb-2, 0.51%; CUI-3IIb-3, 1.02%), CUI-3IIb-2와 3IIb-3에서 유의적인 활성을 나타내었으나 수율과 저농도에서 활성이 우세하였던 CUI-3IIb-3에 대하여 다시 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephacryl S-200(1.7×82 cm)에서 gel filtration chromatography를 행하여 3개의 획분(CUI-3IIb-3-1, 0.13%; CUI-3IIb-3-2, 0.17%; CUI-3IIb-3-3, 0.12%)를 얻었으며 장관면역 활성 측정결과, CUI-3IIb-3-2가 가장 활성이 높았다. 정제된 활성 획분 CUI-3IIb-3-2의 순도를 확인하기 위하여 Shodex OHpak SB-805(8×300 mm, Showa Denko K. K., Tokyo, Japan) column이 장착된 Waters 2690 HPLC(Waters, Milford, MA)를 0.2 M NaNO₃ 용액으로 용출시키면서 (0.5 mL/min) RI(refractive index) detector를 이용하여 행하였으며, 정제 다당의 분자량 측정을 위해 표준물질로 dextran T-2000(2×10⁶), T-500, T-70 및 포도당을 사용하여 구한 표준곡선과 K_{av}값을 비교하여 측정하였다.

굴피 냉수추출물로부터 조제된 조다당 획분(CUI-3)의 효소·화학적 처리

NaIO₄ 산화 : Yamada 등(28)의 방법에 의거하여 측정하였는데, 즉 조다당 획분(CUI-3) 50 mg에 25 mM NaIO₄가 함유된 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 50 mL를 첨가하고 암실, 4°C에서 96시간 교반하였다. 잔여 periodate를 제거하기 위해 ethylene glycol을 첨가하고 투석을 행하여 얻은 비투석액에 NaBH₄를 첨가하여 환원시키고 초산으로 중화 후 투석, 동결건조하여 CUI-3의 NaIO₄ 산화물(periodate-oxidized CUI-3, 수율; 64.9%)을 조제하였다.

Pronase 가수분해 : 조다당 획분(CUI-3) 20 mg을 10 mg CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.9) 20 mL에 용해시킨 후 30 mg Actinase E(Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)를 가하여 37°C에서 48시간 가수분해시켰다. 효소반응은 0.1 N HCl로 중지시키고 투석 후 동결건조하여 CUI-3의 단백질 분해물(pronase-digested CUI-3, 수율; 78.4%)로 조제하였다(28).

장관면역 활성 측정법

장관면역 활성은 Hong 등(29)의 방법에 의거하여 측정하였다. 즉, C3H/He 마우스의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution (HBSS)이 담겨진 petri dish에 옮기고 조직을 파괴하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시킨다. 세포현탁액을 금속채(No. 200)로 여과한 후 RPMI 1640-FBS(5% FBS 함유된 RPMI-1640)로 세척하고 2×10⁶ cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정된 후 96-well plate에 180 µL씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 20 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈를 이용하여 회수하였는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세척하여 2.5×10⁵ cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정하고 96-well plate에 100 µL씩 분주한다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양한다. 장관면역 활성도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar BlueTM의 형광시약이 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다(30). 즉, 골수세포와 위에서 얻은 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar BlueTM 20 µL를 첨가한 다음 형광도를 SpectroFluor Plus(Tecan, Durham, NC)를 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여, 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다.

통계처리

실험결과들은 평균치±SD(standard deviation)로 나타내었고 Student t-test를 이용, 통계처리하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

90여종의 전통차 및 죽류용 식물의 용매추출물에 대한 장관면역 활성

90여종의 전통차 및 죽류용 식물재료로부터 조제된 각 식물의 냉수, hexane, MeOH 및 열수추출물의 약 320여종 획분을 대상으로 장관면역 활성을 검색한 결과, 냉수추출물에서는 상대적인 활성에 있어서 굴피(peels from *C. unshiu*), 다시마(*L. japonica*), 둥글레(*P. japonicum*), 탕자(*P. trifoliata*) 등이 각각 대조구에 비하여 1.65, 1.76, 1.43과 1.52배(시료농도 100 µg/mL)의 높은 활성을 보였으며, 수율 또한 32.4%, 25.8%, 37.7%, 34.5%로 대체적으로 높은 편이었다. 또한 열

수추출물에 있어서는 구기자(*L. chinense*)와 치자(*G. jasminoides*) 등이 각각 1.48, 1.56배로 활성을 나타내었으나 그 외의 많은 용매추출물에서는 그다지 높은 활성을 볼 수 없었고 hexane추출물의 경우에는 오히려 대조군보다도 월등히 낮은 골수세포의 증식상태를 보여주고 있었는데, 이러한 활성감소는 전통차 및 죽류용 식물로부터 hexane추출물에 세포독성을 나타내는 물질이 추출물에 함유되어 있는 것이 원인인 것으로 추정된다.

한편, 활성이 높았던 획분들에 대해 각기 용매별로 재추출하여 활성을 분석한 결과, 냉수추출물에서는 굴피와 탕자가 100 µg/mL(대조군의 1.65배와 1.56배)과 10 µg/mL(1.52배와 1.44배) 모두에서 높았으며, 열수추출물에서는 둥글레(시료농도 100 µg/mL, 1.45배), 치자(1.55배)가 각각의 용매추출획분에서 최대 활성을 나타내었다. 각 용매별 선정시료에 있어서 높은 활성을 지닌 시료들을 대상으로 다시 활성을 비교하여, 재현성이 우수하고 높은 수율(35.5%)과 최대 활성을 지닌 굴피를 최적시료로 선정하였으며 이에 대해 냉수, hexane, butanol, ethylacetate, EtOH, MeOH 및 열수 등의 용매별 추출을 실시하여 각 획분에 대하여 활성을 비교한 결과, 수율(각각 36.1%, 1.0%, 3.1%, 1.1%, 4.3%, 5.2% 및 27.0%)과 활성 모두에서 굴피의 냉수추출물(시료농도 100

µg/mL, 대조군의 1.65배; 10 µg/mL, 1.48배)이 가장 우수하였으므로 이를 원료로 장관면역 활성성분의 분리, 정제를 진행하였다(Fig. 2).

굴피의 냉수추출물부터 장관면역 활성 조다당 획분의 조제

검색을 통해 높은 수율과 장관면역 활성을 가지고 있는 것으로 판명된 건조된 굴피를 대상으로 용매별 분획을 실시하여 장관면역 활성 획분을 조제하였다. 즉, 냉수추출물인 CUI-0와 열수추출물인 CUIV-0를 용매별로 분획하여 MeOH-가용성 획분(CUI-1), EtOH-가용성 획분(CUI-2 및 CUIV-2) 및 조다당 획분(CUI-3과 CUIV-3)를 얻었다. 이러한 획분들에 대하여 장관면역 활성을 측정된 결과(Fig. 3), 10 µg/mL의 낮은 농도에서도 CUI-3의 획분만이 CUI-0 획분보다 높은 활성(대조군의 1.69배)을 보였고 그 외 획분들에서는 낮은 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 CUI-0 획분의 장관면역 활성은 저분자 물질들이 주로 추출되는 MeOH이나 EtOH 획분보다는 EtOH 첨가에 의해 고분자류가 대부분 침전되는 조다당 획분인 CUI-3 중의 물질에 장관면역 활성이 기인되고 있는 것으로 볼 수 있으며, 이러한 추정은 총당 45.6%, 산성당 40.7% 및 단백질 9.4%의 화학적 조성 및 주구성당이 arabinose, galacturonic acid, galactose, glucose, glucuronic

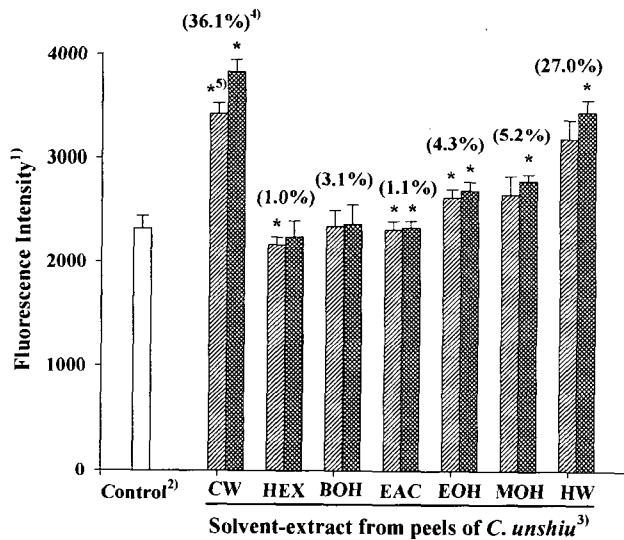


Fig. 2. Intestinal immune system modulating activity of solvent-extracts prepared from peels of *Citrus unshiu*.

□, Control (only saline without sample); ▨, Sample (10 µg/mL); ▩, Sample (100 µg/mL).

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean±SD of quadruplicate assays.

²⁾For control, only saline without sample.

³⁾CW, cold-water extract; HEX, hexane extract; BOH, BuOH extract; EAC, ethylacetate extract; EOH, EtOH extract; MOH, MeOH extract; HW, hot-water extract.

⁴⁾Values in parenthesis represent yield of each extract calculated from raw materials.

⁵⁾*p<0.05; Significance between the control and solvent-extract.

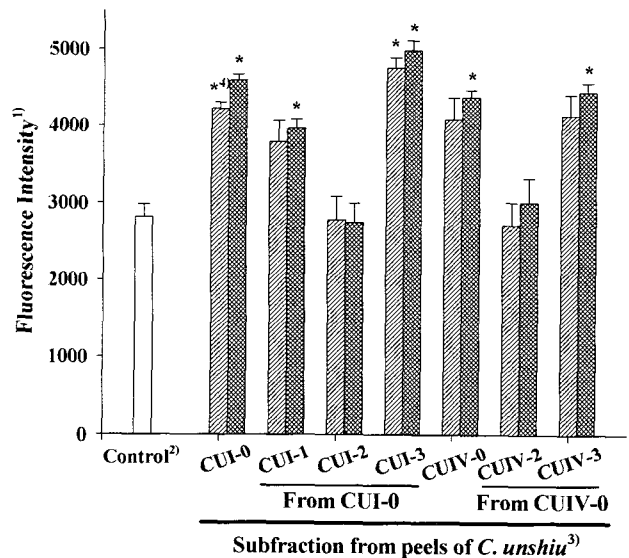


Fig. 3. Intestinal immune system modulating activity of subfractions prepared from peels of *C. unshiu*.

□, Control (only saline without sample); ▨, Sample (10 µg/mL); ▩, Sample (100 µg/mL).

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean±SD of quadruplicate assays.

²⁾For control, only saline without sample.

³⁾CUI-0, cold-water extract; CUI-1, MeOH-soluble fraction; CUI-2, MeOH-insoluble and EtOH-soluble fraction; CUI-3, crude polysaccharide fraction; CUIV-0, hot-water extract; CUIV-2, EtOH-soluble fraction; CUIV-3, crude polysaccharide fraction.

⁴⁾*p<0.05; Significance between the control and subfraction.

Table 1. Physicochemical properties of the active fractions prepared from peels of *Citrus unshiu* on DEAE-Sephacryl FF, Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200

Fraction ¹⁾	CUI-0	CUI-3	CUI-3IIb	CUI-3IIb-2	CUI-3IIb-3	CUI-3IIb-3-2
Yield (%)	33.8	4.9	2.4	0.51	1.02	0.17
Content (%)						
Carbohydrate ²⁾	57.6	45.6	60.7	65.9	69.3	70.1
Uronic acid ³⁾	24.7	40.7	30.0	27.1	50.3	60.6
Protein ⁴⁾	17.9	9.4	14.3	16.1	8.6	3.2
Component sugar (molar ratio)						
Arabinose	N.D. ⁵⁾	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fucose	"	0.07	0.02	0.08	0.01	0.02
Galactose	"	0.45	0.57	0.31	0.70	0.54
Glucose	"	0.28	0.09	0.23	0.13	0.14
Mannose	"	0.07	0.16	0.10	0.20	0.21
Rhamnose	"	0.19	0.15	0.18	0.25	0.28
Xylose	"	0.09	0.09	0.45	0.13	0.08
Galacturonic acid	"	0.53	1.39	0.34	1.64	1.45
Glucuronic acid	"	0.28	0.64	0.69	0.75	0.63

¹⁾CUI-0, cold-water extract from peels of *C. unshiu*; CUI-3, crude polysaccharide fraction from CUI-0; CUI-3IIb, 0.2 M NaCl-eluted fraction by DEAE-Sephacryl FF of CUI-3; CUI-3IIb-2 and 3IIb-3, fractions obtained by Sepharose CL-6B of CUI-3IIb; CUI-3IIb-3-2, fraction obtained by Sephacryl S-200 of CUI-3IIb-3.

²⁾Carbohydrate content: phenol-sulfuric acid method (as galactose).

³⁾Uronic acid content: *m*-hydroxydiphenyl method (as galacturonic acid).

⁴⁾Protein content: Lowry method (as bovine serum albumin).

⁵⁾N.D: not determined.

acid 및 rhamnose(molar ratio; 1.00:0.53:0.45:0.28:0.28:0.19)로 이루어져 있다는 분석 결과(Table 1)를 통하여 사실에 근접하고 있음을 보여주었다.

한편, 귤피의 냉수추출물로부터 EtOH 침전에 의해 조제된 조다당 획분(CUI-3)의 활성물질을 검토히기 위하여 CUI-3를 periodate(NaIO₄) 산화 및 단백질 분해효소인 pronase에 의해 소화시킨 후 그 반응산물들에 대하여 활성을 비교 검토히었다. Table 2에서 보이는 것처럼 모든 처리군에서 CUI-3의 활성이 감소하였는데, 특히 periodate 산화가 가장 많은 감소를 보였다(시료농도 100 µg/mL, CUI-3 활성의 46.4%

감소). Periodate는 당의 구조에서 인접한 hydroxyl기를 갖는 탄소와 탄소사이를 산화시키는 특성을 갖고 있으므로(31) 활성에 중요하게 관여하는 물질이 당류일 가능성을 높게 해주고 있으며, 결과적으로 다당류의 당 구조가 파괴되어 활성이 감소된 것으로 생각된다. 한편, pronase 처리에 의해서는 활성감소의 변화가 periodate 산화와 비교하여 상대적으로 크지 않았다(시료농도 100 µg/mL, CUI-3 활성의 15.4% 감소). 이러한 결과로 미루어 CUI-3에 포함된 여러 물질 중 귤피의 냉수추출물의 장관면역 활성에 중요하게 관여하는 고분자 획분의 활성물질은 단백질보다는 다당일 것으로 추정되며 이러한 활성물질을 밝히기 위하여 조다당 획분의 정제를 진행하였다.

Table 2. Effect of chemical and enzymatic treatments of CUI-3 on intestinal immune system modulating activity

Fraction	Treatment	Concentration (µg/mL)	Fluorescence intensity ¹⁾ (mean ± SD)
Control ²⁾	-	-	3,020 ± 150
	No treatment	10	4,530 ± 120 ^{*3)}
		100	5,190 ± 160 [*]
CUI-3	Periodate oxidation	10	2,410 ± 180
		100	2,780 ± 70 [#]
	Pronase digestion	10	3,870 ± 70 [#]
		100	4,390 ± 100 ^{##}

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay.

²⁾For control, only saline without sample.

³⁾* and #, p<0.05; Significance between the control and treated fraction, and significance between no treatment fraction (CUI-3, crude polysaccharide fraction from hot-water extract) and treated fraction.

귤피의 조다당 획분으로부터 정제된 장관면역 활성 다당류 귤피의 냉수추출물로부터 획분의 조제 시 장관면역 활성이 가장 높았던 조다당 획분, CUI-3에 대해 DEAE-Sephacryl FF(Cl⁻ form)를 이용한 ion exchange column chromatography를 실시하여 1개의 비흡착 획분(CUI-3I)과 3개의 흡착 획분(0.1 M NaCl 용출 획분; CUI-3IIa, 0.2 M NaCl 용출 획분; 3IIb와 0.3 M NaCl 용출 획분; 3IIc)으로 분리하였고(data not shown), 이러한 획분에 대하여 장관면역 활성을 측정하였다. 그 결과(Fig. 4A), CUI-3IIb에서 가장 높은 활성(시료농도 100 µg/mL, 대조군의 1.79배)을 나타내었고 수율 또한 가장 높았으며(원료의 2.4%), 이외의 획분들에서는 활성이 그다지 높지 않았다. 활성 획분인 CUI-3IIb는 총당 60.7%, 산성당 30.0% 및 단백질 14.3%로 구성된 다당류가 주성분인 물질로서, 주로 중성당인 arabinose와 산성당인 galac-

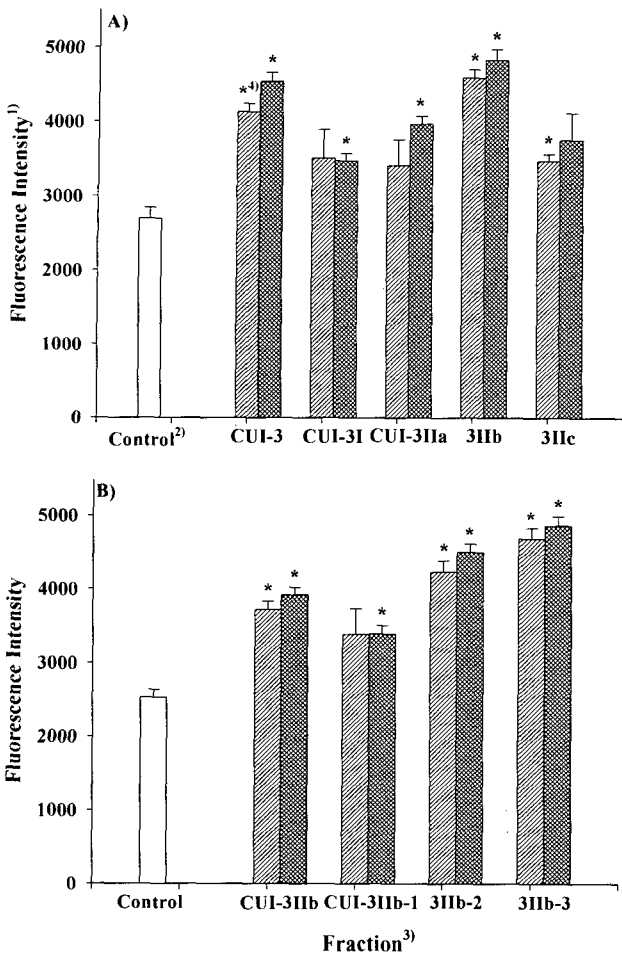


Fig. 4. Intestinal immune system modulating activity of A) fractions obtained from CUI-3 on DEAE-Sephacrose FF, and B) fractions obtained from CUI-3IIb on Sepharose CL-6B. □, Control (only saline without sample); ▨, Sample (10 µg/mL); ▩, Sample (100 µg/mL).

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each value was expressed as the mean ±SD of quadruplicate assays.

²⁾For control, only saline without sample.

³⁾A) Fractions obtained from CUI-3 (crude polysaccharide fraction); CUI-3I (DIW-eluted fraction), 3IIa (0.1 M NaCl-eluted fraction), 3IIb (0.2 M NaCl-eluted fraction) and 3IIc (0.3 M NaCl-eluted fraction), and B) Fractions obtained from CUI-3IIb; CUI-3IIb-1, 3IIb-2 and 3IIb-3.

⁴⁾p<0.05; Significance between the control and fraction.

turonic acid와 glucuronic acid(molar ratio; 1.00:1.39:0.64) 등으로 다당류가 구성되어 있는 것으로 판명되었다(Table 1).

DEAE-Sephacrose FF의 0.2 M NaCl 용출액을 통하여 얻은 활성 획분인 CUI-3IIb에 대하여 Sepharose CL-6B column chromatography를 이용하여 gel filtration을 실시하여 3개의 획분(CUI-3IIb-1, 3IIb-2와 3IIb-3)을 얻었다(Fig. 5 A). 이들 획분에 대하여 장관면역 활성을 비교한 결과, CUI-3IIb-2(시료농도 100 µg/mL, 대조군의 1.78배)와 3IIb-3(시료농도 100 µg/mL, 1.92배)이 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4B). 이들 활성 획분은 각각 총당 65.9%와 69.3%, 산성당

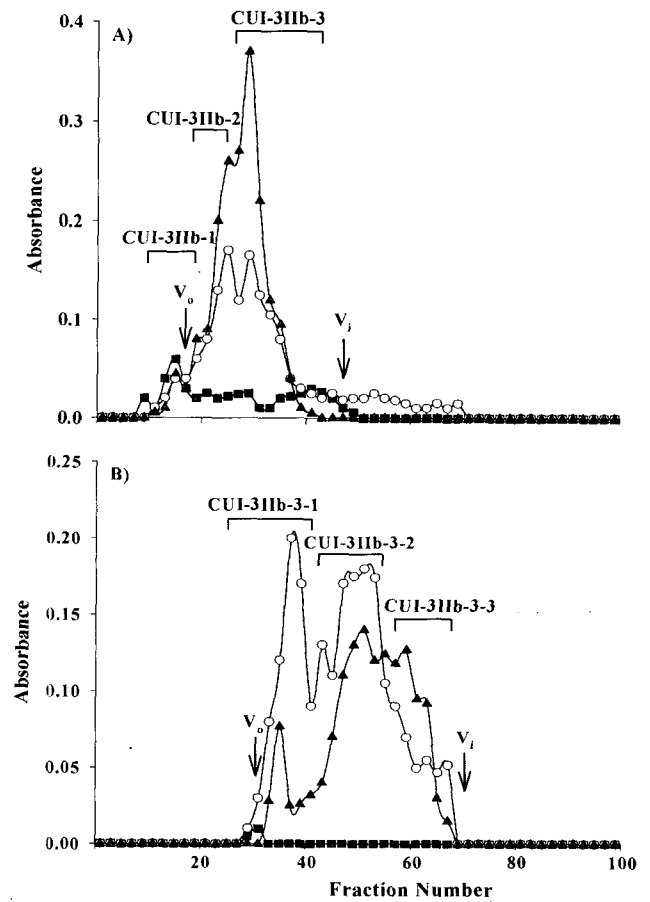


Fig. 5. Gel filtration patterns of A) CUI-3IIb on Sepharose CL-6B and B) CUI-3IIb-3 on Sephacryl S-200.

The symbol is V_o: void volume, V_i: inner volume. Column size: 2.5×94 cm of Sepharose CL-6B and 1.7×82 cm of Sephacryl S-200, elution speed: 5 sec/drop, elution solvent: 0.2 M NaCl.

27.1%와 50.3% 및 단백질 16.1%와 8.6%로 구성된 다당류가 주 구성물질인 획분들로서(Table 1), CUI-3IIb-2는 중성당으로는 arabinose, xylose, galactose, glucose를 포함하였고, glucuronic acid와 galacturonic acid(molar ratio; 1.00:0.45:0.31:0.23:0.69:0.34)의 산성당으로 구성된 반면, CUI-3IIb-3은 중성당으로서 arabinose, galactose, rhamnose 등을, 산성당으로서는 galacturonic acid와 glucuronic acid (molar ratio; 1.00:0.70:0.25:1.64:0.75)를 구성당으로 함유하고 있었다(Table 1). 이러한 결과로 미루어 CUI-3IIb-2는 중성당이 주 구성물질인데 비하여 CUI-3IIb-3은 산성당이 활성에 관여하는 물질로서 함유되어진 획분인 것으로 추정되었다.

Sepharose CL-6B를 통하여 얻은 활성획분인 CUI-3IIb-2와 3IIb-3 중에서 저농도에서 높은 활성(시료농도 10 µg/mL, 대조군의 1.85배)(Fig. 4B)과 수율(원료의 1.02%)을 나타낸 CUI-3IIb-3에 대하여 Sephacryl S-200 column chromatography를 시행하여 또 다른 3개의 획분(CUI-3IIb-3-1, 3IIb-3-2 및 3IIb-3-3)을 얻었으며(Fig. 5B), 이들 획분에 대하여 장관면역 활성을 Peyer's patch를 매개로 하는 기작을 이용하는 지를 동시에 확인할 수 있는 활성방법을 통하여

Table 3. Comparison of intestinal immune system modulating activity of subfractions obtained from CUI-3IIb-3 on Sephacryl S-200 with their direct effect on bone marrow cell proliferation

Fraction ¹⁾	Concentration (µg/mL)	Fluorescence intensity (mean ± SD) ²⁾	
		Peyer's patch-mediated activity ³⁾	Direct activity ⁴⁾
Control ⁵⁾	-	2,350 ± 60	2,580 ± 130
CUI-3IIb-3	10	4,060 ± 380	2,880 ± 110*
	100	4,440 ± 160*	3,020 ± 330
CUI-3IIb-3-1	10	3,420 ± 360	2,540 ± 290
	100	3,820 ± 130*	2,790 ± 100*
CUI-3IIb-3-2	10	4,250 ± 160*	2,910 ± 100*
	100	4,580 ± 160*	3,190 ± 90*
CUI-3IIb-3-3	10	2,550 ± 330	2,640 ± 80*
	100	2,770 ± 360	2,610 ± 300

¹⁾CUI-3IIb-3, fraction obtained by Sepharose CL-6B of CUI-3IIb; CUI-3IIb-3-1, 3IIb-3-2 and 3IIb-3-3, fraction obtained by Sephacryl S-200 of CUI-3IIb-3.

²⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay.

³⁾Peyer's patch-mediated activity; After Peyer's patch cells were cultured with the sample for 5 days, resulting culture supernatant (conditioned medium) were used for stimulation of bone marrow cells.

⁴⁾Direct effect: After the sample directly was cultured with bone marrow cells (without Peyer's patch stimulation), cell growth was measured.

⁵⁾For control, only saline without sample.

*p<0.05; Significance between the control and fraction.

비교하였다. 그 결과, CUI-3IIb-3-2에서 Peyer's patch를 매개로 한 기작을 통하여 가장 높은 활성(시료농도 100 µg/mL, 대조군의 1.95배)을 나타내었으며, 이러한 결과는 장관면역의 활성기작이 직접적으로 활성획분이 골수세포의 증식에 영향을 미치는 것이 아니고(시료농도 100 µg/mL, 대조군의 1.13배) Peyer's patch의 세포를 활성성분이 자극한 후 이러한 활성화된 세포에서 생산된 cytokine 및 lymphokine류가 골수세포 증식에 영향을 끼치는 것으로 추정할 수 있다(Table 3). 또한 CUI-3IIb-3-2는 CUI-3IIb-3에 비해 산성당 함량이 높게 나타나 총당 70.1%와 산성당 60.6%로 이루어져 있고, 단백질 함량은 매우 낮았으며(3.2%), 주 구성당으로서 중성당으로 arabinose, galactose, rhamnose를, 산성당으로는 galacturonic acid와 glucuronic acid(molar ratio: 1.00:0.54:0.28:1.45:0.63)가 함유되어 있었다(Table 1). 또한 이러한 구성당의 분석을 통하여 얻은 활성 획분인 CUI-3IIb-3-2는 galacturonic acid간의 결합 및 galacturonic acid와 rhamnose간의 교호적인 결합으로 이루어진 주쇄(32)에 다양한 종류의 중성당이 측쇄로 결합되어 있는, 특히 arabinose가 다량 함유된 펙틴계통의 다당류(33)일 것으로 추정되나, 보다 확실한 활성 획분의 구조를 밝히기 위해서는 효소 또는 화학적인 활성물질의 수식을 통한 활성본체의 구조분석(34)이 이루어져야만 하기 때문에 구조분석을 통하여 활성본체를 구체적으로 밝히기 위한 연구를 진행하고 있다.

장관면역 활성 다당류인 CUI-3IIb-3과 3IIb-3-2에 대하여 Shodex OHPak SB-805 column을 이용하여 HPLC를 시행하였다. CUI-3IIb-3에서는 4개의 peak로 이루어져 있음을 알 수 있었으나, Fig. 6에서 보이는 것처럼 Sephacryl S-200 column chromatography를 통하여 얻은 활성 획분인

CUI-3IIb-3-2에서는 단일 peak로서의 homogeneous한 양상을 보여주어, 냉수추출물로부터 장관면역 활성 획분이 다양한 분획단계를 거치면서 정제되어 최종적으로 얻은 활성 획분인 CUI-3IIb-3-2는 단일물질로 구성되어져 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 획분의 분자량은 dextran의 표준물질을 기준으로 추정할 때 약 18,000 Da의 다당류임을 알 수 있었다.

이러한 결과를 토대로 귤피의 냉수추출물로부터 장관면역 활성성분으로서 분리, 정제된 다당류는 분자량 18,000 Da의 펙틴류임을 알 수 있었으며 향후 감귤산업의 부산물 이용

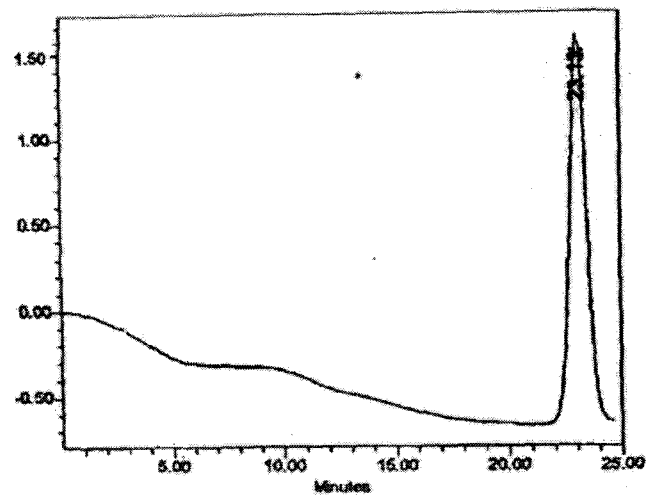


Fig. 6. HPLC profile of the active fraction, CUI-3IIb-3-2 purified from peels of *C. unshiu* on Shodex OHPak SB-805 column.

HPLC: Waters 2690, detector: Waters 410 (Refractive Index), flow rate: 0.5 mL/min, mobile phase: 0.2 M NaNO₃.

이라는 측면에서 폐기되는 껍피를 이용하여 전신 면역계를 활성화할 수 있는 장관면역 활성화 또는 항암제 치료 시의 부작용으로 나타나는 골수세포의 증식억제를 완화시킬 수 있는 기능성 소재로서 식품 등에 이용가치가 클 것으로 예상되며 이를 위해 향후 활성본체의 규명 및 산업적인 적용에 필요한 다양한 문제점 등을 밝혀내는 것이 필요하리라고 생각된다.

요 약

90여종의 전통차 및 죽류용 식물로부터 조제된 다양한 용매추출물 중에서, 껍피(peels of *C. unshiu*)의 냉수추출물(CUI-0)이 Peyer's patch를 매개로 한 가장 높은 장관면역 활성을 나타내었으며 다시마(*L. japonica*), 둥글레(*P. japonicum*), 탕자(*P. trifoliata*)의 냉수추출물과 구기자(*L. chinense*) 및 치자(*G. jasminoides*)의 열수추출물을 제외한 나머지 식물의 용매추출물은 거의 활성을 가지지 못하였다. CUI-0는 MeOH-가용성 획분(CUI-1), MeOH-불가용성이면서 EtOH-가용성 획분(CUI-2)과 조다당 획분(CUI-3)으로 분획되었다. 이러한 획분들 중 CUI-3은 Peyer's patch 세포를 매개로 하는 골수세포 증식의 자극활성이 가장 높았으며 arabinose, galacturonic acid, galactose, glucose, glucuronic acid와 rhamnose(molar ratio; 1.00:0.53:0.45:0.28:0.28:0.19) 등을 주요 구성당으로 함유하고 있었으며 소량의 단백질(9.4%)도 구성물질로 포함된 활성 획분임이 밝혀졌다. CUI-3의 장관면역 활성은 pronase 및 periodate 처리에 의해 감소되었으며 특히 periodate 산화는 CUI-3의 활성에 심각한 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 활성 획분으로서 당 함량이 높은 CUI-3IIb-3-2는 DEAE-Sephacryl FF, Sepharose CL-6B 및 Sephacryl S-200에 의해 껍피 냉수추출물의 조다당 획분으로부터 정제되었으며 HPLC에 의해 분자량 약 18,000 Da의 단일 peak임을 확인하였다. CUI-3IIb-3-2는 주로 arabinose, galactose, rhamnose, galacturonic acid와 glucuronic acid(molar ratio; 1.00:0.54:0.28:1.45:0.63) 등의 구성당으로 구성되어 있었으며 소량의 단백질(3.2%)이 함유되어진 물질로 구성되어 있었다. 한편 CUI-3IIb-3-2는 Peyer's patch를 경유하였을 때만 골수세포 증식활성을 나타내었으며 활성물질 자체가 직접 골수세포 증식활성에 관여하지는 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로부터 껍피의 장관면역 활성은 측쇄에 arabinose와 galactose 등의 중성당이 결합된 polygalacturonan 구조를 갖는 펙틴계통의 다당류에 기인하고 있음을 보여주었다.

문 헌

- Bienenstock J, Befus AD. 1980. Review of mucosal immunology. *Immunol* 41: 249-270.
- Mowat AM, Viney JL. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
- Sminia T, Wilders MM, Janse EM, Hoefsmit EC. 1983. Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiol* 164: 136-143.
- Trier J. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-547.
- Bockman DE, Cooper MD. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of labricus, appendix and Peyer's patches: An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-478.
- James SP, Zeitz M. 1994. Human gastrointestinal mucosal T cells. In *Handbook of Mucosal Immunology*. Pearay LO, Jiri M, Michael EL, Warren S, Jerry RM, John B, eds. Academic Press, London, UK. p 275-285.
- Yamada H, Ra KS, Kiyohara H, Cyong JC, Yang HC, Otsuka Y. 1988. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry* 27: 3163-3168.
- Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. 1999. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 58: 911-915.
- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H. 1998. Wide distribution of [H-3](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 19: 1771-1776.
- Jyotsnabaran H, Amar NB. 1998. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochem Biophys Res* 244: 903-907.
- Greenwalt CJ, Ledford RA, Steinkraus KH. 1998. Determination and characterization of antimicrobial activity of the fermented tea *Kombucha*. *Food Sci Technol* 31: 291-296.
- Kazue I, Kenji S, Kei N. 1997. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Preventive Medicine* 26: 769-775.
- Yamada H. 1994. Modern scientific approaches to Kampo medicines. *Asia Pacific J Pharm* 9: 209-217.
- Aozasa O, Ohta S, Nakao T, Miyata H, Nomura T. 2001. Enhancement in fecal excretion of dioxin isomer in mice by several dietary fibers. *Chemosphere* 45: 195-200.
- Sandberg AS, Ahderinne R, Anderson H, Hallgren B, Hulten L. 1983. The effect of citrus pectin on the absorption of nutrients in the small intestine. *Hum Nutr Clin Nutr* 37: 171-183.
- Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, Donat TL, Tait L, Hogan V, Raz A. 1995. Inhibition of spontaneous metastasis in rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst* 87: 348-353.
- Fernandez ML, Sun DM, Tosca MA, McNamara DJ. 1994. Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: a dose-response study in guinea pigs. *Plant Physiol* 104: 699-710.
- Tanaka T, Sugiura H, Inaba R, Nishikawa A, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H. 1999. Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice. *Carcinogenesis* 20: 1471-1476.
- Wattenberg LW, Coccia JB. 1991. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis* 12: 115-117.
- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, LoCurto RB. 1995. Biological effects of hesperedin, a citrus flavonoid (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Pharmacol* 50: 595-599.

21. Tanizawa H, Ohkawa Y, Takino Y, Miyase T, Ueno A, Kageyama T, Hara S. 1992. Studies on natural antioxidants in citrus species. *Chem Pharm Bull* 40: 1940-1942.
22. Sreenath HK, Crandall PG, Baker RA. 1995. Utilization of citrus by-products and wastes as beverage clouding agents. *J Ferm Bioeng* 80: 190-194.
23. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
24. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-274.
26. Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49: 926-936.
27. York WS, Darvill AG, McNeil M, Albersheim P. 1985. 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is a component of rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharides in the primary cell walls of plants. *Carbohydr Res* 138: 109-126.
28. Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Takemoto N, Komatsu Y, Kawamura H, Aburada M, Hosoya E. 1990. Fractionation and characterization of mitogenic and anti-complementary active fraction from Kampo (Japanese herbal) medicine 'Juzen-Taiho-To'. *Planta Med* 56: 386-391.
29. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicines, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360.
30. Pagé B, Pagé M, Noël C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* 3: 473-476.
31. Goldstein IJ, Hay GW, Lewis BA, Smith F. 1965. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Whistler RL, ed. Academic Press, London, UK. Vol V, p 361-370.
32. Albersheim P, An J, Freshour G, Fuller MS, Guillen R, Ham KS, Hahn MG, Huang J, O'Neill M, Whitcombe A, Williams MV, York WS, Darvill AG. 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochem Soc Trans* 22: 374-378.
33. Yamada H, Ra KS, Kiyohara H, Cyong JC, Otsuka Y. 1989. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr Res* 189: 209-226.
34. Yu KW, Hwang JH. 2001. Characterization of bone marrow cell proliferating arabinogalactan through Peyer's patch cells from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *J Food Sci Nutr* 6: 180-186.

(2004년 8월 30일 접수; 2004년 10월 23일 채택)