

시판 인스턴트 커피에서 추출한 다당류의 화학적 특성 및 면역활성

곽봉신 · 신광순*
경기대학교 식품생물공학과

Chemical Characteristics and Immunostimulating Activity of Crude Polysaccharide Isolated from Commercial Instant Coffee

Bong-Shin Kwak and Kwang-Soon Shin*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract To elucidate the new biologically active ingredient in commercial instant coffee, a crude polysaccharide (ICP-0) was isolated by ethanol precipitation, and its immunostimulatory activity was estimated. ICP-0 mainly consisted of galactose (55.5%), mannose (25.7%), arabinose (6.0%), and galacturonic acid (10.1%), suggesting the possibility of its existence as a mixture of galactomannan or pectic polysaccharide. ICP-0 showed proliferative activity in peritoneal macrophages and splenocytes. ICP-0 dose-dependently augmented the production of nitric oxide and reactive oxygen species by peritoneal macrophages. In addition, murine peritoneal macrophages stimulated by ICP-0 showed enhanced production of various cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-12) as compared to unstimulated murine peritoneal macrophages. In an *in vitro* assay for assessing intestinal immunomodulation, the ICP-0-treated Peyer's patch cells showed higher bone marrow cell proliferation activity at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and higher production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, compared to the untreated Peyer's patch cells. These results suggest that polysaccharides in commercial instant coffee have a potentiality for macrophage functions and the intestinal immune system.

Keywords: instant coffee, polysaccharide, immunostimulating activity, Peyer's patch, intestinal immune system

서 론

커피는 특유의 맛과 향이 조화되어 만들어진 대표적인 기호식품으로써, 국내는 물론 전세계 사람들이 즐겨 마시며, 그 소비량은 해마다 꾸준히 증가되고 있다. 전 세계적으로 커피콩 거래량은 2015년도 기준 1억 520만 포대로 2014년도 대비 약 1.2% 증가하였으며(1), 국내에서도 2014년도 기준 20세 이상 1인당 커피 소비량은 341잔으로 연평균 증가율은 3.0%(2)로 증가되고 있다. 이 중, 과거부터 현재까지 대중들에게 가장 인기 있는 인스턴트 커피(instant coffee)는 커피콩을 볶은 뒤, 열수를 이용하여 추출액을 만들고, 이를 동결건조와 분무건조법을 이용하여 분말화한 후, 제품화된 커피로, 물에 쉽게 녹아 소비자들이 간편하게 즐길 수 있다. 또한, 건조과정을 통해 수분이 감소됨에 따라 부피와 질량이 줄어들어 운송이 용이하고, 수분활성도가 낮아 일반 추출커피에 비해 저장기간이 상당히 길다. 최근 소비량이 늘어남에 따라 커피에 대한 다양한 연구가 진행되고 있는데, 커피에는 항산화 물질인 카페인(caffeine), 클로로겐산(chlorogenic acid)과 카페스토(cafestol) 등이 있으며(3,4) 미량물질로 마그네슘, 포타슘, 나이아

신, 비타민 E 등이 존재한다(4). 특히 카페인과 클로로겐산은 저밀도지질단백질(low density lipoprotein, LDL)이 산화되어 동맥 경화를 일으키는 것을 감소시켜주며(5), c-Jun N-terminal kinase (JNK)와 activator protein 1 (AP-1)을 경유하는 항염증과 골격근의 인슐린 저항성을 개선시킴으로써, 제II형 당뇨병을 개선시키는데 도움을 준다고 보고된 바도 있다(6). 또한, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)에 걸린 환자들에게 아밀로이드반(amyloid plaque)이 공통적으로 나타나는데, 이를 이루고 있는 베타 아밀로이드($A\beta$)를 생산해 내는 효소인 secretase를 저해하여 알츠하이머병을 억제할 수 있는 것으로 알려지면서(7), 이제는 커피도 기호식품을 넘어서 커피의 약리적인 효과에도 많은 연구가 이루어지고 있는 추세이다. 그러나, 커피 안에 존재하는 폴리페놀(polyphenol)이 커피의 모든 약리활성을 책임진다고는 할 수 없으며, 커피 중에 존재하는 다당류 등의 타 성분에서도 새로운 활성이 존재할 가능성이 크다. 따라서 본 연구에서는 시중에서 쉽게 구할 수 있는 인스턴트 커피를 대상으로 다당류를 분리하고 이들의 화학적인 특성과 면역 증진활성에 대해 검토함으로써, 커피 내에 존재하는 새로운 고부가 가치 생리기능성 물질의 존재와 활용을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 시판용 인스턴트 커피가루는 'D'사(Seoul, Korea) 제품 중 아라비카(Arabica) 품종(페루와 콜롬비아산)을 시중 대형 유통매장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 16227, Korea
Tel: 82-31-249-9655
Fax: 82-31-249-9655
E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Received April 5, 2016; revised May 09, 2016;
accepted May 10, 2016

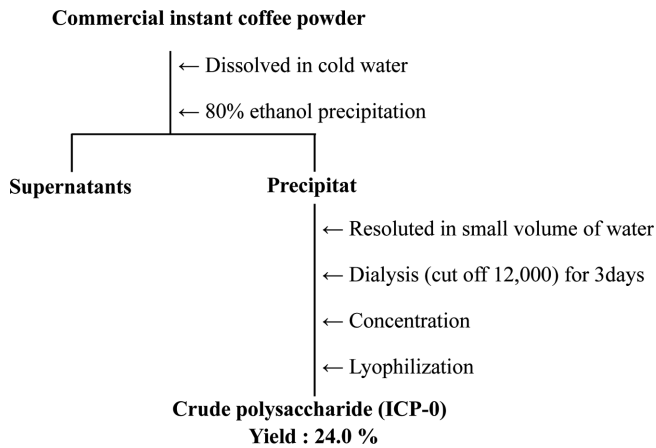


Fig. 1. Isolation of crude polysaccharide from commercial instant coffee.

실험동물

생후 6-7주령의 웅성 BALB/c와 C3H/HeJ를 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 3일간의 순화를 거친 뒤, 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에서 5마리씩 넣어 온도 22±3°C, 습도 55-70%에서 사육하였으며 물과 사료는 자유급식 형태로 유지하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회의 허가(2014-005)를 거치고, 이의 규정에 따라 실시하였다.

Instant coffee로부터 다당류의 분리

100 g의 시판용 인스턴트 커피로부터 조다당류를 분리하기 위해 1 L의 물을 첨가하여 냉수추출 후, 여기에 4배 부피의 95% 에탄올(ethanol, EtOH)을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 원심분리(6,000 rpm, 30 min)하여 침전물을 회수하였다. 그 후 소량의 증류수에 용해하여 투석 튜브(dialysis tubing) (cut off 12,000-14,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 2일간 투석을 진행하여 저분자 물질을 선택적으로 제거하였다. 이후, 동결 건조(FreeZone, Labconco, Kansas city, MO, USA)하여 시판용 인스턴트 커피로부터 분리한 조다당류 ICP-0 (Instant Coffee Polysaccharide)를 동일방법으로 4회 진행하여 얻었다(Fig. 1).

일반분석과 구성당 분석

시판용 인스턴트 커피로부터 분리한 ICP-0의 당 함량을 분석하기 위해 중성당은 갈락토스(galactose)를 표준물질로 하여 페놀-황산(phenol-sulfuric acid)법(8)을, 산성당은 D-갈락투론산(D-galacturonic acid)을 표준물질로 하여 *m*-하이드록시비페닐(*m*-hydroxybiphenyl)법(9)을, 단백질의 함량은 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA; Sigma-Aldrich)을 표준물질로 하여 Bradford 법(10)을, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 비색정량법(11)을 사용하였다. 구성당 분석은 시료를 2 M 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)으로 121°C, 30분간 가수분해하여 건조시킨 후, 수소화붕소나트륨(sodium borohydride, NaBH₄ in NH₄OH)을 첨가하여 상온에서 개환시킨 뒤, 무수 아세트산(acetic anhydride)과 피리딘(pyridine)으로 121°C에서 30분 동안 아세틸화(acetylation) 과정을 거쳐 알디톨 아세테이트(alditol acetate) 유도체(12)로 전환시켰으며, 아세톤(acetone)을 용매로 하여 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC)로 분석하였다. 분석장치는 SP-2380 capillary column (0.2 μm×30 m; Supelco, Bellefonte, PA,

USA)이 연결된 GC ACME-6100 (Young-Lin Co., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 표준 온도조건 [60°C (1 min), 60°C→220°C (30°C/min), 220°C (12 min), 220°C→250°C (8°C/min), 250°C (15 min)]에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, 불꽃이온화검출기(flame ionization detector)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 알디톨 아세테이트(alditol acetate)유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

대식세포(macrophage)에 의한 세포독성(cytotoxicity)과 사이토카인(cytokine) 생산능 측정

대식세포(macrophage)에 대한 세포독성 및 사이토카인 생산자극 활성 측정은 Suzuki 등(13)의 방법을 실험실 여건에 맞춰 변형하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 BALB/c mouse 복강에 5% thioiglycollate 배지(Sigma-Aldrich)를 1 mL 주입하고 72시간 내에 유도된 대식세포를 회수한 후, 10% 소태아혈청(fatal bovine serum, FBS; Welgene Inc., Daegu, Korea)이 첨가된 RPMI 1640 medium (Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) (RPMI1640-FBS)을 이용하여 2.5×10⁶ cells/mL로 세포 수를 조정된 뒤, 96 well plate에 100 μL씩 분주하였다. 이를 5% CO₂ 배양기(CO₂ incubator)에서 배양(37°C, 2 h)하여 macrophage monolayer을 형성시키고, 그 후 10-100 μg/mL로 희석된 ICP-0, 양성대조군(PC) lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O127:B8 (LPS; Sigma-Aldrich)와 음성대조군(NC)으로써 시료를 첨가하지 않는 배지를 각각 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 위의 조건과 동일하게 배양하였다. 그 후, 생육 정도를 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Co. Ltd., Kumamoto, Japan)을 제조사의 지침에 따라 사용하였고, macrophage에 의해 유도, 분비된 배양 상등액 중의 사이토카인 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA; BD biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

산화질소(Nitric oxide, NO), 활성산소(Reactive oxygen species, ROS) 생산능 측정

상기에서 제시된 방법과 동일하게 세포 수를 2.5×10⁶ cells/mL로 조정된 뒤, 96 well plate에 100 μL씩 분주한 뒤, 다양하게 희석된 시료를 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 대식세포에서 분비된 세포 배양액을 회수하여, 배양액 중 생산된 산화질소(nitric oxide, NO), 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생산능을 확인하였다. 세포 배양액 내의 NO는 Griess reagent (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였고, ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen, Eugene, OR, USA)가 활성 산소에 의해 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)을 형성하는 반응을 이용, 배양 후의 세포에 10 μM의 DCFH-DA (Invitrogen)를 첨가하여 2시간 동안 배양시킨 후 세포를 용해시켜 상등액의 형광값을 형광측정기(Victor-2, PerkinElmer, Wellwsley, MA, USA)를 이용해 excitation 450 nm/emission 530 nm에서 측정하였다.

림프구(Lymphocyte) 증식 활성능 측정

BALB/c mouse (6-8주령, 웅성)에서 비장(spleen)을 적출하여 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)를 거쳐 비장세포를 획득한 후, 0.2% 염화나트륨(NaCl)을 이용하여 적혈구를 제거하고, RPMI1640-FBS 배지로 2-3회 세척하여 세포 수를 5×10⁶ cells/mL이 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 현탁액은 96 well plate에 180 μL씩 분주하고 다양하게 희석된 시료 및 LPS를 20 μL 첨가하여

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 각 시료에 대한 활성측정은 CCK-8 (Dojindo. Co. Ltd.)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

Peyer's patch 자극을 통한 장관면역활성 측정

C3H/HeJ mouse의 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 무균적으로 적출한 후 100 mesh의 stainless sieve를 이용하여 조직을 마쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh의 stainless sieve로 여과한 후 minimum essential eagle (MEM; welgene Inc.) with 10% FBS로 세척하고 2×10⁶ cells/mL로 세포농도를 조정 한 후, 96 well plate에 180 µL씩 분주하고 다양한 농도로 희석한 시료 20 µL를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 배양한 상등액 50 µL를 회수하여 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)의 생성능을 ELISA kit (BD biosciences)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였다. 또한 배양 상등액을 일부 취하여 골수세포 증식활성을 측정하기 위해 사용되었으며, 골수세포는 동일 종의 mouse 허벅지의 대퇴부 뼈를 회수한 뒤 양끝뼈 부분을 절단 하여 대퇴골체를 획득하였다. 이후 골수부분에 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS)으로 2-3회 세척하여 세포를 획득하였으며 여과, 세척하고 2.5×10⁶ cells/mL의 세포농도로 조정 한 후, 96 well plate에 100 µL씩 분주하였다. 그 후, Peyer's patch와 시료와의 반응을 통해 획득한 상등액과 RPMI1640-FBS를 각각 50 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 그 후, 골수세포 증식활성측정은 배양액이 담긴 96 well plate에 CCK-8 kit (Dojindo Co. Ltd.) 용액 20 µL를 첨가하고 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 골수세포 증식도와 비교하여 상대적 활성(%)을 계산하였다.

통계처리

실험결과들은 각각의 군에서 나온 결과값을 가지고 평균값±표준편차(Standard deviaton)으로 나타내었으며, 통계의 신뢰도에 있어서는 Student's *t*-test를 이용하여 NC 또는 PC와 다양한 농도별로 조제한 ICP-0 대조군 간의 유의성을 *p*<0.05 수준에서 검정하여 인스턴트 커피에서 얻은 조다당류획분의 시료 활성을 나타내었다.

결과 및 고찰

인스턴트 커피로부터 추출한 조다당류의 특성

본 연구에서 인스턴트 커피로부터 80% 에탄올 침전법을 이용하여 투석과 동결 건조를 거쳐 회수한 조다당류 ICP-0는 4회 반복실험을 진행한 결과, 건조 시판 커피분말 대비 평균 24%의 매우 높은 비율로 다당류를 함유하고 있었다. ICP-0의 일반 화학적 특성 및 구성당을 살펴본 결과, Table 1과 같이 중성당 89.9% 산성당 10.1%로 이루어져 있는 다당체이며, 그 중 주로 갈락토스(galactose) 55.5%와 만노스(mannose) 25.7%로 구성되어 있으며, 소량의 아라비노스(arabinose), 람노오스(rhamnose) 그리고 포도당(glucose)이 함유되어 있어 이는 주로 이미 기존의 coffee에서 보고된 갈락토만난(galactomannan)이나 아라비노갈락탄(arabinogalactan) 구조의 구성성분과 유사한 결과를 나타냈다(14). 그리고 단백질과 Kdo는 함유하고 있지 않았다.

Table 1. Chemical properties of crude polysaccharide isolated from commercial instant coffee (ICP-0)

Chemical composition (%)	ICP-0
Yield from instant coffee	24%
Neutral sugar	89.9±0.0
Uronic acid	10.1±0.0
Protein	-
Kdo-like materials ¹⁾	-
Component sugar ²⁾	Mole % ³⁾
Rhamnose	1.0±0.0
Fucose	-
Arabinose	6.0±0.0
Xylose	-
Mannose	25.7±0.8
Galactose	55.5±0.9
Glucose	1.6±0.1
Galacturonic acid+Glucuronic acid	10.1±0.1

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.

인스턴트 커피로부터 분리한 조다당류 ICP-0의 대식세포 자극에 의한 세포독성과 사이토카인 생산활성

대식세포(macrophage)는 체내에 침입하는 미생물을 파괴하고 괴사시키는 1차 면역방어선이며(15), 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하여 면역현상을 조절한다고 알려져 있다(16). Mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage를 이용하여 ICP-0의 세포에 대한 직접 독성여부를 측정하였다. 2.5×10⁶ cells/mL로 조정된 정상세포주에 ICP-0 10, 100, 200 µg/mL의 농도를 가하여 24 시간 배양한 후, 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 2(A)에 나타난 바와 같다. 정상세포의 경우 저농도인 10 µg/mL의 농도에서 음성대조군(negative control, NC) 대비 높은 세포 증식능을 보여주었으며, 농도가 증가함에도 불구하고 독성은 나타나지 않았다. 한편, 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6)는 여러 가지 기능을 가지고 있는 대표적인 다기능(multifunctional) 사이토카인의 일종으로, 면역초기 반응에서 생산되는 주요한 반응 매개물질이며 면역반응, 급성기 반응, 조혈작용을 활성화시키고, 내분비계와 신경기관에 영향을 준다고 알려져 있다(17). 인터류킨-12(Interleukin-12, IL-12)는 세포매개성 면역을 활성화하며 수지상세포(dendritic cell), B-림프구(B-lymphocyte), 자연살해세포(natural killer cell)의 활성을 조절하여 암세포를 선택적으로 파괴시키는데 중요한 역할을 한다고 알려진 사이토카인이다(18). 또한 종양괴사인자-알파 (tumor necrosis factor-α, TNF-α)는 대식세포와 단핵구(monocyte)의 다면발현을 일으키고, 특정 종양세포에 대한 출혈성 괴사를 일으킨다고 알려져 있다(19). 이를 통하여 인스턴트 커피에서 추출한 다당류 물질인 ICP-0의 자극에 의한 대식세포의 사이토카인중 하나인 IL-6, IL-12 및 TNF-α 생산능을 *in vitro*에서 측정 한 결과, IL-6의 경우(Fig. 2(B)), 저농도인 10 µg/mL에서도 PC만큼 우수한 활성을 보여주었으며, 고농도 1,000 µg/mL의 농도와 유사하게 높은 활성을 보였다. IL-12 및 TNF-α의 경우(Fig. 2(C) 및 2(D)), 농도 의존적인 활성을 보여주었으며, 200 µg/mL 이상의 농도에서는 PC 대비 높은 활성

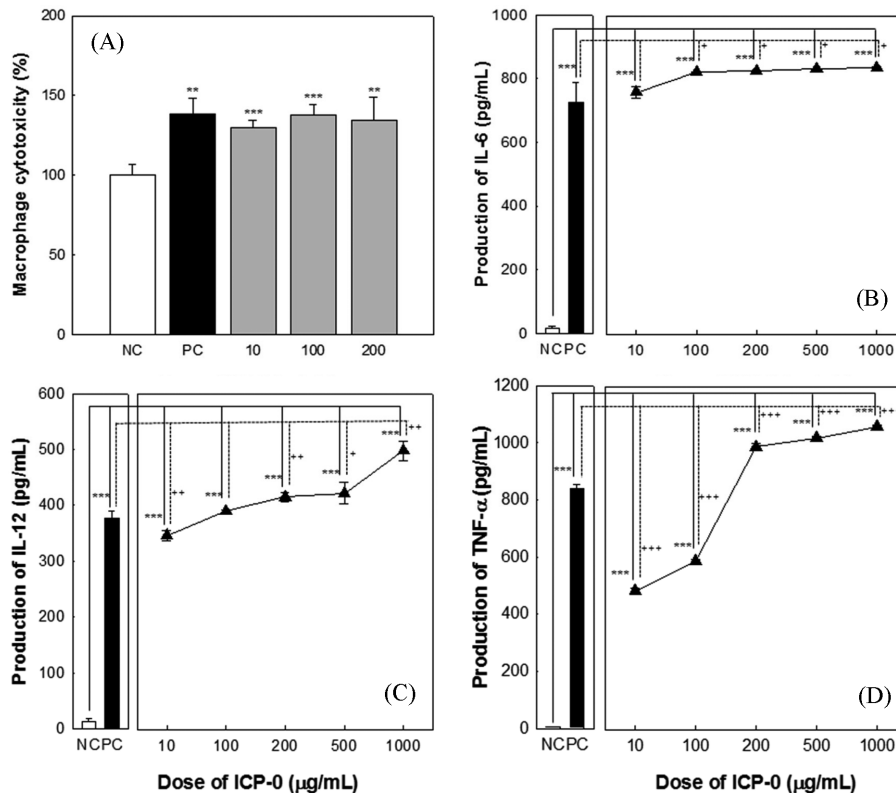


Fig. 2. Effect of ICP-0 from commercial instant coffee on cytotoxicity (A), and cytokine production such as IL-6 (B), IL-12 (C), and TNF- α (D) by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/mL) were treated with various concentrations of ICP-0 in 96-well plates for 24 h. The level of each cytokine in the culture supernatants was determined by ELISA kits. A 5 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O127:B8 was used as positive control (PC) and media was used as the negative control (NC). Significant difference from negative control (NC) at ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by Student's *t*-test. Significant difference from positive control (PC) at + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ by Student's *t*-test.

을 나타냄을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 대식세포를 인스턴트 커피 유래 다당류인 ICP-0에 의해 자극한 결과, 염증부위에 면역세포를 유도하는 것과 직접 관련이 있는 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-6와 세포성 면역능의 활성화와 관련있는 IL-12, 또한 종양 괴사 유발과 감염저항성 향상과 관련이 있는 TNF- α 를 유의하게 생산하는 활성을 가지고 있음을 확인하였고, 이는 인스턴트 커피 유래 다당류 ICP-0가 생체방어에 작용하는 대식세포를 활성화 시킬 수 있는 기능이 있다고 사료되었다.

인스턴트 커피 유래 조다당류의 macrophage 자극에 의한 NO, ROS 생산 활성

산화질소(NO)와 활성산소(ROS)는 광범위하게 존재하는 세포 매개 신호물질이다(20). NO는 세포의 신호전달물질과 동시에 세포간 독성을 나타내는 물질로써, 포유류의 혈관 안정과 신경전달물질 및 혈소판 응집 억제제로 작용하며, 면역 및 염증을 일으킬 수 있다고 알려져 있다(21). ROS는 호흡과정 중 생성되는 물질로 각종 미생물을 사멸시키거나, 대식세포와 접촉 시, NF- κ B를 경유하여 면역과 염증성 사이토카인을 생산하는데 일조한다고 알려져 있다(22). 인스턴트 커피 유래 다당류인 ICP-0를 10, 100, 200, 500, 1000 μ g/mL의 다양한 농도를 처리하여 대식세포의 NO와 ROS를 측정할 결과(Fig. 3.), NO의 경우 NC 대비 100 μ g/mL 농도 이상부터 농도 의존적으로 NO 생산이 높게 증가됨을 확인할 수 있었다. ROS의 경우 NC 대비 모든 농도에서 ROS 생성능이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었으며, 농도 의존적으로

증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 ICP-0는 대식세포로부터 케모카인(chemokine)의 일종인 NO 및 ROS의 생산을 유도하여 면역기능을 활성화 시키는데 영향을 줄 것으로 추정되었다.

인스턴트 커피 유래 조다당류의 splenic lymphocyte proliferation

비장(splenic lymphocyte)은 척추동물에서 발견되는 가장 큰 2차 림프기관으로 혈액에서 유래되는 항원에 대한 면역반응이 개시되며, B-림프구(B-lymphocyte)와 T-림프구(T-lymphocyte)의 성숙과 분화가 이루어지며 이를 통하여 신체의 면역반응에 관여한다고 알려져 있다(23,24). 또한, Nosálová 등(25)은 인스턴트 커피 유래 아라비노갈락탄-단백질(arabinogalactan-protein)이 비장에 대한 사이토카인 생성을 증가시킨다고 이미 보고한 바 있다. 따라서 BALB/c mouse의 비장으로부터 획득한 림프세포에 인스턴트 커피로부터 분리한 조다당류인 ICP-0를 가하여 그 증식 정도를 측정할 결과(Table 2), NC 대조군의 림프구 증식대비, 농도 의존적으로 증가되어지는 것을 확인하였으며, 특히 ICP-0 100 μ g/mL처리군의 경우, NC대비 115%의 매우 우수한 림프구 증식능($p < 0.001$)을 확인하였다. 이러한 결과는 인스턴트 커피로부터 분리한 조다당류 ICP-0가 성숙된 면역세포를 직접 증진시키는 마이토겐(mitogen) 활성이 어느 정도 있음을 보여주는 결과를 얻었으며, 또한, ICP-0의 투여가 외부로부터 항원에 노출되어지면 면역세포를 증식시킬 수 있는 작동세포의 수를 증가시킴으로써, 체내 면역계를 활성화시킬 수 있을 것이라 사료되었다.

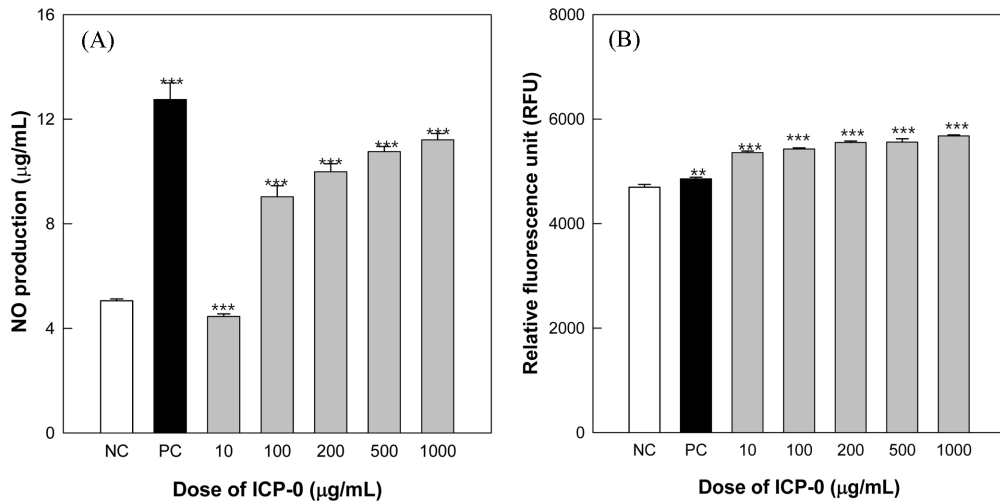


Fig. 3. Effect of ICP-0 on production of nitric oxide (NO)(A) and reactive oxygen species (ROS)(B) by murine peritoneal macrophage cells. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/mL) were treated with various concentrations of ICP-0 in 96-well plates for 24 h. A $5 \mu\text{g/mL}$ of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O127:B8 was used as positive control (PC) and media was used as the negative control (NC). Significant difference from negative control (NC) at $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ by Student's *t*-test.

Table 2. Effect of ICP-0 from commercial instant coffee on proliferation of murine lymphocyte *in vitro*

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Lymphocyte proliferation (%)
NC ¹⁾		100.0 \pm 1.6
PC ²⁾	5	141.2 \pm 2.8 ***
	10	103.2 \pm 2.2 *
ICP-0	50	108.5 \pm 2.3 **
	100	115.1 \pm 1.4 ***

¹⁾NC: media was used as the negative control

²⁾PC: $1 \mu\text{g/mL}$ of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O127:B8 was used as positive control.

Significant difference from negative control (NC) at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ by Student's *t*-test.

Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화

장관에는 위장관점막 연관 림프조직이라는 gut-associated lymphoreticular tissue (GALT) 라는 조직이 장관에 넓게 분포되어 있는데(26), 이 중 Peyer's patch는 소장과 회장 전반에 걸쳐 분포되어 있는 장관 관련 림프상 조직이다(27). 또한, B-림프구, T-림프구, 대식세포와 수지상세포 등으로 이루어져 있으며(28), 항원의 흡수작용(uptake)에 중요한 M (micro enfold) cell로 이루어져 있다(29). 이는 외부와 노출되어있는 장관의 면역기관으로서, 최초로 식품이 생체 내에서 흡수되는 장에서 IgA 생성 등의 면역반응을 일으키게 된다(30). 이 때, 장내 면역기관이 활성화 되면, Peyer's patch 내의 T-림프구에서 분비된 hematopoietic cytokine 중 하나인 GM-CSF를 생성하게 되는데(30,31), 이 사이토카인을 골수세포와 반응하게 되면 여러가지 면역세포로의 분화 및 증식을

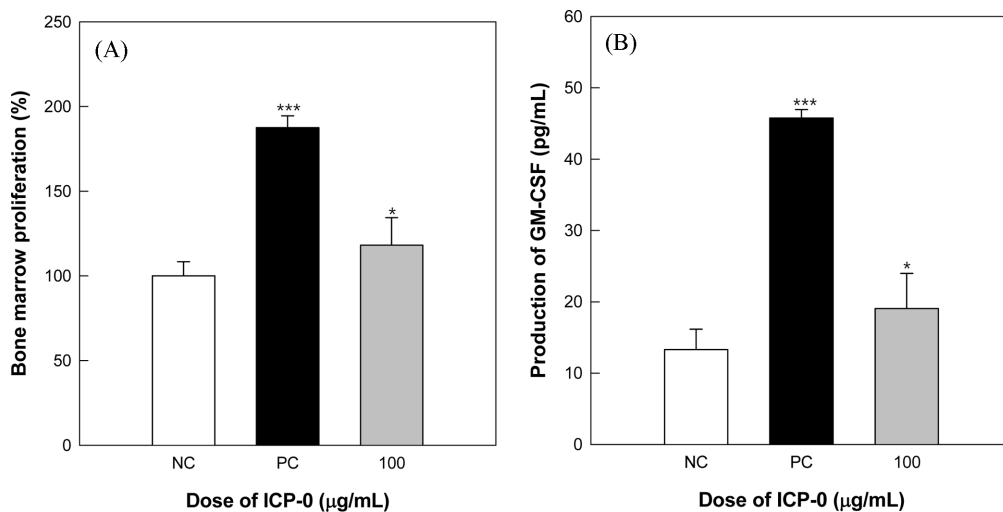


Fig 4. Effect of crude polysaccharide isolated from commercial instant coffee on intestinal immune system modulating activity (A) and GM-CSF production (B) by Peyer's patch cells. $5 \mu\text{g/mL}$ of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O127:B8 was used as positive control (PC) and media was used as the negative control (NC). Significant difference from negative control (NC) at $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ by Student's *t*-test.

유도할 수 있다고 알려져 있으며(25), 이를 통하여 장관면역계의 활성이 곧 전신면역계의 활성을 일으킬 수 있다는 가능성에 대한 연구가 많이 진행 되어지고 있다. 이를 확인하기 위해 C3H/HeJ mouse의 소장에서 획득한 Peyer's patch를 마쇄하여 조직 내 세포를 획득한 뒤, 인스턴트 커피 유래 조다당류인 ICP-0을 100 µg/mL 처리하여, GM-CSF 생성량과 대퇴부에서 채취한 bone marrow cell의 proliferation을 확인하였다(Fig. 4). GM-CSF 생성량의 경우 NC 대비 유의적으로 증가하였으며, 이를 통하여 ICP-0는 Peyer's patch에 존재하는 면역세포인 T-림프구가 GM-CSF생산을 촉진하는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 대퇴부에서 채취한 골수세포에 Peyer's patch에서 얻은 상동액을 분주하여 증식능을 확인한 결과, GM-CSF 생산능 결과와 동일하게 유의적인 증식능을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 시판 인스턴트 커피로부터 분리한 조다당류는 체내 면역세포인 대식세포, 림프구와 Peyer's patch cell을 자극하여 인체의 생체방어에 필수적인 면역 기능을 높이는 잠재적 기능성 물질의 가능성이 확인되었다.

요 약

국내 시판중인 인스턴트 커피에서 다당류를 추출하여 새로운 면역 활성 물질을 확인하고자 하였다. 시판중인 인스턴트 커피를 구입하여 냉수추출 후, 에탄올 침전과 투석을 통하여 약 24%의 높은 수율로 다당류(ICP-0)를 얻을 수 있었다. ICP-0은 중성당 89.9%, 산성당 10.1%로 이루어진 다당체로써, 구성 성분으로는 갈락토스 55.5%, 만노스 25.7%와 소량의 아라비노스, 람노스 등으로 이루어진 것을 확인하였으며, 갈락토만난(galactomannan)이나 펙틴 다당류(pectic polysaccharide)가 혼합된 구조일 것이라고 추정되었다. 인스턴트 커피 유래 ICP-0에 대하여 대식세포 자극에 대한 세포증식능을 확인한 결과, NC 대비 유의적으로 높은 증식활성을 보였으며, IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 경우, 10 µg/mL에서도 NC 대비 우수한 사이토카인 분비 유도능을 보임이 확인되었다. 또한 NO, ROS를 분석한 결과에서도 NO의 경우 10 µg/mL 이상에서 NC 대비 양호한 활성을 보여 주었다. ICP-0에 대하여 2차 면역기관 중 하나인 비장세포상의 증식능을 확인한 결과, NC 대비 115% 정도 증식하는 것이 확인되어 면역세포를 직접 증진시키는 미토겐 활성이 있음을 나타내었다. 인스턴트 커피 유래 ICP-0가 장관 내 분포되어 있는 Peyer's patch를 경유하여 장관면역에 공헌할 수 있는지 여부를 확인한 결과, NC 대비 유의적으로 골수세포의 증식능을 확인하였으며 GM-CSF와 같은 관련 사이토카인의 분비 유도가 확인되었다. 이상의 결과는 시판 인스턴트 커피로부터 분리한 다당류가 대식세포의 기능과 장관면역계를 증진시킬 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2014학년도 경기대학교 학술연구비(일반연구과제) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. International Coffee Organization. World coffee consumption increases but prices still low. Available from: <http://ico.org>. Accessed Mar. 4, 2016.
2. Korea Customs and Trade Development Institute. Analysis of domestic market for the coffee. Available from: <http://www.trass.or.kr/service/stsrsc/StsRschServlet?cmd=RschDtl&rschid=3&wid=186>. Accessed Mar. 11, 2015.
3. Kim MJ, Park JE, Lee JH, Choi NR, Hong MH, Pyo YH. Antioxidant capacity and bioactive composition of a single serving size of regular coffee varieties commercially available in Korea. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 299-304 (2013)
4. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: A review of recent human research. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46: 101-123 (2006)
5. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. Biochemistry (Moscow) 69: 70-74 (2004)
6. Jia H, Aw W, Egashira K, Takahashi S, Aoyama S, Saito K, Kato H. Coffee intake mitigated inflammation and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle of high-fat diet-induced obese mice. Genes Nutr. 9: 389-398 (2014)
7. Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 20: 117-126 (2010)
8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356 (1956)
9. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54: 484-489 (1973)
10. 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)
11. 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)
12. Johns 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)
13. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effects of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. Int. J. Immunopharmacol. 12: 675-684 (1990)
14. Nunes FM, Coimbra MA. Chemical characterization of galactomannans and arabinogalactans from two arabica coffee infusions as affected by the degree of roast. J. Agr. Food Chem. 50: 1429-1434 (2002)
15. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. Res. Immunol. 149: 685-688 (1998)
16. 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)
17. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: A model of the cytokine system. J. Mol. Med. 74: 1-12 (1996)
18. Gately MK, Carvajal DM, Connaughton SE, Gillissen S, Warriar RR, Kolinsky KD, Wilkinson VL, Dwyer CM, Higgins GF, Podlaski FJ, Faherty DA, Familletti PC, Stern AS, Presky DH. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer *in vitro* and *in vivo*. Ann. NY. Acad. Sci. 795: 1-12 (1996)
19. Lasek W, Germasz A, Kuc K, Wańkiewicz A, Feleszko W, Golab J, Jakobisiak M. Potentiation of the antitumor effect of actinomycin D by tumor necrosis factor α in mice: Correlation between *in vitro* and *in vivo* results. Int. J. Cancer. 66: 374-379 (1996)
20. Rodríguez-Serrano M, Barany I, Prem D, Coronado MJ, Resueno MC, Testillano PS. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. J. Exp. Bot. 63: 2007-2024 (2011)
21. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int. Immunopharmacol. 1: 1397-1406 (2001)
22. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 166: S4-S8 (2002)
23. Ryu DS, Oh SM, Kim KH, Kim SH, Choi HJ, Lee DS. Immunomodulating activity of *Laminaria japonica* polysaccharides. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 350-354 (2010)
24. Lee SD, Kim DW, Lee IH, Lee JH, Hyun SK, Kang KH, Hwang

- HJ, Kim CM, Kim BW, Chung KT. *Ulmus macrocarpa* hance water extract improved splenocytes survival and NK cell cytotoxicity. *J. Life Sci.* 26: 109-116 (2016)
25. Nosálová, G, Prisenžďáková L, Paulovičová E, Capek P, Matulová M, Navarini L, Liverani FS. Antitussive and immunomodulating activities of instant coffee arabinogalactan-protein. *Int. J. Biol. Macromol.* 49: 493-497 (2011)
26. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 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 (1998)
27. Mestecky J, Elson CO. Peyer's Patches as the inductive site for IgA responses. *J. Immunol.* 180: 1293-1294 (2008)
28. David CW, Norman J, Hammon HM, Davis WC, Blum JW. Cell proliferation, apoptosis, and B- and T-lymphocytes in peyer's patches of the ileum, in thymus and in lymph nodes of preterm calves, and in full-term calves at birth and on day 5 of life. *J. Dairy Sci.* 86: 3321-3329 (2003)
29. Onishi S, Yokoyama T, Chin K, Yuji M, Inamoto T, Qi WM, Kitagawa H. Ultrastructural study on the differentiation and the fate of M cells in follicle-associated epithelium of rat peyer's patch. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 501-508 (2007)
30. Yoon JA, Yu KW, Shin SH, Cho HY. Activation of intestinal immune system by an orally administered methanol extract from pine needles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 356-362 (2010)
31. Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann. Oncol.* 18: 226-232 (2007)