

감잎으로부터 면역 활성 다당의 선택 분리를 위한 간편 방법

이수정¹ · 홍희도² · 신광순¹

¹경기대학교 식품생물공학과
²한국식품연구원

Convenient Method for Selective Isolation of Immuno-Stimulating Polysaccharides from Persimmon Leaves

Sue Jung Lee¹, Hee-Do Hong², and Kwang-Soon Shin¹

¹Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University

²Korea Food Research Institute

ABSTRACT The biological activity of polysaccharide is greatly influenced by polysaccharide structure and molecular distribution. Here, we developed a rapid and convenient isolation method for fractionating polysaccharides with different characteristics and optimized it using a polysaccharide mixture from Korean persimmon leaves. A crude polysaccharide mixture, persimmon leaves-enzyme (PLE) fraction, was isolated from persimmon leaves digested with pectinase and ethanol precipitation. The PLE fraction was further fractionated with a serially diluted ethanol solution (ethanol : deionized water=4:1, 2:1, 1.5:1, 1:1, and 0.5:1) to produce 10 subfractions (five precipitate fractions labeled from PLE-4 to PLE-0.5 and five supernatant fractions labeled from PLE-4S to PLE-0.5S). HPLC analysis indicated that PLE-4 and -2 consisted of diverse polysaccharides, whereas PLE-1.5, -1, and -0.5 contained high molecular weight (MW) polysaccharides. The fractions from PLE-4 to PLE-1 were mostly composed of 13 different characteristic sugars in rhamnogalacturonan (RG) I and II, and the sugars contained an arabino- β -3,6-galactan moiety. However, PLE-0.5 did not contain RG-II or β -arabino-3,6-galactan. Treatment of macrophages with fractions PLE-1.5S and PLE-1S led to a 10 μ g/mL increase in interleukin (IL)-6 production, whereas treatment with PLE-4S and PLE-2S fractions composed of low MW polysaccharides resulted in reduced levels of IL-6. These results indicate that this isolation method may be useful for the rapid and convenient fractionation of bioactive RGs from polysaccharide mixtures with various properties.

Key words: persimmon leaves, isolation method, immuno-stimulating activity, polysaccharide, rhamnogalacturonan

서 론

펙틴 물질(pectic materials)은 고등식물의 1차 세포벽과 중엽에 주로 존재하는 다당류로 식물 세포벽의 구성 다당류 중 가장 복잡한 형태로 존재하고 있다(1). 펙틴은 크게 homogalacturonan(HG), rhamnogalacturonan I(RG-I), rhamnogalacturonan II(RG-II) 영역으로 나뉠 수 있으며, 전체 분자의 많은 부분은 직쇄상의 HG로 구성되어 있지만 여기에 다양한 oligosaccharide 및 polysaccharide가 고도로 분지된 RG-I과 RG-II가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있다(2). 이들의 구조는 O'Neill 등(2)에 의해 비교적 상세히 밝혀졌는데, RG-I의 경우 rhamnose(Rha)와 galacturonic acid(GalA)로 구성된 이당류가 반복된 구조

([4)- α -D-GalA-(1,2)- α -L-Rha-(1)n)로 연결된 backbone에 arabinan, galactan, arabinogalactan 및 oligosaccharide류가 주쇄의 rhamnose 4번 탄소를 경유하여 고도로 분지된 구조를 가지고 있다(3). 또한 RG-II는 α -1,4 결합으로 연결된 galacturonic acid를 주쇄로 하고, 여기에 일반 다당류에서는 거의 관찰되지 않는 2-methylfucose (2-MeFuc), 2-methylxylose(2-MeXyl), apiose(Api), aceric acid(AceA), 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid(KDO) 및 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid(DHA) 등의 특이당과 galacturonic acid(GalA), glucuronic acid(GlcA), rhamnose(Rha), arabinose(Ara) 등의 일반당을 구성당으로 하는 oligosaccharide가 아주 복잡한 형태로 분지되어 존재하고 있다(4,5). 최근 펙틴류에서 보고되고 있는 면역 증진 활성을 포함한 대부분의 약리 활성(6)은 HG 영역에서는 거의 보고된 바 없으나 고도로 분지된 RG-I과 특이당류가 결합되어 있는 RG-II에서 발견되고 있으며, 미세 구조의 다양성에 따라 생리활성에 차이가 있는 것으로 보고되어 있다

(4,5). RG류에는 cytokine 생산 자극(7), macrophage 활성화, NK cell 자극 활성화(8,9) 등과 같은 다양한 면역 활성이 존재함이 최근 속속 보고되고 있지만, 식품의 다양성과 비교할 때 그 수는 아직 미미한 실정이다.

펙틴과 같이 복잡한 다당의 혼합물로부터 특정 분자량과 생물 활성을 가진 다당을 선택적으로 분리하기 위해서는 여러 단계의 column chromatography, ultrafiltration 등을 필수적으로 거쳐야 하며(10), 다당이 용해되어 있는 용출 용매 중에 존재하는 염류 및 저분자 물질을 제거할 목적으로 투석 또는 탈염과정이 요구되는 등 많은 전처리 과정을 거쳐야 한다(11). 이처럼 추출 혼합물로부터 다당을 분리·정제하는 과정은 복잡하고 많은 시간이 소요되며, 최종 조제물의 단가를 상승시키는 등의 문제점을 가지고 있어 이를 다루는 연구자들이나 산업적 생산자들에게 큰 부담이 되고 있는 실정이다.

감(persimmon, *Diospyros kaki* Thumb)은 우리나라를 비롯한 동북아시아에서 널리 재배되어 왔으며, 그 과실은 생과와 건시 형태로, 감잎은 차 형태로 많이 이용되고 있다. 특히 최근 들어 감잎 중에는 항산화 및 아토피성 피부염 개선 효과(12), 체지방 감량 및 지질대사 조절 효과(13), 항고혈압 및 혈관 이완(14) 등의 우수한 생리활성이 보고된 바 있으며, 위암 세포주에 대한 항암 효과(15), 돌연변이 유발 억제 및 암세포 증식 억제 효과(16) 등이 보고되기도 하였다. 하지만 감잎의 생리활성에 대한 연구는 대부분 플라보노이드나 탄닌을 대상으로 진행되어 왔으며, 감잎에 존재하는 다당류가 갖는 기능성에 관한 연구는 극히 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 현재 농가에서 대부분 폐기 처리되고 있는 농산부산물인 감잎을 이용, 기능성 다당류를 개발하기 위한 기초연구로 감잎을 식품용 pectinase로 처리하여 얻어진 감잎의 효소분해물로부터 면역 활성 다당체인 RG-I 및 RG-II를 신속 분리하기 위한 분획법을 개발하였다. 또한 이들로부터 얻어진 각각의 다당 분획에 대한 화학 특성 및 면역 활성을 확인함으로써 분리법의 효율성을 검증하고 산업적 응용 가능성을 타진하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 감잎(persimmon leaves)은 2012년 경남 거창군에서 생산되어 건조된 감잎을 구입하여 건조시켜 분말화한 후 실험재료로 사용하였다.

감잎으로부터 면역 활성 다당의 분리 및 정제

감잎으로부터 다당을 분리하기 위하여 감잎 건조분말 100 g을 20배 부피의 증류수에 현탁하고 시판 식품용 pectinase인 Rapidase C80MAX(Vision Co., Seongnam, Korea)를 가하여(분말의 1%(w/w) 첨가) 50°C에서 약 3일간 처리하였다. Pectinase 가수분해물은 6,000 rpm에서 20분

간 원심분리 하여 상등액을 회수하고, 여기에 4배(v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이때 발생한 침전물은 소량의 증류수에 용해시킨 후 동결 건조하여 효소 처리 조다당 획분 PLE를 얻었다. 효소 처리 조다당 시료에 증류수와 에탄올이 1:4로 혼합된 알코올 용액을 가하여 현탁하고 stirring 처리한 후 원심분리에 의해 침전물과 상등액을 분리하였으며, 이때 회수된 침전은 동일 부피의 해당 알코올용액을 가하여 2회 세척을 반복하고 각 침전물과 상등액을 회수하였다. 이때 침전에는 증류수와 에탄올이 1:2로 혼합된 알코올 용액을 가하여 현탁하고 stirring 처리한 후 원심분리에 의해 침전물과 상등액을 분리하였으며, 2회 세척을 반복하여 각 침전물과 상등액을 회수하였다. 이후 침전은 Fig. 1에 제시된 바와 같이 일정한 비율로 혼합된 농도별 알코올용액(DIW : EtOH, v/v, 1:1.5, 1:1, 1:0.5)을 이용, 위와 동일한 방법으로 연속 세척하여 각 처리용매별 12개의 용매 분획물인 침전물(PLE-4, PLE-2, PLE-1.5, PLE-1, PLE-0.5)과 상등액(PLE-4S, PLE-2S, PLE-1.5S, PLE-1S, PLE-0.5S) 획분을 얻었으며 이를 동결 건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

일반 분석 방법

중성당 함량은 galactose(Gal)를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(17)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법(18)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(19)으로, KDO의 신속한 정량을 위해서는 thiobarbituric acid(TBA) 비색정량법(20)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다. 한편 분자량 및 정제도 측정에 사용한 HPLC는 Superdex 75 GL(GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) column을 장착한 HPLC 1260 Infinity(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 50 mM ammonium formate(pH 5.5)를 용매로 0.5 mL/min으로 용출하였으며 refractive index detector(Agilent Technologies)로 검출하였다. 정제 다당의 분자량은 standard pullulans(P-100, 50, 20, 10 및 5; Showa Denko Co., Tokyo, Japan)를 표준물질로 하여 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다. 구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해 한 후, 각각 alditol acetate 유도체로 전환시킨 다음 GC로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 mm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME 6000 series(Young-Lin Co., Anyang, Korea)를 이용하였으며 표준 온도조건 [60°C(1 min), 60°C→220°C(30°C/min), 220°C(12min), 220°C→250°C(8°C/min), 250°C(15 min)]에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다(21).

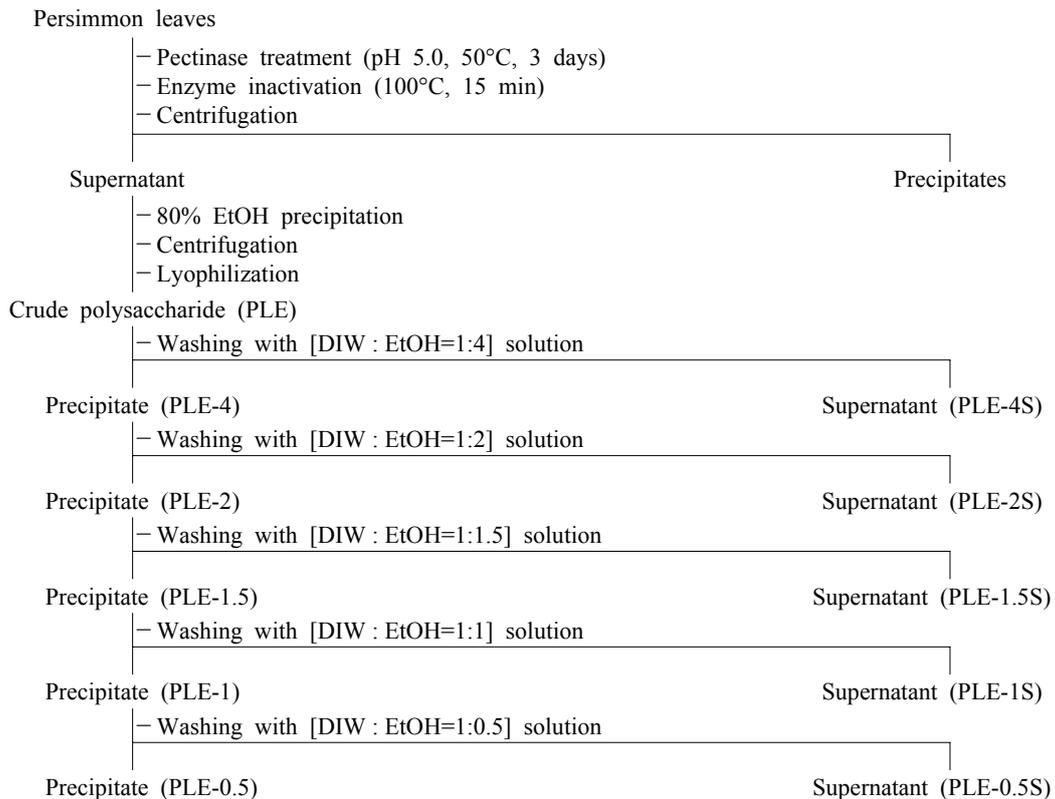


Fig. 1. Purification scheme of bioactive polysaccharides from the pectinase digests of persimmon leaves by ethanol-fractionation method.

β -Glucosyl Yariv reagent와의 반응성

β -Arabino-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β -Glucosyl Yariv reagent(Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 van Holst와 Clarke(22)의 방법에 따라 single adial 젤 확산법으로 측정하였다. β -Glucosyl Yariv reagent 10 μ g/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 well을 만들어 표준물질인 gum arabic 5 μ g을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였다. 이 평판을 습윤상자 내에서 상온, 15시간 정치 분산시킨 후 생성된 침전환을 관찰하여 β -arabino-3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였다.

실험동물

Macrophage 활성 측정을 위해 사용된 실험동물은 BALB/c(6주령, 자성)로 새론바이오(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 일주일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육 조건은 $23\pm 3^\circ\text{C}$, 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 승인(2012-05)을 거쳐 규정에 따라 진행하였다.

Macrophage로부터 IL-6 생산능 측정

BALB/c mouse의 복강에 5% thioglycollate medium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mL 주입하고 96시간 내에 유도된 macrophage를 회수한 후 PBS로 2~3회 세척한 다음 세포수를 2.5×10^5 cells/well로 조정하여 96 well plate에 100 μ L씩 분주하였다. 이를 37°C 의 5% CO_2 incubator에서 2시간 동안 배양하여 macrophage monolayer를 형성시키고 상등액을 제거한 후 미부착 macrophage를 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 MEM (minimum essential medium; Welgene, Daegu, Korea) 배지를 이용하여 3회 세척하였다. 여기에 10% FBS(Welgene)가 첨가된 MEM 배지를 각 well당 100 μ L씩 분주하고, 다양한 농도로 희석된 시료를 100 μ L씩 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. Macrophage에 의해 유도 분비된 배양 상등액 중의 cytokine(IL-6)의 함량 분석은 ELISA set(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

통계처리

실험 결과는 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 처리농도 간 유의적인 차이는 $P <$

0.05 수준에서 Duncan's multiple range test 일원배치 분산분석으로 실시하였다.

결과 및 고찰

감잎으로부터 다당의 분리 및 정제

일반적으로 천연물을 물로 추출한 뒤 고농도의 에탄올 용액을 첨가하면 용해도 차이에 의해 침전되는 성분을 분리할 수 있는데, 이 침전물의 주성분으로는 다당류 및 단백다당류와 같은 고분자 물질이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(23,24). 펙틴류는 수용성으로 열수에 의해 추출이 용이하고 이를 pectinase로 가수분해 하면 HG 영역이 제거되며 RG-I 및 RG-II의 혼합물을 분리할 수 있는데(23), 이는 pectinase 효소 처리에 의해 펙틴 물질이 가수분해 되어 저분자화되면 에탄올에 의해 침전되지 않으며, pectinase에 의해 저항성을 갖는 다당들만이 침전된 결과라 할 수 있다. 따라서 저자 등은 농도가 상이한 알코올용액을 이용하면 생물 활성과 분자량이 상이한 다당 획분 조제가 가능할 것으로 판단하고, 다당 혼합물을 대상으로 특정 성질의 다당 획분을 신속 분리하기 위한 알코올 용매 분리법을 개발하였다. 즉 감잎에 시판 식품용 상업 pectinase인 Rapidase C80MAX를 처리하여 얻은 상등액에 80% ethanol을 처리, 침전물을 동결 건조하여 다당의 혼합물 PLE를 얻었다.

이후 PLE는 증류수와 ethanol이 1:4 비율로 혼합된 알코올용액(DIW : EtOH, v/v, 1:4)을 가하여 현탁한 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min) 하여 침전물과 상등액을 분리하였으며, 이때 회수된 침전은 동일 부피의 해당 알코올용액을 가하여 2회 세척을 반복하고 각각 침전물과 상등액을 회수

하여 침전물 획분을 PLE-4, 상등액 획분을 PLE-4S로 명명하였다. DIW : EtOH=1:4 처리에서 얻어진 침전물 획분 PLE-4는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 DIW : EtOH=1:2 용액에 현탁, 용해한 후 동일 처리를 거쳐 PLE-2, PLE-2S 획분을 얻었으며, 이상과 같이 DIW : EtOH=1:1.5, 1:1, 1:0.5의 알코올용액을 이용한 연속적인 용매 분획에 의해 각 용매에서의 침전물 획분(PLE-1.5, PLE-1, PLE-0.5)과 상등액 획분(PLE-1.5S, PLE-1S, PLE-0.5S)을 각각 획득하였다.

감잎 용매 분리 획분의 화학적 특성

감잎에 용매 분리법으로 얻어진 침전 및 상등액 획분에 대한 화학적 특성 및 구성당 조성을 확인하기 위해 alditol acetate법으로 유도체화 시킨 후 GC를 이용하여 분석하였다. Table 1과 2에 나타난 바와 같이 PLE-4부터 PLE-0.5S까지 11종의 시료에서 총 13종의 구성당이 서로 다른 비율로 검출되었으며 Rha, Ara, Gal가 높은 비율로 검출되었다. 또한 이들 획분에는 2-MeFuc, 2-MeXyl, Api, AceA 및 KDO 등이 검출되었는데, 이들은 RG-II 다당에서만 관찰되는 지표 물질(4,5)로 알려져 있으므로 본 획분들에 RG-II 다당이 들어 있음을 추정할 수 있었다. 한편 PLE-1S에는 RG-II 지표 구성당들이 가장 높은 비율로 검출되어 본 분리 방법에 의해 RG-II가 풍부한 획분을 조제할 경우, 앞서 언급한 바와 같이 PLE-1S를 회수하면 가능할 것으로 판단된다. 또한 RG-I이 풍부한 다당을 회수하는 데 용이할 것으로 판단된 PLE-0.5 획분의 경우, 비록 RG-II의 지표 구성당이 검출되었지만 RG-I에 풍부한 Rha, Ara, Gal 및 GalA가 높은 비율로 검출됨으로써 본 용매 분리법이 RG-I 분리에 유효함을 추정할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Chemical properties of PLE-precipitate polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method using ethanol from enzyme digests of persimmon leaves

Sample	PLE	PLE-4	PLE-2	PLE-1.5	PLE-1	PLE-0.5
Chemical composition (%)						
Neutral sugar	49.5±2.4	47.6±0.6	46.6±0.9	44.8±0.3	43.6±0.6	38.4±0.6
Uronic acid	37.7±1.2	38.2±1.1	39.2±1.1	49.4±0.9	45.3±3.8	60.8±1.3
Protein	11.7±1.8	12.8±2.4	12.9±0.9	4.6±0.8	9.9±0.6	0.6±0.9
KDO-like material ¹⁾	1.1±0.1	1.4±0.1	1.3±0.0	1.2±0.1	1.1±0.1	0.2±0.1
Component sugar ²⁾ (Mole (%) ³⁾)						
2-Methylfucose	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.0	1.0±0.0	1.1±0.1	0.7±0.1
Rhamnose	9.8±0.3	11.1±0.5	9.0±0.2	8.4±0.1	9.6±0.7	9.8±0.0
Fucose	1.0±0.0	1.0±0.1	1.1±0.0	1.1±0.1	1.3±0.1	1.7±0.0
2-Methylxylose	0.9±0.1	0.9±0.1	1.0±0.0	1.1±0.0	1.1±0.1	0.7±0.0
Arabinose	10.1±0.0	9.3±0.7	9.4±0.1	9.2±0.5	8.0±0.9	6.5±0.5
Apiose+Xylose	3.6±0.1	3.4±0.2	3.4±0.1	3.3±0.1	3.4±0.4	4.3±0.2
Acetic acid	0.9±0.8	0.9±1.1	0.9±1.0	1.1±0.7	1.1±1.4	0.7±1.1
Mannose	1.3±0.1	1.5±0.1	1.1±0.1	0.9±0.1	0.7±0.2	0.5±0.2
Galactose	16.7±0.2	15.4±0.7	16.7±0.2	16.2±0.3	15.2±1.0	11.3±0.1
Glucose	4.2±0.0	3.2±0.0	3.0±0.2	2.5±0.1	2.0±0.3	2.2±0.2
Galacturonic acid+Glucuronic acid	37.7±1.2	38.2±1.1	39.2±1.1	49.4±0.9	45.3±3.8	60.8±1.3

¹⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

²⁾Component sugar were analyzed using alditol acetates derivative method.

³⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

Table 2. Chemical properties of PLE-supernatant polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method using ethanol from enzyme digests of persimmon leaves

Sample	PLE-4S	PLE-2S	PLE-1.5S	PLE-1S	PLE-0.5S
Chemical composition (%)					
Neutral sugar	63.9±1.5	49.4±0.7	44.8±1.5	48.0±1.0	49.3±0.2
Uronic acid	30.4±0.2	31.7±0.5	28.4±0.4	29.3±0.9	44.2±0.7
Protein	4.6±0.8	18.1±0.9	25.5±1.2	21.4±0.7	5.4±0.8
KDO-like material ¹⁾	1.0±0.1	0.9±0.1	1.3±0.0	1.3±0.1	1.0±0.2
Component sugar ²⁾ (Mole (%) ³⁾)					
2-Methylfucose	0.0±0.1	0.1±0.2	0.4±0.0	1.1±0.1	0.9±0.0
Rhamnose	7.9±0.3	13.9±0.4	9.6±0.2	9.6±1.2	8.8±0.4
Fucose	0.3±0.0	0.6±0.0	0.7±0.0	0.9±0.0	1.3±0.0
2-Methylxylose	0.0±0.0	0.1±0.2	0.5±0.0	1.1±0.1	1.0±0.0
Arabinose	27.1±1.2	7.7±0.2	8.7±0.5	10.8±0.9	9.2±0.5
Apiose+Xylose	1.7±0.1	3.0±0.1	3.3±0.0	3.3±0.4	4.3±0.2
Acetic acid	0.0±0.4	0.1±0.7	0.4±0.7	1.5±0.8	0.9±1.8
Mannose	1.7±0.3	3.3±0.1	2.6±0.2	1.3±0.2	1.0±0.1
Galactose	10.9±0.5	11.1±1.1	11.6±0.5	15.0±2.3	19.4±0.2
Glucose	14.3±0.5	9.5±0.6	7.0±0.4	3.4±0.5	2.5±0.3
Galacturonic acid+Glucuronic acid	30.4±0.2	31.7±0.5	28.4±0.4	29.3±0.9	44.2±0.7

¹⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

²⁾Component sugar were analyzed using alditol acetates derivative method.

³⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

감잎 용매 분리 획분의 분자량 측정

감잎 효소 처리물 PLE로부터 용매 분리법에 의해 얻어진 각 획분의 분자량 분포 및 순도 여부를 확인하기 위해 Superdex 75 GL column이 장착된 HPLC를 이용하여 elution pattern을 확인한 결과(Fig. 2), EtOH의 농도가 줄어들수록 침전물 획분에서는 저분자 물질이 제거되는 경향을 보였으며, 반대로 상등액 획분에서는 저분자 물질에서 고분자 물질 쪽으로 다당이 회수되는 경향을 보였다. 이때 표준물질

(pullulan series)을 이용하여 분자량별 용출 경향을 확인한 결과, PLE에 존재하였던 분자량 1,000 Da 미만의 저분자 물질은 DIW:EtOH=1:1.5 처리에 의해 거의 완전한 수준으로 제거됨을 확인할 수 있었다. 또한 PLE-1 획분에서 분자량 10 kDa의 peak(RG-II로 추정)가 급격히 소실되고 반대로 PLE-1S에서는 증가되는 결과로부터 동 처리를 행하여 상등액을 취한 경우 RG-II의 분자량 10 kDa peak가 거의 소실됨과 함께 분자량 수만 Da 이상으로 추정되는 peak가 main peak로 관찰(tailing 존재)됨으로써 DIW:EtOH=1:1 처리를 행할 경우 분자량이 높은 RG-I 다당이 풍부한 획분을 조제할 수 있음을 확인할 수 있었으며, PLE-0.5 획분에서는 RG-I으로 추정되는 peak가 주다당으로 관찰됨으로써 DIW:EtOH=1:0.5 처리를 행할 경우 거의 순수하게 RG-I 다당을 회수할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 용매 분리법을 감잎 효소 처리물에 적용할 경우, 특히 PLE-1S에서 회수할 경우 RG-II가 풍부한 획분을, PLE-0.5에서 회수할 경우 RG-I이 풍부한 시료를 빠르게 얻을 수 있으며, 많은 시설과 시간이 요구되는 column chromatography나 한외여과 등을 거치지 않고도 특정 다당을 회수할 수 있음을 확인할 수 있었다.

감잎 용매 분리 획분과 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

RG-I의 경우 RG-II 및 HG와 함께 공유적으로 결합되어 펙틴 물질을 구성하고 있다고 알려져 있으며, RG-I에는 rhamnagalacturonan 주쇄에 arabinan, galactan 및 arabinogalactan이 측쇄로 복잡하게 뻗어져 나가있는 구조로 존재하고 이들 구조는 RG-I의 특징적 측쇄로 인정되고 있

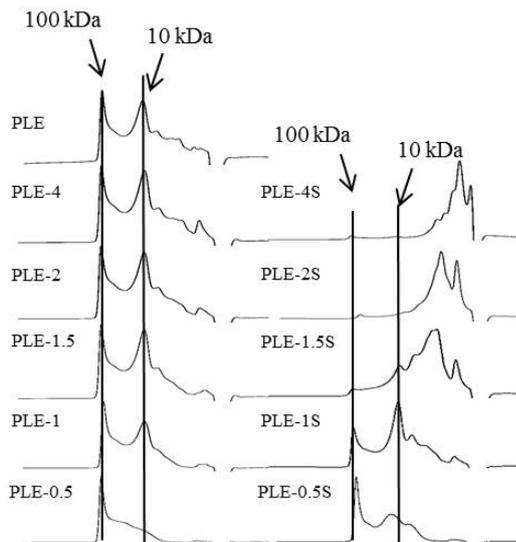


Fig. 2. Molecular-weight patterns of the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method from the pectinase-digests of persimmon leaves. Each polysaccharide fraction was analyzed by HPLC equipped with Superdex 75 GL column, and molecular weight calculated from the pullulan as a standard.

며, 많은 연구에서 각종 생리활성이 높다고 보고된 다당 영역이다(25). 용매 분리법에 의해 얻어진 감잎 효소 처리 다당획분의 구성당 분석 결과에서 arabinose와 galactose가 높은 비율로 존재하고 있다는 사실로부터 이들 다당획분에 arabinogalactan 측쇄의 함량이 높게 존재할 가능성이 판단되었으므로 이를 확인하기 위해 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다. β -glucosyl Yariv reagent는

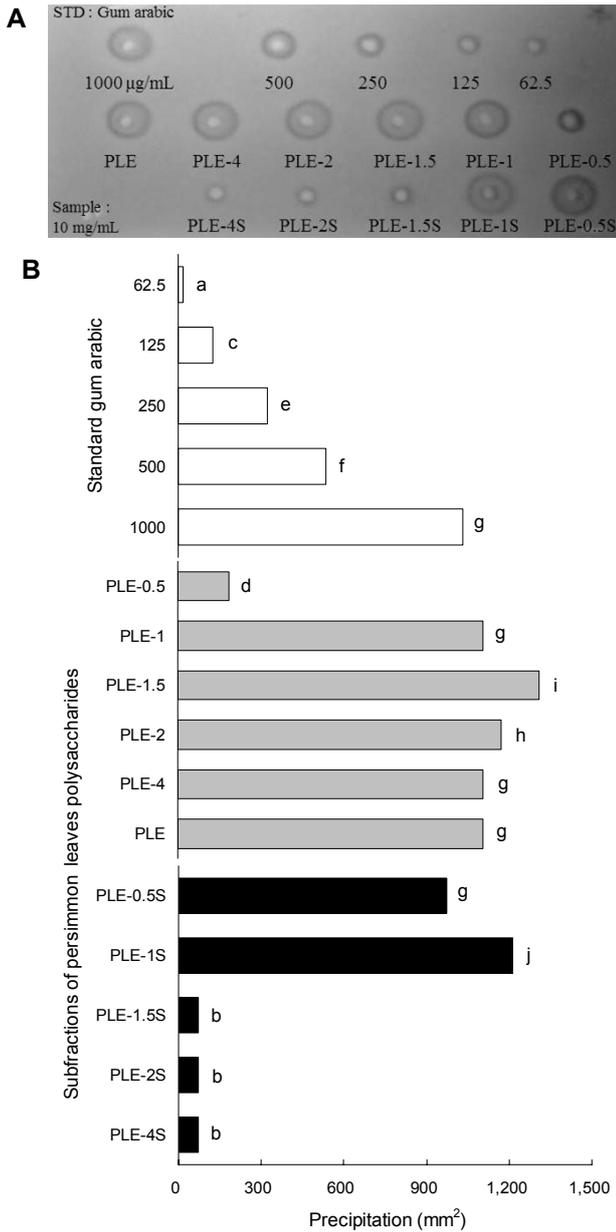


Fig. 3. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β -glucosyl Yariv reagent and the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method from the pectinase-digests of persimmon leaves. β -Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity to β -arabino-3,6-galactan. The result was calculated to relative β -arabino-3,6-galactan (percent) against gum arabic as a positive reference. Means with different letters (a-j) indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

arabinogalactan 중 type II형의 β -arabino-3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는데(26), 이는 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 알려져 있으므로 이를 이용하여 single radial 젤 확산을 시행함으로써 β -arabino-3,6-galactan의 존재를 확인하고자 하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 표준 β -arabino-3,6-galactan인 gum arabic은 농도별로 침전환이 증가하는 양상을 보여주었으며, PLE 침전물 시료의 경우 PLE-4부터 PLE-1.5까지 의존적으로 침전환이 증가하다가 PLE-1에서 약간 감소하였고, 특히 PLE-0.5획분에서는 침전환이 급격히 소실되었다. 한편 PLE 상등액 시료의 경우 PLE-4S부터 PLE-1.5S까지는 침전환이 거의 관찰되지 않았으나 PLE-1S에서 급격히 큰 침전환을 형성하였으며 PLE-0.5에서 약간 감소하는 경향을 보였다. 이러한 사실은 DIW:EtOH 비율이 1:1 이하로 처리하고 상등액을 회수할 경우 β -arabino-3,6-galactan 측쇄 부분을 함유한 RG-I 다당을 얻을 수 있으며, PLE-0.5 침전물에서는 이들이 대부분 제거된 RG-I 함유 다당이 회수 가능함을 알 수 있었다.

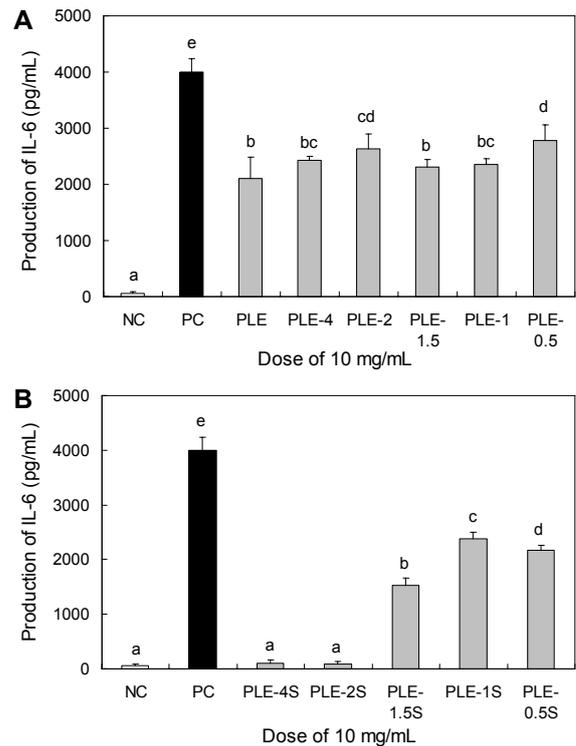


Fig. 4. Effect of the polysaccharide fractions obtained by ethanol-fractionation method on IL-6 production by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^5 /well) were cultured with various concentrations of samples for 24 h, and then concentration of IL-6 in the cultured medium was determined by ELISA. Lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control, ■) at 5 μ g/mL, and only media was used as the NC (negative control, □). Means with different letters (a-e) indicate significant differences at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

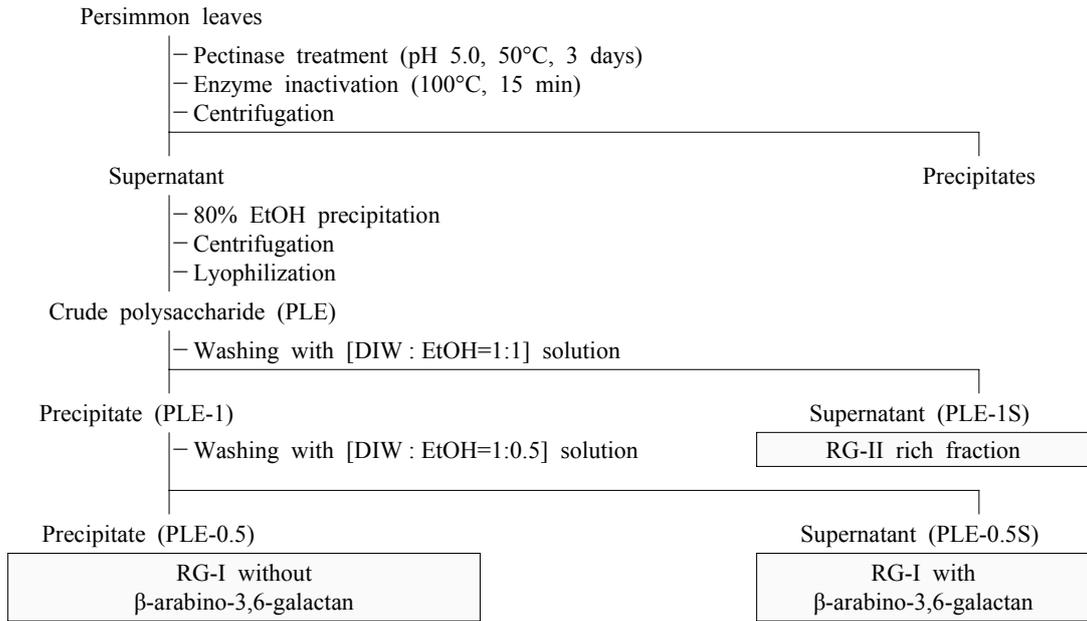


Fig. 5. Newly developed ethanol-fractionation method for the isolation of immuno-stimulating polysaccharides from the pectinase digests of persimmon leaves. RG means rhamnogalacturonan.

감염 용매 분리획분의 macrophage 자극에 의한 cytokine 생산 활성 측정

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine를 분비하여 면역 현상을 조절하고 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서 항원 제시와 림프구의 비특이적인 면역작용에 관계하며, 중앙 세포에 대해서는 직접적인 상해 활성을 나타낸다(27,28). Macrophage에서 분비되는 cytokine인 IL-6는 외부 침입 인자에 의한 인체 감염 시 면역반응을 촉진시키는 역할을 한다. IL-6와 같은 proinflammatory cytokine의 분비는 감염에 의한 숙주의 생존 및 손상된 조직의 복구에 필수적이라고 알려져 있으며(29), IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암 효과가 있다고 보고되고 있다(30). 이전 실험에서 감염 유래의 효소 처리 다당은 macrophage를 자극하여 cytokine 생산을 촉진시키는 것으로 확인된 바(31), 용매 분리법에 의해 얻어진 시료들에 대해 이를 재확인하는 실험을 행하였다. 용매 분리 과정에서 얻어진 PLE 침전시료들은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 활성이 높은 RG-I 및 RG-II 또는 RG-I만을 함유하고 있어 농도와 무관하게 높은 IL-6 생산 증진 효과를 보인 반면, PLE 상등액 시료들의 경우 주로 저분자 물질이 농축되어 있는 PLE-4S 및 PLE-2S에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 하지만 RG-II가 분리되어 나오기 시작하는 PLE-1.5S와 PLE-1S에서는 높은 IL-6 생산량을 보였고, RG-I이 풍부하게 함유된 PLE-0.5S에서는 주로 분리된 처리 농도와 무관하게 높은 활성을 보였다.

감염 조다당으로부터 특정 면역 활성 다당의 선택적 조제

이상의 결과는 Fig. 5에 종합한 바와 같이 감염 유래 다당 혼합물로부터 면역 활성이 우수한 RG-II가 풍부한 다당의 분리를 위해선 PLE-1S를 조제하면 가능하며 고면역 활성의 RG-I 다당을 회수하기 위해선 DIW : EtOH=1:0.5 용매로 세척하여 이 중 침전획분인 PLE-0.5는 β-arabino-3,6-galactan이 제거된 RG-I 획분으로, 상등액 획분인 PLE-0.5S는 β-arabino-3,6-galactan이 함유된 RG-I 획분으로 이용하면 가능할 것으로 판단된다.

따라서 본 실험에서 제안된 에탄올을 이용한 다당의 용매 분리법은 다당 혼합물로부터 화학 특성 및 생물 활성이 상이한 특정 다당만을 선택적으로 정제 또는 농축함에 있어 유효하며, 이를 이용할 경우 장시간의 시일과 복잡한 장비 및 비용이 소요되었던 다당의 선택분리 공정(column chromatography, 한외여과, 투석 등)을 대체하여 효율적이고 신속한 분리 및 높은 수율과 저렴한 생산가 등 산업적 생산 요구에 만족하는 신공정으로 이용 가능하다고 최종 확인할 수 있었다.

요 약

다당이 갖는 각종 생물 활성은 그 구조의 특성 및 분자량 분포에 의해 달라지므로 특정 다당을 분리하기 위한 정제 과정은 다당 연구에 있어 필수적으로 요청된다. 본 연구에서는 서로 다른 특성을 소유한 다당을 분획하기 위한 간편하고 신속한 분리법을 개발하기 위해 한국산 감염으로부터 조제한 다당 혼합물을 이용, 본 분리법을 최적화하였다. 감염은 pectinase 처리 후 에탄올 침전법을 통해 조다당 획분인

PLE로 조제되었으며, PLE는 재차 농도별로 연속 회석된 에탄올 용액(EtOH:DIW=4:1, 2:1, 1.5:1, 1:1 및 0.5:1)을 이용하여 총 10개 획분(5개 침전물 획분: PLE-4~PLE-0.5, 5개 상등액 획분: PLE-4S~PLE-0.5S)으로 분획하였다. HPLC 분석 결과 PLE-4, PLE-2 획분은 저분자와 고분자 획분이 혼합된 다당이, PLE-1.5~0.5 획분에는 고분자 다당이 주로 검출되었다. 또한 PLE-4~PLE-1 획분은 구성당 분석 결과 RG(rhamnogalacturonan)-I과 RG-II 다당의 지표 구성당인 총 13종의 서로 다른 당으로 구성되어 있음이 확인되었으며, β -arabino-3,6-galactan 잔기를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 하지만 PLE-0.5 획분에서는 RG-II 및 β -arabino-3,6-galactan 잔기를 함유하고 있지 않았다. 한편 PLE-1.5S~PLE-1S 획분을 처리한 마우스 복강 대식세포에서는 농도 의존적인 IL-6의 생산 증가가 관찰된 반면, 저분자 다당으로 구성된 PLE-4S 및 PLE-2S 획분에서는 활성이 매우 낮음이 확인되었다. 이상의 결과로부터 본 분리 방법이 다양한 특성을 갖는 다당의 혼합물로부터 생물 활성을 갖는 RG류를 신속하고 간편하게 분리하는 데 있어 유용한 방법임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Ridley BL, O'Neill MA, Mohan D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods Plant Biochem*. Dey PM, ed. Academic Press, London, UK. Vol 2, p 415-441.
- Engelsen SB, Cros S, Mackie W, Perez S. 1996. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers* 39: 417-433.
- Ishii T, Matsunaga T. 2001. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* 57: 969-974.
- Perez S, Rodriguez-Carvajal MA, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85: 109-121.
- Srivastava R, Kulshreshtha DK. 1989. Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry* 28: 2877-2883.
- Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T. 1998. Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. *Carbohydr Res* 307: 97-106.
- Mueller EA, Anderer FA. 1990. Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnogalacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells. *Immunopharmacology* 19: 69-77.
- Shin KS, Lee H. 1997. 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.
- Mueller EA, Anderer FA. 1990. Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. *Cancer Res* 50: 3646-3651.
- McNeil M, Darvill AG, Albersheim P. 1980. 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.
- Jung WY, Jeong JM. 2012. Change of antioxidative activity at different harvest time and improvement of atopic dermatitis effects for persimmon leaf extract. *Kor J Herbology* 27: 41-49.
- Jung UJ, Lee JS, Bok SH, Choi MS. 2011. Effects of extracts of persimmon leaf, buckwheat leaf, and Chinese matrimony vine leaf on body fat and lipid metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1215-1226.
- Kawakami K, Aketa S, Sakai H, Watanabe Y, Nishida H, Hirayama M. 2011. Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1435-1439.
- Kim HJ, Kim MK. 2003. Anticancer effect of persimmon leaf extracts on Korean gastric cancer cell. *Korean J Nutr* 36: 133-146.
- Moon SH. 2002. Inhibitory effect of persimmon leaves on the mutagenicity in spore *rec* assay and on the growth of human cancer cells. *Korean J Food & Nutr* 15: 23-28.
- 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.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54: 484-489.
- 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.
- 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.
- 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.
- van Holst GJ, Clarke AE. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148: 446-450.
- McNeil M, Darvill AG, Aman P, Franzen LE, Albersheim P. 1982. Structural analysis of complex carbohydrates using high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and mass spectrometry. In *Methods in Enzymology*. Ginsburg V, ed. Academic Press, New York, NY, USA. Vol 83, p 3-45.
- Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM, Suh HJ. 2005. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 35-48.
- Yu KW, Hwang JH. 2001. Characterization of bone marrow cell proliferating arabinogalactan through Peyer's patch cells from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *J Food Sci Nutr*

- 6: 180-186.
26. van Holst GJ, Clarke AE. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148: 446-450.
27. 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.
28. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. 1980. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303: 622-626.
29. Ohta Y, Lee JB, Hayashi K, Fujita A, Park DK, Hayashi T. 2007. In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *J Agric Food Chem* 55: 10194-10199.
30. Meyer RA. 2007. *Immunology: from cell biology to disease*. 1st ed. Wiley Publisher, Hoboken, NJ, USA. p 102-107.
31. Shin YA, Park HR, Hong HD, Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharide fractions isolated from persimmon leaves. *Korean J Food & Nutr* 25: 941-950.