

귤피 유래 면역활성 람노갈락투로난류의 신속 분리방법

이수정 · 홍희도¹ · 신광순*
경기대학교 식품생물공학과, ¹한국식품연구원

Rapid Isolation Method for Preparation of Immuno-Stimulating Rhamnogalacturonans in Citrus Peels

Sue-Jung Lee, Hee-Do Hong¹, and Kwang-Soon Shin*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University
¹Korea Food Research Institute

Abstract We developed a rapid isolation method for fractionation of polysaccharides with different characteristics, and optimized it for the polysaccharide mixture from Korean citrus peels. A crude polysaccharide mixture, citrus-peel-enzyme (CPE) fraction was isolated from the citrus peels digested with pectinase and ethanol precipitation. CPE was further fractionated with serially diluted ethanol solution (ethanol:deionized water=8:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1.5:1, 1:1, and 0.5:1) to produce seven fractions labeled from CPE8 to CPE0.5. Fraction from CPE8 to CPE1 were mostly composed of 11 different sugars, including rhamnogalacturonan (RG) I and II, and the sugars contained arabino- β -3,6-galactan moiety. However, CPE0.5 did not contain RG-II and arabino- β -3,6-galactans. Treatment of macrophages with fractions CPE8-CPE1 led to a dose-dependent increase in interleukin-6 production (IL-6), while treatment with CPE1 and CPE0.5 fractions resulted in decreased levels of IL-6. These results indicate that this isolation method may be useful for the rapid fractionation of bioactive RGs from polysaccharide mixtures.

Keywords: citrus peels, immuno-stimulation, isolation method, pectin, rhamnogalacturonan I, rhamnogalacturonan II

서 론

펙틴(pectin)과 같은 다당류의 혼합물로부터 특정 분자량과 생물학적 활성을 가진 다당을 선택적으로 분리하기 위해서는 분리 원리가 상이한 여러 단계의 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 한외여과(ultrafiltration) 등을 필수적으로 거쳐야 하며(1), 다당류가 용해되어 있는 완충용액 유래의 염류 및 저분자 물질을 제거할 목적으로 투석 또는 탈염과정이 요구되는 등, 많은 전처리 과정을 거쳐야 한다(2). 이처럼 혼합물로부터 다당류를 분리·정제하는 과정은 복잡하고 많은 시간이 소모되며 최종 조제물의 단가 상승의 요인으로 작용하여 이를 연구하는 연구자들이나 산업적 생산자들에게 큰 부담이 되고 있는 실정이다.

펙틴(pectin)을 포함한 펙틴물질(pectic materials)은 고등식물의 1차 세포벽(primary cell wall)과 중엽(middle lamella)에 주로 존재하는 다당류로서 식물 세포벽의 구성다당류 중 가장 복잡한 형태로 존재하고 있다(3). 펙틴은 과거 D-갈락투론산(galacturonic acid)이 α -1,4 결합으로 연결된 고분자 물질(α -D-1,4-폴리갈락투론산(polygalacturonic acid))로 알려져 왔지만 최근 구조 분석기술의

발달과 함께 실제로 자연계에 존재하는 펙틴은 이보다 훨씬 복잡한 구조를 가지고 있다고 보고되고 있다. 즉, 전체분자의 많은 부분은 직쇄상의 호모갈락투로난(homogalacturonan)으로 구성되어 있지만 여기에 다양한 올리고당(oligosaccharide) 및 다당류(polysaccharide)가 고도로 분지(branched)된 형태인 람노갈락투로난(rhamnogalacturonan)류가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있다(4). 이들의 구조는 McNeil 등(1)에 의해 비교적 상세히 밝혀졌는데, 람노갈락투로난-I의 경우 갈락투론산과 람노오스(rhamnose)로 구성된 (-4)- α -D-갈락투론산-(1,2)- α -L-람노오스-(1)n의 이당류가 반복되어 연결된 주쇄 (rhamnogalacturonan core)에 아라비난(arabinan), 갈락탄(galactan), 아라비노갈락탄(arabinogalactan) 및 올리고당류가 람노오스를 경유하여 고도로 분지된 구조를 가지고 있다(5). 또한 람노갈락투로난-II는 α -1,4 결합으로 연결된 호모갈락투로난을 주쇄로 하고, 여기에 일반 다당류에서는 거의 관찰되지 않는 2-메틸푸코오스(methylfucose), 2-메틸자일로스(methylxylose), 아피오스(apiose), 아세릭산(aceric acid), 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) 및 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA)와 갈락투론산(galacturonic acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 람노오스, 아라비노스(arabinose) 등을 구성당으로 하는 올리고당이 아주 복잡한 형태로 분지되어 존재하고 있으며 람노갈락투로난-I에 비해 크기가 작은 다당으로 알려져 있다(6,7). 이외에 호모갈락투로난 주쇄에 단당류 형태의 아피오스 또는 자일로스(xylose)가 결합된 자일로갈락투로난(xylogalacturonan)이 결합되어 있는 것으로 알려져 있지만 존재 및 발견 빈도는 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II에 비해 낮은 것으로 알려져 있다. 펙틴류에서 관찰되는 면역증진 활성을 포함한 대부분의 약리활성

*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 443-760, Korea
Tel: 82-31-249-9655
Fax: 82-31-249-9655
E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Received December 29, 2014; revised March 13, 2015;
accepted March 16, 2015

(8)은 호모갈락투로난 주쇄에서는 거의 보고된 바 없으며, 주로 복잡한 구조의 람노갈락투로난-I과 람노갈락투로난-II의 미세구조의 차이에 기인한 것으로 알려져 있다. 펙틴물질이 갖는 구조적 공통성에도 불구하고 람노갈락투로난-I과 람노갈락투로난-II의 구조는 식물체마다 상이하여 약리활성에 차이가 있으며, 때로는 재배 장소, 추출방법에 의해서도 구조적 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. 한편 감귤 펙틴과 사과 펙틴처럼 일반식품 공업에서 많이 사용되는 상업용 펙틴의 경우에도 다양한 분자분포, 아실화 형태, 에스테르화도(degree of esterification, DE)가 상이한 다양한 제품이 생산되고 있다. 이들의 경우 원재료로부터 추출 시, 펙틴의 겔화력을 높이기 위해 호모갈락투로난 영역의 함량이 최대가 되도록 가공되고 있어 대부분의 경우 어떠한 약리 활성도 보고되어 있지 않다. 따라서 펙틴의 약리활성이 배가된 상업용 펙틴을 생산하기 위해선 호모갈락투로난 영역이 아닌 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II의 중요성이 강조된 새로운 추출방법에 의한 생산이 요청된다 하겠다(9).

동의보감(탕액편)에 의하면 감귤은 귤피(귤껍질), 육(과육), 귤낭의 근막(양낭막), 핵(종자) 등에 성능과 약효가 기술되어 있고, 한방의학적으로 처방되어 온 감귤의 효능을 보면 위장장애, 천식, 가래, 식욕부진 및 동맥경화 등에 효과가 있으며, 일부 구전에 따르면, 위암 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(10). 특히, 귤피에 다량 분포하는 것으로 널리 보고된 펙틴은 그 구조적 특성으로 인해 인체 내에서 다이옥신 등의 유해물질의 제거(11), 대장암 예방효과(12), 전립선암 억제효과(13), 그리고 항콜레스테롤(14) 등의 작용이 알려져 있다. 또한, Yang 등(15)은 귤피로부터 분리한 펙틴계열의 다당류의 장관면역 활성을 보고하기도 하였다.

따라서 본 연구에서는 대부분 폐기 처리되고 있는 농산부산물인 귤피에서 고 면역활성 다당인 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II를 간편하게 분리하여 산업적 이용성을 증진시킬 목적으로 시판 식품용 효소인 펙티나아제(pectinase)를 처리하여 얻어진 귤피 유래 다당류의 혼합물로부터 에탄올을 이용한 용매 분리법을 개발하였으며, 본 분리법에 의해 얻어진 각각의 다당획분에 대한 화학특성 및 면역활성을 확인함으로써 본 신속분리법의 효율성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 귤피(citrus peel)는 제주특별자치도 서귀포시 표선면 가시리에서 생산된 온주귤의 과일껍질 부분을 건조시켜 분말화한 후 실험 재료로 사용하였다.

시약 및 실험동물

대식세포 활성 측정을 위해 사용된 실험동물은 BALB/c mouse (6주령, 자성)로, 새론바이오(Uiwang-si, 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 명암을 교대하였으며 경기대학교 동물윤리위원회의 허가(2012-05)를 거쳐 규정에 따라 진행하였다. 면역활성 측정을 위한 동물세포 배양에 사용된 minimum essential medium (MEM), 소태아혈청(fetal bovine serum) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 복강 대식세포 유도를 위한 thioglycollate medium 및 양성대조군(positive

control)으로 사용된 LPS (lipopolysaccharide from *E-coli* O127: B8)는 모두 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

귤피로부터 조다당의 분리 및 분석

귤피 건조분말에 약 20배의 증류수를 가하고 pH 5.0으로 조절한 후, 시판 식품용 상업효소인 펙티나아제(from *Aspergillus niger*, Sigma)를 가하고(분말의 0.5-1.0% 첨가) 50°C에서 3일간 처리한 후, 상층액을 회수하였다. 상층액은 최종농도 80%가 되도록 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치 후, 발생한 침전물을 회수하여 소량의 증류수에 재용해하고 동결 건조하여 조다당 획분인 citrus-peel-enzyme fraction (CPE)를 얻었다. 이후 CPE는 증류수와 에탄올이 일정한 비율로 혼합된 각각의 농도별 알코올 용액 7종(증류수:에탄올, v/v, 1:8, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1.5, 1:1, 및 1:0.5)을 가하여 세척하였으며, 원심분리에 의해 침전물과 상층액을 분리하였다. 이때 회수된 침전은 동일 부피의 해당 알코올용액을 가한 후 총 3회 반복하여 세척하였으며, 회수된 각각의 침전물은 동결 건조를 거쳐 7종의 용매 분획물(CPE8, CPE4, CPE3, CPE2, CPE1.5, CPE1 및 CPE0.5)로 조제하였다(Fig. 1).

일반 분석방법

귤피로부터 분리한 조다당의 일반성분을 분석하기 위해 증성당 함량은 갈락토스(galactose)를 표준물질로 하여 페놀-황산(phenol-sulfuric acid)법(16)으로, 산성당 함량은 갈락투론산을 표준물질로 하여 *m*-하이드록시비페닐(*m*-hydroxybiphenyl)법(17)으로, 단백질 함량은 표준물질로 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 사용하여 Bradford법(18)으로, KDO의 신속한 정량을 위해서는 thiobarbituric acid 비색정량법(19)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

구성당 분석

구성당 분석은 Jones와 Albersheim 등(20)의 방법을 일부 변형하여 다당을 가수분해한 후 각각의 다당을 알디톨 아세테이트(alditol acetate)로 유도체화한 후, 가스 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용해 분석하였다. 귤피 유래 8종의 조다당 획분은 각각 2 M TFA 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid) 상에서 121°C에서 90분간 반응시켜 가수분해한 후, 1 M 암모니아수(NH₄OH) 1 mL과 10 mg의 수소화붕소나트륨(NaBH₄)를 이용해 4 시간동안 개환 및 환원시켰다. 이후 아세트 산(acetic acid)을 적당량 가하여 잔존하는 수소화붕소나트륨을 제거한 후, 수 차례 메탄올(methanol)을 가하며 반복 세척 및 건조함으로써 과량으로 가해진 아세트산을 제거하고 각 구성당에 상응하는 알디톨로 전환하였다. 이 후 각각의 알디톨은 1 mL의 무수초산(acetic anhydride)를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 알디톨 아세테이트로 전환시켰다. 이를 클로로포름/물(chloroform/H₂O)의 2상 용매계로 분리하여 클로로포름층만을 회수 및 건조시킨 다음 소량의 아세톤(acetone)에 용해하여 가스 크로마토그래피 분석용 시료로 사용하였다. 알디톨 아세테이트 유도체를 분석하기 위해서 Supelco (Bellefonte, PA, USA)에서 구입한 SP-2380 capillary column (0.2 μm, 0.25 mm×30 m)이 장착된 가스 크로마토그래피 ACME-6100 system (Younglin Co., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 분석조건으로는 초기 오븐온도를 60°C에서 1분 동안 유지하다가 60°C에서 220°C까지는 30°C/min의 온도로 승온시켰으며 220°C에서 12분 동안 유지하였다. 이후 220°C에서 8°C/min의 온도로 승온시켰으며, 250°C에서 15분 동안 유지시켰다. 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 피크면적, 분자량 및 불꽃이온화검출기(flame

ionization detector)에 대한 분자량 응답 계수(molecular response factor)를 각각 산출하여 계산하였다.

고속액체크로마토그래피에 의한 다당의 분자량 분포 및 정제도 확인

귤피에서 유래한 조다당획분은 각각 10 mg/mL의 농도로 증류수에 희석하여 0.2 μm 여과막(membrane filter) (Toyo Roshi Kai-sha, Ltd., Tokyo, Japan)을 통해 여과한 후, 50 mM 포름산 암모늄(ammonium formate) (pH 5.5)으로 평형화된 Asahi-Pak GS-520+GS-320+GS-220 column (각각 0.76×30 cm, Showa denco Co., Tokyo, Japan)이 장착된 고속액체크로마토그래피(HPLC) (Agilent Technologies Co., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였고, 전체 구성 다당의 분자량에 따른 분포를 관찰하였다.

β-glucosyl Yariv reagent과의 반응성 확인

Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법(21)에 따라 일원평판젤화산법(single radial)으로 측정하였다. 즉, β-glucosyl Yariv reagent 10 mg/mL를 함유한 0.15 M NaCl 아가로스(agarose) 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 well을 만들어 표준물질인 검 아라빅(gum arabic)의 농도별 용액과 시료는 모두 5 μL를 well에 각각 주입하였다. 이 평판을 상온에서 15시간 정치 분산시킨 후, 생성된 침전환을 관찰하여 Arabino-β-3,6-galactan의 존재 유무 및 정량은 표준물질에 대비한 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다.

복강 대식세포로부터 IL-6 생산능 측정

BALB/c mouse의 복강에 5% thioglycollate medium 1 mL을 주입하고 96시간 내에 유도된 대식세포(macrophage)를 회수한 후, 인산완충식염수(PBS)로 2-3회 세척하고 세포수를 1×10⁶ cells/mL로 조정하여 96 well plate에 100 μL씩 분주하였다. 이를 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2시간동안 배양하여 대식세포 단일분자막을 형성시키고 상층액을 제거한 후, 미부착 대식세포를 10% 소태아혈청이 첨가된 MEM배지를 이용하여 3회 세척하였다. 여기에 10% 소태아혈청이 첨가된 MEM배지를 각 well당 100 μL씩 분주하고, 다양한 농도로 희석된 100 μL의 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 대식세포에 의해 유도된 배양 상층액 중의 인터류킨-6 (Interleukin-6)의 함량 분석은 ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 진행하였다.

결과 및 고찰

귤피로부터 다당의 분리 및 정제

일반적으로 천연물의 유용성분은 물로 추출한 뒤 고농도의 에탄올(ethanol, EtOH) 용액을 첨가하면 용해도 차이에 의해 침전되는 성분을 분리할 수 있는데, 이 침전물의 주성분으로는 다당류 및 단백다당류와 같은 고분자물질이 함유되어져 있는 것으로 보고되어 있다(22,23). 펙틴류는 수용성 다당류로, 열수에 의해 추출이 용이하고 이를 펙티나아제로 가수분해하면 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II를 분리할 수 있는데(22), 이는 펙티나아제에 의해 호모갈락투로난 영역이 가수분해되어 저분자화되면, 고분자 상태의 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II는 에탄올 첨가에 의해 침전되고 저분자인 호모갈락투로난 분해물은 상층액에 용해될 것으로 기대되었다. 따라서 본 연구에서는 귤피를 펙티나아제로 처리하여 얻은 상층액에 에탄올을 이용하여 최종 농도 80%로 조절한 뒤 침전물만을 회수하고 동결건조하여 호모갈락투로난 영역이 제거된 고분자의 조다당 획분인 CPE를 얻었다.

이후 동결건조된 CPE를 증류수와 에탄올이 1:8, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1.5, 1:1, 및 1:0.5의 비율로 혼합된 7종의 알코올용액에 각각 세척되었으며, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각의 침전물과 상층액을 분리하였다. 이때 회수된 침전은 동일부피의 해당 알코올용액을 재차 가하여 총 3회 반복 세척하였으며, 최종 침전물들은 동결건조하여 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 CPE8, CPE4, CPE3, CPE2, CPE1.5, CPE1 및 CPE0.5로 각각 조제하였다. 각 용매 분획물들의 수율은 CPE8에서 가장 높았으며, CPE2까지 일정 수율을 유지하다가 에탄올 용액의 농도가 낮아질수록 수율도 함께 낮아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

귤피 유래 용매분리 획분의 화학적 특성

조다당 획분인 CPE와 에탄올 용매 분리법에 의해 얻어진 CPE 유래 다당획분의 화학적 특성 및 구성당 조성은 Table 1에 나타내었다. 먼저, CPE는 중성당(61.7%)과 함께 산성당(35.9%)을 높은 비율로 함유하는 산성다당류로 나타났으며, 주요 구성당으로는 글루코스, 산성당(갈락투론산+글루쿠론산), 갈락토스, 아라비노스 및 람노오스(각각 36.8, 31.7, 22.2, 20.0 및 11.8%)를 포함하는 것으로 확인되었다. 그 외에도 미량 구성당으로 2-메틸푸코오스, 2-메틸자일로스, 아피오스, 아세릭산 및 KDO와 같은 특이당들이 검출되었는데, 이들은 람노갈락투로난-II 다당의 측쇄(side chain)에서만 관찰되는 지표 물질로 알려져 있으므로 CPE는 람노갈락투로난-II 다당이 소량 존재함으로 추정할 수 있었다(6,7).

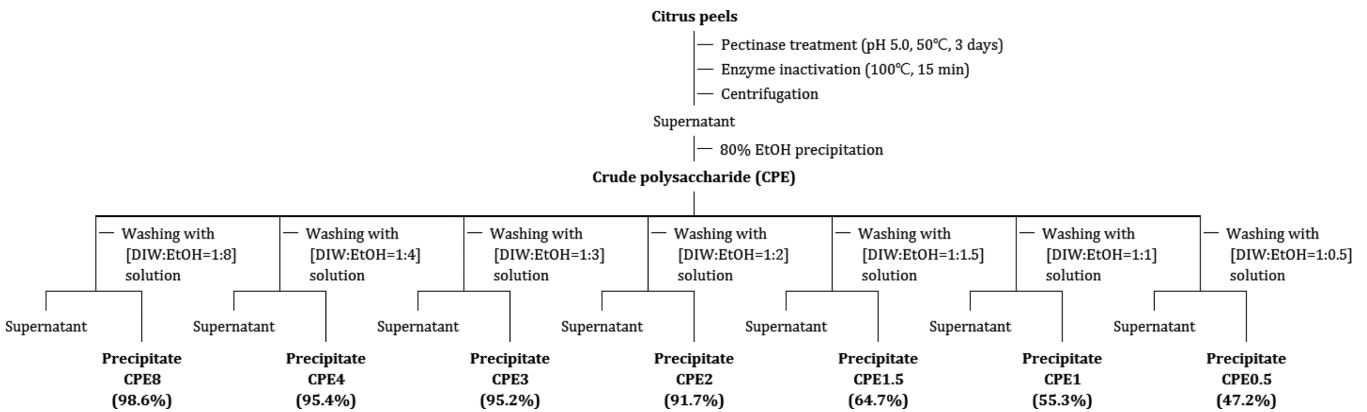


Fig. 1. Purification scheme of bioactive polysaccharides from the pectinase digests of citrus peels by ethanol-fractionation method.

Table 1. Sugar compositions of the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method from the pectinase digests of citrus peels

Sample ¹⁾	CPE0.5	CPE1	CPE1.5	CPE2	CPE3	CPE4	CPE8	CPE
Chemical composition	(%) ⁵⁾							
Neutral sugar	69.3±0.1	66.2±3.1	66.4±4.3	65.9±0.9	60.9±1.7	59.7±2.4	59.4±1.1	61.7±0.2
Uronic acid	30.7±0.1	32.6±0.4	32.7±0.5	33.4±1.0	38.2±0.2	39.0±0.6	39.1±1.1	35.9±0.2
Protein	-	-	-	-	0.3±0.3	0.6±0.6	0.7±0.2	2.2±0.5
KDO-like material ²⁾	-	0.4±0.1	0.9±0.3	0.7±0.1	0.3±0.1	0.6±0.1	0.8±0.1	0.2±0.1
Component sugar ³⁾	(Mole %) ⁶⁾							
2-Methylfucose	-	0.4±0.1	1.0±0.2	1.0±0.2	0.6±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.7±0.0
Rhamnose	16.0±1.4	16.3±1.9	15.4±2.0	14.6±2.1	11.3±0.2	8.8±1.1	9.8±1.3	11.8±0.2
Fucose	1.0±0.1	1.1±0.1	1.3±0.1	1.2±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1	1.1±0.0
2-Methylxylose	-	0.4±0.1	1.0±0.1	1.1±0.2	0.8±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1	0.8±0.0
Arabinose	12.3±0.5	9.4±0.6	12.6±0.8	14.0±1.4	12.5±0.2	10.1±0.9	11.2±1.0	20.0±0.4
Apiose+Xylose	3.4±0.1 (only xylose)	2.6±0.2	1.2±0.1	1.7±0.2	1.9±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	2.8±0.3
Aceric Acid	-	1.1±0.1	0.5±0.0	0.7±0.1	0.4±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	1.7±0.0
Mannose	4.9±0.2	2.8±0.2	1.2±0.2	1.1±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1	1.9±0.2	2.2±0.0
Galactose	15.6±0.9	21.4±1.7	26.0±3.3	25.9±4.0	24.8±1.0	28.5±1.7	23.8±1.6	22.2±0.2
Glucose	16.0±1.0	10.7±0.9	6.1±1.0	4.6±0.2	6.1±0.7	7.0±0.5	8.6±0.7	36.8±0.1
GalA + GlcA ⁴⁾	30.7±0.1	32.6±0.4	32.7±0.5	33.4±1.0	38.2±0.2	39.0±0.6	39.1±1.1	31.7±0.1

¹⁾The CPE0.5, CPE1, CPE1.5, CPE2, CPE3, CPE4 and CPE8 was the fraction precipitated by deionized water:ethanol=1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4 and 1:8, respectively.

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

³⁾Component sugars were analyzed using alditol acetates derivative method.

⁴⁾Sum of galacturonic acid and glucuronic acid.

⁵⁾Percentage (%) in the dried sample.

⁶⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

한편, CPE로부터 에탄올 용매 분리법을 통해 얻어진 다당획분 7종에서는 모든 획분에서 에탄올 용액의 농도가 낮아질수록 중성당의 함량은 증가하는 반면 산성당의 함량은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한, CPE에서 가장 높게 검출되었던 글루코스의 함량(36.8%)이 에탄올 용매 분리 다당획분 7종에서는 급격하게 감소된 것으로 나타났는데(4.6-16.0%), 이는 CPE에서 글루코스는 주로 올리고당 형태의 저분자 다당을 형성하고 있다가 에탄올 세척과정을 통해 다량 제거된 것으로 사료되었다(Table 1). CPE1-CPE8 획분들은 모두 총 11종의 구성당이 서로 다른 비율로 존재하는 것으로 검출되었으며, 주요 구성당으로는 산성당(갈락투론산+글루쿠론산), 람노오스, 아라비노스 및 갈락토스의 비율이 높게 나타나 아라비노갈락탄을 포함하는 람노갈락투로난-I 다당이 다량 함유되는 것으로 나타났다. 하지만 모두 2-메틸푸코오스, 2-메틸자일로스, 아피오스, 아세릭산 및 KDO와 같은 특이당이 소량 검출되었기 때문에 CPE1-CPE8 획분들은 모두 람노갈락투로난-II 다당이 혼재하는 것으로 추정할 수 있었다. 한편, 람노갈락투로난-I의 경우, 람노갈락투로난 주쇄에 아라비난, 갈락탄 및 아라비노갈락탄이 측쇄로 결합되어 있는 구조로 보고되어 있으며 (5), 분자량이 람노갈락투로난-II에 비해 큰 것으로 알려져 있기 때문에 타 획분과는 다르게 특이당이 검출되지 않았으며, 고분자 다당획분으로 예상되는 CPE0.5 획분은 람노갈락투로난-II 획분의 혼입이 없는 순수한 람노갈락투로난-I 획분만으로 구성되어 있음을 추론할 수 있었다.

굴피 유래 용매분리 획분의 분자량 측정

조다당 획분인 CPE로부터 에탄올 용매 분리법에 의해 얻어진 각 획분의 분자량 분포 및 용리 패턴을 확인하기 위해 Asahi-pak GS-520+GS-320+GS-220 column이 장착된 고속액체크로마토그래

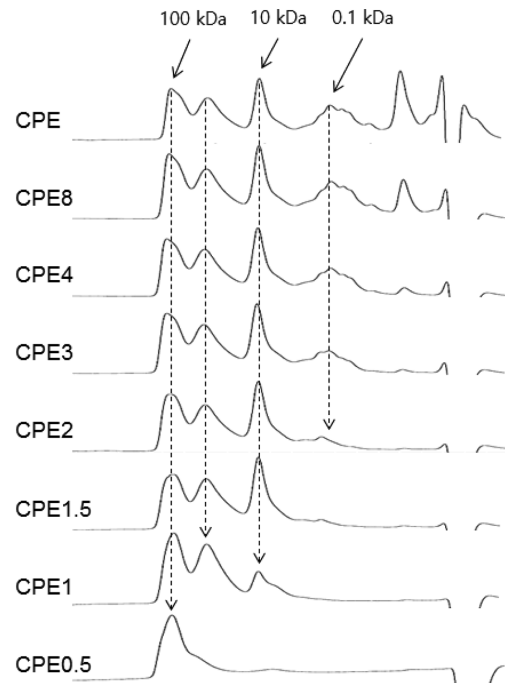


Fig. 2. Molecular-weight patterns of the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method from the pectinase-digests of citrus peels.

피를 이용하여 분석한 결과(Fig. 2), CPE8, CPE4 및 CPE3에서는 0.1-100 kDa까지 다양한 분자량대의 피크가 나타난 반면, CPE2와 CPE1.5 획분에서는 다당획분으로 예상되는 3개의 피크만이

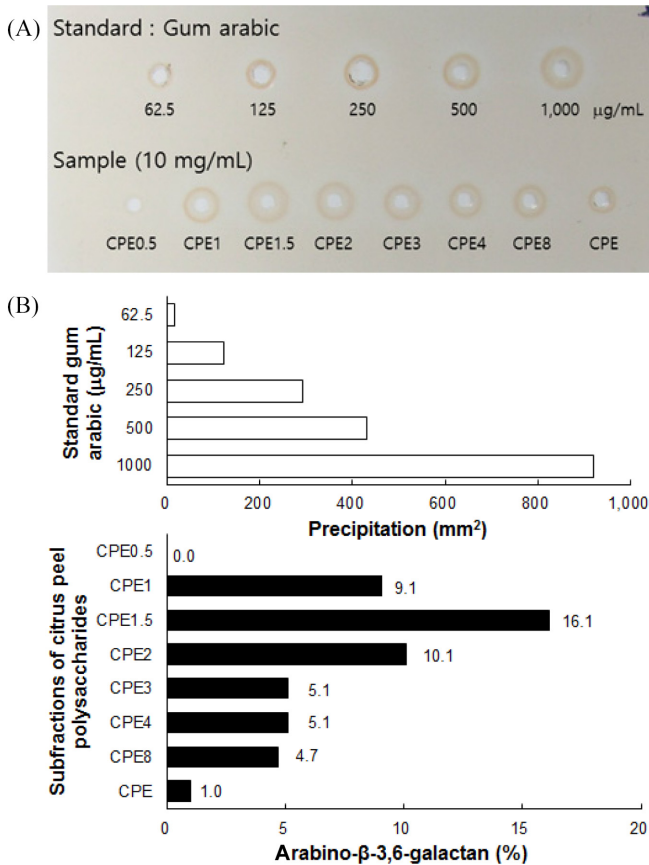


Fig. 3. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β -glucosyl Yariv reagent and the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method from the pectinagedigests of citrus peels.

나타났고, CPE1에서는 100 kDa의 단일 피크만이 검출되었다. 특히, CPE에 존재하는 분자량 0.1 kDa 미만의 저분자 물질은 CPE1.5획분에서 거의 모두 제거됨을 확인할 수 있었으며, CPE1획분에서는 분자량 10 kDa 정도의 피크가 급격히 소실되는 것으로 나타났고, CPE0.5획분에서는 100 kDa 정도의 정제도가 높은 고분자 물질로만 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 Table 1의 구성당 분석결과와 Fig. 2의 분자량 분포도를 종합해볼 때 분자량 10 kDa의 피크는 람노갈락투로난-II로, 100 kDa의 피크는 람노갈락투로난-I으로 예상할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 CPE1.5획분을 조제한 후 재차 증류수:에탄올=1:1 용액으로 세척한다면 그 상층액에는 람노갈락투로난-II가 풍부한 다당획분을, 또한 침전물에는 소량의 람노갈락투로난-II와 함께 람노갈락투로난-I이 풍부한 다당획분을 획득할 수 있음을 추정하게 하였다. 따라서 많은 시간과 경비가 요구되는 컬럼 크로마토그래피를 대체하여 산업적 응용이 가능한 다당 정제법으로써의 가능성이 예견되었다.

굴피 유래 용매분리획분과 β -glucosyl Yariv reagent의 반응성 검토

용매 분리법에 의해 얻어진 7종의 굴피 유래 다당 획분의 구성당 분석 결과에서 아라비노스와 갈락토스가 높은 비율로 존재하고 있다는 사실로부터 아라비노갈락탄이 존재할 가능성이 높다고 판단되었으므로, 이를 확인하기 위해 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다. β -Glucosyl Yariv reagent는 아라비노갈락탄 중 type II형의 arabinosyl-3,6-galactan과 특이적으로 반응하

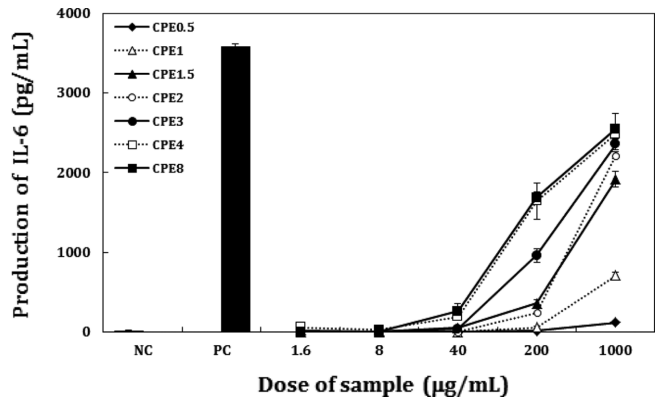


Fig. 4. Effect of the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method on interleukin-6 (IL-6) production by murine peritoneal macrophages.

여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는데(21), 이를 이용하여 일원평판 젤 확산을 시행함으로써 arabinosyl-3,6-galactan의 존재를 확인하고자 하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 arabinosyl-3,6-galactan의 표준물질로 사용된 시판 검 아래빅은 농도별로 침전환의 크기가 증가하는 양상을 보여주었으며, 다당획분의 경우 CPE8에서 CPE1.5까지는 에탄올용액의 농도가 감소함에 따라 적색의 침전환이 증가하는 양상(4.7-16.1%)을 보여주었다(Fig. 3). 이러한 사실은 에탄올 농도가 감소함에 따라 올리고당 또는 저분자 상태의 다당이 순차적으로 제거되어, 상대적으로 고분자인 arabinosyl-3,6-galactan 함량이 높아진 것으로 판단되었다. 그러나 CPE1획분에서는 침전환이 감소하는 것으로 관찰되었으며(9.1%), CPE0.5획분에서는 침전환이 완전히 제거되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 사실은 에탄올 세척용액의 농도가 증류수:에탄올=1:1 이하일 경우 람노갈락투로난-II 뿐만 아니라 람노갈락투로난-I의 arabinosyl-3,6-galactan 측쇄 영역이 제거되기 시작하여 CPE0.5에서는 이들이 거의 완전히 제거되는 것으로 추측되었다.

따라서 Fig. 2의 결과에서 보여주는 바와 같이 분자량이 두 번째로 큰 100 kDa과 10 kDa 사이의 피크는 arabinosyl-3,6-galactan 측쇄 부분을 함유한 람노갈락투로난-I 다당(저분자 람노갈락투로난-I)이며, 증류수:에탄올=1:0.5 세척에 의해 상층액에서 선택적으로 얻을 수 있으며 침전물에서는 arabinosyl-3,6-galactan 영역이 함유되지 않은 람노갈락투로난-I 다당을 분리, 정제할 수 있음을 추측할 수 있었다.

굴피 유래 용매분리획분의 대식세포 자극에 의한 IL-6 생산능

대식세포는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적인 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 살해활성을 나타낸다(24,25). 또한, TLR (toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물질)은 대식세포를 활성화하여 T세포와 B세포의 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- α 와 같은 사이토카인을 생산한다고 알려져 있다(26). 용매 분리법에 의해 얻어진 굴피 유래 다당획분들의 면역활성을 비교하기 위하여 BALB/c mouse로부터 5% TG로 유도된 복강 대식세포 세포를 조제하고, 시료처

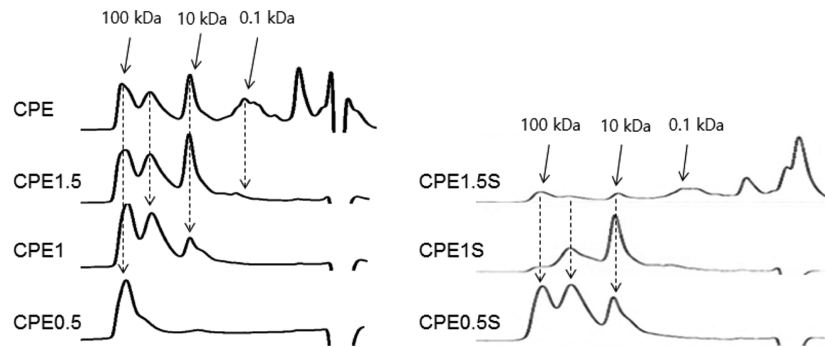


Fig. 5. Molecular weight patterns of the polysaccharide fractions obtained by newly developed ethanol-fractionation method.

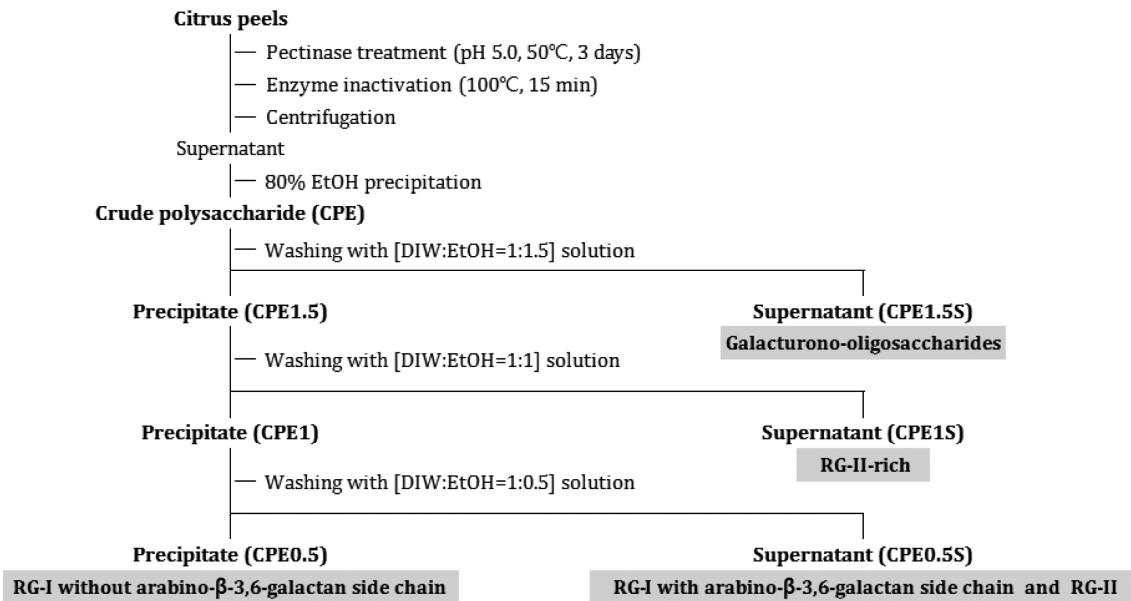


Fig. 6. Newly developed ethanol-fractionation method for the isolation of immuno-stimulating polysaccharides from the pectinase digests of citrus peels.

리에 의한 IL-6 생산능을 측정하였다. 그 결과 모든 다당 시료들에서 농도의존적인 생산능을 보여주었다. 1000 µg/mL의 고농도에서는 CPE8 희분부터 CPE1.5 희분까지 큰 활성차이를 나타내지 않았으나, 동일농도에서 람노갈락투로난-II 영역이 제거되기 시작하는 CPE1 희분에서는 활성이 급격히 감소되었고, 더욱이 람노갈락투로난-I의 arabino-β-3,6-galactan 영역이 모두 제거된 CPE0.5 희분에서는 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 귤피 유래 효소처리 다당의 면역활성에 관여하는 활성영역(active moiety)은 펙틴 중 람노갈락투로난-II와 arabino-β-3,6-galactan을 측쇄로 갖는 람노갈락투로난-I 다당에 의한 것임으로 추정될 수 있었다. 이러한 결과는 Yang 등(15)이 보고한 바 있는 귤피 유래 아라비노스와 갈락토스가 풍부한 펙틴계열의 다당류에 의한 장관면역 활성 증진결과와 일치하는 것으로 사료되었다.

귤피 유래 조다당으로부터 용매 분획법에 의한 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II의 선택적 조제

이상의 결과로부터 본 연구에 의해 개발된 에탄올을 이용한 다당의 용매 분리법은 다당 혼합물로부터 화학특성 및 생물활성이 우수한 특정 다당만을 선택적으로 분리함에 있어 효과적이라고 판단되었다. 또한 본 방법을 통해 장시간의 시일과 복잡한 과정(컬럼 크로마토그래피, 한외여과 등)이 필요했던 다당의 선택분리

공정을 대체하여 효율적이고 신속한 분리 및 높은 수율과 저렴한 생산가 등 다양한 수요를 만족하는 신 공정으로 이용가능하다고 사료되었기에, 귤피로부터 면역활성이 우수한 람노갈락투로난-I 및 람노갈락투로난-II를 선택적으로 분리하기 위하여 펙티나아제가 처리된 조다당 희분(CPE)은 Fig. 5의 방법을 통하여 재차 분리되었다. 즉, CPE로부터 증류수:에탄올=1:1.5 용액 세척을 통해 CPE1.5 희분을 얻은 후, 이를 증류수:에탄올=1:1 용액으로 재차 세척할 경우 상층액에는 면역활성이 우수한 람노갈락투로난-II를 농축된 형태로 얻을 수 있을 것이며, 침전물(CPE1)을 다시 증류수:에탄올=1:0.5 용액으로 세척할 경우에는 그 상층액에서 면역활성이 우수한 arabino-β-3,6-galactan을 측쇄로 갖는 람노갈락투로난-I 다당을 분리함으로써 다당의 특성에 따른 정제가 가능할 것으로 예견되었다(Fig. 5).

따라서 이를 기초로 람노갈락투로난의 종류에 따른 분리, 정제 과정을 최종 확립하였다. 본 다당분리 실험방법의 효율성을 재차 확인하기 위해 Fig. 5의 과정을 행하고 고속액체크로마토그래피에 의해 각 다당의 용출 패턴과 순도 등을 검정한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 예측한 바와 같이 귤피 유래 조다당 희분(CPE)에 존재하는 대부분의 저분자 물질들은 증류수:에탄올=1:1.5 용액으로 세척시 상층액(CPE1.5S)에 존재하여 제거됨을 확인할 수 있었다. 또한, CPE1.5를 증류수:에탄올=1:1 용액으로 세척 후 얻

어진 상층액(CPE1S)에는 람노갈락투로난-I 다당이 일부 혼입되어 있으나 분자량 10 kDa의 람노갈락투로난-II 다당이 주요 성분으로 얻어졌다. CPE1은 증류수:에탄올=1:0.5 용액을 통한 세척에 의해 침전물(CPE0.5)에는 정제된 형태의 분자량 100 kDa의 고분자 람노갈락투로난-I 다당이 얻어졌다. 하지만 CPE0.5S에서는 예상과 다소 상이하게 고분자 람노갈락투로난-I과 람노갈락투로난-II, 그리고 arabino- β -3,6-galactan이 포함된 저분자 람노갈락투로난-I 다당으로 추정되는 3개의 혼합 피크가 관찰되었다(Fig. 6). 하지만 이들이 복잡한 크로마토그래피를 거치지 않고 단순 용매분리에 의해 순수한 피크 형태로 얻어진 점을 감안할 때, 곱피 유래 다당 혼합물로부터 람노갈락투로난류의 산업적으로 선택적 분리, 정제하는데 있어서 높은 유효성과 경제성이 있음을 증명하였다.

요 약

다당의 생물활성은 다당의 구조적인 특징과 분자량 분포에 의해 중요한 영향을 미치기 때문에, 특정 다당의 정제는 다당 연구를 위해 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 서로 다른 특성을 소유한 다당의 분획을 위한 신속 분리 방법을 개발하고 대표 화합물로 한국산 곱피로부터 조제한 다당 혼합물을 이용, 본 분리법을 최적화 하였다. 곱피는 펙티나아제 처리 후 에탄올 침전법을 통해 조다당 화분인 CPE로 조제되었으며, CPE는 재차 농도별로 연속 희석된 에탄올 용액(EtOH:DIW=8:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1.5:1, 1:1, 및 0.5:1)을 이용하여 7가지 화분(CPE8-CPE0.5)으로 분획되었다. CPE8-CPE1 화분은 구성당 분석 결과 람노갈락투로난-I과 람노갈락투로난-II 다당의 지표 구성당인 총 11종의 서로 다른 당으로 구성되어 있었으며, arabino- β -3,6-galactan 잔기를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 CPE0.5 화분에서는 람노갈락투로난-II 및 arabino- β -3,6-galactan 잔기를 함유하고 있지 않았다. 한편, CPE8-CPE1 화분을 처리한 mouse 복강 대식세포에서는 농도의존적으로 IL-6의 생산 증가가 관찰된 반면, CPE1 및 CPE0.5 화분에서는 활성이 급격히 감소됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 이상의 결과로부터 분리방법이 다양한 특성을 갖는 다당의 혼합물로부터 생물활성을 갖는 람노갈락투로난류를 신속히 분리하는데 매우 유용한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 2013년 한국식품연구원의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

References

- McNeil M, Darvill AG, Albersheim P. Structure of plant cell walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 66: 1128-1134 (1980)
- Shin KS, Lee H. Structural analysis of the unusual sugar-containing oligosaccharides formed by the selective cleavage of weakly acidic polysaccharide. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1105-1112 (1997)
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967 (2001)
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. pp. 415-441. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Dey DM, Harborne JB (eds). Academic press, London, England (1990)
- Engelsen SB, Cros S, Mackie W, Perez S. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers* 39: 417-433 (1996)
- Ishii T, Matsunaga T. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* 57: 969-974 (2001)
- Pérez S, Rodríguez-Carvajal M, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85: 109-121 (2003)
- Srivastava R, Kulshreshtha DK. Bioactive polysaccharides from plant. *Phytochemistry* 28: 2877-2883 (1989)
- Shin KS. Immunostimulating plant polysaccharides: macrophage immunomodulation and its possible mechanism. *Food Sci. Ind.* 45: 12-22 (2012)
- Park SB. Isolation of macrophage-stimulating polysaccharide from the citrus peels and its structural characterization. MS thesis, Kyonggi University, Suwon, Korea (2008)
- Aozasa O, Ohta S, Nakao T, Miyata H, Nomura T. Enhancement in fecal excretion of dioxin isomer in mice by several dietary fibers. *Chemosphere* 45: 195-200 (2001)
- Sandberg AS, Ahderinne R, Andersson H, Hallgren B, Hulten L. The effect of citrus pectin on the absorption of nutrients in the small intestine. *Hum. Nutr-Clin. Nutr.* 37: 171-183 (1983)
- Pienta KJ, Nailk H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, Donat TL, Tait L, Hogan V, Raz A. Inhibition of spontaneous metastasis in rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J. Natl. Cancer I.* 87: 348-353 (1995)
- Fernandez ML, Sun DM, Tosca MA, McNamara DJ. Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: a dose-response study in guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 869-878 (1994)
- Yang HS, Yu KW, Choi YM. Isolation of polysaccharides modulating mouse's intestinal immune system from peels of *Citrus unshiu*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1476-1485 (2004)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
- Bradford MM. 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 (1976)
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595-601 (1978)
- Jones TM, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936 (1972)
- Van Holst GJ, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal. Chem.* 148: 446-450 (1985)
- McNeil M, Darvill AG, Aman P, Franzen LE, Albersheim P. Complex carbohydrates. Vol. 83. pp. 3-45. In: *Methods in Enzymology*. Ginsburg V (ed). Academic Press, New York, NY, USA (1982)
- Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM, Suh HJ. Macrophage-stimulating activity of *exo*-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126: 35-48 (2005)
- Keller R, Keist R, Wechsler A, Leist TP, van der Meide PH. 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 (1990)
- Nathan CF, Henry WM, Zanvil AC. The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 303: 622-626 (1980)
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 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 (2003)