

상이한 재료로 제조된 발효식초 유래 다당의 화학적 특성과 면역증진 활성

김동수¹ · 허병석² · 신광순¹

¹경기대학교 식품생물공학과
²샘표식품주식회사

Chemical Characteristics and Immuno-Stimulatory Activity of Polysaccharides from Fermented Vinegars Manufactured with Different Raw Materials

Dong-Su Kim¹, Byung Serk Hurh², and Kwang-Soon Shin¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

²Sempio Food Company

ABSTRACT To elucidate the immuno-stimulatory activity of traditional fermented vinegar, six kinds of crude polysaccharides were isolated from traditional fermented vinegars manufactured with different raw materials in domestic or foreign countries, after which their chemical properties and immuno-stimulatory activities were evaluated. Of the six samples, three kinds of crude polysaccharides prepared from Korean brown rice vinegar (KBV-0), Japanese brown rice vinegar (JBV-0), and Korean persimmon vinegar (KPV-0) showed higher yields and interleukin (IL)-6 production by macrophages and were thus selected for further study. Anti-complementary activities of KBV-0, KPV-0, and JBV-0 increased dose-dependently. KBV-0 and KPV-0 showed higher anti-complementary activities (ITC₅₀ 62 and 65%) than JBV-0 at 1,000 µg/mL. KBV-0, KPV-0, and JBV-0 did not affect growth of peritoneal macrophages at a dose of 1.6 to 1,000 µg/mL, where as they significantly augmented production of IL-6, IL-12, and TNF-α in a dose-dependent manner. However, immuno-stimulatory activity of KPV-0 was the most potent among the tested polysaccharides. These results suggest that Korean fermented vinegars contain selected polysaccharides that confer immuno-stimulatory activities beneficial to human health.

Key words: fermented vinegar, polysaccharide, anti-complementary activity, macrophage, cytokine

서 론

식초는 동서양 모두에서 애용되고 있는 오랜 역사를 지닌 전통발효 식품으로 초산을 포함하여 소량의 휘발성 및 비휘발성 유기산, 당류, ester 등을 함유하고 독특한 방향과 신맛을 갖고 있는 기호식품이다(1). 식초는 크게 곡류, 과실류, 주류 등을 주원료로 발효시켜 제조한 발효식초와 빙초산 또는 초산을 희석하여 만든 합성식초로 분류된다(2). 이 중 발효식초는 합성식초에 비해 산도는 낮으나 풍부한 맛과 영양을 지니고 있으며 우리나라에서는 1990년 감식초를 시작으로 꾸준히 소비자의 선호도가 높아지고 있는 추세이다(1). 일본 식초시장의 경우 양조식초의 소비가 전체의 약 95% 이상을 차지하고 있으며 국내에서도 천연 발효식초의 소비는 더욱 크게 성장할 것으로 기대되고 있다(2). 한편 한국 식초의 용도별 생산비율은 조미용 60%, 음료용이 40%를

차지하고 있으며, 종류별 비율은 사과식초 39%, 현미식초 14%, 기타 양조식초 6%로 천연 발효식초, 특히 음료용 식초의 소비가 매년 증가하는 추세이다(3,4). 최근 식생활의 다양화와 함께 품질이 우수하고 안전성이 확보된 양조식초에 대한 소비자의 요구가 크게 높아지고 있어 사과, 감, 배, 매실 등의 새로운 과일이나 야채 등을 이용하여 독특한 풍미를 가진 발효식초를 개발하고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다(5). 더욱이 건강에 대한 소비자의 인식이 날로 높아지면서 천연재료를 원료로 알코올 발효를 거친 술덧을 재차 초산 발효하는 2단계 발효에 의해 제조된 제품들이 다양하게 생산되고 있다.

발효식초에는 초산을 비롯하여 원료에 따른 유기산, 유리당 및 폴리페놀 등 다양한 영양물질이 함유되어 있다고 알려져 있으며(1), 소화액 분비 촉진, 피로회복, 비만 방지, 혈압 상승 방지, 노화 방지 및 항종양 효과, 항당뇨 및 항산화 활성(6-10) 등 다양한 생리활성이 다수 보고되고 있다. 특히 발효식초들은 원료인 생과 및 곡류와 비교할 때 발효과정 동안 화학적 변화에 의해서 원료에는 함유되어 있지 않은 미지의 물질들과 생리활성을 지닌 물질들을 함유하게 될 가능성이 높아지게 되는데, Na 등(11)은 다양한 원료로부터

제조한 시판 발효식초로부터 유기산, 폴리페놀 및 GABA 함량 등을 비교한 결과를 보고하기도 하였다.

하지만 발효식초에서 보고되고 있는 모든 약리활성이 유기산 또는 polyphenol 등 저분자 물질들만의 기능이라고는 할 수 없으며 생리활성을 갖는 다 화합물, 특히 고분자물질의 존재 가능성이 있을 수 있다. 일반적으로 다당은 고농도의 알코올 용액에서 침전되는 성질 때문에 그동안 발효음료(알코올음료 혹은 알코올발효를 경유한 식초음료) 중의 활성성분으로 주목받지 못하였지만 발효식초에서처럼 비교적 낮은 알코올 농도(5~10%)에서는 선택적으로 용해되어 존재할 가능성이 있다(12). 다당류를 포함하는 탄수화물은 지금까지 식물체의 구조 성분 및 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄(sugar chain)가 세포 간의 인식과 접촉을 통해서 세포의 분화, 정보 전달, 감염 및 암전이 등의 약리적인 효능을 갖는다고 알려져 다당류의 기능성에 대한 관심이 집중되고 있다(13-15). 또한 식용 및 약용으로 사용되어 온 식품소재 및 생약재 등에서 유래한 다당류에서 보체계 활성화(16), 림프구 증식활성(17), 대식세포 증식활성(18) 및 암전이 억제활성(19)을 통한 항암활성을 유도한다는 과학적인 근거가 보고되고 있어 다당류에 의한 생리활성, 특히 체내 면역계를 활성화하는 역할이 주목받고 있다. 그럼에도 이제까지 발효 식초 유래 다당의 생리활성에 대한 연구는 극히 미진한 실정에 있다.

따라서 본 연구에서는 국내외로부터 입수한 발효식초를 대상으로 다당류를 분리하고 이들이 나타내는 면역증진 활성 및 화학 특성을 비교 평가함으로써 국내 전통발효식초의 우수성과 전통발효식초 유래 다당의 새로운 기능성을 해명하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 식초는 국내외에서 시판 또는 생산되는 전통발효식초 6종으로 국내산 전통발효식초 4종(사과식초, 와인식초, 현미식초 및 감식초)과 수입산 발효식초 2종(영국산 와인식초 및 일본산 현미식초)이었으며 2012년 9월 시중 대형 판매장 및 생산회사로부터 구매하여 실험에 사용하였다.

시약 및 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 inbred mice BALB/c(6주령, 웅성)로 새론바이오(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 일주일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육 조건은 23±3°C, 습도 55~70%였으며 물과 사료(Cargill Agri Purina Inc., Minneapolis, MN, USA)는 자유 급식 형태로 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다. 인공조명 아래에 1일 12시간씩(오전 9시~오후 9시) 명암을 교대하였으

며 경기대학교 동물윤리위원회의 허가(2013-003)를 거쳐 규정에 따라 진행하였다. 면역활성 측정의 동물세포 배양을 위한 RPMI-1640 medium과 fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin/streptomycin은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 대조군으로 사용된 LPS(lipopolysaccharide from *E. coli* O127:B8)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, 세포증식능 측정에 사용한 cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)로부터 구입하였다.

국내외산 전통발효식초로부터 조다당의 분리

6종의 국내외산 전통발효식초는 각각 5배 농축하여 초산 및 휘발성 성분을 제거하고 4배 부피(v/v%)의 95% ethanol을 가하여 24시간 동안 다당을 침전시킨 후, 원심분리(6,000 rpm, 30분, 4°C) 하여 침전물을 분리하였다. 침전물은 소량의 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing(MW cut off 12,000~14,000, Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 2~3일간 투석을 진행하였다. 이후 동결건조(FreezeZone 12 Liter, Labconco Co., Kansas City, KS, USA) 하여 각각 국내 사과식초 유래 조다당(Korean apple vinegar, KAV-0), 국내 와인식초 유래 조다당(Korean wine vinegar, KWW-0), 국내 현미식초 유래 조다당(Korean brown rice vinegar, KBV-0), 국내 감식초 유래 조다당(Korean persimmon vinegar, KPV-0), 영국 와인식초 유래 조다당(United Kingdom wine vinegar, UWV-0) 및 일본 현미식초 유래 조다당(Japan brown rice vinegar, JBV-0)으로 조제하여 실험에 사용하였다.

일반분석방법

전통발효식초 유래 조다당획분의 일반성분을 분석하기 위해 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(20)으로 분석하였고 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법(21)으로 분석하였으며, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford법(22)으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid법(23)으로 각각 정량 분석하였다. 모든 표준물질 및 분석시약은 Sigma-Aldrich Co.부터 구매하여 실험에 사용하였다.

구성당 분석

구성당 분석은 Jones와 Albersheim(24)의 방법을 일부 변형하여 다당을 가수분해하고 각각의 다당을 alditol acetate로 유도체화한 후 gas chromatography를 이용해 분석하였다. 국내외 발효식초 유래 조다당 시료는 2 M TFA(trifluoroacetic acid) 상에서 121°C, 90분간 반응시켜 가수분해한 후 1 mL의 1 M NH₄OH 용액에 용해하여 10 mg의

NaBH₄(Sigma-Aldrich Co.)로 4시간 동안 개환 및 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후 수차례 MeOH를 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하고 각 구성당에 상응하는 alditol로 전환하였다. 이후 각각의 alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고 건조시켜 alditol acetate 유도체로 전환시킨 다음에 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. Alditol acetate 유도체를 분석하기 위한 조건으로는, SP-2380 capillary column(0.2 μm×0.25 mm×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young Lin Co., Gyeonggi, Korea)을 이용하여 초기 오븐온도 60°C에서 1분 동안, 60°C에서 220°C까지 분당 30°C의 온도로 승온시켰으며 220°C에서 12분 동안 유지시켰다. 이후 220°C에서 분당 8°C의 온도로 승온시켰으며 250°C에서 15분까지 유지시켜 분석을 실시하였다. 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak 면적, 분자량 및 flame ionization detector(FID)에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

HPLC에 의한 다당의 분자량 분포 및 정제도 확인

6가지 전통발효식초에서 유래한 조다당획분은 각각 50 mg/mL의 농도로 제조하여 0.2 μm membrane filter(Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용해 여과한 후, 50 mM ammonium formate(pH 5.5)로 평형화된 Superdex™ 75 GL column(GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)이 장착된 HPLC(Agilent Technologies Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였고, 전체 구성 다당의 분자량에 따른 분포를 관찰하였다.

보체계 활성화능

항보체 활성은 Mayer법(25)을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca²⁺, 10 mM Mg²⁺이 함유된 GVB²⁺ 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 각각 50 μL씩 혼합하여 37°C에서 30분 동안 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB²⁺를 350 μL씩 첨가하고 이를 10~160배까지 연속 희석하였다. 여기에 750 μL의 GVB²⁺와 양의 감각적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 250 μL씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 4°C의 PBS(phosphate buffered saline)를 2.5 mL 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였으며 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 총보체 용혈 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis: ITCH₅₀)로 나타내었다.

대식세포 배양 및 사이토카인 분석

BALB/c 마우스 복강에 5% thioglycollate medium (Sigma-Aldrich Co.) 1 mL를 주입하여 96시간이 경과된 후에 유도된 macrophage를 회수하여 사용하였다. 회수한 macrophage는 100 U/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin 및 125 ng/mL의 fungizone과 amphotericin B 및 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 medium(FBS/RPMI)으로 세척하고 세포수가 2.5×10⁶이 되도록 계수하여 FBS/RPMI에 재분산시킨 후, 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 분주하고 2시간 동안 배양하여 well의 기벽에 macrophage monolayer를 형성시켰다. 다음으로 FBS/RPMI에 용해한 각각의 조다당 시료를 3.2~2,000 μg/mL의 농도가 되도록 5배수로 연속 희석하여 동일 plate에 100 μL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하면서 macrophage를 자극하였다(26). 배양 종료 후 세포 배양 상등액을 회수하고 상등액 중에 유도된 다양한 사이토카인의 함량은 해당 sandwich ELISA kit(BD Biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였으며, 시료에 의한 세포독성은 CCK-8을 이용한 water soluble tetrazolium(WST) assay(27)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

국내외 발효식초로부터 분리한 다당의 화학적 특성

본 연구에서는 국내외에서 생산된 다양한 발효식초로부터 다당류를 분리하고 이들의 특성을 확인하기 위하여 4종의 국내산 전통발효식초, 즉 국내산 사과식초, 와인식초, 현미식초 및 감식초와 2종의 수입산 전통식초인 영국산 와인식초 및 일본산 현미식초에 존재하는 조다당을 회수하였다. KWV-0의 수율이 0.45%로 가장 높았으며, KAV-0는 0.02%로 가장 낮은 수율을 나타내었다(Table 1). 국내산 와인식초와 현미발효 식초와 같이 다당의 수율이 상대적으로 더 높은 것은 제품개발에 유의할 것이라 판단되며, 이후 다당의 면역활성을 평가하여 종합적으로 시료의 특성을 판단하고자 하였다.

6종의 전통식초 유래 조다당을 대상으로 일반 화학특성을 분석한 결과 KAV-0, KBV-0, JBV-0, KWV-0 모두 87.0% 이상의 중성당(87.6~92.2%)과 함께 소량의 산성당(7.8~12.4%)을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, KPV-0

Table 1. Chemical properties of crude polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials

Sample ¹⁾	KAV-0	KPV-0	KBV-0	KWV-0	JBV-0	UWV-0
Yield	0.23 g/L (0.02%)	0.62 g/L (0.08%)	0.96 g/L (0.10%)	4.18 g/L (0.45%)	0.5 g/L (0.07%)	0.44 g/L (0.04%)
Chemical properties						(%) ⁴⁾
Neutral sugar	89.0±2.6	78.4±1.1	87.6±2.5	87.9±0.5	92.2±2.4	78.9±0.7
Uronic acid	11.0±0.5	21.6±5.1	12.4±0.4	12.1±0.1	7.8±0.4	21.1±0.3
KDO ²⁾ -liked material				ND ⁶⁾		
Protein				ND		
Sugar component ³⁾						(Mole%) ⁵⁾
Rhamnose	12.9±0.4	24.8±0.3	2.2±0.1	6.1±0.2	6.2±0.3	13.2±0.3
Fucose	0.1±0.0	1.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	1.5±0.0
Arabinose	13.2±0.1	18.6±0.2	5.5±0.2	8.6±0.2	13.0±0.4	15.8±0.2
Xylose	0.8±0.1	1.4±0.1	6.2±0.3	0.4±0.0	17.2±0.4	1.3±0.5
Mannose	35.1±3.7	9.2±0.1	23.1±0.1	10.4±0.2	28.6±0.5	28.0±0.3
Galactose	12.5±5.0	13.1±0.2	9.8±0.1	4.8±0.1	9.7±0.3	15.9±0.3
Glucose	13.8±0.9	10.1±0.2	40.1±0.4	56.9±0.6	17.4±0.6	3.2±0.1
GalA+GlcA	11.0±0.5	21.6±5.1	12.4±0.4	12.1±0.1	7.8±0.4	21.1±0.3

¹⁾KAV-0: the crude polysaccharide (CP) from Korean apple vinegar, KPV-0: CP from Korean persimmon vinegar, KBV-0: CP from Korean brown rice vinegar, KWV-0: CP from Korean wine vinegar, JBV-0: CP from Japanese brown rice vinegar, UWV-0: CP from United Kingdom's wine vinegar.

²⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

³⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method.

⁴⁾Percentage (%) in the dried sample. ⁵⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate. ⁶⁾ND: not detected.

와 UWV-0는 주로 중성당(78.4~78.9%)으로 구성되어 있었고, 상대적으로 산성당(21.1~21.6%)을 높은 비율로 함유하고 있어 다른 특성을 나타내었다(Table 1). 각 조다당 시료에는 단백질을 또는 일반적으로 식물체 추출물 및 발효물에서 발견되는 TBA-positive material(KDO)이 6종의 시료에서 모두 함유되어 있지 않았다(Table 1). 이들의 구성당 조성을 확인하고자 6종의 국내외 발효식초 유래 조다당을 alditol acetate 유도체화법을 통한 GC로 분석한 결과 일반적으로 면역활성에는 기여하지 않으면서 전분의 형태로 존재하는 glucose를 제외했을 때 KAV-0와 UWV-0는 mannose(28.0~35.1%)를 가장 높은 비율로 함유하면서 rhamnose(12.9~13.2%), arabinose(13.2~15.8%)와 galactose(12.5~15.9%)를 비슷한 함량으로 구성하고 있는 것으로 나타났다. 한편 JBV-0는 mannose(28.6%), xylose(17.2%), glucose(17.4%) 및 arabinose(13.0%)를 주요 구성당으로 함유하고 있어 여타의 발효식초 유래 조다당과는 다른 조성을 나타내었다(Table 1).

특히 KBV-0와 KWV-0는 glucose를 각각 40.1%, 56.9%의 높은 비율로 함유하고 있었다. 이는 KBV-0의 경우 발효 중 미생물이 생산하는 amylase에 의해 분해되지 않은 limit dextrin이 높은 비율로 존재함을 시사하며, KWV-0는 재료 또는 보당과정 중에 첨가된 당이 투석과정 중 분리되지 않은 glucose로 존재할 가능성이 예견되었다.

6종의 조다당 획분은 50 mM ammonium formate(pH 5.5)로 평형화된 Sephadex 75 GL column을 이용하여 HPLC를 행하여 전체 구성 다당의 분자량에 따른 분포를 관찰한 결과 Fig. 1의 chromatogram에서와 같이 KAV-0

와 JBV-0의 경우 다른 시료들에 비해 고분자 다당만을 주 구성분자로 함유하고 있었다. 또한 KBV-0와 KWV-0는 Table 1의 구성당 결과에서 glucose를 다량 함유하고 있었는데 Fig. 1에 나타난 바와 같이 타 시료에 비해 분자량이 상이한 저분자 다당이 다량 검출되었으며, 이는 oligo당 또는 limit dextrin 형태의 저분자 glucan이 발효과정 중에 식초에 용해되어 존재함을 추정하게 하였다.

발효식초 유래 다당이 대식세포의 IL-6 생산에 미치는 영향

대식세포(macrophage)는 인체의 모든 조직에 분포하며 면역계에 중요한 역할을 담당하는 선천면역계의 대표적인 탐식세포로 알려져 있다. 이들은 체내로 침입한 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 식세포작용(phagocytosis)을 통해 잠재적인 병원체를 제거하며 면역매개물질인 다양한 사이토카인을 분비하여 타 면역세포의 활성화를 유도하는 등 전체 면역반응의 활성화에 기여한다. 또한 활성화된 대식세포는 다양한 사이토카인을 분비, 비정상 세포, 세포 노폐물, 세포 내 바이러스 등을 제거하는 데 중요한 역할을 하며 class II MHC 단백질을 세포 표면에 발현하여 보조 T 세포와 상호 활성화를 이루기도 한다. 즉 대식세포는 항원을 탐식, 분해(processing)하여 그 일부를 자신의 세포 표면에 부착, 제시(presentation)함으로써 T 세포에 의한 면역반응을 유도하여 후천성 면역계가 작동할 수 있도록 해주는 effector cell로서 작용한다(28-31).

국내의 발효식초 유래 조다당의 직접 자극에 의한 대식세포의 사이토카인 생산을 *in vitro*에서 측정된 결과 KBV-0와 KPV-0는 모두 농도 의존적으로 IL-6의 생산을 촉진하

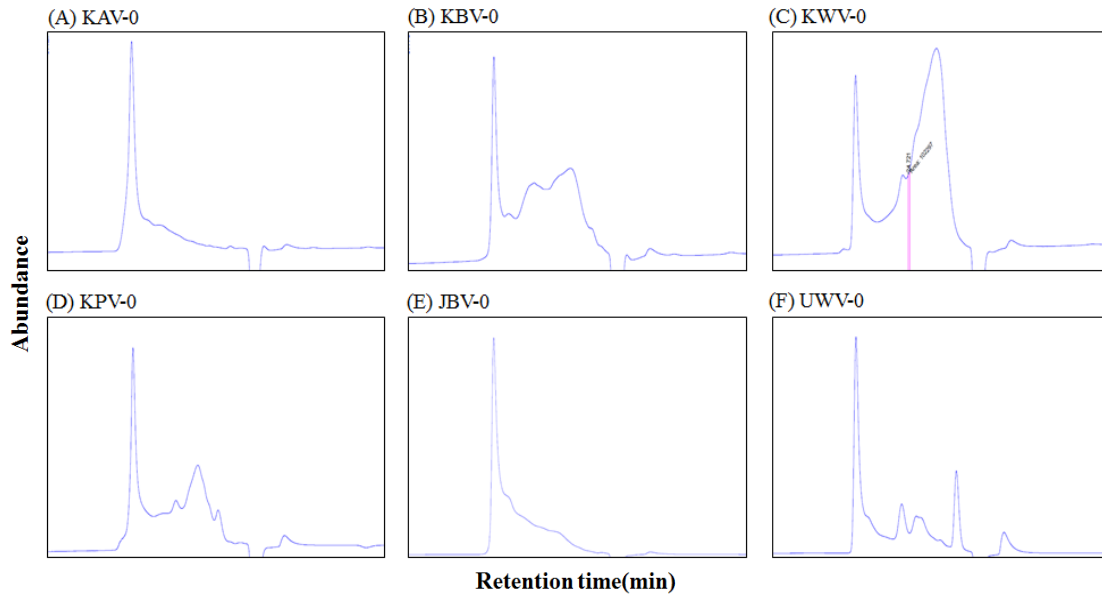


Fig. 1. Elution patterns of six crude polysaccharides isolated from fermented vinegars on size exclusion HPLC. HPLC was equipped with Superdex 75 GL column.

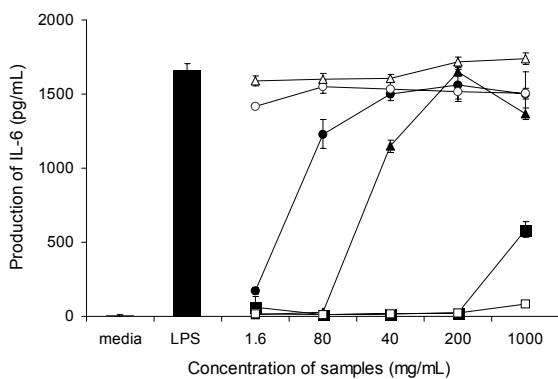


Fig. 2. Effect of crude polysaccharides from fermented vinegars on interleukin (IL)-6 production by peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/mL) were treated with various concentrations of crude polysaccharides for 24 h. The concentrations of IL-6 in the cultured medium were determined by ELISA assay. Lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/mL) was used as the positive control and only medium was used as the negative control. Results are expressed as mean±SD of triplicate samples. KBV-0 (●), JBV-0 (○), KPV-0 (▲), KAV-0 (△), KWV-0 (■), UWV-0 (□).

였으며, 시료 농도에 따른 생산자극 pattern 또한 두 시료가 유사함을 확인하였다(Fig. 2). 특히 KAV-0 및 JBV-0는 1.6~8 µg/mL 이하의 저농도에서도 1,000 µg/mL에서와 유사 정도의 양호한 IL-6의 생산 유도 활성을 나타내었다. 반면 KWV-0와 UWV-0는 다른 4종의 시료에 비해 상대적 활성이 매우 낮았으며, 특히 UWV-0는 1,000 µg/mL의 고농도에서도 활성을 거의 나타내지 않는 특성을 보였다. 특히 IL-6의 경우에는 T 세포와 B 세포 분화에 관여하여 항암효과가 있다고 보고(32,33)되고 있기 때문에 이를 통해 KAV-0, KPV-0, KBV-0와 JBV-0는 항암효과에도 효율적으로

작용할 가능성이 있는 것으로 기대되었다. 하지만 KAV-0는 원료인 사과식초로부터의 다당 수율이 매우 낮아 이후의 실험을 진행하기에는 부적절한 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 국내의 전통발효식초 6종을 대상으로 다당류를 분리하여 화학적 특성, 다당 수율 및 면역활성을 검토한 결과, 조다당 수율이 우수하고 대식세포 cytokine의 생산 유도 활성이 모두 양호한 국내 현미식초, 국내산 감식초 및 일본 현미식초의 3종을 최종적으로 선별하여 이후 실험에 사용되었다.

발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 항보체 활성

선별 과정에서 우수한 수율과 가장 높은 대식세포의 IL-6 생산 증진 활성을 보인 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 3종은 실험에 필요한 충분한 양을 확보하기 위해 재차 다량 시료를 조제하였으며, 인체의 초기 감염 방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대한 활성화 여부를 Mayer(25)의 방법에 따라 측정하였다. KBV-0 및 KPV-0의 경우 1,000 µg/mL의 농도에서 양성대조군으로 사용한 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역활성 다당체인 PSK(polysaccharide-K)(34)의 항보체 활성 약 60%에 비해 약간 높은 62%, 65%의 우수한 활성을 보였으며, 특히 KPV-0의 경우 100 µg/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군보다 훨씬 높은 활성을 나타내었다. JBV-0의 경우에는 1,000 µg/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군보다 낮으나 상대적으로 양호한 약 53%의 활성을 보였다(Fig. 3).

보체계는 C1~C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여 종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며, 외부 감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에

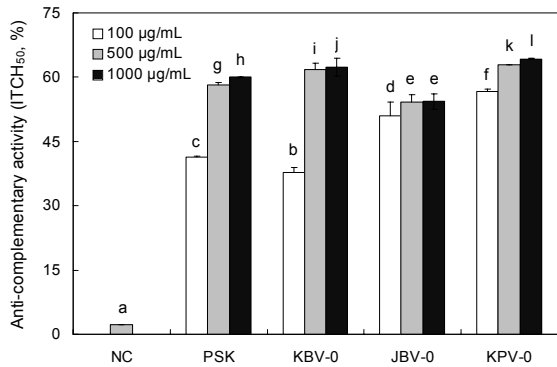


Fig. 3. Anti-complementary activity of KBV-0, JBV-0, and KPV-0 isolated from fermented vinegars. Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method (25). Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. Results are expressed as mean±SD of triplicate samples, and different letters above the bars are significantly different ($P<0.05$).

비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(35). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade 반응에 의하여 보체 단백질이 활성 분자로 분해되고 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다(36). 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 대식세포와 림프구의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(36). 본 실험의 결과로부터 선별된 3종의 발효 식초 유래 다당은 인체의 초기 면역 반응에 있어 주요 기능을 담당하는 보체계의 강력한 활성화자로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 대식세포에 대한 세포독성 및 사이토카인 생산 증진 활성

발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 mouse의 복강으로부터 분리한 대식세포에 대한 직접 독성 여부를 농도별로 측정하였다. 즉 2×10^6 cells/mL로 조정된 대식세포에 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0를 시료 농도 1.6~1,000 µg/mL까지 5배수의 농도를 가하여 배양한 후 세포의 생존 여부를 확인하였고 그 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 모든 시료군에서 뚜렷한 독성은 나타나지 않았으며, 특히 고농도에서도 생육의 유의적 저해는 관찰되지 않아 발효식초 유래 다당은 대식세포의 생육에 별다른 영향을 미치지 않음을 판단할 수 있었다.

면역세포로부터 분비되는 다양한 사이토카인은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는 용해성 단백질로 면역세포 간의 복잡한 network를 형성하여 면역계 전체의 반응 및 효율화에 공헌한다고 알려져 있다(37). 특히 대식세포 표면에는 천연물 유래 다당을 인식하는 특이 수용체, 즉 pattern recognition receptor(PRR)로 알려진

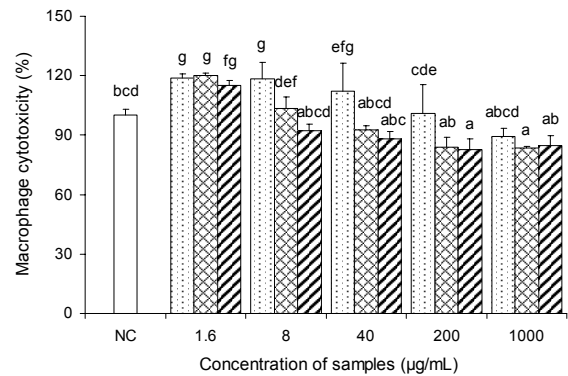


Fig. 4. Cytotoxic effect of KBV-0, JBV-0, and KPV-0 isolated from fermented vinegars on murine macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/mL) were treated with various concentrations of crude polysaccharides for 24 h. The cell cytotoxicity were determined by WST assay. NC means negative control. Results are expressed as mean±SD of triplicate samples, and are shown as relative viability (%) compared to that of NC. KBV-0 (▨), JBV-0 (▩), and KPV-0 (▧). The different letters above the bars are significantly different ($P<0.05$).

세포막 결합단백질(TLR, Dectin-1 등)이 존재하여 세포 내 신호 전달을 유도하며 T 세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF-α와 같은 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다(38-41).

전통발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당 시료들은 mouse 복강으로부터 분리한 macrophage에 농도별로 처리하여 IL-6, IL-12 및 TNF-α의 생산 증진 활성을 측정 한 결과(Fig. 5), KBV-0와 JBV-0 두 시료는 농도 의존적으로 생산을 증진시켰으나 KPV-0의 경우에는 1,000 µg/mL의 농도에서 약간의 감소하는 경향이 나타났다. IL-6 및 IL-12의 경우 KBV-0와 JBV-0에 비해 KPV-0는 저농도인 8 µg/mL 이상에서부터 급격히 사이토카인의 생산을 증진시켰으며(Fig. 5A, 5B), TNF-α의 경우(Fig. 5C)에는 40 µg/mL에서부터 사이토카인의 급격한 증가가 관찰되어 각 농도에서의 사이토카인 생산 유도 활성은 공히 감식초 유래 다당 KPV-0에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

IL-6 및 TNF-α는 대식세포에 의해 유도되는 대표적인 사이토카인으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되고 있다(42,43). 또한 TNF-α는 특정 암세포에 대한 세포독성과 항바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며(43), IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다(44,45). 본 실험에서 mouse 복강으로부터 분리한 대식세포를 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0로 자극한

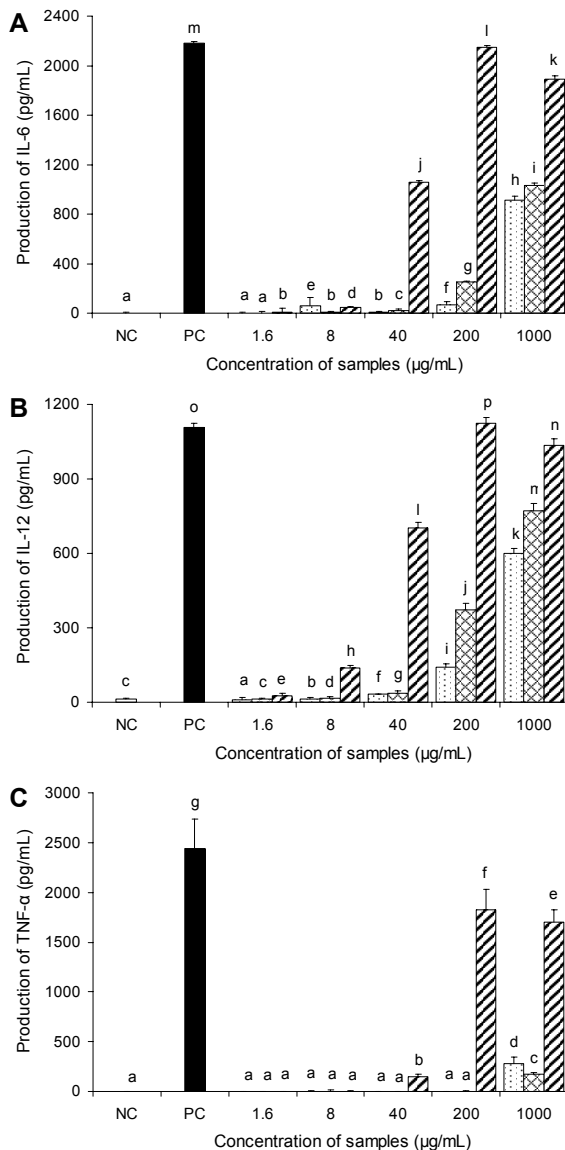


Fig. 5. Effect of KBV-0, JBV-0, and KPV-0 isolated from fermented vinegars on the production of IL-6 (A), IL-12 (B), and TNF- α (C) on peritoneal macrophage from Balb/c mice. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 /mL) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0, and KPV-0 in 96-well plate for 24 h. The concentrations of various cytokines in the cultured medium were determined by ELISA. Lipopolysaccharide (LPS, 5 μ g/mL) was used as the positive control (PC, ■) and only medium was used as the negative control (NC, □). KBV-0 (▨), JBV-0 (▩), and KPV-0 (▧). Results are expressed as mean \pm SD of triplicate samples, and different letters above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

결과, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 TNF- α 및 IL-6의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인되었으므로 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 생체방어에 작용하는 면역기구를 활성화(조절)하는 기능이 우수하며 특히 KPV-0는 타 발효식초 유래 다당의 면역활성에 비해 훨씬 강력함을 확인

할 수 있었다.

이상의 결과로부터 국내산 감식초와 현미식초에는 인체의 생체방어 기능에 유용한 다당이 높은 농도로 함유되어 있으며, 활성 측면에서도 외국산 발효식초보다 상대적으로 우수함을 결론지을 수 있었다. 이들 결과는 기능성 전통발효식초의 산업화와 해외시장 진출에 있어서도 유용한 홍보 수단으로 사용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

전통발효식초의 면역증진 활성을 규명하기 위하여 서로 다른 원재료로부터 제조된 국내외산 6종의 발효식초로부터 다당류를 분리하고 이들의 화학 특성과 면역증진 활성에 대해 평가하였다. 6종의 발효식초 유래 조다당 중에서 국내 현미식초 유래 조다당(KBV-0)과 일본 현미식초 유래 조다당(JBV-0) 및 국내 감식초 유래 조다당(KPV-0)에서 발효식초 대비 높은 수율이 얻어졌으며, *in vitro* 상에서 대식세포를 활성화하여 우수한 interleukin(IL)-6의 생산 유도 활성을 보여 고 면역활성 다당으로 선별하고 이후의 실험에 사용하였다. 한편 선별된 발효식초 유래 3종의 다당획분 KBV-0, KPV-0 및 JBV-0는 비특이적 면역계에 있어 중요 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 모두 농도 의존적으로 높은 항보체 활성을 보였지만 KBV-0와 KPV-0의 경우 1,000 μ g/mL 농도에서 각각 $ITCH_{50}$ 62% 및 65%의 활성을 보여 JBV-0에 비해 높은 항보체 활성을 나타냈다. 한편 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 mouse 복강 macrophage에 대해 특별한 세포독성은 나타내지 않았으며, 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생산을 농도 의존적으로 증가시켰다. 하지만 KPV-0의 활성이 각 처리 농도에서 상대적으로 가장 양호한 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 국내산 전통발효식초에는 타 영양성분 외에 특히 다당류를 함유하고 있으며 이들 발효식초 유래 다당이 인체 건강유지에 필수적인 면역기능을 증진시킬 수 있음을 추정하게 하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 한식세계화용역연구사업(한식 우수성·기능성 연구)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kwon SH, Jeong EJ, Lee GD, Jeong YJ. 2000. Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Industry and Nutrition* 5(1): 18-24.
2. KFDA. 2012. *Korea food and administration*. Korean Food and Drug Administration, Seoul, Korea. p 5-21-1.
3. Kang BH, Shin EJ, Lee SH, Lee DS, Hur SS, Shin KS, Kim SH, Son SM, Lee JM. 2011. Optimization of the acetic

- acid fermentation condition of apple. *Korean J Food Preserv* 18: 980-985.
4. Joo KH, Cho MH, Park KJ, Jeong SW, Lim JH. 2009. Effects of fermentation method and brown rice content on quality characteristics of brown rice vinegar. *Korean J Food Preserv* 16: 33-39.
 5. Ko YJ, Jeong DY, Lee JO, Park MH, Kim EJ, Kim JW, Kim YS, Ryu CH. 2007. The establishment of optimum fermentation conditions for *Prunus mume* vinegar and its quality evaluation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 361-365.
 6. Lee YC, Lee JH. 2000. A manufacturing process of high strength vinegar. *Food Industry and Nutrition* 5(1): 13-17.
 7. Choi HS, Kim MK, Park HS, Shin DH. 2005. Changes in physicochemical characteristics of *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miq.) wine during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 37: 574-578.
 8. Lee WJ, Kim SS. 1998. Preparation of Sikhe with brown rice. *Korean J Food Sci Technol* 30: 146-150.
 9. Seok H, Lee JY, Park EM, Park SE, Lee JH, Lim S, 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.
 10. 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.
 11. Na HS, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY, Ma SJ, Kim JY. 2013. Comparison of characteristics in commercial fermented vinegars made with different ingredients. *Korean J Food Preserv* 20: 482-487.
 12. Hwang YC, Shin KS. 2008. Characterization of immunostimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 40: 220-227.
 13. Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
 14. Paulson JC. 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-276.
 15. Shin KS, Darvill AG. 2006. Structural characterization of physiologically active polysaccharides from natural products (*Arabidopsis*). *Food Sci Biotechnol* 15: 447-452.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. 1997. Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr Res* 300: 239-249.
 19. Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Choi HJ, Shin KS. 2014. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean *Citrus Hallabong*. *Carbohydr Polym* 111: 72-79.
 20. 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.
 21. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochimistry*. 2nd ed. Kabat EA, Mayer MM, eds. Thomas Publisher, Springfield, IL, USA. p 133-240.
 26. Conrad RE. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In *Manual of Macrophage Methodology*. Herscovitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, eds. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. Vol 13, p 5-11.
 27. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
 28. Hackett CJ. 2003. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: prospects and research challenges. *J Allergy Clin Immunol* 112: 686-694.
 29. Cao H, Urban JF Jr, Anderson RA. 2008. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti-inflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr* 138: 833-840.
 30. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. 1980. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303: 662-665.
 31. Unanue ER. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann Rev Immunol* 2: 395-428.
 32. Cho JW, Rhee YK, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Nam SH, Hong HD. 2014. Immunomodulatory activity of crude polysaccharides from *makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 238-242.
 33. Ha JW, Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Lee NH, Yoon DH, Lee YW, Son CG, Cho CK. 2006. Effects of *Cordyceps militaris* extract on tumor immunity. *Kor J Ori Med* 27: 12-29.
 34. Saito H, Tomioka H, Sato K. 1988. PSK, a polysaccharide from *Coriolus versicolor*, enhances oxygen-metabolism of murine peritoneal macrophages and the host-resistance to listerial infection. *J Gen Microbiol* 134: 1029-1035.
 35. Yamagishi T, Tsuboi T, Kikuchi K. 2003. Potent natural immunomodulator, rice water-soluble polysaccharide fractions with anticomplementary activity. *Cereal Chem* 80: 5-8.
 36. Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjöholm AG, Wurzner R, Loos M, Tedesco F, Sim RB, Garred P, Alexopoulos E, Turner MW, Daha MR. 2006. Determinants of human complement function in health and disease. *Mol Immunol* 43: 150-151.
 37. Keller R, Keist R, Wechsler A, Leist TP, van der Meide PH. 1990. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 46: 682-686.
 38. Jang HL, Kang ML, Quan JS, Kang SG, Akaike T, Yoo HS, Cho CS. 2008. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Bio-*

- materials* 29: 1931-1939.
39. 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.
 40. 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.
 41. Meyers RA. 2007. *Immunology: from cell biology to disease*. 1st ed. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany. p 102-107.
 42. Cheng A, Wan F, Wang J, Jin Z, Xu X. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int Immunopharmacol* 8: 43-50.
 43. Tanigawa K, Craig RA, Stoolman LM, Chang AE. 2000. Effects of tumor necrosis factor- α on the *in vitro* maturation of tumor-reactive effector T cells. *J Immunother* 23: 528-535.
 44. Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. 2006. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 13: 997-1003.
 45. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187: 2103-2108.