



Original Article / 원저

흑효모 유래 Polycan의 TNF- α 유도 장 상피세포 염증 및 Loperamide 유도 변비 모델에 미치는 효과

김영숙^{1*}, 구분화¹, 조민정¹, 권정희², 이선민³, 오탈우^{4,5*}

¹(주)글루칸, ²(주)엔피켄바이오, ³안전성평가연구소 경남분소 경남바이오헬스연구지원센터
⁴한국한의학연구원 한의기술응용센터, ⁵과학기술연합대학원대학교 한의융합과학 전공

Effects of Polysaccharide (Polycan) derived from Black Yeast in TNF- α -induced Inflammation in the Intestinal Epithelial Cells and Loperamide-induced Constipation Models

Young Suk Kim^{1*}, Bon Hwa Ku¹, Min Jeong Cho¹, Jung Hee Kwon², Seon Min Lee³, Tae Woo Oh^{4,5*}

¹Glucan Co. Ltd. ²NPChemBio Inc., ³Gyeongnam Biohealth Research Center, Gyeongnam Branch Institute, Korea Institute of Toxicology
⁴Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), ⁵Department of Korean Convergence Medical Science, University of Science & Technology(UST)

ABSTRACT

Objective : This study was conducted to investigate the anti-inflammatory and laxative effects of Polycan in TNF- α -treated HT-29 intestinal epithelial cells and loperamide-induced constipation in vivo models, respectively.

Methods : To evaluate the anti-inflammatory effects of Polycan, HT-29 cells were treated with TNF- α in the presence or absence of Polycan. IL-8 production was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MAPK phosphorylation, nuclear translocation of NF- κ B, and phosphorylation of I κ B were assessed by Western blot analysis. To investigate the laxative effects of Polycan, 6-week-old SD rats (8 female rats per group) were orally administered Polycan or Chicory Fiber as a positive control for 4 weeks, and constipation was induced with loperamide treatment for 10 days before sacrifice. One day before sacrifice, a charcoal meal was administered to evaluate intestinal transit times. The periodically collected feces were used to assess the number of fecal pellets and fecal water content.

© 2024 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Results : Polycan inhibited TNF- α -induced IL-8 expression in dose-dependent manner. Furthermore, Polycan suppressed TNF- α -induced phosphorylation of MAPKs (ERK1/2, p38 and JNK), degradation of I κ -B α and nuclear translocation of NF- κ B. In an *in vivo* constipation model, the number of fecal pellets per food intake was significantly increased in rats administered with Polycan, both 1 day and 7 days after loperamide treatment. The water content of fecal pellets was restored in the Polycan groups starting 7 days after loperamide treatment. In addition, Polycan intake significantly enhanced the gastrointestinal transit ratio of a charcoal meal but reduced the number of intestinal fecal pellets.

Conclusions : These results suggest that Polycan suppressed TNF- α -induced inflammation by blocking both the MAPK and NF- κ B pathways in HT-29 cells. Additionally, in a loperamide-induced constipation model, Polycan showed clear laxative effects by increasing the number of fecal pellets, fecal water content, and intestinal transit ratio of a charcoal meal.

Keywords : Polycan, β -glucan, HT-29 cells, anti-inflammation, laxative effect

I. 서론

한국은 전통적으로 발효 음식을 많이 섭취하는 식습관을 가지고 있으며, 이러한 식습관은 장 건강을 유지하는 데 도움이 될 수 있다. 김치, 된장, 고추장 등은 유익균을 증가시키고, 장내 환경을 개선하는 데 긍정적인 영향을 미치는 것이 잘 알려져 있다¹⁾. 하지만 최근에는 서구화된 식습관과 스트레스, 불규칙한 생활 패턴, 운동 부족 등이 복합적으로 작용하면서 장에 문제가 생기는 경우가 많아, 장 건강에 대한 관심이 점점 높아지고 있다. 이에 따라 프로바이오틱스와 같은 장 건강 기능성식품을 섭취하는 사람들은 계속해서 증가하고 있다²⁻³⁾.

장 건강을 위협하는 질환은 변비, 염증성 장질환, 과민성 장증후군 등이 있으며, 이들은 장 운동, 장관면역 조절 및 장내 미생물 불균형 등으로 인해 발생할 수 있다⁴⁾. 장의 건강은 소화 및 영양 흡수에 대한 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 여러 만성질환, 특히 염증성 장질환 (IBD), 과민성 장 증후군 (IBS), 심지어 당뇨병 및 심혈관 질환과도 밀접한 관계가 있다⁵⁾. 또한, 장은 면역 체계의 중요한 부분을 담당하고 있다. 장내 미생물군은 면역 반응 조절에 관여하므로 장 건강의 변화가 면역 기능에 영향을 미칠 수 있다⁶⁻⁷⁾. 장 염증은 여러 요인으로 인해 생성된 다양한 독소와 항원들이 장내 면역체계를 감작하여, TNF- α , IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인 분비를 촉진하고, NF- κ B 와 MAPK 경로를 활성화하여 pro-inflammatory cytokines, nitric

oxide (NO), prostaglandin (PG)와 같은 여러 염증성 매개인자들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 과민성 장 증후군은 스트레스와 심리적 요인이 증상에 영향을 미침으로써 장의 수축과 이완의 비정상적인 조절이 나타나는 장 운동 이상과 설사, 변비 등의 증상을 초래한다⁹⁾. 특히, 변비는 소화관의 운동 기능이 저하되거나 수분 조절에 문제가 생겨 발생하는데, 소화관 운동 기능이 떨어지는 것은 장 내용물들의 이동시간 (Transit time)을 길어지게 만드는 작용을 하고, 수분 조절 이상은 변의 수분함량과 개수에 영향을 미친다¹⁰⁾.

오늘날 세계의 많은 사람들은 건강한 삶을 영위하기 위해 웰빙 (Well-being)과 자연주의를 지향함으로 인하여 천연성분 및 한방 제품에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, 코로나 유행과 인구 고령화에 따라 건강에 대한 관심이 높아지며 건강관리에 투자하고 소비하는 이들이 많아지면서, 천연의 생리활성물질을 원료로한 건강기능식품 시장은 폭발적으로 성장하고 있다²³⁾. 특히, 천연물의 항산화, 항염증 효능은 체지방 감소, 혈관 건강, 장 건강, 뇌 건강, 모발 건강 등 다양한 건강기능성 과도 연관되어 있다⁴⁾. 천연페놀, 플라보노이드류는 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인에 의한 MAPK 및 NF- κ B 신호전달 경로를 억제함으로써 항염증 효능을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다²⁻³⁾. 또한, 오메가-3 와 같은 불포화지방산은 세포막의 아라키돈산과 에이코사노이드 생성량을 줄임으로써 염증을 억제한다⁸⁾. 한 편, 곡물, 과일, 야채 등에 풍부한 식이섬유는 체내에서

*Corresponding author: Tae Woo Oh, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3833, E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

•Received : August 20, 2024 / Revised : August 27, 2024 / Accepted : August 30, 2024



분해되지 않는 성분으로 장의 연동 운동을 촉진하고 물을 흡수하는 성질로 대변의 부피를 증가시켜 장 운동을 원활하게 할 뿐만 아니라, 장내 미생물 발효를 통해 유익한 부산물을 생성하여 장 건강에 기여한다고 알려져 있다¹⁰⁾. 대한민국 식품의약품안전처로부터 배변활동 원활에 도움을 주는 것으로 인정받은 개별인정 원료는 대부분 식이섬유와 올리고당 등 프리바이오틱스를 지표 성분으로 하는 원료들이 대부분이다³⁾. 한편, 면역 기능 개선 효능으로 많은 연구가 이루어진 β -glucan은 장기 복용에도 내성이 나타나지 않으며, 염증 및 암에 대한 생리활성 효과가 입증되면서 다양한 건강기능성이 밝혀지고 있다¹²⁾⁻¹⁴⁾. β -glucan 원료인 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양물인 polycan¹⁵⁾은 골 생성 촉진 및 골 소실 억제 효능이 밝혀진 바 있으며¹⁶⁾⁻¹⁷⁾, 치주질환과 DSS 유도 장염 *in vivo* 모델 등 다양한 염증 모델에서 β -glucan이 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성을 억제하는 것으로 보고되었다¹⁸⁾⁻²⁰⁾. 또한, 고지방식이 모델에서 β -glucan의 장 점막 장벽 손상 개선 효능 또한 보고된 바 있다²¹⁾.

이에 본 연구에서는 β -glucan이 풍부한 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양물 Polycan의 장관면역 조절과 배변활동 개선 효능을 살펴보고자, HT-29 세포주를 사용하여 TNF- α 처리로 장 염증 세포 모델을 제작하여 Polycan 처리에 따른 항염증 효능을 확인하였다. 또한, Loperamide로 유도한 *in vivo* 변비 모델에서 Polycan의 배변활동 개선 효과에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) Polycan 제조

본 실험에 사용한 polycan은 흑효모 *Aureobasidium pullulans* SM-2001 배양물 유래의 β -glucan으로, 선행 연구에서 β -1,3/1,6-glucan (β -1,3 linkage 68: β -1,6 linkage 32), 평균 분자량은 2.6×10^5 Da로 규명된 바 있다²²⁾. 실험에 사용한 β -glucan은 (주)글루칸에서 제공받아 실험에 사용하였다.

2) 세포배양 및 염증 유도

HT-29 colon epithelial cell line은 ATCC로부터 구입하였으며, 세포배양은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 μ

g/mL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) 배지로 배양되었다. 배지는 2일 간격으로 교체하였다. Polycan의 항염증 효능을 평가하기 위하여 HT-29 세포주에서 50 ng/mL 농도의 TNF- α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 6시간 동안 처리하여 염증을 유도하였다.

3) 실험동물

본 실험은 6주령의 SD-Rat 수컷 마우스를 주식회사 코아텍 (KOATECH, Pyeongtaek, Korea)에서 공급받아 7일간 순화과정을 거쳐 사용하였으며, 경상국립대학교 공동실험실습관 동물실에서 12시간 간격으로 명암 조절과 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도, $50 \pm 5\%$ 의 습도를 유지하여 동물을 관리하며, 사료 및 음수는 자유롭게 공급하였다. 경상대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 얻고 윤리 규정을 준수하여 본 실험을 진행하였다(GNU-240802-R0156).

2. 방법

1) 세포독성 평가

Polycan 및 TNF- α 의 세포독성을 평가하기 위해 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA)를 이용한 cell viability assay를 수행하였다. 배양한 HT-29 cell를 96well plate에 1×10^5 cell/mL 농도로 200 μ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. HT-29 cell에 각각 125, 250, 500 μ g/mL 농도의 polycan 시료와 50 ng/mL TNF- α 를 24시간 처리한 후, 5 mg/mL (DPBS)의 MTT 시약을 media에 5배 희석한 용액 100 μ L/well씩 분주 한 후 1시간 incubator에서 반응시켰다. 상층액을 제거 후 formazan을 DMSO 100 μ L씩 처리해 용해시킨 후, palate를 마이크로 판독기 (SpectraMax i3, Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 사이토카인 발현 평가

HT-29 세포에서 TNF- α 에 의해 유도된 IL-8 사이토카인 발현은 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)를 통해 측정하였다. 24 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주하여 24시간 배양 후, Polycan을 125, 250, 500 μ g/mL 농도로 전처리하였다. 그런 다음 세포들은 TNF- α (50 ng/ml)로 6시간 동안 처리하여 염증반응

유도 후 상층액 (Supernatant)을 수집하였다. 96 well plate에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IL-8 1차 항체로 하룻밤 동안 코팅한 후, plate는 washing buffer (PBS와 0.05% Tween 20)로 세 번 세척하고 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 이후 10% FBS함유 PBS로 blocking한 후, 세 번의 세척 후 표준품과 상층액을 무혈청 배지로 희석하여 첨가한 다음, 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 이후 washing buffer로 다섯 번 세척한 다음 IL-8 2차 항체 (Streptavidin-conjugated)와 HRP를 plate에 첨가하여 1시간 동안 반응 후 일곱 번 세척하였고, TMB를 기질로 사용하여 흡광도를 측정하였다. 마이크로 판독기를 사용하여 450 nm 파장에서 측정하였고, IL-8 표준 곡선을 이용하여 시료 내 IL-8의 발현량을 산출하였다.

3) Western blotting

HT-29 cell로부터 염증 관련 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, HT-29 cell에 Polycan을 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 후 염증을 유도하기 위하여 TNF- α 를 24시간 처리하였다. 각 세포를 PBS로 세척 후, RIPA buffer로 lysis하였다. 이를 12,000 rpm에서 20 분 원심분리하여 얻은 단백질의 농도를 BCA solution으로 정량한 다음, 30 μg 단백질을 sample buffer와 혼합하여 8-15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 염증반응에 의한 NF- κ B의 핵내 이동을 확인하기 위해서는, 상기와 같이 처리된 HT-29 cell을 수확하여 nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo, USA.)를 사용하여 세포질과 핵 분획을 얻었다. 각 분획은 마찬가지로 BCA solution으로 단백질 정량 후, 20 μg 씩 실험에 사용하였다. 분리된 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각

membrane은 5% BSA로 실온에서 1시간 blocking하였다. membrane에 1차 항체를 넣어 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. Membrane에 다시 HRP-conjugated 2차 항체를 넣은 후, 1시간 동안 실온에서 반응시키고 TBS로 3회 세척하여 ECL용액을 이용하여 ChemiDoc™touchimagingssystem(BioRad, California,USA)를 이용하여 분석하였다.

4) 실험동물 투여 및 변비 유도

실험동물은 여섯 군으로 분류하여 실험을 진행하였으며, 실험 개체 간 실험 결과의 표준 오차를 고려하여 군 당 8마리로 설정하였다. 일주일의 순화 기간을 거친 후 체중을 기반으로 무작위 선별하여 군을 분리하였다. 변비 유도를 위한 Loperamide는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, 양성대조군으로 사용된 식품의약품안전처에서 배변 활동 개선 가능성을 인정받은 치커리 식이섬유 (FIBRULOSE F90)는 벨기에산으로 COSUCRA S.A사 (Warcoding, Belgium) 제품을 사용하였다. 시험 물질 및 양성대조군은 매일 오전 10시 1회 경구투여용 Sonde를 이용하여 28일 간 경구 투여하였다. 음성대조군은 증류수를 사용하였고, 양성대조군인 치커리 식이섬유 (CRF)는 300 mg/kg, Polycan 저용량군 (Polycan L)은 31.25 mg/kg, 중용량군 (Polycan M)은 62.5 mg/kg, 고용량군 (Polycan H)은 125 mg/kg 용량으로 투여하였다. 또한, 변비를 유도하지 않는 정상군을 제외한 음성대조군, 양성대조군, Polycan 저용량, 중용량, 고용량군은 실험 시작일부터 19일차부터 28일차까지 매일 1회 Loperamide를 3 mg/kg의 용량으로 경구 투여하여 변비를 유도하였다 (Fig. 1).

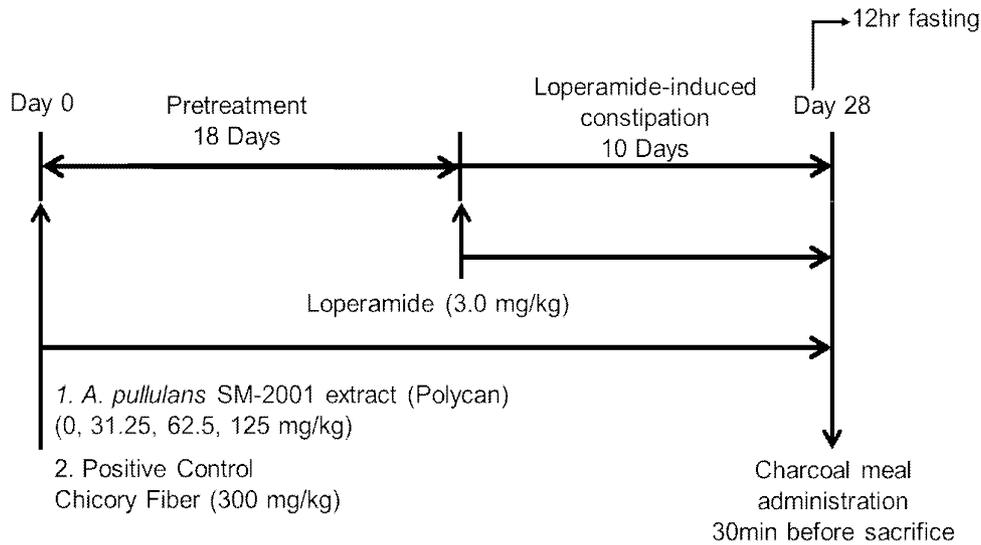


Fig. 1. Experimental schedule of loperamide-induced constipation *in vivo* model.

5) 변 수집 및 수분함량 측정

변의 개수, 수분 함량의 측정값은 변비 유발 전과 변비 유발 후 7일 차, 2회로 나누어 측정하였으며, 24시간 동안 수집된 각 실험 동물의 변의 개수를 세고, 변의 수분 함량을 측정하기 위하여 70 °C 오븐에서 24시간 동안 건조시킨 뒤, 건조 전후 중량의 차이를 이용해 수분함량을 측정하였다²⁰⁾. 중량을 측정한 다음 변의 사진을 촬영하였다. 장 내 변의 개수는 실험 동물 희생 후, 맹장에서 직장까지의 전 부위를 취해 장관 내 남아 있는 변을 계수하였다.

6) 장 이동능 측정

마지막 투여인 28일 차 투여 후, 실험동물을 18시간 이상 절식시킨 다음, 29일차에 charcoal meal (3% suspension of activated charcoal in 0.5% aqueous methylcellulose; Sigma-Aldrich) 1 mL을 투여하여, 30분 뒤 동물을 희생하여 소장부터 맹장까지의 charcoal meal이 이동한 최장길이를 측정하였으며, 측정된 길이를 장 이동 길이로 정의하였다. 아래의 식에 따라 장 이동율을 계산하였다.

7) 통계 처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 8.0 통계 프로그램 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차 (mean±SD)로 계산하였으며, 변비 유도 음성대조군 (LPA)과 각 그룹 간 비교를 위해 통계처리는 T-test로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, *P* value가 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있다고 판단하였다. 그래프 및 표 결과의 유의성은 다음과 같이 표기하였다 (* *P* <0.05, ** *P* <0.01, *** *P* <0.001).

III. 결과

1. 세포독성 평가

Polycan의 세포 독성 및 유효성 평가를 위한 농도 범위를 평가하기 위해, HT-29 cell에 125, 250, 500 μ g/mL 농도로, TNF- α 는 50 ng/mL 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay 방법으로 세포독성을 측정하였다. 그 결과, 해당 농도에서 Polycan은 HT-29 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않았으며, TNF- α 처리 시에도 세포 생존율은 90% 이상을 나타내었다 (Fig. 2). 따라서, 이후의 바이오마커 발현 평가 실험에서는 TNF- α 와 Polycan을 해당 농도로 처리하였다.

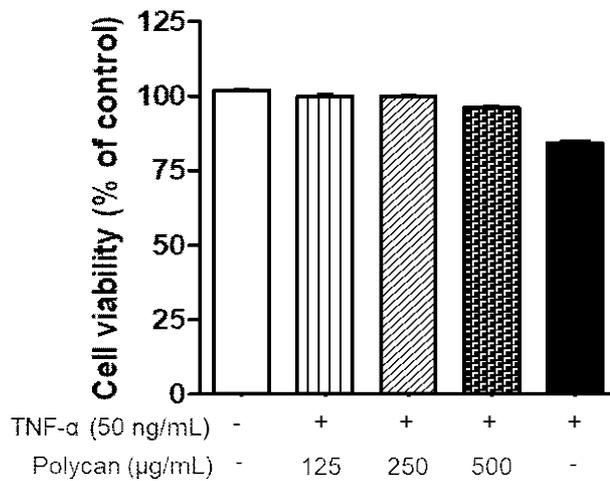


Fig. 2. Cell viability of HT-29 cells treated with Polycan or TNF- α .

2. TNF- α 유도 장 염증 세포모델에서 Polycan 처리에 따른 IL-8 사이토카인 발현량 평가

HT-29 세포는 처리 24시간 전에 24 well에서 전배양 후, Polycan을 각각 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 30분 동안 처리한 후 TNF- α 로 6시간 동안 자극하여

염증을 유도하였다. IL-8의 함량을 ELISA법으로 측정 한 결과, TNF- α 는 HT-29 세포에서 IL-8 분비를 효과적으로 유도하였으며, Polycan 처리 세포에서 IL-8 분비가 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

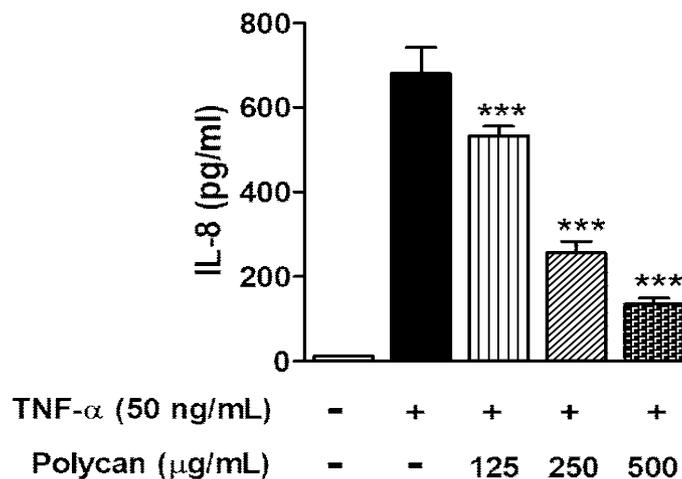


Fig. 3. Effects of Polycan on TNF- α -induced IL-8 production in HT-29 cells. This experiment was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using culture supernatants collected from treated cells. Supernatants were analyzed according to the manufacturer's protocol. Each value represents the mean \pm S.E. The asterisks indicate the values significantly different from the TNF- α at $p < 0.001$ (***)

3. 항염증 신호전달 경로 MAPK 및 NF- κ B 발현량 평가

Polycan이 TNF- α 에 의해 유도된 MAPK 인산화에 미치는 영향을 조사하기 위해, HT-29 세포에서 TNF- α 자극 후 세 가지 MAPK (ERK1/2, p-38, JNK1/2) 신호 전달 경로의 인산화를 western blot을 통해 확인하였다. TNF- α 는 HT-29 세포에서 모든 종류의 MAPK 인산화를 효과적으로 유도하였으며, 이러한 MAPK 인산화는 Polycan에 의해 농도 의존적으로 억제되었고, ERK1/2, p-38, JNK1/2 모두에서 나타났다

(Fig. 4A). 한편, Polycan이 TNF- α 로 자극된 HT-29 세포에서 NF- κ B 이동과 I κ -B α 분해에 미치는 영향을 Polycan 처리 HT-29 세포에서 세포질과 핵 분획 추출 후, western blot을 통해 확인하였다. NF- κ B 이동 확인 결과, Polycan은 TNF- α 에 의해 유도된 NF- κ B의 핵으로의 이동을 감소시켰다. TNF- α 에 의해 세포질에서 I κ -B α 의 인산화와 그에 따른 분해는 촉진되었지만, 이러한 현상은 Polycan 처리에 따라 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4B).

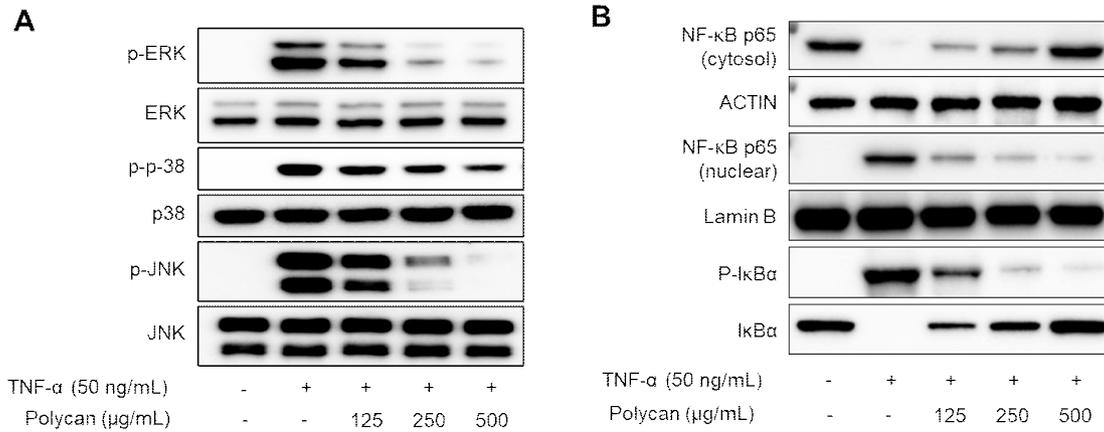


Fig. 4. Effects of Polycan on MAPK cellular signaling pathways (A) and nuclear translocation of NF- κ B (B) in the TNF- α stimulated HT-29 cells. Cells (5×10^6 cells/ml) were pre-treated with three concentrations (125, 250 and 500 μ g/mL) of Polycan and then stimulated with TNF- α (50 ng/ml). The cells were harvested and protein samples were immunoblotted for p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38, p-JNK, and JNK. Polycan were shown dose-dependent inhibitory effects on the MAPK phosphorylation (A). Polycan-treated HT-29 cells showed significantly decreased NF- κ B nuclear translocation. The volumes of cytosol and nucleus fractions were demonstrated with comparison of expression of β -Actin and Lamin B, respectively. Polycan suppressed the TNF- α -induced phosphorylation of I κ B α and its degradation in a dose-dependent manner

4. Loperamide 유도 변비 모델에서 Polycan 투여에 따른 체중, 식이섭취량 및 변 개수 영향 평가

4주 간의 Polycan 투여 (Fig. 1) 기간 동안 정상군 (Normal)과 대조군 (LPA)을 비교했을 때, LPA 투여 시점인 2주차와 3주차 사이의 체중 증가가 둔화되는 경향이 보였지만, 통계적으로 유의미한 체중 감소는 나타나지 않았다. 양성대조군 (CRF)과 Polycan 투여군 모두에

서도 대조군 대비 체중 증가를 감소 경향이 나타났지만, 유의하지는 않았다 (Table 1). 한편, LPA 투여 후 첫날과 7일차에 식이섭취량 대비 변 개수를 측정된 결과, 두 측정 시점 모두 정상군과 비교하였을 때, LPA 투여에 따라 식이섭취량 대비 변 개수가 유의하게 감소하였고, 양성대조군 및 Polycan 투여 시 회복되는 양상이 나타났으며, 그 정도 또한 통계적으로 유의하였다 (Fig. 5).

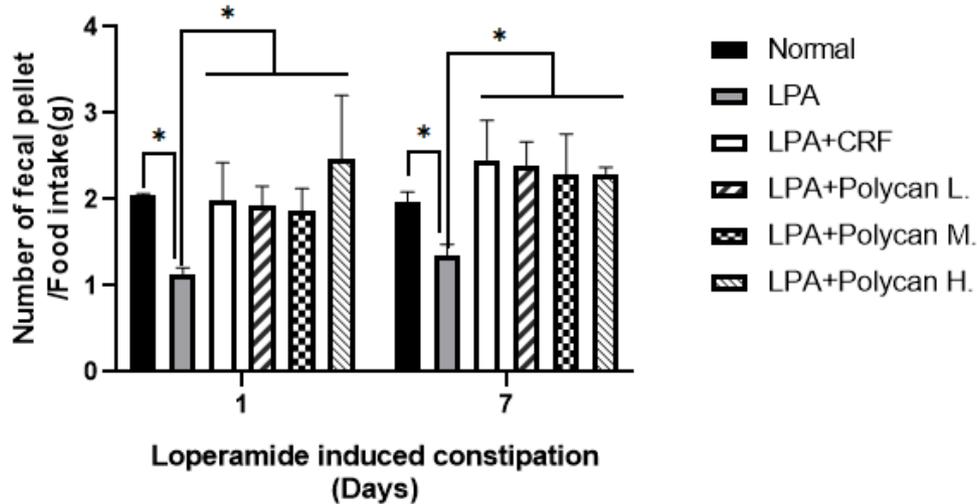


Fig. 5. Effect of Polycan on food intake and number of fecal pellets of constipated rats. Each value represents the mean \pm S.E. The asterisks indicate the values significantly different from the LPA (Negative control) at $p < 0.05$ (*).

Table 1. Body weight change following oral treatment with Polycan and CRF in rats with loperamide-induced constipation

Group	Body weight (g)				
	0 weeks	1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	232.0 \pm 3.6	297.1 \pm 5.3	337.6 \pm 7.2	360.2 \pm 8.3	385.5 \pm 9.8
LPA	232.1 \pm 5.7	300.8 \pm 6.4	339.0 \pm 7.2	357.4 \pm 7.7	368.5 \pm 7.7
LPA+CRF	232.2 \pm 3.4	289.3 \pm 3.5	323.6 \pm 4.6	344.6 \pm 5.0	361.2 \pm 5.7
LPA+Polycan L.	229.2 \pm 4.1	292.2 \pm 5.7	327.2 \pm 5.6	344.2 \pm 6.4	342.0 \pm 7.9
LPA+Polycan M.	230.8 \pm 4.5	289.0 \pm 4.4	324.9 \pm 4.4	346.8 \pm 4.7	359.5 \pm 4.9
LPA+Polycan H.	229.6 \pm 4.4	288.3 \pm 4.9	324.2 \pm 5.5	344.4 \pm 6.9	363.0 \pm 7.7

Each value represents the mean \pm S.E.

5. Polycan 투여에 따른 변 수분 함량 변화 평가

LPA 투여 1일차에는 변의 수분 함량은 군 간에 유의한 차이가 없었으나, 7일차에 수집된 변의 수분 함량은 양성대조군과 Polycan 고용량군 (LPA+Polycan H.)에서 유의한 회복이 관찰되었다. 또한, 10일차에 수집된 변의 수분 함량은 대조군 대비 양성대조군과 Polycan 투여군 모두에서 20% 이상 유의한 증가가 나타났다 (Table

2). 한편, 수분 함량 측정을 위해 건조하였던 변의 이미지는 Fig.6과 같다. 정상군 (Normal) 대비 대조군 (LPA)에서 변의 크기와 개수가 눈의 띄게 줄어들어 변비의 전형적인 현상을 관찰할 수 있다. 반면, 양성대조군 (CRF) 및 Polycan 투여군에서는 변의 크기와 개수가 회복되는 양상이 나타났다 (Fig. 6).

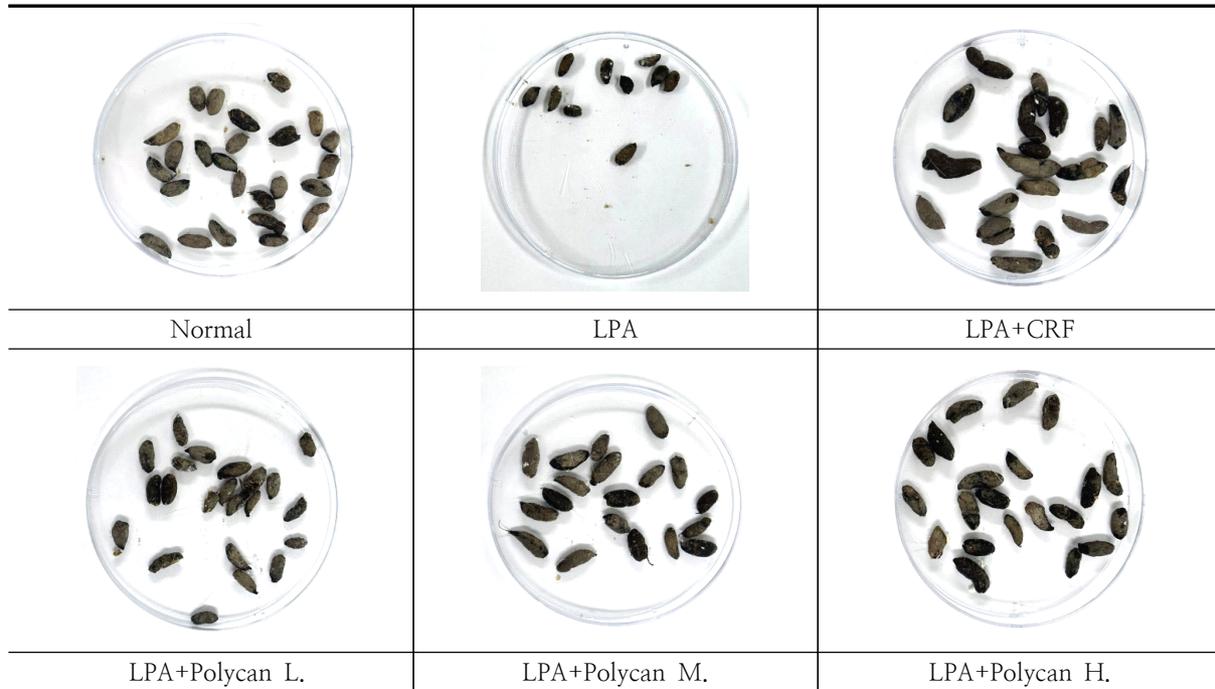


Fig. 6. Stool morphological characteristics. The images of the dried feces were taken on the seventh day after inducing constipation. The number of fecal pellets from each experimental animal was counted over a 24-hour period. After measurement of the fecal water content, the dried feces were taken using digital camera.

Table 2. Change in fecal water content in rat with loperamide-induced constipation.

Loperamide-induced constipation	Water content of fecal pellets (%)					
	Normal	LPA	LPA+CRF	LPA +Polycan L.	LPA +Polycan M.	LPA +Polycan H.
0 Days	63.79±2.07	64.35±1.92	61.66±1.56	61.58±2.03	61.37±1.29	63.46±0.88
1 Days	61.40±3.02	54.9±0.69	58.25±2.00	60.67±2.50	62.43±0.60	62.97±3.13
7 Days	64.87±3.41*	50.12±4.44	65.44±1.97*	55.26±1.52	58.52±3.54	65.11±2.89*
10 Days	67.87±3.19**	50.50±1.18	72.28±4.06***	72.70±3.04***	72.22±4.04***	71.15±1.97**

Each value represents the mean \pm S.E. The asterisks indicate the values significantly different from the LPA (Negative control) at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

6. Charcoal meal을 이용한 장 이동능 평가

정상군의 charcoal meal 이동능이 70.43%인데 비해, 대조군은 약 11% 감소한 59.27%로 유의한 감소를 보였다 ($P < 0.001$). 한편, 양성대조군의 charcoal meal 이동능은 69.87%로 대조군 대비 10.6% 이상 유의한 증

가를 보였다 ($P < 0.001$). Polycan 저용량, 중용량, 고용량 그룹에서는 각각 11.1, 12.2, 11.8% 증가한 70.34%, 72.43% 및 71.01%의 이동능을 보였으며 모두 통계적으로 유의하였다 (Table 3).

Table 3. Gastrointestinal charcoal transit ratio following oral treatment with Polycan in rats with loperamide-induced constipation.

Group	Small Intestine Transit		
	Average total length (mm)	Average transit length (mm)	Average transit ratio (%)
Normal	1056.40 ± 29.95	743.00 ± 16.09	70.43 ± 1.33 ^{***}
LPA	1116.20 ± 12.51	661.00 ± 22.49	59.27 ± 2.27
LPA+CRF	1113.80 ± 17.84	778.80 ± 22.03	69.87 ± 0.96 ^{***}
LPA+Polycan L.	1138.00 ± 9.30	800.60 ± 13.47	70.34 ± 0.83 ^{**}
LPA+Polycan M.	1132.40 ± 11.58	820.00 ± 19.95	72.43 ± 1.80 ^{***}
LPA+Polycan H.	1067.40 ± 31.88	757.40 ± 25.78	71.01 ± 1.92 ^{***}

Each value represents the mean ± S.E. The asterisks indicate the values significantly different from the LPA (Negative control) at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

7. 변비 흰쥐의 희생 시점 장내 변 개수 평가

해부를 통해 확인한 장내 변 개수는 정상군에 비해 대조군에서 많은 것으로 나타났다. 한편, 양성대조군 투여군과 Polycan 저용량 투여군에서는 대조군 대비 장내

변 개수가 감소하는 경향은 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. 반면, Polycan 중용량 및 고용량 투여군에서는 장내 변 개수가 통계적으로 유의하게 감소하여 농도 의존적인 경향을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

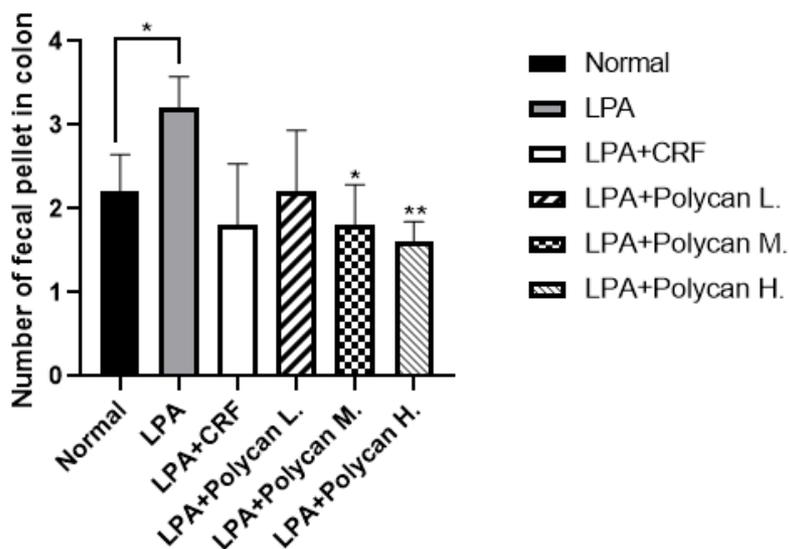


Fig. 7. Number of Intestinal fecal pellets. The number of feces in the intestine was measured by counting the fecal pellets remaining in the entire intestinal tract from the cecum to the rectum after sacrificing the experimental animals. Each value represents the mean ± S.E. The asterisks indicate the values significantly different from the LPA (Negative control) at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).



IV. 고찰

서구화된 식생활, 불규칙한 식습관, 음주, 운동부족 및 스트레스 등 다양한 요인들이 현대인의 장 건강을 위협하고 있다¹⁾. 한국에서 염증성 장질환의 발병률은 과거에 비해 꾸준히 증가하고 있다. 연구에 따르면, 한국의 염증성 장 질환 유병률은 2000년대 이후로 급격히 증가하였으며, 여전히 증가 추세에 있다. 정확한 수치는 연구마다 다를 수 있지만, 일반적으로 아시아 지역에서는 상대적으로 낮은 발병률을 보이다가 최근 몇 년간 증가한 것으로 보고되고 있다³⁾. 과민성 장 증후군은 기능성 위장 질환의 하나로 기질적 병변이 없는 상태에서 복통, 복부 불편감, 배변습관 변화 등을 동반하는 질환이다¹⁾. 국내 인구의 약 16.5%는 스스로 변비라고 인식하고 있으며, 변비 환자의 70%는 일상 업무에 방해를 받고 정상적인 사회생활이 어렵다고 느끼는, 삶의 질에 큰 영향을 주는 질환이다²⁾. 이러한 장 질환의 원인은 유전적, 후생유전적, 환경적 요인, 숙주의 면역상태 등 다양한 요인들이 복합적으로 영향을 미친다고 알려져 있지만, 생활 습관, 식습관, 환경 변화 등의 영향을 많이 받기 때문에, 조기 진단과 관리를 통해 삶의 질을 높일 수 있다⁴⁻⁵⁾. 장이 외부로부터 유입되는 물질이 상호작용하는 주요 기관이기 때문에 환경적 요인 중에서도 특히 식이 섭취가 장 건강에 큰 영향을 미칠 수 있다. 인간의 소화기관에서 분해되지 않고 장에 도달하는 난소화성 식이 섬유는 장내 미생물의 먹이가 되는 프리바이오틱스 (prebiotics)의 기능을 수행함으로써, 장내 유익균인 프로바이오틱스 (probiotics)의 성장을 촉진하고 유익균은 유기산을 만들어 유해균 성장을 억제함으로써 면역기능을 정상화하여 염증성 장을 개선할 수 있다⁶⁾. 또, 식품으로 섭취하는 식이섬유 중 불용성 식이섬유는 체내 소화효소나 장내 미생물에 의해 분해되지 않고 장 속에 남아서 변의 양을 늘리고, 변을 부드럽게 하여 원활한 배변 활동에 도움을 줄 수 있다¹⁰⁾. 이 밖에도 최근 다양한 바이오소재의 장 건강 기능성 물질로써 역할과 작용 기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다¹¹⁾. 본 연구에서는 면역기능 증진 효능으로 잘 알려진 β -glucan의 장건강 기능성을 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 검증하고자 하였다. β -glucan은 포도당이 β -1,3 결합으로 고분자를 이루는 다당류를 통칭하며, β -1,3 결합의 기본구조에 β -1,4결합이 가지형태를 이루는 분자구조로 진균류, 조류, 박테리아 등에 존

재하는 생리활성 물질이다. 흑효모인 *Aureobasidium pullulans* SM-2001균주에 의하여 생산된 β -glucan인 Polycan은 β -1,3/1,6 결합의 분자 구조를 가지며, 면역 증진과 항염증 기능성이 있다고 알려져 있다¹⁵⁾.¹⁸⁾⁻¹⁹⁾.

따라서 본 연구에서는 HT-29 장상피세포 모델에서 TNF- α 처리로 장 염증 질환을 모사한 *in vitro* 모델을 구축하여 Polycan의 장 염증 개선 효능을 평가하였다. 또, 흰쥐를 이용하여 Loperamide 투여로 변비를 유도하는 *in vivo* 모델을 구축하여 Polycan의 4주 경구 투여에 따른 배변 활동 개선 기능성을 평가하였다.

장 염증 개선 효능을 평가하기 위해 우선적으로 Polycan을 HT-29 세포에 처리하여 독성 유무를 평가하였다. MTT를 이용한 세포생존율 분석 결과, 125 ~ 250 μ g/mL 범위에서는 세포독성이 나타나지 않았으며, 염증 유도를 위한 TNF- α 처리(50 ng/mL) 시에도 독성이 없어 이후 항염증 효능평가는 해당 농도 범위에서 실험을 수행하였다 (Fig.2). 장관 내 염증반응과 면역은 여러 사이토카인과 면역세포, 다양한 염증인자에 의해 조절된다. TNF- α 는 장 상피세포로부터 생성되는 염증 촉진 사이토카인으로 장 손상이 일어날 경우 장 조직으로 염증세포의 침윤을 촉진하는 역할을 한다. 따라서 장 조직 내 TNF- α 생성량의 변화를 장 손상 개선 효과 평가의 지표로 활용할 수 있으며, 본 시험에서는 장 상피세포에 TNF- α 를 처리하여 염증 유도 모델을 만드는데 사용하였다. TNF- α 처리시 MAPK 및 NF- κ B 신호전달 경로를 활성화하여 IL-6, IL-8, TNF- α , iNOS 등 대표적인 염증인자들의 발현을 유도하는 것이 잘 알려져 있다⁸⁾. 본 연구에서도 HT-29 세포에 TNF- α 처리시 염증 사이토카인인 IL-8의 생성을 효과적으로 유도하여 장 염증 *in vitro* 모델이 잘 확립된 것을 확인하였다. 해당 조건에서 Polycan 처리시 IL-8의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig.3). 이러한 Polycan의 장염증 억제 효능 기작을 확인하기 위하여 MAPK 및 NF- κ B의 핵심 인자들의 발현을 Western blot으로 조사하였다. MAPK 3종 ERK1/2, p38 및 JNK는 염증 유도 시 인산화 과정을 거쳐 활성화되는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 본 연구결과에서 HT-29 세포에 TNF- α 처리시 ERK1/2, p38 및 JNK의 인산화가 관찰되어 염증 유도가 잘 되었음을 확인할 수 있었다. 한편, Polycan 처리시 3종 MAPK의 인산화는 농도 의존적으로 감소하여 Polycan은 MAPK 신호전달

경로를 억제함으로써 항염증 효능을 발휘하는 것으로 볼 수 있다 (Fig. 4A). 또다른 염증 신호전달 경로인 NF- κ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절, 세포사멸, 세포증식, 상피세포 분화 등에 관여하면서 체내 거의 모든 생리반응에 연관되어 있는 단백질이다. NF- κ B 단백질은 다양한 homo-, hetero 이합체 (dimer)의 형태로 존재하며 그 조합에 따라 다양한 기능을 나타낸다. 외부에서 TNF- α 를 처리하면 IKK 복합체가 I κ B의 인산화와 polyubiquitination 과정을 연속적으로 거쳐 proteasome에서 분해함으로써 NF- κ B 이합체를 I κ B로부터 분리 활성화시킨다. 이후 분리된 NF- κ B 이합체는 핵 안으로 들어가서 전사촉진자로 작용하여 IL-8를 포함한 여러 염증 인자들의 발현을 촉진한다⁸⁾. 실제로 본 연구에서 TNF- α 처리 HT-29 세포의 세포질과 핵 분획을 분리하여 NF- κ B의 핵 내 이동과 I κ B α 의 인산화 및 분해를 western blot으로 평가하였다. TNF- α 처리에 의해 NF- κ B의 핵 내 이동이 나타났으며, 그와 일치하게 세포질 내 NF- κ B의 양은 감소하였다. 해당 조건에서 Polycan은 TNF- α 에 의한 NF- κ B의 핵 내 이동을 농도 의존적으로 억제하였다. Polycan이 NF- κ B의 핵내 이동을 억제하는 기작을 추가적으로 확인하기 위해 I κ B α 및 p-I κ B α 의 발현을 조사하였다. Polycan은 TNF- α 에 의한 I κ B α 의 인산화를 억제하였으며, 인산화에 따른 I κ B α 의 분해 또한 Polycan에 의해 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 4B). 따라서, 염증 조건에서 Polycan은 I κ B α 의 인산화를 억제함으로써 I κ B α 단백질 안정성을 높이고, 그로 인해 NF- κ B의 핵 내 이동을 억제하여 downstream의 IL-8을 비롯한 염증 매개인자들의 발현을 억제하는 것으로 보인다.

Polycan의 배변활동 개선 효능을 평가하기 위해 Polycan을 4주간 경구 투여하였고, 시험 종료 10일 전부터는 변비를 유도하기 위해 Loperamide를 투여하였다 (Fig. 1). Polycan 투여에 따른 흰쥐의 유의한 체중감소는 관찰되지 않았으며, Loperamide에 의한 변비 유도 기간 중에도 유의한 체중 변화는 나타나지 않아 (Table 1) 흰쥐의 건강 상태가 유지되는 조건에서 Polycan의 배변 활동 개선 효능을 평가할 수 있었다. 변비 유도 기간 1일차와 7일차 모두 변비 조건에서는식이섭취량 대비 변 개수가 유의하게 감소하였으나 양성대조군인 치커리 식이섭취나 Polycan 섭취 시 식이섭취량 대비 변 개수가 회복되는 것으로 나타났다 (Fig.

5). Loperamide나 치커리 식이섭취, Polycan 섭취가 실험동물의 식이섭취량 자체에는 영향을 주지 않았지만 (data not shown), 동물실험 특성상 개체별 식이섭취량의 오차가 크고, 변 개수는 식이섭취량에 영향을 받으므로, 변 개수는 식이섭취량에 대한 비율로 환산하여 평가하였다. 변 개수 및 수분 함량 등을 조사하였고, 희생 후 장 내 변 개수도 평가하였다. 변비 유발 조건에서 Polycan에 의한 변 개수 회복은 4주 투여 종료 시점에 희생 후 확인한 장 내 변의 개수와도 경향이 일치하였다. 즉, Loperamide 투여군에서는 장에 남아있는 변의 개수가 정상군 대비 유의하게 많았지만, 양성대조군과 Polycan 투여군에서는 잔여 변 개수가 대조군 대비 줄어들었고, Polycan 중용량과 고용량에서는 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 이는 Polycan이 배변 활동을 원활하게 하여 장 내에 남아있는 변의 개수를 감소시킨 것으로 볼 수 있다. Fig. 6의 7일차에 수집된 변의 모양을 살펴보면, 변비 유도군에서는 변의 개수뿐 만 아니라 크기도 매우 줄어든 것을 볼 수 있다. 반면, 양성대조군과 Polycan 투여군에서는 변 개수와 크기 모두 증가하는 경향이 나타났다. 한편, 변의 수분 함량은 변비 유도 시 감소하지만 양성대조군 및 Polycan 투여시 회복되는 것으로 나타나 (Table 2), 변비 조건에서 Polycan은 변의 수분량을 유지시키고, 그로 인해 변의 배출을 촉진하는 기작을 통해 배변 활동 개선 효능을 갖는 것으로 판단된다. 4주차 마지막 투여 시점에 charcoal meal을 이용한 장 이동능 평가 결과에서도 앞의 내용들과 일맥상통하는 결과를 얻었다. Loperamide 투여시 charcoal meal의 장 이동능이 현저하게 떨어진 반면, 양성대조군 및 Polycan 투여군에서는 정상군과 동일한 수준으로 장 이동능이 회복된 것으로 나타났다 (Table 3).

Loperamide 유도 변비는 변 수분함량과 대장 점막 감소를 야기하는데²⁴⁾, β -glucan은 수소 결합을 통해 물과 상호작용하는 많은 수의 하이드록실기를 가지고 있는 고친수성 성질로 인해 용해성과 불용성 형태 모두에서 물을 유지하는 능력을 갖추고 있어²⁵⁾⁻²⁸⁾, β -glucan의 이러한 물리화학적 성질이 변비 조건에서도 변의 수분함량을 유지시켜주고, 그로 인한 배변 활동 개선에 기여하는 것으로 추측된다. 또, β -glucan은 고지방식이 *in vivo* 모델에서, 단쇄지방산 (Short chain fatty acid) 생성 미생물 군집 증가와 독성물질 감소를 유발함으로써, 고지방식에 따른 장 점막 장벽 (Intestinal



mucosal barrier) 손상을 개선함으로써 장 건강에 기여한다는 점 또한 변비 조건에서 β -glucan에 의한 배변 활동 개선 효능을 뒷받침하는 결과로 판단된다²¹⁾.

V. 결론

본 연구에서는 Polycan을 처리한 장 상피세포 염증 모델에서 β -glucan인 polycan의 염증 억제 효능을 확인하였다. Polycan이 세포에 독성을 유발하지 않으면서 TNF- α 로 유도된 장염증 세포모델에서 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로를 저해시켜 IL-8 등 사이토카인과 염증인자들의 발현을 억제하는 효능을 가진다는 것을 입증하였다. 또, Loperamide로 유도한 변비 *in vivo* 모델에서는 Polycan이 변 수분함량을 유지시키고 변의 장내 이동능을 촉진시킴으로써 배변 활동을 원활하게 해 준다는 것을 증명하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, Polycan은 장 질환 예방 및 치료와 관련된 다양한 제품군에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

이 연구는 산업통상자원부, 한국산업기술진흥원(KIAT)의 “바이오활성제제 글로벌 경쟁력강화사업 (과제 번호:B0080207002074)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Park KY. Increased Health Functionality of Fermented Foods. *Food Industry and Nutrition*. 2012;17(1):1-8.
2. Lee JJ, Lee YM, Jung SK, Kim KY, Lee MY. Effects of dietary mulberry leaf on loperamide-induced constipation in rats. *Korean J Food Preserv*. 2008;15(2):280-287.
3. Kyung Bae Lee, A Ram Yu, In-Bong Song, Jeong Yong Park, and Min-Jung Bae. Role of Nutraceuticals in Gut Health. *Food Industry and Nutrition*. 2020;25(1):45-49.
4. Mizoguchi E, Low D, Ezaki Y, Okada T. Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models. *Intest Res*. 2020;18:151-167.
5. Jang BI, Lee SH. Update in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Korean Soc Coloproctol*. 2008;24:302-309.
6. Gilbert JA, Quinn RA, Debelius J, Xu ZZ, Morton J, Garg N, et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 2016;535:94-103.
7. Cumming JH. The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. Spiller GA, editors. *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. Boca Raton: CRC Press. 1993;263-349.
8. Xianli Wu and Alexander G. Schauss. Mitigation of Inflammation with Foods. *J. Agric. Food Chem*. 2012;60:6703-6717.
9. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The brain-gut-microbiome axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6:133-148.
10. Jeon HH, Park HJ. Diagnosis and treatment of constipation. *Korean J Med*. 2012;83(5):568-579.
11. A. Olajide, O. A., Sarker, S. D. Anti-inflammatory natural products. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2020;55:153-177
12. Chan GCF, Chan WK, Sze DMY. The effect of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*. 2009;2:1-11.
13. Song HS, Moon KY. In vitro antioxidant activity profiles of β -glucan isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Food Sci. Biotechnol*. 2006;15:437-440.
14. Novak M, Vetvicka V. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J Immunotoxicol*. 2008;5:47-57.
15. Seo HP, Kim JM, Shin HD, Kim TK, Chang HJ, Park BR, Lee JW. Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullulans* SM-2001. *Kor J Biotechnol Bioeng*. 2002;17:376-380.
16. Shin HD, Yang KJ, Park BR, Son CW, Jang HJ,

- Ku SK: Antiosteoporotic effect of polycan, beta-glucan from *Aureobasidium*, in ovariectomized osteoporotic mice. *Nutrition*. 2007; 23:853-860.
17. Song HB, Park DC, Do GM, et al.: Effect of exopolymers of *Aureobasidium pullulans* on improving osteoporosis induced in ovariectomized mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2006; 16:37-45.
18. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol*. 2009; 2:25
19. Kim JH, Kim KR, Jin HJ, Im SU, Song KB, Choi YH. The Effect of Polycan-Calcium Gluconate Complex on Inflammatory Mediators from Periodontitis Patients. *J Dent Hyg Sci*. 2014;14(2):223-229.
20. Do HJ, Kim Y-S, Oh TW. Effect of Polycan, a β -Glucan from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, on Inflammatory Response and Intestinal Barrier Function in DSS-Induced Ulcerative Colitis. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24:14773.
21. Ko G-P, Unno T, Kim Y-S, Kim J. Dietary Polycan, a β -glucan originating from *Aureobasidium pullulans* SM-2001, attenuates high-fat-diet-induced intestinal barrier damage in obese mice by modulating gut microbiota dysbiosis. *Food Sci Nutr*. 2024; 00:1-12.
22. Hwang SJ, Lim JM, Ku BH, Cheon DM, Jung YJ, Kim YS, et al. Effects of polysaccharide (polycan) derived from black yeast in dexamethasone-induced muscle atrophy cell model. *Herbal Formula Science*. 2021;29(1):45-55.
23. Lee HJ. Study on the mechanism of consumer decision-making for purchasing health functional foods in the post-COVID era: focusing on latent class analysis (LCA). *J. Korea Academia Industrial*. 2023;24(9):610-622.
24. Shimotoyodomo A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. Decreased colonic mucus in rats with loperamide induced constipation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Mol and Integr Physiol*. 2000;126(2):203-212.
25. Kyanko MV, Canel RS, Ludemann V. et al. β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Appl Biochem Microbiol*. 2013;49:41-45.
26. Ahmad A, Kaleem M. β -Glucan as a Food Ingredient. In: Grumezescu AM, Holban AM. *Biopolymers for Food Design*. 1st ed. Amsterdam:Elsevier. 2018:351-381.
27. Tejinder S, Bhupinder K, Harinder K. Flow behavior and functional properties of barley and oat water-soluble β -D-glucan rich extractions. *Int. J. Food Prop*. 2000;3:259-274.
28. Kaur R, Sharma M, Ji D, Xu M, Agyei D. Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan. *Fibers*. 2020;8:1.