pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 27. No. 6, 1033~1042 (2014)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2014.27.6.1033

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

현미식초 및 감식초 유래 다당류의 대식세포 자극활성 및 화학적 특성

김 동 수 · †신 광 순
경기대학교 식품생물공학과

Chemical Property and Macrophage Stimulating Activity of Polysaccharides isolated from Brown Rice and Persimmon Vinegars

Dong-Su Kim and †Kwang-Soon Shin
Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Abstract

To elucidate the novel biological function of Korean traditional vinegars, crude polysaccharides were isolated from vinegars manufactured at home and abroad, and their chemical properties and immuno-stimulating activities were examined. Three kinds of polysaccharides from Korean brown rice vinegar (KBV-0), Japanese brown rice vinegar (JBV-0) and Korean persimmon vinegar (KPV-0) showed higher immuno-stimulating activity. Component sugar analysis indicated that KBV-0 and JBV-0 mainly consisted of mannan, whereas KPV-0 existed as pectic materials. Three polysaccharides did not show any cytotoxicity to RAW 264.7 cell, whereas RAW 264.7 cells stimulated with KBV-0, JBV-0 and KPV-0 showed enhanced production of various cytokines such as IL-6, IL-12 and TNF-α in dose-dependent manners. However, the activity of KPV-0 was more potent than that of KBV-0 and JBV-0. Also, only KPV-0 augmented FcR II expression related with phagocytosis of macrophages. The results suggest among the tested vinegars, that the Korean persimmon vinegar has the most potent immune-stimulating activity, and it could possibly serve as industrial applications as functional materials.

Key words: persimmon vinegar, brown rice vinegar, polysaccharide, RAW 264.7, immuno-stimulation

서 론

식초는 소량의 휘발성 및 비휘발성 유기산, 당류, ester 등을 함유하여 독특한 방향과 신맛을 가지는 오랜 역사를 지닌 전통발효식품으로 동서양을 막론하고, 다양한 용도로 이용되어 왔다(Kwon 등 2000). 국내 식품공전에는 식초를 크게 합성식초, 발효식초 및 기타 식초로 분류하고 있는데, 1970년대에는 빙초산을 희석하여 제조된 저렴한 합성식초가 대량 소비되었으나, 이들은 ethylene이나 acetylene으로부터 유기합성에 의해 만들어진 빙초산을 원료로 사용하기 때문에 발효를 거치지 않아 원가 절감 및 대량생산에 수월하지만, 식초 고유의 풍미가 없을 뿐만 아니라, 빙초산의 합성 및 정제 시 사용되는 유해물질들로 인하여 나쁜 영향을 미칠 수 있기 때문에 선진국에서는 직접적인 사용을 금지하거나, 엄격히 제한하고 있다(Vogel 등 2000). 이에 반해 1980년대부터는 주정과 무기염, 일부 과즙을 첨가한 주정 발효식초가 최근까지 시장의 대부분을 차지하고 있지만(Jeong YJ 2009), 최근에는 건강에 대한 소비자들의 인식이 날로 높아지면서 천연과실 및 곡류를 원료로 알코올 발효된 술덧을 거쳐 초산 발효하는 2단계 발효를 통해 제조된 발효식초 및 관련 기능성 제품이 다양하게 생산되고 있는 추세이다. 더욱이 발효식초는 유기산, 향기성분, 아미노산 조성, 관능적인 맛과 품질이 우수하여 생산과 소비가 계속해서 증가되는 추세이며, 일본의 경우에는 식초 시장에서 이미 양조식초가 약 95% 이상을 차지하고 있어, 향

† Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea. Tel: +82-31-249-9650, Fax: +82-31-249-9650, E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

후 국내에서도 천연발효식초의 소비가 더욱 크게 성장할 것으로 기대되고 있다(Jeong YJ 2009). 또한, 최근에는 식초의 다양한 효능이 과학적으로 규명되었고, 이를 이용한 식초제품은 고급화되어 단순한 조미용도에서 식초음료 등의 다양한 기능성소재로 이용될 뿐만 아니라, 건강식품으로까지 영역이 확대되고 있는 추세이다(Kwon 등 2000). 특히 식초에는 소화액의 분비를 촉진하거나 피로 회복, 당뇨병, 비만 방지, 혈압 상승 방지, 노화 방지 및 항종양 효과 등의 다양한 기능성이 과학적으로 증명되었으며(Vogel 등 2000), 동맥경화, 고혈압, 심장병 등의 성인병 예방 효과를 비롯하여, 살균 작용 등의 기능성도 밝혀져 있다. 최근 발표된 식초의 기능성으로는 ABCA-1 발현량 증가와 beta-cell의 활성 증대를 통한 항당뇨 활성(Seok 등 2012), 또한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), superoxide radicals 및 hydroxyl radicals 등의 실험을 통한 항산화 활성의 우수함(Sakanakaand & Ishihara 2008) 등이 보고되어 있다.

식초와 같은 방식의 발효음료들은 원료인 생과와 비교할 때, 발효과정을 통한 화학적 변화에 의해서 원료에는 함유되어 있지 않은 미지의 물질들과 생리활성을 지닌 물질들을 함유하게 될 가능성이 높아지게 된다. 하지만 식초의 주성분인 초산 또는 폴리페놀성분들이 식초에서 나타나는 모든 약리활성을 책임진다고는 할 수는 없으며, 식초 중에 존재하는 다양한 형태의 다당류 또는 단백다당 등의 고분자 물질을 통해서도 새로운 활성이 존재할 가능성이 크다고 할 수 있다. 일반적으로 다당류는 고농도의 알콜 용액에서 침전되는 성질 때문에 그 동안 발효음료(알콜음료 혹은 알콜발효를 경유한 식초음료) 중의 활성성분으로 주목받지 못하였지만, 비교적 낮은 알콜 농도(5~10%)에서는 선택적으로 용해되어 존재할 가능성이 있다. 한편, 탄수화물은 지금까지 식물체의 구조 성분 및 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나, 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄(sugar chain)가 세포간의 인식과 접착을 통해서 세포의 분화, 정보전달, 감염 및 암전이 등의 생명현상에 깊이 관여한다는 사실이 밝혀졌다(Paulson JC 1989; Ruoslahti E 1989). 또한, 최근에는 식용 및 약용으로 사용된 한약재, 식품소재 또는 버섯류 등에서 유래한 다당류가 보체계 활성화(Zhu 등 2008), 림프구 증식활성(Bao 등 2002), 대식세포 자극활성(Hwang & Shin 2008; Lee & Shin 2013) 및 생리활성 증진을 통한 항암활성을 유도(Lee 등 2014)한다는 과학적인 근거가 보고되어 다당류에 의한 면역활성이 더욱 주목받고 있는 추세라 할 수 있다. 특히, 대식세포(macrophage)에 의해 유도되는 면역반응에 최근 저자들은 국내 · 외로부터 입수한 다양한 발효식초를 대상으로 다당류를 분리하고, 이들이 나타내는 면역증진 활성 또는 화학적 특성을 비교 · 평가하여 국내산 현미식초와 감식초의 우수성을 주장한 바 있다(in process). 이러한 연구를 바탕으로, 본 연구에서는 국내산 현미식초와 감식초, 그리고 일본산 현미식초의 고분자 다당체를 대량으로 분리하여 선천면역계에서 중추적인 역할을 담당하는 대식세포를 자극하는 활성을 비교하고, 각각의 다당체가 나타내는 화학적 특성을 평가함으로써 국내산 전통발효식초의 우수성과 함께 이를 산업적으로 응용하고자 하는데 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용된 식초는 국내 · 외에서 시판 또는 생산되는 전통발효식초 3종으로, 국내산 전통발효식초 2종인 현미식초와 감식초, 그리고 일본산 현미식초로 모두 2012년 9월 시중 대형 판매장 및 생산회사로부터 구매하여 실험에 사용하였다.

2. 전통발효식초로부터 조다당 분리

3종의 전통발효식초는 각각 5배씩 농축하여 초산 및 휘발성 성분을 제거하고, 4배 부피(%, v/v)의 95% ethanol을 가하여 24시간 동안 교반한 뒤 원심분리(6,000 rpm, 30분, 4℃)를 통해 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물은 소량의 증류수에 재용해한 다음, Sigma에서 구입한 dialysis tubing(MW cut off 12,000~14,000, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 진행한 뒤 동결건조(FreeZone 12 Liter, Labconco Co., Kansas city, KS, USA)하여 각각 국내산 현미식초 유래 조다당(KBV-0), 국내산 감식초 유래 조다당(KPV-0) 및 일본산 현미식초 유래 조다당(JBV-0)으로 추후 실험에 사용하였다.

3. 일반성분 분석

3종의 전통발효식초 유래 조다당획분의 일반성분을 분석하기 위해, 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(Dubois 등 1951)으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법(Brumenkranzand & Asboe-Hansen 1973)으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법(Bradford MM 1976)으로, 그리고 TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법(Karkhanis 등 1978)으로 각각 정량 분석하였다.

4. 구성당 분석

3종의 전통발효식초 유래 조다당획분의 구성당 분석은 다

당을 가수분해한 뒤 alditol acetate로 유도체화하여 gas chromatograpy(GC)를 이용해 분석하는 Jones & Albershim(1972)의 방법을 변형하여 진행하였다. 먼저, 각각의 조다당 획분은 2M TFA (trifluoroacetic acid)로 121℃에서 90분 동안 반응시켜 가수분해한 후, 1 mL의 1 M NH_4OH 용액에 용해하여 10 mg의 $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich Co.)로 4시간 동안 개환 및 환원시켰다. 이후 acetic acid를 적당량 가하여 잔존 $NaBH_4$를 제거한 후, 수 차례 methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하고, 각 구성당에 상응하는 alditol로 전환하였다. 다음으로 각각의 alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121℃에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며, 이를 chloroform/H_2O 2상 용매계로 분리·추출하고 건조시켜 alditol acetate 유도체로 전환시켰다. 조제된 유도체는 소량의 acetone에 용해하여 SP-2380 capillary column(0.2 μm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC(ACME-6100, Young-Lin Co., Anyang, Korea)를 이용하여 표준온도조건[60℃(1 min), 60℃→220℃(30℃/min), 220℃ (12 min), 220℃→50℃(8℃/min), 250℃(15 min)]에서 분석을 실시하였다. 각 구성당의 mole%는 각각의 peak 면적, 분자량 및 flame ionization detector(FID)에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

5. HPLC를 이용하여 다당의 분자량 분포도 및 정제도 확인

다당의 분자량 분포도 및 정제도 확인은 50 mg/mL의 농도로 제조된 각각의 조다당획분을 0.2 μm membrane filter(Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후, 50 mM ammonium formate(pH 5.5)로 평형화된 Superdex^{TM} 75 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences, Poscataway, NJ, USA)이 장착된 HPLC(Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies Co., Palo Alto, CA, USA)의 refractive index detector(Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 이동상의 유속은 0.5 mL/min이었으며, 시료의 injection volume은 20 μL, 30 min 동안 등용리 조건(isocratic mode)으로 분석하였다.

6. β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 Arabino-β-3,6-galactan(type-Ⅱ)의 존재확인 및 정량

Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent(Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법(van Holst & Clarke 1985)에 따라 single radical 젤 확산법으로 측정하였다. β-Glucosyl Yariv reagent 10 μg/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고, 직경 2.5 mm의 well을 만들어 농도별로 희석한 표준물질 gum arabic과 시료 5 μg을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였다. 이 평판을 습윤하고 25℃에서 15시간 반응시켜 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여, arabino-β-3,6-galactan의 존재유무 및 정량은 표준물질에 대비한 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다.

7. 세포배양 및 시약

Murine macrophage 세포주인 RAW 264.7(ATCC, TIB 71^{TM}) 세포는 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Rockbille, MD, USA)에서 분양받았으며, RPMI-1640 medium, fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin/streptomycin은 Welgene(Daegu, Korea)사에서 입수하여 사용하였다. 대조군으로 사용된 LPS (lipopolysaccharide from *E. coli* O127:B8)는 Sigma사의 제품을 사용하였고, 세포증식능 측정에 이용된 CCK-8(cell counting kit-8)은 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)로부터 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 medium(10% FBS-RPMI)으로 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2~3일 간격으로 계대하면서 사용하였다. 이후 다당시료의 RAW 264.7 세포 자극활성을 측정하기 위해, 먼저 세포수가 2.5×10^5 cells/well이 되도록 96-well plate(BD Biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)에 분주하고, 2 hr 동안 배양하여 well의 기벽에 macrophage monolayer를 형성시킨 후, 10% FBS-RPMI에 용해한 다양한 농도의 시료를 첨가하여 동일 배양기에서 24시간 동안 배양하면서 RAW 264.7 세포를 자극하였다.

8. 사이토카인, NO 및 세포독성 측정

RAW 264.7 세포와 시료를 함께 반응시킨 세포배양액은 배양 종료 후 900 rpm, 4℃에서 5 min 동안 원심분리하여 상등액만을 회수하였으며, 상등액 중에 유도된 다양한 사이토카인과 nitric oxide의 함량은 각각 sandwich ELISA set(BD biosciences Co., Ltd.)의 사용방법 및 griess reagent 반응법(Pak 등 2005)을 이용하여 측정하였다. 한편, 다당시료에 대한 세포독성 측정을 위해 배양 종료 후 상등액이 제거된 세포는 PBS에 적당히 희석된 CCK-8을 well당 100 μL를 가하여 재배양한 다음 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, RAW 264.7 세포에 대한 시료의 독성 여부는 시료 대신 배지만이 첨가된 negative control에 대한 생존률(%)로 나타내었다.

9. RNA 추출 및 First-Strand cDNA 합성

RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/mL로 조정한 후 6-well microplate에 1 mL씩 분주하고, 농도별로 희석된 시료를 동량 처리하였다. 이후 세포는 4시간 배양한 후 배양 상등액을 제거하고, PBS로 세척한 후 Trizol reagent(Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 이용해 total RNA를 추출하였다. First-strand cDNA 합성은 1 μg의 total RNA를 사용하

여 Revertaid first strand cDNA kit(Fermentas., Ontario, Canada)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 진행하였다.

10. Reverse transcription-PCR(RT-PCR)

RT-PCR은 Taq DNA polymerase kit(Komabiotech, Seoul, Korea)를 이용, cDNA 2 μL, 5 unit/μL Taq polymerase 1 μL, 10× Taq PCR buffer 2 μL, 2.5 mM 10× dNTP mixture 2 μL 및 10 pM primer 1 μL를 섞고 DEPC 처리수로 전체용량을 20 μL 맞춰 PCR 증폭시켜서 관련된 mRNA의 발현을 확인하였다. Primer는 Fc receptor II(sense, 5'-TGGATCCAGGTGCTC AAGGAA-3', antisense, 5'-CTTCCTTTGCAGTAGTAGTCC-3')를 Genotech사(Daejeon, Korea)에서 제작하여 사용하였으며, Fc receptor II(FcR II)의 PCR은 94℃-5분(초기변성), 94℃-1분(변성, denaturation), 57℃-1분(결합반응, annealing), 72℃-1분(연장반응, extension)으로 33 cycle 증폭 후 72℃-10분(재연장반응, re-extension)으로 DNA thermal cycler(Takara bio., Shiga, Japan)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 산물은 GelRedTM (Biotium Co., Hayward, CA, USA)를 포함한 1% agarose gel을 TAE(Tris-acetate-EDTA) buffer 내에서 100 V로 15분간 전기영동한 후 Gel-doc system(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에서 밴드의 크기를 정량하였다.

11. 통계처리

실험결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계처리하였으며, 평균과 표준편차로 산출하였다. 시료간의 유의성 차이는 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후검정을 실시하여 측정값 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 3종의 전통발효식초로부터 분리한 다당의 화학적 특성

저자들이 최근 선행한 연구에서 다수의 국내산 및 해외산 발효식초를 대상으로 식초에 수용상태로 존재하는 다당을 분리하여 면역증진활성을 검토한 결과, 국내산 현미식초 유래 조다당(KBV-0), 일본산 현미식초 유래 조다당(JBV-0) 및 국내산 감식초 유래 조다당(KPV-0)에 높은 활성이 존재함을 확인한 바 있다(in process). 이에 선별과정에서 확인된 3종의 발효식초를 다량으로 조제하여 재차 활성다당을 분리하고, 그 화학특성을 검토한 결과, KBV-0와 JBV-0는 모두 중성당이 94.5%, 산성당은 5.5%를 함유하는 것으로 나타났으며, KPV-0는 중성당이 82.8%, 산성당이 17.2%로 KBV-0, JBV-0보다 산성당을 더 많이 함유하고 있음을 확인할 수 있었다(Table 1). 한편, 단백질과 일반적으로 식물체 추출물 및 발효물에서 발견되는 TBA-positive material(KDO)은 3종의 전통발효식초 유래 조다당에서는 발견되지 않았으며, 수율의 경우, KBV-0는

Table 1. Chemical properties and sugar composition of three crude polysaccharides isolated from the fermented vinegars manufactured with different raw materials

		KBV-0	JBV-0	KPV-0
Sample[1] (%)[5]	Yield(w/v%)	0.17	0.07	0.10
Chemical properties (Mole%)[6]	Neutral sugar	94.5	94.5	82.8
	Uronic acid	5.5	5.5	17.2
	KDO[2]-liked materials	-[4]	-	-
	Protein	-	-	-
Sugar component[3]	Rhamnose	0.6±0.0	3.1±0.3	13.5±0.7
	Fucose	0.1±0.0	-	1.1±0.0
	Arabinose	2.8±0.1	9.2±0.4	17.5±0.3
	Xylose	3.5±0.1	11.1±0.5	3.1±0.0
	Mannose	20.6±0.1	38.1±0.5	16.8±0.3
	Galactose	6.7±0.1	10.6±0.2	17.6±0.4
	Glucose	60.2±0.2	22.0±0.4	13.3±0.3
	Galacturonic acid+glucuronic acid	5.5±0.0	5.5±0.0	17.2±0.0

[1] KBV-0, crude polysaccharide isolated from Korean brown rice vinegar; JBV-0, crude polysaccharide isolated from Japanese brown rice vinegar; KPV-0, crude polysaccharide isolated from Korean persimmon vinegar.
[2] KDO means 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid. [3] Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method.
[4] Not detected. [5] Percentage (%) was expressed against the dried crude polysaccharide.
[6] Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

0.17%(w/v), JBV-0는 0.07%(w/v), 그리고 KPV-0는 0.10%(w/v)로 전체적으로 낮은 수율을 나타내었다(Table 1). 3종의 조다당 획분들의 구성당 분석을 행한 결과(Table 1), KBV-0와 JBV-0는 모두 주로 glucose, mannose로 구성되어 있었으나, KBV-0의 경우 glucose(60.2%)의 비율이 mannose(20.6%)보다 높게 나타난 반면, JBV-0의 경우에는 반대로 glucose(22.0%)보다는 mannose(38.1%)의 비율이 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 KBV-0와 JBV-0 모두 mannose를 높은 비율로 구성하고 있다는 사실은 원재료인 현미 자체에는 mannose가 거의 존재하지 않다는 점을 고려할 때, 발효식초를 제조하는 과정에서 알코올 발효 단계에 사용된 yeast의 세포벽 최외각 구성 다당인 mannan이 발효 및 숙성과정에서 자가 분해되어 식초에 존재할 가능성을 시사하였다. KPV-0의 경우에는 주로 rhamnose, arabinose, mannose 및 galactose(각각 13.5%, 17.5%, 16.8% 및 17.6%)로 다양한 구성당의 조성을 지니고 있었는데, 이는 원재료인 감 유래의 pectin 물질이 구성되어 있을 가능성을 시사해 주었다. Hwang & Shin(2008)은 이미 감식초에서 유래한 다당을 정제하여 면역활성이 우수한 pectin 유래 arabino-3,6-galatan의 존재를 주장한 바 있다.

한편, 3종의 전통발효식초 유래 조다당 획분은 50 mM ammonium formate(pH 5.5)로 평형화된 Superdex 75 GL column이 장착된 HPLC에 로딩하여 다당의 분자량에 따른 분포를 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타냈다. KBV-0의 경우 다른 시료들보다 저분자 다당이 다량 검출되었는데, 이는 원재료 중에서 전분이 가수분해된 저분자 glucan이 시료 중에 여전히 존재하고 있음을 시사하였으며, JBV-0의 경우에는 비교적 순수하게 고분자 다당만으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. KPV-0는 원재료인 감으로부터 유래된 다양한 분자량의 pectin 물질로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다.

2. 전통 발효식초 유래 조다당과 β-Glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

국내산 감식초 유래 조다당인 KPV-0는 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있어, 이들이 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 높다고 판단되었으므로, 이를 재차 확인하기

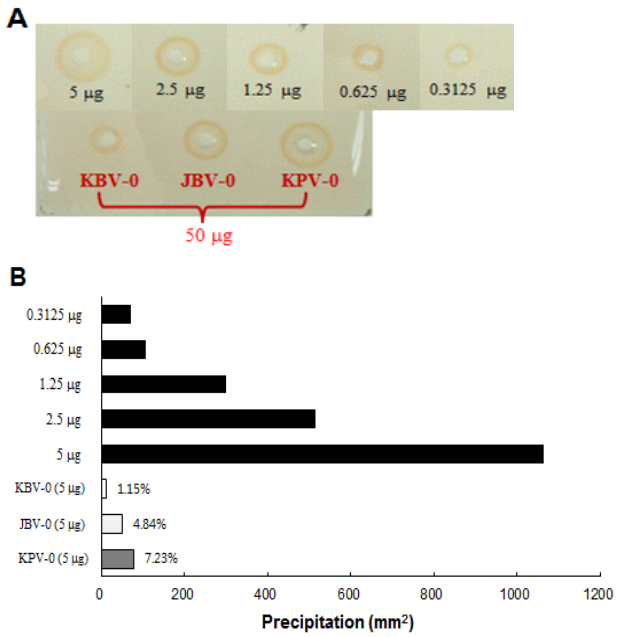
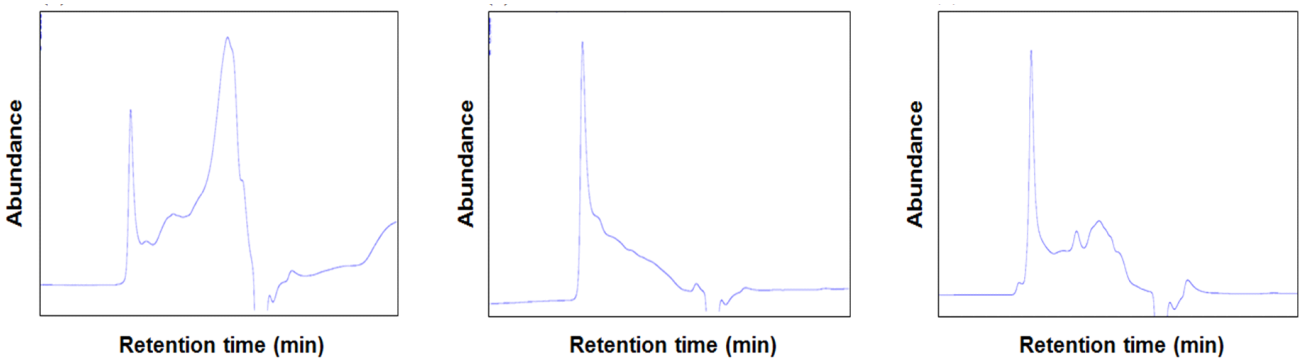


Fig. 2. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β-glucosyl Yariv reagent and three crude polysaccharides isolated from the fermented vinegars. β-Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity to arabino-β-3,6-galactan. Gum arabic was used as a positive reference. The result was calculated to relative percent against positive reference at a same dose (5 μg).



(a) KBV-0 (b) JBV-0 (c) KPV-0

Fig. 1. Elution patterns of three crude polysaccharides isolated from fermented vinegars on high performance size exclusion chromatography. Samples were injected into HPLC system equipped with Superdex 75 GL column and then eluted with 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5) at a flow rate of 0.5 mL/min. Samples refer Table 1.

위해 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하고자 하였다. 국내산 현미식초 유래 KBV-0와 일본산 현미식초 유래 JBV-0의 경우에도 높은 비율은 아니지만 arabinose와 galactose를 함유하고 있으므로 동일한 실험을 진행하였다. β-Glucosyl Yariv reagent[1,3,5-tri-(4-β-glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene]는 arabinogalactan 중 II형의 arabino-β-3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있으며(van Holst & Clarke 1985), 특정 구조를 갖는 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 보고되어 있다. 따라서 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 중 arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위해 single radial 젤의 확산을 행하였다. Arabino-β-3,6-galactan의 표준물질로 사용된 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증가하는 양상을 보여주었으며, 3종의 다당시료에서 모두 침전환 형성이 관찰되었다(Fig. 2). 특히 KPV-0의 경우, 동일양의 gum arabic에 비해 침전환의 크기는 7.23%로, 분자 내 II형 arabinogalactan을 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 이는 KBV-0 또는 JBV-0(각각 1.15 및 4.84%)에 비해 높은 함량으로 존재함으로 확인되었다.

3. 3종의 발효식초 유래 조다당 획분의 RAW 264.7 세포에 대한 독성평가

전통발효식초 유래 다당시료 3종에 대해 RAW 264.7 세포의 다양한 면역활성을 평가하기에 앞서, 다당시료에 대한 독성 여부를 CCK-8 시약을 이용해 측정하였다. 3종의 다당시료는 모두 1.6 또는 8 μg/mL의 낮은 농도수준에서 negative control(NC) 대비 약 10~15% 수준의 약한 독성이 의심되었으나, 농도가 증가함에 따라 오히려 RAW 264.7 세포에 대한 증식을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 즉, KBV-0 및 JBV-0는 시료농도 1,000 μg/mL의 고농도에서 NC의 약 1.5배 정도의 증식활성을 보여주었으며, 특히 KPV-0는 저농도인 40 μg/mL에서부터 증식능을 보여주기 시작하여(NC 대비 1.4배 증식) 1,000 μg/mL의 고농도에서는 1.8배로 높은 증식능을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 이후 RAW 264.7 세포에 대한 전통발효식초 유래 다당에 의한 Fc receptor 발현, NO 및 사이토카인 생성능 측정의 자극농도는 10~1,000 μg/mL의 농도에서 진행하였다.

4. RAW 264.7 세포의 Fc recepor 발현에 미치는 영향

Fc 수용체(Fc receptor, FcR)는 대식세포의 수용체와 관련된 식세포작용(phagocytosis)에서 중요한 역할을 담당하는 수용체 중 하나로, 항원에 결합한 Immunoglobulin G(IgG)의 Fc 부분을 인식하여 항원-항체 복합체를 탐식세포에 부착시키는 opsonin 작용을 유도한 후, phagosome을 형성하고, 탐식세포 내의 lysosome에 의한 식세포작용을 유도한다고 보고되어

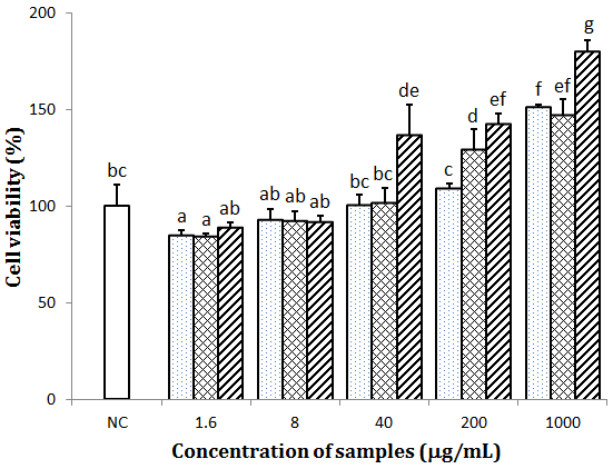
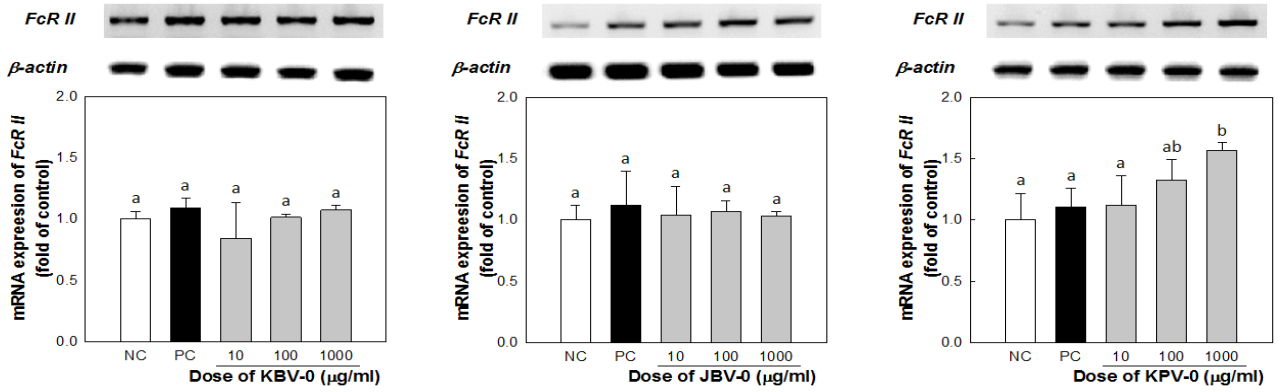


Fig. 3. Cytotoxic effect of three crude polysaccharides isolated from the fermented vinegars on RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cells (2.5×10^5 cells/well) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 24 h. The cell cytotoxicity were determined by cell counting kit (CCK) assay. Only media without sample was used as the NC (negative control, □). KBV-0 (▒), JBV-0 (▩) and KPV-0 (▨). Results are expressed as mean± S.D. of triplicate samples, and are shown as relative viability (%) compared to that of NC. The different superscripts are significantly different ($p<0.05$). Samples refer Table 1.

있다(Indik 등 1995; Nimmerjahn 등 2005; Nimmerjahn & Ravetchb 2006). RAW 264.7 세포에 전통발효식초 유래 조다당을 다양한 농도로 처리한 후 RNA를 추출하고, RT-PCR을 수행하여 Fc 수용체 II(FcR II)의 발현량 증가를 측정한 결과(Fig. 4), KBV-0와 JBV-0는 어떠한 영향도 미치지 않은 반면(Fig. 4A 및 4B), KPV-0는 1,000 μg/mL의 농도에서 유의적으로 FcR II receptor의 발현을 증가시키는 것이 나타남으로써(Fig. 4C), 감식초 유래 다당인 KPV-0가 FcR II 발현을 증가시켜 대식세포의 식세포작용을 증진시킬 수 있음을 추정할 수 있었다.

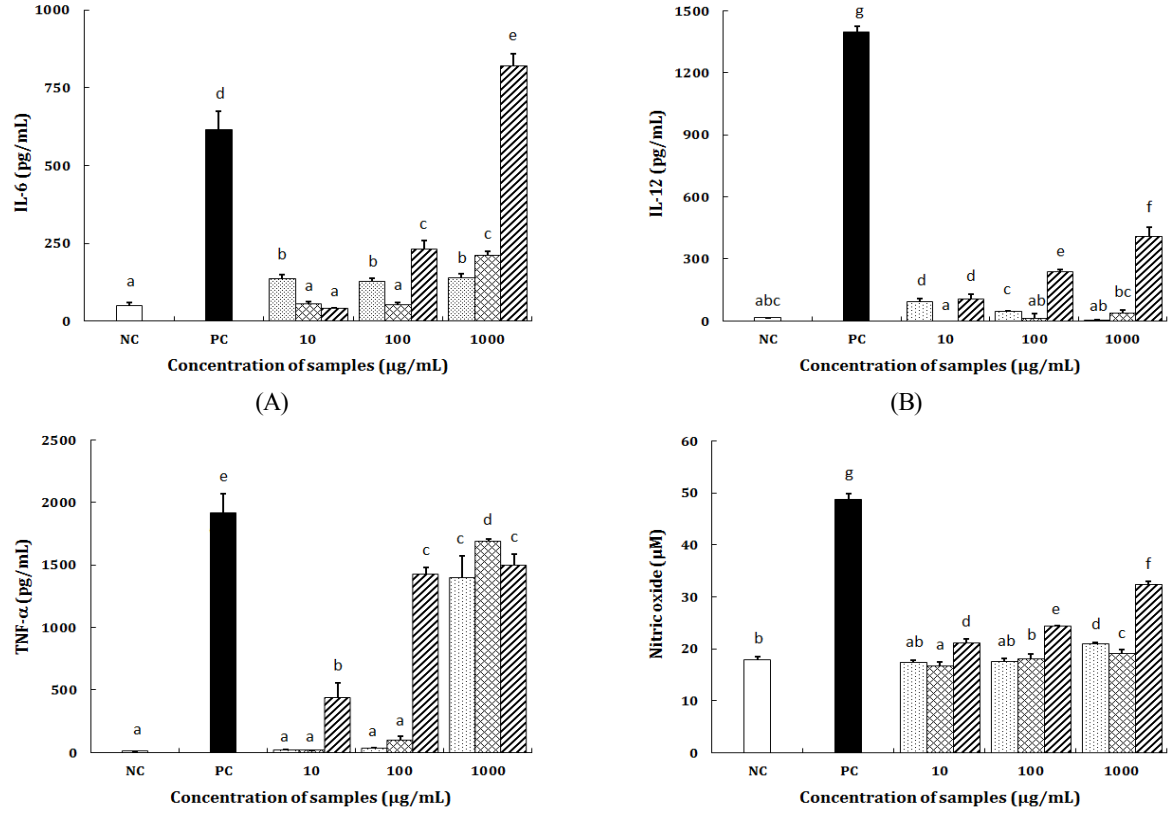
5. RAW 264.7 세포에 의한 NO 및 사이토카인 생성에 미치는 영향

면역세포로부터 분비되는 다양한 사이토카인은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는데, 면역세포간의 복잡한 사이토카인 네트워크를 형성하여 면역계 전체의 반응 및 효율화에 공헌한다고 알려져 있다(Starr 등 1997). 또한, TLR(tool-like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 대식세포를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균작용을 위한 대식세포의 활성, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-6, IL-12 및 TNF-α 등과 같은 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다(Wang 등 2003).



(A) (B) (C)

Fig. 4. FcR II mRNA expression on RAW 264.7 cell stimulated with KBV-0 (A), JBV-0 (B) or KPV-0 (C). A total of 5 μg/mL lipopolysaccharide (LPS, ■) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control, □). Results are expressed as mean±SD of triplicate samples, and different superscripts are significantly different (p<0.05). Samples refer Table 1.



(A) (B)

(C) (D)

Fig. 5. Effect of three crude polysaccharides isolated from fermented vinegars on the production of cytokines and nitric oxide by RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells (2.5×10^5 cells/well) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 or KPV-0 in 96-well plate for 24 h. The productions of IL-6 (A), IL-12 (B) and TNF-α were determined by ELISA, and nitric oxide (D) was estimated by Griess reagent assay. A total of 5 μg/mL lipopolysaccharide(LPS) was used as the PC (positive control, ■) and only media was used as the NC (negative control, □). KBV-0 (▨), JBV-0 (▩), KPV-0 (▨). Results are expressed as mean±S.D. of triplicate samples, and different superscripts are significantly differenet (p<0.05). Samples refer Table 1.

IL-6는 감염과 조직손상에 따른 면역 초기반응에서 생성되는 주요한 반응 매개물질로 TNF-α 등에 의해 유전자 발현이 자극되어 단핵세포, 대식세포, 간질세포 등에 의해 생성되어 급성 염증 반응을 촉진하거나 또는 억제하는 역할을 하며(Hamiltonand & Adams 1987), TNF-α는 림프구에 의해 생산되는 염증 매개성 사이토카인으로 생체 면역반응에서 단독적 혹은 IL-1 등과 같은 사이토카인과 복합적으로 작용하여 종양의 혈관을 손상시켜 결과적으로 종양 괴사를 유발하거나, 미생물에 의한 감염 저항성을 향상시킨다고 보고되어 있다(Visner 등 1990). 또한 IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 사이토카인으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 면역 반응을 유도하여, 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 살해능을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.

KBV-0와 JBV-0는 대식세포를 자극하여 IL-6 생산을 유도함에 있어 비교적 낮은 활성을 나타내었지만, KPV-0의 경우에는 농도의존적으로 활성이 증가하는 경향을 보이면서 1,000 μg/mL의 농도에서는 무첨가 대조군인 음성대조군(negative control, NC)에 비해 16.2배(820 pg/mL)로 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 5A). IL-12의 경우, KBV-0와 JBV-0에서는 NC와 비교하여 농도의존적으로 유의적인 활성 증가를 보여주지 못한 반면, KPV-0에서는 농도의존적인 경향을 나타내어 1,000 μg/mL의 고농도에서 NC의 27.3배(412 pg/mL)로 유의적으로 높은 IL-12 생성능을 나타내었다(Fig. 5B). 한편, TNF-α 생성능의 경우에는 모든 시료에서 농도 의존적인 활성을 보였는데, 고농도인 1,000 μg/mL에서 NC에 비해 136~164배(1,405~1,696 pg/mL)로 우수한 활성을 보여주었다. 하지만 상대적으로 저농도인 10 μg/mL 또는 100 μg/mL에서는 유일하게 KPV-0만이 유의적으로 높은 TNF-α 생성능(43 및 138배)을 나타내었으며(Fig. 5C), 이는 KBV-0 또는 JBV-0에 비해 상대적으로 낮은 농도에서도 대식세포를 활성화시킬 수 있음이 확인되었다.

한편, 대식세포는 인체에 침입한 박테리아나 바이러스 등의 병원균과 암세포 등을 인지하고, 이에 대한 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 제거함으로써, 생체 방어를 담당함과 동시에 면역반응 및 염증반응에 기여하는 nitric oxide(NO) 및 TNF-α 등의 사이토카인을 생산하여 외부에서 침입한 인자들에 대응한다고 알려져 있다(Rosenthal AS 1978; Huber 등 1984). 특히 NO는 생체 내에서 혈압조절, 신호전달 등 다양한 작용을 하는 물질이기도 하지만, 체내로 침입한 박테리아나 바이러스 등을 치사시켜 생체 방어 기전에 중요한 조절자로서 역할을 한다(Ding & Nathan 1988). RAW 264.7 세포에 의한 NO 생성능에 미치는 발효식초 유래 다당의 효과를 검토한 결과, KBV-0 또는 JBV-0는 NC에 비해 유의적인 활성의 변화를 보이지 않은 반면, KPV-0는 1,000 μg/mL 농도에서 NC의 약 1.8배(32.47 μM)에 이르는 높은 NO 생성량을 나타냈으며, 농도 의존적인 생성 증가 양상도 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 5D).

대식세포에 의해 생산된 사이토카인 또는 NO는 interferon와 함께 NK 세포의 활성화를 유도하여 바이러스에 감염된 세포를 선별적으로 사멸시키는 등 다양한 면역자극을 유발한다(Chace 등 1997). 또한 대식세포는 항원제시세포(antigen presenting cell)로서 작용하여 중요한 기여를 한다고 보고되어 있으며, T 세포와 반응함으로써(Birk 등 2001) 이후의 후천면역 반응에 있어서도 배아발생(embryogenesis), 상처 치유, apoptic cell의 제거, 혈세포 증식(hematopoiesis)과정 동안 조직의 재형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Lingen MW 2001; Klimp 등 2002). 따라서 대식세포에 의한 NO 또는 TNF-α, IL-6, IL-12와 같은 사이토카인들의 적절한 생성은 면역체계를 조절하는데 매우 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 본 연구에서 나타난 바와 같이, 감식초 유래 조다당인 KPV-0는 국내산 현미식초 유래 조다당 KBV-0 또는 일본산 현미식초 유래 조다당 JBV-0에 비해 대식세포를 자극함으로써 면역계를 증진시킬 수 있는 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 추후 경구투여나 정맥투여와 같은 직접투여를 통해 본 면역증진 활성을 정확히 입증해야 할 것으로 사료되었으며, 현재 본 실험이 진행 중에 있다.

요 약

본 연구는 한국의 전통발효식초가 지닌 새로운 생물학적 기능을 규명하기 위해 국내 및 국외에서 제조된 전통발효식초로부터 다당류를 분리하여 면역자극활성을 검토하였다. 국내산 현미식초 조다당(KBV-0), 일본산 현미식초 조다당(JBV-0) 및 국내산 감식초 조다당(KPV-0)을 분리하여 구성당 분석한 결과, KBV-0와 JBV-0는 주로 mannan으로 구성되어 있으며, KPV-0는 펙틴 유래 물질로 인한 조성으로 사료되었다. 3종의 다당 시료는 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않은 반면, RAW 264.7 세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF-α와 같은 사이토카인의 생성을 농도 의존적인 경향으로 증진시켰으나, 특히 KPV-0의 활성이 KBV-0와 JBV-0보다 더 우수하였다. 또한 KPV-0는 대식세포의 포식작용과 관련있는 FcR II의 발현량을 유일하게 증가시켰다. 이상의 결과로부터 국내산 전통발효 감식초인 KPV-0는 다른 발효식초에 비해 더 우수한 면역활성을 지니는 것으로 나타났으며, 이는 기능성 소재로의 산업적 응용이 가능할 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2014학년도 경기대학교 대학원 연구원 장학금

지원에 의하여 수행되었음. 또한, 본 연구의 일부는 농림수산식품부 한식세계화용역연구사업(한식 우수성・기능성 연구)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

Bao X, Wang Z, Fang J, Li X. 2002. Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Planta Med* 68:237-243

Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdt S. 2001. Alternative activation of antigen-presenting cells: Concepts and clinical relevance. *Hautarzt* 52:193-200

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Brumenkranzand N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489

Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 84:185-193

Ding AH, Nathan CF. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412

Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168:167

Hamiltonand TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 8:151-158

Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H. 1984. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 160:310-316

Hwang YC, Shin KS. 2008. Characterization of ummuno-stimulating polysaccharides islated from Korean persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 40:220-227

Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399

Jeong YJ. 2009. Current trends and future prospects in the Korean vinegar industry. *Food Sci Ind* 42:52-59

Jonesand 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

Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-*keto*-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative. *Anal Biochem* 85: 595-601

Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44:143-161

Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Ind Nutr* 5:18-24

Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Chio HJ, Shin KS. 2014. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean citrus *Hallabong*. *Carbohydr Polym* 111:72-79

Lee MS, Shin KS. 2013. Macrophage activation by polysaccharides from Korea's commercial and traditional soy sauces. *Korean J Food Nutr* 26:797-805

Lingen MW. 2001. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 125:67-71

Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. 2005. Fcγ RIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23:41-51

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006. Fcγ receptors: Old friends and new family members. *Immunity* 24:19-28

Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. 2005. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-α secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am J Chin Med* 33:415-424

Paulson JC. 1989. Glycoproteins: What are the sugar chains for?. *Trends Biochem Sci* 14:272-276

Rosenthal AS. 1978. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 40:136-152

Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264:13369-13372

Sakanakaand S, Ishihara Y. 2008. Comparison of antioxidant

properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chem* 107:739-744

Seok H, Lee JY, Park EM, Park SE, Lee JH, Lim ST, Lee BW, Kang ES, Lee HC, Cha BS. 2012. Balsamic vinegar improves high fat-induced beta cell dysfunction via beta cell ABCA1. *Diabetes Metab J* 36:275-279

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray L, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921

van Holst GJ, Clarke AE. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148:446-450

Visner GA, Dougall W, Wilson J, Burr I, Nick H. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265:2856-2864

Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. 2000. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 36:1455-1460

Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An *in vitro* cytokine study using mouse macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128

Zhu H, Zhang Y, Zhang J, Chen D. 2008. Isolation and characterization of an anti-complementary protein-bound polysaccharide from the stem barks of *Eucommia ulmoides*. *Int Immunopharmacol* 8:1222-1230

Received 13 October, 2014
Revised 30 October, 2014
Accepted 1 November, 2014