

## 추출조건에 따른 귀리 추출물의 면역활성

박희정 · 김윤배<sup>1</sup> · 강태수<sup>2</sup> · 정익수<sup>3</sup> · 김광엽 · 정헌상\*

충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>충북대학교 수의과대학, <sup>2</sup>충북과학대학 식품생명과학과, <sup>3</sup>(주)보락

## Immunomodulatory Activities of Oat Bran Extracts with Different Extraction Conditions

Hee-Joeng Park, Yun-Bae Kim<sup>1</sup>, Tae-Su Kang<sup>2</sup>, Ick-Soo Jung<sup>3</sup>, Kwang-Yup Kim, and Heon-Sang Jeong\*

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University

<sup>3</sup>Technical Research Institute, Bolak Company Limited

Immunomodulatory activities of crude  $\beta$ -glucans extracted from oat bran under different conditions, fractions A (55°C, 5%, pH 6), B (45°C, 15%, pH 6), C (50°C, 20%, pH 7), D (50°C, 0%, pH 7), and E (50°C, 10%, pH 9), were investigated. All crude  $\beta$ -glucan fractions stimulated macrophages, producing nitric oxide dose-dependently, and, efficiently promoted nitric oxide production in presence of IFN- $\gamma$ . Except for fraction C, *in vivo* test indicated fractions B, D, and E (100 mg/kg) substantially enhanced carbon-phagocytic indices of blood macrophages by oral administration of crude  $\beta$ -glucan for 7 days prior to carbon injection. These immunomodulatory effects could be determined with extraction conditions of crude  $\beta$ -glucan.

**Key words:** oat bran, crude  $\beta$ -glucan, murine peritoneal macrophages, nitric oxide, carbon clearance

### 서 론

귀리(*Avena sativa*, L.)는 벼과(*Gramineae*)에 속하는 일반적으로 냉습한 날씨에서 잘 자라는 대표적인 곡류로서(1) 오래전부터 oatmeal 형태로 식품으로 섭취되어 왔으며, 귀리의  $\beta$ -glucan은 1942년에 Morris에 의해서 처음으로 분리되었으나(2) 크게 주목 받지 못하다가 불용성 식이섬유에 비하여 수용성 식이섬유의 생리적 기능이 더 우수한 것이 알려지면서(3) 수용성  $\beta$ -glucan 함량이 높은 귀리에 대한 관심이 증가하게 되었다. 귀리 중의 수용성  $\beta$ -glucan 함량은 총  $\beta$ -glucan의 80%를 차지하며 보리의 54%에 비하여 높은 것으로 알려져 있다(4).

귀리  $\beta$ -glucan은 혈중 콜레스테롤 함량을 낮추고(5) 식후 당류의 소화 흡수를 지연시키며 insulin의 분비를 조절할 뿐 아니라 당뇨병에 있어서 혈당 농도를 저하시키며(6) 대장암을 예방하는 것으로 알려져 있다(7). 또한 귀리  $\beta$ -glucan의 면역성은 혈청의 면역글로블린인 IgG, IgG 1, IgG 2, IgM 및 IgA을 증가시킴으로써(8) 외부로부터 침입한 균들에 대하여 저항성을 높

이는 것으로 알려져 있다(9). Estrada 등(10)은 복강의 macrophage는 귀리  $\beta$ -glucan 투여시 투여 용량과 반응 시간에 비례하여 IL-1을 생산하고, IL-2, IFN- $\gamma$  및 IL-4를 시간 의존적으로 분비하게 함으로서 면역기능을 자극한다고 하였고, *Staphylococcus aureus*에 감염된 3일 후에 마우스에  $\beta$ -glucan 500  $\mu$ g을 1회 복강 주사했을 때 생존율이 높아졌다고 하였다. Yun 등(9)은 *Staphylococcus aureus*와 *Eimeria vermiformis*에 감염된 쥐에 귀리  $\beta$ -glucan(68.2%)을 경구 또는 복강주사시 모두 두 군에 대한 항체가 증가하면서 저항성이 향상된다고 하였다. 특히 *Eimeria vermiformis*에 감염된 쥐에 투여 했을 때 mesentric 림프절과 Peyer's patch에서 백혈구 수가 두드러지게 증가한다고 하였다.

이러한 생리활성은 직선상일 때보다 고분자 형태일 때 항암 활성이 강하다는 보고(11),  $\beta$ -glucan이 단백질과 결합된 형태인 단백질 다당체가 우수한 생리활성을 나타낸다는 보고(12) 및 single helical 보다 triple helical 구조인  $\beta$ -glucan의 nitric oxide 생성능이 우수하다는 보고(13)에서와 같이  $\beta$ -glucan의 미세한 구조 및 특성 등에 따라 달라지게 된다. 귀리 유래의 선형(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan의 경우에는 lichenase에 의한 가수분해시 생성되는 소당류의 DP3/DP4 비율이 크거나(14), 중합도가 큰 소당류가 많을수록 용해도가 낮아져(15) 생리적 효능이 감소하게 된다(3). 그러나 이러한 귀리  $\beta$ -glucan의 미세한 구조적 차이와 생리 효과에 대한 연구는 균일한 구조 및 정제된 시료의 다량 확보의 어려움 등으로 광범위하게 이루어지지 못하고 있다. 또한

\*Corresponding author: Heon-Sang Jeong, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, 12 Gaesing-dong, Cheongju, Chungbuk 361-763 Korea  
Tel: 82-43-261-2570  
Fax: 82-43-271-4412  
E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

$\beta$ -glucan의 특성은 추출조건 및 방법 등에 따라 달라지게 되므로(14-16) 기능성 소재로 개발하기 위해서는 추출특성에 따른 생리적 기능에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

따라서, 본 연구에서는 귀리의 crude  $\beta$ -glucan을 면역 조절제로 개발하기 위한 연구의 일환으로 우수한 면역활성을 갖는  $\beta$ -glucan의 추출조건을 조사하기 위하여, 추출조건을 달리하여 얻은 crude  $\beta$ -glucan을 대상으로 *in vitro* 상에서 복강대식세포의 nitric oxide 생성능 및 *in vivo* 상에서의 혈중 macrophage의 탐식효율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 귀리 crude $\beta$ -glucan 제조

Crude  $\beta$ -glucan은 Jeong 등(16)와 같은 방법으로 추출온도, 에탄올 농도 및 용매 pH를 조합한 추출조건하에서 제조하였다. 본 실험에 사용한 5개의 crude  $\beta$ -glucan 분획은 Kang 등(17)의 보고에서와 같이 *in vitro* 실험에서 항암활성이 우수하게 나타난 분획을 선정하였다. 5개의 분획으로는 A(55°C, 5%, pH 6), B(45°C, 15%, pH 6), C(50°C, 20%, pH 7), D(50°C, 0%, pH 7) 그리고 E(50°C, 10%, pH 9) 이었다.

### 성분분석

원료 및 crude  $\beta$ -glucan 중의 수분 함량은 적외선 수분 측정기(FD 600, Kett Electronic Lab., Japan)를 사용하여 분석하였고, 단백질 함량은 Kjeldahl 법으로, 지방 함량은 soxhlet 법으로, 회분은 직접 회화법으로 분석하였으며(18), 전분 함량은 Dawkins와 Nnanna의 방법(19)에 준하여 분석하였다. 각 성분의 함량은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 구하여 crude  $\beta$ -glucan 무게에 대한 건물량(%)으로 나타내었다.

### 실험동물

실험동물은 6주령의 25-30 g의 수컷 ICR 마우스(대한바이오파크(주), Korea)로부터 공급받아 실험에 사용하였다. 사육실 및 실험실의 환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ , 환기횟수 12회/hr, 조명주기 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300 lux로 조절하였으며 고형사료를 자유롭게 급여하면서 1주간의 적응사육을 실시하였다.

### 복강 macrophage의 분리 및 배양

마우스에 2.5% liquid thioglycollate medium을 2.5 mL/mouse의 용량으로 복강내에 주사하고, 3일 후 8 mL의 cold saline으로 복강을 씻어내어 세포를 얻었다. 얻어진 세포를 3겹 거즈를 통과시켜 이물질을 제거한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 침전물에 1 mL의 144 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액(17 mM Tris buffer, pH 7.2)을 가하여 약 5분 동안 용혈시킨 다음 원심분리하여 적혈구를 제거하였다. 얻어진 세포에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 함유된 RPMI 1640 medium을 1 mL 가하고 세포가 고르게 부유되도록 흔들어 주었다. 일정량(50  $\mu\text{L}$ )의 세포 부유액과 동량의 trypan blue 용액을 혼합한 다음 haemocytometer를 이용하여 생존 세포수를 측정하고,  $1 \times 10^6$  cells/mL로 조절한 다음 96-well plate에 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하였다.

세포를 5%  $\text{CO}_2$  incubator(37°C)에서 2시간 동안 배양하여 macrophage가 plate에 부착하도록 한 다음, crude  $\beta$ -glucan(최종 10-1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 단독 또는 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ , 10 U/mL)와 복

합으로 처리하였다. 비교를 위한 면역활성화 물질로는 IFN- $\gamma$ (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 lipopolysaccharide(LPS, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 단독 또는 복합으로 처리하고, 72시간 동안 추가로 배양하였다(20).

### Nitric oxide 농도 측정

Crude  $\beta$ -glucan이 복강 대식세포(큰포식세포)를 활성화시켜 nitric oxide(NO) 분비를 촉진시켰는지를 검색하기 위하여 각 well에 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride + 2.5% phosphoric acid)를 넣고 10분간 반응시킨 다음, 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 배양액내의 nitrite 함량을 정량하였으므로 배지의 고유값을 모든 수치에서 빼 주었다(20).

### 마우스에서의 carbon 탐식효율측정

마우스에 각각 100 mg/kg의 crude  $\beta$ -glucan을 7일간 경구투여하고, 최종투여 4시간 후 혈액내 carbon 탐식효율을 측정하였다. 즉, carbon suspension(India ink)을 5,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 1.5% gelatin (in saline)에 2배 희석하여 30 mg/mL가 되도록 하였다. 희석된 carbon 현탁액을 10 mL/kg의 용량으로 정맥내 주사하고, 0.5분 및 10분 후에 혈액(50 L)을 채취하였다.

Crude  $\beta$ -glucan이 혈액내 대식세포를 활성화시켜 carbon particles 탐식능을 증진시켰는지를 검색하기 위하여 채취한 일정량(30  $\mu\text{L}$ )의 혈액에 1 mL의 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 첨가하여 용혈시킨 다음 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액에 직접 단계별 carbon suspension을 가하여 작성한 표준곡선으로부터 혈액내 carbon 함량을 정량한 다음, phagocytic index(K) =  $1/(t_{10} - t_{0.5}) \times \ln(C_{0.5}/C_{10})$ 로부터 탐식효율을 산출하였다(21).

### 통계분석

모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, Student's *t*-test를 통하여  $p < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 귀리 crude $\beta$ -glucan의 성분

Crude  $\beta$ -glucan의 성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다.  $\beta$ -glucan 함량은 22.8-38.3% 범위로 B분획이 가장 높고, C분획이 가장 낮은 함량을 보였고, 단백질 함량은 23.2-27.8% 범위로 C분획이 가장 높고 A분획이 가장 낮았다. 전분함량은 13.2-35.4% 범위로 C분획에서 가장 높고 B분획에서 가장 낮았으며, 지방은 8.3-11.2% 범위였고, 회분은 5.9-7.9% 범위였다. Crude  $\beta$ -glucan 분획은  $\beta$ -glucan, 단백질 또는 전분이 주성분으로 이루어져 있었고,  $\beta$ -glucan 함량이 높은 분획에서는 단백질 함량도 유사하게 높았으나 전분 함량은 오히려 낮게 나타나, 본 추출 조건에 의하여 crude  $\beta$ -glucan중의 전분과  $\beta$ -glucan의 함량을 경쟁적으로 조절할 수 있음을 알 수 있었다. 추출조건에 의한 crude  $\beta$ -glucan의 조성변화는 전보(16)에 의하면 추출온도가 높고 에탄올 농도가 낮을수록 전분 함량은 증가하고, 단백질 함량 및  $\beta$ -glucan 함량은 감소하였고, pH는 지질함량에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 한편, 본 연구에서 각 분획 중  $\beta$ -glucan의 미세구조에 대한 연구는 이루어지지 않았으나, 추출온도가 높아질수록 연속적인  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) 결합 block이 감소하고, 전체적인  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)결합수는 증가하며(14), 침전용매인 ammonium

**Table 1. The chemical compositions of crude  $\beta$ -glucans from oat bran** (% , dry basis)

Fraction <sup>1)</sup>	$\beta$ -Glucan	Protein	Starch	Lipid	Ash
A	22.9	23.2	34.2	8.4	5.9
B	38.3	25.6	13.2	10.9	7.9
C	35.3	27.8	13.2	11.2	5.9
D	22.8	23.6	35.4	8.8	6.7
E	28.2	21.4	25.1	8.3	7.2

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 5%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 20%, pH 7), D fraction (50°C, 0%, pH 7), E fraction (50°C, 10%, pH 9).

sulfate 농도를 30-50% 범위에서 높일수록  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)결합과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합비는 낮아지고, 분자량이 작아진다는 보고(15)에서 지적인 바와 같이, 본 추출조건에 의하여 성분함량 및 미세한 구조적 차이를 보이는 crude  $\beta$ -glucan 분획이 얻어진 것으로 판단된다.

#### *In vitro* 상에서 crude $\beta$ -glucan이 마우스 복강 macrophage의 nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향

귀리의 crude  $\beta$ -glucan이 마우스 복강 macrophage를 직접적으로 활성화시키는지를 조사하기 위하여 5개의 crude  $\beta$ -glucan 분획을 10-1,000  $\mu$ g/mL 농도 범위에서 단독으로 또는 interferon-(IFN- $\gamma$ )와 복합적으로 처리한 후 nitric oxide(NO)의 생성량을 정량한 결과는 Table 2와 같다.

Liquid thioglycollate medium을 접종하여 얻은 복강 macrophage를 RPMI 160 medium에서 72시간 동안 배양했을 때의 NO 생성은 평균 10.65-10.70  $\mu$ M의 범위였으며, 이 값을 대조군으로 하였다. A분획은 10-1,000  $\mu$ g/mL로 단독 처리한 경우 대조군에 비하여 100  $\mu$ g/mL 에서는 118.8%로 증가하였고, 320 및 1,000  $\mu$ g/mL에서 각각 152.0 및 184.5%로 증가하였다. 반면,

IFN- $\gamma$ (10  $\mu$ g/mL)만을 처리했을 때는 대조군의 135.3%로 증가하였으며, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우 crude  $\beta$ -glucan A분획은 1,000  $\mu$ g/mL에서 IFN- $\gamma$ 의 131.2%로 증가시킨 것 외에 그 이하의 농도에서는 아무런 상승효과를 발휘하지 못하였다. 한편, macrophages는 resting macrophages(무자극)에서 IFN 자극에 따른 primed macrophages를 거쳐 박테리아나 그 성분인 LPS 자극에 따른 activated macrophages로 활성화되므로 IFN과 LPS를 양성대조물질로 처리하였는 바, LPS(10  $\mu$ g/mL)를 단독으로 처리했을 때는 대조군의 410.8%로, IFN- $\gamma$ 와 복합처리했을 때는 554.7%(IFN- $\gamma$ 의 409.7%)로 상승하였다.

B분획은 단독 처리한 경우 320 및 1,000  $\mu$ g/mL에서 각각 대조군의 130.0 및 228.2%로 탁월한 증가를 유도했으며, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우에는 320 및 1,000  $\mu$ g/mL에서 각각 IFN- $\gamma$ 의 145.5 및 218.1%로 상승하였다. C 분획은 A 분획과 유사하거나 약간 저조하였는데, 1,000  $\mu$ g/mL로 단독 처리한 경우는 대조군의 158.7%로 유의적으로 증가하였을 뿐, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우는 거의 상승효과를 발휘하지 못하였다. D 분획 역시 A 분획과 유사한 경향으로 다소 높은 효과를 발휘하였는데, 100, 320 및 1,000  $\mu$ g/mL로 단독 처리한 경우는 각각 대조군의 122.2, 133.2 및 195.2%를 나타냈으며, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우에는 1,000  $\mu$ g/mL에서만 IFN- $\gamma$ 의 159.5%로 유의적인 상승효과를 나타내었다.

이에 비해 E 분획은 단독으로도 고용량에서 탁월한 효과를 발휘함은 물론 IFN- $\gamma$ 에 대한 높은 상승효과를 나타내었다. 즉, 320 및 1,000  $\mu$ g/mL로 단독 처리한 경우 각각 대조군의 118.2 및 258.0%를 나타냈으며, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우에는 100, 320 및 1,000  $\mu$ g/mL에서 각각 IFN- $\gamma$ 의 135.9, 169.6 및 200.3%로 높은 상승효과를 발휘하였다.

즉, crude  $\beta$ -glucan 처리시 마우스 복강 macrophage에 의한 NO 생성량은 단독 처리시 및 IFN- $\gamma$  동일 처리시 모두 모든 분획에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 단독 처리시 증가폭이 클수록 IFN- $\gamma$  동일 처리시의 증가폭도 커지는 경

**Table 2. Effect of crude  $\beta$ -glucans from oat bran alone or in combination with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), on the nitric oxide (NO) production by peritoneal macrophages**

Treatment	Dose ( $\mu$ g/mL)	NO concentration ( $\mu$ M)				
		A <sup>1)</sup>	B	C	D	E
Medium	-	10.65 $\pm$ 1.90	10.70 $\pm$ 2.33	10.65 $\pm$ 1.90	10.70 $\pm$ 2.33	10.65 $\pm$ 1.90
IFN- $\gamma$	10	1.42 $\pm$ 1.69*	14.89 $\pm$ 1.72*	14.42 $\pm$ 1.69*	14.89 $\pm$ 1.72*	14.42 $\pm$ 1.69*
LPS	10	43.75 $\pm$ 21.06*	45.47 $\pm$ 25.45*	43.75 $\pm$ 21.06*	45.47 $\pm$ 25.45*	43.75 $\pm$ 21.06*
IFN- $\gamma$ +LPS	10	59.08 $\pm$ 19.30#	65.33 $\pm$ 18.01#	59.08 $\pm$ 19.30#	65.33 $\pm$ 18.01#	59.08 $\pm$ 19.30#
Crude $\beta$ -glucan	10	10.79 $\pm$ 1.63	7.58 $\pm$ 0.42	8.10 $\pm$ 0.39	9.92 $\pm$ 1.17	8.58 $\pm$ 3.11
	32	11.54 $\pm$ 1.05	9.31 $\pm$ 1.65	8.50 $\pm$ 0.87	10.25 $\pm$ 1.15	9.42 $\pm$ 2.80
	100	12.65 $\pm$ 1.23	10.72 $\pm$ 2.52	10.96 $\pm$ 0.66	13.08 $\pm$ 1.64	11.15 $\pm$ 1.97
	320	16.19 $\pm$ 3.88*	13.91 $\pm$ 1.88	13.77 $\pm$ 1.31	14.25 $\pm$ 3.03	12.59 $\pm$ 1.87
	1,000	19.67 $\pm$ 5.29*	24.42 $\pm$ 3.81*	16.90 $\pm$ 2.12*	20.89 $\pm$ 2.90*	27.48 $\pm$ 16.01*
	IFN- $\gamma$ +crude $\beta$ -glucan	10	14.96 $\pm$ 5.69	13.39 $\pm$ 3.84	11.42 $\pm$ 3.13	12.89 $\pm$ 3.31
32		14.67 $\pm$ 5.42	17.06 $\pm$ 6.24	13.42 $\pm$ 4.48	13.22 $\pm$ 3.68	15.52 $\pm$ 2.60
100		16.02 $\pm$ 6.63	19.08 $\pm$ 7.95	14.25 $\pm$ 4.63	15.39 $\pm$ 3.67	19.59 $\pm$ 11.41#
320		16.50 $\pm$ 6.42	21.67 $\pm$ 9.10#	13.90 $\pm$ 2.66	16.94 $\pm$ 3.67	24.46 $\pm$ 20.38#
1,000		18.92 $\pm$ 3.03#	32.47 $\pm$ 7.78#	16.06 $\pm$ 2.85	23.75 $\pm$ 1.23#	28.88 $\pm$ 13.70#

\*: Significantly different from medium control ( $p < 0.05$ ).

#: Significantly different from IFN- $\gamma$  control ( $p < 0.05$ ).

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 5%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 20%, pH 7), D fraction (50°C, 0%, pH 7), E fraction (50°C, 10%, pH 9).

Table 3. Effect of 7-day oral treatment with crude  $\beta$ -glucans from oat bran on the carbon clearance of mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Phagocytic index (K)	% of control
Vehicle	-	0.0162 $\pm$ 0.0035	100.0
A <sup>1)</sup>	100	0.0167 $\pm$ 0.0041	103.1
B	100	0.0249 $\pm$ 0.0065*	153.7
C	100	0.0198 $\pm$ 0.0039	122.2
D	100	0.0256 $\pm$ 0.0071*	158.0
E	100	0.0276 $\pm$ 0.0036*	170.4

\*Significantly different from vehicle control ( $p < 0.05$ ).

<sup>1)</sup>A fraction (55°C, 5%, pH 6), B fraction (45°C, 15%, pH 6), C fraction (50°C, 20%, pH 7), D fraction (50°C, 0%, pH 7), E fraction (50°C, 10%, pH 9).

향을 보였다. 이러한 결과는 귀리  $\beta$ -glucan의 처리시 면역조절과 관련된 IL-2, IFN- $\gamma$  및 IL-4 등의 cytokine 농도가 처리 농도 및 시간에 의존적으로 증가한다는 보고(10)와 유사하였다.

각 처리구간의 NO 생성능은 crude  $\beta$ -glucan 단독 처리에는 A 분획을 제외한 나머지 4개의 분획이 1,000  $\mu$ g/mL의 농도에서만 유의적인 증가를 보인 반면, A 분획은 더 낮은 농도인 320  $\mu$ g/mL에서도 유의적인 상승효과를 보여(152.0%), 저농도에서 직접적인 면역증진효과가 가장 우수한 분획으로 나타났다. 또한, 1,000  $\mu$ g/mL 농도 단독 처리시 NO 생성능은 E(258), B(228.2), D(195.2), A(184.5) 및 C(158.7%) 분획 순으로 높게 나타나 E 분획이 고농도 처리시에 가장 효과적이었음을 알 수 있었는데, 그 효과는 NO 생성량이 가장 적었던 C 분획의 약 1.6배에 달하였다.

한편, IFN- $\gamma$ 와 복합 처리한 경우에는 C 분획을 제외한 모든 분획의 고농도(1,000  $\mu$ g/mL) 처리에서 유의적인 상승률을 보였으며, IFN- $\gamma$  대조군에 대한 증가율은 B(218.1), E(200.3), D(159.5) 및 A(131.2%) 순으로 높게 나타났다. 특히 B 분획은 320  $\mu$ g/mL에서도 IFN- $\gamma$  대조군에 비하여 145.5% 증가하였고, E 분획은 100 및 320  $\mu$ g/mL에서도 각각 135.9 및 169.6%로 탁월한 증가효과를 나타냈다.

이와 같이, 귀리 crude  $\beta$ -glucan의 마우스 복강 macrophage에 대한 면역증진효과는  $\beta$ -glucan의 추출조건에 따라 달라짐을 알 수 있었다. 면역 증진효과는 고농도 단독 처리시 NO 생성이 증가하는 것으로 보아 복강 macrophage에 대한 직접적인 자극이나, T-cell 이 분비하는 면역글로블린인 IFN- $\gamma$  존재시에는 더 낮은 농도에서도 NO생성을 촉진하는 것으로 보아 면역글로블린을 통한 간접적인 자극에 의해 발휘되는 것을 확인할 수 있었다. NO는 항암성, 항균성, 종양세포독성 및 신경전달물질 등의 여러 가지 생리효과를 나타내는 물질로(22), nitric oxide 합성효소(NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 합성되므로(23), crude  $\beta$ -glucan의 macrophage 에 대한 NO 생성 증가는 NOS 생성 촉진과도 관련이 있을 것으로 판단된다. 그러나, 귀리  $\beta$ -glucan의 면역조절 기능에 대해서는 T 및 NK 세포관련 cytokine인 IL-2, IFN- $\gamma$  및 IL-4의 분비, macrophage 활성화를 통한 IL-1 cytokine의 분비 등이 보고된 바 있으나,  $\beta$ -glucan은 다양한 면역세포들을 자극하기 때문에 그 기작이 매우 복잡한 것으로 알려져 있다(10).

#### In vivo 상에서 귀리 crude $\beta$ -glucan의 마우스에서의 carbon 탐식효율에 미치는 영향

귀리 crude  $\beta$ -glucan이 체내 탐식세포의 활성화를 통해 혈액 내 carbon 탐식효율을 증가시키는지를 검색하기 위하여 7일간

crude  $\beta$ -glucan(100 mg/kg)을 경구투여한 후 4시간 후에 phagocytic index를 측정된 결과는 Table 3과 같다.

7일 동안 vehicle을 투여한 정상 마우스에 carbon suspension을 투여하고 0.5분과 10분 후 혈액 내 carbon의 농도를 측정하여 얻은 9.5분 동안의 clearance, 즉 phagocytic index는 평균 0.0162로 나타났고 이를 대조군으로 하였다. 이에 비해 100 mg/kg의 A 분획을 투여한 경우에는 0.0167로 큰 효과를 나타내지 못하였으나, B 분획은 0.0249로 대조군의 153.7%, C 분획은 0.0198로 122.2%, D 분획은 0.0256으로 158.0%, 그리고 E분획은 0.0276으로 170.4%의 가장 높은 phagocytic index의 상승을 유도하였다. 특히, B, D 및 E 분획은 대조군에 비하여 탐식효율이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는, IFN- $\gamma$  존재시 복강 macrophage에 대하여 NO 생성율이 높게 나타났던 상위 3개의 분획인 B, D 및 E 분획과 일치하였다. 따라서, NO 생성능과 탐식효율 실험으로부터 B, D 및 E 분획의 면역 증진효과가 우수한 것으로 확인되었고, 이로부터 면역증진효과가 우수한 crude  $\beta$ -glucan의 최적 추출조건을 도출할 수 있었다.

한편 각 처리구의 면역증진 효과와  $\beta$ -glucan 함량간에는 뚜렷한 경향을 확인할 수 없었는데, 이러한 면역증진 효과는 단순한 함량 차이 외에 Hashimoto 등(13)이 triple helical 구조와 single helical  $\beta$ -glucan간의 NO 생성량이 다르고, NOS 생성이 single helical  $\beta$ -glucan에서 우수하다고 보고한 바와 같이  $\beta$ -glucan의 미세한 구조적인 차이나, 단백질 다당체의 생리활성이 보고(12)된 바와 같이  $\beta$ -glucan 이외의 기타 성분과의 상호작용 및 Malkki 등(24)의  $\beta$ -glucan 함량이 낮고 분자량은 작으나 장내소화효소에 의한 변화가 적은 분획에서 콜레스테롤 저하효과가 높았다는 보고에서와 같이 장내에서의 구조적인 변화 정도 등에 따라서 달라질 수 있을 것이다. 한편, 사람의 macrophage는 1 $\rightarrow$ 3 결합을 가진  $\beta$ -glucan에 대해서 특이성을 가진 receptor 들이 있는 것으로 보고(25)된 바 있으므로 분획중의 1 $\rightarrow$ 3 결합수와 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터, crude  $\beta$ -glucan이 복강 macrophage의 nitric oxide 생성능을 증진시키고, 탐식효율을 증진시키는 기전을 통하여 면역증진효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 추출조건에 따라 효능에 다소 차이가 있는 것을 알 수 있었으나, 그 성분 용량 및 작용기전 면에서 충분히 검토되지 못하였다. 따라서 crude  $\beta$ -glucan으로부터 새로운 약리활성물질의 탐색 및 개발을 위해서는 시료의 분리 및 정제 후 면역활성에 대한 추가 실험 및  $\beta$ -glucan의 구조 분석을 통한 면밀한 조사가 앞으로 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

추출조건에 따른 귀리의 crude  $\beta$ -glucan에 대한 면역증진효과를 살펴보기 위해 추출온도, 에탄올 농도 및 pH를 달리하면서 얻은  $\beta$ -glucan 분획 중 *in vitro* 실험에서 항암성이 우수하게 나타난 5개 분획인 A분획(55°C, 5%, pH 6), B분획(45°C, 15%, pH 6), C분획(50°C, 20%, pH 7), D분획(50°C, 0%, pH 7) 및 E분획(50°C, 10%, pH 9)를 대상으로 복강 큰 포식세포의 nitric oxide 생성능과 경구투여 후 혈액중의 carbon 탐식효율을 조사하였다. *In vitro* 실험에서  $\beta$ -glucan을 10-1,000  $\mu$ g/mL 범위에서 단독으로 또는 IFN- $\gamma$ 와 병행 처리했을 때 모두 대식세포의 nitric oxide 생성량은 처리 농도에 비례하여 증가하였다. 단독 처리시에는 고용량일 때(1,000  $\mu$ g/mL) 모든 분획에서 nitric oxide 생성량이 유의적으로 증가하였다. IFN- $\gamma$ 와 병행 처리시에는 C분획을 제외한 모든 분획의 고농도 처리구에서 유의적으로 증가하였는데, 특히 E분획은 100  $\mu$ g/mL의 낮은 농도에서도 효율적인 증가를 보였다. *In vivo* 실험에서 100 mg/kg의  $\beta$ -glucan 분획을 7일간 경구투여한 후 carbon 탐식효율을 조사한 결과 B, D 및 E 분획에서 유의적인 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합해볼 때,  $\beta$ -glucan은 고용량일 때 직접적으로 또는 IFN- $\gamma$  존재시에는 저용량에서도 복강 큰 포식세포를 활성화시킬 뿐 아니라, 탐식효율도 높임으로써 면역기능을 증진시키는 것으로 나타났고, 그 효과는 crude  $\beta$ -glucan의 추출조건에 따라 달라지는 것을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비지원 (02-PJ1-PG4-PT04-0003)에 의해 수행되어 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Macrae R, Robinson R, Sadler MJ. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA. pp. 3319-3322 (1993)
- Morris DL. Lichenin and araban in oats (*Avena sativa*). J. Biol. Chem. 142: 881-891 (1942)
- Vachon C, Jones JD, Wood PJ, Savoie L. Concentration effects of soluble dietary fibers on postprandial glucose and insulin in the rat. Can. J. Pharmacol. 66: 801-806 (1988)
- Aman P, Graham H. Analysis of total and insoluble mixed-linked (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans in barley and oats. J. Agric. Food Chem. 35: 704-709 (1987)
- Anderson JW, Story L, Sieling B, Sieling WJL, Petro MS, Story J. Hypocholesterolemic effects of oat bran or bean intake for hypercholesterolemic men. Am. J. Clin. Nutr. 40: 1146-1155 (1984)
- Anderson JW. Dietary fiber and diabetics. In: Medical Aspects of Dietary Fibre. Spiller GA, Kay RM (eds). Plenum Medical, New York, NY, USA (1980)
- Vahouny GV, Kritchevsky D. Dietary Fiber. Basic and Clinical Aspects. Plenum Press, New York, USA (1986)
- Yun AH, Estrada A, Kessel AV, Gajadhar AV, Redmond MJ, Laarveld B.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) Oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. Int. J. Parasitol. 27: 329-337 (1997)
- Yun AH, Kessel AV, Park BC, Laarveld B.  $\beta$ -Glucan, extracted from oat, enhances diseases resistance against bacterial and parasitic infections. Immunol. Med. Microbiol. 35: 67-73 (2003)
- Estrada A, Yun CH, Kessel AV, Li B, Huuta S, Laarveld B. Immunomodulatory activities of oat  $\beta$ -glucan *in vitro* and *vivo*. Microbiol. Immunol. 41: 991-998 (1997)
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor  $\beta$ -glucan from cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biol. Pharm. Bull. 24: 820-828 (2001)
- Ooi VEC, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide protein complexes. Current Med. Chem. 7: 715-729 (2000)
- Hashimoto T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -glucan in mice. FEMS Immunol. Microbiol. 19: 131-135 (1997)
- Woodward JR, Phillips DR, Fincher GB. Watersoluble (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. IV. Comparison of 40 and 65 soluble fractions. Carbohydr. Polym. 8: 85-97 (1988)
- Izydorczyk MS, Biliaderist CG, Macri LJ, Macgregor AW. Fractionation of oat (1-3),(1-4)- $\beta$ -D-glucans and characteristics of the fractions. J. Cereal Sci. 27: 321-325 (1998)
- Jeong HS, Kang TS, Park HJ, Jung IS, Lee HY. Characteristics of viscosity and component of soluble extract in oats. Food Eng. Prog. 8: 40-46 (2004)
- Kang TS, Jeong HS, Park HJ, Lee MY, Kong YJ, Jung IS. Biological activities of oat soluble  $\beta$ -glucans. Korean J. Food Preserv. 10: 547-553 (2003)
- AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Chemists, VA, USA (1990)
- Dawkins NL, Nnanna IA. Studies on oat gum [(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan]: composition, molecular weight estimation and rheological properties. Food Hydrocol. 9: 1-7 (1995)
- Jun CD, Choi BM, Lee SY, Kang SS, Kim HM, Chung HT. Nitric oxide inhibits the expression of protein kinase C gene in the murine peritoneal macrophages. Biochem. Biophys. Res. Comm. 204: 105-111 (1994)
- Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vehicles as oxygen carriers. Influence of phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am. J. Pathol. 159: 1079-1088 (2001)
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142 (1991)
- Nathan CZ. Nitric oxide a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 6: 3051-3064 (1992)
- Malkki Y, Autio K, Hanninen O, Myllymaki O, Pelkonen K, Suortti T, Torronen R. Oat bran concentrates: physical properties of  $\beta$ -glucan and hypocholesterolemic effects in rats. Cereal Chem. 69: 647-653 (1992)
- Czop JK, Kay J. Isolation and characterization of  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 173: 1511-1520 (1991)

(2004년 12월 5일 접수; 2005년 1월 31일 채택)