

국내산 시판 간장과 재래식 간장에서 분리한 다당의 장관면역 활성화

이문수 · 신광순[†]

경기대학교 식품생물공학과

Intestinal Immune-Modulating Activities of Polysaccharides Isolated from Commercial and Traditional Korean Soy Sauces

Moon-Su Lee and Kwang-Soon Shin[†]

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Gyeonggi 443-760, Korea

ABSTRACT To characterize novel biologically-active ingredients in traditional Korean soy sauces, polysaccharide fractions were isolated from two different soy sauces made either commercially (CSP-0) or through a traditional Korean process (KTSP-0), after which their intestinal immune-modulating activities were examined. CSP-0 and KTSP-0 showed enhanced production of interleukine-6 (IL-6) in culture supernatant of Peyer's patch cells. However, KTSP-0 activity was more potent than that of CSP-0. Only KTSP-0 increased *in vitro* immunoglobulin A (IgA) production by Peyer's patch cells in a dose-dependent manner. KTSP-0 also showed the higher bone marrow cell proliferation activity through Peyer's patch cells than that of the CSP-0 group. To investigate the *in vivo* effects on the intestinal immune system, CSP-0 and KTSP-0 were administered orally to four experimental groups of mice (0.0, 0.5, 1.0, and 5.0 mg/mouse/day, 30 days). Oral administration of CSP-0 and KTSP-0 induced IgA production by Peyer's patch cells and increased IgA excretion into mouse stools in a dose-dependent manner. Peyer's patch cells from the mice administered both CSP-0 and KTSP-0 showed significantly higher IL-6 production than that of the untreated or CSP-0 groups. However, oral administration of KTSP-0 was more effective at the same dosage. KTSP-0 administration augmented IL-6 content in mouse sera, whereas CSP-0 did not show any effect on IL-6 induction. The above data lead us to conclude that the intestinal immune-stimulating activities of polysaccharides from Korean traditional soy sauce are much better than those of commercial ones.

Key words: soy sauce, polysaccharide, intestinal immune-modulating activity, Peyer's patch, IgA

서 론

탄수화물은 그동안 식물의 구조 성분 및 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나, 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄가 세포간의 인식과 접촉을 통해서 세포의 분화, 정보 전달, 감염 및 암 전이 등의 생명현상에 깊이 관여한다는 사실이 밝혀지고 있다(1,2). 또한 식용 및 약용으로 사용되어 온 한약재, 식품 소재, 담자균류 등에서 유래한 다당류가 보체계 활성화(3), 림프구 증식활성(4), 대식세포 증식활성(5) 및 생리활성(6)을 통한 항암활성을 유도한다는 것이 보고되고 있어 다당류에 의한 면역 활성이 주목받고 있다. 면역반응이 유발되는 데에는 형태적, 기능적으로 다른 조직과 기관이 관여하고 있으며 기능에 따라 1차 및 2차 림프기관으로 구분할 수 있다(7,8). 실질적으로 흉선과 골수처럼 직접 림프구를 생산하고 분화시키는 1차 혹은 중추 림프기관과 림프구와 항원과의 접촉 또는 림프구

간의 상호작용을 돕는 2차 혹은 말초 림프기관으로 분류된다(7-9). 2차 림프기관 중 생체 림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막 림프기관(mucosa-associated lymphatic tissue, MALT)은 수많은 필수 영양소들의 소화와 흡수의 중추적인 장소인 동시에 유해한 이물질들과 병원성 미생물들에 대한 물질적인 장벽 역할을 수행할 뿐만 아니라 중요한 면역학 방어기능을 담당하고 있다(9). 이러한 점막 림프기관 중 장관림프상 조직(gut associated lymphoid tissue, GALT)은 생체 내에서 가장 큰 림프상 조직으로 Peyer's patch, lamina propria, 장간막림프절(mesenteric lymph nodes, MLN) 등으로 구성되어 있다(10). 특히 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 유도부위(inductive site)로 알려져 있다(11). Peyer's patch에는 장내 외부 항원의 수송과정을 담당하는 전문화된 M cell이 존재하고 있으며 M cell의 기저외측 세포막에는 B 림프구, T 림프구, 대식세포 및 수지상세포가 모여 있는데(8,12), 이러한 Peyer's patch 내 세포들의 활성화에 의해 cytokine이 생산되고 이들 cytokine은 B 림프구를 형질세포로 활성화시켜 IgA 분비를 유도한다(13). 분비된 IgA는

Received 19 November 2013; Accepted 26 November 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr, Phone: +82-31-249-9655

호산구나 대식세포 등의 활성화를 유도하여(14), 식세포 작용(15) 및 항체의존성세포상해(ADCC)능(16)을 일으켜 전신면역반응에 관여한다고 알려져 있다. 결국 Peyer's patch를 포함한 장관면역계는 장관의 면역학적 방어계를 조절할 뿐만 아니라 전신면역계의 활성화에도 기여할 수 있다고 사료된다.

간장(soy sauce)은 오랜 전통을 가진 우리나라의 대표적인 발효식품으로 조미료로서 한국의 식문화에서 매우 중요하게 여겨져 왔으며, 점차 세계적으로 사용범위가 넓어지고 있다(17). 간장은 조미료의 기능 이외에도 혈전 생성 억제 활성(18), *Escherichia coli* O157:H7에 대한 항균활성(19), 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone(HMF)과 같은 향기성분의 항암활성(20,21) 및 angiotensin I-converting enzyme(ACE) 억제활성(22) 등의 기능성을 가지고 있다고 보고되어 있다. 최근 일본 간장(Shoyu)으로부터 얻어진 다당의 철분 흡수 증진 효과(23), 알레르기 억제 효과(anti-allergic effects)(24), 장관면역 증진활성(25), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과(26)뿐만 아니라 IgA의 생산을 증가시키는 장관면역 증강 활성을 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통해 밝혀지기도 하였다(25). 현재 시판되는 대부분의 시판 간장은 일본식 간장처럼 밀과 콩을 원료로 하여 곰팡이류에 의해 발효하는 koji 방식으로 만들어지고 있는데, 우리나라의 전통 재래식 간장의 경우 대두만을 사용하고 주로 *Bacillus subtilis* 등 세균에 의해 발효되는 메주 방식으로 제조되므로 시판 간장과 전통 간장 간에는 원료, 제조과정, 발효미생물 및 숙성기간 측면에서 큰 차이가 있으며, 따라서 각각에서 얻어진 간장 유래 다당의 특성도 상이할 것으로 예상된다(27). 최근 저자 등은 시판 양조간장과 재래식 간장으로부터 다당을 분리하여 화학적 특성이 상이함을 보고한 바도 있다(28). 따라서 본 연구에서는 일본식으로 만들어진 시판 간장과 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래식 간장으로부터 얻어진 다당의 장관면역 활성을 비교함으로써, 우리나라 전통간장이 소유한 우수한 기능성을 규명하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 시판 간장은 'A'식품(Korea)의 제품 중 대두와 밀을 주원료로 하여 koji 방식으로 만들어진 100% 양조간장을 대형 유통마트에서 구입하여 사용하였으며, 재래식 간장은 전북 순창에 소재한 농림부 지정 전통식품 제조업체인 'L'전통식품에서 전통방식으로 제조 및 숙성된 간장을 구입하여 사용하였다.

실험동물

실험에 사용된 실험동물은 C3H/HeN(5~6 weeks, ♀)과

ICR mouse(5~6 weeks, ♀)로 G-Bio사(Seoul, Korea)와 새론바이오사(Uiwang, Korea)에서 구입하여 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육 조건은 23±3°C, 습도 55~70%, 물과 사료(Cargill Agri Purina Inc., Minneapolis, MN, USA)는 자유 급식 형태로 유지하였다. 인공조명 아래 1일 12시간씩(오전 9시~오후 9시) 명암 교대하였으며 경기대학교 동물윤리위원회의 허가(2011-06)를 거쳐 규정에 따라 진행하였다.

간장으로부터 다당의 분리

각각의 간장 1 L에 최종농도가 약 80%가 되도록 약 4배의 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 원심분리(6,000 rpm, 635×g, 30 min) 하여 침전물을 얻었으며 여기에 소량의 증류수를 가하여 침전물을 재용해하고 최종농도 약 60%가 되도록 2배의 에탄올을 첨가하여 재차 침전물을 회수하였다. 본 침전물은 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing cellulose membrane(MW cut off 12,000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하였으며 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

일반분석 및 구성당 분석

일반분석 및 구성당 분석방법은 선행 연구(28)의 방법과 동일하게 진행하였다. 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(29)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법(30)으로, 단백질 함량은 표준물질 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(31)으로, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(Kdo)는 thiobarbituric acid (TBA) 비색정량법(32)을 사용하였다. 구성당 분석은 시료를 2 M TFA(Sigma-Aldrich Co.)로 가수분해한 후, 각각 alditol acetate 유도체(33)로 전환시킨 다음 SP-2380 capillary column(0.2 μm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 GC ACME-6100(Young-Lin Co., Anyang, Korea)을 이용하여 표준온도조건[60°C(1 min), 60°C→220°C(30°C/min), 220°C(12 min), 220°C→50°C(8°C/min), 250°C(15 min)]에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

Peyer's patch 세포로부터 IgA 및 IL-6 측정

6주령 C3H/HeN mouse의 소장 외벽에 존재하는 Peyer's patch를 회수하여 PBS가 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속체를 이용하여 조직을 파쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속체로 여과한 후 FBS-MEM(with 10% FBS, Welgene Inc., Daegu, Korea)으로 세척하고 1×10⁷ cells/mL로 세포농도를 조정한 후 96-

well microplate에 100 µL씩 분주하고, 활성을 측정하고자 하는 시료를 다양한 농도로 희석하여 100 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양한 후 상등액을 회수하여 Peyer's patch 세포로부터 생성되는 IgA 및 IL-6를 ELISA kit(IgA: Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA, IL-6: BD Biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

골수세포 증식활성 측정

골수세포 증식활성은 Hong 등(34)의 방법을 실험실 여건에 따라 일부 변형하여 측정하였다. C3H/HeN mouse로부터 Peyer's patch를 회수하고, 2×10⁶ cells/mL로 세포 농도를 조정한 후 96-well microplate에 180 µL씩 분주하였다. 여기에 농도별로 제조된 시료를 20 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 골수세포는 동일종 mouse의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 세척을 거쳐 2.5×10⁵ cells/mL로 세포 농도를 조정하였으며 96-well microplate에 100 µL씩 분주하였다. 이후 Peyer's patch 세포로부터 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 FBS-MEM을 각각 50 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다. 골수세포 증식 측정은 Alamar blue™의 형광시약을 이용하여 살아있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다. 즉, 골수세포와 위에서 얻은 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar blue™ 20 µL를 첨가한 후 형광도를 Victor 2(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하였다.

경구 투여에 의한 mouse Peyer's patch 세포의 IgA 및 IL-6 측정

6주령 ICR mouse에 다당 시료를 0.5, 1.0 및 5.0 mg/mouse의 농도로 1일 1회, 총 30회를 경구 투여하였다. 경구 투여 완료 후, mouse로부터 Peyer's patch를 위에 언급한 방법으로 회수하여 1×10⁷ cells/mL로 세포용액을 만들었다. 12-well plate에 세포용액을 1 mL씩 분주하고, 10% FBS가 들어있는 MEM 배지를 1 mL씩 분주 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양하였다. 이후 배양 상등액 일부를 회수하여 IgA 및 IL-6 함량을 측정하였으며 측정법은 상기한 바와 같이 ELISA kit를 사용하여 분석하였다.

경구 투여한 mouse 분변 내 IgA 측정

경구 투여 후 빈 케이지에 각 실험군별로 mouse를 이동시킨 후 자극 없이 10분간 방치하여 자연적으로 분비되는 분변을 모아 무게를 측정한 후 100 mg/mL의 농도가 되도록 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)를 첨가하고 현탁하였으며 stirrer를 이용하여 충분히 혼합하고 4°C에서 1시

간 방치하였다. 분변액은 2,000 rpm(43×g), 4°C에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하고 이를 이용하여 IgA를 측정하였다. IgA의 측정은 ELISA kit를 사용하여 분석하였다.

경구 투여한 마우스의 혈청 내 IL-6 함량 측정

경구 투여 후 희생시킨 마우스를 심장채혈로 전혈을 채취하고 이를 4°C에 30분간 저장한 후, 10,000 rpm(1,095×g)에서 2분간 원심분리 하여 상등액인 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IL-6 측정은 ELISA kit를 사용하여 분석하였다.

통계처리

실험결과는 IBM SPSS Statistics 21(IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계처리 하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 시료 간 및 처리 농도 간 유의적인 차이는 P<0.05 수준에서 one-way ANOVA(analysis of variation)로 분석한 뒤 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

간장 유래 다당의 화학적 특성

시판 간장과 재래식 간장에서 추출한 다당의 화학적 특성은 본 연구실에서 기발표한 논문(28)과 동일하며 Table 1에 나타내었다. 시판 간장에서 얻어진 다당(CSP-0)은 중성당 64.2%, 산성당 35.8%로 구성되어 있으며, 재래식 간장 유래 다당(KTSP-0)은 중성당 73.5%, 산성당 25.5%로 구성되어 있었다. KTSP-0는 자연계에서 거의 발견되지 않는 특이한 Kdo가 미량 검출되었다. 또한 CSP-0 및 KTSP-0를

Table 1. Chemical properties and yields of CSP-0 and KTSP-0 isolated from commercial and Korean traditional soy sauces

Chemical composition	CSP-0 (%)	KTSP-0 (%)
Neutral sugar	64.2±2.7	73.5±3.6
Uronic acid	35.8±1.7	25.5±0.6
Protein	—	—
Kdo-liked material ¹⁾	—	1.1±0.6
Component sugar ²⁾	(Mole%) ³⁾	
Rhamnose	6.6±0	9.2±0
Fucose	6.1±0	7.5±0
Arabinose	4.5±0	2.9±0
Xylose	15.6±0	12.7±0
Mannose	10.9±0	18.2±0
Galactose	18.0±0	15.9±0
Glucose	2.4±0	7.1±0
Galacturonic acid +Glucuronic acid	35.8±1.7	25.5±0.6
Yield	5.3 g/L	10.7 g/L

¹⁾Kdo means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.
²⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.
³⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate. Above data have been quoted from our recent paper (28).

가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, 두 종류의 시료 모두 9종의 구성당이 분석되었으며 KTSP-0에서 상대적으로 산성당의 함량이 낮게 나타났다. 간장 제조 중의 두 시료의 원료 및 제조과정의 차이로 인해 KTSP-0에서만 특이당 Kdo가 검출되었을 것이라고 추정된다.

간장 유래 조다당의 Peyer's patch 세포에서의 IgA 및 IL-6 생산 활성

IgA는 장관 내 Peyer's patch에 유도되는 면역 항체로 장관 내의 여러 유해한 이물질, 병원성 미생물의 점막 상피 부착을 억제하고, 장내로 유입되는 박테리아, 바이러스에 대한 항체활성을 가지고 있어 장관점막 면역반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(35). 따라서 장내 IgA의 생성량은 점막면역반응의 중요한 지표로 알려져 있다. 본 실험에서는 시판 간장에서 얻어진 조다당(CSP-0)과 전통 재래식 방법으로 제조된 간장에서 얻어진 조다당(KTSP-0)을 Peyer's patch 세포와 배양시킨 후, 배양 상등액 내에 존재하는 IgA 및 IL-6 생산을 측정하였다(Table 2). CSP-0 자극에 의한 Peyer's patch 세포의 IgA의 생산능은 100~5,000 µg/mL의 농도에서 거의 유의적 차이를 나타내지 않았다. 반면 KTSP-0의 경우 모든 농도에서 CSP-0보다 유의적으로 높은 IgA의 생산능을 나타내었으며, 5,000 µg/mL 처리 시 대조군보다 최대 약 2.4배 증가하였다. Peyer's patch 세포의 IgA 분비는 IL-6와 IL-5 등의 cytokine 자극에 의해 이루어진다고 알려져 있다(35). Cytokine은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는 단백질로서, 면역세포로부터 분비되는 용해성 단백질이다(36). Hosono 등(37)은

유산균의 증식을 촉진시킨다고 알려진 fructo-oligosaccharides에 의해 murine Peyer's patch 세포의 IgA 분비가 증가되는 것을 보고한 바 있고, Sato 등(38)은 Peyer's patch 내에 존재하는 수지상세포에 의해 cytokine IL-6가 생산되며 궁극적으로 IgA의 분비를 유도한다고 보고하였다. Peyer's patch 세포에 의해 IL-6의 생산이 이루어졌는지를 확인한 결과 KSTP-0의 경우 500~5,000 µg/mL에서 농도 의존적으로 IL-6의 생산이 유도된 반면, CSP-0의 경우 KTSP-0 처리군보다 동일농도에서 상대적으로 낮은 IL-6 생산유도능을 보였으며 농도 의존적 경향도 보이지 않았다. 이들 결과를 토대로 KTSP-0가 Peyer's patch 세포를 자극하여 cytokine IL-6를 생산하고, 이를 통해 IgA가 분비되었으며 장관면역기능이 활성화됨을 추정할 수 있었다.

간장 유래 조다당의 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성

간장 유래 다당류에 의해 장관면역계의 활성화가 유도된 Table 2의 결과를 바탕으로 장관면역계의 활성화에 의한 전신면역계의 활성화 여부를 골수세포 증식 실험을 통해 확인하였다. 골수는 다양한 면역세포들이 생성되고 성숙하는 장소이며, 백혈구를 비롯한 적혈구, 혈소판 등 혈액 내 대부분의 세포들은 궁극적으로 골수 내 조혈모세포(hematopoietic stem cell)라는 동일한 전구세포에서 생성되어 전신을 순환한다. 따라서 골수세포의 증식은 면역계에서 매우 중요하다고 할 수 있다(31). Table 2에서 사용한 간장 유래 다당과 Peyer's patch 세포의 배양 상등액을 이용하여 골수세포 증식정도를 측정된 결과, CSP-0의 경우 대조군 대비 100 µg/mL의 농도에서 골수세포 증식활성을 나타냈으나 KTSP-0에 비해 미미한 활성을 나타내었다. 반면 KTSP-0는 상대적으로 낮은 농도인 20 µg/mL에서도 증식활성을 보였으며, 100 µg/mL의 농도에서는 대조군보다 유의적으

Table 2. Effect of CSP-0 and KTSP-0 from commercial and Korean traditional soy sauce on *in vitro* production of IgA and IL-6 by Peyer's patch cells

	Dose of polysaccharide (µg/mL)	Relative IgA production (%) ²⁾	Relative IL-6 production (%) ²⁾
Control ¹⁾	—	100±11.0 ^{e3)}	100±1.0 ^f
CSP-0	100	82.9±2.8 ^f	93.6±20 ^f
	500	87.3±5.2 ^{ef}	132.7±2.6 ^{de}
	1,000	108.6±6.8 ^e	141.6±4.0 ^d
	5,000	116.7±3.1 ^{de}	126.2±5.0 ^c
KTSP-0	100	128.2±1.6 ^c	108.6±4.9 ^f
	500	145.8±6.4 ^b	164.7±4.2 ^c
	1,000	156.9±9.0 ^b	186.8±4.7 ^b
	5,000	240.2±5.0 ^a	235.6±6.4 ^a

¹⁾Media alone was treated for the control.

²⁾Peyer's patch cells were obtained, and pooled and cultured with same condition. The each resulting cell-free supernatant was subjected to ELISA for IgA and IL-6.

³⁾Data were expressed as relative production against the control and represented mean±SD of three separate experiments. Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

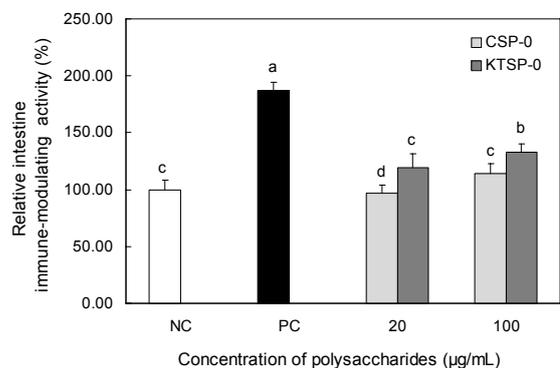


Fig. 1. Effects of CSP-0 and KTSP-0 on intestine immune-modulating activity through Peyer's patch cells *in vitro*. The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay, and each data was expressed as the mean±SD of three separate experiments. For control, only PBS without sample was used. Means with different letters on the bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 이러한 결과는 구성당 분석(Table 1)에서 나타난 바와 같이 간장의 제조 원료, 제조 과정 및 발효 미생물의 차이에 의해 생성된 다당의 구성 차이에 기인한 것으로 추정된다.

간장 유래 다당의 경구 투여에 의한 IgA 및 IL-6 생산 자극 활성화

일반적으로 간장과 같은 식품은 구강을 통해 섭취되기 때문에 경구 투여에 의한 장관면역 활성화 및 그로 인한 전신면역계 활성화 유도를 확인하는 것이 중요하다고 판단된다. 또한 식품에서 분리한 활성성분은 *in vitro*와 달리 섭취된 후 위와 장에 존재하는 다양한 소화효소에 의해 분해될 수 있으며, 이러한 경우 체내의 면역 활성화에도 영향을 줄 수 있기 때문에 이를 확인하는 과정이 필수적이라고 할 수 있다. 간장 유래 다당을 0.0, 0.5, 1.0 및 5.0 mg/mouse의 농도로 30일 동안 mouse에 경구 투여한 후 활성화된 Peyer's patch 세포로부터 IgA 및 IL-6의 생산능을 측정하였다(Table 3). 그 결과 CSP-0 및 KTSP-0를 1.0 및 5.0 mg을 경구 투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서는 대조군에 비해 IgA 생산능이 농도 의존적으로 높게 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, KTSP-0를 5.0 mg/mouse의 농도로 투여한 군에서는 IgA 생산능이 대조군에 비해 약 3.8배 증가하여 동일농도로 투여한 CSP-0(약 3.4배)보다 높은 생산능을 나타내었다. 또한 KTSP-0를 경구 투여한 군의 Peyer's patch 세포로부터 IL-6의 생산능을 확인한 결과, CSP-0를 경구 투여한 군에서는 IL-6의 생산 증가가 현저하지 않았으나 KTSP-0를 투여한 군에서는 모든 농도에서 농도 의존적으로 IL-6의 생산을 증가시켜 5.0 mg/mouse의 농도로 투여한 군에서는 대조군에 비해 약 1.5배 증가하였

다. 간장 유래 다당이 Peyer's patch로부터 IgA의 생산을 증가시켰다는 Matsushita 등(25)의 보고와 같이 간장 유래 다당의 경구 투여는 IgA의 생산을 유도하여 장관면역 활성화에 기여하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 일본식으로 제조된 시판 간장에 비해 전통방식으로 제조된 재래 간장에서 분리한 다당은 IgA의 생산뿐만 아니라 IL-6의 생산도 함께 증가시켜 전신면역에도 영향을 미칠 가능성을 제시하였다.

간장 유래 다당의 경구 투여 후 분변 중 IgA 함량 및 혈청 내 IL-6 생산량

간장 유래 다당의 경구 투여에 의해 Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되면 IgA의 생성능이 증가된 결과로부터 장관 내에 분변 중에는 장내로 분비된 IgA가 상당량이 포함되어 있을 것으로 예측되었다. 따라서 시판 간장 및 재래 간장 유래 다당의 경구 투여 후 분변 중에 존재하는 잔여 IgA를 측정된 결과(Table 4), CSP-0를 농도별로 경구 투여한 군에서 분변 중 잔여 IgA가 농도 의존적으로 증가하였으며 특히 5.0 mg/mouse 투여군에서는 대조군에 비해 약 2.4배 증가하는 것을 확인하였다. KTSP-0의 경우 1.0 및 5.0 mg/mouse를 경구 투여한 군에서 분변 중 IgA 함량이 높게 나타났으며 5.0 mg/mouse를 투여한 군에서는 약 2.6배 증가하여 CSP-0보다 높은 IgA 생산량을 확인하였다. 한편 간장 유래 다당의 경구 투여 후, mouse 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 혈청 내 존재하는 IL-6의 함량을 측정하였다. CSP-0의 경우 혈청 내의 IL-6는 모든 농도에서 대조군과 비교하여 유의적인 생산 증가를 확인하지 못한 반면, KTSP-0를 경구 투여한 경우에는 모든 농도에서 혈청 내 IL-6가 농도 의존적으로 증가하였으며, KTSP-0는 5.0 mg을 경구 투여했을 시, 대조군에 비해 혈청 내 IL-6 양이 약 1.6배 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 간장 유래 다당 시료의 경구 투여에 의해 활성화된 Peyer's patch 세포로부터

Table 3. Effect of oral administration of CSP-0 and KTSP-0 from commercial and Korean traditional soy sauce on production of IgA and IL-6 by Peyer's patch cells

	Dosage of polysaccharide (mg/mouse/day)	Relative IgA production (%) ²⁾	Relative IL-6 production (%) ²⁾
Control ¹⁾	—	100±4.1 ^{e3)}	100±3.6 ^d
CSP-0	0.5	78.5±10.6 ^e	100.5±2.0 ^d
	1	263.2±2.1 ^c	125.7±2.7 ^c
	5	338.3±8.8 ^b	116.2±4.7 ^{cd}
KTSP-0	0.5	99.9±14.8 ^e	129.8±4.7 ^c
	1	227.0±11.7 ^d	136.5±13.2 ^{ab}
	5	379.3±40.6 ^a	147.3±14.8 ^a

¹⁾Distilled water was orally administrated for the control.
²⁾Peyer's patch cells were obtained, and pooled and cultured with same condition. The each resulting cell-free supernatant was subjected to ELISA for IgA and IL-6.
³⁾Data were expressed as relative production against the control and represented mean±SD of three separate experiments. Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of oral administration of CSP-0 and KTSP-0 from commercial and Korean traditional soy sauce on contents of IgA in mouse stools and IL-6 in mouse sera

	Dosage of polysaccharide (mg/mouse/day)	Relative IgA content in stools (%) ²⁾	Relative IL-6 content in sera (%) ²⁾
Control ¹⁾	—	100±3.0 ^{e3)}	100±3.2 ^d
CSP-0	0.5	138.2±2.8 ^d	92.6±3.5 ^e
	1	161.1±6.1 ^c	76.5±0.9 ^f
	5	236.0±4.3 ^b	87.1±1.0 ^e
KTSP-0	0.5	99.7±1.6 ^e	111.2±2.2 ^c
	1	154.1±6.0 ^c	119.8±1.1 ^b
	5	259.4±12.1 ^a	165.1±9.1 ^a

¹⁾Distilled water was orally administrated for the control.
²⁾Each content of IgA and IL-6 was determined by ELISA kits.
³⁾Data were expressed as relative content against the control and represented mean±SD of three separate experiments. Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

터 IgA 생성능을 증가시켜 장관 내로의 IgA 분비를 촉진시킬 수 있음이 확인되었으며, 이러한 사실은 식이 등에 포함되어 장내로 유입된 각종 항원을 신속하게 제거하는데 기여할 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 재래식 간장으로부터 유래된 다당은 IgA 생산을 통한 장관면역을 활성화할 뿐만 아니라, IL-6 등과 같은 면역관련 cytokine의 생산 증가를 유도하여 전신면역의 활성화에도 기여할 수 있음을 추론할 수 있었다.

요 약

간장 중에 존재하는 새로운 생물활성 성분을 규명하기 위해 일본식으로 제조된 시판 간장(CSP-0)과 우리나라 전통방식으로 제조된 재래식 간장으로부터 다당(KTSP-0)을 분리하여 장관면역 활성화에 대하여 비교, 검토하였다. Peyer's patch 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 간장 유래 다당인 CSP-0와 KTSP-0는 IL-6 생산 자극활성을 증가시켰지만 KTSP-0가 CSP-0보다 상대적으로 높게 나타났다. 또한 KTSP-0는 모든 농도에서 대조군에 비해 IgA 생산능을 유의적으로 증가시켰으나, 시판 간장 유래 다당인 CSP-0의 경우 IgA 생산증가에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식능에서 KTSP-0는 100 µg/mL의 농도에서 대조군에 비해 높은 장관면역 활성을 나타냈으며, CSP-0는 골수세포 증식능이 거의 없는 것으로 확인되었다. 간장 유래 다당에 의한 *in vivo* 장관면역 활성을 관찰하기 위해 0.0, 0.5, 1.0 및 5.0 mg/mouse의 농도로 30일간 경구 투여하고 Peyer's patch 세포에 의한 IgA 생산능을 측정된 결과, CSP-0와 KTSP-0를 경구 투여한 mouse 군에서 농도 의존적으로 우수한 IgA 생산 증진 활성을 보였으며 분변 중에 존재하는 IgA 함량을 증가시켰다. Peyer's patch 세포에 의한 IL-6 생산능을 측정된 결과, CSP-0 및 KTSP-0를 투여한 mouse의 Peyer's patch 세포들은 대조군에 비해 모두 IL-6의 생산능을 증진시켰으나 동일 투여 농도에서 KTSP-0의 효과가 더 우수하였다. 또한 KTSP-0의 경구 투여는 혈청 내 IL-6를 높게 증가시키는 반면 CSP-0는 IL-6 생산에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 토대로 본 연구를 통해 시판 간장보다 전통 재래식 간장이 높은 장관면역 활성화 효과를 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 이는 간장 제조 원료 및 제조과정과 발효에 관여하는 미생물의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 경기대학교 연구년 수혜로 연구되었음.

REFERENCES

1. Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
2. Paulson JC. 1989. Glycoprotein: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-276.
3. 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: 1220-1230.
4. 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.
5. Zhao L, Dong Y, Chen G, Hu Q. 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym* 80: 783-789.
6. Daba AS, Ezeronye OU. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Afr J Biotechnol* 2: 672-678.
7. Abbas AK, Lichtman AK, Pillai S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Netherlands. p 59-64.
8. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. 2007. *Kuby Immunology*. 6th ed. WH Freeman and Co., New York, NY, USA. p 43-50.
9. Yu KW, Shin KS. 2001. Bone marrow cell proliferation activity through intestinal immune system by the components of *Atractylodes lancea* DC. *Korean J Food Sci Technol* 33: 135-141.
10. Deitch EA, Xu DZ, Qi L, Specian RD, Berg RD. 1992. Protein malnutrition alone and in combination with endotoxin impairs systemic and gut-associated immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16: 25-31.
11. Sminia T, Wilders MM, Janse EM, Hoefsmit EC. 1983. Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiology* 164: 136-143.
12. Trier JS. 1991. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-547.
13. Bockman DE, Cooper MD. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-477.
14. Ouadrhiri Y, Pilette C, Monteiro RC, Vaerman JP, Sibille Y. 2002. Effect of IgA on respiratory burst and cytokine release by human alveolar macrophages: role of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases and NF-κB. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 315-332.
15. Weisbart RH, Kacena A, Schuh A, Golde DW. 1988. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature* 332: 647-648.
16. Tagliabue A, Nencioni L, Villa L, Keren DF, Lowell GH, Boraschi D. 1982. Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA. *Nature* 306: 184-186.
17. Yokotsuka T. 1986. Soy sauce biochemistry. *Adv Food Res* 30: 195-329.
18. Tsuchiya H, Sato M, Watanabe I. 1999. Antiplatelet activity of soy sauce as functional seasoning. *J Agric Food Chem* 47: 4167-4174.
19. Masuda S, Hara-Kudo Y, Kumagai S. 1998. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce, a fermented seasoning. *J Food Prot* 61: 657-661.

20. Benjamin H, Storkson J, Nagahara A, Pariza MW. 1991. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res* 51: 2940-2942.
21. Kataoka S, Liu W, Albright K, Storkson J, Pariza M. 1997. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H₂O₂ concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy sauce. *Food Chem Toxicol* 35: 449-457.
22. Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. 1993. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1107-1110.
23. Kobayashi M, Nagatani Y, Magishi N, Tokuriki N, Nakata Y, Tsukiyama R, Imai H, Suzuki M, Saito M, Tsuji K. 2006. Promotive effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on iron absorption in animals and humans. *Int J Mol Med* 18: 1159-1163.
24. Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama R, Sugimura T, Yamamoto K. 2004. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med* 14: 879-884.
25. Matsushita HF, Kobayashi M, Tsukiyama R, Fujimoto M, Suzuki M, Tsuji K, Yamamoto K. 2008. Stimulatory effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system. *Int J Mol Med* 22: 243-247.
26. Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama R, Yamamoto K. 2006. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating activities of Shoyu polysaccharides from soy sauce. *Int J Mol Med* 17: 905-909.
27. Lee JG, Kwon KI, Choung MG, Kwon OJ, Choi JY, Im MH. 2009. Quality analysis on the size and the preparation method of Meju for the preparation of Korean traditional soy sauce (Kanjang). *J Appl Biol Chem* 52: 205-211.
28. Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H, Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J Food Sci Technol* 44: 228-234.
29. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
30. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
31. 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.
32. 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 bacteria. *Anal Biochem* 85: 595-601.
33. Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatography method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol* 49: 926-936.
34. 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) medicine "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360.
35. 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, England. p 275-285.
36. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921.
37. Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R. 2003. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 758-764.
38. Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. 2003. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol* 171: 3684-3690.