

보리발효추출물로부터 분리한 다당의 대식세포 활성화 및 신호 전달

김한울¹ · 지희숙² · 신광순^{1,*}

¹경기대학교 식품생물공학과, ²(주)일화 식품바이오연구센터

Polysaccharide isolated from fermented barley extract activates macrophages via the MAPK and NF- κ B pathways

Han Wool Kim¹, Hee Sook Jee², and Kwang-Soon Shin^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

²Food and Biotechnology Research Center, ILHWA Co., Ltd.

Abstract Barley has nutritional benefits due to its high dietary fiber content; therefore, the intake of whole barley grains is recommended. However, barley is often consumed in the fermented form because of the improved texture and digestibility. The present study was designed to elucidate the intracellular signaling pathway for macrophage activation by the polysaccharide BF-CP from fermented barley. BF-CP is a neutral polysaccharide, composed of neutral sugars, including glucose (70.7%), xylose (11.4%), and arabinose (9.0%). BF-CP exhibited macrophage-stimulatory activity by inducing the production of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. Further, BF-CP treatment strongly increased the IL-6 and TNF- α gene expression in a concentration-dependent manner. Signal transduction experiments using immunoblotting showed that BF-CP phosphorylated mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as c-Jun N-terminal kinase, extracellular signal-regulated kinase, and p38, and nuclear factor (NF)- κ B, in RAW 264.7 cells in a concentration-dependent manner. These results suggest that BF-CP activates the macrophages via MAPK and NF- κ B pathways, and also induces an increase in the production of cytokines.

Keywords: fermented barley, macrophage, polysaccharide, immunostimulatory activity, signaling pathway

서 론

현대 사회에서 만연하고 있는 환경오염과 식생활의 급격한 서구화로 인하여 뇌졸중, 뇌 경색, 고혈압과 같은 심혈관계 질환, 암, 당뇨병과 같은 만성 대사성 질환 및 아토피, 루푸스와 같은 자가면역질환이 증가 추세에 있다(Lee 등, 2011). 이들은 대부분 현대의학으로 치유가 어렵거나 장기간 치료를 필요로 하는 경우가 많으며, 최근에는 합성의약품의 심각한 부작용까지 알려지면서 기존의 의약품을 대체할 새로운 수단이 강력히 요구되고 있다(Yamada, 1992). 이에 대한 효율적 대체 방안의 하나로, 인체가 갖는 고유의 방어기구인 면역계의 활성화를 유도하는 면역증진제(immuno-stimulator)의 이용이 제안되고 있다(Yamada, 1992). 과거 민간이나 한방에서 사용되어 왔던 다양한 식물류에 이러한 인체고유의 방어 메커니즘을 활성화하는 물질이 존재할 것으로 기대되어 많은 연구자의 관심과 연구가 집중되고 있는데 특히 식물유래 다당에서 높은 면역증진 활성이 보고되고 있다(Paulsen, 2001; Wasser, 2002). 식물 다당의 면역증진활성, 항균활성, 항암활성 및 기타 약리활성은 면역계 중 대식세포(macrophage)와 보

체계(complement system)의 활성화(Chihara, 1992; Wang 등, 1997)를 경유하여 인체를 방어 한다고 알려져 있다(Beutler, 2004).

대식세포는 선천면역 반응에서 가장 중요한 역할을 수행하는 면역세포로, 이들이 활성화되면 탐식작용과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 산화질소(II) (nitric oxide, NO)의 생산 등을 증가시켜 외부에서 침입한 병원체 및 이물을 제거한다(Forman과 Torres, 2002; MacMicking 등, 1997). 탐식작용에 의해 세포 내로 들어온 병원체는 대부분 분해되지만, 분해가 어려운 펩타이드 단편은 세포표면에 존재하는 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)와 결합하여 항원을 제시하고, 이들을 T-cell이 인지하여 세포의 증식과 분화를 유도하게 된다(Aderem과 Underhill, 1999; Valitutti 등, 1995). 즉 대식세포는 항원제시세포로 작용, 항원 특이적인 후천 면역계를 유도하게 된다. 한편 활성화된 대식세포는 IL-1, IL-6 및 TNF- α 와 같은 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하여 후천면역계를 활성화시킨다(Belardelli, 1995; Iwasaki와 Medzhitov, 2010). 대식세포의 활성화는 세포 표면에 존재하는 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR) (Kawai와 Akira, 2010)로 알려진 단백질 수용체에 대한 활성물질의 결합으로 시작되며 일련의 연속된 세포 내 신호전달을 유도하고 결국 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로와 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 경로를 활성화시킨다(Kawai와 Akira, 2010; Pennini 등, 2012). 이들의 활성화 산물은 최종적으로 핵 내로 이행되어 면역활성화와 관련된 유전자의 전사를 활성화시키고, 결국 사이토카인의 생산 등으로 이어지게 된다(Cargnello와 Roux, 2011; Tanoue와 Nishida, 2003). 특히 식물 유

*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16229, Korea
Tel: +82-31-249-9655

Fax: +82-31-249-9650

E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

Received September 20, 2018; revised October 8, 2018;

accepted October 9, 2018

래의 활성물질들이 대식세포의 활성화를 일으키기 위해서는 세포표면에 발현되어 있는 toll-like receptor 4 (TLR4), dectin-1, CD14, scavenger receptor (SR), mannose receptor (MR), complement receptor 3 (CR3) (Rice 등, 2002; Shao 등, 2004; Taylor 등, 2002)와 같은 PRR 수용체(Gordon, 2002)에 결합되어야 하는데 많은 세균, 곰팡이 및 식물 유래 다당들이 이들을 경유하여 면역증진 활성을 보이며 특별한 부작용도 나타내지 않는 것으로 보고되어 있다. 그 예로써 버섯 유래의 면역활성 다당 베타글루칸 (β -glucan) (Smiderle 등, 2013; Tada 등, 2009)과 식물 유래 펙틴 다당(Lee 등, 2014; Park 등, 2016)들은 강력한 면역증진 활성을 나타내고 이들을 통하여 항암활성까지 보이는 것으로 알려져 있다.

우리나라는 예로부터 발효식품을 즐겨 섭취해 왔는데, 이는 발효과정 중 관여 미생물들에 의해 원재료 중의 성분들이 분해되면서 소화가 용이한 저분자로 전환될 뿐 아니라, 이로부터 새로운 대사산물이 생산되는 등 식품의 맛, 소화율 및 기능성이 개선된 식품의 생산이 가능하기 때문에 판단된다(Park, 2012). 특히 최근에는 한국의 전통발효식품, 감식초(Hwang과 Shin, 2008), 간장(Park 등, 2012), 막걸리(Cho 등, 2014) 등에서 분리한 다당 획득에서 강력한 면역활성이 존재한다고 보고되고 있어 발효를 통한 새로운 기능성물질의 분리와 개발에 관심이 집중되고 있다.

보리는 백미와 함께 우리나라의 대표적인 주식이었으나 국민의 식량 소비 구조가 변화되면서 소비량이 크게 줄고 있는 추세에 있다. 그러나 최근 혈중 콜레스테롤 감소, 심장 질환 예방과 같은 성인병에 우수한 효과가 있다고 알려진 베타글루칸이 다량 함유되어 있다고 보고되면서, 보리의 건강 기능성은 재평가되고 있다(Izidorczyk와 Dexter, 2008; Kim 등, 2002; Oh와 Lee, 1996). 또한, 베타글루칸은 대식세포, 자연살해세포(natural killer cell), T 세포와 같은 면역세포를 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제 할 수 있다고 보고되어 있다(Di Renzo 등, 1991;

Roubroeks 등, 2000). 이처럼 보리의 섭취가 건강 증진 측면에서 우수한 평가를 받고 있음에도 불구하고 관능성 및 식감이 떨어지는 단점을 가지고 있으므로, 이들의 소비량을 증가시키기 위해서는 발효와 같은 가공 수단을 도입하고 기능성 규명과 같은 새로운 가치를 부여하는 것이 요청된다고 할 수 있다(Kuno 등, 2004; Martensson 등, 2002; Oh와 Lee, 1996).

따라서 본 연구에서는 효소 및 미생물을 이용해 3단 발효시킨 보리발효추출물을 이용하여 다당을 분리, 정제하고, 선천면역계에서 중요한 역할을 하고 있는 대식세포의 활성화에 대해 검토함으로써 보리의 소비를 증진시킬 수 있는 새로운 방법을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 보리발효추출물은 (주)일화 식품바이오연구센터(Seoul, Korea)에서 기업의 노하우에 의해 제조된 것을 공여 받아 사용하였다. 즉 보리 알곡은 거칠게 마쇄하여 90°C에서 2시간 증자하여 호화시킨 후, 1차 효소발효(상업용 amylase처리), 2차 효모 발효(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 3차 유산균 발효(*Weissella cibaria*) 등 총 3단 발효를 거쳐 면역증강 성분이 강화된 보리발효물을 조제하였다. 본 보리발효물은 6,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 발효 상층액을 분리하고 가압 살균하여 보리발효추출물을 조제하였다.

보리발효추출물로부터 다당의 분리

5°Brix 보리발효추출물 1 kg을 재차 원심분리(6,500 rpm, 20 min, 4°C)하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 회수하여 여과한 후 80% 에탄올을 가하여 24시간 동안 다당을 침전시켰다.

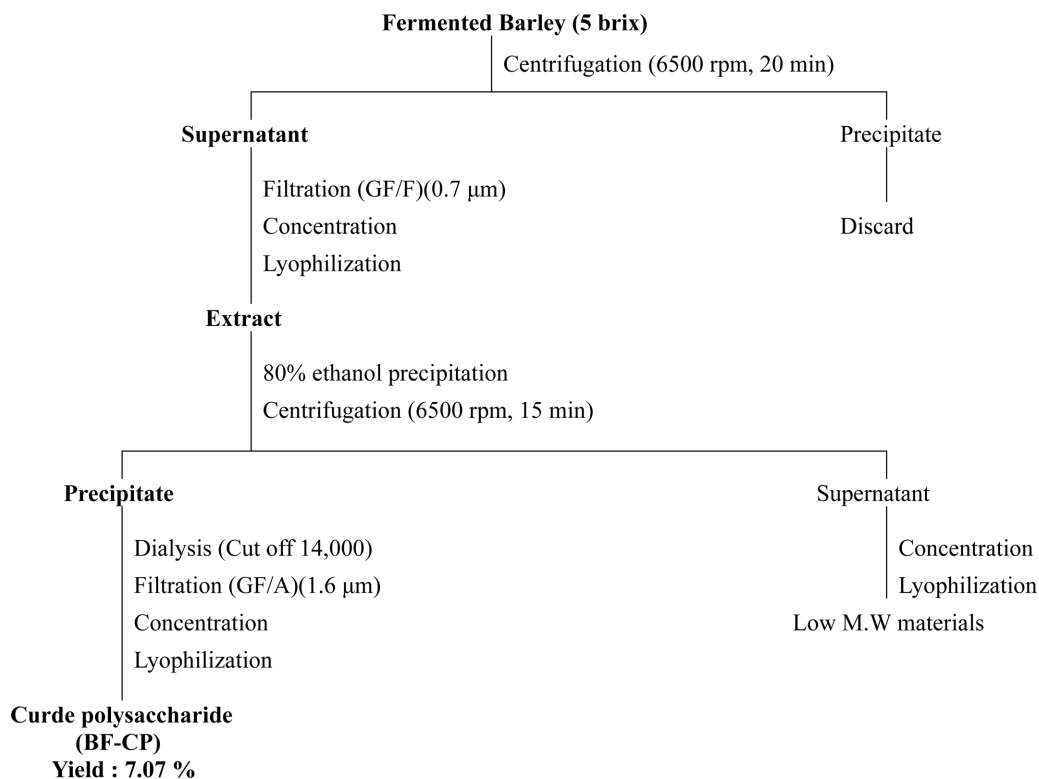


Fig. 1. Scheme tree for isolation of crude polysaccharides from fermented barley.

이후 원심분리(6,500 rpm, 15 min, 4°C)하여 얻은 침전물은 소량의 증류수에 용해한 다음 dialysis tubing (MW cut off 14,000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 3일간 투석을 진행하였다. 이후 여과, 농축, 및 동결건조를 거쳐 보리발효추출물 유래 조다당(fermented barley crude polysaccharide, BF-CP, 수율 7.07%)을 얻었다(Fig. 1).

다당의 성분 분석

보리발효추출물로부터 분리한 조다당의 일반성분을 분석하기 위해 중성당 함량은 갈락토스(galactose, Gal)를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등, 1956)으로, 산성당 함량은 갈락투론산(galacturonic acid, GalA)을 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법(Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973)으로, 단백질 함량은 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준물질로 하여 Bradford법(Bradford, 1976)으로 분석하였다. 한편 식물 유래 다당에서 발견되는 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (KDO)를 측정하기 위해 KDO를 표준물질로 하여 싸이오바비트루산(thiobarbituric acid, TBA) 비색정량법(Karkhanis 등, 1978)으로 실험실 여건에 맞게 변형하여 측정하였다. 페놀화합물 함량은 갈산(gallic acid)을 표준물질로 하여 Folin-Ciocalteu법(Singleton과 Rossi, 1965)으로 분석하였다.

구성당 분석

보리발효추출물 유래 조다당 시료의 구성당을 분석하기 위해 Honda 등(1989)의 방법을 일부 변형하여 실험실 조건에 맞게 사용하였다. 먼저 내부표준물질(internal standard)로써 글루코사민(GlcN) 50 µg을 시료 500 µg에 첨가하여 수분을 완전히 제거한 뒤 2 M 트라이플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)로 121°C에서 1.5시간 동안 처리하여 단당으로 산가수분해하여 건조하였다. 0.3 M NaOH 100 µL와 0.5 M 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazoline-5-one (PMP) 120 µL를 넣어 70°C에서 1시간 반응하여 각 구성당을 PMP 유도체로 전환한 뒤 0.3 M HCl 100 µL를 가하여 중화하였다. 이를 CHCl₃/H₂O 2상 용매계로 상분리하여 수용 회분을 얻은 후 막여과(0.22 µm)를 거쳐 high-performance liquid chromatography (HPLC)의 분석시료로 사용하였다. HPLC의 분석 장비조건은 Acclaim™ 120 C18 column (4.6×250 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)이 장착된 Shimadzu Prominence HPLC system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)-UV/Vis detector (SPD-20A, Shimadzu Co.)을 이용하여 분석하였다. 분석 조건으로는 분석 온도 30°C, 유속 1 mL/min, 용출액 0.1 M phosphate buffer (pH 6.7):acetonitrile (82:18), 시료 주입량 20 µL로 설정하여 분석하였다. 각 분석된 구성당의 mol%는 내부표준물질 대비 시료의 피크 면적, 분자량 및 반응계수(response factor)로부터 환산하여 계산하였다.

Cell viability, NO, IL-6 및 TNF-α 생산능 측정

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7 (KCLB 40071)세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 정상세포에 대한 조다당 시료의 직접적인 세포증식/독성 여부를 확인하고자 대식세포 유래 세포주 RAW 264.7 cell (1.5×10⁶ cells/mL)을 회수하여 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Welgene, Daegu, Korea) 및 1% penicillin streptomycin (P/S, Welgene)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene)에 희석한 후 flat-bottom 96 well plate에 100 µL씩 분주한 후 각 농도로 조제된 조다당 시료를 각 well에 100 µL씩 가하여 37°C, 5%

CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 시료 농도에 따른 세포 증식/독성 여부를 확인하기 위해 상층액을 제거한 뒤 각 well에 50 µL의 phosphate buffered saline (PBS)을 분주한 후 EZ-cytox (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)를 50 µL씩 well에 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30-60분 반응시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화질소(NO) (Nitric oxide, NO), 인터루킨(interleukin, IL)-6 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)-α 생산능을 측정하기 위해서 flat-bottom 96 well plate에 NO의 경우 RAW 264.7 cell 수를 3×10⁶ cells/mL로 조정하여 100 µL로, cytokine의 경우 RAW 264.7 cell수를 1.5×10⁶ cells/mL로 조정하여 100 µL씩 분주하고 여러 농도로 조제한 조다당 시료를 100 µL 첨가한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포 배양 상층액을 취하여 유도된 NO의 경우 griess reagent system kit (Promega, Madison, WI, USA)를, IL-6 및 TNF-α의 경우 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mouse IL-6 ELISA, BD Biosciences, San Diego, CA, USA; Mouse TNF-α kit, Invitrogen, San Diego, CA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. NO, IL-6 및 TNF-α 생성량은 각 키트에 포함된 표준 물질을 농도 별로 희석하여 표준곡선을 구하여 계산하였다.

mRNA 발현도 측정

사이토카인 생산에 관련된 유전자의 mRNA 발현을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 1.0×10⁶ cells/6 cm dish로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 이후, 보리발효추출물 유래 조다당 시료를 10% FBS와 1% P/S-DMEM 혼합용액에 희석하여 최종 농도가 0.1-50 µg/mL가 되도록 첨가한 후 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 RNeasy mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 RNA를 추출하고 정량한 후 reverse aid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, MA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다. 즉 1 µg의 RNA에 oligo dT를 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 뒤 5×reaction buffer, RNase inhibitor, dNTP, reverse transcriptase로 조성된 용액을 가하고 42°C에서 1시간 및 72°C에서 5분간 각각 반응시켜 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. NO, IL-6 및 TNF-α의 DNA 발현량을 정확하게 측정하기 위해서 template DNA에 2×SYBR green mix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), sense primer, antisense primer 및 RNase-free water로 구성된 용액을 이용하여 quantitative real-time PCR (qPCR)을 수행하였다. 또한 qPCR의 전개를 확인하기 위해 power SYBR green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하였다. 이때 사용된 각 primer의 서열은 Table 1과 같다. 이후 상대적인 유전자 증폭량(relative mRNA

Table 1. Sequence of the primers used for q-PCR

Gene	Primer sequence
β-Actin	Forward : 5'-ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'
	Reverse : 5'-CTGGATGGCTACGTACATGG-3'
iNOS	Forward : 5'-ACATCGACCCGTCCACAGTAT-3'
	Reverse : 5'-CAGAGGGGTAGGCTTGCTC-3'
IL-6	Forward : 5'-ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG-3'
	Reverse : 5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'
TNF-α	Forward : 5'-GTACCTTGTCTACTCCCAGGTTCT-3'
	Reverse : 5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTATATG-3'

expression)은 step one plus system (Applied Biosystems)을 이용하여 확인하였다. qPCR 조건은 IL-6와 TNF- α 의 경우, 95°C에서 15초→60°C에서 1분으로 40 cycles (melting curve), iNOS의 경우 95°C에서 15초→58°C에서 20초→72°C에서 30초로 40 cycles (melting curve) 증폭시켜 시료의 comparative C_t값을 구한 후, 대조군으로 β -actin 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 방법을 통하여 계산하고 정량하였다.

웨스턴 블롯팅(Western blotting)

Western blotting 시료를 제조하기 위해 RAW 264.7 cell을 1.0×10⁶ cells/6 cm dish로 조정하여 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 이후 보리발효추출물 유래 조다당 시료를 10% FBS와 1% P/S-DMEM의 혼합용액에 희석하여 최종 농도가 0.1-10 μ g/mL가 되도록 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한 후 배지를 제거하고 TBS로 1회 세척하고 protease inhibitor cocktail (PIC), dithiothreitol (DTT), NaVO₄, β -glycerophosphate, phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF)로 조성한 RIPA lysis buffer (EMD Millipore Corp., Oak Drive, CA, USA)를 분주하여 4°C에서 방치하였다. 이후 scraper를 이용하여 cell을 회수하고 4°C에 30분간 방치하여 단백질을 용출시켰다. 원심분리(13,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit (Thermo scientific, Meridian Rd., Rockford, USA)를 이용하여 단백질 함량을 확인하고 상층액과 laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)의 비율을 3:1로 혼합한 후 100°C에서 5분간 중탕하고 상온에서 보관하였다.

단백질 시료를 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 20 μ L씩 분주하여 120 V에서 90분간 전기영동 하였다. 전기영동 후 PVDF 막(Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용, 0.45 A에서 80분간 blotting하고 5% 탈지분유(skim milk) 및 소혈청알부민(BSA)를 이용하여 90분간 상온에서 blocking 처리 하였다. 이후, 1×TBS-T (Tris 247 mM, NaCl 1,370 mM, KCl 27 mM, Tween 20 0.5%, pH 7.6)을 이용하여 10분씩 2회 세척하였다. 1차 항체는 적절 비율로 희석하여 4°C에서 12시간 처리하고, 1×TBS-T로 10분씩 3회 세척하였으며 2차 항체를 상온에서 90분간 처리하고 재차 1×TBS-T를 이용하여 10분씩 3회 세척하였다. 항체반응이 완료된 막을 ECL (enhanced chemiluminescence, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)과 반응시켜 X-ray film (Agfa, Mortsel, Belgium)에 현상하여 목적하는 단백질의 발현량을 확인 하였다.

본 실험에서 사용된 1차 항체 c-Jun, p-c-Jun, JNK, p-JNK, p-ERK, p-p65, p-p38, I κ B α antibodies는 cell signaling technology (Denvers, MA, USA)에서, p65, p38, ERK, β -actin antibodies는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 2차 항체로 사용된 m-IgG κ BP-HRP는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz)에서, Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulins/HRP는 DAKO (Dako, Glostrup, Denmark)에서 구입하여 사용하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 IBM SPSS Statistics 21 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석을 수행하였으며 측정 항목에 대한 평균과 표준편차로 나타내었다. 시료 및 처리 농도 간의 유의적 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 실시하였다.

Table 2. Chemical properties of crude polysaccharide (BF-CP) isolated from fermented barley

Chemical properties (%)	BF-CP
Neutral sugar	91.1±3.2
Uronic acid	4.9±1.1
Protein	2.0±0.3
KDO-liked materials	-
Polyphenol compound	2.0±0.9
Component sugar	
Rhamnose	-
Fucose	-
Arabinose	9.0±0.0
Xylose	11.4±0.3
Mannose	1.9±0.0
Galactose	3.0±0.0
Glucose	70.7±0.2
Glucuronic acid	-
Galacturonic acid	-

결과 및 고찰

보리발효추출물 유래 BF-CP의 일반화학적 특성

보리발효추출물로부터 분리한 조다당 BF-CP의 일반분석을 진행한 결과는 Table 2에서 제시된 바와 같이 91.1% 중성당과 4.9% 산성당으로 구성되어 있었으며, 단백질 및 폴리페놀 화합물이 각각 2.0%로 소량 함유되어 있었다. 한편 구성당으로는 글루코스(glucose) 70.7%, 자일로스(xylose) 11.4%, 아라비노스(arabinose) 9.0%, 갈락토스 3.0% 및 마노스(mannose) 1.9%의 조성을 갖는 것으로 나타났다. 구성당 조성으로 미루어 본 보리발효추출물 유래 조다당(BF-CP)에는 전분성 물질이 여전히 함유되어 있을 가능성이 예견되었으며, 그 외 원재료인 보리 유래의 베타글루칸(식물 β -glucan, β -(1→3, 1→4)-glucan)과 아라비노자일란(arabinoxylan) (Izydorczyk와 Dexter, 2008) 그리고 발효 미생물인 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 세포벽 유래 β -(1→3)-glucan (Rice 등, 2002)으로 존재할 가능성이 강력히 시사되었다.

보리발효추출물 유래 BF-CP의 세포증식능

선천면역계의 가장 중추적인 역할을 담당한다고 알려진 대식세포는 활성화될 경우 세포 내로 항원을 탐식하여 이를 소화/분해하는 비특이적 면역 기능을 수행함과 동시에 항원의 일부를 자신의 표면에 제시(presentation)하여 T 세포와 같은 후천성 면역세포가 이를 인식하고 활성화되도록 도와주는 항원제시세포로서의 역할을 수행한다고 알려져 있다(Cebra와 Shroff, 1994; James와 Zeitz, 1994). 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP의 대식세포주 RAW 264.7 cell에 대한 세포 증식/독성여부를 측정된 결과(Fig. 2A), 0.05-100 μ g/mL의 모든 농도에서 세포 독성은 거의 나타나지 않았으며, 특히 0.1-1 μ g/mL의 저농도에서는 오히려 약간의 세포 증식능을 보였다.

보리발효추출물 유래 BF-CP의 NO 및 사이토카인 생산능

인체의 대표적 면역세포인 대식세포가 활성화되면 외부로부터 침입한 세균 및 이물질을 제거하기 위해 NO, ROS와 같은 케모카인(chemokine) 및 다양한 사이토카인을 분비하게 된다(Forman

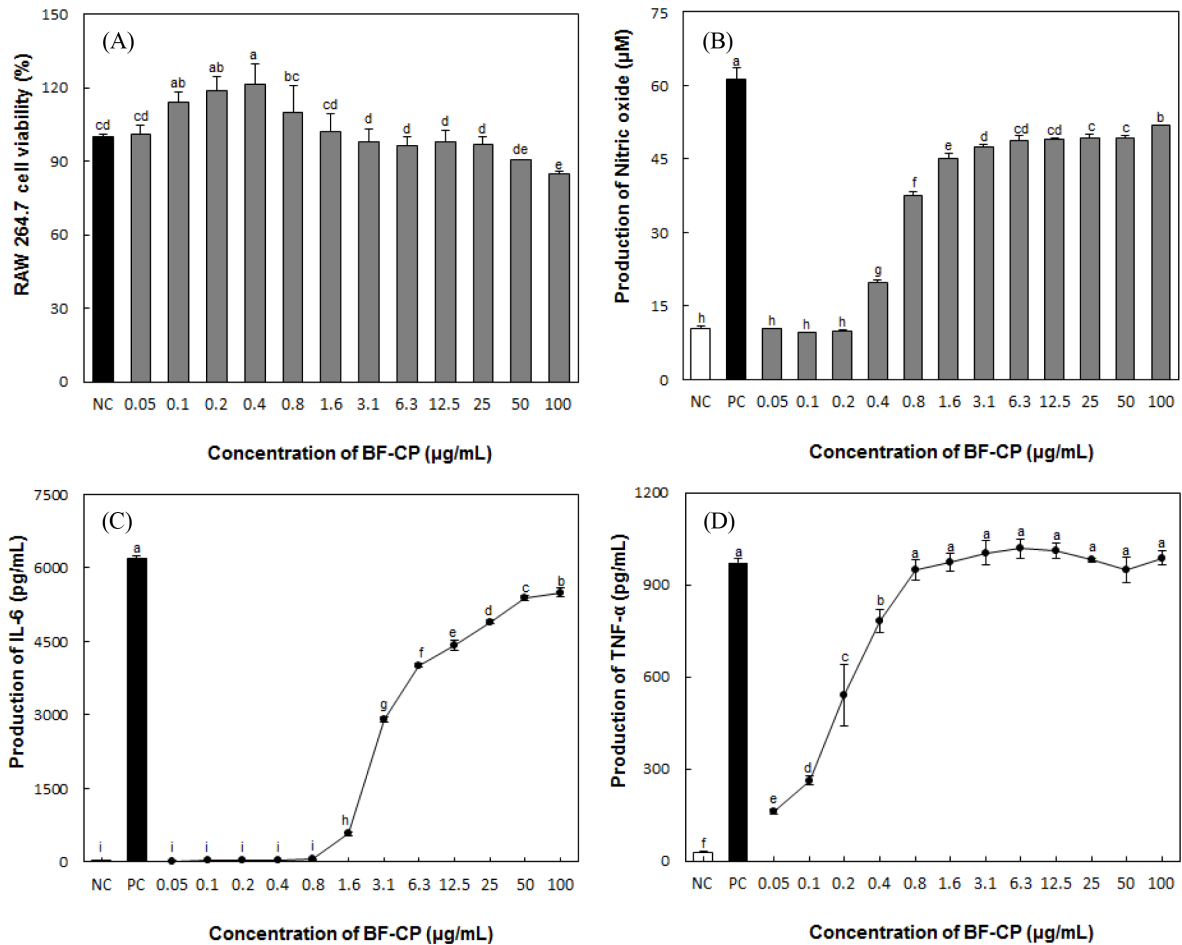


Fig. 2. Effect of BF-CP on cell viability (A), and the production of nitric oxide (NO) (B), IL-6 (C) and TNF- α (D) production in RAW 264.7 cells. A total of 1 μ g/mL LPS was used as the PC (positive control) and media as NC (negative control). Bars with lower case letter (a-i) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

과 Torres, 2002; MacMicking 등, 1997). NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 생성되는 NO는 체내 항상성 유지를 위해 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS), 염증성 인자에 의해 생산되는 inducible NOS (iNOS)로 나누어진다(Stuehr, 1999). 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부에서 유입된 병원체로부터 인체를 방어하는 데 중요한 역할을 하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암과 밀접하게 연관되어 있다고 보고되고 있다(Kröncke 등, 1998). RAW 264.7 cell에 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP를 0.05-100 μ g/mL의 농도로 24시간 처리한 후 NO, IL-6 및 TNF- α 를 측정하였으며, 음성대조군은 시료를 첨가하지 않은 DMEM 배지, 양성 대조군은 대식세포를 활성화시키는 대표적인 물질인 lipopolysaccharide (LPS) (Park과 Hong, 2017)를 사용하여 비교 측정하였다. 그 결과 NO의 경우(Fig. 2B), 0.4-100 μ g/mL 농도에서 농도의존적으로 활성이 증가하는 양상을 보여주었다.

활성화된 대식세포에 의해 분비된 다양한 사이토카인은 타 면역세포의 기능조절과 신호전달에 중요한 역할을 하는 용해성 단백질로, 면역세포 간의 복잡한 cytokine network 형성하여 면역계 전체의 반응 및 효율화에 공헌한다고 알려져 있다(Starr 등, 1997). 이 중 IL-6는 감염과 조직 손상에 따른 면역 초기반응에서 생산되는 주요한 반응 매개물질로 IL-1, TNF- α 등에 의해 IL-6의 유전자 발현이 자극되어 단핵세포, 대식세포, 간질세포 등에 의해

생산되고 급성 염증 반응 촉진 또는 억제하는 것으로 알려져 있다(Hamilton과 Adams, 1987). 또한 TNF- α 는 림프구에 의해 생산되는 염증 매개성 사이토카인으로, 생체 면역반응에서 단독적 혹은 IL-1 등과 복합적으로 작용하여 종양의 혈관을 손상시켜 결과적으로 종양 괴사를 유발하거나 미생물에 의한 감염 저항성을 향상시킨다고 보고되어 있다(Lasek 등, 1997).

BF-CP를 대식세포주에 처리 했을 때 IL-6의 경우(Fig. 2C) 농도의존적으로 생성량이 지속적으로 증가하는 양상을 보였으며 최저 자극농도는 약 1.6 μ g/mL 정도인 것으로 나타났다. 한편 TNF- α 의 경우(Fig. 2D)에도 농도의존적인 생성능을 보여주었으나, 상대적으로 저농도인 0.10 μ g/mL부터 활성화 경향을 보였으며, 특히 0.8 μ g/mL 이상의 농도에서는 양성 대조군인 LPS에 준하는 높은 활성을 나타내었다.

대부분의 면역활성 실험에서 양성대조군으로 사용되는 LPS는 세균유래의 endotoxin으로 이들은 면역세포에 대한 강력한 활성 인자이지만 숙주의 체내에서 발열원(pyrogen), 염증 및 패혈증을 유발시키므로(Beutler, 2000) 면역 활성화 실험에서 단순히 최대 자극활성을 비교하는 대조군으로만 사용된다. LPS는 식물체 다당의 시료 제조 시 혼입될 가능성이 있을 수 있으며 이들에 의해 대식세포가 활성화될 수 있기 때문에 실제 활성보다 과다하게 평가될 수 있다. 본 실험에서 BF-CP의 사이토카인 생산 자극 활성이 LPS에 준하는 높은 활성이지만 상대적으로 처리량이 훨씬

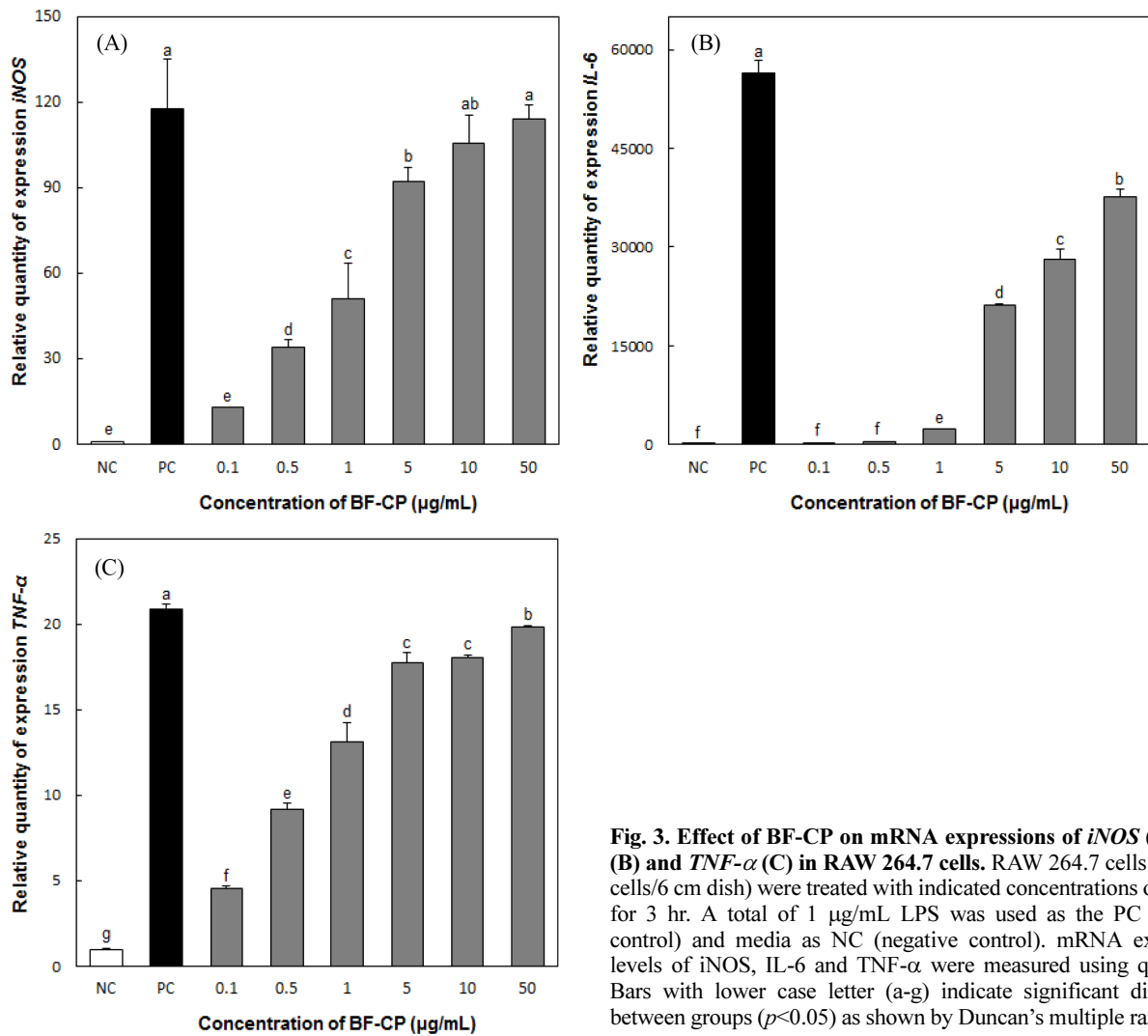


Fig. 3. Effect of BF-CP on mRNA expressions of *iNOS* (A), *IL-6* (B) and *TNF-α* (C) in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/6 cm dish) were treated with indicated concentrations of BF-CP for 3 hr. A total of 1 µg/mL LPS was used as the PC (positive control) and media as NC (negative control). mRNA expression levels of *iNOS*, *IL-6* and *TNF-α* were measured using qRT-PCR. Bars with lower case letter (a-g) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

선 높고 polymyxin B (Han 등, 2003)를 처리하여도 활성에 감소 관찰되지 않는 점(결과는 제시하지 않았음)으로 미루어 BF-CP의 실제 활성임이 분명한 것으로 추정하였다. 따라서 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP는 대식세포를 활성화하여 면역기능을 증강시키는 데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단하였다.

면역 활성화 관련 유전자의 mRNA 발현에 대한 BF-CP의 효과

보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP의 RAW 264.7 세포에 대한 면역조절 관련 유전자 *IL-6*, *TNF-α* 및 *iNOS*의 발현 유무를 확인하기 위해 시료를 RAW 264.7 세포와 함께 배양한 후 total RNA를 추출하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하고 primer를 이용하여 quantitative real-time PCR (qPCR)로 mRNA 발현량을 증폭하고 분석하였다. 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP는 50 µg/mL 처리 시 *iNOS*와 *TNF-α* mRNA의 발현량이 양성대조군 LPS에 준하는 발현량을 나타내었으며, 활성 또한 농도의존적 경향을 보였다(Fig. 3A와 C). 반면 *IL-6*의 mRNA의 경우, 농도의존적으로 발현량이 증가되었으나, 1 µg/mL 이하의 농도에서는 뚜렷한 발현량이 나타나지 않았다(Fig. 3B). 이러한 mRNA의 발현량 변화를 통해 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP는 케모카인 및 사이토카인 생산에 관련된 유전자를 발현시켜 최종적으로 NO, *IL-6* 및 *TNF-α* 생산을 유도할 것으로 예상되었다. 이는 염증부위에

면역세포의 귀소 및 NO 생산에 관여하는 사이토카인인 *IL-6*와 종양 괴사 유발 및 감염 저항성 향상과 관련이 있는 *TNF-α*를 유의적으로 생산함으로써 생체방어에 작용하는 선천면역 메커니즘의 활성 및 조절에 관여할 수 있다는 것을 재차 확인하였다.

보리발효추출물 유래 BF-CP의 대식세포 내 신호전달

대식세포는 TLR-2, TLR-4, MR, CR3, SR 및 Dectin-1 등 PRR 수용체가 발현되어 있어 LPS 혹은 β-glucan과 같은 미생물 혹은 천연물 유래 다당 분자가 결합하면 일련의 연속된 세포 내 신호전달을 유도하고, 최종적으로 핵 내에서 다양한 사이토카인 유전자의 전사를 촉진시켜 최종적으로 사이토카인의 생산을 증진시킨다(Rice 등, 2002; Shao 등, 2004; Taylor 등 2002). 특히 다당 분자에 의해 활성화되는 대표적인 신호전달 경로로 MAPK 및 NF-κB 경로가 알려져 있는데, MAPK 경로는 신호전달 단백질들의 단계적 활성화 경로로, 많은 세포 유형에서 발견되며 p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 3중으로 구성되어 있다. 이들은 최종적으로 핵 내로 들어가 다양한 전사인자를 포함하는 AP-1 family를 활성화시켜 사이토카인 및 NO 등의 생산을 유도한다고 알려져 있다(Yang 등, 2003; Lewis 등, 1998). 한편 NF-κB는 강력한 전사인자로서, 통상 세포질 내에 존재하는 비인산화된 형태의 inhibitor

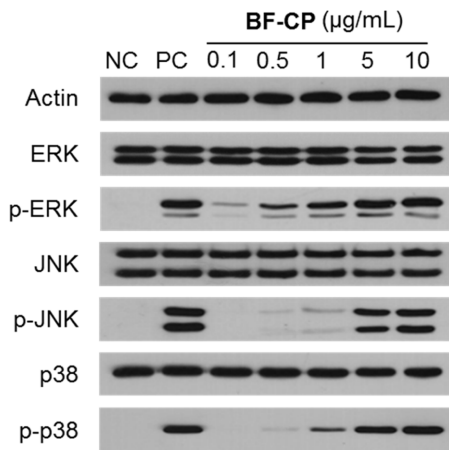


Fig. 4. Effect of BF-CP on the phosphorylation of mitogen activated protein kinase (MAPK) in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/6 cm dish) were treated with the indicated concentrations of BF-CP for 30 min. Whole-cell lysates were then immunoblotted with the specific antibodies indicated on the left side of each panel. Phosphorylation of p38, JNK and ERK was determined by using their phospho-specific antibodies. β -Actin (Actin) served as an internal loading control. A total of $1 \mu\text{g/mL}$ LPS was used as the PC (positive control) and media as NC (negative control).

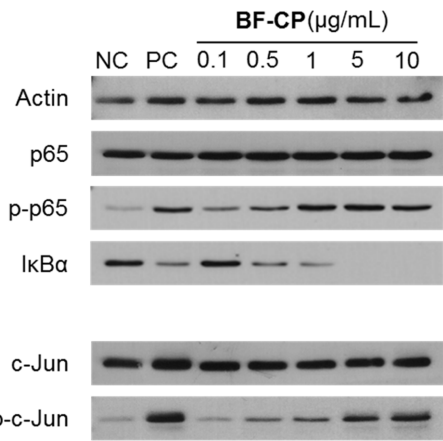


Fig. 5. Effect of BF-CP on the phosphorylation of nuclear factor (NF)- κ B and transcription factor in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/6 cm dish) were treated with the indicated concentrations of BF-CP for 30 min. Whole-cell lysates were then immunoblotted with the specific antibodies indicated on the left side of each panel. Phosphorylation of p65 and c-Jun was determined by using their phospho-specific antibodies. β -Actin (Actin) served as an internal loading control. A total of $1 \mu\text{g/mL}$ LPS was used as the PC (positive control) and media as NC (negative control).

of $\kappa\text{B}\alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)에 의해 억제된 상태로 존재하고 있는데 리간드의 자극에 의해 $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase (IKK)가 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 를 인산화시켜 분해되면, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 는 핵 내로 이동하여 유전자들의 전사를 개시하고 다양한 사이토카인의 생산을 유도하여 T 림프구와 B 림프구의 활성화에서 중요한 역할을 담당하기 때문에 적응면역계에서도 매우 중요한 인자로서 알려져 있다(Liacini 등, 2002).

보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP에 의해 유도되는 NO, IL-6 및 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생산 메커니즘을 확인하기 위하여, RAW 264.7 세포에 BF-CP를 0.1-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 신호전달 관련 단백질의 변화를 관찰한 결과, MAPK (p38, ERK, JNK) 단백질의 전체량은 변화가 없음에도 불구하고, MAPK (p38, ERK, JNK)의 인산화는 BF-CP 농도 의존적으로 유도되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). Shin 등(2016)은 감 잎에서 추출한 펙틴(pectin) 다당 (PLE-I)이 JNK, p38 및 ERK와 같은 MAPK 단백질의 인산화를 통해 대식세포의 활성화를 진행시킨다고 보고한 바 있으며, 제주 감귤의 과피에서 분리한 다당 CPE-II에서도 유사한 활성화 경향을 보임을 확인(Shin 등, 2018)한 바 있다는데, 이는 본 실험의 결과와 잘 일치하였다.

한편 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 신호전달 경로에서는 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 인산화가 일어나고 분해되면 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ subunit p65의 활성화가 유도된다고 알려져 있는데 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP를 농도 별로 RAW 264.7 세포에 처리한 결과, 농도 의존적으로 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해를 유도하는 것을 확인하였으며, 동시에 p65의 인산화도 유도되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). Ando 등(2002)은 홍화(*Carthamus tinctorius*)로부터 분리한 다당 SF-1 및 SF-2가 TLR4를 경유하여 면역세포를 활성화하며, 주로 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해와 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 의 활성화를 유도, $\text{TNF-}\alpha$ 및 NO 생산을 자극한다고 보고하였는데 이 또한 본 실험의 결과와 잘 일치하고 있다. 이상의 결과로부터 대식세포에 존재하는 대표적인 신호전달 단백질인 MAPK 및 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 에 대해 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP는 농도 의존적으로 인산화를 유도시킨다는 것을 확실하게 할 수 있었다.

또한 핵 내의 전사인자에 대한 인산화를 확인하기 위해 AP-1 family의 대표적인 전사인자 중 하나인 c-Jun의 인산화를 관찰한 결과, 이 또한 농도 의존적으로 유도됨이 확인되었다(Fig. 5). Lee 등(2016)은 발효현미로부터 정제한 다당체 FBR-4a가 보리발효물 유래 다당의 결과와 아주 유사하게 MAPK, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 와 AP-1 전사인자의 주 구성인자인 c-Jun을 인산화를 통해 대식세포를 활성화 시킴을 보고하기도 하였다. 따라서 보리발효추출물 유래 조다당 BF-CP는 선천면역계 대표적 면역세포인 대식세포를 활성화 시키기 위해 MAPK 및 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signal pathway를 거쳐 핵 내로 들어가 AP-1 family의 대표적인 전사 인자 c-Jun과 p65를 활성화시키며 이들이 NO, IL-6 및 $\text{TNF-}\alpha$ 의 유전자 발현을 촉진시키고 해당 cytokine의 생산을 유도하여 면역활성에 공헌함을 최종 확인할 수 있었다.

요 약

보리는 높은 비율로 식이섬유를 함유하고 있어, 일반적으로 영양학적으로는 전곡 형태로의 섭취가 추천되고 있지만, 조직감과 소화율을 고려하여 발효물 형태의 소비가 바람직한 것으로 판단되고 있다. 본 연구는 효소당화 후, 효모 및 유산균 발효를 거쳐 조제한 보리발효물로부터 조다당 BF-CP를 분리하고, 대식세포에 대한 면역증강 효과 및 세포 내 신호전달을 규명하여 기능성 소재로의 이용방안을 모색하기 위해 계획되었다. BF-CP획분의 일반화학적 특성을 분석한 결과 70.7% 글루코스 11.4% 자일로스와 9.0% 아라비노스를 포함하여 91.1%의 중성당으로 이루어진 중성다당이었다. BF-CP는 RAW 264.7 대식세포주에서 농도 의존적으로 IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ 와 같은 사이토카인 및 NO의 생산능을 유도하는 등 높은 대식세포 활성능을 나타냈다. 또한 qPCR 분석을 통해, BF-CP 획분을 대식세포주에 처리하였을 때, 처리 농도에 비례하여 IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ 및 iNOS의 mRNA 유전자 발현을 증가시킬 수 있었다. 한편 Western blot을 활용한 신호전달 단백질 추적실험에서 BF-CP 획분을 대식세포주에 처리하였을 때,

JNK, ERK 및 p38과 같은 MAPK 경로와 NF- κ B 경로의 관련 단백질 발현을 인산화시킴이 확인되었으며 그 활성은 BF-CP 농도에 의존적이었다. 이상의 결과로부터 보리발효물 유래 다당 BF-CP는 MAPK와 NF- κ B 경로를 통해 대식세포를 활성화시키며, 이를 통하여 NO, IL-6 및 TNF- α 와 같은 면역활성화 관련 물질의 생산을 높은 비율로 유도시킨다는 것을 최종 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며, 이에 감사드립니다(116002-03-2). 또한 본 연구는 2018학년도 경기대학교 대학원 연구원장학생 장학금 지원에 의하여 수행되었음.

References

- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623 (1999)
- Ando I, Tsukumo Y, Wakabayashi T, Akashi S, Miyake K, Kataoka T, Nagai K. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1155-1162 (2002)
- Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis* 103: 161-179 (1995)
- Beutler B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 23-28 (2000)
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40: 845-859 (2004)
- 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)
- Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75: 50-83 (2011)
- Cebra JJ, Shroff KE. Peyer's patches as inductive sites for IgA commitment. pp. 151-158. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic press, New York, NY, USA. (1994)
- Chihara G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. *Dev. Biol. Stand.* 77: 191-197 (1992)
- Cho CW, Han CJ, Rhee YK, Lee YC, Shin KS, Hong HD. Immunostimulatory effects of polysaccharides isolated from Makgeolli (traditional Korean rice wine). *Molecules* 19: 5266-5277 (2014)
- Di Renzo L, Yefeno E, Klein E. The function of human NK cells is enhanced by β -glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur. J. Immunol.* 21: 1755-1758 (1991)
- Dubois, M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (supplement_1): S4-S8 (2002)
- Gordon S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930 (2002)
- Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today* 8: 151-158 (1987)
- Han SB, Yoon YD, Ahn HJ, Lee HS, Lee CW, Yoon WK, Park SK, Kim HM. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. *Int. Immunopharmacol.* 3: 1301-1312 (2003)
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal. Biochem.* 180: 351-357 (1989)
- Hwang YC, Shin KS. Characterization of immuno-stimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 220-227 (2008)
- Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327: 291-295 (2010)
- Izydorczyk MS, Dexter JE. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Res. Int.* 41: 850-868 (2008)
- James SP, Zeitz M. Human gastrointestinal Mucosal T cells. pp. 275-285. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic press, New York, NY, USA. (1994)
- 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)
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11: 373 (2010)
- Kim SR, Seog HM, Choi HD, Park YK. Cholesterol lowering effects in rat liver fed barley and β -glucan enriched barley fraction with cholesterol. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 319-324 (2002)
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 147-156 (1998)
- Kuno T, Hirose Y, Hata K, Kato K, Qiang SH, Kitaori N. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. *Int. J. Oncol.* 25: 1809-1815 (2004)
- Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stokłosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M, Jakóbsiak M. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 45: 100-108 (1997)
- Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Choi HJ, Shin KS. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean citrus hallabong. *Carbohydr. Polym.* 111: 72-79 (2014)
- Lee DY, Shin MS, Shin KS. Characterization of macrophage-activating polysaccharide isolated from fermented brown rice. *J. Med. Food* 19: 1147-1154 (2016)
- Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS. Immunostimulatory effects of traditional doenjang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1227-1234 (2011)
- Lewis TS, Paul SS, Natalie GA. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74: 49-114 (1998)
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 21: 251-262 (2002)
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350 (1997)
- Martensson O, Maite DC, Ana I, Olle H. Effects of fermented, rory, non-dairy, oat-based products on serum lipids and the faecal excretion of cholesterol and short chain fatty acids in germfree and conventional rats. *Nutr. Res.* 22: 1461-1473 (2002)
- Oh HJ, Lee SR. Physiological function *in vitro* of β -glucan isolated from barley. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 689-695 (1996)
- Park KY. Increased health functionality of fermented foods. *Food Ind. Nutr.* 17: 1-8 (2012)
- Park HM, Hong JH. Immune-Enhancing Effects of Polysaccharides Isolated from *Phellinus linteus Mycelium* on *Mori ramulus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 26-33 (2017)
- Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H, Shin KS. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 228-234 (2012)
- Park JY, Shin MS, Kim SN, Kim HY, Kim KH, Shin KS, Kang KS. Polysaccharides from Korean *Citrus* hallabong peels inhibit

- angiogenesis and breast cancer cell migration. *Int. J. Biol. Macromol.* 85: 522-529 (2016)
- Paulsen B. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Curr. Org. Chem.* 5: 939-950 (2001)
- Pennini ME, Perkins DJ, Salazar AM, Lipsky M, Vogel SN. Complete dependence on IRAK4 kinase activity in TLR2, but not TLR4, signaling pathways underlies decreased cytokine production and increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection in IRAK4 kinase-inactive mice. *J. Immunol.* 1201644 (2012)
- Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-β-D-glucans. *J. Leukocyte Biol.* 72: 140-146 (2002)
- Roubroeks JP, Skjåk-Bræk G, Ryan L, Christensen BE. Molecular Weight Dependency on the Production of the TNF Stimulated by Fractions of rye (1→3),(1→4)-β-D-Glucan. *Scand. J. Immunol.* 52: 584-587 (2000)
- Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 1103-1111 (2004)
- Shin MS, Lee H, Hong HD, Shin KS. Characterization of immunostimulatory pectic polysaccharide isolated from leaves of *Diospyros kaki Thumb.* (Persimmon). *J. Funct. Foods* 26: 319-329 (2016)
- Shin MS, Park SB, Shin KS. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of *Citrus unshiu*. *Int. J. Biol. Macromol.* 112: 576-583 (2018)
- Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158 (1965)
- Smiderle FR, Alquini G, Tadra-Sfeir MZ, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LJ. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydr. Polym.* 94: 91-99 (2013)
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921 (1997)
- Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 217-230 (1999)
- Tada R, Ikeda F, Aoki K, Yoshikawa M, Kato Y, Adachi Y, Tanioka A, Ishibashi K, Tsubaki K, Ohno N. Barley-derived β-D-glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated pathway. *Immunol. Lett.* 123: 144-148 (2009)
- Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell. Signalling* 15: 455-462 (2003)
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. The β-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 169: 3876-3882 (2002)
- Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375: 148 (1995)
- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 70: 699-705 (1997)
- Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 258-274 (2002)
- Yamada H. Chemical and pharmacological studies on efficacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 65: 1-22 (1992)
- Yang SH, Andrew DS, Alan JW. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3-21 (2003)