

발간 등록번호

11-1543000-000504-01

전통발효식초 기능성 규명 연구

A Study on Functional Identification from
Traditional Fermented Vinegar

농림수산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통발효식초 기능성 규명 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2014년 8월 9일

경 기 대 학 교

연 구 진

연구기관명 : 경기대학교

연구책임자 : 신 광 순

연구보조원 : 조 선 영

연구보조원 : 박 혜 령

연구보조원 : 김 동 수

연구보조원 : 이 수 정

연구기관명 : 샘표식품(주)

책임연구원 : 허 병 석

연 구 원 : 이 대 희

연 구 원 : 박 정 희

연 구 원 : 김 경 옥

연 구 원 : 조 동 운

연 구 원 : 전 중 은

연 구 원 : 김 선 진

연 구 원 : 엄 햇 님

연 구 원 : 백 은 중

연구기관명 : 이화여자대학교

책임연구원 : 김 주 희

연 구 원 : 도 경 민

연구보조원 : 박 민 영

연구보조원 : 이 효 진

연구보조원 : 이 혜 민

연구보조원 : 김 유 진

연구보조원 : 권 보 라

연구보조원 : 진 보 라

연구보조원 : 안 영 숙

연구보조원 : Gereamanuel Meron-Regu

요 약 문

I. 제 목 : 전통발효식초 기능성 규명 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식초라 함은 곡류, 과실류, 주류 등을 주원료로 하여 발효시켜 제조하거나 이에 곡물당화액, 과실착즙액 등을 혼합, 숙성하여 만든 발효식초와 빙초산 또는 초산을 먹는 물로 희석하여 만든 합성식초를 말함.
- 식초는 소량의 휘발성 및 비휘발성 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 방향과 신맛을 가진 동서양의 대표적인 발효식품임. 식물성 원료를 효모로 알코올 발효시킨 다음, 초산균으로 초산 발효를 하여 제조한 것으로 산미료 외에도 식품 보존효과와 의약품으로 이용되고 있음. 우리나라는 오래전부터 발효식초를 이용하여 다양한 형태의 음식에 맛과 보존성을 높이는 데 이용하여 왔음.
- 발효식품은 미생물의 발효작용으로 성분이 분해되고 새롭게 합성되어 독특한 풍미를 갖게 된 식품을 총칭하는 것으로 영양가와 저장성이 높아짐. 알코올발효, 젖산발효, 초산발효, 단백질 및 당질의 분해 등을 이용하여 새로운 맛으로 창조된 식품임.
- 식초발효에 사용되는 중요한 미생물인 자낭균류에 속하는 *Aspergillus*, 즉 누룩곰팡이속은 예부터 된장, 간장, 약주, 탁주, 감주 등의 양조공업에 널리 사용되는 곰팡이들임. 균총의 색깔은 백색, 황색, 녹색, 흑색 등으로 다양하기 때문에 백국균, 황국균, 흑국균 등으로 색을 중심으로 분류하기도 함. *Aspergillus*에 속하는 곰팡이들은 각종 다양한 효소들을 생성하는데 특히 전분 당화력과 단백질 분해력이 뛰어난 효소들을 생성하는데, *Aspergillus oryzae*는 누룩 곰팡이의 대표격으로 단백질 분해능과 전분 당화력이 뛰어나서 식초제조를 비롯한 다양한 양조공업에 많이 이용되어 왔음.
- 한편, 식초발효에서 가장 중요한 역할을 하는 초산균(acetic acid bacteria)은 그 종류에 따라 생성하는 acetic acid의 함량이 다르며 총산 함량을 좌우하는 식초품질판정의 지표로 이용되어 매우 중요하다 할 수 있음. 초산균은 당과 알코올을 초산으로 산화시킬 수 있는 능력에 따라 초산과 젖산을 재산화시킬 수 있는 *Acetobacter*속과 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 *Gluconobacter*속 두 종류로 분류되어 왔으나 최근 Yamada와 Kondo에 의해 새로운 아속인 *Gluconacetobacter*속을 밝힌 바 있음. 지금까지 알려진 대표적인 종들로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum*, *A. hansenii* 및 *A. methanolicus* 등이 있음.
- 최근에는 우리 발효식품에 대한 유용한 물질 탐색 및 발효 대사의 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 면역 활성화, 고혈압 억제, 세포 증식 촉진, 항종양 활성, 혈당 강하 작용, 콜레스테롤 저하, 혈전 용해 효소 작용, 항암 효과, 항비만, 생균제 등으로 생활습관병 예방 및 건강에 긍정적인 효과를 입증하고 있음.
- 영양학적으로 우수한 우리 농산물을 주원료로 하여 미생물 발효과정을 거치므로, 우리 전통 발효식초의 우수성은

1. 영양성분이 풍부한 원료인 감, 현미, 사과에서 오는 당질, 단백질, 식이섬유(펙틴질 등), 비타민, 무기질 및 미량 원소(polyphenols 등)
 2. 발효과정에 필요한 발효 미생물과 그 균체(β -glucan 등), 발효 과정을 통한 대사산물
 3. 발효과정을 통해 분해되어 생성된 아미노산펩타이드, 폴리사카라이드 등이 다량 함유되어 있어 건강 증진에 유익할 것으로 기대됨.
- 식초의 주요 성분은 초산으로 그 기능성이 다양하게 보고되었으나, 감식초, 쌀식초(米醋) 등 발효과정을 거친 전통식초와 초산을 비교하는 연구들이 일부 진행되었으며, 그 기능이 우수함이 보고되었음.
 - 식품이 섭취되면 장관에서 흡수되어 유용 성분이 간에서 대사되어짐. 따라서 직접적으로 흡수, 대사되는 간과 장관은 식품의 체내 효율에 중요한 역할을 하며, 간과 장관의 건강이 곧 신체의 건강으로 직접적인 연관이 있음. 전통발효식초가 왜 우수한지 명확한 기전 연구에 대해서는 미흡하며 특히 간과 장관면역증진에 대해 발효식초가 지니는 우수성에 대한 연구가 부족한 실정임.
 - 따라서 우리나라 전통 발효식초의 제조과정의 우수성과 건강증진효과를 과학적으로 규명하여 국민 건강에 기여하고 한식의 과학성과 우수성을 알려 세계적으로 발전시키고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 연구목표:
 - 전통발효식초의 간 보호 효과 및 장관면역 기능성에 대한 과학적 평가 및 핵심 물질 규명
- 연구내용:
 1. 전통발효식초의 공시시료 선정
 - 전통발효식초의 이화학적 분석을 통한 시료 선정
 - 해외 유명 식초와 비교
 2. 전통발효식초의 기능성 성분 분획법 수립
 - 전통발효식초의 특성에 따른 분획으로 기능성 성분 분획법 수립, 분획물 확보
 3. 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가
 - 전통발효식초의 장관면역 활성 기작 규명 (*in vitro*)
 - *in vivo* 및 *ex vivo* 실험 통한 장관면역 기능성 검증
 - Inflammatory bowel disease(IBD) 모델에서 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가 (*in vivo*)
 - 전통발효식초의 장관면역 기능 물질 및 메카니즘 규명
 4. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가
 - 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vitro*)
 - 알코올 스트레스에 대한 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vivo*)

- 전통발효 식초의 분획물의 간 보호 효과 평가 (*in vitro*, *in vivo*)를 통한 간 보호 기능 물질 및 메카니즘 규명

IV. 연구개발결과

1. 전통발효식초 시료 선정

▪ 전통발효식초의 이화학적 특성

- 공시시료 선정을 위해 시중에 판매되는 식초를 대상으로 주정초가 아니며 원료를 100% 포함하는 국내산 전통발효식초 및 대조군으로 해외산 식초를 수거하였다.
- 수거한 시판 식초(국내식초 6종, 해외식초 5종)의 이화학적 특성(총 산도, 아세트산, 아세트산 순도, TN, 총 아미노산, 유리아미노산, 총 폴리페놀, Crude polysaccharide)을 비교 분석하여 국내산 식초 4종(사과식초, 감식초, 와인식초, 현미식초), 해외산 식초 2종(현미식초, 와인식초)를 1차적으로 선별하였다.
- 국내산 식초와 해외산 식초의 이화학적 특성 비교 결과, 국내산 식초는 해외산 식초보다 acetic acid의 순도가 약 3~5% 가량 낮았으며, 발효 과정 중 단백질이 아미노산화로 진행된 것을 확인할 수 있었음. 국내산 식초에서 crude polysaccharide의 함량이 월등히 높게 나타났다.

▪ 전통발효식초로부터 폴리사카라이드의 분리 및 화학적 특성

- 국내산 전통발효식초 4종 [사과식초(KAV-0), 와인식초(KWV-0), 현미식초(KBV-0), 감식초(KPV-0)]와 해외산 발효식초 2종[영국와인식초(UWV-0), 일본현미식초(JBV-0)]로부터 다당을 분리하여 다당 시료의 수율, 화학특성 및 면역활성을 비교 검토한 결과 활성 및 수율이 우수한 3개 다당(KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)을 선정할 수 있었으며, 이들을 대량 조제하여 제반 화학특성 특성을 규명한 결과 국내 및 일본산 현미식초 유래 다당 KBV-0, JBV-0는 발효 미생물 유래 mannan을 주성분으로 함유하고 있었으며 국내산 감식초 유래 KPV-0는 발효 원재료인 감 유래 pectin을 주성분으로 함유함이 확인되었다.

2. 전통발효식초의 기능성 성분 분획법 수립

▪ 간보호 및 장관면역 기능성분 분리 및 대량 분리법 확립 및 유효성분 분석

- 전통발효식초 중 국내산 감식초 및 국내산 현미식초에서 기능성 성분의 분리를 위하여 에탄올 침전법을 적용하여 분획을 실시하여 각 샘플별로 3가지의 샘플을 제조하였다. 국내산 감식초 및 국내산 현미식초를 각각 25kg를 이용하여 에탄올 침전법으로 대량으로 분리하였다. 증발농축기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 에탄올을 1:3 비율로 첨가하여 20시간 저온침전시킨 후 동결건조를 거쳐 대량의 식초 샘플을 제조하여, 일반성분 분석, 지표물질 분석, *in vitro*, *in vivo* 실험에 사용하였다. 국내산 현미식초 농축액의 조단백질함량은 17%, 국내산 감식초 농축액의 조단백질함량은 2.4%로써, 7배 이상 국내산 현미식초의 조단백질함량이 높은 것으로 조사되었다. 분획물에 따른 총아미노산의 프로파일은 일반성분의 조단백질함량과 유사한 경향을 보여주었다. 국내산 현미식초초농축액이 감식

초 농축액보다 9배 이상 많은 총아미노산 함량을 보여주었다. 모든 분획에서 가장 함량이 높은 아미노산은 glutamic acid로 조사되었다. 국내산 현미식초 및 감식초에 공통적으로 포함된 유기산은 citric acid, acetic acid, lactic acid, pyroglutamic acid로 조사되었다. 곡류보다 유기산 함량이 높은 감은 유기산 분석에서 보듯이 단백질에서 기인한 아미노산인 glutamic acid의 발효로 생성된 pyroglutamic acid를 제외한 모든 유기산이 감식초 분획물에서 많았다. 식초의 기능성 지표물질인 ferulic acid 분석 결과, 감식초에서는 항산화 물질의 대표적인 ferulic acid가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 국내산 현미식초에는 유리형의 형태보다는 수용성 식이섬유에 결합된 bound form으로 ferulic acid가 존재함이 밝혀졌으며, 47.5(ug/g)의 함량으로 조사되었다. 또한, UPLC-QTOF-MS를 이용한 식초의 기타 항산화 물질 정성 및 정량 결과, 국내산 감식초에서 발견되는 항산화 phenolic acid는 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 총 3가지가 발견되었으며, 국내산 현미식초의 경우 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 이외에 sinapic acid, vanillic acid가 추가적으로 발견되어 총 5가지의 phenolic acid가 포함되어 있는 것으로 분석되었다.

3. 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가

▪ 전통발효식초의 장관면역 활성 기작 규명 (*in vitro*) 규명

- 전통발효식초 유래 3종의 다당 시료(KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)는 생체 초기방어에 중요 역할을 담당하는 보체계에 대하여 높은 항보체 활성을 농도의존적으로 보였으며 특히 가장 높은 활성을 보인 KPV-0는 고전경로와 부경로를 거쳐 보체계를 활성화 하는 것으로 확인되었다.
- KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 mouse 복강 macrophage, Raw 264.7 cell, Caco-2 cell에 대해 특별한 세포독성은 나타내지 않았으나 대식세포를 자극하여 NO, IL-6, IL-12, TNF- α 등의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며 감식초 유래 KPV-0의 활성이 상대적으로 가장 양호한 것으로 나타났다 (mRNA level 포함).
- 감식초 유래 KPV-0는 대식세포의 탐식작용에 있어 중요한 역할을 담당하고 있으며 체내 immune complex 제거를 책임지는 FcRII 발현을 촉진하였다.
- KBV-0 및 KPV-0는 장관면역 Peyer's patch cell을 자극하여 IL-6 생산을 촉진시키고 이들 세포를 경유 골수세포 증식능을 보였으며, 특히 감식초 유래 KPV-0의 활성이 상대적으로 우수한 것으로 평가되었다.
- KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 Peyer's patch 내 T_{reg} 세포를 활성화하여 자극하여 TGF- β 의 생합성을 촉진하고 IgA의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며, 그 활성은 KPV-0가 가장 우수하였다.
- Transwell®이 장착된 배양기를 이용한 실험에서 KPV-0는 장관상피세포를 통과하여 면역세포에 작용할 수 있음이 확인되었다.

▪ 전통발효식초의 장관면역 활성 다당의 정제 및 구조화학적 특성 규명

- KBV-0 및 KPV-0는 각각 면역활성에 관여하는 성분의 구조화학적 특성을 규명하고자 분자량이 상이한 3개획분 KBV-I, KBV-II, KBV-III 및 KPV-I, KPV-II, KPV-III의 가

각 3개획분으로 분획하였다.

- 현미발효 식초 유래 정제 다당획분인 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III는 각각 분자량 60 kDa, 10 kDa, 3 kDa의 다당체임이 확인되었으며, 감식초 유래 정제 다당획분인 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III 획분은 각각 분자량 60 kDa, 10 kDa, 5 kDa의 다당체임을 확인하였다.
- 현미식초 유래 정제다당에는 arabino- β -3,6-galactan 구조를 거의 포함하고 있지 않음을 확인할 수 있었지만, 감식초 유래 고분자 다당획분인 KPV-I은 arabino- β -3,6-galactan 구조를 side chain으로 하는 RG-I 구조로 존재함을 추론하였다.
- 모든 정제 획분들은 모두 Balb/c 마우스로부터 유래한 복강 마크로파지와 마우스 유래 마크로파지 세포주인 RAW 264.7 세포, 그리고 인간의 장 상피세포주인 Caco-2 세포주에 대한 독성은 나타내지 않았으며, KPV-I은 Balb/c에서 유래한 복강 마크로파지로부터 생산해내는 IL-6, IL-12, TNF- α 및 NO의 생성을 다른 획분들에 비해 유의적으로 높게 증가시키는 활성을 나타내었다.
- 구성당과 methylation 분석을 통해 면역활성 정제 다당획분 KBV-I은 하나의 단일 다당이 아니라 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었는데, 약 60%이상의 가장 높은 비율로 존재하는 mannan과 약 30%의 비율을 차지하는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan I (RG-I), 그리고 10% 미만으로 존재하는 glucan 이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었다.
- 일반적으로 arabinogalactan은 고등식물에서 주로 발견되는 다당류의 일종으로, 구조적 특성에 따라 I형, II형, 및 기타형으로 구분되는데, 특히 KBV-I 중 rhamnogalacturonan-I은 arabinan, galactan 또는 arabinogalactan의 측쇄가 연결된 형태로, 이들이 면역활성에 중요 역할을 수행할 것으로 추정되었으며, 현미발효 식초 중에 존재하는 활성 다당 KBV-I은 현미의 pectin이 발효과정 중에 HG region이 분해되어 분리된 RG-I 임을 최종 확인할 수 있었다.
- 따라서 현미발효 식초의 면역활성의 주요 다당인 KBV-I은 원재료인 현미의 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 RG-I과 발효 초기 알코올 발효를 담당했던 효모의 세포벽 유래의 mannan으로 구성되어 있음을 최종 결론 지을 수 있었다.
- 국내산 감식초 유래 면역활성 다당획분인 KPV-I도 당 조성 및 당쇄의 특성으로 미루어 단일 다당이 아니라 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었는데, 약 70%의 가장 높은 비율로 존재하는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan I (RG-I), 약 20%의 비율을 차지하는 mannan과 10% 정도로 존재하는 glucan이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었다.
- KPV-I의 구성 다당 RG-I의 존재는 다양한 결합의 arabinose, rhamnose 및 galactose 잔기로부터 추정할 수 있었는데, KPV-I 중 RG-I은 arabinan, galactan 또는 arabino-3,6-galactan의 측쇄가 연결된 형태로, 이들이 면역활성에 중요 역할을 수행할 것으로 추정되었다.
- 감식초의 면역활성의 주요 다당인 KPV-I은 원재료인 감 중에 존재하는 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 RG-I이 주요 활성 성분이며, 알코올 발효를 담당했던 효모의 세포벽 유래의 mannan이 활성 다당으로 구성되어 있음을 최종 확인할 수 있었다.

었다.

▪ **장관면역 활성화 다당의 지표 구성당 및 함량 설정**

- 전통 발효식초 유래 다당체에 대한 지표성분을 분석하기 위해 구성당 및 함량분석을 실시한 결과, KBV-0에 대한 당의 함량을 실제값으로 환산한 결과 62.9%를 총당으로 포함하는 물질로 분석되었으며, 주요한 구성당으로는 36%의 Glc와 13.7%의 Man를 주로 함유하는 것으로 나타났으므로, KBV-0를 산업화에 응용하기 위해서는 지표성분으로 yeast의 세포벽 구성성분인 mannan에서 유래되는 것으로 예상되는 Man의 함량을 10% 이상으로 설정하는 것이 적절하다고 판단되었다.
- KPV-0의 구성당 및 함량분석에서 KPV-0는 총당 함량에서는 61.5%로 KBV-0와 유사했지만 구성당에서 Man를 비롯하여 Ara, Gal, Glc, Xyl, Rha(각각 15.6, 12.5, 10.4, 9.9, 6.3, 6.2%)를 골고루 포함하는 다당체로 분석되었다. 따라서 KPV-0를 산업화에 응용하기 위해서는 지표성분으로 원료인 감에서 유래된 RG-I의 side chain인 arbinogalactan의 구성요소인 Ara와 Gal를 각각 9% 및 8% 이상으로 설정하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

▪ **전통발효식초 유래 다당의 경구투여에 의해 유도된 장관면역계 활성화 평가 (*in vivo*)**

- 지금까지의 실험 (*in vitro*)을 통해 활성이 입증된 전통 발효식초 유래 다당소제가 경구투여에 미치는 장관면역 활성화에 대한 가능성을 타진하고자 본 실험에서는 마우스를 이용하여 확인하고자 하였다. 즉, 전통 현미식초 유래 조다당획분 (KBV-0)과 감식초 유래 조다당획분 (KPV-0)을 각각 50, 500, 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도로 6주령의 C3H/HeN 마우스에 1일 1회 총 20일간 투여하였으며, 투여가 종료된 후 장관면역계에 관련된 중요한 항체인 IgA 및 관련된 사이토카인 (GM-CSF, TGF- β 및 IL-6)을 각각 Peyer's patch 세포, 혈청, 장관내액 및 분변에서 측정하여 그 영향을 분석하고 하였다.
- IgA는 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있는 장관면역에서 중추적인 역할을 하는 항체로, KBV-0와 KPV-0를 농도별로 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 생산되는 IgA를 비롯하여 관련된 cytokine의 함량을 측정할 결과, 두 종류의 시료에서 모두 농도의존적인 IgA 분비능을 나타내었으며, 특히 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0은 시료농도 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서는 현미발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0와 비슷한 활성을 나타내었으나, 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도에서는 유의적으로 높은 IgA 분비능을 나타내었다.
- 또한, 대식세포, T 세포, 비만세포, 자연살해 세포 등에서 발생시켜 백혈구의 성장인자로 작용하며, 줄기세포가 과립구(호중구, 호염기구, 호산구)와 단핵구를 생산하도록 자극하는 GM-CSF의 경우, KBV-0를 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 발생하는 GM-CSF는 시료농도 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 NC의 1.6배의 유의적인 활성을 나타내었으나, KPV-0는 동일농도에서 NC의 5.3배로 유의적으로 월등히 높은 생성능을 나타내었다.
- 장관면역에서 TGF- β 의 생성은 IL-6와 같은 선천면역반응에서 생산되는 사이토카인과 함께 IL-17을 분비하는 CD4⁺ T 세포의 항염증성 아집단의 분화를 촉진하며, B 세포의 IgA형으로 전환을 유도하여 IgA 항체의 생산을 자극하는 주요한 사이토카인으로 알려져

있는 TGF- β 는 사이토카인의 생산이 촉진되고, 이들이 B 세포를 선택적으로 자극하여 점막 면역과 관련된 IgA 항체의 생성이 증가하게 되는데, KBV-0 및 KPV-0를 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 유도하는 TGF- β 의 생성능은 KBV-0에서 시료농도 500~5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서 NC 대비 1.3~1.5배의 활성을 나타내었어 KPV-0보다는 TGF- β 에 대한 자극능은 더 우수한 것으로 나타났다.

- KBV-0 및 KPV-0를 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 유도하는 IL-6의 생성능을 측정된 결과, 두가지 시료에서 모두 유의적으로 농도의존적인 활성의 증가를 나타내었으나 시료농도 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서 KPV-0가 NC 대비 2.2배의 분비능을 나타내어 KBV-0에 비해 더 우수한 분비능을 유도하는 것으로 확인되었다. Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성이 되어져 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데 IL-6는 이때 골수의 증식에 관여를 하는 사이토카인으로 전신면역으로 확대가 일어나게 된다고 알려져 있다.
- KBV-0 및 KPV-0의 경구투여한 마우스의 장관내액 및 분변 중에 존재하는 잔여 IgA를 측정된 결과, 두 종류의 시료에서 모두 IgA의 함량을 농도의존적으로 증가하였으며, 특히 KPV-0를 경구투여한 군에서 KBV-0에 비해 상대적으로 높은 IgA 생산량을 나타내었다.
- 한편, 혈액으로 순환하는 사이토카인인 IL-6와 GM-CSF의 양을 확인한 결과, GM-CSF는 과립구의 증식과 생성뿐만 아니라 성숙 과립구의 강력한 활성인자로 작용하는 가장 중요한 사이토카인이며, 각각에 대한 특이세포 표면수용체에 결합함으로써 생리학적 효과를 나타내는데, 전통 발효식초 유래 조다당획분 2종 (KBV-0 및 KPV-0)의 경구 투여에 의한 혈액 중 GM-CSF와 IL-6의 생성증가는 모두 무투여 대조군 (NC)과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 못하는 것으로 나타났다.
- 지금까지 현미발효 식초 및 감식초 유래 조다당획분의 경구투여에 의한 장관면역계의 영향에 대한 결과를 종합해볼 때, 현미발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0와 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0는 모두 경구투여로 인해 마우스의 장관면역계를 자극함으로써 Peyer's patch 세포의 IgA 및 관련 사이토카인의 생성을 농도의존적인 경향으로 증가시켰음을 알 수 있었으며 효과는 KPV-0에서 더욱 우수하였다. 더욱이 IgA의 분비와 관련된 사이토카인인 GM-CSF 및 IL-6의 생성 역시 모두 KBV-0에 비해 상대적으로 KPV-0에서 더 우수한 활성을 나타내었으며, 대체적으로 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 이상에서 유의적인 차이를 나타내었음을 확인하였다. 그러나 TGF- β 는 KPV-0보다 KBV-0에서 투여농도 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서 더 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.
- 또한, 전통 발효식초 유래 조다당획분의 경구 투여에 의해 활성화된 Peyer's patch 세포로부터 IgA 생성능이 증가시켜 장관 내로의 IgA 분비를 촉진시킬 수 있음이 추가적으로 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 전통 발효식초의 식이를 통한 섭취는 장내의 면역체계를 활성화시켜 IgA 분비를 촉진킴으로서 장내로 유입된 각종 항원을 신속하게 제거하는데 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 활성은 현미발효 식초보다는 감식초에서 유래한 다당이 더욱 효과적일 것으로 판단되며, 추후 장내 건강에 도움을 줄 수 있는 식품 또는 장관면역 증진용 의약품 소재로서의 활용도 충분히 가능할 것으로 사료된다.

4. 전통발효식초의 장관면역계 효능(면역관용) 평가

- 감식초 농축액 (PV) 및 현미식초 농축액 (UV)의 장관 면역에 대한 효능을 DSS를 9일간 제공한 동물 모델을 통해 규명하였다. 수컷 C57BL/J (6주령)를 23일간 매일 PV 및 UV를 각 200 mg/kg B.W 혹은 400 mg/kg B.W 을 경구투여 하였으며, 시험 시작 후 2주 뒤부터 DSS를 식수에 혼합하여 제공함으로써 장관 면역을 약화시켰다.
- 9일 간의 DSS 섭취 기간 동안 DAI 측정 결과 DSS군에 비하여 감식초 농축액 저용량군 (DPL)에서 감소하는 경향을 보였다. Colon 조직의 형태학적 분석에서 pathological score 가 DSS군과 비교하여 감식초 농축액 고용량군 (DPH)에서 DSS군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 염증, 세포사 및 재생에서도 유의적인 효과를 관찰할 수 있었다.
- 이에 따라 Quantitative real-time-transcription polymerase chain reaction을 이용하여 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 TNF- α , IL-6, 및 IL-1 β 의 발현 정도를 측정하고, I κ B 및 NF κ B를 측정하였으며, 세포 증식 및 세포사에 대한 효과를 확인하고자 기전 인자인 b-catenin, c-myc 및 cyclin d 그리고 caspase-3 및 caspase-9의 발현 정도를 측정하였다. 유신 분비를 관여하는 MUC2의 발현 정도를 측정한 결과 TNF- α 에서 DSS군이 증가하는 경향을 보였으며, DSS군과 비교하여 DPL군이 감소하는 경향을 보였다.
- 결론적으로, 9일 간의 4% DSS는 colon에 세포사 및 염증 인자의 생성을 촉진시키고 이로 인해 정상 대조군에 비하여 몸무게 및 장기 무게의 유의적인 차이를 보임을 확인하였으며, 이에 대해 감식초 농축액이 염증 사이토카인 유전자 발현을 약화시키며, 세포 증식의 조절 인자의 발현 조절 가능성이 있을 것으로 사료된다.

5. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가

▪ 전통발효식초의 간 보호 효과 (*in vitro*) 평가

- 생체 내에서 생성되는 활성산소는 인체의 노화와 질병을 유발하는 주요 원인으로 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있음. 대표적인 활성산소 유도물질인 ethanol을 처리하여 산화된 간세포에 전통발효식초를 처리함으로써 산화방어기전과 관계된 효소들의 mRNA 발현과 활성을 확인하였다. 국내산 현미식초 및 국내산 감식초는 ethanol로 인해 감소한 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 유의적으로 증가시킴으로써 항산화 활성을 증가시켰으며, 각각의 분획물들에서도 같은 결과를 얻었다.

▪ 전통발효식초의 간 보호 효과 (*in vivo*) 평가

- 수컷 Wistar Rat에 16일간 강제 경구투여로 50%(v/v) 에탄올을 제공하여 간 손상을 유도하였으며, 동시에 전통발효식초를 경구투여 하여, 알코올성 간 손상에 대한 전통발효식초의 효능을 확인하였다.
- 간 손상 지표인 serum AST, ALT 수준이 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 감소하는 경향을 보였다. 특히, 국내산 감식초 군에서의 감소폭이 가장 컸다.
- 간 조직 알코올 대사 관련하여 간 조직 cytosol 분획에서의 ADH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였다. 간 조직 mitochondria 분획에서의 ALDH활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초군과 국내산 감식초 군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 일본산

현미식초군의 수준은 에탄올 대조군의 활성과 차이를 보이지 않았다.

- 간 조직 및 적혈구 항산화 대사관련하여, 간 SOD 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초군의 그 수준이 유의적으로 증가하였으나, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초와 일본산 현미식초군의 활성의 차이는 보이지 않았다. 적혈구 CAT 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 군의 활성은 감소하는 경향을 보였다. Plasma MDA는 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서 수준이 감소하는 경향을 보였다.
- 감식초 농축액 (PT) 및 감식초를 에탄올 침전법으로 분획한 에탄올 불용성 분획물 (PI) 및 에탄올 가용성 분획물(PS)의 알코올 스트레스에 대한 간 내 항염증 및 알코올 대사에 대한 효능을 알코올을 4주간 1일 1회 경구 투여한 동물 모델을 통해 규명하였다.
- 간 조직의 형태학적 분석에서 에탄올 대조군(ET)과 비교하여 감식초 농축액 및 에탄올 불/가용성 분획물 투여군에서 간 조직 내 지방의 크기가 작고 분포가 적은 것으로 확인되었다.
- 간 조직에서 알코올 스트레스에 대한 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 qPCR을 이용하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 β , TLR 4, CD14, MCP-1, MIP-2, COX-2의 발현 정도를 측정된 결과 염증성 사이토카인인 IL-1 β 에서 PI 및 PS군에서 ET군과 비교하여 그 발현이 유의적으로 감소하였으며, IL-12 β 에서 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 유의적으로 감소하였다. COX-2의 발현 역시 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 현저하게 감소하였다. 또한, 에탄올에 의한 LPS 자극으로 유도되는 TLR4 수용체의 발현 역시 ET군에 비하여 PI 및 PS군에서 유의적인 감소를 보였다.
- 간 내 에탄올 대사과정의 주요 효소인 CYP2E1의 단백질 발현을 측정된 결과, ET군이 NC군에 비해 발현이 유의적으로 증가하였고, PT군의 발현이 PI와 PS를 투여한 군에 비하여 CYP2E1의 발현이 유의적으로 감소됨을 확인하였다.
- 결론적으로 4주간의 에탄올 경구투여는 알코올 대사 효소의 발현 증가와 간 내 염증성 사이토카인 및 염증 인자의 생성을 촉진하였으며, 이에 대해 감식초 농축액 및 그 분획물의 투여가 에탄올 섭취로 유도되는 LPS/ TLR4 신호 매개 전달 경로와 관련된 염증성 사이토카인 및 관련 인자를 조절함으로써 면역 기전 조절의 가능성이 있을 것으로 사료된다. 더욱이 감식초 농축액 (PT)의 투여는 에탄올 대사과정에 있어 주요 효소로 작용하는 CYP2E1의 단백질 발현을 억제하였으므로 알코올 대사 효율에 있어 감식초의 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

▪ 학술발표 4건

- 2013년 한식세계화 심포지엄(2013.05.15., 경기대 신광순 교수)
 - 전통발효식초 기능성 규명 연구
- 2013년 한국영양학회 추계학술대회 및 제48회 정기총회(13.11.08., 이화여대 이혜민)
 - Persimmon vinegar extract protects alcohol-induced hepatic inflammatory damage in Wistar rats
- 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN(13.11.14, 경기대)

- Intestinal immune system modulating activities of polysaccharides from Korean traditional vinegars manufactured with different raw materials
- 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (13.08.29, 경기대)
- Characteristics and immuno-stimulating activities of P/S from Korean Traditional Vinegars

- **홍보, 전시회 참여 2건**
 - 2012년도 생명산업과학기술대전 (12.09.20.~22., 샘표식품(주))
 - 2013년도 생명산업과학기술대전 (13.09.26.~28., 샘표식품(주))

- **학술논문 5건**
 - Chemical characteristics and immuno-stimulating activity of the polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials (한국식품영양과학회 투고완료, 2014년 43권)
 - Characterization of RAW 264.7 cells stimulating polysaccharides from brown rice and persimmon vinegars (2014년 9월중으로 한국식품영양학회지 투고 예정)
 - Effect of oral administration of polysaccharide isolated from Korean black vinegar on intestinal immune system (2014년 9월중으로 Food Chemistry 투고 예정)
 - Structural characterization of immuno-stimulating polysaccharide purified from Korean persimmon vinegar (작성 중, 2014년 10월중으로 투고예정)
 - Modulatory effects of persimmon vinegar and its fractions on ethanol-induced hepatic inflammatory stress and CYP2E1 expressions in rats (투고예정, 작성 중)

SUMMARY

1. Selection of physiologically active sample from traditional fermented vinegars

▪ Physicochemical properties of traditional fermented vinegars

In order to select experimental samples, we collected vinegars in commercial markets, not spirit vinegars but traditional fermented vinegars. We analyzed physicochemical properties (total acidity, acetic acid concentration, total nitrogen, total amino acid, free amino acid, total polyphenol, crude polysaccharide) of collected vinegars (6 samples of domestic vinegars and 5 samples of abroad vinegars) Among them, 4 samples (apple vinegar, persimmon vinegar, brown rice vinegar, wine vinegar) of domestic vinegars and 2 samples (brown rice vinegar, wine vinegar) of abroad vinegars were selected for the further studies. The purity of acetic acid of Domestic vinegars are 3~5% lower than abroad vinegars' and the contents of crude polysaccharide of domestic vinegars are higher than abroad vinegars'.

▪ Isolation and chemical properties of the polysaccharide from traditional fermented vinegars

In order to elucidate the intestinal immune-system modulating activity of traditional fermented vinegar, 6 kinds of crude polysaccharides (CP) were isolated from traditional fermented vinegars in domestic or foreign origins, and then their chemical properties and several immuno-stimulating activities were evaluated. Three kinds of crude polysaccharide fractions prepared from Korean traditional brown rice vinegar (Korean black vinegar, KBV-0), Japanese brown rice vinegar (Japanese black vinegar, JBV-0) and Korean persimmon vinegar (KPV-0) showed higher yields and cytokine producing activities on macrophages than other traditional fermented vinegars. Both KBV-0 and JBV-0 had a similar sugar composition (mannose and glucose), but not similar contents of them. KPV-0 was obtained as a higher arabinose and rhamnose contents than KBV-0 or JBV-0.

2. Isolation method of functional ingredients from traditional fermented vinegars

In order to scrutinize of functional ingredients in vinegars, sample was extracted through this steps. Each sample, which was Korean persimmon vinegar and Korean brown rice vinegar, was extracted for 24h under room temperature by using 75% of ethanol then took only precipitation, it made solid substance by using evaporator and freezing dryer. Total protein of brown rice vinegar concentrate is 7 times higher than persimmon vinegar concentrate's, total protein of brown rice vinegar concentrate is 17%, and total protein of persimmon vinegar concentrate is 2.4%. Total amino acid of brown rice vinegar concentrate

is 9 times higher than persimmon vinegar concentrate's. The 2 types of vinegar contain citric acid, lactic acid, pyroglutamic acid. Particularly, the brown rice vinegar has bound form of ferulic acid and the concentration is 47.5µg/g.

The reactive oxygen species is known as main cause of aging and some kind of diseases in human body. So that reasons, we had test the effect of anti-oxidant activity of Korean brown rice vinegar and Korean persimmon vinegar into ethanol-treated hepatic cells. In this research, Korean brown rice vinegar and Korean persimmon vinegar are verified that has anti-oxidant activity. The superoxide dismutase is slightly increased in damaged hepatic cells.

3. Estimation for intestinal immune-modulating activity of traditional fermented vinegars

▪ Elucidation of active modes of intestinal immune-modulating polysaccharides from traditional fermented vinegars (*in vitro*)

Various immuno-stimulating activities of KBV-0, KPV-0 and JBV-0 were estimated. Anti-complementary activities of KBV-0, KPV-0 and JBV-0 were increased dose-dependently but KBV-0 and KPV-0 showed higher anti-complement activity (62 and 65% of DIW control) than JBV-0 at 1,000 µg/mL. Results obtained by crossed immunoelectrophoresis using anti-human C3 and anti-complementary activity in the absence of Ca⁺⁺ ion suggested complement activation by KPV-0 is *via* both classical and alternative pathways. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, KBV-0, KPV-0 and JBV-0 did not affect the growth of peritoneal macrophages, RAW 264.7 cells and Caco-2 cells. KBV-0, KPV-0 and JBV-0 significantly augmented the production of nitric oxide (NO), IL-6, IL-12 and TNF-α in a dose dependent manner as well as their mRNA expressions. However the activity of KPV-0 was the most potent in the tested polysaccharides. In order to assess phagocytosis activity, the effects of vinegar polysaccharides on mRNA expression of Fc receptor II (FcRII) was also determined by PCR products. Only KPV-0 showed enhanced expression of mRNA expression for FcRII by dose dependent manner whereas KBV-0 and JBV-0 did not affect the FcRII expression. In an *in vitro* assay for intestinal immune modulating activity, KBV-0, KPV-0 and JBV-0 augmented bone marrow cell proliferation through Peyer's patch and the production of IgA and TGF-β by Peyer's patch cells in a dose-dependent manner. However the activity of KPV-0 was more potent.

▪ Purification of intestinal immune-modulating polysaccharides from traditional fermented vinegars and their chemical and structural characterization

On the other hands, to identify and characterize the immunomodulating ingredient of KBV-0 and KPV-0, they were further fractionated by Sephadex G-75 gel filtration chromatography. Three polysaccharide fractions (KBV-I, II and III) with different MWs were obtained from the crude polysacchride (KBV-0), and KPV-I, II and III were from

KPV-0. The high molecular weight polysaccharide fraction, KBV-I was estimated as 60 kDa of MW and it mainly consisted of neutral sugar (96.9%) such as mannose (58.4%), galactose (12.1%) and Glc (13.3%). KPV-I was estimated as 60 kDa polysaccharide that consisted of neutral sugar (85.4%) such as arabinose (31.7%), mannose (19.6%) and galactose (15.2%), and uronic acid (14.6%). KBV-I and KPV-I were reacted with β -glucosyl Yariv reagent, suggesting the presence of an arabino- β -3,6-galactan moiety. All of the purified fractions did not affect the growth of peritoneal macrophages from Balb/c mice, RAW 274.7 murine macrophage cell lines or Caco-2 human epithelial colorectal cell lines. KPV-I showed a significantly higher production of NO and various cytokines such as IL-6, IL-12 and TNF- α from peritoneal macrophage of Balb/c mice than other fractions.

Methylation analysis indicated that KBV-I comprised 25 different glycosyl linkages and it existed as the mixture composed of three different polysaccharides such as mannan (60%), rhamnogalacturonan I (RG-I, 30%) and glucan (10%). A mannan residue in KBV-I contained several characteristic mannopyranosyl linkages such as terminal-, 2- and 2,6-linked Man β , suggesting mannan originated from the cell walls of yeasts. A RG-I residue in KBV-I was composed of rhamnogalacturonan core substituted with neutral carbohydrate side chains such as arabinan, galactan and arabinogalactans and related oligosaccharides. It supposed that the potent immuno-stimulating activity of KBV-I may be due to the mannan from yeast cell walls and RG-I from the pectin of brown rices which was released during fermentation process. On the other hand, KPV-I contained 21 different glycosyl linkages, suggesting the mixture composed of three different polysaccharides such as rhamnogalacturonan RG-I (70%), mannan (20%), and glucan (10%). A RG-I residue in KPV-I comprised several glycosidic linkages such as 5-linked Ara β , 3-linked Gal β and 2,4-Rha β , being characteristic glycosidic linkages in RG-I region of pectin. A mannan residue in KPV-I contained several characteristic mannopyranosyl linkages such as terminal-, 2- and 2,6-linked Man β , expecting mannan originated from yeast cell wall. It also supposed that the potent activity of KPV-I may be mainly due to the yeast mannan and persimmon RG-I.

- **Establishment of standard component sugars and specifications of intestinal immune-modulating polysaccharide**

In component sugar analysis, KBV-0 included 62.9% total sugar contents by dry mass mainly consisted of Glc and Man (36.6 and 13.7%) in addition to small amount of Gal, Xyl and Ara (5.2, 3.8 and 2.9%). KPV-0 contained similar total sugar contents (61.5% of dry mass) with KBV-0, but different composition such as Man, Ara, Gal, Glc, Xyl and Rha (15.6, 12.5, 10.4, 9.9, 6.3 and 6.2%, respectively). As these results, we suggest that immunostimulating polysaccharides, KBV-0 should contain mannose over 10%, and KPV-0 should contain arabinose over 9.0% as each marker compound to be possible to use as functional material for the intestinal immune enhancement.

▪ **Estimation of intestinal immune-modulating activity by oral administration of the polysaccharides from traditional fermented vinegars (*in vivo*)**

To investigate the *in vivo* effects of polysaccharides isolated from traditional fermented vinegars on the intestinal immune system modulating activity, KBV-0 and KPV-0 were administered orally into the mice of each four experimental groups (0, 50, 500 and 5,000 μ g/mouse/day, 20 days). In this results, oral administration of KBV-0 and KPV-0 induced the increased production of not only IgA but also various cytokines (IL-6, GM-CSF and TGF- β) by Peyer's patch cells, in a dose dependent manner. Also, the groups fed with KBV-0 and KPV-0 markedly increased the IgA production into intestinal fluids and feces. However, oral administration of KPV-0 was more effective at the same dosages than that of KBV-0. On the other hand, IL-6 and GM-CSF secretion in serum did not show significant increase in the groups fed with KBV-0 and KPV-0 in comparison with negative control (NC, water administrated group). Above data lead us conclude that Korean traitional vinegars contains select polysaccharides in addition to seasoning components, and these polysaccharides appear to provide intestinal immune-stimulating activities beneficial to human health.

4. Estimation of intestinal immune function of traditional fermented vinegars in IBD models (*in vivo*)

To evaluate the efficacy of persimmon vinegar (PV) and unpolished rice vinegar (UV) on gut immune system in DSS-induced colitis mouse model, forty male C57BL6 mice were randomized into five groups; DSS control (DSS), DSS + PV concentrate 200 mg/kgBW (DPL), DSS + PV concentrate 400 mg/kgBW (DPH), DSS + UV concentrate 200 mg/kgBW (DUL), DSS + UV concentrate 400 mg/kgBW (DUH). Test materials were orally administered for 23 days and DSS was administered for 9 days after 2 weeks of starting the administration of test materials. DAI tends to be decreased in DPL group. Colonic pathological score was significantly decreased in DPH group compared with DSS group. Inflammation, cell death and regeneration score also showed significant effect in DPH group. mRNA expressions of IL-1 β TNF- α and IL-6 were evaluated using qPCR and TNF- α tended to be decreased in DPL group compared with DSS group. Taken together, present findings suggest that PV concentrate had a regulatory effect on gut immune system by decreasing inflammatory cytokine expression.

5. Estimation of liver-protective effects of traditional fermented vinegars (*in vivo*)

To evaluate the efficacy of persimmon vinegar (PV) and its fractions on hepatic immune response and alcohol metabolism in chronically alcohol administered rats, forty male Wistar rats were randomized into five groups; normal control (NC), ethanol control (EC), ethanol + PV (PT), ethanol + insoluble PV fraction (PI), and ethanol + soluble

fraction of PV (PS). After four weeks, increases in hepatic mRNA expressions of IL-1 β , IL-12 β , TLR-4 and COX-2 were significantly dampened in PV, PT, and PS groups compared to ET. Histological observation also revealed effects of PV, PT, and PI on ethanol-induced mild steatosis compared to the ET group. CYP2E1 protein expression was significantly suppressed only in the PT group compared to the EC group. Taken together, present findings suggest that PV and its fractions had a hepatoprotective effect on ethanol-induced inflammation and oxidative stress via regulation of alcohol metabolism and anti-inflammatory response system.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	29
Part 1. Purpose and necessity of research and development	29
Part 2. Research contents	35
1. Selection of traditional fermented vinegar	35
2. Establishment of isolation method for isolation of functional ingredient from traditional fermented vinegar	35
3. Estimation of intestinal immune modulating activity of traditional fermented vinegar	35
4. Estimation of liver protecting effect of traditional fermented vinegar	35
Chapter 2. Contents and Results of research and development	36
Part 1. Selection of traditional fermented vinegar by physicochemical analysis	36
1. Screening of various vinegar sample	36
2. Analysis of various vinegar	37
Part 2. Isolation of immune activating polysaccharides from traditional fermented vinegar and selection of the activating sample	40
1. Experimental method	40
2. Results	43
Part 3. Establishment of isolation method of traditional fermented vinegar according to characteristic	49
1. Experimental method	49
2. Results	52
Part 4. Establishment of intestinal immune system modulating activity (stimulation) of traditional fermented vinegar	64
1. Experimental method	64
2. Results	78
Part 5. Establishment of intestinal immune system modulating activity (tolerance) of traditional fermented vinegar	133

1. Selection of animal model for inflammatory bowel disease · · · · ·	133
2. Experimental method · · · · ·	134
3. Results · · · · ·	136
Part 6. Establishment of liver protecting effect (<i>in vitro</i>) · · · · ·	146
1. Experimental method · · · · ·	146
2. Results · · · · ·	149
Part 7. Establishment of liver protecting effect (<i>in vivo</i>) · · · · ·	156
I. Liver protecting effect of traditional fermented vinegar · · · · ·	156
1. Experimental method · · · · ·	156
2. Analysis marker · · · · ·	158
2. Results · · · · ·	166
4. Summary · · · · ·	184
5. Conclusion · · · · ·	188
II. Liver protecting effect of fractions from traditional fermented vinegar · · · · ·	191
1. Experimental design · · · · ·	191
2. Results · · · · ·	194
3. Conclusion of <i>in vivo</i> liver protecting effect of fractions from traditional fermented vinegar · · · · ·	207
Chapter 3. Level of target accomplishment and contribution to related fields · · · · ·	208
Chapter 4. Achievements of research and development and plans for utilizing research results · · · · ·	213
Chapter 5. Information on international scientific technology collected during research and development · · · · ·	214
Chapter 6. Specific requirement for the project · · · · ·	214
Chapter 7. Research equipment status · · · · ·	214
Chapter 8. References · · · · ·	215

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 전통발효식초 기능성 규명연구		
	(영문) A study on the health functionalities of Korean fermented vinegars		
연 구 기 관	경기대학교	연 구 책 임 자	(소속) 경기대학교
참 여 기 관	샘표식품(주) 이화여자대학교		(성명) 신 광 순
연 구 비	계	300,000	총 연 구 기 간
		2012.08.10.~2014.08.09. (2년)	
참 여 연 구 원	17명 (연구책임자: 3명, 책임연구원: 0명, 연구원: 9명, 연구보조원: 12명)		

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표

- 전통발효식초의 간 보호 효과 및 장관면역 기능성에 대한 과학적 평가 및 핵심 물질 규명

나. 연구개발 내용

- 전통발효식초의 공시시료 선정
- 전통발효식초의 기능성 성분 분석법 수립
- 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 및 메카니즘 규명
- 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가 및 메카니즘 규명

2. 연구결과

가. 전통발효식초의 공시시료 선정

(1) 전통발효식초의 이화학적 특성

- 공시시료 선정을 위해 시중에 판매되는 식초를 대상으로 주정초가 아니며 원료를 100% 포함하는 국내산 전통발효식초 및 대조군으로 해외산 식초를 수거하였다.
- 수거한 시판 식초(국내식초 6종, 해외식초 5종)의 이화학적 특성(총 산도, 아세트산, 아세트산 순도, TN, 총 아미노산, 유리아미노산, 총 폴리페놀, Crude polysaccharide)을 비교분석하여 국내산 식초 4종(사과식초, 감식초, 와인식초, 현미식초), 해외산 식초 2종(현미식초, 와인식초)를 1차적으로 선별하였다.
- 국내산 식초와 해외산 식초의 이화학적 특성 비교 결과, 국내산 식초는 해외산 식초보다 acetic acid의 순도가 약 3~5% 가량 낮았으며, 발효 과정 중 단백질이 아미노산화로 진행된 것을 확인할 수 있었으며, 국내산 식초에서 조다당의 함량이 월등히 높게 나타났다.

(2) 전통발효식초로부터 조다당체의 분리 및 화학적 특성

- 국내산 전통발효식초 4종 [사과식초(KAV-0), 와인식초(KWV-0), 현미식초(KBV-0), 감식초(KPV-0)]와 해외산 발효식초 2종[영국와인식초(UWV-0), 일본현미식초(JBV-0)]로부터 다당을 분리하여 다당 시료의 수율, 화학특성 및 면역활성을 비교 검토하였다.
- 이 결과, 활성 및 수율이 우수한 3개 다당(KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)을 선정할 수 있었으며, 이들을 대량 조제하여 제반 화학특성 특성을 규명한 결과 국내 및 일본산 현미식초 유래 다당(KBV-0 및 JBV-0)은 발효 미생물 유래 mannan을 주성분으로 함유하고 있었으며, 국내산 감식초 유래 다당(KPV-0)은 원재료인 감에서 유래한 pectin을 주성분으로 함유함이 확인되었다.

나. 전통발효식초의 기능성 성분 분획법 수립

(1) 전통발효식초의 기능성분 분리 및 대량 분리법 확립

- 전통발효식초 중 국내산 감식초 및 국내산 현미식초에서 기능성 성분의 분리를 위하여 에탄올 침전법을 적용하여 분획을 실시하여 각 샘플별로 3가지의 샘플을 제조하였으며, 국내산 감식초 및 국내산 현미식초를 각각 25kg를 이용하여 에탄올 침전법으로 대량으로 분리하였다.
- 증발농축기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 에탄올을 1:3 비율로 첨가하여 20시간 저온 침전시킨 후 동결건조를 거쳐 대량의 식초 샘플을 제조하여, 일반성분 분석, 지표물질 분석, *in vitro*, *in vivo* 실험에 사용하였다.

(2) 전통발효식초의 유효성분 분석

- 국내산 현미식초 농축액의 조단백질함량은 17%, 국내산 감식초 농축액의 조단백질함량은 2.4%로써, 7배 이상 국내산 현미식초의 조단백질함량이 높은 것으로 조사되었고 분획물에 따른 총 아미노산의 프로파일은 일반성분의 조단백질함량과 유사한 경향을 보여주었으며, 국내산 현미식초 농축액이 감식초 농축액보다 9배 이상 많은 총아미노산 함량을 보여주었다.
- 모든 분획에서 가장 함량이 높은 아미노산은 glutamic acid로 조사되었으며, 국내산 현미식초 및 감식초에 공통적으로 포함된 유기산은 citric acid, acetic acid, lactic acid, pyroglutamic acid로 조사되었다.
- 곡류보다 유기산 함량이 높은 감은 유기산 분석에서 보듯이 단백질에서 기인한 아미노산인 glutamic acid의 발효로 생성된 pyroglutamic acid를 제외한 모든 유기산이 감식초 분획물에서 많았다.
- 식초의 기능성 지표물질인 ferulic acid 분석 결과, 감식초에서는 항산화 물질의 대표적인 ferulic acid가 존재하지 않음을 알 수 있었고, 국내산 현미식초에는 유리형의 형태보다는 수용성 식이섬유에 결합된 bound form으로 ferulic acid가 존재하는 것으로 (47.5 µg/g)의 함량으로 조사되었다.
- 또한, UPLC-QTOF-MS를 이용한 식초의 기타 항산화 물질 정성 및 정량 결과, 국내산 감식초에서 발견되는 항산화 성분인 phenolic acid는 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 총 3가지가 발견되었으며, 국내산 현미식초의 경우 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 이외에 sinapic acid, vanillic acid가 추가적으로 발견되어 총 5가지의 phenolic acid가 포함되어 있는 것으로 분석되었다.

다. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 및 메커니즘 규명

(1) 전통발효식초의 간 보호 효과 (*in vitro*) 평가

- 생체 내에서 생성되는 활성산소는 인체의 노화와 질병을 유발하는 주요 원인으로 세포와 조직

에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있음. 대표적인 활성산소 유도물질인 ethanol을 처리하여 산화된 간세포에 전통발효식초를 처리함으로써 산화방어기전과 관계된 효소들의 mRNA 발현과 활성을 확인하였음. 국내산 현미식초 및 국내산 감식초는 ethanol로 인해 감소한 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 유의적으로 증가시킴으로써 항산화 활성을 증가시켰으며, 각각의 분획물들에서도 같은 결과를 얻었다.

(2) 전통발효식초의 간 보호 효과 (*in vivo*) 평가

- 수컷 Wistar Rat에 16일간 강제 경구투여로 50%(v/v) 에탄올을 제공하여 간 손상을 유도하였으며, 동시에 전통발효식초를 경구투여 하여, 알코올성 간 손상에 대한 전통발효식초의 효능을 확인하였다.
- 간 손상 지표인 serum AST, ALT 수준이 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 감소하는 경향을 보였는데, 국내산 감식초 군에서의 감소폭이 가장 컸으며, 간 조직 알코올 대사 관련하여 간 조직 cytosol 분획에서의 ADH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였다.
- 간 조직 mitochondria 분획에서의 ALDH활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초군과 국내산 감식초 군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 일본산 현미식초군의 수준은 에탄올 대조군의 활성과 차이를 보이지 않았다.
- 간 조직 및 적혈구 항산화 대사와 관련하여 간 SOD 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초군의 그 수준이 유의적으로 증가하였으나, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초와 일본산 현미식초군의 활성의 차이는 보이지 않았다.
- 적혈구 CAT 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 군의 활성은 감소하는 경향을 보였고, Plasma MDA는 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서 수준이 감소하는 경향을 보였다.
- 한편, 감식초 농축액 (PT) 및 감식초를 에탄올 침전법으로 분획한 에탄올 불용성 분획물 (PI) 및 에탄올 가용성 분획물(PS)의 알코올 스트레스에 대한 간 내 항염증 및 알코올 대사에 대한 효능을 알코올을 4주간 1일 1회 경구 투여한 동물 모델을 통해 규명하였다.
- 간 조직의 형태학적 분석에서 에탄올 대조군 (ET)과 비교하여 감식초 농축액 및 에탄올 불/가용성 분획물 투여군에서 간 조직 내 지방의 크기가 작고 분포가 적은 것으로 확인되었고, 간 조직에서 알코올 스트레스에 대한 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 qPCR을 이용하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 β , TLR 4, CD14, MCP-1, MIP-2, COX-2의 발현 정도를 측정된 결과 염증성 사이토카인인 IL-1 β 에서 PI 및 PS군에서 ET군과 비교하여 그 발현이 유의적으로 감소하였으며, IL-12 β 에서 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 유의적으로 감소하였다.
- COX-2의 발현 역시 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 현저하게 감소하였으며, 에탄올에 의한 LPS 자극으로 유도되는 TLR4 수용체의 발현 역시 ET군에 비하여 PI 및 PS군에서 유의적인 감소를 보였다.
- 간 내 에탄올 대사과정의 주요 효소인 CYP2E1의 단백질 발현을 측정된 결과, ET군이 NC군에 비해 발현이 유의적으로 증가하였고, PT군의 발현이 PI와 PS를 투여한 군에 비하여 CYP2E1의 발현이 유의적으로 감소됨을 확인하였다.
- 결론적으로 4주간의 에탄올 경구투여는 알코올 대사 효소의 발현 증가와 간 내 염증성 사이토카인 및 염증 인자의 생성을 촉진하였으며, 이에 대해 감식초 농축액 및 그 분획물의 투여가 에탄올 섭취로 유도되는 LPS/ TLR4 신호 매개 전달 경로와 관련된 염증성 사이토카인 및 관련 인자를 조절함으로써 면역 기전 조절의 가능성이 있을 것으로 사료되었으며, 더욱이 감식초 농축

액 (PT)의 투여는 에탄올 대사과정에 있어 주요 효소로 작용하는 CYP2E1의 단백질 발현을 억제하였으므로 알코올 대사 효율에 있어 감식초의 가능성을 확인할 수 있었다.

라. 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가 및 메카니즘 규명

(1) 전통 현미발효식초 유래 다당의 전신면역계 활성화 (*in vitro*) 평가

- 전통발효 식초를 이용하여 새로운 장관면역활성 증진 소재를 개발하기 위해, 6종의 국내·외 유래 전통발효 식초로부터 조다당을 분리하였으며, 이들의 화학적특성과 면역 증진활성을 평가하는데, 국내산 전통 현미발효 식초, 일본산 전통 현미발효 식초 및 국내산 발효 감식초를 이용하여 조제된 3 종류의 조다당 (KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)이 다른 전통발효 식초들보다도 우수한 수율과 마크로파지에서 유래한 사이토카인 생성능을 확인하였다.
- KBV-0 및 JBV-0는 Man와 Glc를 주요 구성당으로 함유하였으나, 그 함량은 서로 유사하지 않으며, KPV-0 KBV-0 및 JBV-0에 비해서 높은 Ara와 Rha의 함량과 함께 Man와 Glc를 함유하고 있었다.
- KBV-0, KPV-0 및 JBV-0의 다양한 면역증진 활성을 검색했는데, KBV-0와 KPV-0는 JBV-0에 비해 우수한 항보체 활성을 나타내었다.
- KPV-0는 Balb/c 마우스에서 유래한 복강 마크로파지뿐만 아니라 마우스 유래 마크로파지 세포주인 RAW 264.7 세포의 NO, IL-6 및 IL-12의 생성을 유의적으로 증가시키며, Peyer's patch 세포를 경유한 골수세포 증식능뿐만 아니라 IgA와 TGF- β 의 생성능의 유의적인 증가를 보여주었다.

(2) 전통 발효식초 유래 다당의 장관면역계 활성화 (*in vitro*) 평가

- 면역활성이 우수한 전통 현미발효 식초 (KBV-0)와 감식초 (KPV-0)에서 유래한 다당체는 면역 활성을 나타내는 성분을 동정하고 확인하기 위하여 각각 Sephadex G-75 겔여과 크로마토그래피를 이용하여 분획되었는데, KBV-0로부터 3개의 정제획분 (KBV-I, II 및 III)과 KPV-0로부터 3개의 정제획분 (KPV-I, II 및 III)으로 각각 분획되었다.
- 가장 고분자 획분인 KBV-I은 60 kDa로, 주로 Man (58.4%)와 함께 소량의 Gal (12.1%)와 Glc (13.3%)를 포함하는 중성당 (96.9%) 획분으로 분석되었으며, KPV-I도 60 kDa으로, 주로 Ara (58.4%), Man (19.6%) 및 Gal (15.2%)의 중성당과 함께 uronic acid (14.6%)를 포함하는 것으로 분석되었다.
- KBV-I과 KPV-I은 모두 β -glycosyl Yariv 시약과 반응했기에 이들은 모두 arabino- β -3,6-galactan 영역의 존재를 제시하는 결과로 나타났다.
- 모든 정제 획분들은 모두 Balb/c 마우스로부터 유래한 복강 마크로파지와 마우스 유래 마크로파지 세포주인 RAW 264.7 세포, 그리고 인간의 장 상피세포주인 Caco-2 세포주에 대한 독성은 나타내지 않았고, KPV-I은 Balb/c에서 유래한 복강 마크로파지로부터 IL-6, IL-12, TNF- α 및 NO의 생성능이 다른 획분들에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

(3) 전통 발효식초 유래 장관면역 활성화 정제다당의 지표성분 설정 및 활성구조 동정

- KBV-I은 메틸화 분석을 통해 25개의 서로 다른 글리코시드 결합으로 구성되었는데, 주로 효모 세포벽 구성성분인 mannan (약 60%) 유래와 현미의 발효과정에서 유리되는 pectin의 RG-I (약 30%)으로 사료되었다.
- KPV-I은 21개의 서로 다른 글리코시드 결합으로 구성되며 70%의 RG-I의 결합양식으로 밝혀졌고, terminal-, 2-결합 및 2,4-Man의 존재는 효모 세포벽에서 유래된 만난 (20%)으로 예상되었

다. 이러한 결과로, 국내 감식초 유래 다당(KPV-0)은 면역자극 활성을 증진시킬 수 있는 것과 함께 RG-I (KPV-I)이 활성에 관여하는 주요한 성분으로 나타났다.

- 구성당 분석 결과 KBV-0는 건조물에 대해 62.9%의 총당을 포함하며 주로 glucose와 mannose (36.6과 13.7%)와 함께 galactose, xylose 및 arabinose (5.2, 3.8 및 2.9%)로 구성되는 것으로 나타났다으며, KPV-0는 KBV-0와 총당 함량에서는 KBV-0와 유사했지만 (건조물의 61.5%), 구성당은 mannose, arabinose, galactose, glucose, xylose 및 rhamnose (각각 15.6, 12.5, 10.4, 9.9, 6.3 및 6.2%)로 다른 조성을 나타냈다.
- 이러한 결과로 본 연구진은 장관면역 증진을 위한 기능성소재로 활용하기 위해 KBV-0는 10% 이상의 mannose를, 그리고 KPV-0는 9% 이상의 arabinose와 8% 이상의 galactose를 포함해야 한다고 제시하고자 한다.

(4) 전통 발효식초 유래 다당의 장관면역 활성 (*in vivo*) 평가

- 전통발효 식초에서 분리된 다당의 장관면역계 증진활성을 *in vivo* 효과로 검토하기 위하여, KBV-0와 KPV-0는 각각 C3H/HeN 마우스에 각각 4개의 실험군 (0, 50, 500 and 5,000 μ g/mouse, 20일) 나누어 경구투여 되었다.
- 이 결과에서, KPV-0를 투여한 군에서는 Peyer's patch 세포, 장관 내액 및 분변에서 IgA 생산을 유의적으로 증진시켰을 뿐 아니라, Peyer's patch에서 다양한 사이토카인 (IL-6, GM-CSF 및 TGF- β)의 생산을 농도의존적인 경향으로 증가시켰다..
- 이러한 모든 연구를 통해 국내 전통발효 식초인 현미발효 식초 및 감식초로부터 유래한 다당은 장관면역 활성 증진에 도움이 될 수 있는 기능성식품 또는 의약소재로의 활용이 가능하며, 이를 통하여 본 사업의 최종 목표였던 한식의 세계화에도 크게 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

(5) 전통 발효식초의 장관면역계 효능 (면역관용) 평가

- 전통 발효식초의 장관면역계의 면역관용을 평가하기 위해 수컷 C57BL/J (6주령)를 23일간 매일 감식초 농축액 (PV) 및 현미식초 농축액 (UV)를 각 200 mg/kg B.W 혹은 400 mg/kg B.W를 경구투여하여 시험 시작 후 2주 뒤부터 9일간 DSS를 식수에 혼합한 동물 모델을 통해 규명하고자 하였다.
- 9일 간의 DSS 섭취 기간 동안 DAI 측정 결과 DSS군에 비하여 감식초 농축액 저용량군(DPL)에서 감소하는 경향을 보였으며, colon 조직의 형태학적 분석에서 pathological score가 DSS군과 비교하여 감식초 농축액 고용량군 (DPH)에서 DSS군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 염증, 세포사 및 재생에서도 유의적인 효과를 관찰할 수 있었다.
- 이에 따라 Quantitative real-time-transcription polymerase chain reaction을 이용하여 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 TNF- α , IL-6, 및 IL-1 β 의 발현 정도를 측정하고, I κ B 및 NF κ B를 측정하였으며, 세포 증식 및 세포사에 대한 효과를 확인하고자 기전 인자인 b-catenin, c-myc 및 cyclin d 그리고 caspase-3 및 caspase-9의 발현 정도를 측정하였는데, 뮤신 분비를 관여하는 MUC2의 발현 정도를 측정한 결과 TNF- α 에서 DSS군이 증가하는 경향을 보였으며, DSS군과 비교하여 DPL군이 감소하는 경향을 나타내었다.
- 결론적으로, 9일 간의 4% DSS는 colon에 세포사 및 염증 인자의 생성을 촉진시키고 이로 인해 정상 대조군에 비하여 몸무게 및 장기 무게의 유의적인 차이를 보임을 확인하였으며, 이에 대해 감식초 농축액이 염증 사이토카인 유전자 발현을 약화시키며, 세포 증식의 조절 인자의 발현 조절 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

3. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 학술발표 4건

- 2013년 한식세계화 심포지엄(2013.05.15., 경기대 신광순 교수)
 - 전통발효식초 기능성 규명 연구
- 2013년 한국영양학회 추계학술대회 및 제48회 정기총회 (13.11.08., 이화여대 이혜민)
 - Persimmon vinegar extract protects alcohol-induced hepatic inflammatory damage in Wistar rats
- 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN (13.11.14, 경기대)
 - Intestinal immune system modulating activities of polysaccharides from Korean traditional vinegars manufactured with different raw materials
- 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (13.08.29, 경기대)
 - Characteristics and immuno-stimulating activities of P/S from Korean Traditional Vinegars

나. 홍보, 전시회 참여 2건

- 2012년도 생명산업과학기술대전 (12.09.20.~22., 샘표식품(주))
- 2013년도 생명산업과학기술대전 (13.09.26.~28., 샘표식품(주))

다. 논문투고 및 특허출원

- Chemical characteristics and immuno-stimulating activity of the polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials (한국식품영양과학회 투고완료, 2014년 43권)
- Characterization of RAW 264.7 cells stimulating polysaccharides from brown rice and persimmon vinegars (2014년 9월중으로 한국식품영양학회지 투고 예정)
- Effect of oral administration of polysaccharide isolated from Korean black vinegar on intestinal immune system (2014년 9월중으로 Food Chemistry 투고 예정)
- Structural characterization of immuno-stimulating polysaccharide purified from Korean persimmon vinegar (작성 중, 2014년 10월중으로 투고예정)
- Modulatory effects of persimmon vinegar and its fractions on ethanol-induced hepatic inflammatory stress and CYP2E1 expressions in rats (투고예정, 작성 중)

목 차

제 1 장	연구개발 과제의 개요	29
제 1 절.	연구개발의 목적 및 필요성	29
제 2 절.	연구 내용	35
1.	전통발효식초의 시료 선정	35
2.	전통발효식초의 기능성 성분 분획법 수립	35
3.	전통발효식초의 장관면역 기능성 평가	35
4.	전통발효식초의 간 보호 효과 평가	35
제 2 장	연구개발 수행 내용 및 결과	36
제 1 절.	전통발효식초의 이화학적 분석을 통한 시료 선정	36
1.	식초 시료 Screening	36
2.	Screening 시료 분석	37
제 2 절.	전통발효식초로부터 면역 활성이 우수한 다당체의 분리 및 우수 식초의 선별	40
1.	실험방법	40
2.	연구결과	43
제 3 절.	전통발효식초의 특성에 따른 분획법 수립 및 분획물 확보	49
1.	연구방법	49
2.	연구결과	52
제 4 절.	전통발효식초의 장관면역계 활성(장관면역 증진) 기능 평가	64
1.	연구방법	64
2.	연구결과	78
제 5 절.	전통발효식초의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가	133
1.	Inflammatory bowel disease (IBD) 동물모델 선정	133
2.	실험디자인	134
3.	연구결과	136
제 6 절.	전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (<i>in vitro</i>)	146
1.	연구방법	146

2. 연구결과	149
제 7절. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (<i>in vivo</i>)	156
I. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가(<i>in vivo</i>)	156
1. 연구방법	156
2. 분석지표	158
3. 연구결과	166
4. 요약	184
5. 고찰	188
II. 전통발효식초 분획물의 간 보호 효과 평가(<i>in vivo</i>)	191
1. 실험디자인	191
2. 연구결과	194
3. 전통발효식초 분획물의 <i>in vivo</i> 간 건강 기능성 평가 결론	207
제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	208
제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	213
제 5 장 연구개발과정에서 수집한 해당과학기술정보	214
제 6 장 주요 연구사항에 대해 시행기관의 장이 요구하는 사항	214
제 7 장 연구시설·장비 현황	214
제 8 장 참고문헌	215

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식초라 함은 곡류, 과실류, 주류등을 주원료로 하여 발효시켜 제조하거나 이에 곡물당화액, 과실착즙액 등을 혼합, 숙성하여 만든 발효식초와 빙초산 또는 초산을 먹는 물로 희석하여 만든 합성식초를 말함.
- 식초는 소량의 휘발성 및 비휘발성 유기산, 당류, 아미노산, ester 등을 함유한 독특한 방향과 신맛을 가진 동서양의 대표적인 발효식품임. 식물성 원료를 효모로 알코올 발효시킨 다음, 초산균으로 초산 발효를 하여 제조한 것으로 산미료 외에도 식품 보존효과와 의약용으로 이용되고 있음. 우리나라는 오래전부터 발효식초를 이용하여 다양한 형태의 음식에 맛과 보존성을 높이는 데 이용하여 왔음.
- 우리나라에서는 재래식 식초가 언제부터 만들어졌는지는 분명하지 않으나 주류의 발달과 더불어 이루어졌다고 추정할 수 있으며, 해동역사(海東繹史)에 의하면 고려시대에 식초가 음식의 조리에 이용되었으며, 향약구급방(鄉藥救急方) 중에 약방(藥房)으로 식초의 다양한 이용이 기술되어 있음. 식초 종류에 있어서는 쌀식초(米醋), 소맥초(小麥醋), 점미초(粘米醋)와 같은 곡류초와 매실, 감과 같은 과실을 이용한 과실초가 있었으며, 다양한 종류의 식초가 조미료로 뿐만 아니라 민간의약으로 다양하게 이용되어 왔음.
- 발효식품은 미생물의 발효작용으로 성분이 분해되고 새롭게 합성되어 독특한 풍미를 갖게 된 식품을 총칭하는 것으로 영양가와 저장성이 높아짐. 알코올발효, 젖산발효, 초산발효, 단백질 및 당질의 분해 등을 이용하여 새로운 맛으로 창조된 식품임.
- 식초발효에 사용되는 중요한 미생물인 자낭균류에 속하는 *Aspergillus*, 즉 누룩곰팡이속은 예부터 된장, 간장, 약주, 탁주, 감주 등의 양조공업에 널리 사용되는 곰팡이들임. 균종의 색깔은 백색, 황색, 녹색, 흑색 등으로 다양하기 때문에 백국균, 황국균, 흑국균 등으로 색을 중심으로 분류하기도 함. *Aspergillus*에 속하는 곰팡이들은 각종 다양한 효소들을 생성하는데 특히 전분 당화력과 단백질 분해력이 뛰어난 효소들을 생성하는데, *Aspergillus oryzae*는 누룩 곰팡이의 대표격으로 단백질 분해능과 전분 당화력이 뛰어나서 식초제조를 비롯한 다양한 양조공업에 많이 이용되어 왔음.
- 한편, 식초발효에서 가장 중요한 역할을 하는 초산균(acetic acid bacteria)은 그 종류에 따라 생성하는 acetic acid의 함량이 다르며 총산 함량을 좌우하는 식초품질관정의 지표로 이용되어 매우 중요하다 할 수 있음. 초산균은 당과 알코올을 초산으로 산화시킬 수 있는 능력에 따라 초산과 젖산을 재산화시킬 수 있는 *Acetobacter*속과 알코올보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화시킬 수 있는 능력이 없는 *Gluconobacter*속 두 종류로 분류되어 왔으나 최근 Yamada와 Kondo에 의해 새로운 아속인 *Gluconacetobacter*속을 밝힌 바 있음. 지금까지 알려진 대표적인 종들로는 *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. xylinum*, *A. hansenii* 및 *A. methanolicus* 등이 있음.
- 최근에는 우리 발효식품에 대한 유용한 물질 탐색 및 발효 대사의 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 면역 활성화, 고혈압 억제, 세포 증식 촉진, 항종양 활성, 혈당 강하 작용, 콜레스테롤 저하, 혈전 용해 효소 작용, 항암 효과, 항비만, 생균제(probiotics) 등으로 생활 습관

병 예방 및 건강에 긍정적인 효과를 입증하고 있음.

- 영양학적으로 우수한 우리 농산물을 주원료로 하여 미생물 발효과정을 거치므로, 우리 전통 발효식초의 우수성은
 1. 영양성분이 풍부한 원료인 감, 현미, 사과에서 오는 당질, 단백질, 식이섬유(펙틴질 등), 비타민, 무기질 및 미량 원소(polyphenols 등)
 2. 발효과정에 필요한 발효 미생물과 그 균체(β -glucan 등), 발효 과정을 통한 대사산물
 3. 발효과정을 통해 분해되어 생성된 아미노산펩타이드, 폴리사카라이드 등이 다량 함유되어 있어 건강 증진에 유익할 것으로 기대됨.
- 또한 식초의 효능은 동맥경화, 고혈압 등의 성인병 예방효과를 비롯하여 콜레스테롤 합성 저해효과, 체지방 감소 및 피로회복 등에도 효과적인 것으로 알려져 있으며, 특히 식초의 초산성분은 부패균의 생육을 억제함으로써 식품의 부패방지에도 기여하는 것으로 알려져 있음.
- 식초의 주요 성분은 초산으로 그 기능성이 다양하게 보고되었으나, 감식초, 쌀식초(米醋) 등 발효과정을 거친 전통식초와 초산을 비교하는 연구들이 일부 진행되었으며, 그 기능이 우수함이 보고되었음.
- 한편, 식품이 섭취되면 장관에서 흡수되어 유용 성분이 간에서 대사되어짐. 따라서 직접적으로 흡수, 대사되는 간과 장관은 식품의 체내 효율에 중요한 역할을 하며, 간과 장관의 건강이 곧 신체의 건강으로 직접적인 연관이 있음. 전통발효식초가 왜 우수한지 명확한 기전 연구에 대해서는 미흡하며 특히 간과 장관면역증진에 대해 발효식초가 지니는 우수성에 대한 연구가 부족한 실정임.
- 따라서 우리나라 전통 발효식초의 제조과정의 우수성과 건강증진효과를 과학적으로 규명하여 국민 건강에 기여하고 한식의 과학성과 우수성을 알려 세계적으로 발전시키고자 함.

우리나라 전통 발효식초

- 우리나라는 예부터 가정에서 곡류와 과실 등 다양한 원료의 사용과 제조 방법으로 식초를 제조하여 왔으며, 이러한 양조식초는 합성식초보다 산도는 낮지만 풍부한 맛과 영양을 가지고 있음⁸⁾.
- 1970년대, 대량공급을 위한 대규모 생산으로 값싼 합성식초가 도입되었으나 잔류독성문제와 소비자의 인식 전환으로 가정에서의 합성식초 사용은 거의 사라졌음. 1980년대 주정을 희석하여 초산발효시킨 양조식초가 식초시장의 주류를 형성하였으며, 1990년에 감식초를 시작으로 100% 과실을 원료로 주정을 사용하지 않은 양조식초에 대한 소비자의 선호도가 높아졌음⁸⁾.
- 식초의 영양과 건강 기능 성분을 취하기 위해서 조리용 외 마시는 식초 시장이 형성되어 성장하고 있음.
- 전통적으로 식초를 만드는 대표 원료로서 현미, 감, 사과가 사용되고 있음.
 1. 현미는 정백과정을 거치지 않아 배아(쌀눈), 호분층이 그대로 남아있어 여러 영양소가 풍부한데, 특히 단백질, 지방, 비타민 B₁, 비타민 B₂가 풍부하며, 최근에는 비타민 E, 천연 토코페롤, γ -오리자놀, 식이섬유 등 영양소가 풍부⁵⁾해 그 기능성이 보고되고 있음.
 2. 감(persimmon, *Diospyros kaki* Thumb.)은 우리나라를 비롯한 일본, 중국 등 동북아시아에서 널리 재배되고 있으며, carotenoid, pectin, polyphenol과 같은 영양 및 건강 성분

들에 대한 인식으로 최근 남부유럽에서도 재배가 확산되고 있는 과실임. 감은 포도당, 과당 등의 당질과 비타민 A와 C가 풍부한 알칼리성 식품으로 우리나라에서는 사과, 포도와 더불어 3대 과실 중의 하나로 생산량이 큰 과실임⁷⁾.

3. 사과는 국내에서 생산되는 3대 과일 중 하나로 연간 생산량이 408,000톤에 이르며 재배 면적은 전체 과실 중 18.4%를 차지함. 친환경적 식품으로 유리당, 유기산 및 식이섬유가 풍부하여 건강 식품으로서 가치가 재조명되고 있음⁹⁾.

- 예부터 우리나라의 가정에서는 전통적인 병행복발효방법으로 다양한 과실초를 제조하여 조리에 이용하였으며¹⁰⁾, 양조식초는 초산발효에 의해 만들어지는데, 과실과 알코올을 원료로 하여 초산균(효모)의 산화 발효에 의해 초산으로 되어 초가 만들어 짐⁶⁾.



< 미초(米醋)의 제조⁶⁾ >



< 병행복발효방법에 의한 과실초의 제조⁶⁾ >

- 영양이 풍부한 곡류와 과실 중 현미, 감 및 사과를 100% 원료로 하여, 주정을 사용하지 않고 발효한 전통 발효식초에 대한 기능성을 검증하여 한식 발효식초의 우수한 건강 기능성을 입증하고자 함.

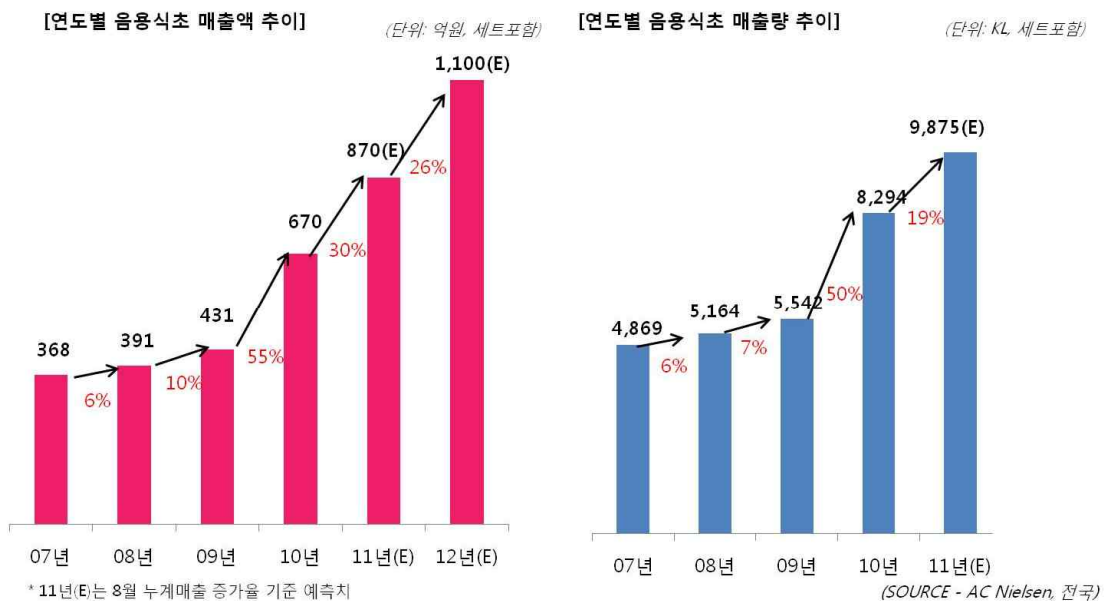
전통 발효식초의 선행연구

- 식초는 건강기능식품으로서 피로회복 촉진, 혈중지질 감소, 식욕 억제 효과 등이 보고되고 있으며, 이러한 식초의 주성분인 acetic acid 뿐 아니라, 다양한 아미노산과 미네랄이 그 역할을 하는 것으로 보고되고 있음¹¹⁾. 또한 과실주와 과실식초로 대표되는 발효음료의 적절한 음용은 심혈관계 질환의 예방 및 개선에 효과가 있다고 보고되고 있음⁷⁾.
- 식초의 기능성은 주로 acetic acid의 기능성으로 설명되고 있는데, acetic acid의 hypertensive 효과에 대한 연구가 다수 보고되고 있으며, renin activity와 angiotensin II를 감소시켜 혈압을 떨어뜨리는 기전으로 설명하고 있으며¹²⁾, 간과 골격근에 glycogen을 빠르게 합성하여 재공급함으로써 피로회복에 도움을 준다고 보고되고 있음¹³⁾. 또한 칼슘의 용해도를 높여 장내 칼슘 흡수를 용이하게 도와준다는 보고도 있음¹⁴⁾.
- 그 외에도 antibacterial effects, 혈청 콜레스테롤 감소, 그리고 항산화 효과 등 식초에 대한 다양한 효과들은 이미 많은 연구를 통해 밝혀지고 있으며, 감식초 섭취는 만성적인 알코올을 섭취한 쥐에서도 대사성 질환을 예방할 수 있는 것으로 보고되었으며¹⁵⁾, 스포츠 드링크

와 감식초를 함께 섭취하게 되면, 비만인의 지질대사가 개선되고, 에탄올 산화에 도움을 준다는 연구결과도 있음¹⁶⁾¹⁷⁾.

연구의 필요성

- 식초는 동맥경화증이나 혈전증을 일으키는 과산화지질을 분해해 동맥경화 예방과 부신피질 호르몬의 분비, 소화 및 식욕 촉진에 효능, 당뇨병과 비만, 혈압 상승, 노화 방지와 항종양 효과 등 그 기능이 주목되고 있음²⁾.
- 최근 일본에서 식초는 동맥경화, 고혈압 등의 성인병 예방 효과, 식중독균의 살균 효과, 콜레스테롤 저하 효과, 체지방 감소 및 피로회복 효과 등이 밝혀지면서 다양한 용도의 식초 제품이 개발되고 있으며, 마시는 식초 시장이 크게 성장하였음³⁾.
- 음용식초시장이 성장한 이유 중 가장 큰 원인은 마시는 식초에 대한 소비자들의 건강기능성 측면의 기대치 때문으로 분석됨. 또한 조미용으로 사용되던 식초의 영역을 확장하여 맛있고 편리하게 섭취할 수 있었던 점이 소비자들의 요구와 부합한 것으로 보임.



< 연도별 음용식초 매출액 추이 및 매출량 추이 >

- 하지만 우리의 전통 식초에 대한 기능성 규명이 미비하며, 특히 장관면역기능증진 측면에 대한 연구는 거의 없는 실정임. 또한 식초의 주성분인 acetic acid에 의한 기능성 규명은 많은 연구가 진행되어 있지만, 우리 전통적인 발효식초에 어떠한 유효 성분이 다양한 기능성을 나타내는지에 대한 기작 연구가 부족함.
- 따라서 우리의 전통 식초의 간 보호 효과 및 장관면역기능성을 확인하고, 이를 발효의 가치와 더불어 세계적인 한국 발효의 우수성을 입증하고자 함.

간 보호 기능성 연구의 필요성

- 간은 영양소 및 물질 대사와 해독을 담당하는 중요한 장기임. 지금까지 알려져 있는 간 손상 유도 물질에는 알코올, 지질과산화, 식품 중의 toxin과 항생물질, 화학요법제, 중추신경계

- 용 약물, 순환기계용 약물과 같은 간독성 약물이 있음¹⁹⁾.
- 현대인에 있어서 문명발달에 따른 다양한 화학물질의 노출과 약물의 오남용, 비만, 알코올 섭취 등으로 산화적 스트레스를 증가시키고 있으며, 간이 독성물질대사와 해독의 주된 장기라는 점을 감안해볼 때 간의 병태, 생리적 조건이 독성물질의 해독에 중요한 영향을 미친다는 사실을 알 수 있음²⁰⁾.
 - 과량의 알코올 소비는 알코올성 지방간, 알코올성 간염 및 간경변과 같은 알코올-관련 질병의 간손상을 유발할 수 있음. 섭취된 알코올은 알코올탈수소효소, cytochrome P450 2E1 및 catalase에 의해 분해되어 아세트 알데히드로 대사됨. 과량의 알코올 대사에서 과도하게 생성된 아세트 알데히드는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질과산화물의 생성을 유발시켜 간독성에 관여함. 또한 알코올 대사에 의해 유도되는 CYP 2E1, p450 reductase, NADPH oxidase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase 등은 생체 내 활성산소종을 생성하고, 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 자유유리기를 생성함으로써 생체내 산화스트레스를 유발하며 알코올성 간 손상의 주요 원인이 됨. 만성적 알코올 섭취는 글루타치온 등과 같이 자유유리기를 중화시키는 항산화제의 생성이나 작용을 저해함으로써 산화스트레스를 촉진하여 간세포 손상을 일으킴¹⁸⁾.
 - 우리 발효식초에 함유된 branched chain amino acid를 비롯한 필수아미노산이 풍부한 아미노산펩타이드 혼합물은 알코올의 번역시작 억제작용을 완화시키고, 단백질 합성 촉진에 영향을 줌. 또한 발효식초의 acetic acid 및 장관에서 식이섬유가 발효되어 생성된 acetic acid는 간의 지방 축적을 억제하고 지방산화를 촉진시키며, 몸에 활력을 줌. 그 외 미네랄 등 영양성분들은 알코올 독성 및 산화적 스트레스로 인해 부족한 영양분을 보충해주므로 독성에 노출된 간을 보호해주는 작용을 할 것으로 예상됨.
 - 우리 발효식초에 함유되어 있는 다양한 영양성분 및 발효산물들이 간 보호에 영향을 주는 사실을 과학적으로 입증하고 더 나아가 장관면역 활성화증진에 도움이 되는 식품으로 그 영역을 넓히고자 함.

장관면역증진 기능성 연구의 필요성

- Gut associated Lymphoid Tissue(GALT)는 인체 내 가장 큰 면역기관으로 70~80%의 면역세포가 몰려있으며, 장 건강 및 장 면역을 증진시키는 것이 인체의 전반적인 건강을 유지하는 데 중요함.
- Controlled inflammation을 조절하는 GALT는 peyer's patch, mesenteric lymph node, epithelial cell, lamina propia cell등으로 되어 있으며, 정상적인 환경에서는 점막의 면역학적 tolerance(관용)가 장관내의 세균 그리고 식이 항원들에 대하여 항상 유도됨. 그러나 break down 되면 장관 내 환경적인 인자에 대하여 과잉 유도되어 면역 응답을 민감하게 만들게 됨.
- 식이 항원과 미생물에 매일 접촉하고 있는 소화관에는 수많은 면역학적 무질서로 발생하는 염증성 장 질환과 같은 난치성 질환이 장관 조직에 나타나며, 장관 면역계 질환은 식이 요인과 깊은 관련이 있음.
- 장관면역계와 cytokine의 역할은 명확하며, 장관면역질환 환자들이 염증부위에서 tumor necrosis factor(TNF- α), interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8 생성이 현저하게 증가되었다는 연구 결과가 있으며²¹⁾, 따라서 cytokine 생산능이 매우 중요하며, 장관 면역계의 건강상태를 예측

할 수 있음.

- 식이섬유는 장내 미생물에 의해 발효되어 short-chain fatty acids(SCFAs)를 형성하고, 이는 장내 상피세포의 영양공급원으로 활용됨(장 에너지원의 70%). 따라서 다량의 식이섬유를 섭취하는 것은 장에 영양을 공급하여 장을 튼튼하게 하고 장의 기능을 정상화하는 데 기여함. 따라서 장내 유익균이 발효원으로 선호하는 식이섬유를 섭취하는 것은 장내 유익균의 수를 증가시킬 수 있으며, 이를 통해 장의 정상작용에 도움을 주며, 장의 barrier function을 향상시키고, 점막 mucin 생성 분비를 촉진시킬 수 있음. 또한 장의 permeability 감소를 통해 병원균과 독소의 침입을 저해하고, 장내 염증을 조절하여 암 발생의 위험을 줄이는 역할을 함. 특히 수용성 polysaccharide는 장관면역계에 긍정적인 영향을 미친다는 연구결과가 다수 보고되었음.
- 우리 발효식초에 함유되어 있는 다양한 영양성분 및 발효산물들이 이러한 장관면역의 조절에 영향을 준다는 사실을 확인하고 그 기작에 대하여 규명하고자 함.

연구 결과의 유용성

- 우리나라는 오래전부터 발효식초를 이용하여 다양한 형태의 음식에 맛과 보존성을 높이는 데 이용하여 왔으며, 최근에는 조미용 식초의 범위를 넘어서 건강 증진에 도움을 주는 식품으로 크게 각광받고 있음.
- 우리 전통발효 식초를 대상으로 한 기능성 규명과 그 유효성분에 대한 기작 규명에 대한 연구가 미흡한 실정이며, 따라서 현대인의 스트레스, 과로, 흡연, 음주 등 잘못된 생활습관으로 떨어진 면역 세포 활성화 및 간 기능에 도움이 되는 건강식품으로 그 영역을 확장하고자 함.
- 우리 농산물인 감, 현미, 사과 등의 대량 소비처 발굴을 통한 농가 소득 증대 및 관련 산업 발전에 기여 가능함.
- 전통발효식초의 기능성을 규명하여 식초의 가치를 재조명하고, 소비자들의 관심을 고조시키고, 발효식초를 이용한 제품을 다양화하여 손쉽고 편리하게 국민 건강 증진에 도움이 되고자 함.
- 건강증진에 도움이 되는 우리 전통발효 식초의 세계화에 본 연구결과를 활용한다면 우리 전통발효 식초의 우수성을 입증하게 될 뿐 아니라 한국 전통 발효문화의 우수성의 근거로 활용할 수 있다고 사료됨.

제 2 절. 연구 내용

1. 전통발효식초의 시료 선정

- 전통발효식초의 이화학적 분석을 통한 시료 선정
- 해외 유명 식초와 비교

2. 전통발효식초의 기능성 성분 분획법 수립

- 전통발효식초의 특성에 따른 분획으로 기능성 성분 분획법 수립 및 분획물 확보

3. 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가

- 전통발효식초의 장관면역 활성 기작 규명 (*in vitro*)
- *in vivo* 및 *ex vivo* 실험 통한 장관면역 기능성 검증
- Inflammatory bowel disease(IBD) 모델에서 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가 (*in vivo*)
- 전통발효식초의 장관면역 기능 물질 및 메카니즘 규명

4. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가

- 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vitro*)
- 알코올 스트레스에 대한 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vivo*)
- 전통발효 식초의 분획물의 간 보호 효과 평가 (*in vitro, in vivo*)를 통한 간 보호 기능 물질 및 메카니즘 규명

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 전통발효식초의 이화학적 분석을 통한 시료 선정

1. 식초 시료 Screening

한국 전통 식초의 우수성을 알아보기 위하여 시판 국내산 식초와 해외산 식초 중 전통 발효 방식으로 제조된 식초를 샘플링 하여 각 식초에 대한 성분 분석을 실시하였다. 시료 선정시 주안점은 주정초가 아닌 각 원료를 100%로 포함하는 식초를 선정하였다. 사과, 감, 현미 식초는 국내시판 제품 외 전통 초산 발효 방법으로 제조된 시료를 선정하였으며, 국내산 제품과 우수성을 비교하기 위해 시판되고 있는 일본산 현미 식초, 영국산 와인식초 제품을 선정하였다. 그 외 사과 식초와 감식초의 경우 해외 제품의 경우 원료로만 발효된 제품이 없으므로, 해외 제품과의 비교 분석은 불가하였다.

Table 1. 선정 시료의 분류

제품	원산지	사용원료
사과식초	국내산	사과 착즙 원액
감식초A	국내산	감
와인식초	국내산	포도
현미식초A	국내산	현미
현미식초B	국내산	현미
감식초B	국내산	감
현미식초A (마루시케)	일본산	현미
현미식초B (카고시마)	일본산	현미
현미식초C (카쿠이다)	일본산	현미
현미식초D (구로스)	일본산	현미
와인식초 (Aspall)	영국산	포도

2. Screening 시료 분석

가. 총산도 및 acetic acid 함량 분석 결과

식초의 총산을 알아보기 위하여 0.1M NaOH를 사용하여 titration method 법으로 총산을 측정하였으며, 이에 초산의 순도를 확인하기 위해 acetic acid 함량을 Roche 社(from Germany)의 acetic acid kit을 사용하여 정량 하였다. 총산도와 acetic acid 함량 분석 결과 국내산 제품이 해외 판매제품보다 acetic acid 의 순도는 약 3~5% 가량 낮은 것으로 도출되었다. 이는 국내산 제품에는 acetic acid 외 기타의 유기산(citric acid, lactic acid, malic acid)의 함량이 더 많이 포함된 것으로 유추할 수 있다.

Table 2. 선정 시료의 총산과 acetic acid 함량 분석 결과

원산지	제품	총산도 (%)	Acetic acid (%)	Acetic acid 순도(%)
국내산	사과식초	5.22	2.1	40.2
	감식초A	4.93	1.87	37.9
	와인식초	6.25	2.2	35.2
	현미식초A	4.65	1.9	40.8
	현미식초B	6.06	3.15	51.9
	감식초B	4.26	1.87	43.9
일본산	현미식초A (마루시케)	5.19	2.83	54.5
	현미식초B (카고시마)	4.47	2.28	51
	현미식초C (카쿠이다)	4.53	2.43	53.6
	현미식초D (구로스)	4.67	2.4	51.4
영국산	와인식초 (Aspall)	6.15	3.4	55.2

나. TN 및 아미노산 분석 결과

식초의 Total Nitrogen 함량 및 체내 흡수가 용이하면서 생리활성 물질로 알려진 아미노산을 분석하였다. Total Nitrogen은 Kjeldahl법으로 정량하였고, 아미노산 분석은 Biochrom 아미노산 분석기를 사용하여 분석 하였다. 분석 결과 국내산 식초의 경우 발효 과정 중에 단백질이 아미노산화로 진행된 것을 확인하였고, 현미를 원료로 한 식초가 다른 식초들에 비해 TN 및 아미노산 함량이 높게 나타났다.

Table 3. 식초의 TN 및 아미노산 분석 결과

원산지	제품	TN (%)	총아미노산 (%)	유리아미노산 (%)
국내산	사과식초	0.012	0.04	0.04
	감식초A	0.038	0.14	0.14
	와인식초	0.038	0.17	0.1
	현미식초A	0.15	0.66	0.28
	현미식초B	0.06	0.24	0.12
	감식초B	0.035	-	-
일본산	현미식초A (마루시케)	0.17	-	-
	현미식초B (카고시마)	0.134	-	-
	현미식초C (카쿠이다)	0.144	-	-
	현미식초D (구로스)	0.125	-	-
영국산	와인식초 (Aspall)	0.022	-	-

다. 항산화 물질(Polyphenol) 및 장관 면역 활성 물질 (Polysaccharide) 분석 결과

시료에 대해 항산화 물질인 Polyphenol 함량을 BioGamma (from Italy) kit을 이용하여 정량하였고, 장관 면역 활성 물질인 crude polysaccharide는 H₂SO₄를 사용하여 titration method로 측정하였다. 분석 결과 국내산 식초의 경우 장관 면역 활성 물질로 여겨지는 crude polysaccharide의 함량이 월등히 높은 것을 확인하였다. 사과식초는 다른 식초들과 비교하여 polyphenol과 polysaccharide 함량 모두 낮게 나타났으며, 국내산 와인식초와 국내산 현미식초에서 polysaccharide 함량이 두드러지게 높게 나타났다.

Table 4. 식초의 Total polyphenol, Total polysaccharide 함량 분석

원산지	제품	Total polyphenol (g/L)	Total polysaccharide (%)
국내산	사과식초	0.044	0.18
	감식초A	0.161	1.19
	와인식초	0.423	31.5
	현미식초A	0.347	16.26
	현미식초B	0.19	5.3
	감식초B	0.438	3.05
일본산	현미식초A (마루시케)	0.745	0.5
	현미식초B (카고시마)	0.523	0.44
	현미식초C (카쿠이다)	0.705	0.59
	현미식초D (구로스)	0.536	0.24
영국산	와인식초 (Aspall)	0.543	0.45

상기와 같이 이화학적 특성 분석 결과를 비교하여 1차적으로 국내 식초 4종, 해외 식초 2종(국내산 사과식초, 국내산 감식초B, 국내산 현미식초A, 국내산 와인식초, 일본산 현미식초B (카고시마), 영국산 와인식초)를 선별하였다.

제 2 절. 전통발효식초로부터 면역 활성이 우수한 다당체의 분리 및 우수 식초의 선별

1. 연구방법

가. 국내의 전통 식초로부터 조다당의 분리

각각의 전통식초는 각각 5배 농축하여 초산 및 휘발성 성분을 제거하고 약 4배 부피(v/v%)의 95% EtOH을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 원심분리(6,000 rpm, 30 min, 4°C)하여 침전물을 얻었다. 이후 각각의 침전물들은 증류수에 재용해한 다음 dialysis tubing (MW cut off 12,000, Sigma)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하였으며 동결건조(FreeZone 12 Liter, Labconco Co., Kansas city, KS, USA)하여 국내의 전통 발효식초 조다당 6종을 분리하였다.

나. 일반성분 분석

국내 외 전통 식초로부터 분리한 조다당 6종의 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법으로, 각각 정량 분석하였다.

다. 구성당 분석

구성당 분석은 Albersheim 등의 방법을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화하여 GC를 이용하여 분석하였다. 다당 시료를 2 M TFA (trifluoroacetic acid) 중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 mL의 1 M NH₄OH 용액에 용해하여 10 mg의 NaBH₄로 4시간 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 이 후 각각의 alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H₂O 2상 용매 계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. Alditol acetate 유도체의 GC분석 조건은 Table 1과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

라. HPLC에 의한 정제 다당의 분자량 측정

국내외 전통 식초로부터 분리한 조다당 6종의 분자량 측정을 위해 SuperdexTM 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 Table 5의 분석조건으로

HPLC (High performance liquid chromatography)를 통해 분석하였다. 분자량 측정 시 이용된 표준물질인 pullulan series (P-200, 100, 50, 20 및 10)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 각 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준곡선으로부터 환산하여 분자량을 결정하였다.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_t : total volume
 V_o : void volume
 V_e : elution volume of sample

Table 5. Analytical conditions of HPLC for the determination of molecular weight of polysaccharides

Pump	SP-930D (YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive index (356-LC, Varian, USA)
Column	Superdex™ 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)
Column size	10 × 306 mm
Column temp.	25°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)
Injection vol.	20 µL
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

마. β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino-β-3,6-galactan (type-II)의 존재 확인 및 정량

Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법에 따라 single radical 젤 확산 법으로 측정하였다. 즉, β-Glucosyl Yariv reagent 10 µg/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 well을 만들어 농도별로 희석한 표준물질 gum arabic과 시료 5 µg을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였으며, 이 평판을 습윤상태에서 25 °C에서 15시간 정치시켜 반응시키고 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여 arabino-β-3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였다. 시료와 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다.

바. 세포배양 및 사이토카인 측정

면역활성 측정을 위한 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 U/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin 및 125 ng/mL의

fungizone과 amphotericin B를 함유한 minimum essential medium (MEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2~3일 간격으로 계대하면서 배양하였다. 이후 2.5×10⁶ cells/mL 조정된 RAW 264.7 세포 100 μL을 flat-bottomed 96-well microplate에 분주한 후, 10% FBS/MEM 배지에 용해한 조당 시료를 1.6~1,000 μg/mL의 농도가 되도록 연속 희석하여 세포가 배양된 well plate에 100 μL를 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 세포배양액 상등액을 회수하고 상등액 중에 유도된 cytokine의 함량은 sandwich ELISA set (BD biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)의 introduction manual에 의해 분석하였다.

2. 연구결과

가. 국내외 전통 식초로부터 조다당획분의 분리

상기와 같이 이화학적 분석 결과를 통해 1차 스크리닝한 국내외에서 시판 또는 생산되는 전통발효식초 6종, 즉 국내산 전통식초 4종 [국내 사과 식초, 국내 와인 식초, 국내 현미 식초, 국내 감식초]과 국외 시판되고 있는 전통 발효식초 2종 [영국 와인식초, 일본 현미 식초(가고시마 흑초)]을 수집하여 실험에 사용하였다.

수집된 6종의 전통식초는 각각 5배 농축하여 초산 및 휘발성 성분을 제거하고 4배 부피 (v/v)의 95% ethanol을 가하여 다당을 침전시킨 후, 투석 및 동결건조를 행하여 조다당 획분 6종을 조제하였다 [국내 사과식초(KAV-0), 국내 와인식초(KWV-0), 국내 현미식초(KBV-0), 국내 감식초(KPV-0), 영국 와인식초(UWV-0), 일본 현미식초(JBV-0)](Fig. 1).

각각의 전통 발효 식초에 존재하는 조다당을 회수한 결과, 국내 와인식초 유래 조다당 KWV-0의 수율이 0.45%로 가장 높았으며, 국내 사과식초 유래 조다당 APV-0는 0.02%로 가장 낮은 수율을 나타내었다(Table 6).

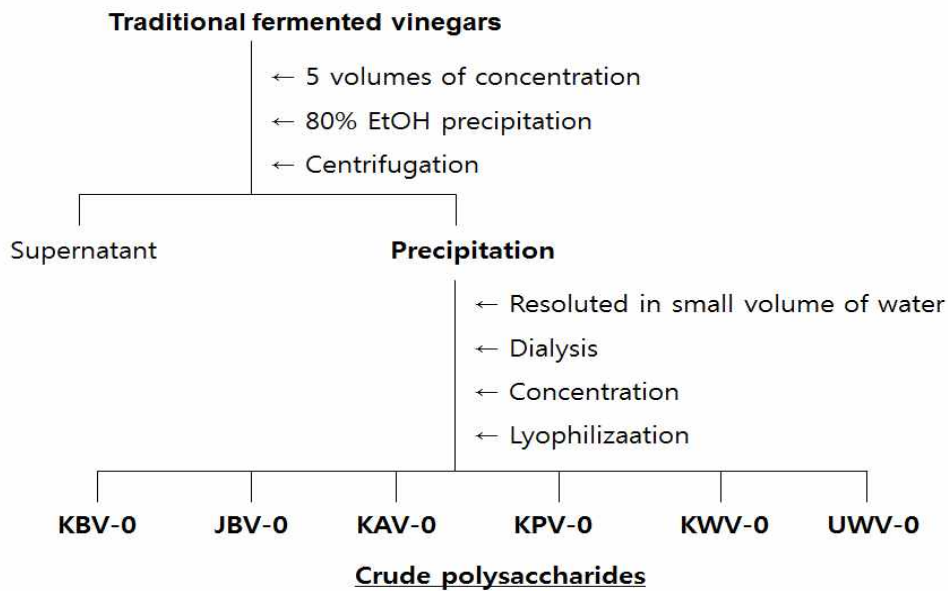


Fig. 1. Isolation of crude polysaccharides from six different traditional vinegars.

나. 국내외 전통식초로부터 분리한 다당의 화학적 특성

6종의 전통식초 유래 조다당을 대상으로 일반 화학특성을 분석한 결과, 국내 사과식초 유래 조다당 KAV-0, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0, 국내 와인식초 유래 조다당 KWV-0는 모두 중성당이 87.0% 이상으로 구성되어 있었으며, 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0와 영국 와인식초 유래 조다당 UWV-0는 중성당 약 78.0%, 산성당 21.0%로 비슷하게 구성되어 있었다. 한편 각 조다당 시료에는 단백질 또는 일반적으로 식물체 추출물 및 발효물에서 발견되는 TBA-positive material (KDO)는 6종의 시료에서 모두 함유되어 있지 않았다(Table 6).

Table 6. Chemical properties of crude polysaccharides from six different traditional vinegars

	사과식초 (국내) KAV-0	감식초 (국내) KPV-0	현미식초 (국내) KBV-0	현미식초 (일본) JBV-0	와인식초 (국내) KWV-0	와인식초 (영국) UWV-0
Yield	0.23g (0.02%)	0.62g (0.08%)	0.96g (0.1%)	0.5g (0.07%)	4.18g (0.45%)	0.44g (0.04%)
Chemical properties	(%)					
Neutral sugar	89.0±2.6	78.4±1.1	87.6±2.5	92.2±2.4	87.9±0.5	78.9±0.7
Uronic acid	11.0±0.5	21.6±5.1	12.4±0.4	7.8±0.4	12.1±0.1	21.1±0.3
KDO-liked material	-	-	-	-	-	-
Protein	-	-	-	-	-	-
Sugar component	(Mole%)					
Rhamnose	12.9±0.4	24.8±0.3	2.2±0.1	6.2±0.3	6.1±0.2	13.2±0.3
Fucose	0.1±0.0	1.3±0.0	0.4±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	1.5±0.0
Arabinose	13.2±0.1	18.6±0.2	5.5±0.2	13.0±0.4	8.6±0.2	15.8±0.2
Xylose	0.8±0.1	1.4±0.1	6.2±0.3	17.2±0.4	0.4±0.0	1.3±0.5
Mannose	35.1±3.7	9.2±0.1	23.1±0.1	28.6±0.5	10.4±0.2	28.0±0.3
Galactose	12.5±5.0	13.1±0.2	9.8±0.1	9.7±0.3	4.8±0.1	15.9±0.3
Glucose	13.8±0.9	10.1±0.2	40.1±0.4	17.4±0.6	56.9±0.6	3.2±0.1
GalA+GlcA	11.0±0.5	21.6±5.1	12.4±0.4	7.8±0.4	12.1±0.1	21.1±0.3

6종의 국내외 전통 발효 식초 유래 각 조다당 획분들의 구성당 분석을 alditol acetate 법으로 분석한 결과(Table 6 및 Fig. 2), 국내 사과식초 유래 조다당 KAV-0, 국내 감식초 유래 조다당 KPV-0, 영국 와인식초 유래 조다당 UWV-0는 대부분 rhamnose, arabinose, mannose 및 galactose로 주로 구성하고 있었으며, 특히 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0는 mannose 28.6%, xylose 17.2%, arabinose 13.0%를 높은 비율로 함유하고 있어 타 식초 유래 조다당과는 다른 조성을 나타내었다.

특히, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 국내 와인식초 유래 조다당 KWV-0는 glucose를 각각 40.1%, 56.9%의 높은 비율로 함유하고 있었다. 이는 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0의 경우, 발효 중 미생물이 생산하는 amylase에 의해 분해되지 않은 limit dextrin이 높은 비율로 존재함을 시사하였으며, 국내 와인식초 유래 조다당 KWV-0는 재료 또는 보당과

정 중에 첨가된 당이 투석과정 중 분리되지 않은 glucose로 존재할 가능성이 예견되었다.

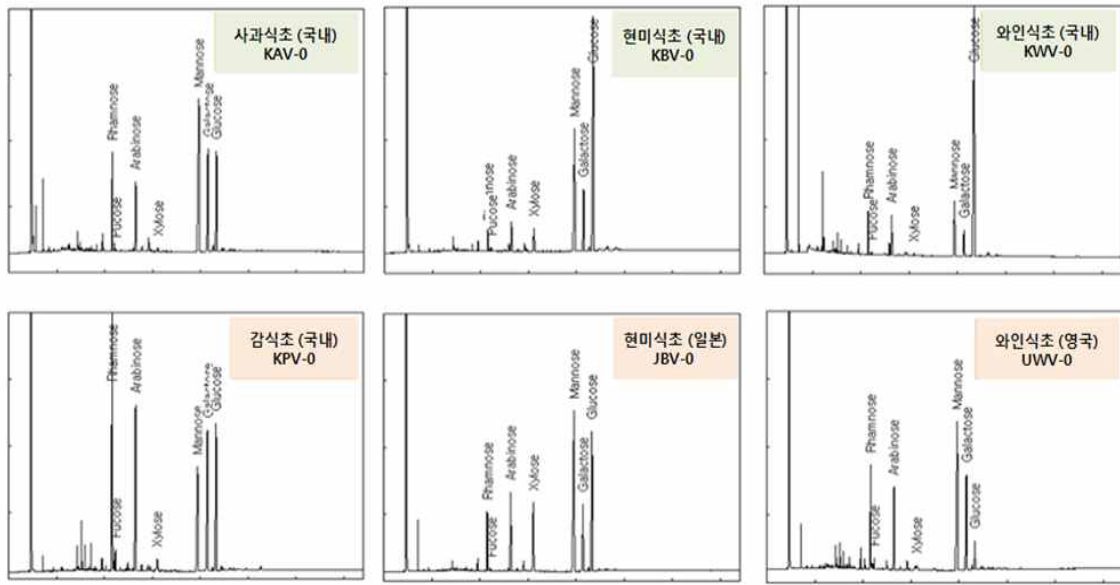


Fig. 2. GC chromatograms of component sugar of six crude polysaccharides isolated from traditional vinegars.

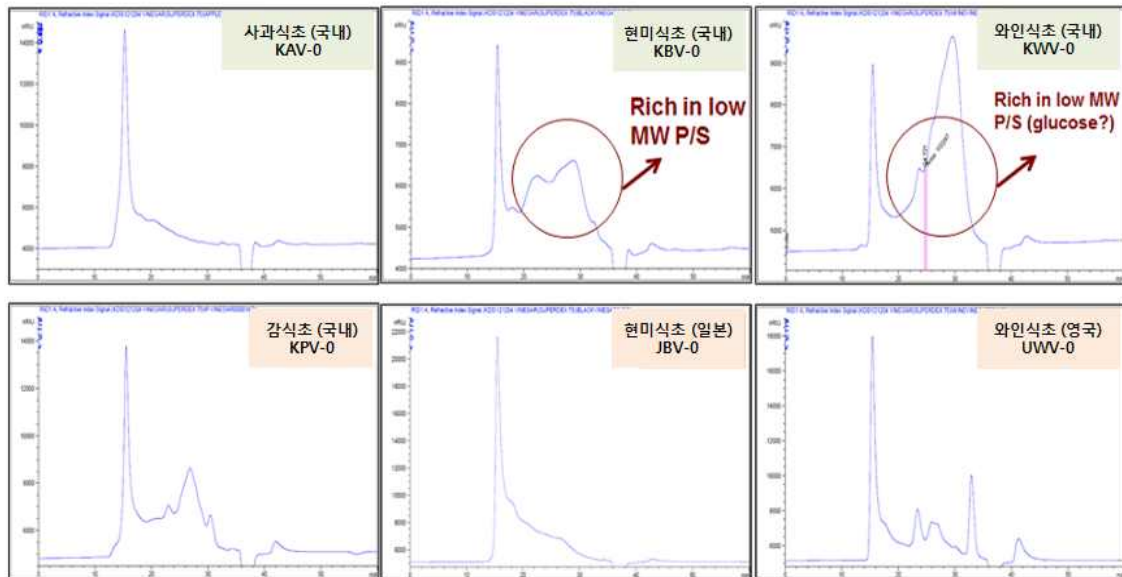


Fig. 3. Elution patterns of six crude polysaccharides isolated from traditional vinegars on size-exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75 GL column.

한편, 6종의 조다당 희분은 50 mM ammonium formate (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex 75 GL column를 이용하여 HPLC를 행하여 전체 구성 다당의 분자량에 따른 분포를 관찰한 결과, Fig. 3의 chromatogram에서와 같이 국내 사과식초 유래 조다당 KAV-0와 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0의 경우, 다른 시료들에 비해 고분자 다당만을 주 구성분자로 함유하고 있었다. 또한, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 국내 와인식초 유래 조다당 KVV-0는 Table. 6의

구성당 결과에서 glucose를 다량 함유하고 있었는데, Fig. 3에 나타난 바와 같이 타 시료에 비해 분자량이 상이한 저분자 다당이 다량 검출되었으며 이는 oligo당 또는 limit dextrin 형태의 저분자 glucan이 발효과정 중에 식초에 용해되어 존재함을 추정케 하였다.

다. 국내의 전통 식초로부터 분리한 조다당이 대식세포의 cytokine 생산에 미치는 영향

대식세포(Macrophage)는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 TLR(toll-like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다.

IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있다. IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되었으며, TNF- α 는 특정암세포에 대한 세포독성과 항 바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

국내의 전통 발효 식초 유래 다당 시료의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정된 결과, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0는 모두 농도 의존적으로 IL-6의 생산을 촉진하였으며, 시료농도에 따른 생산자극 pattern 또한 두 시료가 유사함을 확인하였다(Fig. 4). 특히 국내 사과식초 유래 조다당 KAV-0 및 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0는 1.6 ~8 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 저농도에서도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도와 유사정도의 양호한 IL-6의 생산 유도활성을 나타내었다.

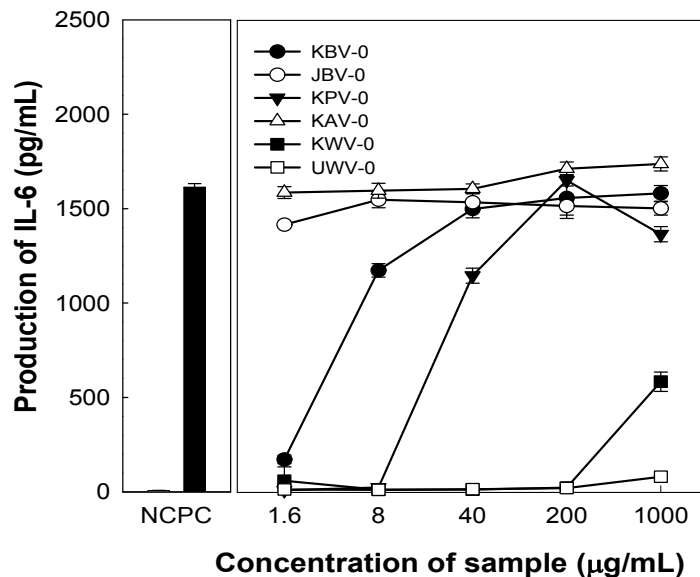


Fig. 4. Effect of crude polysaccharides from traditional vinegars on the production of cytokine(IL-6) by peritoneal murine macrophages.

반면, 국내 와인식초 유래 조다당 KWV-0와 영국 와인식초 유래 조다당 UWV-0는 다른 4종의 시료에 비해 상대적 활성이 매우 낮았으며, 특히 영국 와인식초 유래 조다당 UWV-0는

1,000 µg/mL의 고농도에서도 활성을 거의 나타내지 않는 특성을 보였다. 특히 IL-6의 경우에는 T 세포와 B 세포 분화에 관여하여 항암효과가 있다고 보고되고 있기 때문에 이를 통해 국내 사과식초 유래 조다당 KAV-0, 국내 감식초 유래 조다당 KPV-0, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0는 항암효과에도 효율적으로 작용할 가능성이 있는 것으로 기대되었다.

이상의 결과로부터 국내외 전통 발효 식초 6 종을 대상으로 다당류를 분리하여 화학적 특성, 다당 수율 및 면역활성을 검토한 결과, 조다당 수율이 우수하고 macrophage 자극에 의한 cytokine의 생산유도활성이 모두 양호한 시료 3종을 선택하여 추후 실험을 진행하기로 하였는데, 수율 및 면역활성이 모두 양호한 국내 현미식초 (KBV-0), 국내산 감식초 (KPV-0) 및 일본 현미식초(JBV-0)의 3종이 최종적으로 선정되어 추후의 실험에 사용되었다.

제 3 절. 전통발효식초의 특성에 따른 분획법 수립 및 분획물 확보

1. 연구방법

가. NPLC

전통 발효식초 중 3가지 샘플인 국내산 현미식초, 일본산 현미식초 및 국내산 감식초의 기능성 성분의 profiling 및 분획법을 확립하기 위하여 식초 시료를 methanol로 추출한 후 ion exchange chromatography column을 도입한 NPLC를 이용하여 분석하였으며, 분석 방법은 Fig. 5와 같다.

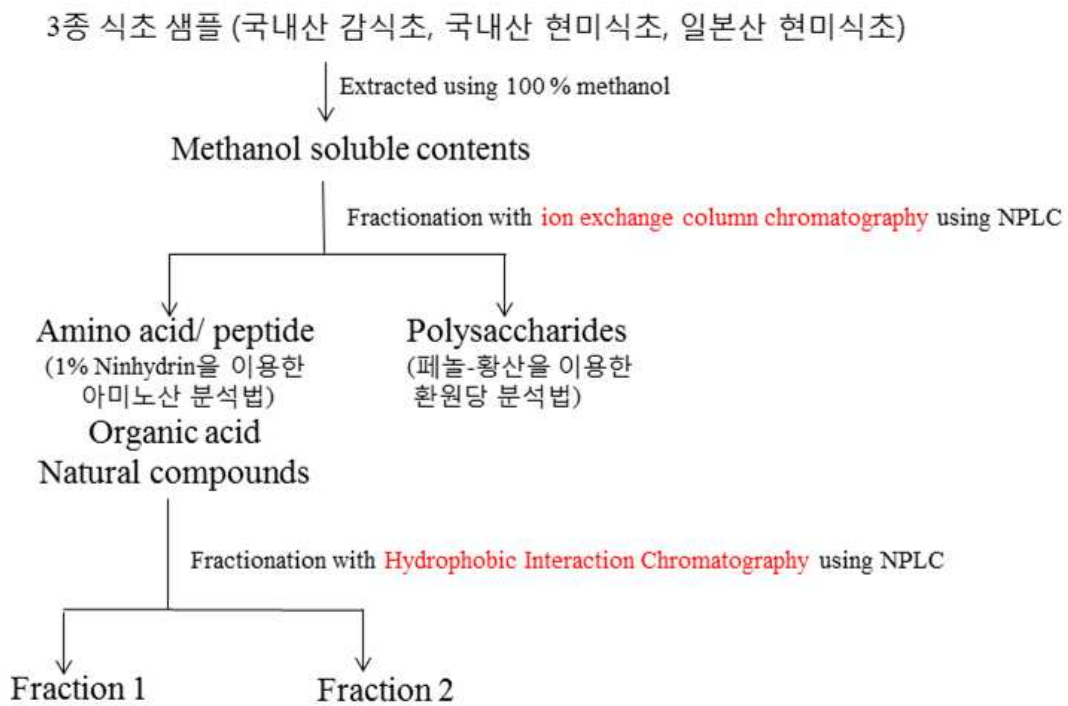


Fig. 5. 3종의 식초 샘플 분획 방법 process

나. 간보호 및 장관면역 기능성분 분리 및 대량 분리법 확립

1) 전통발효식초 유효성분의 프로파일 및 함량 측정

전통발효식초 중 국내산 감식초 및 국내산 현미식초에서 기능성 성분의 분리를 위하여 에탄올 침전법을 적용하여 분획을 실시하여 각 샘플별로 3가지의 샘플을 제조하였다. 총 6가지의 샘플을 UPLC-QTOF-MS를 이용하여 향산화 물질을 정성 및 정량하였다.

2) 기능성분 정제 및 대량 분리법 확립

국내산 감식초 및 국내산 현미식초를 각각 25kg를 이용하여 에탄올 침전법으로 대량으로 분리하였다. 증발농축기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 에탄올을 1:3비율로 첨가하여 20시간 저온침전시킨 후 동결건조를 거쳐 대량의 식초 샘플을 제조하였다.

다. 일반성분 분석

국내산 감식초 및 국내산 현미식초의 분획에 따른 일반성분의 변화를 알아보기 위하여 식품공전상의 AOAC에 준하는 식품 분석법에 의하여 각각의 분획에 대한 일반성분을 분석하였다. 국내산 감식초 및 국내산 현미식초의 분획에 따른 식초의 Total Nitrogen 함량 및 체내 흡수가 용이하면서 생리활성 물질로 알려진 아미노산을 분석하였다. 아미노산 분석은 Biochrom 아미노산 분석기를 사용하여 분석하였다.

라. 식초의 기능성 지표물질인 유리 및 결합형 ferulic acid의 분석

1) Free-ferulic acid 검출을 위한 시료의 전처리

- ① 식초 샘플을 100% MeOH를 이용하여 3반복 추출 후 동결건조하여 추후 분석에 사용 하였다.
- ② 2g의 동결건조 샘플을 2M NaOH 10ml을 첨가하여 30℃. 18시간 동안 분해하였다.
- ③ 4,000 rpm for 15 min at 10℃ 조건에서 원심분리 후 상등액을 수거하였다.
- ④ 상등액을 6M HCl로 산화시킨 후, pH를 2.0으로 조정하였다.
- ⑤ pH 조정된 용액을 ethyl acetate (1:1,v/v)로 5번 반복하여 추출하고 4,000 rpm for 30 min at 10℃조건에서 원심분리후, 농축기를 이용하여 농축 후 동결건조하였다. 실험 시 70% MeOH에 용해시킨 후 0.2 μ m filter에 여과 후 냉장보관하면서 실험을 진행하였다.

2) Total ferulic acid 검출을 위한 시료의 전처리

- ① 2g의 동결건조 샘플을 2M NaOH 10ml을 첨가하여 30℃. 18시간 동안 분해하였다.
- ② 4,000 rpm for 15 min at 10℃ 조건에서 원심분리 후 상등액을 수거하였다.
- ③ 상등액을 6M HCl로 산화시킨후, pH를 2.0으로 조정하였다.
- ④ pH조정된 용액을 ethyl acetate (1:1,v/v)로 5번 반복하여 추출하고 4,000 rpm for 30 min at 10℃조건에서 원심분리후, 농축기를 이용하여 농축 후 동결건조하였다. 실험 시 70% MeOH에 용해시킨 후 0.2 μ m filter에 여과 후 냉장보관하면서 실험을 진행하였다.

마. UPLC-QTOF-MS를 이용한 식초의 기타 항산화 물질 정성 및 정량 방법

1) UPLC조건

LC-MS profiling 실험을 수행하기 위하여 binary solvent delivery system and an autosampler. chromatographic separation was carried out on an ACQUITY UPLC BEH C18

column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm, 40°C)시스템을 갖춘 ACQUITY UPLC system (Waters Co.,MA, USA)을 사용하여 실험을 진행하였다.

실험에 사용한 mobile phase는 0.1% formic acid in Water as solvent A and 0.1% formic acid in acetonitrile as solvent B 조건이었다. 분리조건은 gradient elution : 0 min 95% A, 3min 80% A, 5 min 50% A, 7.5 min 0% A with the flow rate 600 μl/min이었다. 샘플의 injection volume은 5μl 이었다.

2) MS조건

식초 샘플 분석을 위하여 Synapt G2 HDMS (Waters Co.,MA, USA)을 이용하여 accurate mass measurement and MS/MS fragmentation analysis을 진행하였다. ESI mass spectra는 scanning over the m/z range 100-2,000 스캐닝에 의해서 positive and negative ion electrospray ionization mode에서 측정하였다.

ESI capillary voltage는 3.0 Kv and 2.5 kv이었다. electrospray source and desolvation gas의 온도는 각각 120 °C와 400 °C였다. Independent reference lock-mass ions로는 Leucine-enkephalin을 사용하였으며, mass accuracy 와 reproducibility을 위해서 LackSpray을 이용하여 진행하였다. Collision energy는 energy lamping mode에서 25 에서 45 V까지 설정하여 분석하였다.

2. 연구결과

가. 전통발효식초의 특성에 따른 분획 및 생리활성 물질 profiling

3종 식초를 Ion exchange chromatography 방법(IEX)을 활용하여 분리한 결과 Fig. 6에서와 같이 이온 컬럼에 흡착하지 못하고 washing된 분획에서 페놀-황산 발색법에 의해 다당류 부분이 분리되어 용출됨을 확인하였다.

NaCl gradient에 의해 탈착되어 유리되는 분획은 Hydrophobic interaction chromatography 및 Q-TOF-MS장비를 활용하여 유효성분을 분석하였다. Fig. 7에서와 같이 IEX 실험에서 흡착된 분획을 Hydrophobic interaction column을 활용하여 분석한 결과 모든 유효성분이 컬럼에 흡착하지 않고 탈착되는 결과를 보여주었다.

식초에 있는 유효성분 중 다당류를 제외한 유효성분의 분리는 유기용매를 이동상으로 활용하고 소수성 컬럼도 기존 Hydrophobic interaction column인 C4에서 C18급으로 변경하여 활성 성분을 분리하는 작업이 필요함. 그러므로 컬럼에 의한 분획보다는 IEX에서 분리된 분획의 생리활성 물질의 profiling을 Q-TOF-MS를 이용하여 분석하였다.

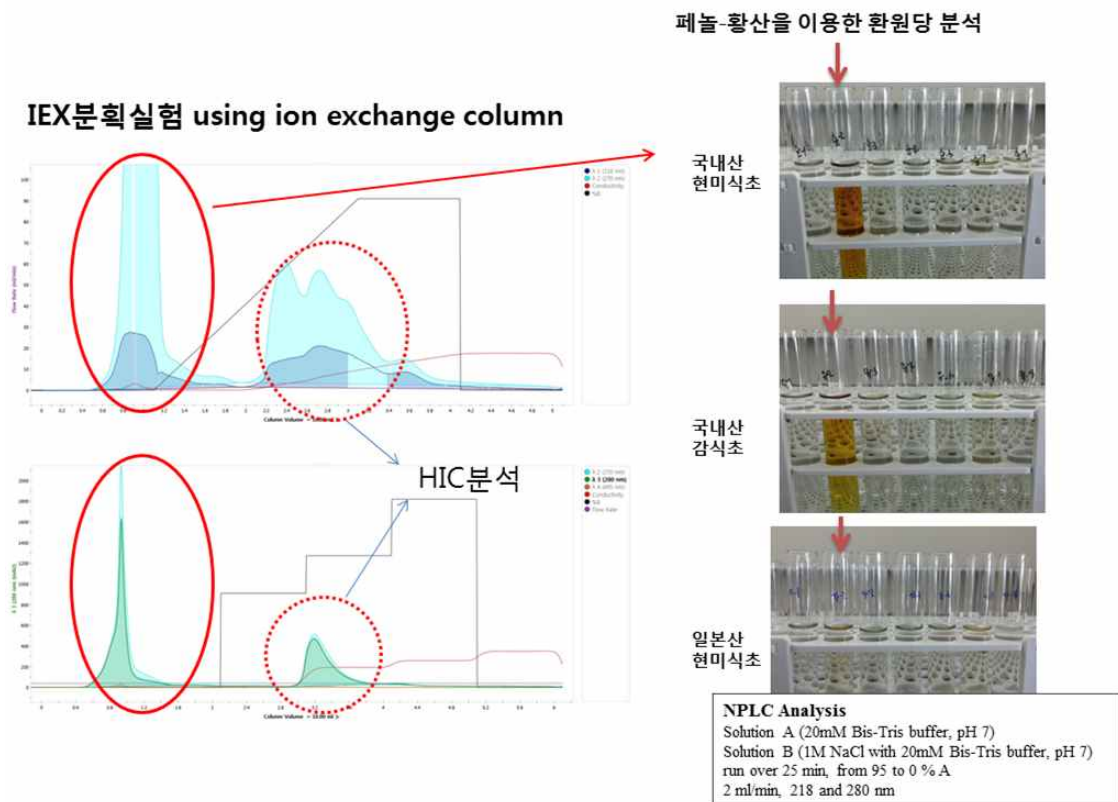


Fig. 6. Ion exchange chromatography를 이용한 식초 샘플의 분리

Hydrophobic interaction chromatography – binding buffer scouting

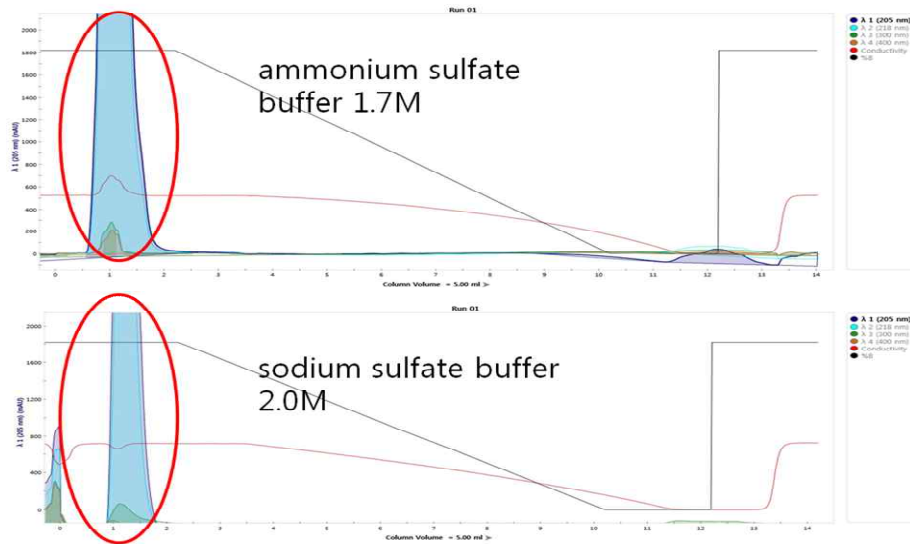


Fig. 7. Hydrophobic interaction chromatography를 이용한 IEX분획 분리 결과

Fig. 6.에서와 같이 IEX에 의해 분획된 샘플 3종을 UPLC-Q-TOF-MS를 이용하여 분석하여 각 식초샘플의 chromatography가 매우 다른 양상을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 8). 유효 생리활성 성분을 확인하기 위하여 대표적인 peak의 정성을 MassLynx 프로그램(WATERS, UK)의 elemental composition 기능을 활용하여 formula를 예측하였으며, 후보물질은 www.chemspider.com에서 확인하였다. 각각의 후보물질은 ChemDraw 프로그램을 이용하여 구조식에 대한 Mol. 파일을 얻어 MS/MS의 fragmenaton시 사용하여 정확한 유효성분을 identification하였다.

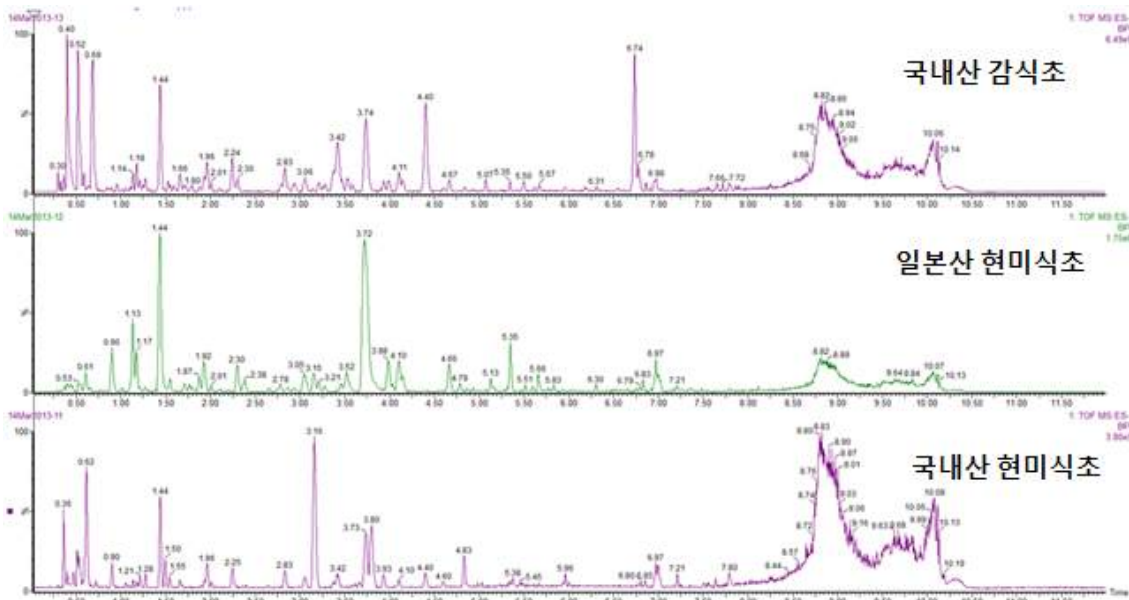


Fig. 8. UPLC-Q-TOF-MS를 활용한 식초 샘플 IEX분획의 chromatography

Fig. 9.에서와 같이 3가지 식초 샘플의 공통적인 대표 peak인 Rt=1.4분에 대한 1차 MS값

확인 결과 181.0503 m/z을 나타내었으며, elemental composition을 수행한 결과 분자식 C₉H₉O₄로 0.0PPM 수준에서 분석되었음. 또한 Rt=1.44 peak의 MS/MS fragmentation analysis 수행 결과 181.0498, 163.0396, 135.0445 m/z의 3가지 이온값이 acetic acid와 일치하여 3가지 식초 샘플에서 존재하는 Rt=1.44 peak은 acetic acid로 최종 확인되었다.

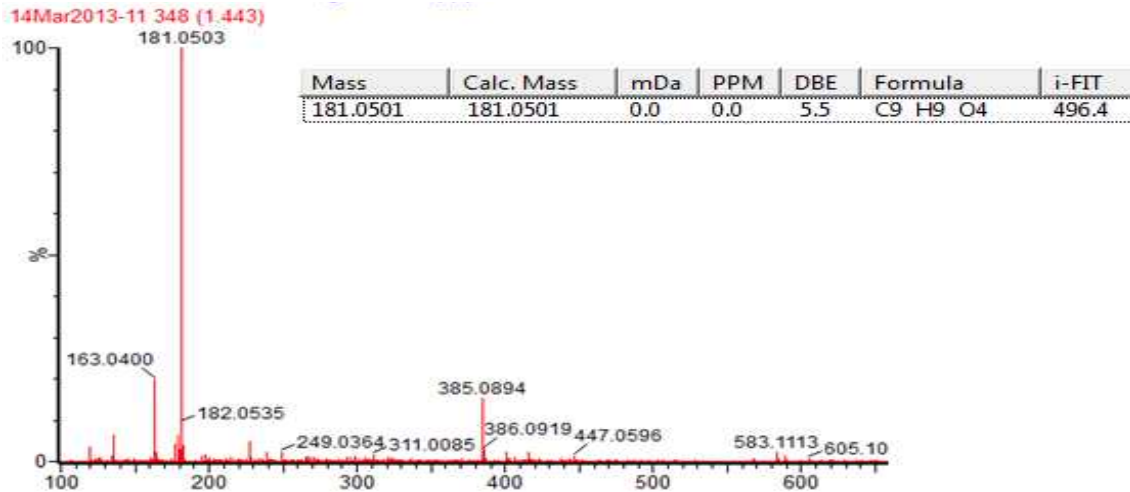


Fig. 9. Rt=1.44 peak의 elemental composition 결과

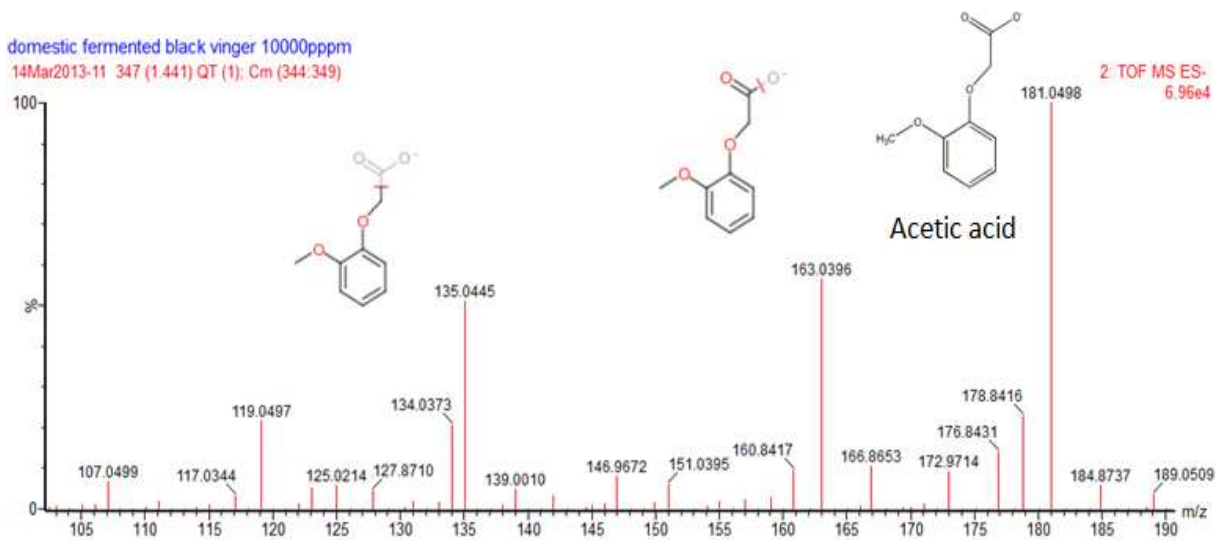


Fig. 10. Rt=1.44 peak의 MS/MS fragmentation analysis 결과

식물성 원료를 사용하여 제조된 식초에서 보고되는 생리활성 물질 중 항산화에 관계되어 보고된 물질인 ferulic acid의 MS값인 193.05 m/z를 이용하여 XIC를 수행하여 193.05 m/z값만 뽑아서 그래프화하였는데, Fig. 11에서와 같이 표준물질인 ferulic acid와 비교하여 일본산 현미 식초와 국내산 현미식초에서는 ferulic acid가 존재함을 확인하였으나 국내산 감식초에서는 전혀 검출되지 않았다. 정확한 정성을 위해 MS/MS fragmentation analysis를 수행하였는데 (Fig. 11), 그 결과 일본산 현미식초와 국내산 현미식초에서 발견되는 Rt=4.06 peak가 정확히 ferulic acid임을 확인할 수 있었다.

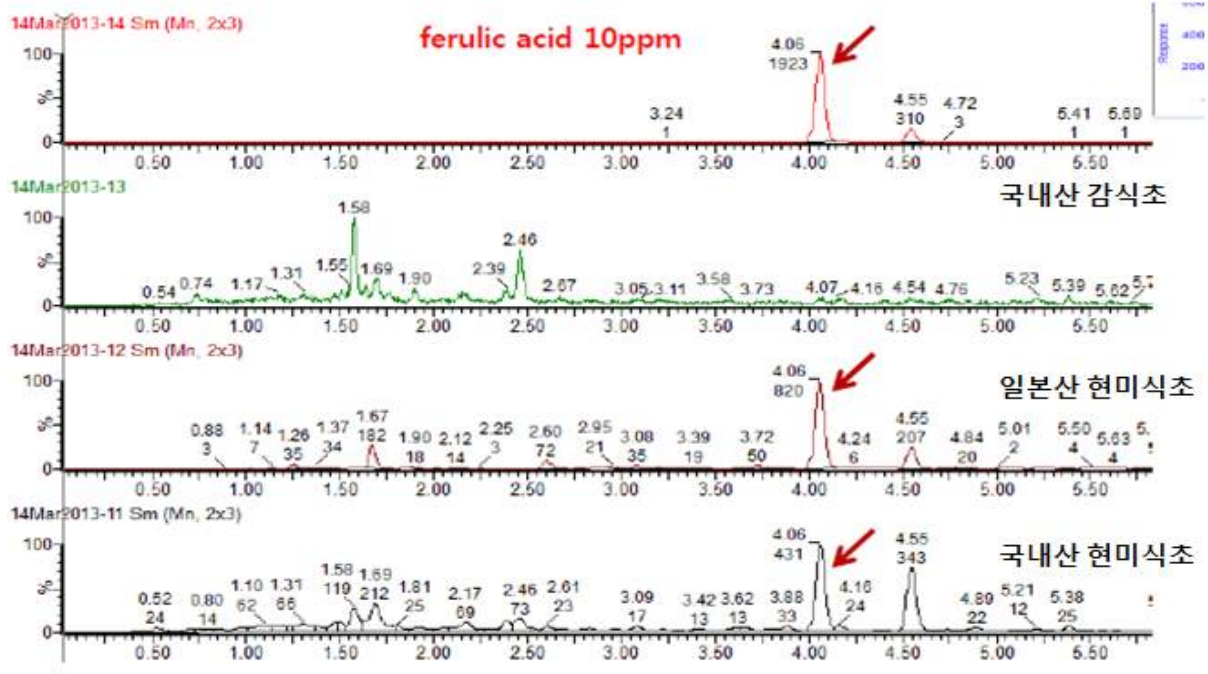


Fig. 11. Rt=4.06 peak의 XIC chromatography

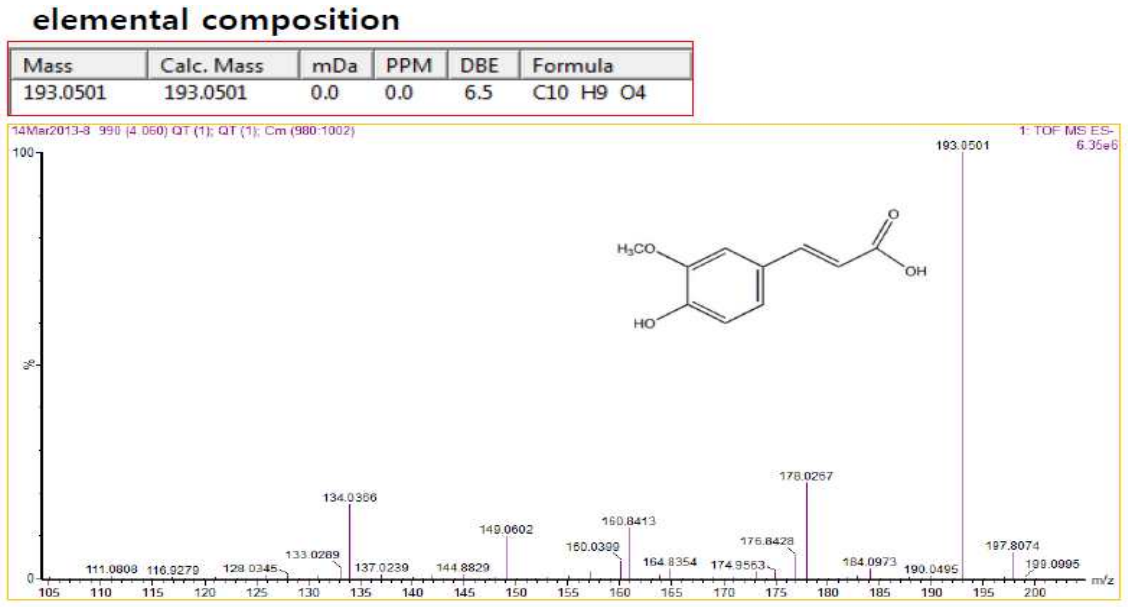


Fig. 12. Rt=4.06 peak의 MS/MS fragmentation analysis 결과

상기와 같은 방법을 이용하여 phenolic acid 중 hydrocinnamic acid 계열인 ferulic acid 이외의 항산화 지표물질인 caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, vanillic acid, 4-hydroxybenzoic acid 및 3,4-dihydroxybenzoic acid에 대하여 분석을 진행하였는데, 식초 3종의 IEX분획물에서 Fig. 13과 같은 총 8가지의 항산화 지표물질을 분석에 이용하였다.

분석 결과 acetic acid 및 신규물질 1종을 포함하여 총 7가지의 물질이 분석되었으며, 지표물질 중 caffeic acid는 3종의 식초 샘플 모두에서 존재하지 않았다.

compound	Retention time(t_R), min	Formula [M-H] ⁻	[M-H] ⁻ (m/z)
Caffeic acid	2.16	C ₉ H ₇ O ₄	179.0344
P-Coumaric acid	3.25	C ₉ H ₇ O ₃	163.0396
Ferulic acid	4.06	C ₁₀ H ₉ O ₄	193.0500
Sinapic acid	4.26	C ₁₁ H ₁₁ O ₅	223.0607
Syringic acid	2.56	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450
Vanillic acid	2.24	C ₈ H ₇ O ₄	167.0345
4-hydroxybenzoic acid	1.69	C ₇ H ₅ O ₃	137.0240
3,4-dihydroxybenzoic acid	1.17	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188

Fig. 13. 식초 3종의 IEX분획물에서 분석에 이용된 향산화 지표물질

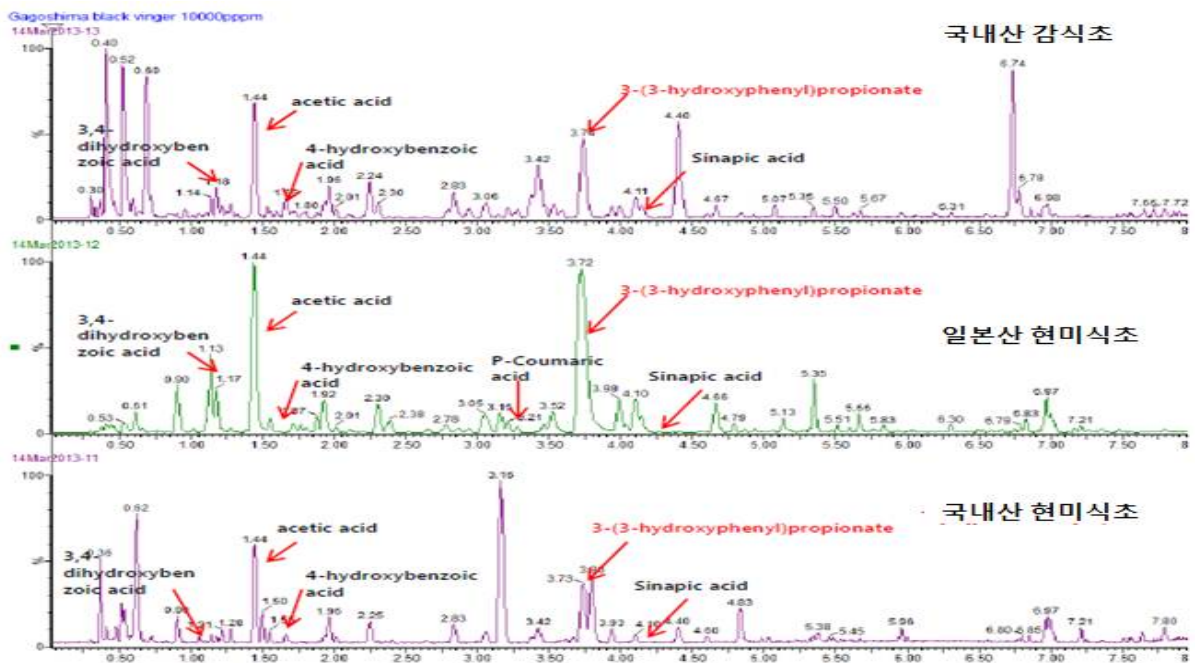
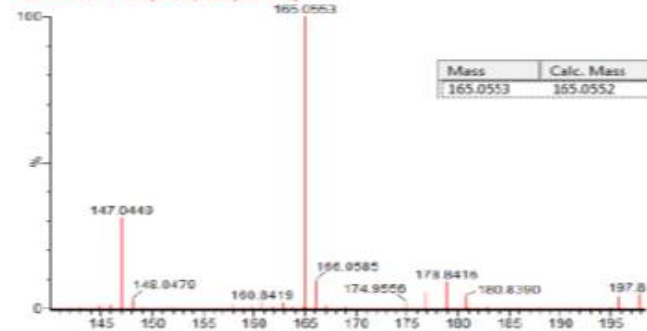


Fig. 14. 3종의 식초 IEX분획에 대한 생리활성 성분 정성 결과

한편, 3종의 식초 모두에서 기존 식초에서 보고된 바 없는 신규물질인 Rt=3.72 peak이 검출되었는데, 신규 물질은 elemental composition 결과 165.0552 m/z의 분자량 값을 나타내었으며, 분자식은 C₉H₁₀O₃를 나타내었고 www.chemspider.com에서 후보물질을 검색하고 MS/MS fragmentation을 진행하여 신규물질이 3-(3-hydroxyphenyl)propionate임을 확인하였다 (Fig. 15).

domestic fermented black vinegar 10000ppm

14Mar2013-11 913 (3.733) Cm (904.917)



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT
165.0553	165.0552	0.1	0.6	5.5	C9 H8 O3	1465.7

3-(3-hydroxyphenyl)propionate
로 정성됨

MS/MS fragmentation result

domestic fermented black vinegar 10000ppm

14Mar2013-11 910 (3.734) GT (1): Cm (906.916)

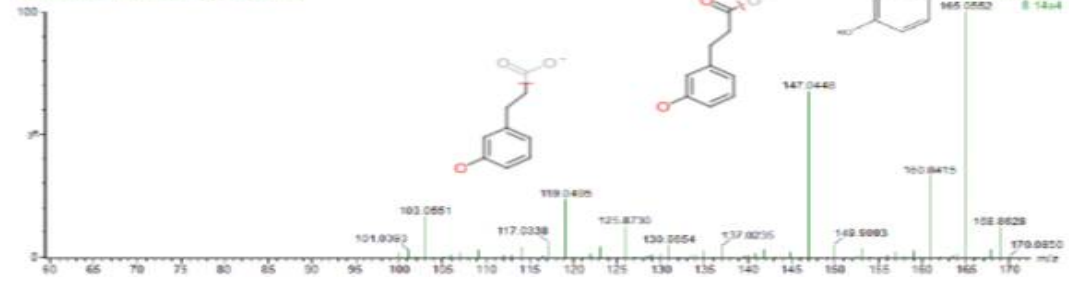


Fig. 15. Rt=3.72 peak의 MS/MS fragmentation analysis 결과

나. 간보호 및 장관면역 기능성분 분리 및 대량 분리법 확립

1) 기능성 성분 정제 및 대량 분리법 확립

분리할 식초 실험원료는 항산화 및 면역 활성이 우수했던 국내산 감식초 및 국내산 현미식초를 선택하였으며, 식초에서 생리활성 다당류를 분리하기 위하여 에탄올 침전법을 사용하였다. 즉, 국내산 감식초, 현미식초 25.2kg에 3배에 해당하는 75%에탄올을 혼합 후 20시간 상온에서 침전을 시켰으며, 침전 후 원심분리기를 이용하여 상등액과 침전물을 분리시켰다. 국내산 감식초의 경우, 상등액은 동결건조기(freeze drying)를 사용하여 48시간 동결건조 후 530g의 분말을 얻었고, 침전물 또한 동결건조기(freeze drying)를 사용하여 48시간 동결건조 후 15g의 분말을 얻었다. 국내산 현미식초의 경우, 상등액은 동결건조기(freeze drying)를 사용하여 48시간 동결건조 후 830g의 분말을 얻었으며, 침전물 또한 동결건조기(freeze drying)를 사용하여 48시간 동결건조 후 5.3g의 분말을 얻었다. 또한 실험의 대조군으로 사용하여 위하여 국내산 감식초 및 현미식초를 감압농축기를 이용하여 60brix까지 농축하여 실험 대조군으로 사용하였다.

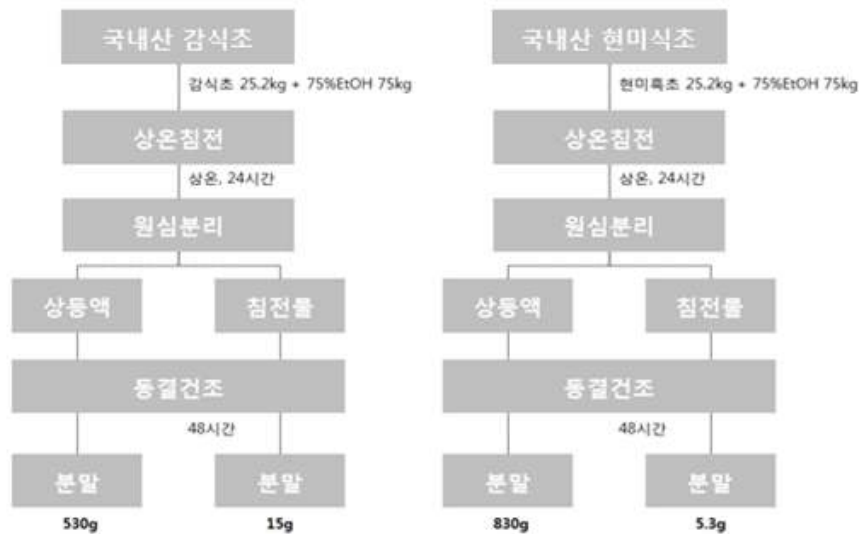


Fig. 16. 국내산 감식초 및 국내산 현미식초의 에탄올 분리를 통한 실험 샘플 제조 공정도
나. 전통발효식초 유효성분의 프로파일 및 함량 측정

2) 일반성분 분석 결과

국내산 현미식초 및 감식초의 질량분석과 *in vitro*, *in vivo* 실험에 사용할 대조군으로 농축액은 60%이상의 고형분이 함유되도록 제조되었으며, 특이한 점은 국내산 현미식초 농축액의 조단백질함량은 17%, 국내산 감식초 농축액의 조단백질함량은 2.4%로써, 7배 이상 국내산 현미식초의 조단백질함량이 높은 것으로 조사되었다. 또한 질소함량 또한 국내산 현미식초 농축액이 감식초 농축액보다 7배 이상 높은 결과를 보여주었다. 이는 감보다 현미의 단백질이 10배 이상 높다는 결과와 유사하며, 식초를 제조할 때 원료에 따라 단백질 함량이 매우 차이가 남을 보여주고 있다. 에탄올 침전방법에 따라 제조된 추출물 분말 및 침전물 분말에서는 조단백질함량

및 총당함량이 비슷하게 분포함을 볼 수 있어, 이는 에탄올에 수용성 당 및 단백질이 추출물에 포함되고, 에탄올에 비수용성 당 및 단백질이 침전물에 포함되어 어느 한쪽으로 분리가 완벽히 이루어지지 않았음을 볼 수 있다. 그러나 침전물에 포함된 당함량의 경우 에탄올에 침전되는 비수용성 당이므로 대부분 폴리머 형태의 올리고당임은 자명한 사실이다. 또한 에탄올에 침전된 침전물이나 추출된 추출물도 5-6배 정도 현미식초가 감식초보다 함량이 높음을 보여주었다.

Table 7. 국내산 감식초 및 현미식초 분획물의 일반성분 분석표

	현미식초 농축액	현미식초 추출물 ^{a)}	현미식초 침전물 ^{b)}	감식초 농축액	감식초 추출물	감식초 침전물
	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)
Total solid	62.32	83.05	69.62	65.71	78.53	49.78
Total nitrogen	2.72	1.21	1.73	0.39	0.43	0.42
Total protein	16.97	7.54	10.82	2.43	2.71	2.64
Crude ash	0.76	0.51	1.12	1.21	1.49	5.40
Total carbohydrate	1.36	1.13	1.15	0.78	1.31	0.50
pH	3.64	2.95	3.76	3.58	3.09	4.22

a) 추출물: 75% 에탄올 추출 공정 후 상등액에 대한 동결건조 분말

b) 침전물: 75% 에탄올 추출 공정 후 침전물에 대한 동결건조 분말

3) 분획물의 총 아미노산 분석결과

분석 결과 분획물에 따른 총아미노산의 프로파일은 일반성분의 조단백함량과 유사한 경향을 보여주었다. 국내산 현미식초 농축액이 감식초 농축액보다 9배 이상 많은 총아미노산 함량을 보여주었다. 모든 분획에서 가장 함량이 높은 아미노산은 glutamic acid로 조사되었다.

Table 8. 국내산 감식초 및 현미식초 분획물의 총아미노산 분석 결과

	현미식초 농축액	현미식초 추출물	현미식초 침전물	감식초 농축액	감식초 추출물	감식초 침전물
	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)	(%, w/w)
ASP	0.91	0.43	0.83	0.08	0.08	0.08
THR	0.45	0.23	0.26	0.06	0.10	0.06
SER	0.63	0.25	0.43	0.05	0.05	0.08
GLU	1.72	1.19	1.08	0.11	0.18	0.10
PRO	0.58	0.45	0.34	0.09	0.04	0.00
GLY	0.63	0.26	0.46	0.05	0.06	0.08
ALA	0.87	0.46	0.57	0.12	0.20	0.12
CYS	0.10	0.04	0.14	0.00	0.01	0.00
VAL	0.48	0.41	0.26	0.08	0.17	0.04

MET	0.21	0.13	0.11	0.02	0.01	0.00
ILE	0.30	0.28	0.11	0.09	0.09	0.00
LEU	0.74	0.75	0.29	0.08	0.17	0.04
TYR	0.37	0.28	0.20	0.03	0.06	0.02
PHE	0.40	0.33	0.17	0.05	0.10	0.02
HIS	0.32	0.19	0.49	0.18	0.32	0.16
LYS	0.45	0.04	0.42	0.06	0.03	0.14
ARG	0.24	0.12	0.09	0.15	0.14	0.16
합계(%)	9.39	5.83	6.26	1.28	1.81	1.10

4) 분획물의 유기산 분석 결과

실험에 사용되는 시료가 초산발효에 의하여 생산된 식초이므로, 각 샘플에 포함된 유기산 함량을 조사하였다. 식초는 곡류를 포함한 식물성 당류를 효모로 인해 알코올로 발효시키고, 초산균은 그 알코올을 초산으로 발효하는 공정을 가지고 있다. 또한 이러한 효모나 초산균은 단일 발효도 일어나지만 다양한 부산물도 발효를 통하여 생산된다. 곡류 및 식물성 물질들은 그 자체로 다양한 생리활성 유기산을 포함하고 있으며, 이런 발효를 통하여 그 프로파일도 다양하게 변화되어 발효의 기능성이 높아지는 원인이 되기도 한다. 국내산 현미식초 및 감식초에 공통적으로 포함된 유기산은 citric acid, acetic acid, lactic acid, pyroglutamic acid로 조사되었다. 곡류보다 유기산 함량이 높은 감은 유기산 분석에서 보듯이 단백질에서 기인한 아미노산인 glutamic acid의 발효로 생성된 pyroglutamic acid를 제외한 모든 유기산이 감식초 분획물에서 많았다.

Table 9. 국내산 감식초 및 현미식초 분획물의 유기산 분석 결과

	현미식초 농축액	현미식초 추출물	현미식초 침전물	감식초 농축액	감식초 추출물	감식초 침전물
	(ug/g, w/w)	(ug/g, w/w)	(ug/g, w/w)	(ug/g, w/w)	(ug/g, w/w)	(ug/g, w/w)
Citric acid	52,498.27	0.00	0.00	78,664.56	83,425.89	86,301.25
Tartaric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Malic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Succinic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lactic acid	22,065.61	36,853.51	6,952.90	26,936.19	53,044.45	7,305.91
Acetic acid	17,605.49	0.00	0.00	19,741.33	11,589.57	3,067.94
Levulinic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pyroglutamic acid	3,899.87	3,654.92	1,570.67	305.78	564.99	93.79
합계	96,069.24	40,508.43	8,523.57	125,647.86	148,624.91	96,768.88

5) 국내산 감식초 및 현미식초 분획물의 기능성 지표물질 정성 및 정량화

쌀과 미강의 주요 구성성분이자 다양한 식물성 원료의 폴리페놀의 일종인 Ferulic acid는 항산화 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있으며 이 외에도 암, 당뇨, 알츠하이머, 고혈압 등에 효과를 보인다. 위와 같은 활성은 산화적 스트레스와 큰 연관이 있는 것으로 밝혀져 있으며 이에 항염증, 간 기능 향상, 보습 효과를 더불어 가지고 있을 것으로 판단된다. 이처럼 다양한 활성을 보이는 Ferulic acid는 발효 과정을 거치면서 더 많이 발생하여 발효물로 생산되는 식초에 다량 함유되어 있을 것으로 예상된다. 또한 폴리페놀 화합물은 저분자 항산화 물질로 caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid 등이 대표적이며 이러한 페놀산은 분자 내 활성 수소를 가지고 있어 체내 유리 라디칼 제거에 효과적으로 알려져 있다. Hydrocinnamic acid류의 페놀산들은 항산화 활성을 통하여 여러 생리 기능성을 발휘하므로 현미뿐만 아니라 다양한 식초에 다량 함유되어 있을 것으로 예상된다.

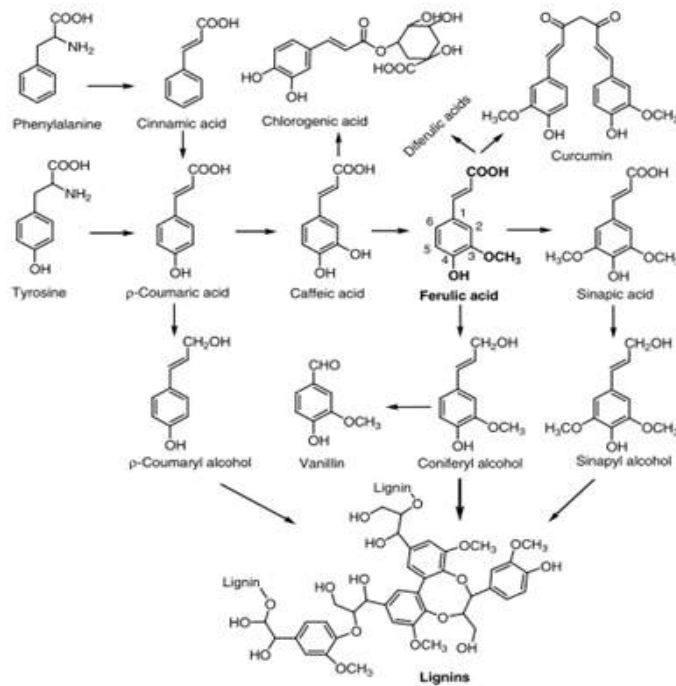


Fig. 17. 식물체 내의 ferulic acid를 포함하고 있는 다양한 phenolic acid compound 종류

가) 식초의 기능성 지표물질인 ferulic acid 분석 결과

현미를 포함한 식물체 표면의 cellulose 계열에 대부분 결합되어 존재하는 것으로 밝혀진 ferulic acid를 분석하기 위하여 전처리한 결과를 Table 10에 나타내었다. 또한 알칼리 가수분해법으로 총 ferulic acid 함량을 구한 후 free ferulic acid 함량을 감하고 bound ferulic acid 함량을 구하여 Table 11에 나타내었다. 실험결과에서 알 수 있듯이 감식초에서는 항산화 물질의 대표적인 ferulic acid가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 국내산 현미식초에는 유리형의 형태보다는 수용성 식이섬유에 결합된 bound form으로 ferulic acid가 존재함이 밝혀졌으며, 47.5(ug/g)의 함량으로 조사되었다.

Table 10. 국내산 감식초 및 현미식초의 ferulic acid 분석을 위한 전처리 결과

시료명	시료양(g)	분석시료량(mg)	수율(%)
감식초 농축액	2.0	168.1	8.41
감식초 추출물	2.0	160.2	8.2
감식초 침전물	2.0	162.4	8.21
현미식초 농축액	2.0	179.3	8.97
현미식초 추출물	2.0	170.3	8.6
현미식초 농축액	2.0	169.1	8.5

Table 11. 국내산 감식초 및 현미식초의 ferulic acid 분석결과

시료명	Free ferulic acid (ug/g)	Bound ferulic acid (ug/g)	Total ferulic acid (ug/g)
감식초 농축액	0.0	0.0	0.0
감식초 추출물	0.0	0.0	0.0
감식초 침전물	0.0	0.0	0.0
현미식초 농축액	0.01	47.5	47.5
현미식초 추출물	0.95	0.0	0.95
현미식초 농축액	0.0	42.5	42.5

나) UPLC-QTOF-MS를 이용한 식초의 항산화 물질 정성 및 정량 결과

식물체에서 흔히 발견되는 대표적인 항산화물질인 ferulic acid 이외에 총 7종의 항산화 가능성을 가진 phenolic compound를 std를 구합하여 정성, 정량을 UPLC-QTOF-MS를 이용하여 진행한 결과를 Table 12와 Fig. 18에 나타내었다. 대부분의 phenolic compound는 유기용매상으로 추출되는 추출물에 대부분 존재하는 것으로 파악되며, 현미식초 침전물에서 발견되는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 경우는 샘플 제조 시 혼입이 된 것으로 판단된다. 감식초에서 발견되는 항산화 phenolic acid는 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 총 3가지가 발견되었으며, 현미식초의 경우 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 이외에 sinapic acid, vinillic acid가 추가적으로 발견되어 총 5가지의 phenolic acid가 포함되어 있는 것으로 분석되었다.

Fig. 18에서 보는 것과 같이 대부분의 phenolic acid는 RT 2-5분 사이에 분석이 되었으며, 분리도 및 분석감도 또한 매우 우수하였다. 그러나 아직까지 발효로 인해 생산된 식초에도 밝

혀지지 않은 많은 unknown compound가 매우 많이 분석되었으며, 추가적인 질량분석적 접근이 필요하다.

Table 12. UPLC-QTOF-MS를 이용한 국내산 감식초 및 현미식초 분획물의 항산화 물질 분석결과

compound	Retention time(t_r), min	Formula [M-H] ⁻	[M-H] ⁻ (m/z)	Amount (ppm(mg/100g))			
				감식초 추출물	감식초 침전물	현미초 추출물	현미초 침전물
Caffeic acid	2.16	C ₉ H ₇ O ₄	179.0344	1.8 (18)	ND	0.2 (2)	ND
P-Coumaric acid	3.25	C ₉ H ₇ O ₃	163.0396	ND	ND	ND	ND
Sinapic acid	4.26	C ₁₁ H ₁₁ O ₅	223.0607	ND	ND	1.1 (11)	ND
Syringic acid	2.56	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	ND	ND	ND	ND
Vanillic acid	2.24	C ₈ H ₇ O ₄	167.0345	ND	ND	11.1 (111)	ND
4-hydroxybenzoic acid	1.69	C ₇ H ₅ O ₃	137.0240	7.9 (79)	ND	6.3 (63)	ND
3,4-dihydroxybenzoic acid	1.17	C ₇ H ₅ O ₄	153.0188	11(110)	ND	24(240)	1.8(180)

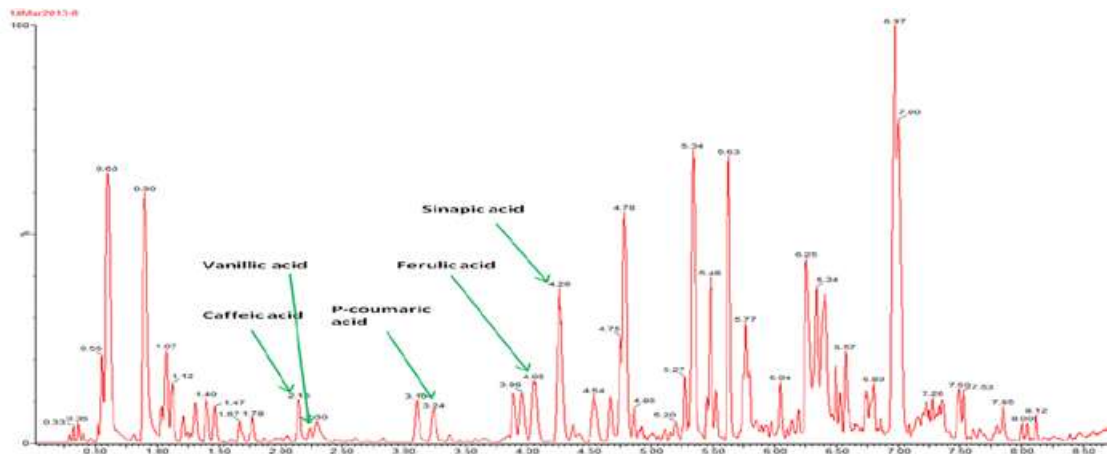


Fig. 18. UPLC-QTOF-MS를 이용한 국내산현미식초 추출물의 MS chromatogram

제 4 절. 전통발효식초의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기능 평가

1. 연구방법

가. 선별된 전통 발효 식초의 대량 조제 및 분리·정제

1) 선별 전통 발효 식초로부터 대량 시료 조제

선별 과정에서 우수한 수율과 가장 높은 macrophage의 cytokine 생산능을 보여준 3종의 시료[국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0와 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0]는 이후 실험에 사용할 물량을 확보하기 위해 다량의 시판 식초를 확보하고 선별과정에서와 동일한 방법으로 조다당을 분리하여 대량 시료를 확보하였다.

2) Gel permeation chromatography (GPC)

한국 전통 현미식초 유래 조다당 KBV-0는 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-75 column (2.5×90 cm)에 loading하고 동일 buffer를 이용하여 용출시켜 분자량이 상이한 3개획분 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III로 정제하였다(Fig. 필요). 또한 한국전통 감식초 유래조다당 KPV-0 획분은 동일 정제과정을 거쳐 각각 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III의 3개 획분으로 분획하였으며, 이들은 전통발효 식초 유래 정제 활성다당으로 이후의 실험에 사용하였다.

나. 분리·정제된 전통발효 식초 유래 다당의 구성분, 구성당 분석 및 분자량 측정

1) 일반성분 분석

일반 성분을 분석하기 위해 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법으로, 각각 정량 분석하였다.

2) 구성당 분석

구성당 분석은 Albersheim 등의 방법을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화하여 GC를 이용하여 분석하였다. 즉, 다당 시료를 2 M TFA (trifluoroacetic acid) 중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 mL의 1 M NH₄OH 용액에 용해하여 10 mg의 NaBH₄로 4시간 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 이 후 각각의 alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. Alditol acetate 유도체의 GC분석 조건은 Table 13과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

Table 13. Analytical conditions of gas-liquid chromatography for component sugar analysis

Apparatus	GC ACME-6100 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column (Supelco, USA)
Column size	0.25 mm×30 m, 0.2 mm film thickness
Oven temp.	60°C(1 min) → 220°C(12 min) → 250°C(15 min) 30°C/min 8°C/min
Injector temp.	240°C
Detector temp.	260°C
Carrier gas	N ₂ (1.5 mL/min)

3) HPLC에 의한 정제 다당의 분자량 측정

분리·정제된 전통발효 식초 다당획분의 분자량 측정을 위해 Superdex™ 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 Table 14의 분석조건으로 HPLC (High performance liquid chromatography)를 행하였다. 분자량 측정 시 이용된 표준물질인 pullulan series (P-200, 100, 50, 20 및 10)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 각 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준곡선으로부터 환산하여 분자량을 결정하였다.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_t : total volume
 V_o : void volume
 V_e : elution volume of sample

Table 14. Analytical conditions of HPLC for the determination of molecular weight of polysaccharides

Pump	SP-930D (YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive index (356-LC, Varian, USA)
Column	Superdex™ 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)
Column size	10 × 306 mm
Column temp.	25°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)
Injection vol.	20 µL
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

4) β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino-β-3,6-galactan (type-II)의 존재 확인 및 정량

Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법에 따라 single radical 젤 확산 법으로 측정하였다. β-Glucosyl Yariv reagent 10 µg/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 well을 만들어 농도별로 희석한 표준물질 gum arabic과 시료 5 µg을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였다. 이 평판을 습윤상태에서 25 °C에서 15시간 정치시켜 반응시키고, 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여 arabino-β-3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였다. 시료와 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다.

5) Methyl화 분석에 의한 구조 및 결합위치 결정

가) Methylsulfinyl carbanion의 조제

Methylsulfinyl carbanion은 유기화학에서 염기로 작용하거나, 또는 친핵체(nucleophile)로 작용하여 에테르 합성(R-O-R')을 자극하는 물질로 잘 알려져 있다. 이러한 carbanion은 음전하가 주로 탄소원자에 위치해 있는 유기화합물로 주로 중성 유기분자들로부터 양전하를 띤 원자나 원자단을 제거해서 얻으며, 유기화학에서 다른 물질의 반응을 유도하는 화학적 중간물질로서 주로 사용되는 화합물이다. Methylsulfinyl carbanion을 조제하기 위해 무수 NaH 1.26 g에 무수 DMSO(dimethylsulfoxide) 20 mL을 첨가한 후 질소로 충전하며 90°C oil bath 상에서 약 10~15분간 반응시켰다. 반응액이 옅은 녹색을 띠는 시점을 종말점으로 하여 반응을 종결하고 상온까지 냉각시킨 후 3,000 rpm에서 원심분리하였으며, methylsulfinyl carbanion이 함유된 상등액은 공기의 접촉이 없도록 질소로 치환하여 소량씩 분주한 후 냉동보관 (-70°C)하며 실험에 사용하였다.

나) Methylation

다당 시료의 결합위치를 결정하기 위한 Methyl화는 Hakomori 방법을 이용하여 실시하였다. 데시케이터에서 1~2일간 충분히 건조한 각 다당 시료(1 mg)에 1 mL의 무수 DMSO를 가하고 교반하여 완전히 용해시킨 후, 500 µL의 methylsulfinyl carbanion (MSCA)를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 이때 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환될 수 있도록 필요한 경우 MSCA를 수차례 첨가하였으며, 미반응 MSCA의 잔존 여부는 triphenylmethane으로 확인하였다. Polyalkoxide로 전환된 시료는 과량의 CH₃I를 가하여 methyl화 하였으며, 잔존 CH₃I는 N₂ gas flushing을 통해 제거 후 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 전환된 methyl화 다당을 회수하였다.

다) Methyl화 다당의 가수분해 및 acetyl화

Methyl화된 다당은 2 M TFA 1 mL을 가하여 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해를 행한 후 건조하였다. 가수분해한 시료는 25% NH₄OH가 수 drop 첨가된 ethanol에 용해하고 10 mg의 NaBH₄를 가하여 4시간 동안 개환 및 환원하였으며, acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거하고, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하였다. 이 후 1 mL의 acetic anhydride를 가하고, 121°C에서 3시간 동안 반응시켜 partially methylated alditol acetate로 전환하였으며, 이는 2상 용매계(hexane, H₂O)로 분리, 추출하여 acetone에 용해시켜 GC 및 GC-MS로 분석하였다 (Fig. 19).

라) Partially methylated alditol acetate의 GC 및 GC/MS 분석

GC 분석은 SP-2380 capillary column(0.25 mm×30 m, 0.2 µm film thickness)이 장착된 Young-Lin ACME-6100 GC를 사용하여 최적온도 조건 [60°C(1min), 60°C→180°C(30°C/min), 180°C→250°C(1.5°C/min), 250°C(5min)]에서 split injection mode (1:20)로 분석하였으며 이때 carrier gas (N₂)의 압력은 1.5 mL/min로 조정하였다.

한편, GC-MS는 SP-2380 capillary column을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5973N Mass spectrophotometer를 이용하여 GC 분석과 동일한 최적온도 조건에서 splitless injection mode로 분석하였다 (He pressure : 1.5 mL/min). Methylated alditol acetate는 Mass에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며 각 peak의 molar %는 peak area 및 molecular response factor로 부터 환산하였다.

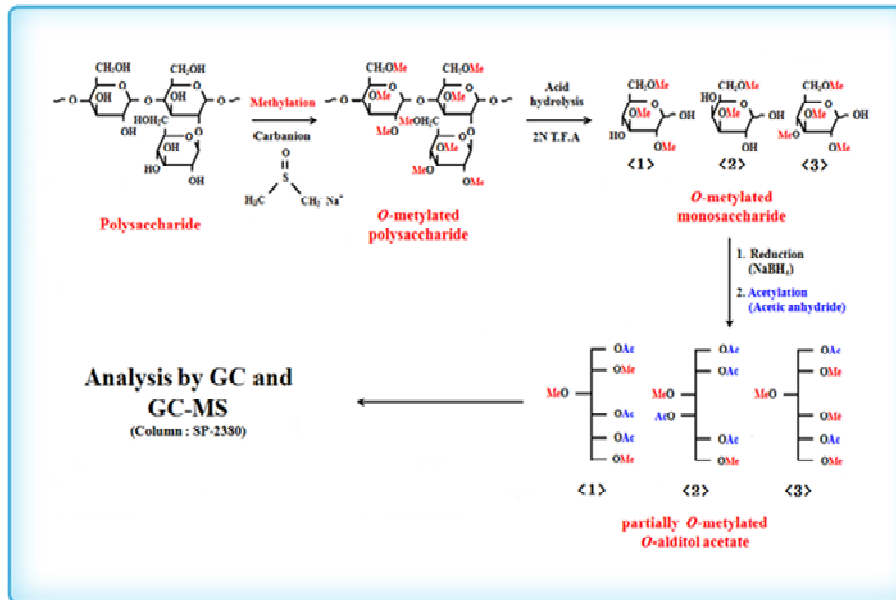


Fig. 19. Scheme of methylation analysis of polysaccharide for the determination of linkage formular

다. 전통식초 유래 다당의 선천 면역계 증진활성 (*in vitro*)

1) 항보체 활성화

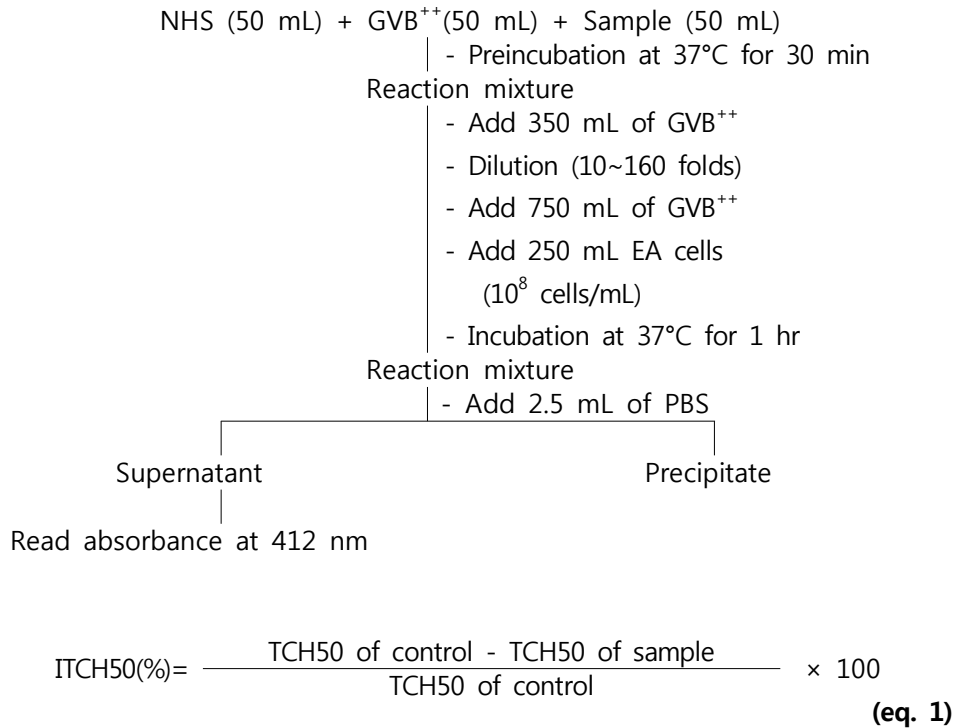


Fig. 19. Assay procedures for anti-complement activity.

가) 정상인 혈청(Normal human serum, NHS)의 제조

건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온에서 약 15분간 방치하여 응고시킨 후, 응고된 혈액을 절단하고 약 5분간 상온에서 방치시켰다. 이 혈액을 다시 4°C에서 약 20분간 방치한 다음 원심분리(2,200 rpm, 15 min, 4°C)하여 혈청을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 mL씩 분주하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

나) 항보체 활성화 실험

항보체 활성화는 Meyer법을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였다. 여러 농도로 증류수에 용해시킨 시료를 GVB⁺⁺ (gelatin veronal buffer, pH 7.4, 0.1% gelatin, 0.15 mM Ca⁺⁺, 0.5 mM Mg⁺⁺ 함유) 및 정상인의 혈청과 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시켰다. 동 반응액에 GVB⁺⁺ 350 µL를 가하고, 이를 10배에서 160배 까지 연속 희석시킨 후, 750 µL의 GVB⁺⁺와 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA cell, 1×10⁸ cells/mL)를 250 µL를 가하여 37°C에서 60분간 2차 반응시키고, PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 2,000 rpm

에서 10분간 원심분리하였으며, 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 항보체 활성은 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺, 증류수만을 반응시킨 음성대조군의 총보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)으로써 나타내었다. 양성대조군으로는 운지버섯 유래 면역증강제인 PSK (polysaccharide-K)를 사용하여 비교하였다(Fig. 19).

다) 금속이온 존재에 의한 보체계 활성화능 비교

보체계의 활성 경로를 확인하기 위해 GVB⁺⁺ buffer와 Ca⁺⁺이온이 선택적으로 제거된 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻ buffer, Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺ 이온이 모두 제거된 EDTA-GVB⁻ buffer를 제조하여 시료 및 NHS와 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 각 반응액은 37°C에서 60분간 재차 보체를 활성화 시키고, PBS 2.5 mL를 가한 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정함으로써 보체계 활성화능을 비교하였다(Fig. 19).

라) 2차원 면역전기영동에 의한 보체계 활성 경로의 검토

보체계 활성화 경로의 확인을 위한 2차원 면역전기영동은 Morrison 등의 방법에 따라 실시하였다. GVB⁺⁺ buffer, Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻ buffer와 EDTA-GVB⁻ buffer에 각각 정상인의 혈청과 정제 다당 시료를 동량(50 µL) 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 냉각하였다. 반응액을 barbital buffer (pH 8.6)에 용해시켜 만든 1% agarose gel plate (5×5 cm)의 well에 5 mL씩 loading하고, 4°C에서 약 3시간 동안 1차 전기영동(75 mA/plate)을 실시하였다. 이 후 1% anti-human C₃가 함유된 agarose gel plate 상에서 4°C, 약 15시간 동안 2차 전기영동(25 mA/plate)을 실시하였다. 전개된 gel은 bromophenol blue로 약 10분 간 염색 후 탈색하여 침강선(precipitation line)을 확인함으로써 C₃의 활성화 여부를 관찰하였다.

2) 전통식초 유래 정제 다당의 대식세포 활성화

가) 정상세포에 대한 세포 독성실험

일반세포에 대한 시료의 세포독성 여부를 확인하고자 mouse에서 획득한 일반세포인 mouse 복강 유래 macrophage, mouse 유래 면역세포주인 RAW 264.7 및 소장점막상피세포주 Caco-2 세포를 각각 2.5×10⁶ cells/mL의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 µL씩 분주하고 각 농도의 시료를 각 well에 100 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 세포 독성은 세포배양액 100 µL을 제거한 후 CCK-8 (cell counting kit-8)을 Phenol free-MEM 배지 (Minimum Essential Medium Eagle, Welgene Co. Inc., Daegu, Korea)에 5배 희석하여 well 당 100 µL씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30~60분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) 대식세포에서 NO, ROS 및 cytokine 생산유도 활성

(1) Murine peritoneal macrophage, RAW 264.7 세포 배양액의 준비

mouse 복강 유래 macrophage는 BALB/c (우, 6 weeks) mouse의 복강에 5% thioglycollate medium 1 mL를 주입하여 96시간 동안 유도된 macrophage (2.5×10^5 cells/mL of MEM) 100 μ L를 flat-bottomed 96-well microplate에 분주한 후 MEM 배지에 녹인 다당 시료를 20~2,000 μ g/mL의 농도가 되도록 10 배수로 연속 희석하여 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 세포배양액 상등액을 회수하고 상등액 중에 유도된 NO, ROS 및 cytokine의 함량을 측정하였다.

한편, RAW 264.7 세포는 100 × 20 mm cell culture dish에서 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 0.05% trypsin-EDTA를 1 mL 분주하여 배양기에서 5분간 배양시켰다. 그 후 MEM 배지 10 mL를 가하여 세포를 회수하고 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 2.5×10^6 cells/mL의 농도로 계수한 후 위와 동일한 과정을 거쳐 측정하였다.

(2) Nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) 생산능 측정

상기에 제시된 방법으로 세포를 24시간 배양하고 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 후 세포 배양액을 회수하여 배양액 중 생성된 NO 및 ROS 생산능을 확인하였다. 세포 배양액 내의 NO는 Griess reagent를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 세포 내의 ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 활성 산소에 의해 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)을 형성하는 반응을 이용, 배양 후의 세포에 10 μ M의 DCFH-DA를 첨가하여 2 시간동안 배양시킨 후 세포를 용해시켜 상등액의 형광값을 형광측정기를 이용해 excitation 450 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

(3) Sandwich ELISA에 의한 cytokine 측정

Mouse 복강 유래 macrophage와 RAW 264.7 세포에 의해 생산된 cytokine의 함량은 sandwich ELISA kit에 의해 분석하였다. 각 cytokine의 항체는 coating buffer에 희석하여 flat-bottomed 96-well microplate에 50 μ L를 가하여 coating한 후 4°C에서 12시간 방치하였다. Coating이 완료된 microplate는 washing buffer (PBS with 0.05% tween 20, PBST)를 이용하여 3차례 세척하고, assay diluent (PBS with 10% FBS or 2% skim milk) 200 μ L를 가하여 1시간 동안 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. Blocking 완료 후 각 well은 washing buffer를 이용하여 재차 3회 세척하고, 각 well에 연속 희석한 표준물질 (recombinant mouse cytokine)과 면역세포배양액을 각각 50 μ L씩 분주하였다. 이를 실온에서 2시간 동안 방치한 다음 washing buffer로 5회 세척하고 detection antibody (in assay diluent) 50 μ L를 처리하여 실온에서 1시간 방치한 후 재차 세척하였다. Enzyme reagent (avidin-horseradish peroxidase conjugate) 50 μ L를 처리하여 실온에서 40분간 결합시킨 후 substrate solution [tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide] 50 μ L를 가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution (2 N H₂SO₄)을 처리하여 450 nm에서 흡광

도를 측정하였다.

다) Cytokine mRNA 발현 측정

(1) RAW 264.7 세포로 부터 RNA 추출

Cytokine mRNA 발현의 변화는 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/mL의 농도로 하여 flat-bottomed 6-well microplate에 1 mL씩 가한 후 각 농도의 시료를 1 mL씩 처리하였으며 음성대조군으로 배지 1 mL만을 첨가한 것(Negative control, NC)과 양성대조군으로 LPS (Lipopolysaccharide) 5 μ g/mL의 농도(Positive control, PC)로 제조한 배지 1 mL을 처리한 것이 사용되었다. 이들은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 후 cold-PBS로 3회 세척하고 Trizol 500 μ L를 처리하여 얻어진 세포 용해액에 chloroform 200 μ L를 혼합하여 상온에서 3분간 정치하였다. 12,000 rpm, 4 °C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 넣고 상온에서 10분간 정치시켰다. 원심분리하여 얻어진 침전물은 70% 에탄올로 세척하고, 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)가 첨가된 탈이온수 20 μ L에 녹이고 spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여, 흡광도를 측정하여 total RNA의 농도를 측정하였다.

(2) First-strand cDNA 합성

5 μ g의 RNA에서 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. RNA sample 5 μ g을 oligo dT 1 μ L를 혼합하여 65 °C에서 5분간 가열하고 신속하게 냉각시킨 후 5X reaction buffer 4 μ L, RNase inhibitor 1 μ L, dNTP 2 μ L, reverse transcriptase 1 μ L가 혼합된 mixture를 8 μ L씩 분주한 후 42°C에서 1 시간 반응시킨 후 72°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 합성된 cDNA는 1 mM tris-buffer에 10배 희석하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 이용하였다.

(3) Real-time PCR (polymerase chain reaction)

DNA 정량을 실시간으로 정확하게 측정하기 위해서 CFX96TM Real-time PCR Detection System을 이용하여 IL-6, TNF- α cytokine의 DNA 발현량을 측정하였다. 2X SYBR Green Mix, sense primer, antisense primer, template DNA를 넣고 탈이온수를 첨가하여 총 25 μ L로 하며 real-time PCR를 수행하였다.

사용한 primer는 IL-6 sense primer 5'-GAGAGGAGACTTCACAGAGGATACC-3'와 antisense primer 5'-CTCCAGCTTATCTGTTAGGAGAGC-3', TNF- α sense primer는 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3'와 antisense primer 5'-GGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC-3', glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'와 antisense primer 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'를 사용하였다.

PCR 조건은 95°C-3분(초기변성)하고, 95°C-30초(변성, denaturation), 60°C-30초(결합반응,

annealing), 72°C-30초(연장반응, extension)으로 39회 목적 DNA를 증폭하였으며 melting curve 분석은 증폭과정 후 95°C-10초, 60°C-5초, 95°C-10초의 조건으로 증폭시켜 sample data의 comparative C_T값을 구한 후, 표준물질로 GAPDH 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 2^{-ΔΔCT} 방법을 통하여 계산하여 정량하였다.

(4) Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

RT-PCR은 Taq DNA polymerase kit를 이용, cDNA 2 μL, 5 unit/μL Taq polymerase 0.2 μL, 10×Taq PCR buffer 2 μL, 2.5 mM 10×dNTP mixture 1.6 μL 및 10 pM primer 1 μL을 섞고 증류수로 전체를 20 μL 맞춰 PCR 증폭시켜 관련된 mRNA의 발현을 확인하였다.

primer는 IL-6 (sense, 5'-GAGAGGAGACTTCACAGAGGATACC-3'; antisense, 5'-CTCCAGCTTATCTGTTAGGAGAGC-3'), TNF-α (sense, 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3'; antisense, 5'-GGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC-3'), Fc receptor I (sense, 5'-TTACCACGCCAGTGCTGAGAG-3'; antisense, 5'-ACTGAGCTTCGAGGTCCATC-3'), Fc receptor II (sense, 5'-TGGATCCAGGTGCTCAAGGAA-3', antisense, 5'-CTTCCTTTGCAGTAGTAGTCC-3')를 제작하여 사용하였다.

Cytokine의 PCR은 94°C-5분(초기변성), 94°C-30초(변성, denaturation), 60°C-30초(결합반응, annealing), 72°C-30초(연장반응, extension)으로 35회 증폭 후 72°C-7분(재연장반응, re-extension)으로 작동하였으며. Fc receptor I (FcR I)은 94°C-5분(초기변성), 94°C-30초(변성, denaturation), 63°C-1분(결합반응, annealing), 72°C-1분(연장반응, extension)으로 25회 증폭 후 72°C-10분(재연장반응, re-extension)으로, Fc receptor II (FcR II)는 94°C-5분(초기변성), 94°C-1분(변성, denaturation), 57°C-1분(결합반응, annealing), 72°C-1분(연장반응, extension)으로 33회 증폭 후 72°C-10분(재연장반응, re-extension)으로 DNA thermal cycler를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 산물은 GelRed™를 포함한 1% agarose gel 상에서 100 V에서 15분, 50 V에서 15분간 전기영동한 후 Gel-doc system에서 중합효소 반응 띠의 밝기를 정량하였다.

라. 전통식초 유래 정제 다당획분의 장관면역 활성화 (*ex vivo* & *in vivo*)

1) Peyer's patch 세포로부터 IgA 및 관련 cytokine 생성능 측정 (*ex vivo*)

6주령 C3H/HeN mouse의 소장 외벽에 돌기형태로 존재하는 Peyer's patch를 회수하여 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 medium이 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속채를 이용하여 조직을 파쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속채로 여과한 후, 배지로 세척하고 2×10^6 cells/mL로 세포 농도를 조정된 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 다양한 농도로 희석하여 100 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양한 후 상등액을 회수하여 Peyer's patch 세포로부터 생성되는 IL-6, IL-10, GM-CSF, TGF- β 및 IgA를 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

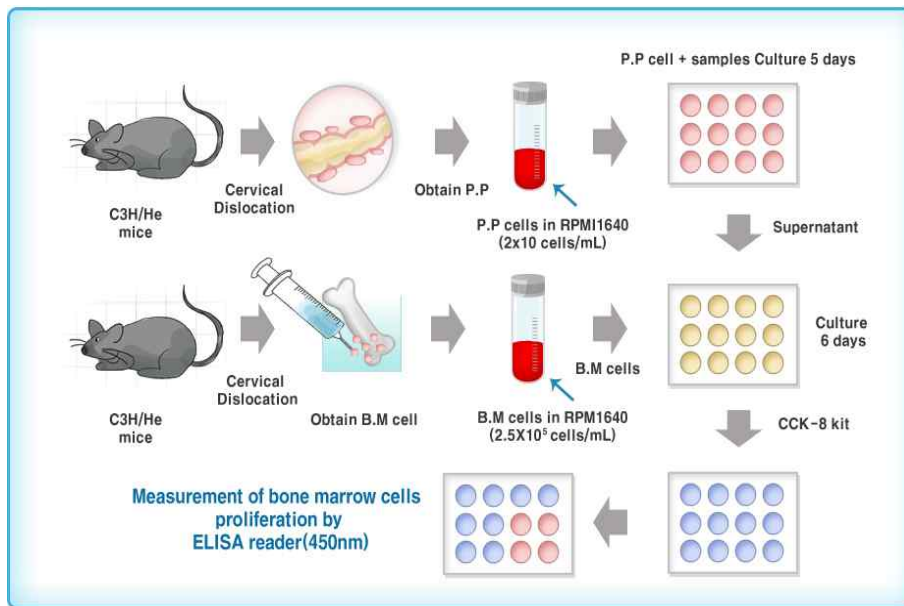


Fig. 20. Assay for intestinal immune system modulating activity by measurement of bone marrow cell proliferation.

2) 골수세포 증식활성 측정 (*ex vivo*)

골수세포 증식활성은 C3H/HeN mouse의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 회수한 후 시료와 반응시킨 상등액을 동일 마우스종의 골수세포에 접종함으로써 증가된 세포의 양을 골수세포 증식활성으로 나타내었다. 즉, C3H/HeN mouse의 Peyer's patch를 회수한 후 여과, 세척하고 2×10^6 cells/mL로 세포농도를 조정하여 flat-bottomed 96-well microplate에 180 μ L씩 분주하였다. 활성을 측정하고자 하는 시료는 적당한 농도로 희석하여 20 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 골수세포는 동일종 mouse의 대퇴부 뼈를 이용하여 회수하였는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 PBS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 200 mesh로 여과한 후 2.5×10^5

cells/mL로 세포농도를 조정하고 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하였다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 MEM medium을 각각 50 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다. 장관면역 활성화는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로 나타내는데, 증식도 측정은 WST-8법에 의해 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다 (Fig. 20).

3) Caco-2 세포와 면역세포의 혼합배양계를 이용한 면역세포의 자극활성 (*in vitro*)

다당의 장관상피세포를 통과하여 흡수된 후 체내 면역세포들과의 반응, 활성화 여부를 판단하기 위해 Transwell® insert가 장착된 12-well plate를 이용하여 장관 *in vitro* 혼합배양계를 제조하였다. 장관상피세포주 Caco-2 세포를 배양하여 3×10^5 cells/mL로 조정된 후 Transwell® insert가 장착된 12 well plate 상층부에 100 μ L씩 분주하고 10~15일간 배양하여 monolayer를 형성시켰다. 하층부에는 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 배양하여 3×10^5 cells/mL로 조정하고 세포 혼탁액 200 μ L와 MEM배지 300 μ L씩 분주한 후 상층부의 Caco-2 세포를 PBS로 세척, 여과한 후 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 500 μ L씩 처리하였다. 24 시간 배양한 후 하층부의 RAW 264.7 세포 배양액을 회수하여 IL-6 생산능을 확인하였다. 대조군으로는 무처리군과 LPS(5 μ g/mL)처리군 및 동일농도의 시료를 RAW 264.7 세포에 직접 처리하였다. 따라서 본 실험에서는 경구투여된 활성다당이 장관 상피세포를 통과하여 흡수된 후, 체내 면역세포들과 반응, 그들을 활성화시킬 수 있다는 가설을 증명하기 위해 Transwell® insert가 장착된 12 well plate를 이용, 실험을 실행하였다 (Fig. 21).

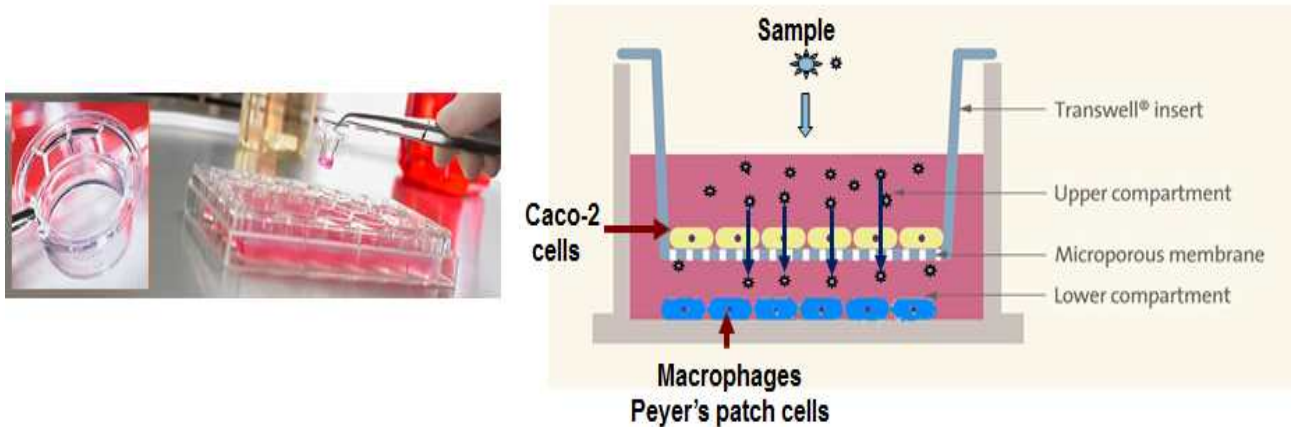


Fig. 21. Appearance and application of well cluster plate equipped with Transwell® insert.

4) 장관면역계 활성화에 미치는 전통식초 유래 다당획분의 마우스 경구 투여에 따른 면역활성 자극 효과(*in vivo*)

가) 실험동물과 전통식초 유래 조다당획분의 경구 투여

식품소재로서의 전통 발효식초 유래 다당소재의 장관면역 활성화에 대한 가능성을 타진하고자 하였다. 따라서 경구투여를 통한 실험동물의 면역증진 효과를 검토하기 위해 실험동물은 6주령의 C3H/HeN 마우스를 중앙실험동물로부터 구입한 후 1주일간 정상식으로 적응기간을 가진 후 실험에 사용하였다. 실험군으로는 시료가 포함되지 않은 생리식염수 (saline)을 투여한 대조군 (negative control, NC)과 전통 현미식초 유래 조다당획분 (KBV-0)과 감식초 유래 조다당획분 (KPV-0)이 각각 50, 500, 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 농도로 투여된 총 7개의 group으로 나누고 각 group당 8마리씩 1일 1회 총 20일간 투여하였다. 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고 모든 실험식은 사육기간 동안 냉장보관하였다. 사육실의 온도는 $23\pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 50~60%로 유지하였으며 조명은 12시간 주기로 하였다.

나) 전통발효식초의 유래 다당의 경구 투여가 Peyer's patch cell의 IgA 및 cytokine 생산에 미치는 효과

경구투여가 완료되면 마우스의 소장 내벽에 존재하는 Peyer's patch를 분리한 후, 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 medium이 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속체를 이용하여 조직을 파쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속체로 여과한 후, 배지로 수차례 세척하고 1×10^7 cells/mL로 세포농도를 조정된 후 flat-bottomed 12-well microplate에 1 mL씩 분주하고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양하였다. Peyer's patch 세포로부터 유도된 IgA 및 cytokine (IL-6, IL-10, GM-CSF 및 TGF- β)은 배양 상등액을 회수한 후 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

다) 전통발효식초의 유래 다당의 경구 투여가 혈액, 소장내액 및 분변 중 분비하는 IgA 함량에 미치는 효과

경구투여가 종료된 C3H/HeN 마우스에서 Peyer's patch가 제거한 소장 (십이지장~회장말단)은 PBS 5 mL를 이용하여 내액을 용출시키고 원심분리 (2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 분비되어 있는 IgA의 양은 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

한편, 경구투여가 종료된 동일마우스는 26 G needle을 이용하여 심장채혈을 실시하였고, 혈액 1.5~2 mL을 채취하여 냉장고에 30분 보관 후 원심분리 (2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 혈청을 회수하였다. 분리한 혈청에 분비되어 있는 IgA의 양은 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

또한, 경구투여 24시간 전부터 각 group별로 분변을 회수하여 2시간동안 자연건조하여 수분을 제거한 다음, PBS에 100 mg/mL의 농도로 분변을 희석하였다. 희석된 분변액은 충분히 교반하고 냉장고에서 하루동안 방치한 다음, 원심분리 (2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 분비되어 있는 IgA의 양은 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

라) 통계처리

실험결과는 IBM SPSS Statistics 21을 이용하여 통계처리하였으며 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 일원배치 분산분석으로 실시하였다.

2. 연구결과

가. 면역활성이 우수한 전통 발효식초 유래 다당체의 분리 및 정제

1) 선별 전통 발효 식초로부터 대량 시료 조제 및 화학적 특성

선별 과정에서 우수한 수율과 가장 높은 macrophage의 cytokine 생산능을 보여준 3종의 시료[국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0와 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0]는 이후 실험에 사용할 물량을 확보하기 위해 다량의 시판 식초를 확보하고 선별과정에서와 동일한 방법으로 조다당을 분리하여 대량 시료를 확보하였으며, 이들은 시료 제조에 따른 활성의 편차가 존재하는지 여부를 확인하기 위해 재차 화학적 특성을 평가하여 재연성 여부를 평가하고자 하였다.

대량 조제한 선별 식초 3 종의 수율을 확인한 결과, 식초 선별 과정시 처리된 얻어진 시료와 거의 동일한 양의 수율이 확인되었다 (Table 15). 즉, 대량 조제된 3종의 조다당 획분을 대상으로 일반 화학특성을 분석한 결과, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0 모두 중성당 94.5%, 산성당 5.5%로 동일한 조성이 확인되었으며, 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0의 경우 중성당 82.8%, 산성당 17.2%로 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0보다 산성당을 더 많이 함유하고 있었다. 또한, 단백질과 식물체 추출물에서 발견되는 TBA-positive material(KDO)는 3종의 시료에서 모두 함유되어 있지 않았다 (Table 15).

Table 15. Chemical properties of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from three different traditional vinegars.

	KBV-0 (17 L)	JBV-0 (8.6 L)	KPV-0 (7.6 L)
Yield	28.39g (0.17%)	6.2g (0.07%)	8.0g (0.1%)
Chemical properties			
Neutral sugar	94.5±0.0	94.5±0.0	82.8±0.0
Uronic acid	5.5±0.0	5.5±0.0	17.2±0.0
KDO-liked material ¹⁾	-	-	-
Protein	-	-	-
Sugar component ²⁾			(Mole%) ³⁾
Rhamnose	0.6±0.0	3.1±0.3	13.5±0.7
Fucose	0.1±0.0	-	1.1±0.0
Arabinose	2.8±0.1	9.2±0.4	17.5±0.3
Xylose	3.5±0.1	11.1±0.5	3.1±0.0
Mannose	20.6±0.1	38.1±0.5	16.8±0.3
Galactose	6.7±0.1	10.6±0.2	17.6±0.4
Glucose	60.2±0.2	22.0±0.4	13.3±0.3
GalA+GlcA	5.5±0.0	5.5±0.0	17.2±0.0

3 종의 조다당 획분들의 구성당 분석을 행한 결과 (Table 15 및 Fig. 22), 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0의 경우 두 시료 모두 주로 glucose,

mannose로 구성되어 있었고, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0의 경우 glucose 60.2%, mannose 20.6%, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0의 경우 glucose 22.0%, mannose 38.1%로 구성되어 있었다. 이처럼 두 시료 모두 mannose를 높은 비율로 구성하고 있다는 사실은 재료인 현미에는 mannose가 거의 존재하지 않음을 고려할 때, 식초제조 중 알코올 발효 단계에서 사용된 yeast 세포벽의 최외각 구성 다당인 mannan이 발효 및 숙성과정에서 자가분해 후 식초에 용해되어 존재할 가능성을 시사하였다.

한편, 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0의 경우 rhamnose, arabinose, mannose, galactose로 구성되어 있으며 각 13.5%, 17.5%, 16.8%, 17.6%로 다양한 구성당 조성을 지니고 있었는데, 이는 원재료인 감 유래 pectin 물질로 구성되어 있을 가능성을 시사해 주었다. 이는 앞선 선별과정 중 제조한 시료와 유사한 구성당 분석을 조성하고 있음을 재확인시켜 주었다.

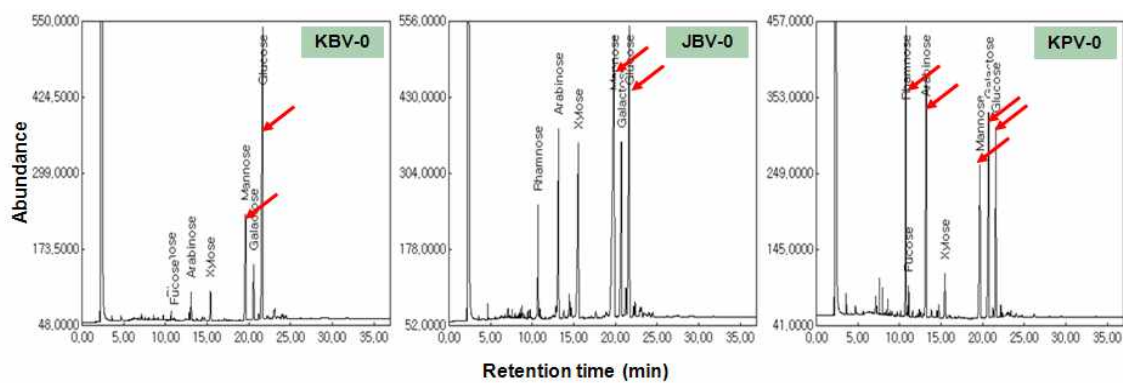


Fig. 22. GC chromatogram for the determination of sugar composition of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars.

3종의 조다당 희분은 50 mM Ammonium formate (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex 75 GL column를 이용하여 HPLC를 행한 결과, Fig. 23에 나타난 바와 같이 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0 및 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0 모두 선별 시 제조한 시료와 유사한 결과를 나타내었다.

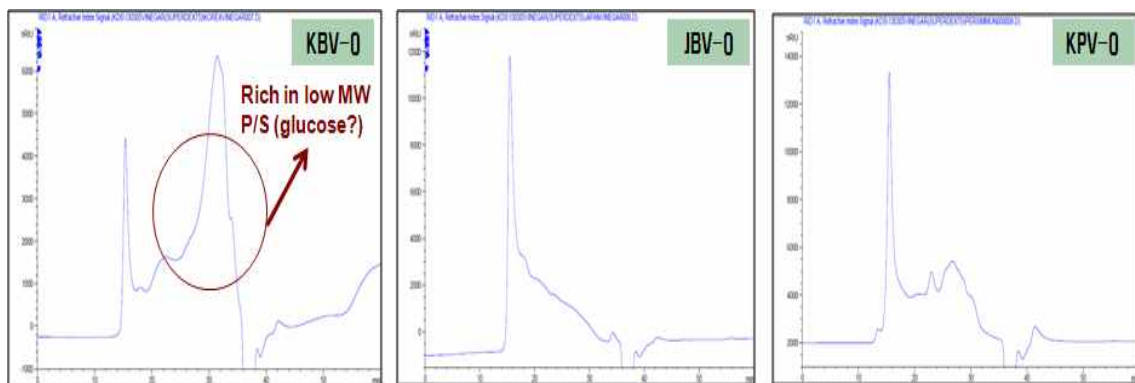


Fig. 23. Elution patterns of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars on size-exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex GL 75 column.

국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0 경우, 다른 시료들 보다 저분자 다당이 다량 검출되었는데 이는 저분자 glucan이 시료 중 여전히 존재하고 있음을 확인케 하였다. 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0의 경우, 선별시 제조한 시료와 유사하게 비교적 순수하게 고분자 다당만이 분리되었고 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0의 경우, 다양한 구성당 조성을 바탕으로 재료인 감 유래 pectin 물질로 구성되어 있을 가능성을 보여줌으로써 저분자 pectin 물질이 함유되어 있을 것이라고 추측케 하였다.

2) 선별 전통 발효식초 유래 조다당과 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0는 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있어 이들이 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 높다고 판단되었으므로 이를 재차 확인하기 위해 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하고자 하였다.

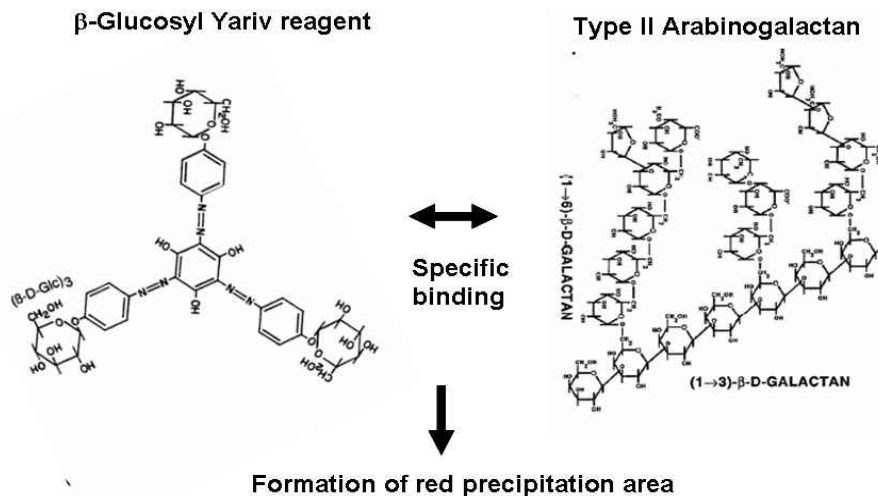


Fig. 24. Scheme of the reactivity between arabinogalactan and β -glucosyl Yariv reagent.

국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0의 경우에도 높은 비율은 아니지만 arabinose와 galactose를 함유하고 있어 동일한 방법으로 진행되었다.

β -Glucosyl Yariv reagent [1,3,5-tri-(4- β -glucopyranosyl oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene]는 arabinogalactan 중 II형의 arabino- β -3.6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 24). 이는 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 알려져 있으므로 이를 이용, 국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0 및 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0에 대한 single radial 젤확산을 행하였다.

표준 arabino- β -3.6-galactan인 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증가하는 양상을 보여 주었으며, KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 모두 침전환 형성이 관찰되었다 (Fig. 25). 또한 KPV-0의 경우 침전환의 크기는 동일량의 표준물질이 형성한 침전환의 약 7% 정도로 나타났으며 (Fig. 26), 따라서 KPV-0의 구조 내에 II형 arabinogalactan이 소량 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. JBV-0 및 KPV-0도 5% 이하의 침전환이 소량 형성되었다.

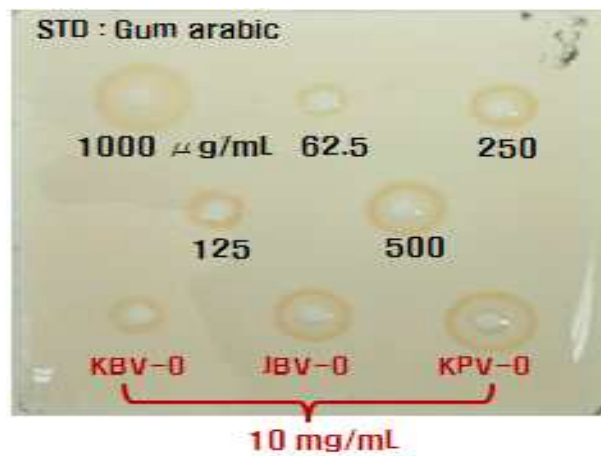


Fig. 25. Single radial gel diffusion of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars with β -glucosyl Yariv reagent. β -Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity to arabino-3,6-galactan. Gum arabic was used as a positive reference.

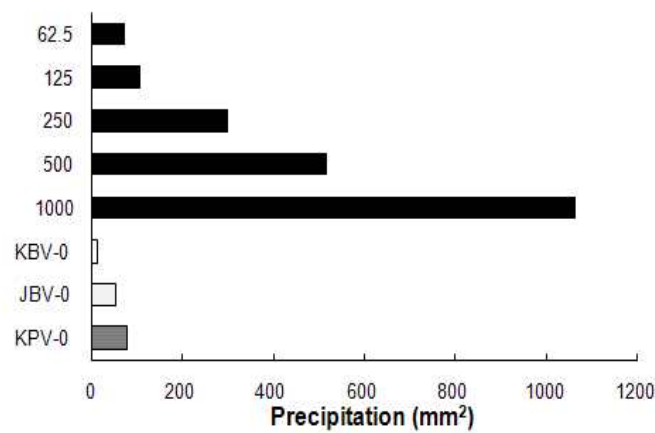


Fig. 26. Reactivity between β -glucosyl Yariv reagent and KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars.

나. 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 전신면역계 활성화 평가

1) 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 항보체 활성화

인체의 초기 감염 방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 3종의 전통 식초[국내 현미식초 유래 조다당 KBV-0, 일본 현미식초 유래 조다당 JBV-0 및 국내산 감식초 유래 조다당 KPV-0] 유래 다당의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer의 방법 (Fig. 27)에 따라 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군 (positive control)으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성화 다당체인 PSK (polysaccharide K)를 사용하였으며, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였으며 음성대조군에서의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 각 시료의 활성화능을 확인하였다.

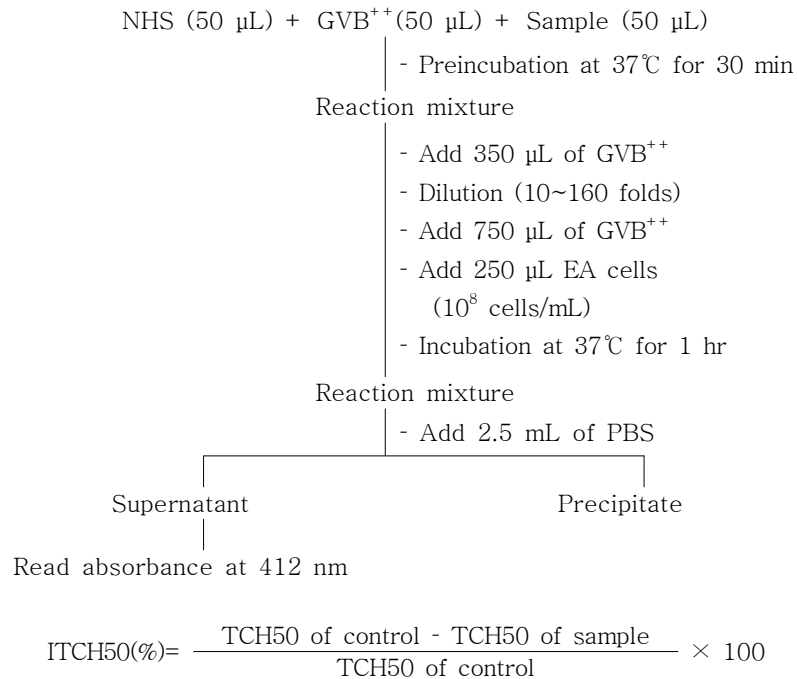


Fig. 27. Assay procedures for anti-complementary activity.

KBV-0 및 KPV-0 1,000 μg/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군 대비 (약 60%) 상대적으로 약 62%, 65%의 높은 활성을 보였는데, 특히 KPV-0 100 μg/mL의 농도에서는 동일 농도를 가한 양성대조군보다 훨씬 높은 활성을 나타내었다. JBV-0의 경우에는 1,000 μg/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군보다 낮으나 상대적으로 양호한 약 53%의 활성을 보였다 (Fig. 28).

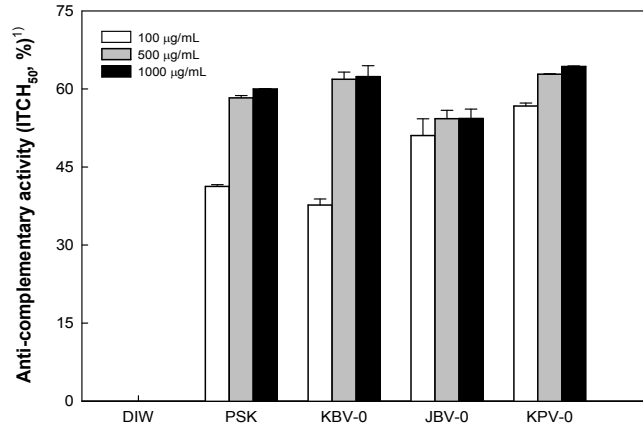


Fig. 28. Anti-complementary activity of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars.

¹⁾Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. ³⁾Values are the mean of triplicate±SD.

일반적으로 1,000 µg/mL의 농도에서 60% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있기 때문에, 3종의 시료 모두 높은 항보체 활성을 지니고 있음이 확인되었으며 특히 가장 높은 항보체 활성을 나타낸 KPV-0는 Fig. 29에 나타난 바와 같이 농도 의존적으로 활성의 증가 경향을 보였다.

보체계의 활성화 경로는 크게 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)로 구성되어 있으며, 고전경로의 활성화에는 Ca^{++} 및 Mg^{++} 모두가 관여하고 부경로에는 Mg^{++} 만이 선택적으로 관여하고 있다고 보고되어 있다. 따라서 특정 금속이온이 제거된 반응계와 기본 반응계의 활성을 비교할 경우, 시료의 보체계 활성화 경로를 예측 할 수 있다.

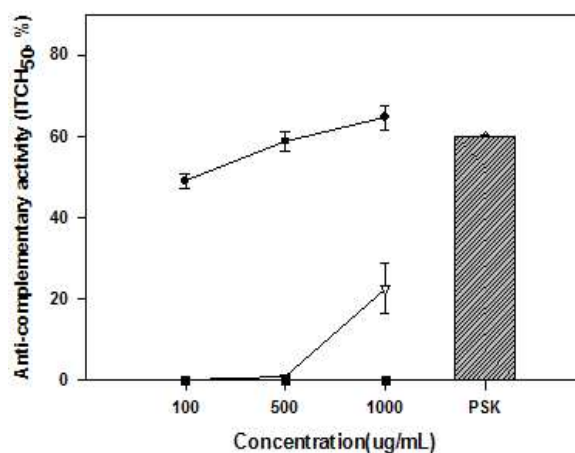


Fig. 29. Effect of calcium and magnesium ions on the anti-complementary activity of KPV-0 isolated from the Korean persimmon vinegar.

◆; GVB⁺⁺ (Ca^{++} and Mg^{++}), ▽; Mg^{++} -EGTA-GVB⁻⁻ (Mg^{++} only), ■; EDTA-GVB⁻⁻ (divalent metal ion free)

항보체 활성평가 시 가장 높은 활성을 지녔던 KPV-0를 대상으로 보체계 활성화 경로를 예측하기 위해 실험한 결과, Fig. 30에서 보는 바와 같이 Ca^{++} 이 선택적으로 제거된 반응계에서는 Ca^{++} 와 Mg^{++} 가 존재하는 기본 반응계에 비해 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서만 약 30%의 활성이 나타났으며, Ca^{++} 및 Mg^{++} 모두가 제거된 반응계에서는 활성이 거의 소실됨을 확인하였는데, 이는 KPV-0의 보체계 활성화가 고전경로와 부경로 모두를 경유하여 나타남을 시사하였다.

Mayer법에 의한 항보체 활성 측정법은 1차 반응단계에서 시료 성분의 보체계 활성화에 의한 보체의 소모정도를 측정하는 방법으로, 만일 시료 중 보체의 활성화가 아닌 특정한 저해 성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 나타낼 수 있는 문제점을 갖고 있다.

일반적으로 보체계의 고전경로 및 부경로가 활성화되면 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분인 C3가 C3a와 C3b로 분해되고 이 후 연속적으로 C5의 활성화, C6~C9의 항원으로의 결합 반응을 진행하여 보체계가 활성화되므로 2차원 면역전기영동을 이용해 C3의 활성화 여부를 함인함으로써 Mayer 법에 의해 확인된 시료의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기인한 것인지, 혹은 보체 저해인자에 의한 결과인지를 확인할 수 있다.

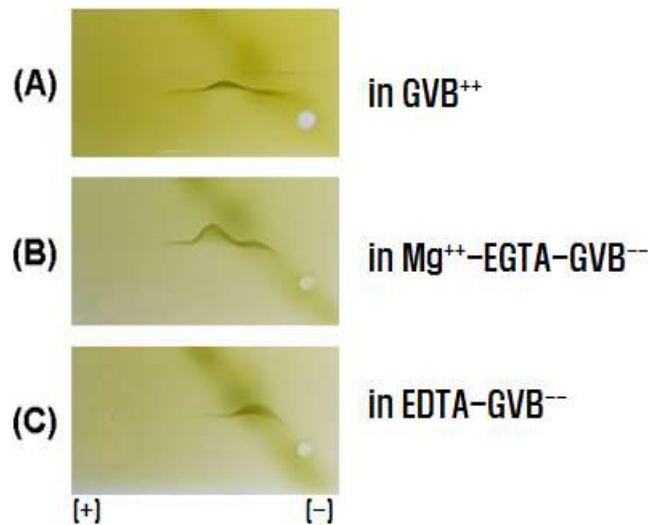


Fig. 30. Cross-immunoelectrophoretic patterns of C3 converted by KPV-0 isolated from the Korean persimmon vinegar in the presence of Ca^{++} . Normal human serum was incubated with the sample in GVB^{++} (A), Mg^{++} -EGTA- GVB^{-} (B), and EDTA- GVB^{-} (C) at 37°C for 30 min. The sera were subjected to immuno-electrophoresis using anti-human C3 antibody to located C3 cleavage products.

따라서 KPV-0를 기본 반응계와 특정 금속이온이 제거된 반응계에서 각각 반응시킨 후 C3 인자의 분해여부를 관찰한 결과 Ca^{++} 와 Mg^{++} 가 모두 존재하는 정상 반응계에서는 well로부터의 첫 번째 침강선에 비해 두 번째 침강선이 높게 나타남을 확인할 수 있었는데 첫 번째 침강선은 C3, 두 번째 침강선은 C3a와 C3b에 의해 기인함을 고려해 볼 때 이는 KPV-0의 항보체 활성이 보체 저해인자에 의한 것이 아님을 증명하였다(Fig. 30).

반면 금속이온이 모두 제거된 반응계에서는 첫 번째 침강선만이 뚜렷하게 나타나고 두 번째 침강선은 불분명하게 나타나는 것이 확인되었으며 Ca^{++} 만이 선택적으로 제거된 반응계에서

는 정상 반응계만큼 두 번째 침강선의 높이가 상대적으로 높아진 것을 확인할 수 있었다. 이는 고전경로가 저해된 상태에도 C3의 활성화가 일어났음을 의미하며, KPV-0의 보체계 활성이 고전경로 및 부경로 모두를 경유하여 나타남을 재차 확인시켜주는 결과였다.

2) 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 세포 독성

식초 선별 과정에서 높은 수율과 활성을 보였던 3종의 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage와 대식세포주 Raw 264.7 cell line, 장관상피세포주 Caco-2 cell line을 각 세포에 대한 직접 독성여부를 측정하였다.

즉, 2×10^6 cells/mL로 조정된 macrophage cell (Fig. 31A) 및 Raw 264.7 세포 (Fig. 31B)에 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0를 시료농도 1.6 μg 에서 1,000 μg 까지, 또한 동일 세포수로 조정된 장관상피세포인 Caco-2 세포 (Fig. 31C)에는 시료농도 1 μg 에서 1,000 μg 까지 조정된 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며 그 결과는 Fig. 31에 나타난 바와 같이 모든 세포군에서 뚜렷한 독성은 나타나지 않았으며 특히 고농도에서 생육의 저해는 관찰되지 않았다.

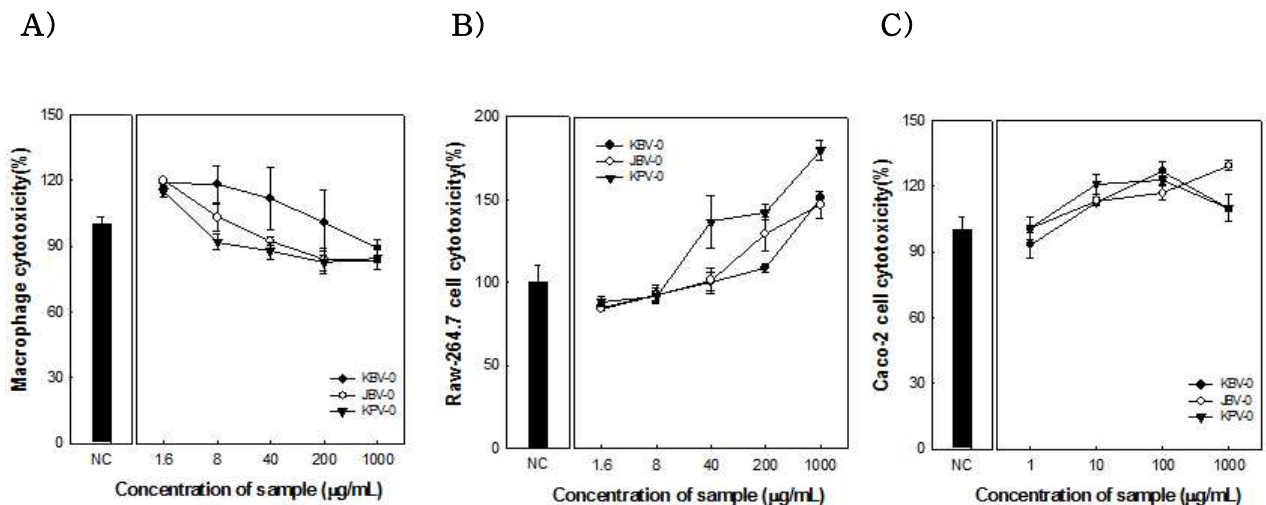


Fig. 31. Cytotoxic effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 isolated from traditional vinegars on murine macrophage (A), RAW 264.7 cell line (B) and Caco-2 cell line (C) *in vitro*. Each cells (2.0×10^6 /mL) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 24 h. The cell cytotoxicity were determined by cell counting kit (CCK) assay. NC and PC mean negative and positive control, respectively.

Balb/c mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage의 경우 3종의 시료 모두 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도보다 오히려 저농도로 갈수록 세포의 증식능이 관찰되었으며, 장관상피세포주 Caco-2 세포에서는 3종류 시료 모두 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포의 증식능이 관찰되었으나, KBV-0와 KPV-0는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약간 감소하였고 JBV-0만이 농도 의존적으로 증가하였다.

대식세포주 RAW 264.7 세포의 경우에는 KBV-0 및 JBV-0에서 시료농도 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 control 대비 약 1.5배의 증식능을 보여주었고, 특히 KPV-0는 저농도인 40 $\mu\text{g/mL}$

에서부터 control 대비 약 1.3-4배 정도의 증식을 보여주어 KBV-0와 JBV-0와 대비 가장 높은 증식능을 보여주었다.

3) 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 대식세포에 대한 활성

가) 대식세포(macrophage)의 NO 생산에 미치는 영향

전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당 시료는 모두 농도의존적으로 대식세포를 자극하여 NO를 생성하는 경향을 보였다 (Fig. 32). 하지만 시료대신 동일부피의 배지만이 첨가된 양은 음성대조군 (negative control, NC)과 비교할 때 KBV-0, JBV-0의 자극 활성은 유의적 차를 보이지 않은 반면, KPV-0는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 NC의 약 1.7배에 이르는 높은 NO 생성량을 유의적으로 나타냈으며 농도 의존적 활성증가 양상도 뚜렷하게 관찰되었다.

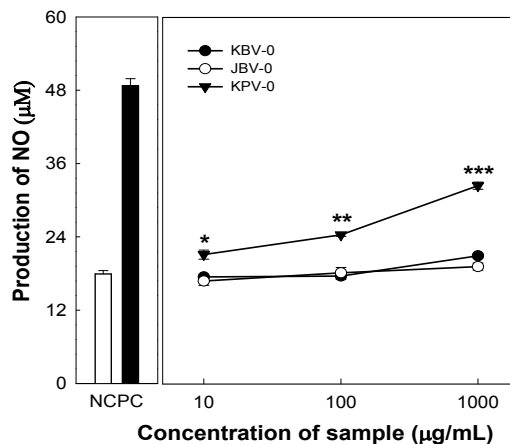


Fig. 32. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 on production of NO by RAW 264.7 cells. Peritoneal macrophage($2.0 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 24 h. The concentrations of NO in the medium were determined by Griess reagent. NC and PC mean negative and positive control, respectively.

나) 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 TLR(toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다.

IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로서 세균감염에 따른

염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되고 있다. 또한 TNF- α 은 특정 암세포에 대한 세포독성과 항 바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.

따라서 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당 시료들은 mouse 복강으로부터 분리한 macrophage와 대식세포주 Raw 264.7 cell line를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생성을 측정한 결과, mouse 복강으로부터 분리한 macrophage cells의 경우(Fig. 33), KBV-0와 JBV-0 두 시료는 농도 의존적으로 증진시켰으나, KPV-0의 경우에는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약간의 감소하는 경향이 나타났다.

IL-6 및 IL-12의 경우, KBV-0와 JBV-0에 비해 KPV-0는 저농도인 8 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서부터 급격히 cytokine의 생성 유도능이 높게 나타났으며 (Fig. 33A 및 B), TNF- α 의 경우 (Fig. 33C)에는 40 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 급격히 cytokine의 생성 유도능을 높게 촉진시켰다. 각 cytokine 생산 유도활성은 공히 감식초 유래 다당 KPV-0에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

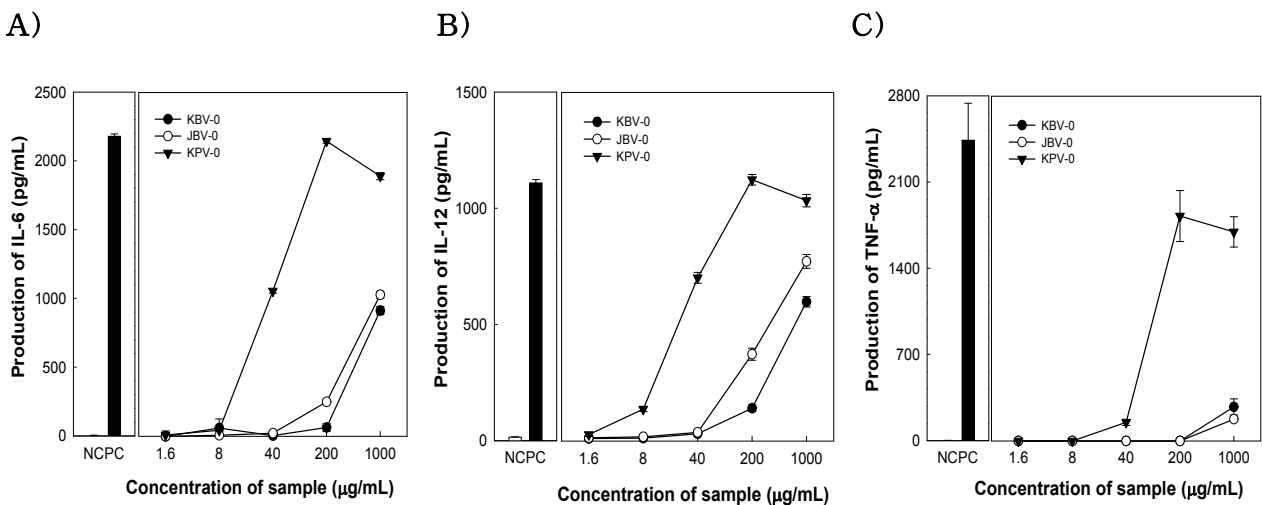


Fig. 33. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 of production of cytokines IL-6 (A), IL-12 (B), TNF- α (C) on peritoneal murine macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96-well plate for 24h. The concentrations of various cytokines in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control).

한편 대식세포주 RAW 264.7 cell line를 이용하여 동일실험을 행하고, IL-6, IL-12 및 TNF- α 를 측정한 결과(Fig. 34), 각 시료 KBV-0, JBV-0와 KPV-0는 모두 농도 의존적으로 활성 증가 경향을 모였지만 각 cytokine에서 모두 가장 높은 활성을 보인 시료는 KPV-0였다. 특히 IL-6와 IL-12의 경우 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 positive control 대비 더 우수한 활성을 나타내었다 (Fig. 34A 및 B). TNF- α 의 경우에는 KBV-0, JBV-0와 KPV-0 모두 고농도 1,000

µg/mL에서 positive control 대비 우수한 활성을 나타내었으나, 저농도인 100 µg/mL에서는 KPV-0 상대적으로 우수한 생산 자극 활성을 보였다 (Fig. 34C).

이상의 결과로부터 mouse 복강으로부터 분리한 macrophage와 대식세포주 RAW 264.7 cell line에서 KBV-0와 JBV-0 보다 KPV-0가 모두 우수한 cytokine 생산 자극활성을 보임으로써 전반적으로 KPV-0가 대식세포에 대해 더 유효하게 작용함을 추론케 하였다.

본 실험에서 mouse 복강으로부터 분리한 macrophage와 대식세포주 RAW 264.7 cell line을 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0에 의해 24시간 자극한 결과, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 TNF-α 및 IL-6의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인되었으므로 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 생체방어에 작용하는 면역기구를 활성화(조절)하는 기능이 있다고 판단되었다.

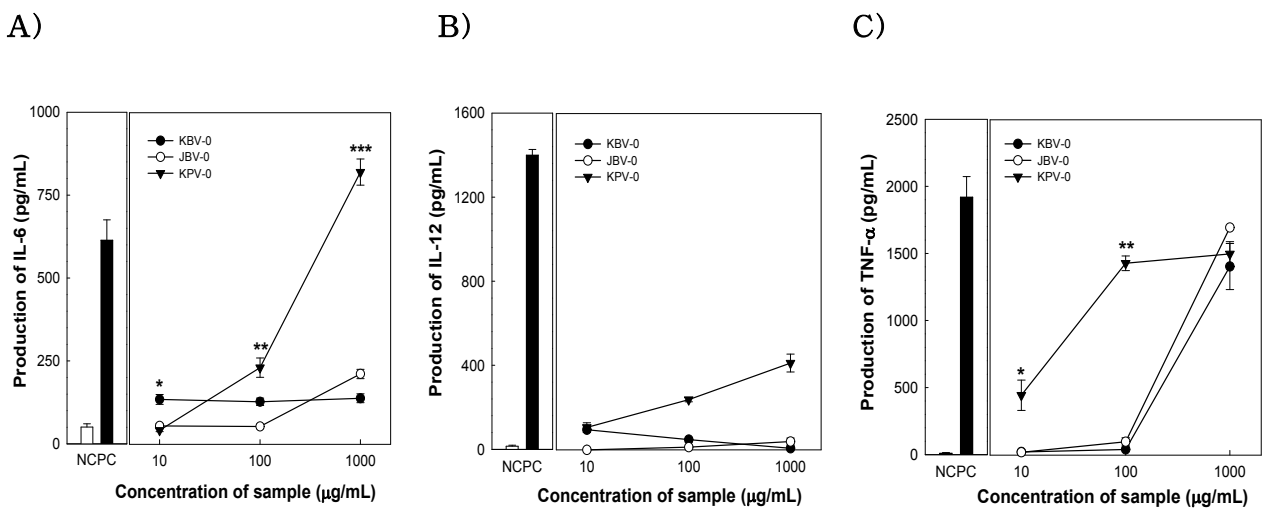


Fig. 34. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 of production of IL-6 (A), IL-12 (B) and TNF-α (C) on RAW 264.7 cell line. RAW 264.7 cell line (2.5×10^6 /mL) were treated with various concentrations of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96-well plate for 24h. The concentrations of various cytokines in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5mg/mL lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control).

한편, reverse transcription PCR을 이용한 유전자의 발현을 확인한 실험에서는 JBV-0가 각 농도에서 공히 높은 IL-6 mRNA의 발현을 나타냈으며, 특히 1000 µg/mL의 농도에서 JBV-0는 무처리군에 비해 약 6배의 IL-6 mRNA의 발현을 보였다 (Fig. 35). KPV-0에서는 JBV-0보다는 낮은 발현을 나타내었지만, 1000 µg/mL의 농도에서 KPV-0는 무처리군에 비해 약 2배 이상의 IL-6 mRNA의 발현을 보였으나, KBV-0는 거의 활성을 나타내지 않았다.

이상의 결과는 단백질 level에서의 측정 결과와 다소 상이하었지만 이는 측정법이 다르고 mRNA와 단백질의 생체내 반감기가 상이함을 고려할 때, 배양 시간별 재실험을 통하여 재확인 요청되는 사안이라 판단되었다.

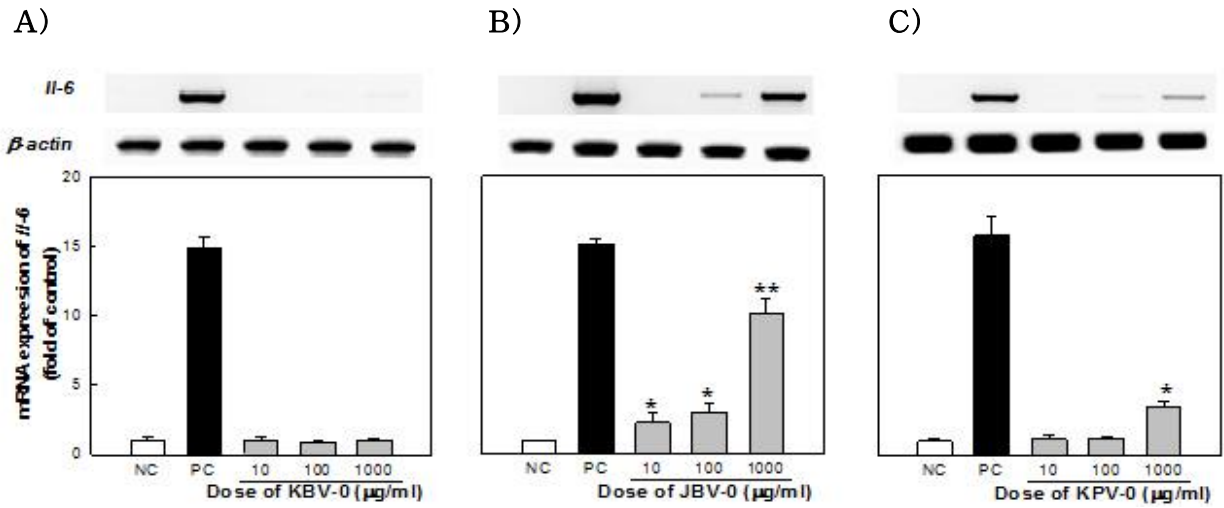


Fig. 35. Effect of KBV-0 (A), JBV-0 (B) and KPV-0 (C) on mRNA expression of *IL-6* of macrophage cell line, RAW 264.7.

다) 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 Fc receptor 발현

대식세포는 보체(C3b) receptor와 IgG Fc receptor를 가지고 항원항체 복합체를 세포표면에 부착시켜 탐식을 실시하였는데, 대식세포의 Fc 수용체를 통한 탐식에 대한 연구결과에 의하면 면역체계에서 대식세포의 바이러스 등 다양한 항원들의 세포내 탐식이 인접 T 세포에 항원 인식을 유도하는데 중요하게 관여한다고 보고되고 있다. 대식세포의 세포막에는 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIII 등의 subtype 들이 있으며, 이들 중 FcγRI, FcγRIIa, 및 FcγRIII들은 활성 수용체로써 세포질 영역에 공통적으로 immunoreceptor tyrosine activation motif (ITAM)가 존재하여 ITAM 특정부위의 타이로신 인산화를 통해 Fc 수용체를 통한 탐식과정에 양성적으로 작용하고, FcγRIIb는 억제 수용체로써 immunoreceptor tyrosine inhibition motif (ITIM)을 가지고 있어 음성적으로 작용함이 밝혀져 있다.

따라서 macrophage 탐식과정에 있어 중요한 역할을 수행하는 FcRIIa의 mRNA 발현을 관찰한 결과(Fig. 36), FcRII receptor의 발현에 있어 KBV-0, JBV-0는 어떠한 영향도 미치지 않은 반면, 반면 KPV-0는 1000 μg/mL의 농도에서 유의적으로 FcRII receptor 발현을 증가시키는 것으로 나타남으로써 감식초 유래 KPV-0가 macrophage의 탐식작용을 촉진할 수 있음을 확인할 수 있었다.

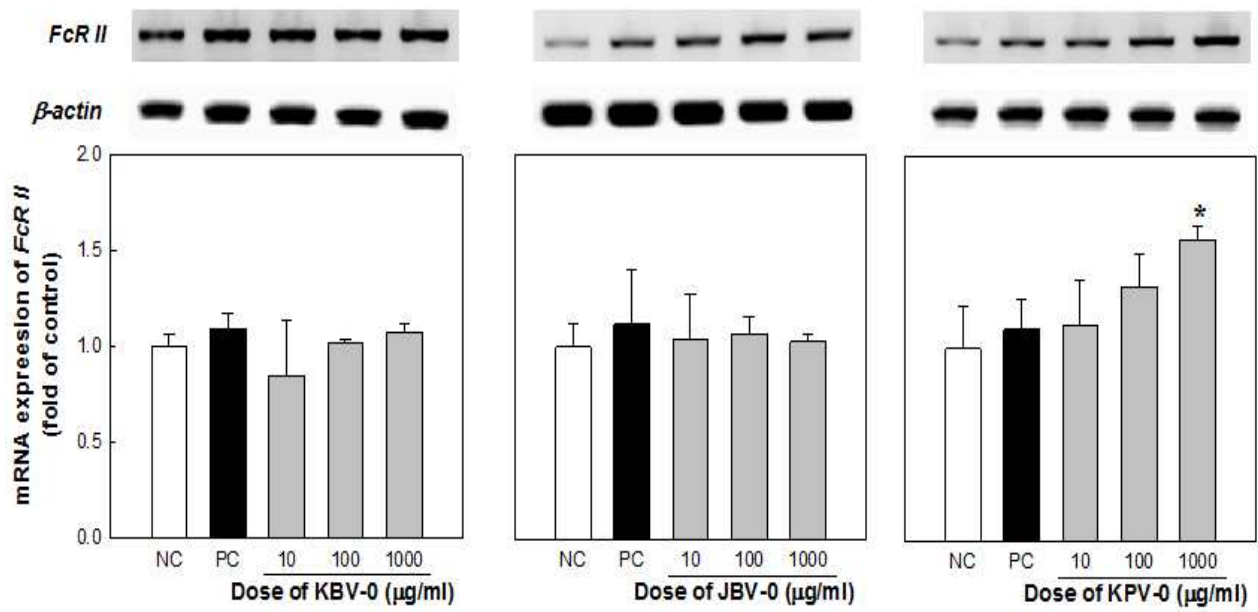


Fig. 36. Effects of KBV-0 (A), JBV-0 (B) and KPV-0 (C) on FcR II expression of macrophage cell line, RAW 264.7 (Reverse-transcription PCR)

다. 전통 발효식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 장관면역계에 대한 활성 (*in vitro & ex vivo*)

1) Peyer's patch cell에 의한 cytokine 생산 자극 활성 및 골수세포 증식활성

Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성되어 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데, 이중 골수의 증식에 관여를 하는 IL-6, GM-CSF 등과 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 된다. 이를 확인하기 위하여 시료에 의한 Peyer's patch cell에서의 cytokine의 생성량과 Peyer's patch cell 배양 상등액을 mouse bone marrow에 적용하여 골수세포의 proliferation에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당시료를 Peyer's patch cell에 처리하고 이들이 생산한 GM-CSF와 IL-6의 함량을 ELISA로 측정, 세 시료 모두 GM-CSF의 생산에는 어떠한 영향도 미치지 않는 결과를 보였다(Fig. 37). IL-6의 경우 KBV-0와 KPV-0는 1,000 μ g/mL에서보다 저농도인 100 μ g/mL에서 오히려 높은 생산 자극 활성을 보여주었으나, 전반적으로 활성은 낮은 편이었다.

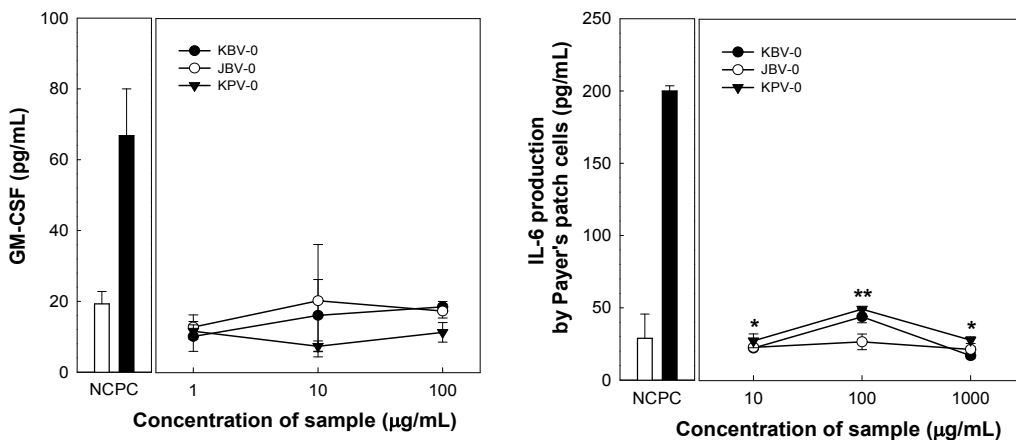


Fig. 37. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 on production of GM-CSF (A) and IL-6 (B) by Peyer's patch cells. Peyer's patch cells (2.0×10^6 /mL) were treated with KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 12 h. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC and PC mean negative and positive control, respectively.

한편, 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당의 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 검토한 결과, 세 시료 모두 무첨가군에 비해 약 4배로 유의적 활성 증가가 관찰되었으며, 특히 KPV-0의 경우 농도의존적으로 증식활성을 보였다. 특히 100 μ g/mL에서 양성 대조군과 유사 정도의 높은 활성을 나타내어 가장 우수한 골수세포 증식활성을 보였다(Fig. 38). 이는 앞선 대식세포의 자극 활성 결과와 동일한 결과로써 감식초 유래 다당 KPV-0가 우수한 활성을 나타낸다는 것을 재차 확인할 수 있는 결과였다.

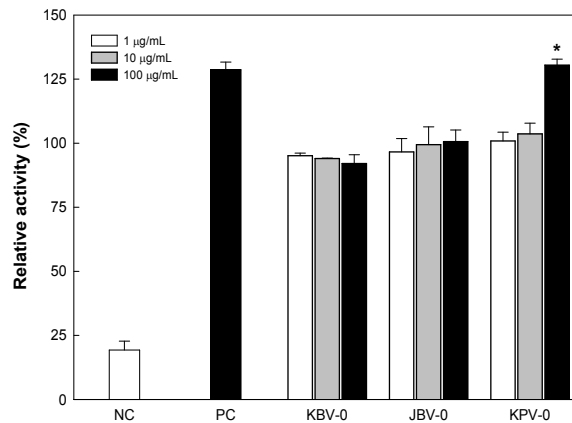


Fig. 38. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 on bone marrow proliferation activity through Peyer's patch cells. A 10 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control).

2) Peyer's patch cell에 의한 IgA 생산자극 활성

시료 자극에 의해 Peyer's patch 내의 T세포 중 T_{reg} 세포가 자극하게 되면 장관내 분비형 항체인 IgA의 생산에 중요한 역할을 담당하는 IL-10 및 transforming growth factor-β(TGF-β) 등의 cytokine의 생산이 촉진되고, 점막 면역과 관련된 IgA 항체의 생성이 증가하게 된다고 알려져 있다 (Fig. 39).

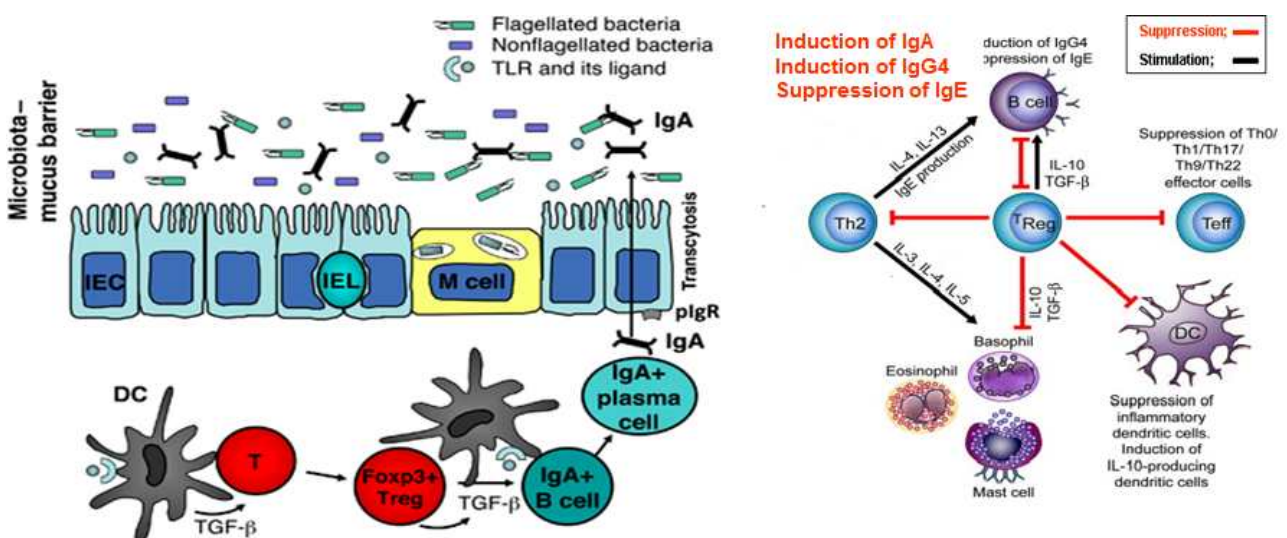


Fig. 39. IgA production by Peyer's patch cells and related regulatory mechanism.

전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당시료를 Peyer's patch cell에 처리하고 IgA의 생산량을 조사한 결과, 3 종류의 전통발효 식초 다당시료에서 모두 IgA의 생산량을 농도 의존적으로 증가시켰으며, control 대비 약 2~3.5 배의 활성을 나타내었다 (Fig. 40). 특히

감식초 유래 다당시료인 KPV-0의 경우, 지금까지의 면역활성 실험의 결과와 마찬가지로 가장 우수한 IgA 생산효과를 나타내었다.

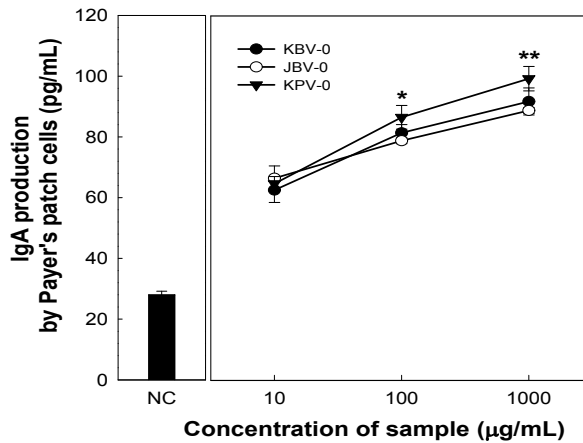


Fig. 40. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 on production of IgA by Peyer's patch cells. Peyer's patch cells (2.0×10^6 /mL) were treated with KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 24 h. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. Only media was used as the NC (negative control).

IgA는 인체에서 생산되는 총 면역글로브 항체의 약 6%를 차지하는 대표적 분비형 항체로써 주로 타액, 눈물 그리고 장점막(mucosal-associated lymphoid tissues; MALT)에서 주로 분비되며 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 전통 발효 식초 유래 면역 활성다당은 인체의 항상성 유지에 중요 역할을 담당하는 장관면역계에 유효하게 관여함을 재차 확인할 수 있었다.

3) Peyer's patch cell에 의한 IgA 생산 관련 cytokine의 생산

전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당이 Peyer's patch cell을 자극하여 농도 의존적으로 IgA의 생산을 자극시켰다는 사실은 IgA생산에 관련된 cytokine의 변화가 예상되었다. 따라서 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 다당시료의 직접적인 자극에 의한 Peyer's patch cell의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정된 결과, 시료 처리 5일차에 활성 다당 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0은 TGF-β의 생산을 촉진하였고, IL-10는 어떠한 영향도 미치지 않음이 확인되었다 (Fig. 41A).

한편 Peyer's patch cell의 TGF-β 생산자극 효과는 세 시료 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 무처리군 대조군에 비해 최대 30배 이상의 높은 생산량을 보였다. 특히, KPV-0의 경우 10 µg/mL 저농도에서도 무처리군 대비 약 15배 이상의 높은 생산량을 보여주며 KBV-0와 JBV-0보다 매우 높은 생산량을 나타내었다 (Fig. 41B).

이상의 결과는 전통 식초 유래 다당 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0가 모두 장관면역세포의 IgA 생산을 촉진한 결과는 IL-10 및 TGF-β의 생산 결과와도 일치하였으며 따라서 장관면역

세포 중 T_{reg} 세포가 시료에 의해 자극되어 특히 $TGF-\beta$ 의 분비를 촉진시키고, 이들에 의해 IgA^+ B cell의 분화를 자극, IgA^+ plasma cell로의 전환을 유도시켜 다량의 IgA 를 생산토록 유도함을 추론할 수 있다.

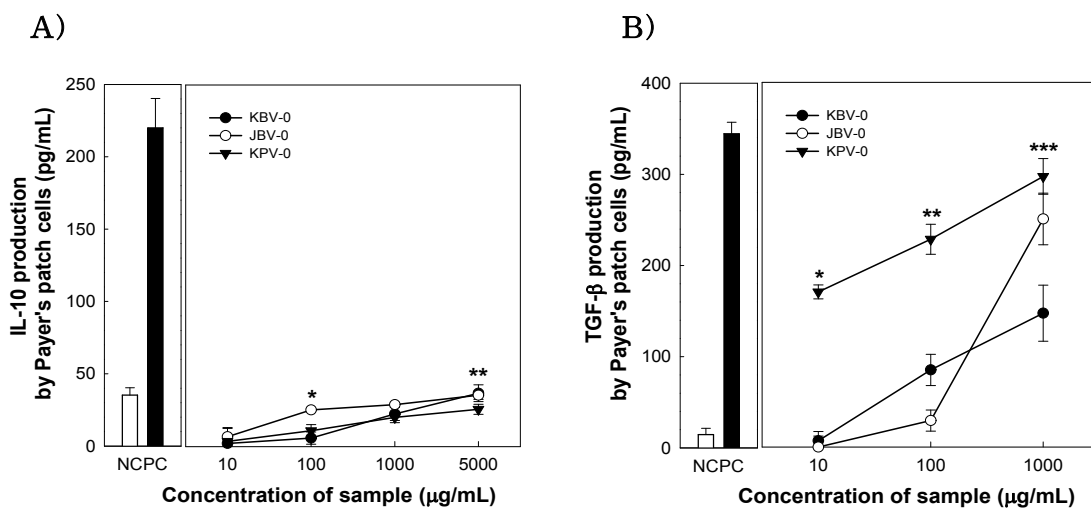


Fig. 41. Effect of KBV-0, JBV-0 and KPV-0 on production of IL-10 (A) and $TGF-\beta$ (B) by Peyer's patch cells. Peyer's patch cells (2.0×10^6 /mL) were treated with KBV-0, JBV-0 and KPV-0 in 96 well plate for 4 days. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC and PC mean negative and positive control, respectively.

4) Caco-2 cell과 면역세포의 혼합배양계를 이용한 면역세포의 증식능 (*in vitro*)

전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 및 KPV-0 시료는 다당이라는 특성상, 시료의 장관내 흡수에 대한 논란이 있는 것이 사실임. 최근 다당과 같은 거대분자의 흡수가 기존에 제시되어 왔던 장관 상피세포 사이의 tight junction을 통한 흡수, endocytosis 및 exocytosis에 의한 상피세포 통과라는 가설외에도 Peyer's patch를 둘러싼 장관측 상피세포 중 M-cell을 경유하여 진행된다는 많은 연구가 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서는 경구투여된 활성다당이 장관 상피세포를 통과하여 흡수된 후, 체내 면역세포들과 반응, 그들을 활성화시킬 수 있다는 가설을 증명하기 위해 Transwell® insert가 장착된 12 well plate를 이용, 실험을 실행하였다.

즉, transwell membrane 상층부에는 장 상피 모델 세포주인 Caco-2 cell을 배양하여 세포 monolayer를 형성시키고, 하층부에는 대식세포 모델세포주인 Raw 264.7를 배양하면서, transwell 상층부에 전통 발효 식초 유래 KBV-0, JBV-0 alc KPV-0 다당을 첨가하여 본 시료가 Caco-2 cell을 통과하여 하층부에 존재하는 Raw 264.7 cell을 자극할 수 있는지 여부를 Raw 264.7 cell이 생산하는 IL-6 및 IL-12 함량을 측정하였다.

실험 결과, Fig. 42에 나타난 바와 같이 전통발효식초 다당 KPV-0은 tranwell 상층부의 Caco-2 cell monolayer를 통과하여 하층부의 Raw 264.7 cell을 자극하고 IL-6의 생산을 유도할 수 있음이 확인되었다. 시료 투과에 의한 IL-6 생산 정도는 시료를 단순히 Raw 264.7 cell 배양액에 첨가했을 때 보다는 낮았으나 KPV-0의 경우 1,000 μg/mL의 농도에서 약 65% 정도

의 투과율을 보이는 것으로 관찰되었다 (Fig. 42C).

한편, KBV-0와 JBV-0는 상대적으로 어떠한 영향도 끼치지 않음을 나타내었는데 (Fig. 42A 및 B), 이러한 결과는 KBV-0와 JBV-0보다 KPV-0가 장관상피세포의 세포막 지질층을 통과하는데 더 유리하게 작용했을 가능성으로 추론되었다. 향후, 본 assay system을 이용, 상층부에는 장관상피세포인 Caco-2 cell을, 하층부에는 장관면역세포인 Peyer's patch cell을 이식하여 사용할 경우, 장관과 유사환경을 갖는 *in vitro* 조건에서 장관면역세포 활성화 물질을 검색하는데 있어 신속, 간편하게 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

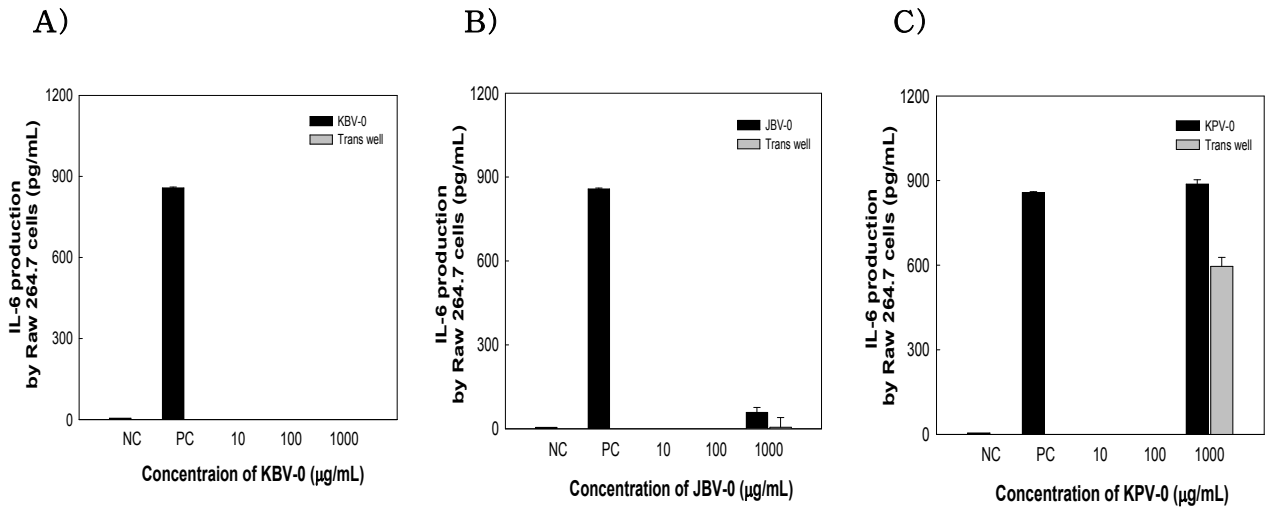


Fig. 42. Effect of KBV-0 (A), JBV-0 (B) and KPV-0 (C) passing through Caco-2 cell monolayer on cytokine production by Raw 264.7 cells.

이상의 결과로부터 국내산 전통발효 식초인 감식초 유래 KPV-0와 현미식초 유래 KBV-0는 높은 면역활성과 장관면역 증진활성을 갖고 있으며, 특히 KPV-0의 경우 일본산 현미식초인 가고시마 흑초 유래의 JBV-0보다 월등한 면역증진능을 소유한 것으로 확인되었다. 따라서 추후 국내산 전통발효 식초 유래 다당, KPV-0와 KBV-0를 대상으로 정제를 거쳐 구조특성에 대해 살펴보고, 특히 *in vivo* 실험을 통하여 경구투여에 의한 장관면역계에 대한 활성화 정도를 구체화하고자 하였다.

라. 전통발효식초의 면역활성 다당의 정제 및 구조화학적 특성 규명

1) 전통발효식초로부터 면역활성이 우수한 다당체의 분리·정제

각종 장관면역활성과 수율이 양호했던 한국 전통 현미식초 유래 조다당획분인 KBV-0는 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-75 column (2.5×90 cm)에 loading하고 동일 buffer를 이용하여 용출시켜 분자량이 상이한 3개 획분 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III로 정제하였다 (Fig. 43 및 44A). 또한 한국전통 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0 획분은 동일 정제과정을 거쳐 각각 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III의 3개 획분으로 분획하였으며 (Fig. 43 및 44B), 이들은 각각 전통발효 식초 유래 정제 다당획분으로 이후의 실험에 사용되었다.

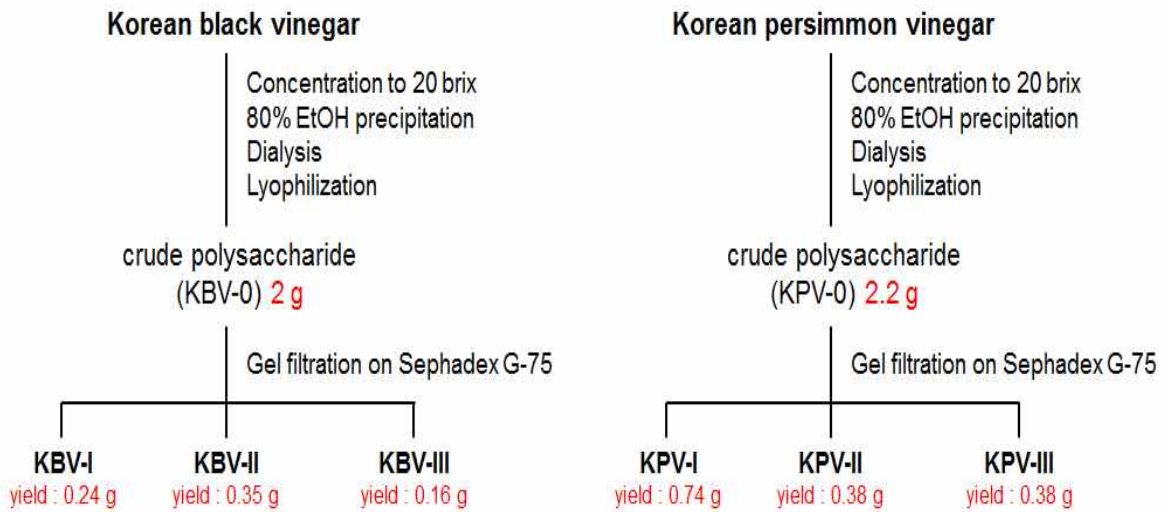


Fig. 43. Isolation and purification of the immuno-stimulating polysaccharides from Korean black (KBV-0) and persimmon vinegars (KPV-0).

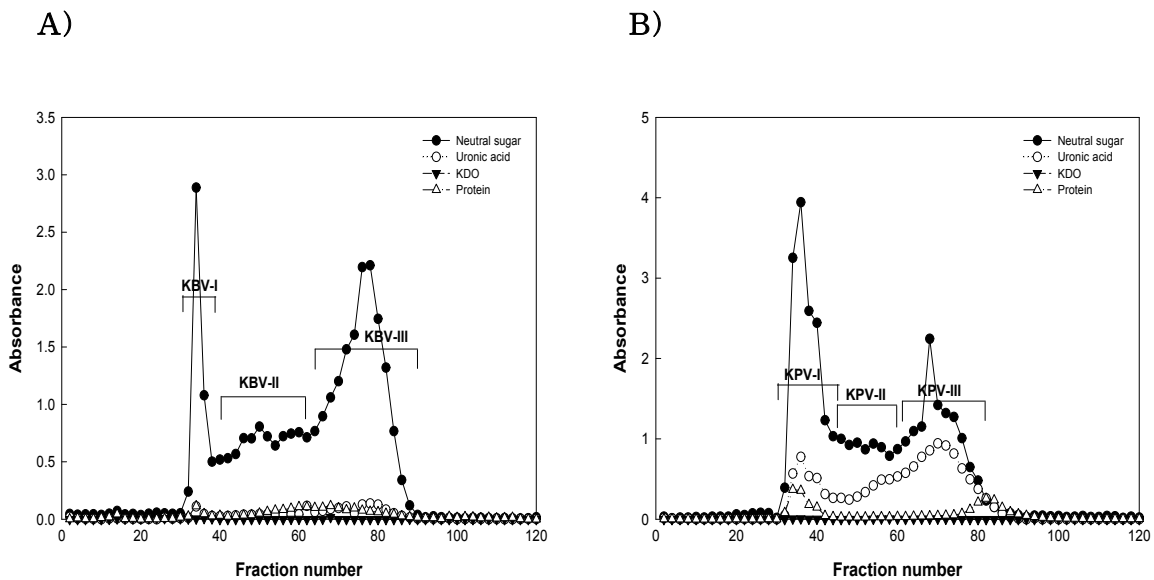


Fig. 44. Gel permeation chromatographies of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) from Korean black and persimmon vinegars on column of Sephadex G-75. KBV-0 and KPV-0 were subjected on Sephadex G-75 (2.5×90 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5) at the flow rate of 0.2 mL/min.

최종 정제과정에서 얻어진 각 획분들은 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 Superdex 75 GL을 이용한 HPLC를 행한 결과, 현미식초 유래 정제 다당 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III 세 획분 모두 단일 peak를 나타내지는 않았으나 비교적 정제도가 우수한 주 peak를 중심으로 분자량이 상이한 소량의 물질이 혼입된 경향을 보였음. 표준물질(pullulan series)을 이용하여 이들의 주 peak 분자량을 측정된 결과, 이들은 각각 분자량 60 kDa, 10 kDa, 3 kDa의 다당체임이 확인되었다 (Fig. 45).

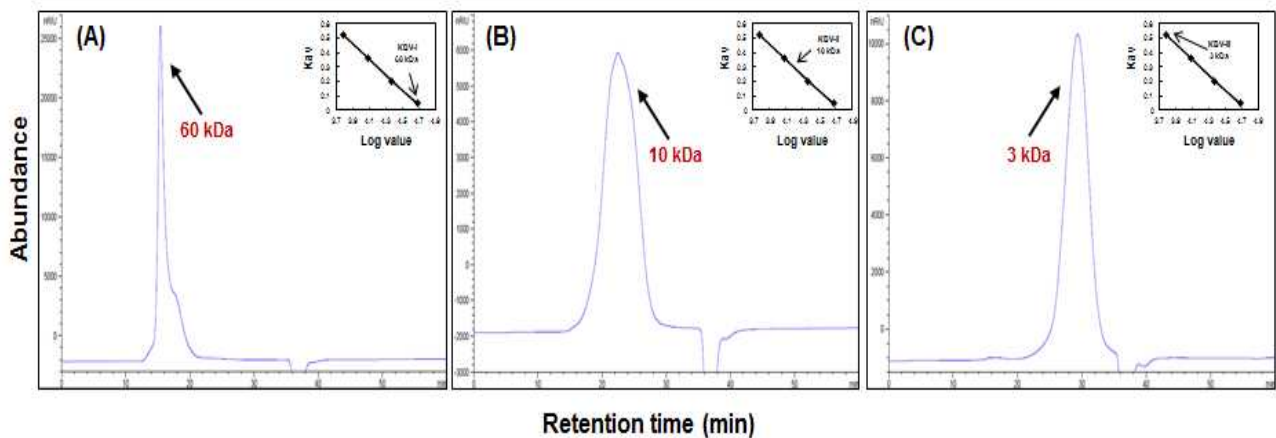


Fig. 45. Elution pattern and MW-determination of KBV-I (A), II (B) and III (C) purified from Korean black vinegar (KBV-0) on size exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75 columns.

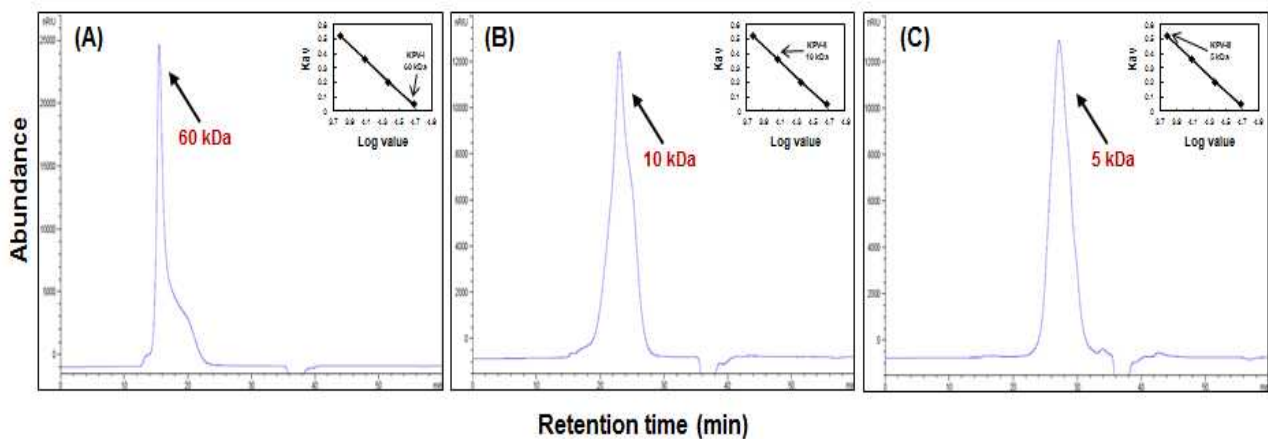


Fig. 46. Elution pattern and MW-determination of KPV-I (A), II (B) and III (C) purified from Korean persimmon vinegar (KPV-0) on size exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75 columns.

한편, 감식초 유래 정제 다당획분인 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III 획분의 경우도 모두 단일 peak를 나타내지는 않았으나, 주 peak를 중심으로한 분자량을 측정된 결과, 이들은 각각 분자량 60 kDa, 10 kDa, 5 kDa의 다당체임을 확인하였다 (Fig. 46).

2) 정제된 다당 획분의 구조화학적 특성 규명

한국산 전통 현미식초 유래 정제 다당획분인 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III의 일반 화학특성을 살펴본 결과, Table 16에 나타난 바와 같이 세 획분 모두 90%이상의 높은 중성당 함량을 보였으며 3.1-9.6%의 산성당 함량을 나타냄으로써 이들이 주로 중성 다당체로 존재함을 확인할 수 있었다. 한편, 일반적으로 식물추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO물질은 함유하고 있지 않았다.

Table 16. Chemical composition of KBV-I, II and III purified from Korean black vinegar

	KBV-I	KBV-II	KBV-III
(Mole %)			
Chemical properties			
Neutral sugar	96.9±2.0	96.0±4.8	90.4±3.4
Uronic acid	3.1±1.1	4.0±0.4	9.6±1.2
KDO-liked material	-	-	-
Protein	-	-	-
Sugar component			
Rhamnose	2.0±0.2	1.1±0.1	1.0±0.1
Fucose	0.1±0.0	0.2±0.0	0.5±0.0
Arabinose	7.0±0.4	7.5±0.2	4.9±0.4
Xylose	6.9±0.3	9.0±0.3	9.2±0.5
Mannose	58.4±0.9	27.0±0.1	9.4±0.1
Galactose	12.1±0.1	15.4±0.1	4.0±0.1
Glucose	10.3±0.1	35.8±0.3	61.4±0.8
Galacturonic acid+Glucuronic acid	3.1±1.1	4.0±0.4	9.6±1.2

현미식초 유래 정제 다당획분들을 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과 (Fig. 47), 고분자의 KBV-I은 특히 mannose를 58.4%의 높은 비율로 함유하고 있었으며 KBV-II는 mannose와 glucose를, 저분자 다당인 KBV-III는 glucose를 상대적으로 높은 비율로 함유하고 있음이 확인되었다. 이러한 사실은 현미식초 유래 KBV-I가 초산 발효가 일어나기 전, 알콜 발효 단계에서 관여하는 효모 유래의 최외각 세포벽 기원의 mannan에 기인한 다당임을 추론하게 하였으며, KBV-III는 원료인 현미 유래의 전분에서 기원한 limit dextrin이 잔존할 가능성이 예견되었다 (Table 16).

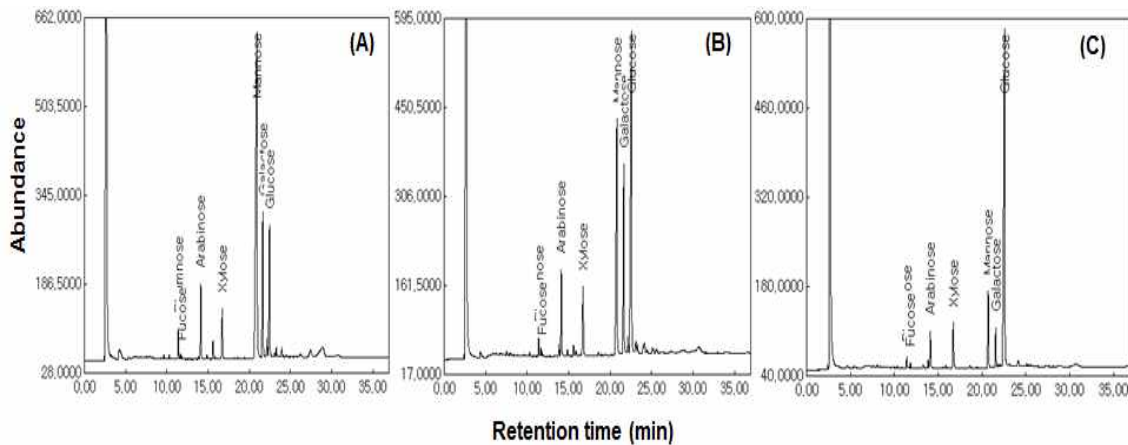


Fig. 47. GC chromatogram for the determination of sugar compositions of KBV-I (A), II (B) and III (C) purified from Korean black vinegar.

한편 감식초 유래 정제 다당획분인 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III의 일반 화학특성을 살펴본 결과, Table 17에 나타난 바와 같이 62.8-85.4%의 중성당 함량과 14.6-37.2%의 산성당 함량을 나타냄으로써 이들이 주로 원료인 감 유래의 pectic polysaccharide로 구성되어 있음을 유추해 볼 수 있었다. 특히, 중간 분자량 획분인 KPV-II의 경우, pectin에 공유적으로 결합되어 있다고 보고되고 있는 rhamnagalacturonan II (RG-II)의 지표물질인 KDO물질이 검출됨으로써, 이들이 발효과정 중 효소에 의해 pectin으로부터 homogalacturonan 부분이 절단되어 분리된 RG-II 다당으로 존재함을 추론할 수 있었다.

Table 17. Chemical composition of KPV-I, II and III purified from Korean persimmon vinegar

	KPV-I	KPV-II	KPV-III
(Mole %)			
Chemical properties			
Neutral sugar	85.4±2.7	71.3±1.6	62.8±1.0
Uronic acid	14.6±0.3	28.7±1.2	37.2±0.5
KDO-liked material	-	0.5±0.5	-
Protein	-	-	-
Sugar component			
2-Mefuc	-	0.6±0.0	-
Rhamnose	8.6±0.3	14.3±0.1	24.8±0.5
Fucose	0.3±0.0	0.7±0.0	1.6±0.0
2-Mexyl	-	0.6±0.0	-
Arabinose	31.7±0.3	20.5±0.2	8.3±0.1
Xylose + Apiose	1.7±0.0	2.1±0.0	4.8±0.1
Aceric acid	-	0.4±0.0	-
Mannose	19.6±0.3	6.9±0.1	2.6±0.0
Galactose	15.2±0.2	17.4±0.1	12.7±0.3
Glucose	8.3±0.1	7.3±0.1	8.0±0.3
Galacturonic acid+Glucuronic acid	14.6±0.3	28.6±1.2	37.2±0.5

감식초 유래 정제 다당획분들을 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을

분석한 결과, 고분자의 KPV-I은 rhamnose, arabinose, mannose, galactose 및 galacturonic acid의 함량이 높게 검출됨으로써 이들이 pectin유래의 RG-I 구조로 존재함을 추론할 수 있었다. 또한 KPV-II는 rhamnose, arabinose, galactose 및 galacturonic acid가 고비율로 검출됨과 동시에 식물체에서는 잘 관찰되지 않는 2-methyl fucose, fucose, 2-methoxylose, apiose, aceric acid가 검출됨으로써 KPV-II가 주로 RG-II 다당으로 구성되어 있음을 재차 확인할 수 있었다. 따라서 감식초 유래 다당은 주로 원료인 감에 존재하는 pectin이 발효과정 중 가수분해되어 RG-I과 RG-II로 분리되고 이들이 발효 및 숙성 및 과정 중 식초에 선택적으로 용해된 것임을 재차 확인할 수 있었다 (Fig. 48).

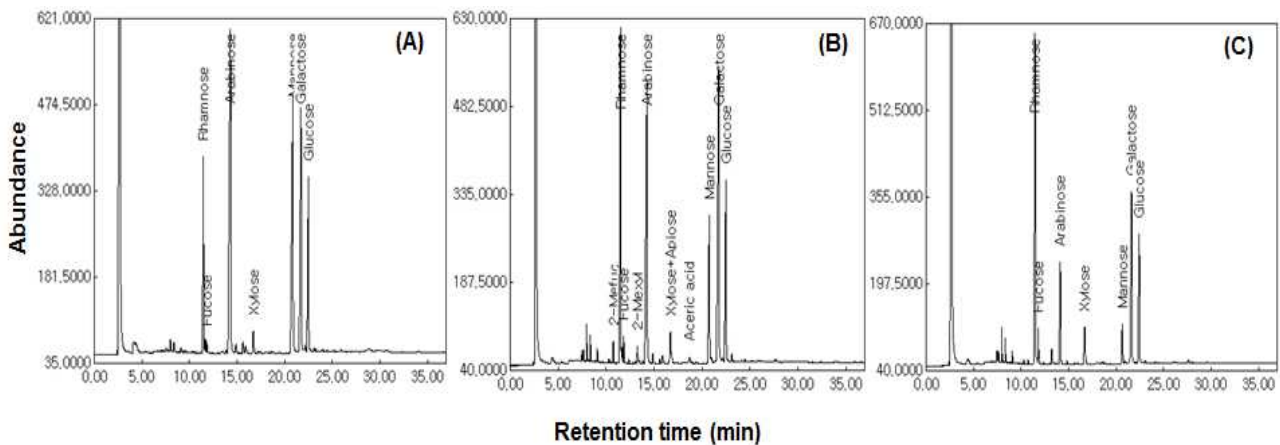


Fig. 48. GC chromatogram for the determination of sugar compositions of KPV-I (A), II (B) and III (C) purified from Korean persimmon vinegar.

3) 전통발효식초 유래 정제 다당 획분과 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

전통발효식초 유래 정제 다당획분들은 모두 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있어 이들이 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 높다고 판단되었으므로 이를 확인하기 위해 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다. β -Glucosyl Yariv reagent [1,3,5-tri-(4- β -glucopyranosyl oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene]는 arabinogalactan 중 II형의 arabino- β -3.6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는데, 이는 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 알려져 있으므로 이를 이용, 전통 현미식초 유래 정제 다당획분인 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III에 대한 single radial 젤확산을 행하였다.

Fig. 49에 보이는 바와 같이, 표준물질로 사용된 arabino- β -3.6-galactan인 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증가하는 양상을 보여 주었지만 현미식초 유래 고분자 다당획분인 KBV-I의 경우 약간의 침전환 형성이 관찰된 반면 (Fig. 49A), KBV-II 및 KBV-III는 각 농도에서 어떠한 반응환도 관찰되지 않았다. 따라서 현미식초 유래 정제다당에는 arabino- β -3.6-galactan 구조를 거의 포함하고 있지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 49B).

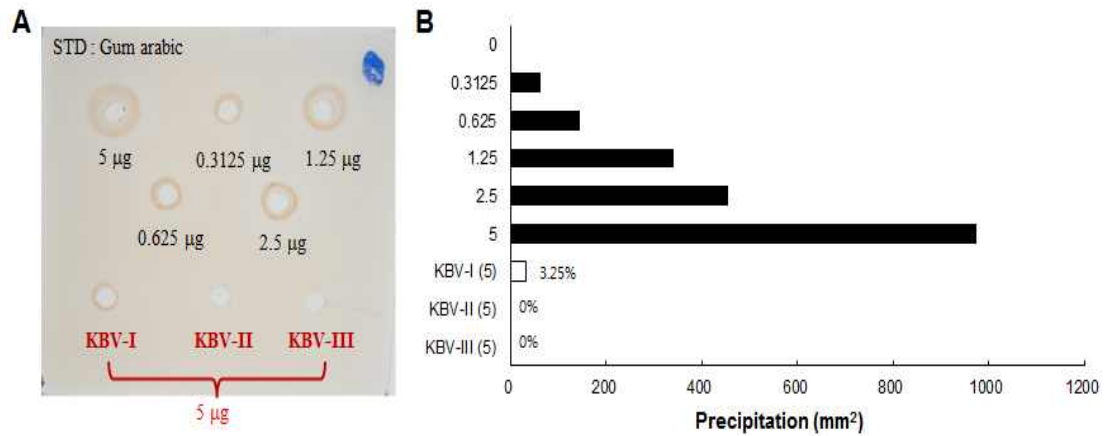


Fig. 49. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between α -glucosyl Yariv reagent and subfractions of KBV-I, KBV-II and KBV-III isolated from Korean black vinegar.

전통 감식초 유래 정제 다당획분의 경우 고분자량 다당획분인 KPV-I은 표준물질의 침전환과 비교한 경우 약 23%의 arabino- β -3,6-galactan을 함유한 것으로 평가되었지만 (Fig. 50B), KPV-II 및 KPV-III는 어떠한 침전환도 형성하지 않았으며(Fig. 50A), 이러한 사실로부터 감식초 유래 고분자 다당획분인 KPV-I은 arabino- β -3,6-galactan 구조를 side chain으로 하는 RG-I 구조로 존재함을 추론할 수 있었다.

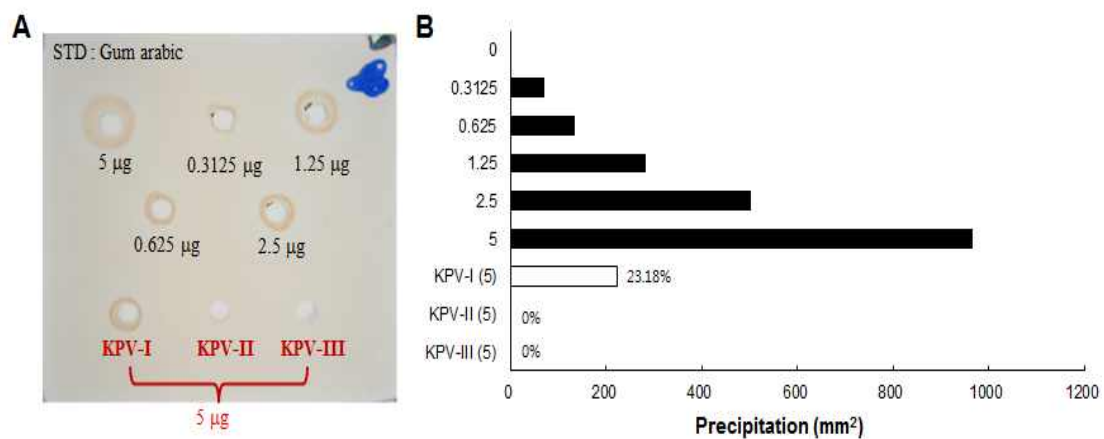


Fig. 50. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between α -glucosyl Yariv reagent and subfractions of KPV-I, KPV-II and KPV-III isolated from Korean persimmon vinegar.

마. 전통 발효식초 유래 정제 다당의 면역 활성 특성 평가 (*in vitro*)

1) 전통 발효식초 유래 정제 다당 화분의 면역관련 세포에 대한 세포독성

전통 현미식초 및 감식초 유래 정제 다당화분들은 mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage를 자극하는 면역활성을 측정하기 전, 먼저 다당화분들의 세포독성 여부를 확인하고자 하였다. 96 flat-bottomed well plate에 2.5×10^5 cells/well로 조정된 macrophage에 전통 현미식초와 감식초 유래 정제 다당화분을 각각 시료농도 1.6 μg 에서 1,000 μg 까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였는데, 그 결과는 Fig. 51에 나타난 바와 같이 모든 세포군에서 뚜렷한 독성은 나타나지 않았으며 특히 고농도에서 생육의 저해는 관찰되지 않았다.

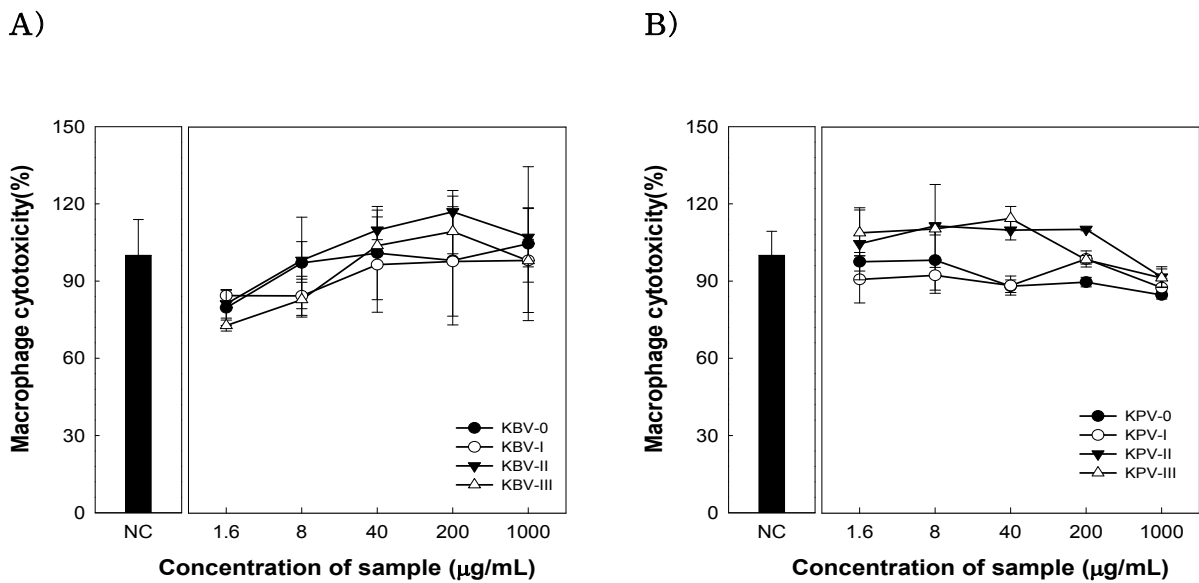


Fig. 51. Cytotoxic effect of the polysaccharides purified from Korean black (A) and persimmon (B) vinegars on murine peritoneal macrophages *in vitro*

2) 전통 발효식초 유래 정제 다당 화분의 대식세포 자극 활성

가) 대식세포(Macrophage)의 NO 생산에 미치는 영향

전통 발효식초 유래 정제다당 시료는 모두 농도 의존적으로 대식세포를 자극하여 NO 생성을 유도하는 경향을 보였는데, 전반적인 활성은 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 뚜렷한 경향을 나타내었다. 특히 감식초 유래 정제 다당화분 (Fig. 52B)이 현미식초 유래 정제 다당화분 (Fig. 52A)에 비해 상대적으로 높은 활성을 보여주었다.

특히, 현미식초 및 감식초 유래 고분자 다당화분인 KBV-0 및 KPV-0의 경우, 각각의 조다당화분 및 타 정제 다당화분에 비해 모두 우수한 NO 생성 경향을 보였으며, 감식초 유래 고분자 다당화분인 KPV-I은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 음성대조군 (negative control, NC)의 약 2배에 이르는 높은 NO 생성량을 나타냈으며 농도 의존적 활성증가 양상도 뚜렷하게 나타났다.

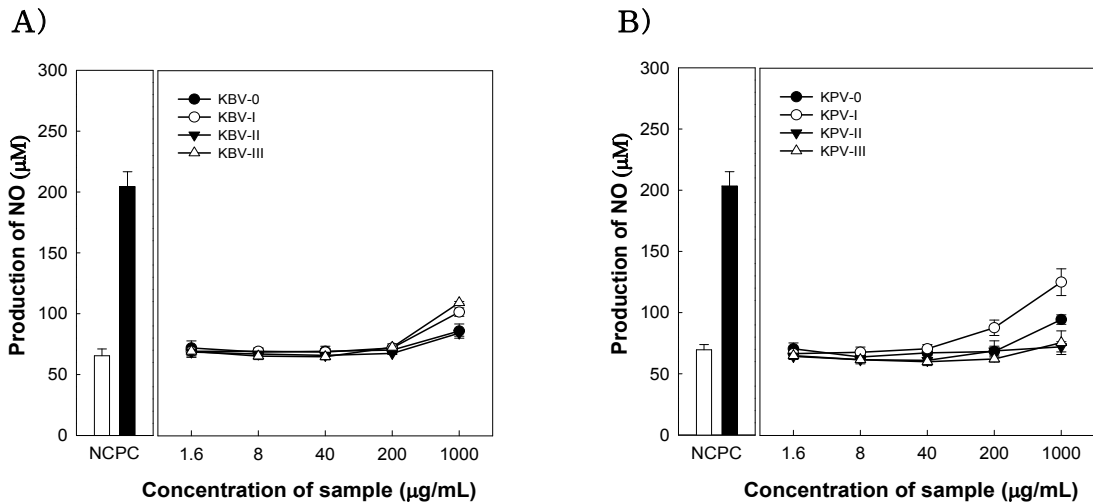


Fig. 52. Effect of the polysaccharides purified from Korean black (A) and persimmon (B) vinegars on the production of NO on peritoneal murine macrophages *in vitro*.

나) 대식세포(Macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비 특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타내기도 하는 선천면역과 적응면역을 연결하는 중추적인 역할을 하는 세포이다. Macrophage의 세포막 표면의 TLR (toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 세포를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 다양한 cytokine을 생산한다고 이미 잘 알려져 있다.

특히 IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로써 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되고 있다. TNF- α 은 특정 암세포에 대한 세포독성과 항 바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.

Fig. 53에 나타난 바와 같이 전통 현미식초로부터 정제한 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III 다당획분들은 mouse 복강에서 유래한 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생성을 농도 의존적으로 증진시켰으며, 고분자 다당획분인 KBV-I이 상대적으로 저분자획분인 KBV-II 또는 KBV-III에 비해 높은 cytokine의 생성 유도능을 나타내었다. 한편, KBV-I은 1,000 μ g/mL의 고농도 처리에서는 조당 KBV-0와 유사한 정도의 IL-6 생성능을 보였지만, 200 μ g/mL의 농도에서도 1,000 μ g/mL에서와 유사한 생성능을 나타내어 적은 농도에서도 효과적으

로 활성을 유도해 낼 수 있는 것으로 나타났다 (Fig. 53A). IL-12와 TNF- α 생성능에서도 40~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 이미 조다당핵분 (KBV-0) 또는 타 정제핵분 (KBV-I 및 II)에 비해서 우수한 활성을 나타내고 있었다 (Fig. 53B 및 C).

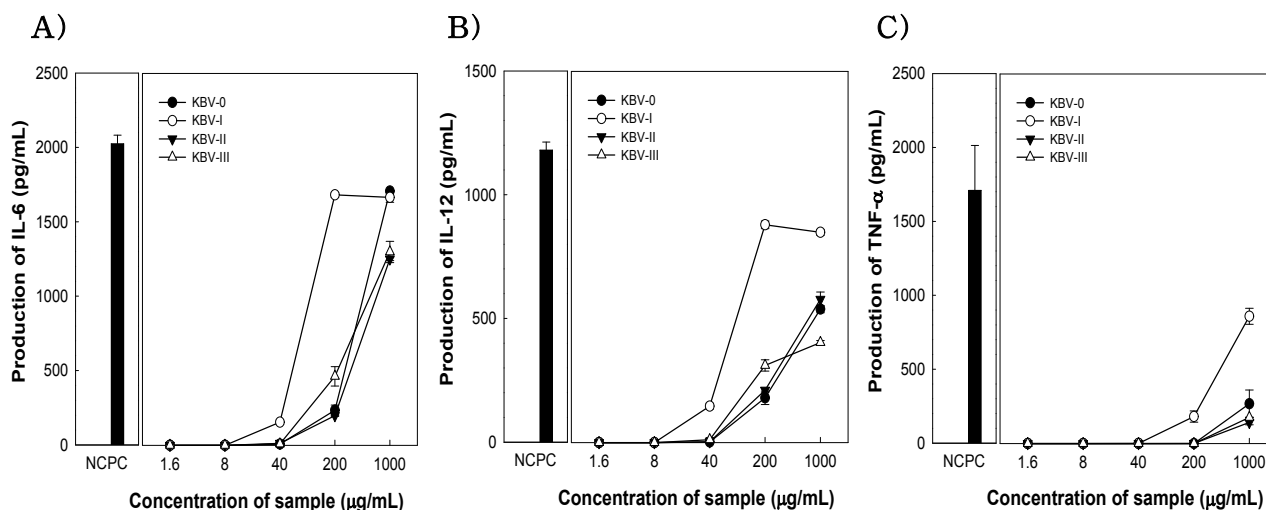


Fig. 53. Effect of KBV-0, KBV-I and KBV-II, KBV-III on production of IL-6 (A), IL-12 (B), TNF- α (C) by peritoneal murine macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of KBV-0, KBV-I, KBV-II or KBV-III in 96-well plate for 24h. The concentrations of various cytokines in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control).

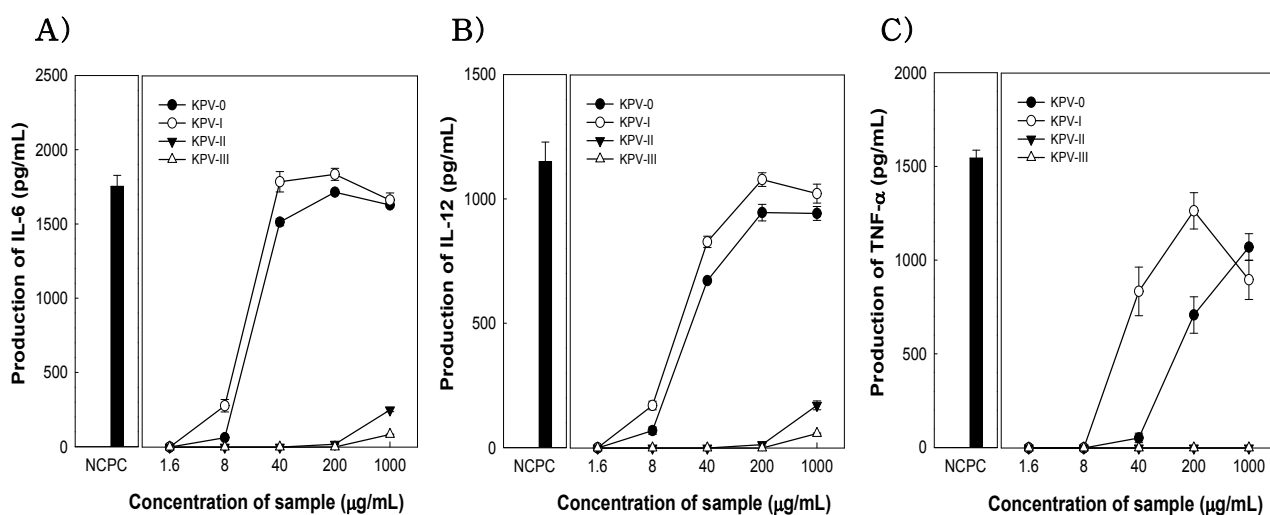


Fig. 54. Effect of KPV-0, KPV-I and KPV-II, KPV-III on production of IL-6 (A), IL-12 (B), TNF- α (C) by peritoneal murine macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of KPV-0, KPV-I, KPV-II or KPV-III in 96-well plate for 24h. The concentrations of various cytokines in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS) was used as

the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control).

한편 전통 감식초로부터 정제한 다당획분인 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III는 현미식초 유래 다당획분들과 달리 조다당 KPV-0와 고분자 정제다당 KPV-I 다당 시료들만이 mouse 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생성을 농도 의존적으로 증진시켰으며, 특히 고분자 다당 KPV-I이 조다당 KPV-0에 비해 상대적으로 우수한 cytokine의 생성 유도능을 나타내었다. (Fig. 54C)

저분자 정제 다당획분인 KPV-II 및 KPV-III에서는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도 처리에서만 IL-6 및 IL-12 생성능 (Fig. 54A 및 B)에서 약간의 활성을 보일 뿐, cytokine의 생산을 유도능에는 크게 기여하지 못하는 것으로 나타나 감식초 유래 다당이 갖는 면역활성은 대부분 KPV-I에 기인한 활성임으로 사료될 수 있었다.

바. Methyl화 분석에 의한 결합양식 분석, 전통발효식초 유래 활성 다당체의 전체구조의 추정

다당의 구조 분석에 있어서 당쇄의 결합양식은 다당체의 기본 구조를 해명한다는 점에서 가장 중요한 분석으로 알려져 있다. 핵산 및 단백질이 구성분자인 nucleotide나 amino acid의 사이에 phosphodiester 결합이나 peptide 결합이라는 동일한 결합양식으로 연결된 데 반하여, 다당은 구성당 사이에 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 등의 결합이 가능하며 각 탄소에서 분지된 형태로 존재 할 수 있기 때문에 타 생체 분자에 비해 구조 해석이 어려우며 따라서 결합양식의 분석은 다당의 구조 특성 규명에 있어 가장 중요한 단계이다.

당쇄 결합양식 분석에 많이 사용되는 methylation analysis는 Fig. 55에 나타난 바와 같이 결합에 참여하지 않은 탄소에 붙은 hydroxyl를 methyl화하고, 가수분해하여 부분적으로 methyl화 된 구성당의 ring을 개환한 후, 남아있는 hydroxyl group을 acetylation하여 GC-MS를 이용, fragment ion을 분석하여 구조를 규명하는 복잡한 과정이다.

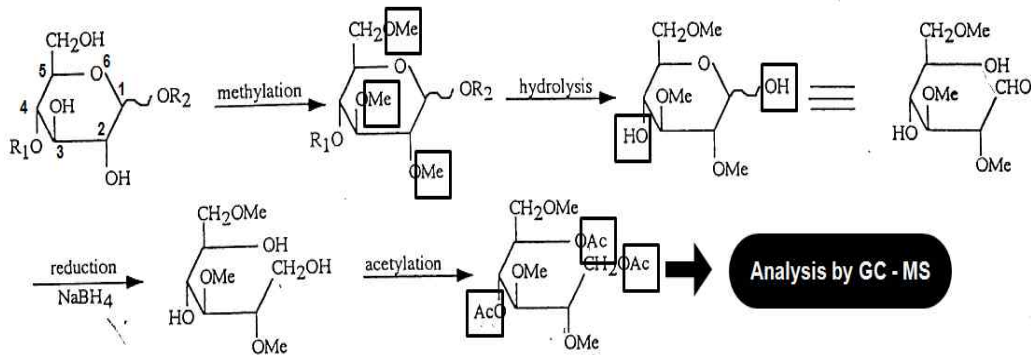


Fig. 55. Principle of methylation analysis for determination of sugar linkages of polysaccharides.

전통 현미발효 식초 유래 정제 다당획분 시료들 중 높은 면역활성을 나타낸 현미식초유래 KBV-I과 감식초 유래 KPV-I을 대상으로 활성에 공헌하는 구조 (active moiety)를 확인하고자 Hakomori 방법에 의해 methylation을 각각 행하고, GC에 의해 당쇄 결합양식의 total ion chromatogram을 확인하였다 (Fig. 56). Total ion chromatogram에서 관찰된 각 peak들은 GC-MS로 fragment 이온을 분석하여 결합에 참여하고 있는 각 당의 탄소 위치를 확인하였다 (Fig. 57 및 58). 또한, 이들의 결과를 종합하여 Table 18과 19에 구성당 결합 양식의 조성을 표시하였다.

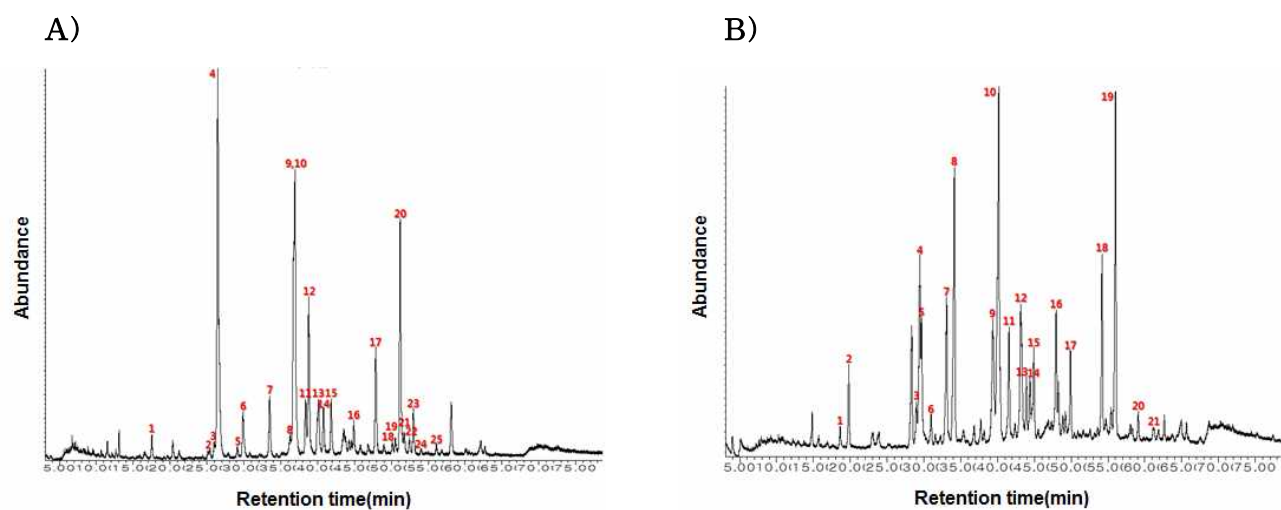


Fig. 56. Total ion chromatograms on GC-MS of partially methylated alditol acetates of derived from KBV-I purified from Korean black vinegar (A) and KPV-I from Korean persimmon vinegar (B).

A)

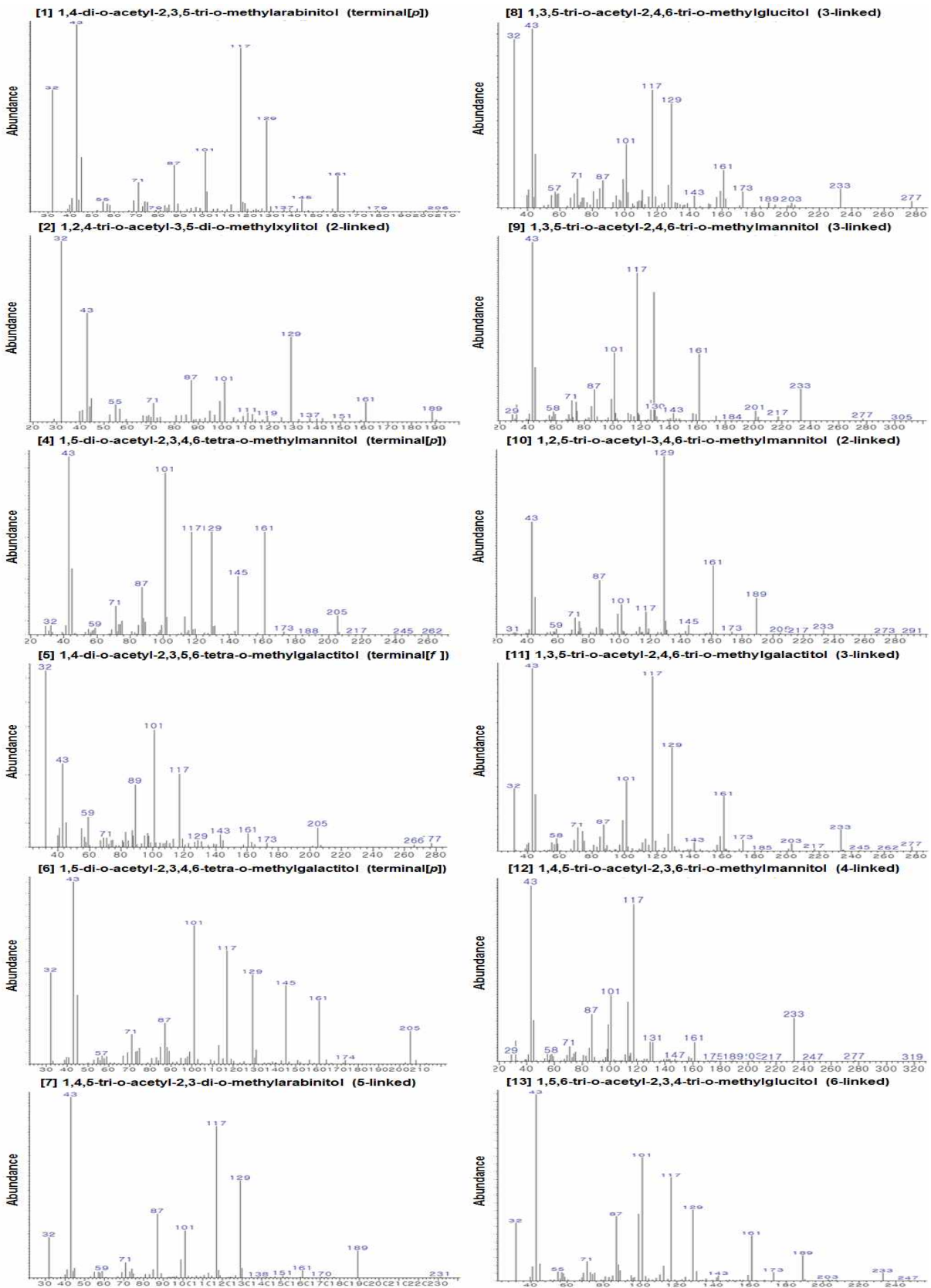


Fig. 57. GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from KBV-I purified from Korean black vinegar.

B)

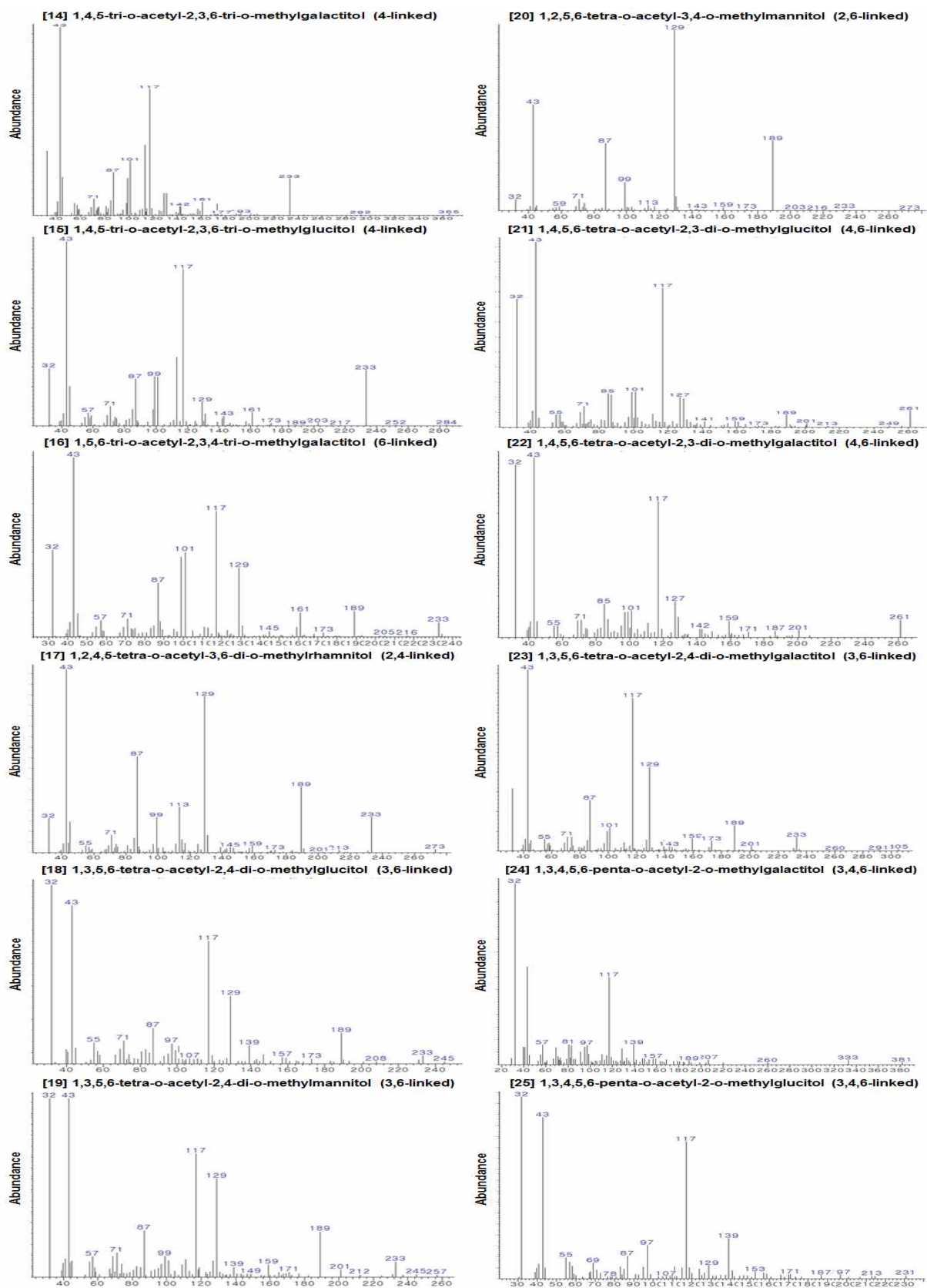


Fig. 57. GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from KBV-I purified from Korean black vinegar (continue).

A)

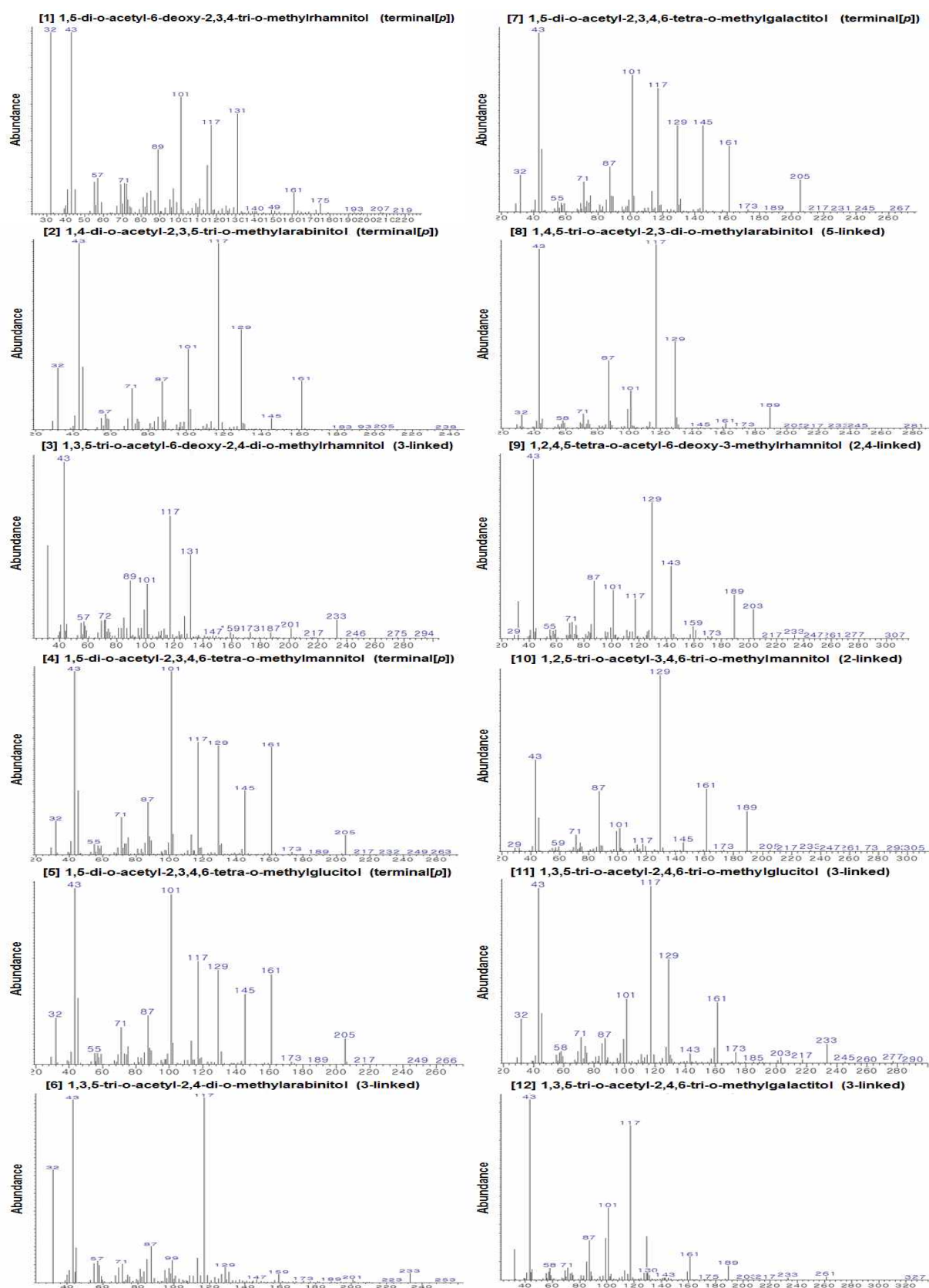


Fig. 58. GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from KPV-I purified from Korean persimmon vinegar.

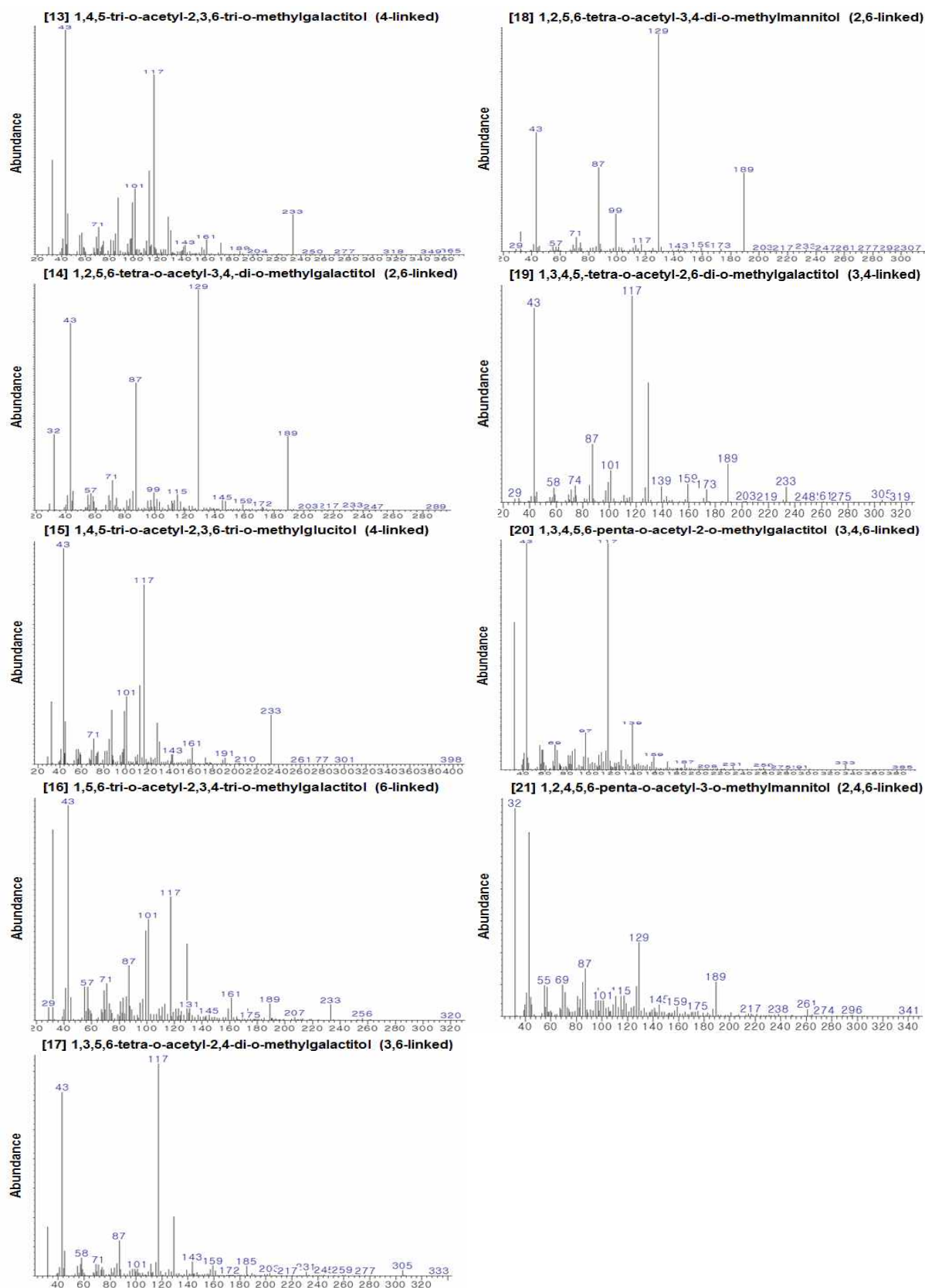


Fig. 58. GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from KPV-I purified from Korean persimmon vinegar (continue).

1) 현미발효 식초 유래 면역활성 다당획분의 전체구조

국내산 현미식초 유래 면역활성 다당획분인 KBV-I의 total ion chromatogram은 Fig. 56A에 나타내었으며, 주요한 fragment ion spectrum은 Fig. 57에 나타내었다. KBV-I은 총 25종의 당쇄 결합이 검출되었는데 (Fig. 56A), 주로 mannose(Man) 결합 당쇄가 가장 높은 비율로 존재하고 있었으며 (63.9%), 그 다음으로 galactose(Gal) 결합 및 glucose(Glc) 결합이 주를 이루고 있었고 (각각 12.4 및 10.2%) 그외 rhamnose와 arabinose 결합 당쇄가 소량 존재하는 것으로 나타났다. 하지만 구성 당조성 및 당쇄의 특성으로 미루어 KBV-I은 하나의 단일 다당이 아니라 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었다 (Table 18). KBV-I 다당에는 첫째, 약 60%이상의 가장 높은 비율로 존재하는 mannan, 둘째로 약 30%의 비율을 차지하는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan I (RG-I)과 셋째, 10% 미만으로 존재하는 glucan이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었다.

KBV-I의 구성 다당 mannan의 경우, 비환원 말단에 존재함을 의미하는 T-Man_p(terminal mannoopyranoside, 23.4%)가 높은 비율로 검출되었는데, 이러한 사실은 측쇄(side chain)가 mannose 또는 이들의 oligo당이 고도로 분지된 형태로 존재함을 추정할 수 있었다. 2,6-linked mannose 잔기가 높은 비율로 검출되고, 3,6-linked 잔기가 미량 검출된 사실로부터 mannan의 주쇄 (main chain)는 (1→6) 결합으로 연결된 mannose 사슬로 연결되어 있으며, 주쇄 mannose의 C2 위치(일부 C3)에서 측쇄가 연결되어 뺄어나가는 구조로 되어 있음을 알 수 있었다. 또한 2-, 3- 및 4-linked-Man_p (각각 12.6, 9.5 및 7.9%)가 높은 비율로 존재하는 사실로부터 측쇄에 붙어 있는 mannose 잔기는 (1→2, 1→3 및 1→4)-결합으로 연결되어 존재함을 알 수 있었다 (Table 18). 이상의 결과로부터 추정되는 KBV-I 중 mannan의 전체 구조는 Fig. 59에 표시한 바와 같다.

일반적으로 현미에 존재하는 다당류로는 저장다당인 starch를 제외하고 1차 세포벽과 중엽(middle lamella)에 존재하는 다당류는 cellulose, 최근 xyloglucan과 arabinoxylan으로 밝혀진 hemicellulose, 그리고 펙틴물질(pectic substances) 등 크게 3종류로 구성되어 있다. 이중 cellulose는 고도의 분자간 수소결합으로 인해 거대 분자를 형성하고 있어 수용화가 극히 어려운 다당체이며 hemicellulose도 수소결합에 의해 cellulose 다발 사이에서 강력한 network를 형성하여 고농도의 알칼리 처리를 하지 않는 한 수용화가 어려운 다당류로 분류되고 있다. 따라서 KBV-I에 고함량의 mannan이 존재한다는 사실은 현미식초의 원재료인 현미 중에 mannan이 존재하여 이들이 발효과정 중 선택적으로 수용화 되었을 가능성이 존재한다. 그러나 식물체에는 mannan이 구성성분으로 관찰된 경우가 드물며, 특히 현미라는 곡류의 성분으로 mannan의 존재가 보고된 예는 거의 찾아볼 수 없다. 따라서 KBV-I에 존재하는 높은 mannose의 함량은 발효 중 사용된 미생물 기원의 mannan에서 유래한 것으로 추정되었다. 식초의 제조를 위해선 알코올 발효단계와 초산 발효단계로 나뉘며, 특히 알콜 발효 과정 중 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모가 사용된다. 효모의 세포벽은 β -glucan과 chitin이 주성분으로 존재하며 최외각에 mannoprotein이 둘러쌓여 존재하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 발효 및 숙성 과정 중 알코올 발효를 담당하였던 효모가 자가분해되어 이중 용해도가 낮은 β -glucan과 chitin은 식초발효 과정 동안 세포벽 다당과 함께 침전하게 되고, 효모 세포벽 기원의 mannan이 선택적으로 용해됨을 추론할 수 있었다. 따라서 현미발효 식초에 존재하는 주요 면역활성 다당획분인 KBV-I은 발효과정 중 발효제인 효모의 세포벽 기원의 다당계 물질로 추정된다.

Table 18. Methylation analysis of KBV-I purified from the crude polysaccharide of Korea black vinegar

Glycosyl residue	Deduced linkage	Composition (mole%)	Polysaccharide	Organism
Arabinose	terminal[p]	1.1	RG-I	Brown rice
	5-linked	3.5	RG-I	Brown rice
Rhamnose	3-linked	0.7	RG-I	Brown rice
	2,4-linked	4.7	RG-I	Brown rice
Xylose	2-linked	0.4	Pectin	Brown rice
Mannose	terminal[p]	23.4	Mannan	Yeast
	3-linked	9.5	Mannan	Yeast
	2-linked	12.6	Mannan	Yeast
	4-linked	7.9	Mannan	Yeast
	3,6-linked	0.7	Mannan	Yeast
	2,6-linked	9.9	Mannan	Yeast
Galactose	terminal[f]	0.5	RG-I	Brown rice
	terminal[p]	2.6	RG-I	Brown rice
	3-linked	2.6	RG-I	Brown rice
	4-linked	2.4	RG-I	Brown rice
	6-linked	1.6	RG-I	Brown rice
	4,6-linked	0.7	RG-I	Brown rice
	3,6-linked	1.9	RG-I	Brown rice
	3,4,6-linked	0.2	RG-I	Brown rice
Glucose	3-linked	1.4	β -glucan	Yeast
	6-linked	4.1	β -glucan	Yeast
	4-linked	2.8	α -glucan	Brown rice
	3,6-linked	0.5	β -glucan	Yeast
	4,6-linked	1.0	α -glucan	Brown rice
	3,4,6-linked	0.4	β -glucan	Yeast

KBV-I 의 구성 다당 RG-I의 존재는 다양한 결합의 arabinose, rhamnose 및 galactose 잔기로부터 추정 가능하였다(Table 18). 본 실험에서는 galacturonic acid의 결합양식은 확인할 수 없었으나 비교적 높은 비율로 2,4-linked rhamnose가 존재하는 사실로부터 주쇄가 $\rightarrow 2$ -Rha-(1 \rightarrow 4)-GalA-(1 \rightarrow 의 disaccharide 반복 서열로 구성되어 있으며 rhamnose의 C4 위치에서 다양한 측쇄가 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 다양한 결합양식의 arabinose와 galactose의 잔기들은 RG-I의 측쇄가 arabinan, galactan 또는 arabinogalactan으로 뻗어나간 구조로 존재함을 확인하게 하였다(Table 18). Arabinan의 경우, 5-linked-Ara가 높은 비율로 존재하는 사실로부터 side chain에 붙어 있는 arabinan은 1 \rightarrow 5결합으로 연결되어 존재함을 알 수 있었다. Galactan의 경우, 4-linked Galp의 존재로부터 (1 \rightarrow 4) galactan으로 존재하고 있음을 추정케 하였다. 또한 arabinogalactan의 경우, terminal-Ara의 존재와 함께 arabino-4,6-galactan을 지적하는 4-linked 및 4,6-linked Galp 잔기가 검출되었으며,

arabino-3,6-galactan의 존재를 확인케 하는 3-linked, 6-linked, 3,6-linked 및 3,4,6-linked Galp 잔기가 또한 검출되었다. Arabinogalactan 경우에는 arabino-4,6-galactan 보다는 주로 arabino-3,6-galactan 형태의 측쇄가 우세하게 존재하는 것으로 나타났는데 이는 KBV-I이 arabino-3,6-galactan과 선택적으로 반응하는 β -Glucosyl Yariv reagent에 반응성을 보였던 사실과 잘 일치하였다. 일반적으로 arabinogalactan은 고등식물에서 주로 발견되는 다당류의 일종으로, 구조적 특성에 따라 I형, II형, 및 기타형으로 구분된다. I형 arabinogalactan은 측쇄에 arabinosyl oligosaccharide잔기를 갖는 β -(1 \rightarrow 4)-D-galactan 주쇄로 구성된 다당을, II형은 β -(1 \rightarrow 3)-D-galactan 주쇄에 galactose의 C6 위치에서 β -(1 \rightarrow 6)-D-galactosyl 측쇄 및 비환원 말단 arabinose 잔기를 갖는 arabino- β -3,6-galactan을, 그리고 기타형은 arabinogalactan 측쇄를 갖는 pectic polysaccharide를 지칭한다. 따라서 KBV-I에 존재하는 RG-I은 Type III의 arabinogalactan이며 주로 원재료인 현미에서 유래한 pectin으로부터 발효과정 중 분리되어 식초에 용해상태로 존재하는 것이 확인되었다. 특히 KBV-I 중 rhamnogalacturonan-I은 arabinan, galactan 또는 arabinogalactan의 측쇄가 연결된 형태로, 이들이 면역활성에 중요 역할을 수행할 것으로 추정되었다 (Fig. 59). 펙틴은 식물체의 세포벽과 middle lamella 층에 존재하는 수용성 다당류로 전체분자의 많은 부분은 직쇄상의 homogalacturonan(HG)으로 구성(펙틴의 smooth region)되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide가 고도로 분지(branched)된 rhamnogalacturonan류(rhamnogalacturonan I 및 II)가 공유적으로 결합(펙틴의 hairy region을 구성)되어 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현미 식초 중에 존재하는 활성 다당 KBV-I은 현미의 pectin이 발효과정 중에 HG region이 분해되어 분리된 RG-I임을 최종 확인 할 수 있었다 (Fig. 60).

KBV-I의 구성 다당 gucan은 크게 원재료인 현미 중 존재하는 starch 유래의 α -glucan과 발효 미생물인 yeast 세포벽 유래의 β -glucan임이 확인되었다. Table 18 및 Fig. 59에 나타난 바와 같이 α -glucan은 α -(1 \rightarrow 4) 결합의 glucan에 C6위치에서 측쇄로 뻗어나간 구조를 하고 있었다. β -glucan의 경우, 3-linked, 6-linked, 3,6-linked 및 3,4,6-linked Glcp 잔기의 검출 결과로부터 β -(1 \rightarrow 3)-glucan 영역이 β -(1 \rightarrow 6)-glucan과 연결된 기본 구조에 β -(1 \rightarrow 6)-glucan의 C3 또는 C4 위치에서 드물게 측쇄구조를 갖는 것으로 평가되었다 (Fig. 59). 하지만 이들 glucan은 기존에 어떠한 생리활성도 보도되어 있지 않은 전분유래의 α -glucan이라는 측면과 활성이 알려져 있는 β -glucan도 상대적으로 매우 낮은 함량으로 존재한다는 점에서 KBV-I의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 요약할 때 Fig. 60에 제시한 바와 같이 현미식초의 면역활성의 주요 다당인 KBV-I은 원재료인 현미의 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 rhamnogalacturonan I과 발효 초기 알코올 발효를 담당했던 효모의 세포벽 유래의 mannan으로 구성되어 있음을 최종 결론 지을 수 있었다.

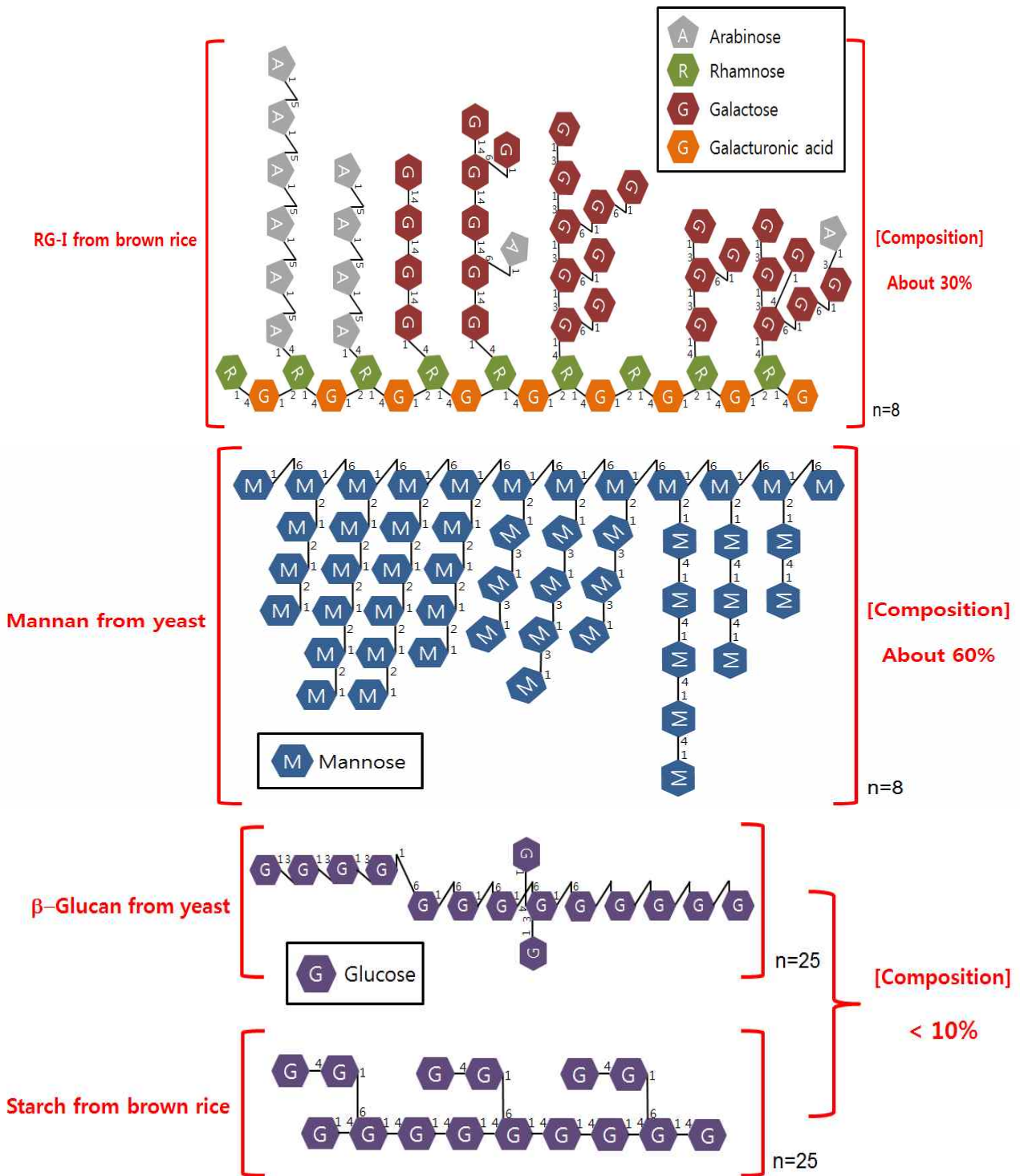


Fig. 59. A proposed structure of immunostimulating polysaccharide purified from Korea black vinegar.

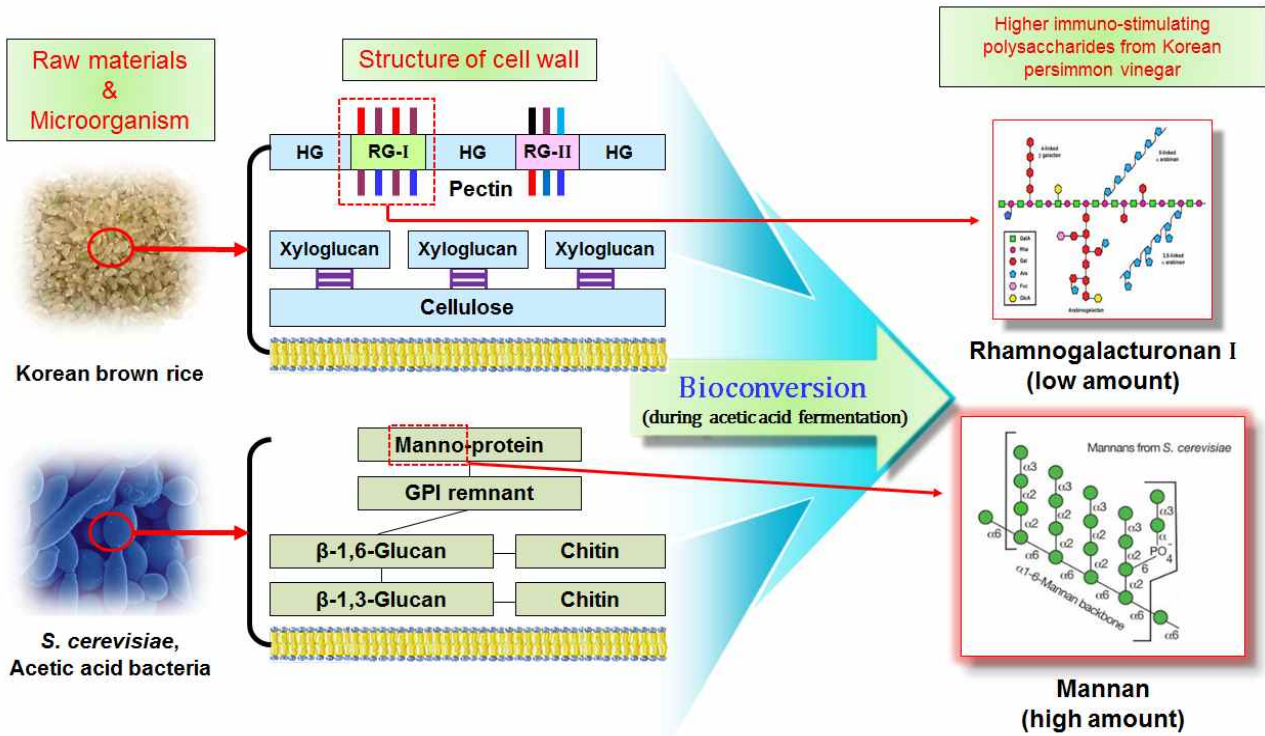


Fig. 60. A proposed bioconversion mechanism of immunostimulating polysaccharide purified from Korea black vinegar.

2) 감식초 유래 면역활성 다당획분의 전체구조

국내산 감식초 유래 면역활성 다당획분인 KPV-I의 total ion chromatogram은 Fig. 56B에 나타내었으며, 주요한 fragment ion spectrum은 Fig. 58에 나타내었다. KPV-I은 총 21종의 당쇄 결합이 검출되었는데 (Fig. 56B), 주로 galactose(Gal) 결합 당쇄가 가장 높은 비율로 존재하고 있었으며 (30.8%), 그 다음으로 mannose (Man) 결합 및 Arabinose (Ara) 결합이 주를 이루고 있었고 (각각 23.4 및 13.7%), glucose와 rhamnose 결합 당쇄가 소량 존재하는 것으로 나타났다. 이들 조성은 현미식초 유래의 활성 다당 KBV-I과는 조성이 상이하였다. 감식초 유래 활성 다당 KPV-I은 당조성 및 당쇄의 특성으로 미루어 단일 다당이 아니라 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었다(Table 19). KPV-I 다당에는 첫째, 약 70%의 가장 높은 비율로 존재하는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan I (RG-I), 둘째로 약 20%의 비율을 차지하는 mannan과 셋째, 10% 정도로 존재하는 glucan이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었다.

Table 19. Methylation analysis of KPV-0 purified from the crude polysaccharide of purified from Korea black vinegar.

Glycosyl residue	Deduced linkage	mole %	Polysaccharide	Organism
Arabinose	terminal[f]	2.4	RG-I	Persimmon
	3-linked	1.2	RG-I	Persimmon
	5-linked	10.1	RG-I	Persimmon
Rhamnose	terminal[p]	0.6	RG-I	Persimmon
	3-linked	0.8	RG-I	Persimmon
	2,4-linked	5.3	RG-I	Persimmon
Mannose	terminal[p]	6.1	Mannan	Yeast
	2-linked	12.3	Mannan	Yeast
	2,6-linked	4.5	Mannan	Yeast
	2,4,6-linked	0.5	Mannan	Yeast
Galactose	terminal[p]	5.3	RG-I	Persimmon
	3-linked	6.6	RG-I	Persimmon
	4-linked	1.9	RG-I	Persimmon
	2,6-linked	1.7	RG-I	Persimmon
	6-linked	3.9	RG-I	Persimmon
	3,4-linked	2.4	RG-I	Persimmon
	3,6-linked	8.4	RG-I	Persimmon
	3,4,6-linked	0.6	RG-I	Persimmon
Glucose	terminal[p]	4	Beta glucan	Persimmon
	3-linked	3.8	Beta glucan	Persimmon
	4-linked	3.2	Beta glucan	Persimmon

KPV-I 의 구성 다당 RG-I의 존재는 다양한 결합의 arabinose, rhamnose 및 galactose 잔

기로부터 추정할 수 있었다 (Table 19). 본 실험에서는 galacturonic acid의 결합양식은 확인할 수 없었으나 비교적 높은 비율로 2,4-linked rhamnose가 존재하는 사실로부터 주쇄가 $\rightarrow 2$ -Rha-(1 \rightarrow 4)-GalA-(1 \rightarrow 의 disaccharide 반복 서열로 구성되어 있으며 rhamnose의 C4 위치에서 다양한 측쇄가 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 다양한 결합양식의 arabinose와 galactose의 잔기들은 RG-I의 측쇄가 arabinan, galactan 또는 arabinogalactan으로 뻗어나간 구조로 존재함을 확인하게 하였다(Table 19). Arabinan의 경우, 5-linked-Ara가 10.1%의 높은 비율로 존재하는 사실로부터 side chain에 붙어 있는 arabinan은 1 \rightarrow 5결합으로 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 Galactan의 경우, 4-linked, 3,4-linked 및 3,4,6-linked Galp의 존재로부터 (1 \rightarrow 4)-galactan 주쇄에 C3 또는 C6위치에서 측쇄가 뻗어 있는 구조로 존재함을 추정케 하였다. 하지만 이들의 존재 비율은 상대적으로 낮은 것으로 평가되었다.

또한 arabinogalactan의 경우, terminal-Ara의 존재와 함께 arabino-3,6-galactan의 존재를 확인케 하는 3-linked, 6-linked, 3,6-linked 및 3,4,6-linked Galp 잔기가 상대적으로 높은 비율로 검출되었다. 따라서 감식초 유래 KPV-I의 경우 현미식초 유래 KBV-I과 다르게 arabino-4,6-galactan은 거의 존재하지 않고 주로 arabino-3,6-galactan 형태로 존재하는 것으로 평가되었다. 이러한 사실은 이전 실험에서 KPV-I이 arabino-3,6-galactan과 선택적으로 반응하는 β -Glucosyl Yariv reagent와의 반응성에서 KBV-I보다 상대적으로 높게 나타난 결과와 잘 일치하였다. 따라서 KPV-I에 존재하는 RG-I은 arabino-3,6-galactan 측쇄가 rhamnogalacturonan 주쇄에 결합된 Type III의 arabinogalactan이며 주로 원재료인 감에서 유래한 pectin으로부터 발효과정 중 분리되어 식초에 용해상태로 존재하는 것이 확인되었다. 상기 결과는 KPV-I 중 rhamnogalacturonan-I은 arabinan, galactan 또는 arabino-3,6-galactan의 측쇄가 연결된 형태로, 이들이 면역활성에 중요 역할을 수행할 것으로 추정되었다 (Fig. 61). 펙틴은 식물체의 세포벽과 middle lamella 층에 존재하는 수용성 다당류로 전체분자의 많은 부분은 직쇄상의 homogalacturonan(HG)으로 구성(펙틴의 smooth region)되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide가 고도로 분지(branched)된 rhamnogalacturonan류(rhamnogalacturonan I 및 II)가 공유적으로 결합(펙틴의 hairy region을 구성)되어 있는 것으로 보고되고 있으므로 국내산 감식초 중에 존재하는 활성 다당 KPV-I은 감 과실의 pectin이 발효과정 중에 HG region이 분해되어 분리된 RG-I 임을 최종 확인할 수 있었다 (Fig. 62).

KPV-I의 구성다당 mannan의 경우, 비환원 말단에 존재함을 의미하는 T-Manp(terminal mannoopyranoside, 6.1%)가 높은 비율로 검출되었는데, 이러한 사실은 측쇄(side chain)가 mannose 또는 이들의 oligo당이 고도로 분지된 형태로 존재함을 추정할 수 있었다. 특히 2,6-linked mannose 잔기가 높은 비율로 검출되고, 2,4,6-linked 잔기가 미량 검출된 사실로부터 mannan의 주쇄(main chain)는 (1 \rightarrow 6) 결합으로 연결된 mannose 사슬로 연결되어 있으며, 주쇄 mannose의 C2 위치(일부 C4)에서 측쇄가 연결되어 뻗어나가는 구조로 되어 있음을 알 수 있었다. 또한 현미식초 유래 KBV-I과 다르게 감식초 다당 KPV-I은 측쇄를 구성하는 manno-oligosaccharide가 모두 2-linked-Manp(각각 12.3%)로 나타나 측쇄의 mannose 잔기는 (1 \rightarrow 2)-결합으로만 연결되어 있음을 확인하게 하였다 (Table 19). 이상의 결과로부터 추정되는 KPV-I 중 mannan의 전체 구조는 Fig. 61에 표시한 바와 같다.

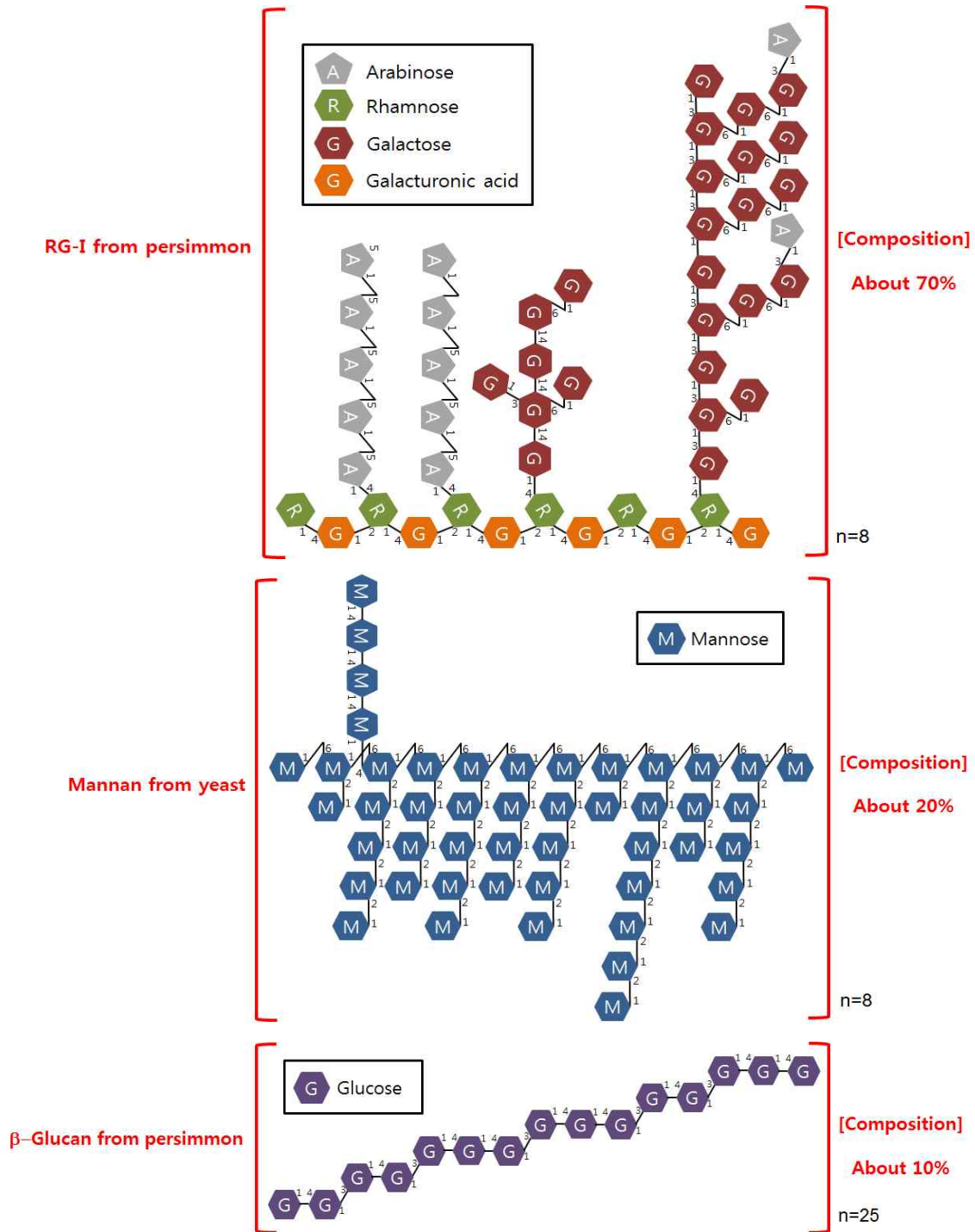


Fig. 61. A proposed structure of immunostimulating polysaccharide purified from Korea persimmon vinegar.

KPV-I에 이처럼 고함량의 mannan이 존재한다는 사실은 감식초의 원재료인 감 과실 중 또는 발효에 관여하는 미생물 유래의 다당으로 추정되었으나, 식물체에는 mannan이 주 구성당으로 존재하지 않으며 특히 감 과실에서 구성 성분으로 mannan의 존재가 보고된 예는 거의 찾아볼 수 없다. 따라서 KPV-I에 존재하는 높은 mannose의 함량은 발효 중 사용된 미생물 기원의 mannan에서 유래한 것으로 추정되며 특히 초산 발효 이전의 알콜 발효 과정 중

*Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모 기원일 것으로 추정되었다. 효모 세포벽의 최외각에는 mannoprotein이 둘러싸여 존재하는 것으로 보고되고 있으므로 감식초의 발효 및 숙성과정 중 알코올 발효를 담당하였던 효모가 자가분해되어, 이중 용해도가 낮은 다당류는 식초발효 과정 동안 세포벽 다당과 함께 침전하게 되고, 효모 세포벽 기원의 mannan이 선택적으로 용해됨을 추론할 수 있었다. 따라서 국내산 감식초에 존재하는 주요 면역활성 다당획분인 KPV-I은 발효과정 중 발효제인 효모의 세포벽 기원의 다당계 물질로 추정된다 (Fig. 62).

KPV-I의 구성 다당 gucan은 terminal, 3-linked 및 4-linked Glcp가 주요 결합으로 검출되었다. 감에는 α -(1→4) 결합의 amylose 즉 전분 성분이 적으며, yeast 세포벽 유래의 β -glucan의 경우도 β -(1→3)-glucan 영역과 β -(1→6)-glucan과 연결되어 있어 6-linked Glcp가 존재하지 않는 상태로 3-linked Glcp만이 검출될 수는 없으므로 KPV-I 중 gucan은 전분 유래나 효모기원의 β -glucan은 아닌 것으로 판단되었다. 일반적으로 식물체에는 β -(1→4) 결합으로만 연결된 glucan인 cellulose 외에 β -(1→3) 및 β -(1→4)결합의 -4G-4G-3G-4G-4G-3G-4G-3G-4G-4G-와 같이 불규칙하게 연결된 식물성 β -glucan이 존재한다고 알려져 있으므로 KPV-I 중 gucan은 감 과실 유래의 β -glucan임을 추정할 수 있었다 (Fig. 73). 그러나 동 구조의 β -glucan은 기존에 어떠한 생리활성도 보도되어 있지 않으므로 이들이 KPV-I의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 요약할 때 Fig. 62에 나타낸 바와 같이 감식초의 면역활성의 주요 다당인 KPV-I은 원재료인 감 중에 존재하는 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 rhamnogalacturonan I이 주요 활성 성분이며, 알코올 발효를 담당했던 효모의 세포벽 유래의 mannan이 활성 다당으로 구성되어 있음을 최종 확인할 수 있었다.

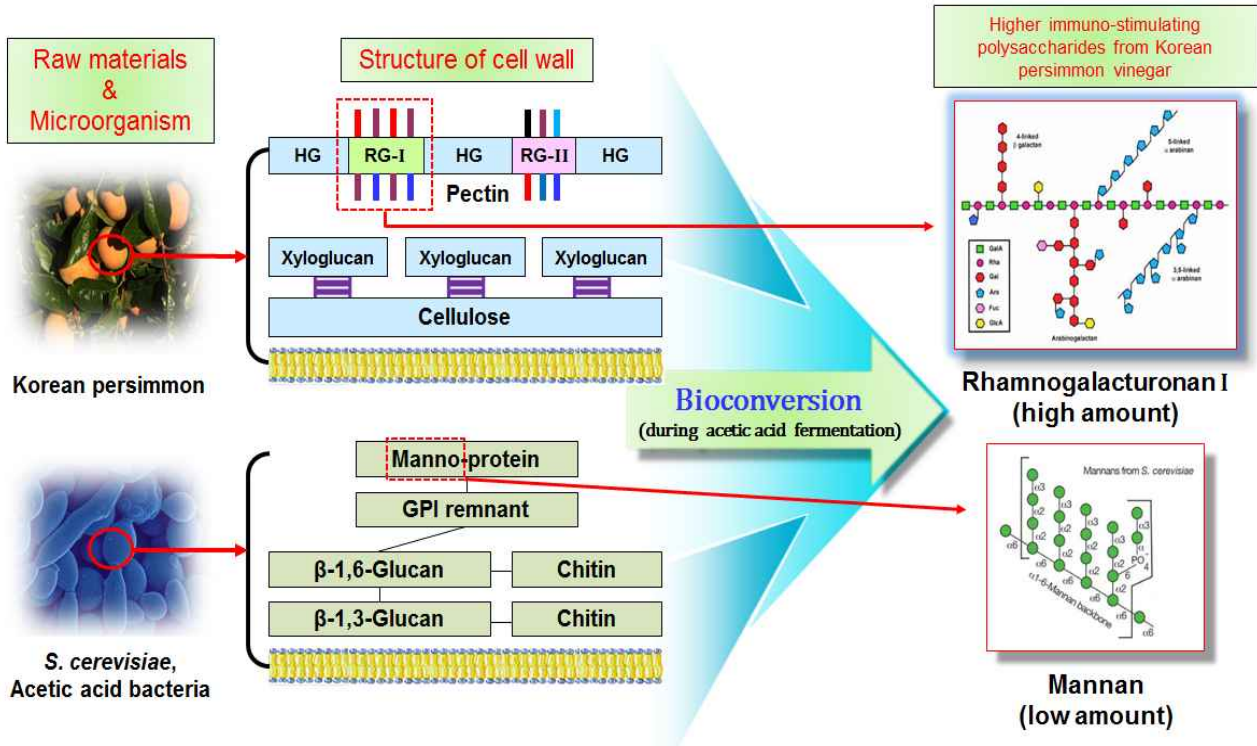


Fig. 62. A proposed bioconversion mechanism of immunostimulating polysaccharide purified from Korea black vinegar.

사. 장관면역 활성 다당의 지표 구성당 및 함량 설정

식품의약품안전처에서는 건강기능식품에 대한 과학적 관리원칙을 수립하여 이미 잘 알려진 건강기능식품 기능성 원료에 대하여 과학적 근거를 확보하여 그 기능성분을 밝히고 일일섭취량 (acceptable daily intake)을 정하여 고시하고 있다. 따라서 앞으로는 어떠한 기능성분이 얼마만큼 함유되어 있는 건강기능식품을 섭취하면 어떻게 건강유지 및 증진에 도움이 된다는 것을 과학적으로 설명할 수 있어야만 한다. 그러나 이런 변화는 건강기능식품 기능성 원료에 함유하고 있는 기능/지표성분(functional/marker compound)을 정확히 분석해 낼 수 있어야 한다.

본 과제 목적은 전통 발효식초를 이용한 다양한 생리활성 강화 성분을 분리 및 동정함과 동시에 이를 바탕으로 산업적으로 응용할 수 있는 소재로 적용하는 것이 또다른 목적이기 때문에, 지금까지의 연구에서 강력한 면역활성을 나타낸 국내산 현미식초 및 감식초의 면역활성 다당 획분은 생산단가 및 수율을 고려하였을 때, 현미식초 조다당획분 (KBV-0)과 감식초 유래 조다당획분 (KPV-0)이 산업적으로 실제 응용가능할 것으로 판단되었다. 이들 활성다당에 있어 원재료의 사용여부 (identity)를 확인할 수 있는 성분 중 제조공정의 표준화를 위해 관리할 수 있는 성분인 지표성분을 설정하기 위해, 3차에 걸쳐 각 면역 활성 조다당체를 조제하였으며, 이들의 구성당을 분석하여 지표 구성당의 함량을 설정하고자 하였다. 지표 구성 당 함량은 다당체 원물 (dry material)에 존재하는 구성당 간의 mole%가 아닌 실제값 (real value)로 나타내었다.

1) 현미발효 식초 유래 면역활성 조다당체의 지표 구성당 및 함량 설정

Table 20. Sugar composition of KBV-0 isolated from Korean black vinegar

Component	Sugar content in KBV-0 (mg/g)				Sugar composition (%)	
	1st prep.	2nd prep.	3rd prep.	Mean ± SD	Mean ± SD	
sugar						
Rha	6.1	5.7	6.1	6.0 ± 0.2	0.6 ± 0.0	
Fuc	1.0	0.8	0.9	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.0	
Ara	28.5	27.5	29.8	28.6 ± 1.2	2.9 ± 0.1	
Xyl	38.4	37.1	39.2	38.2 ± 1.1	3.8 ± 0.1	
Man	140.7	132.5	137.1	136.8 ± 4.1	13.7 ± 0.4	
Gal	53.4	50.5	52.3	52.1 ± 1.5	5.2 ± 0.1	
Glc	373.0	351.3	374.6	366.3 ± 13.0	36.6 ± 1.3	
Total	641.1	605.5	640.0	628.8 ± 20.3	62.9 ± 2.0	

Table 20에 나타낸 바와 같이 KBV-0에 대한 당의 함량을 실제값으로 환산한 결과 총 62.9%를 중성당으로 포함하는 물질로 분석되었으며, 주요한 구성당으로는 36%의 glucose와 13.7%의 mannose를 주로 함유하는 것으로 나타났다. 따라서, KBV-0를 장관면역 활성 증진에 도움을 줄 수 있는 소재 또는 제품으로 산업화에 응용하기 위해서는 지표성분으로 mannose의 함량을 10% 이상으로 설정하는 것이 적절하다고 판단되었다. 현미식초 유래 활성 조다당 KBV-0에 존재하는 높은 glucose 함량은 원재료인 현미에서 기원한 전분유래의 α-glucan일

것으로 추정되었으며, 이들은 영양성분으로의 기능외에 어떠한 생리활성도 보고되어 있지 않으므로 지표당으로 설정하는데는 무리가 있을 것으로 판단되었다. 또한 glucose 성분 중 일부는 활성이 알려져 있는 β -glucan일 가능성도 있으나 이들은 상대적으로 매우 낮은 함량으로 존재한다는 점에서 KBV-0의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되며, 지표물질 설정으로 yeast에서 유래되는 것으로 예상되는 mannose의 함량 설정은 발효의 표준화를 위해서도 적절할 것으로 사료된다. Fig. 63에 제시한 chromatogram은 KBV-0의 전형적 구성당 pattern이다.

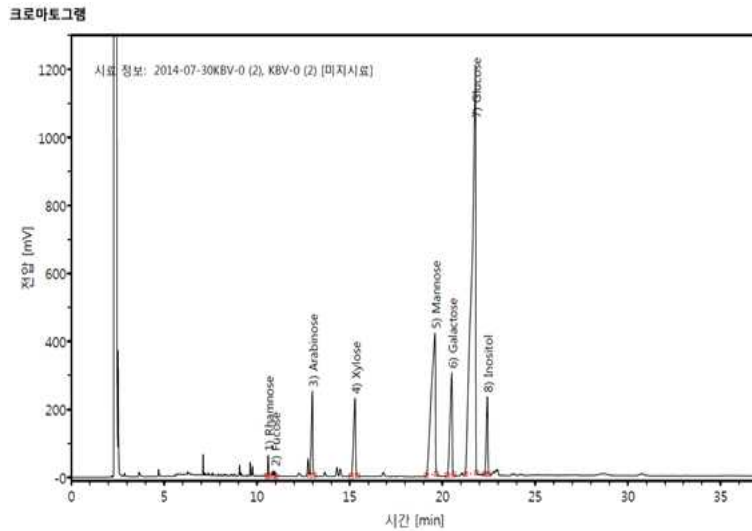


Fig. 63. GC chromatogram for the determination of sugar composition of KBV-0.

2) 감식초 유래 면역활성 조다당체의 지표 구성당 및 함량 설정

Table 21. Sugar composition of KPV-0 isolated from Korean persimmon vinegar

Component sugar	Sugar content in KPV-0 (mg/g)				Sugar composition (%)	
	1st prep.	2nd prep.	3rd prep.	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Rha	63.1	62.8	61.3	62.4 \pm 1.0	6.2 \pm 0.1	
Fuc	5.0	5.4	5.0	5.1 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	
Ara	123.3	128.7	123.6	125.2 \pm 3.0	12.5 \pm 0.3	
Xyl	61.7	64.6	63.2	63.2 \pm 1.5	6.3 \pm 0.1	
Man	152.6	162.8	153.5	156.3 \pm 5.6	15.6 \pm 0.6	
Gal	98.3	112.8	101.8	104.3 \pm 7.6	10.4 \pm 0.8	
Glc	92.5	102.8	100.3	98.5 \pm 5.4	9.9 \pm 0.5	
Total	596.5	640.0	608.8	615.0 \pm 27.4	61.5 \pm 2.2	

한편, 경구투여를 통한 장관면역활성 실험에서 가장 우수한 활성을 나타낸 KPV-0의 구성당 및 함량분석은 Table 21에 나타내었다. KPV-0에 대한 당의 함량을 실제값으로 환산한 결과 KBV-0와는 다른 양상을 확인하였는데, KBV-0가 mannose와 glucose를 주로 포함하는 다당체인데 반해 KPV-0는 총 중성당 함량에서는 61.5%로 비슷했지만 구성당에서 mannose를

비롯하여 arabinose, galactose, glucose, xylose 및 rhamnose (각각 15.6, 12.5, 10.4, 9.9, 6.3, 6.2%)를 골고루 포함하는 다당체로 분석되었다. 따라서 KPV-0를 장관면역 활성화 증진에 도움을 줄 수 있는 소재 또는 제품으로 산업화에 응용하기 위해서는 구조분석 결과에서 높은 함량을 보였던 RG-I 다당을 지표성분으로 함이 타당하다고 판단되었으며 따라서 RG-I의 주요구성당인 arabinose의 함량을 9% 이상, galactose 8% 이상으로 설정하는 것이 적절하다고 판단되었다. 이후 면역활성에 관여하는 성분을 분석한 정제 및 구조확인 실험결과를 통해 KBV-0가 yeast의 세포벽에서 유래한 mannan을 주로 함유하는 다당체였으며 KPV-0는 원료인 감에서 유래하는 pectin 중 RG-I의 함량이 높은 다당체로 분석된 바 있으므로, RG-I 유래 arabinogalactan의 구성요소인 arabinose 와 galactose를 지표물질로 설정하는 것이 적절할 것으로 사료된다. Fig. 64에 제시한 chromatogram은 KPV-0의 전형적 구성당 pattern이다.

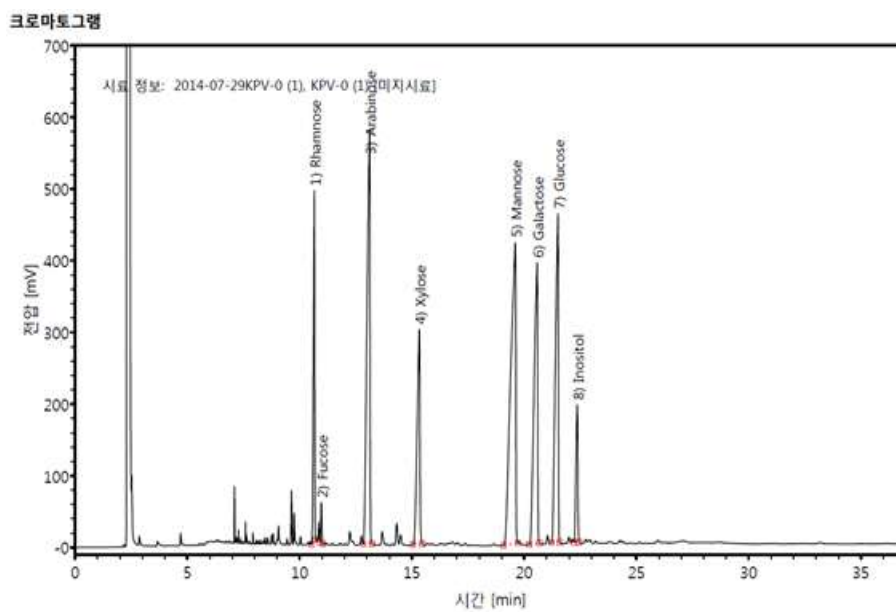


Fig. 64. GC chromatogram for the determination of sugar composition of KPV-0.

아. 전통식초 유래 다당의 경구투여에 의해 유도된 장관면역계 활성화 평가 (*in vivo*)

지금까지의 실험 (*in vitro*)을 통해 면역활성 증진이 입증된 전통 발효식초 유래 다당소재가 경구투여를 통한 장관면역 활성화 증진에 대한 가능성을 타진하고자 본 실험에서는 마우스를 이용하여 동물실험을 진행하고자 하였다. 본 과제 목적은 전통 발효식초를 이용한 다양한 생리활성 강화 성분을 분리 및 동정함과 동시에 이를 바탕으로 산업적으로 응용할 수 있는 소재로 적용하는 것이 목적이기 때문에, 지금까지의 연구에서 강한 면역활성을 나타낸 정제 다당획분이 아닌 산업적으로 응용이 가능한 조다당체, 즉 전통 현미식초 유래 조다당획분 (KBV-0)과 감식초 유래 조다당획분 (KPV-0)을 이용하여 실험을 진행하였다. KBV-0 및 KPV-0는 각각 50, 500, 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도로 6주령의 C3H/HeN 마우스에 1일 1회 총 20일간 투여하였으며, 투여가 종료된 후 장관면역계에 관련된 다양한 cytokines 및 IgA를 측정하여 그 영향을 분석하였다.

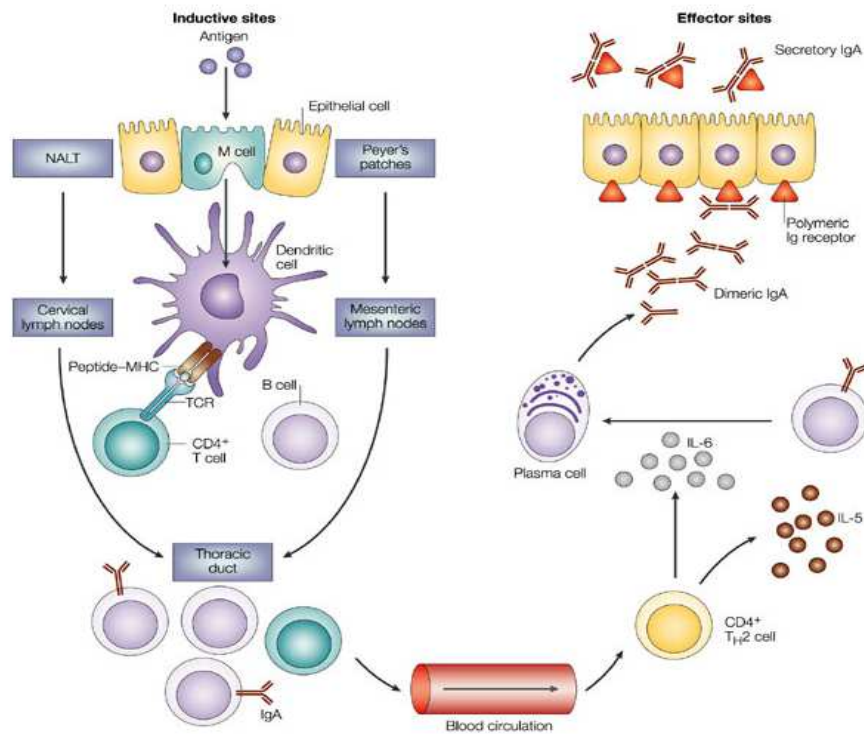


Fig. 65. Immune response in the Peyer's patch mediated mucosal immunity

우리신체의 장관은 환경으로부터의 여러 가지 항원에 끊임없이 노출되고 장관내에는 막대한 양의 미생물이 항원으로 작용하게 되는데, 이에 대응하여 장관면역계에서는 면역응답으로 IgA 항체를 생산하게 된다. 이러한 면역반응에 있어서는 gut-associated lymphoid tissue (GALT)가 중요한 역할을 하는데, Fig. 65에서 나타난 것처럼 다양한 종류의 세포들과 cytokine이 작용하게 된다. Peyer's patch (P.P)는 가장 중요한 GALT로써 알려져 있으며, 이러한 림프조직은 전신의 림프절이나 비장과는 독립한 면역 조직계를 형성하고 외부비 장기에 연결된 림프조직과 교류하여 immunoglobulin A (IgA)의 생산을 중심으로 하는 분비형 면역계를 형성하고 있다.

1) 전통발효식품 유래 다당의 경구 투여가 Peyer's patch cell의 IgA 및 관련 cytokine 생산에 미치는 효과

가) Immunoglobulin A (IgA) 생산능

Immunoglobulin A (IgA)는 점막에서 면역을 조절하는 면역글로불린중 하나로 미생물 유래 독소나 외부항원이 점막에 결합하지 못하게 하는 일차적 점막 방어기전(primary mucosal defense mechanism)의 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 항체를 분비하는 B 림프구는 일반적인 경우에 IgG를 생산하지만, 장관 면역계에서는 특이적으로 IgA를 많이 생산하여 장관 내로 분비시키고, 분비된 항체는 세균이나 바이러스를 불활성화시키는 중요한 역할을 한다 (Fig. 66).

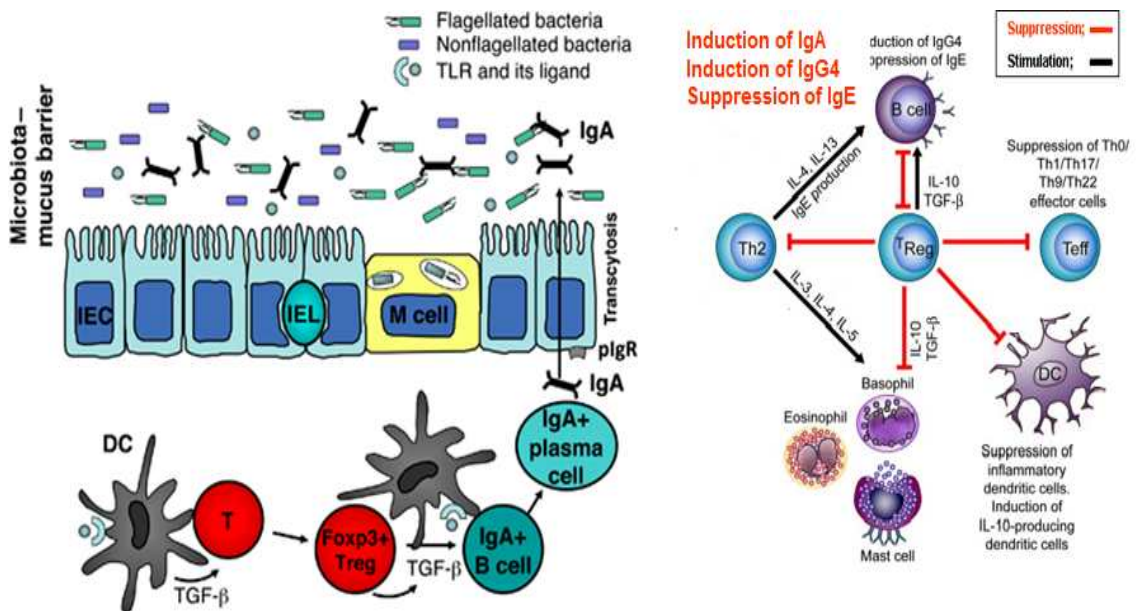


Fig. 66. IgA production by Peyer's patch cells and related regulatory mechanism.

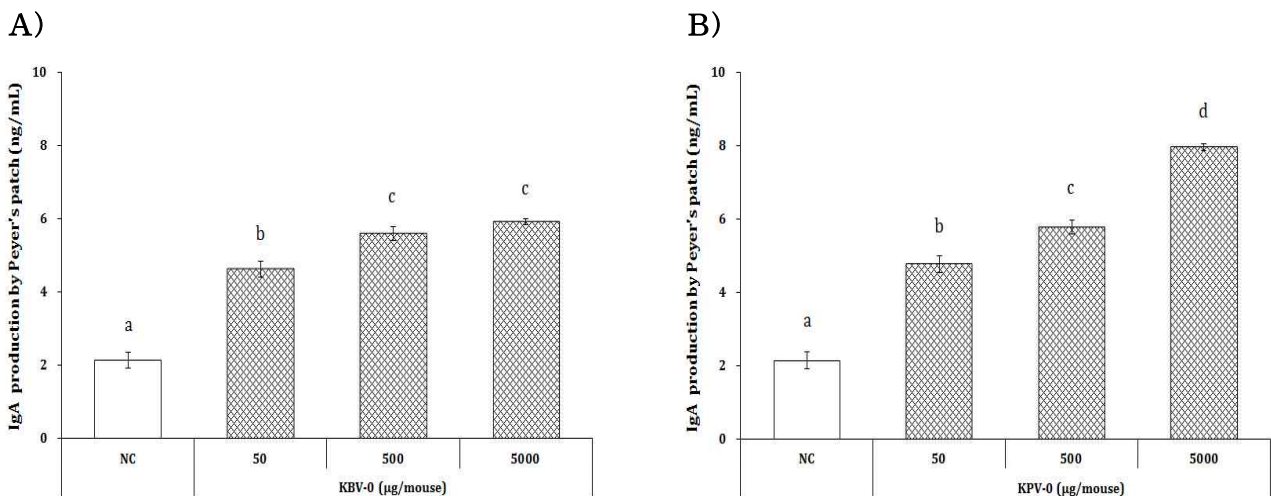


Fig. 67. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of immunoglobulin A (IgA) by Peyer's patch cells.

전통발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0와 KPV-0를 각각 50, 500 및 5,000 µg/mouse의 농도로 20일간의 경구투여한 마우스의 소장으로부터 Peyer's patch 세포 분리하고, 배양 중 생산되는 IgA의 함량을 측정된 결과, 두 종류의 시료에서 모두 농도의존적인 IgA 분비능을 나타내었다 (Fig. 67). 특히, 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0 (Fig. 57B)의 경우, 시료농도 500 µg/mouse에서는 현미발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0 (Fig. 57A)와 비슷한 활성 (무투여 대조군인 NC의 2.7배)을 나타내었으나, 5,000 µg/mouse의 농도에서는 유의적으로 높은 IgA 분비능을 나타내었다 (3.7배).

이러한 IgA는 인체에서 생산되는 총 면역글로브린 항체의 약 6%를 차지하는 대표적 분비형 항체로서 주로 타액, 눈물 그리고 장점막 (mucosal-associated lymphoid tissues; MALT)에서 주로 분비되며 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있는 장관면역에서 중추적인 역할을 하는 항체이다.

나) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) 생산능

대식세포, T 세포, 비만세포, 자연살해(natural killer, NK) 세포 등에서 발생시켜 백혈구의 성장인자로 작용하며, 줄기세포가 과립구(호중구, 호염기구, 호산구)과 단핵구를 생산하도록 자극하는 과립구 단구-군체자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)의 자극활성을 확인한 결과는 Fig. 58에 나타났다. GM-CSF는 대식세포의 수를 급격히 늘려 감염반응과 대항할 수 있도록 하는 면역/감염반응의 일부로, 현미발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0를 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 발생하는 GM-CSF는 시료농도 5,000 µg/mL에서 NC의 1.6배의 유의적인 활성을 나타내었으나 (Fig. 68A), 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0 (Fig. 68B)는 동일농도에서 NC의 5.3배로 유의적으로 월등히 높은 생성능을 나타내었다.

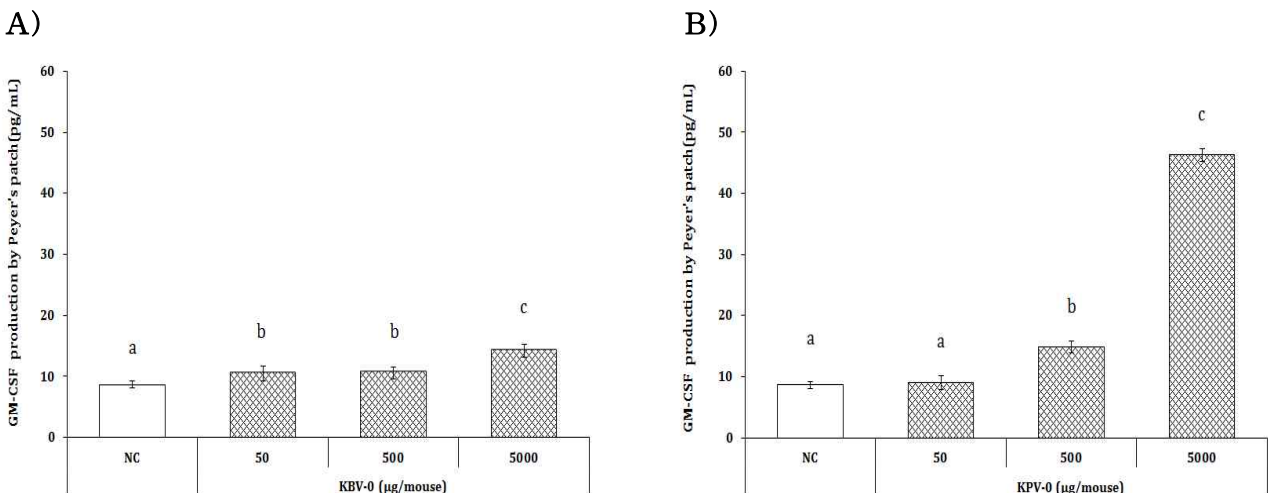


Fig. 68. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) by Peyer's patch cells.

다) Transforming growth factor- β (TGF- β) 생산능

시료 자극에 의해 Peyer's patch내의 T세포 중 조절 T 세포(regulatory T cell, T_{reg} 세포)가 자극하게 되면 장관내 분비형 항체인 IgA의 생산에 중요한 역할을 담당하는 IL-10 및 transforming growth factor- β (TGF- β) 등의 cytokine의 생산이 촉진되고, 이들이 B 세포를 선택적으로 자극하여 점막 면역과 관련된 IgA 항체의 생성이 증가하게 된다(Fig. 66).

전통발효 식초 유래 조다당획분 2종 (KBV-0 및 KPV-0)을 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 유도하는 TGF- β 의 생성능은 Fig. 69에 나타난 바와 같이, KBV-0에서 시료농도 500~5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서 NC 대비 1.3~1.5배의 활성을 나타내었으며 (Fig. 69A), KPV-0에서는 동일농도에서 1.1~1.2배의 활성을 보여 (Fig. 69B), KPV-0보다는 KBV-0의 TGF- β 에 대한 자극능은 더 우수한 것으로 나타났다. 장관면역에서 TGF- β 의 생성은 IL-6와 같은 선천면역반응에서 생산되는 사이토카인과 함께 IL-17을 분비하는 CD4⁺ T 세포의 항염증성 아집단의 분화를 촉진하며, B 세포의 IgA형으로 전환을 유도하여 IgA 항체의 생산을 자극하는 주요한 cytokine으로 알려져 있다.

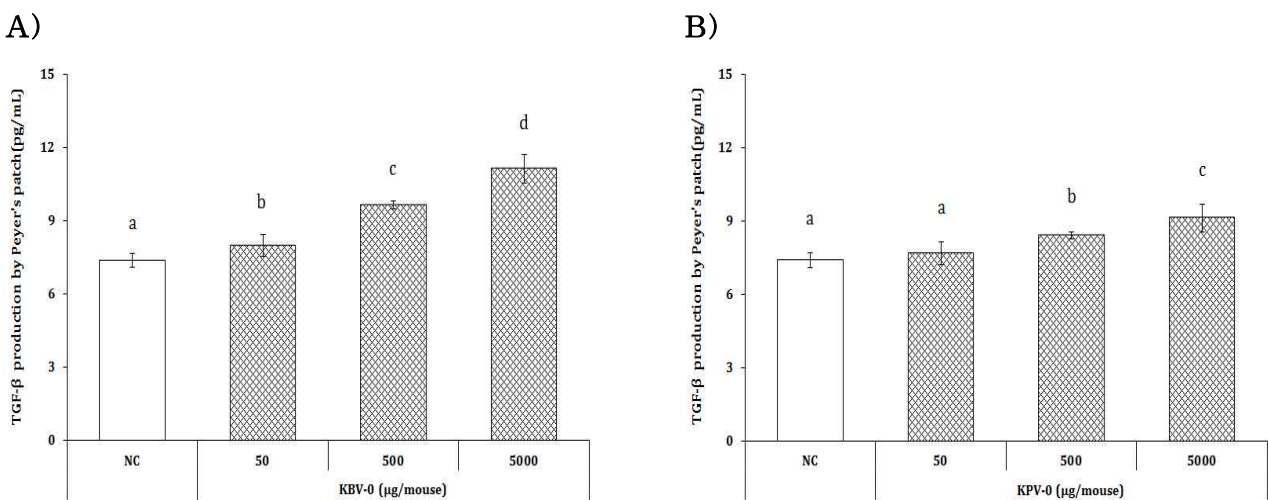


Fig. 69. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of transforming growth factor-beta (TGF- β) by Peyer's patch cells.

라) Interleukin-6 (IL-6) 생산능

마지막으로 전통발효 식초 유래 조다당획분 2종 (KBV-0 및 KPV-0)을 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 유도하는 IL-6의 생성능을 측정된 결과 (Fig. 70), 두가지 시료에서 모두 유의적으로 농도의존적인 활성의 증가를 나타내었으나 시료농도 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서

KPV-0 (Fig. 70B)가 NC 대비 2.2배의 분비능을 나타낸 것에 비해 KBV-0 (Fig. 70A)는 1.5배의 활성을 나타내어 상대적으로 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0가 더 우수한 분비능을 유도하는 것으로 확인되었다. Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성되어 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데 IL-6는 이때 골수의 증식에 관여를 하는 cytokine으로 전신면역으로 확대가 일어나게 된다고 알려져 있다.

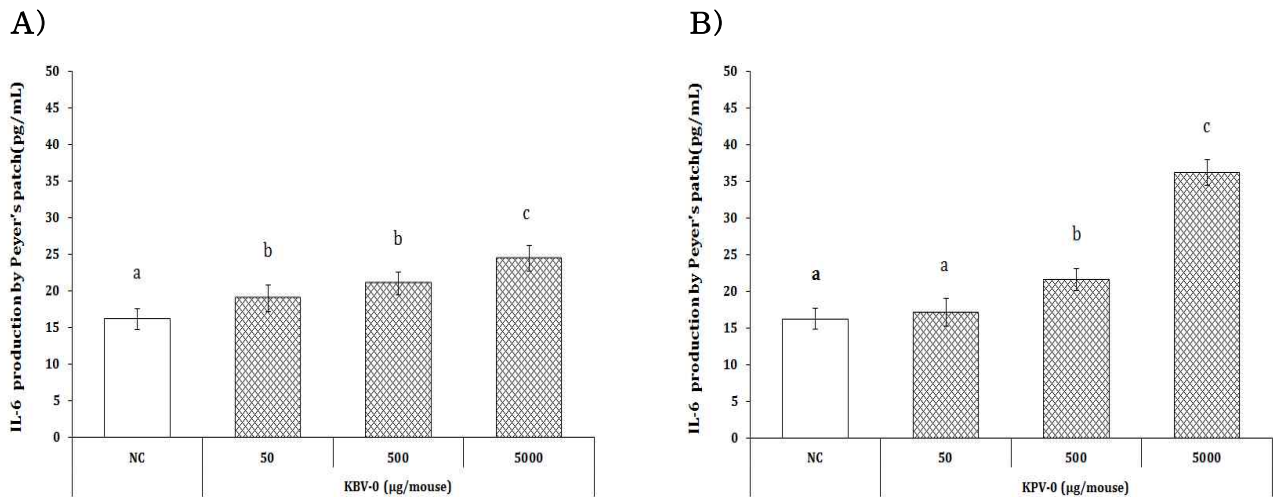


Fig. 70. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of interleukin-6 (IL-6) by Peyer's patch cells.

2) 전통발효식초 유래 다당의 경구 투여가 IgA의 장관내 및 분변으로 분비에 미치는 효과

전통 발효식초 유래 조다당획분의 경구투여에 의해 Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되면 IgA의 생성능이 증가된 결과로부터, 장관 내 또는 분변 중에는 장관으로 분비된 IgA가 상당량이 포함되어 있을 것으로 예측되었다. 따라서 KBV-0 및 KPV-0의 경구투여 후 장관내액 및 분변 중에 존재하는 잔여 IgA를 측정된 결과, 두 종류의 시료에서 모두 IgA의 함량을 농도의존적으로 증가하였으며, 특히 KPV-0를 경구 투여한 군에서 KBV-0에 비해 상대적으로 높은 IgA 생산량을 나타내었다 (Fig. 71 및 72).

3) 전통발효식초 유래 다당의 경구 투여가 혈청 내 IL-6 및 GM-CSF 생산에 미치는 효과

전통 발효식초 유래 조다당획분의 경구투여에 의해 Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되어 IgA의 생성능이 증가된 결과로부터, 혈액으로 순환하는 cytokine인 IL-6와 GM-CSF의 양을 확인하고자 하였다. GM-CSF는 과립구의 증식과 생성뿐만 아니라 성숙 과립구의 강력한 활성화인으로 작용하는 가장 중요한 사이토카인이며, 각각에 대한 특이세포 표면수용체에 결합함으로써 생리학적 효과를 나타내는데, 전통 발효식초 유래 조다당획분 2종 (KBV-0 및 KPV-0)의 경구 투여에 의한 혈액 중 GM-CSF (Fig. 73)와 IL-6 (Fig. 74)의 생성증가는 모두 무투여 대조군 (NC)과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 못하는 것으로 나타났다.

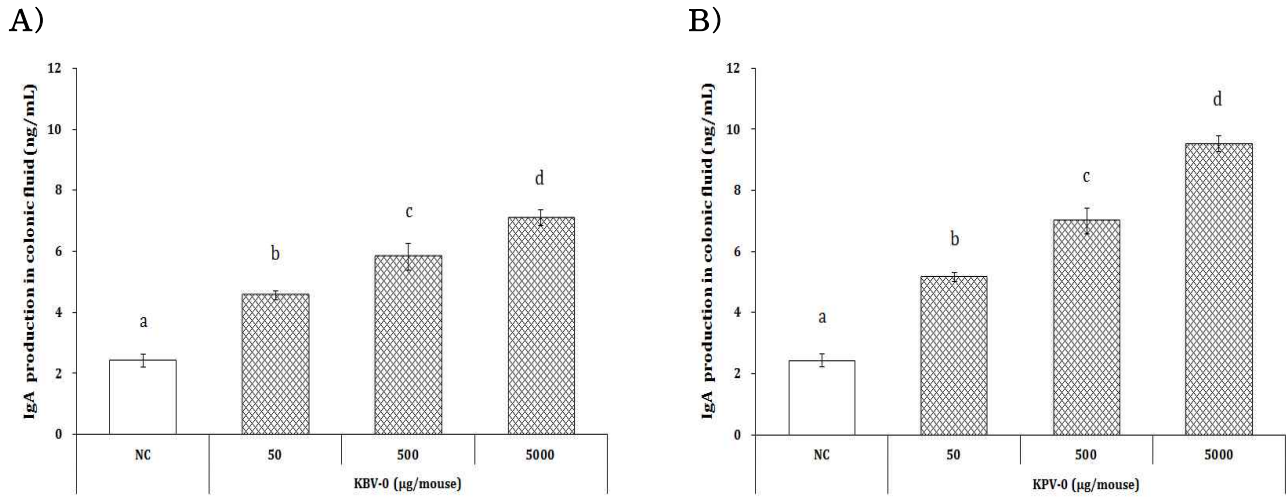


Fig. 71. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of immunoglobulin A (IgA) in colonic fluid.

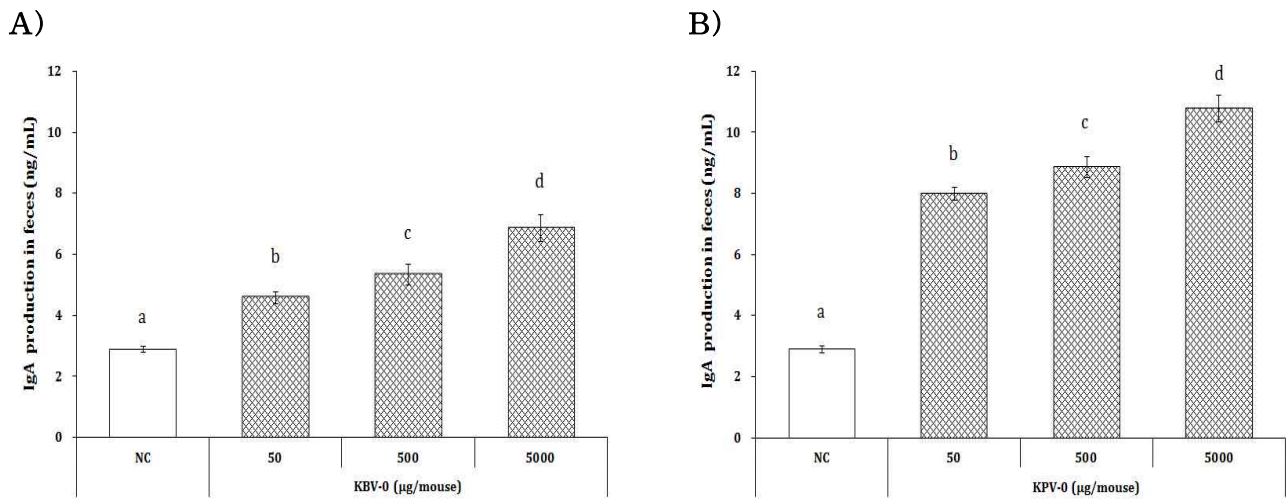
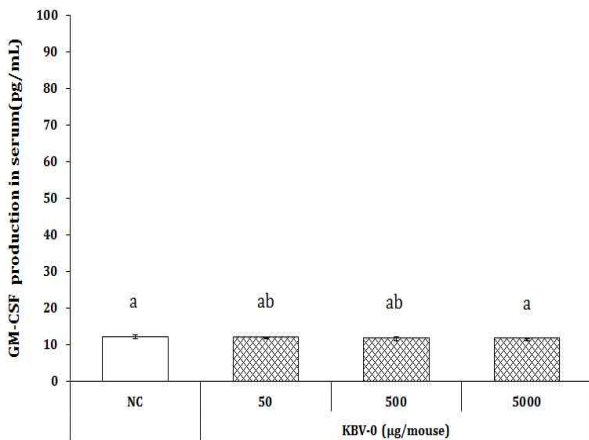


Fig. 72. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of immunoglobulin A (IgA) of mouse feces.

A)



B)

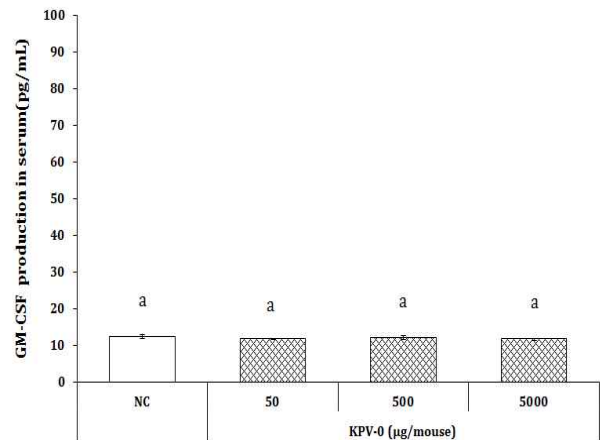
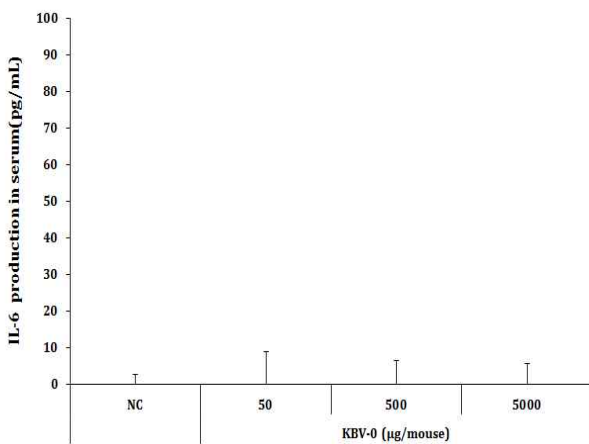


Fig. 73. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) in mouse serum.

A)



B)

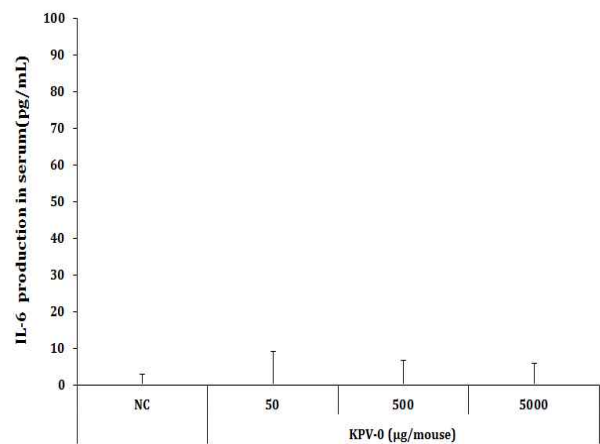


Fig. 74. Effect of oral administration of KBV-0 (A) and KPV-0 (B) on the production of interleukin-6 (IL-6) in mouse serum.

지금까지 현미발효 식초 및 감식초 유래 조다당획분의 경구투여에 의한 장관면역계의 영향에 대한 결과를 종합해볼 때, 현미발효 식초 유래 조다당획분인 KBV-0와 감식초 유래 조다당획분인 KPV-0는 모두 경구투여로 인해 마우스의 장관면역계를 자극함으로써 Peyer's patch 세포의 IgA 및 관련 cytokine의 생성을 농도의존적인 경향으로 증가시켰음을 알 수 있었으며 효과는 KPV-0에서 더욱 우수하였다. 더욱이 IgA의 분비와 관련된 cytokine인 GM-CSF 및 IL-6의 생성 역시 모두 KBV-0에 비해 상대적으로 KPV-0에서 더 우수한 활성을 나타내었으며, 대체적으로 500 µg/mouse 이상에서 유의적인 차이를 나타내었음을 확인하였다. 그러나

TGF- β 는 KPV-0보다 KBV-0에서 투여농도 5,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서 더 우수한 활성을 나타내었다.

또한, 전통 발효식초 유래 조다당획분의 경구 투여에 의해 활성화된 Peyer's patch 세포로부터 IgA 생성능이 증가시켜 장관 내로의 IgA 분비를 촉진시킬 수 있음이 추가적으로 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 전통 발효식초의 식이를 통한 섭취는 장내의 면역체계를 활성화시켜 IgA 분비를 촉진킴으로서 장내로 유입된 각종 항원을 신속하게 제거하는데 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 활성은 현미발효 식초보다는 감식초에서 유래한 다당이 더욱 효과적일 것으로 판단되며, 추후 장내 건강에 도움을 줄 수 있는 식품 또는 장관면역 증진용 의약품 소재로서의 활용도 충분히 가능할 것으로 사료된다.

제 5절. 전통발효식초의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가

1. Inflammatory bowel disease (IBD) 동물모델 선정

IBD 동물모델 선정을 위해 선행 연구자료를 검색하고 분석하였다.

Table 22. IBD 유도 및 IBD에 대한 phenolic compound의 효능 검증 연구

No.	DSS	Phenolic compound	period	Species	week	Effect
1	3%	Hydroxytyrosol	27day (DSS 5 day)	C57BL/6 mice	6	DAI
2	1.25%	Caffeic acid	12 day (5 day DSS)	CD-1/IGS female mice	12	Body weight, CYP4B1, cecal damage, MPO
3	3%	Ellagic acid (2번)	7 day	male Fisher 344 rats	140-160 g	Colon length, histology,
4	5%	Glabridin	7 day	BALB/C female mice	6	Colon length, histology, Nitrate (7일), PGE2, MPO (7일), TNF- α , IL-6, mRNA expression (TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, ICAM-1)
5	5%	Rutin	14 day (7 day DSS)	ICR female mice	8	Colon rectum, body weight, IL-1 β
6	5%	Wogonin	19 day (DSS 5 day)	BALB/C female mice	5	Colon length, hemoglobin, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10
7	3.5%	Curcumin	14 day	BALB/C male mice	8	Body weight, DAI, colon length, histology, MPO, immunostaining (CD4 T cell, CD8 T cell, NF- κ B, I κ B- α)
8	5.0%	Dosmalfate	7 day	BALB/c mice	-	Colitis severity, MPO, neutrophil infiltration, IL-1 β
9	5.0%	Piceatannol	7 day	female BALB/c mice	6	Colitis severity, MPO, NO/PGE2 production, mRNA expression (iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α , MCP-1, KC-1), STAT3/NF- κ b nuclear translocation
10	3.50%	Kurozu (vinegar)	12 day	C57BL/6 female mice	-	Body weight, bloody stool, Nitrotyrosine level, histology

2. 실험디자인

가. 실험 동물 선정 및 사육

생후 6주령의 수컷 C57BL/J를 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 7주령부터 실험을 진행하였다. 실험동물은 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 적응기간 중 무균음수와 사료 (purina, United states)를 자유롭게 공급하여 적응시킨 후 실험 식이를 공급하였다. 본 연구의 protocol은 이화여자대학교 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No. 2014-01-013).

나. 시험물질

경구투여 시료로써 사용된 시험물질은 국내산 감식초의 총 농축액 (PV) 및 현미식초 총 농축액 (UV)을 그 시료로써 사용하였다.

Table 23. The composition of PV and its fractions

Ingredient	Sample	PV	UV
고형분 (%)		65.71	63.32
수분 (%)		34.29	37.68
회분 (%)		0.794	0.476
총당 (%)		0.51	0.85

다. 실험 디자인

수컷 C57BL/J (6주령)를 대상으로 1주일 적응기간을 거친 후, 총 23일 간 매일 감식초 농축액 (PV) 및 현미식초 농축액 (UV) 를 각 200 mg/kg B.W 및 400 mg/kg B.W를 경구투여 하였다. 2주 후 4% DSS를 9일 동안 2차 증류수에 녹여 제공하였다. 실험동물은 23일 뒤, 12시간 절식 후에 희생하여 조직 및 혈액을 채취하였다.

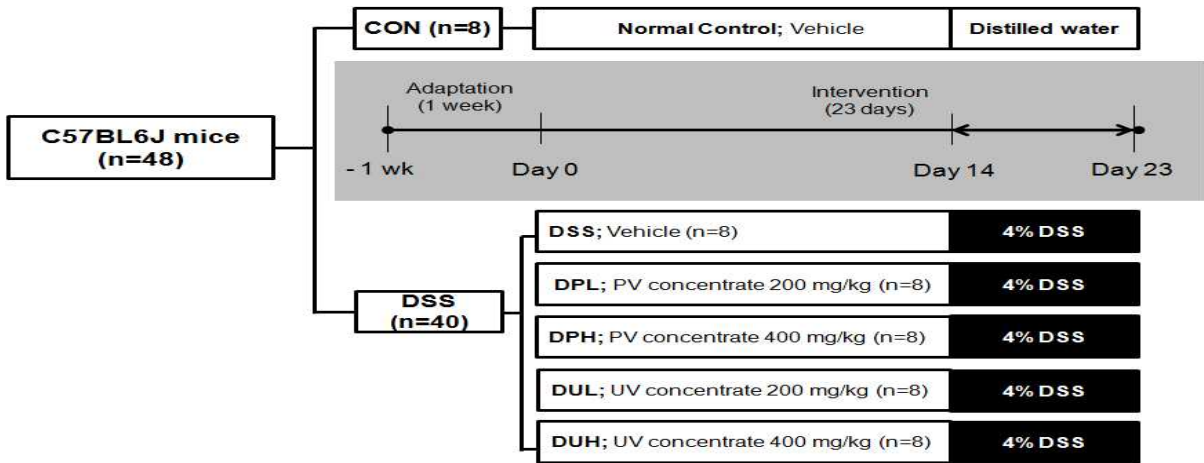


Fig. 75. Experimental design The mouse were pretreated PV and UV or water once daily. After 2 weeks, 4% DSS was provided for 9 days. CON, normal control, water (n=8) DSS, DSS + water (n=8) DPL, DSS + 200mg/kg B.W. PV (n=8), DPH, DSS + 400mg/kg B.W. PV (n=8), DUL, DSS + 200mg/kg B.W. UV (n=8), DUH, DSS + 400mg/kg B.W. UV (n=8),

라. 분석 지표

9일 간의 DSS로 인한 염증 반응에 대한 감식초 농축액(PV) 및 현미식초 농축액 (UV) 의 장 면역 효과와 기전을 다음과 같은 분석지표를 통하여 확인하였다.

Table 24. 일반지표 및 생화학 분석 바이오마커 측정 항목

지표	측정 항목	
일반지표	식이섭취량, 체중 변화량.	
	장기 및 조직 무게 및 길이 측정 (비장, 신장, 간, 소장, 대장의 무게 및 대장 길이)	
바이오 마커	염증대사	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10
	세포 증식 / 세포사	b-catenin, cyclin d1, c-myc, caspase-3, caspase-9
	뮤신 분비	MUC2
	DAI	
조직 병리학적 분석	H&E staining	

3. 연구결과

가. 체중 및 식이 섭취량

실험 기간 19일 이후 CON군과 DSS 섭취 군간 체중의 유의적인 차이를 보였으며 ($p < 0.0001$), 식이 섭취량은 3주차에 DSS군에 비하여 시료 섭취군에서 유의적인 차이가 있었다 ($p = 0.0004$). DSS군과 시험물질 투여군 간은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

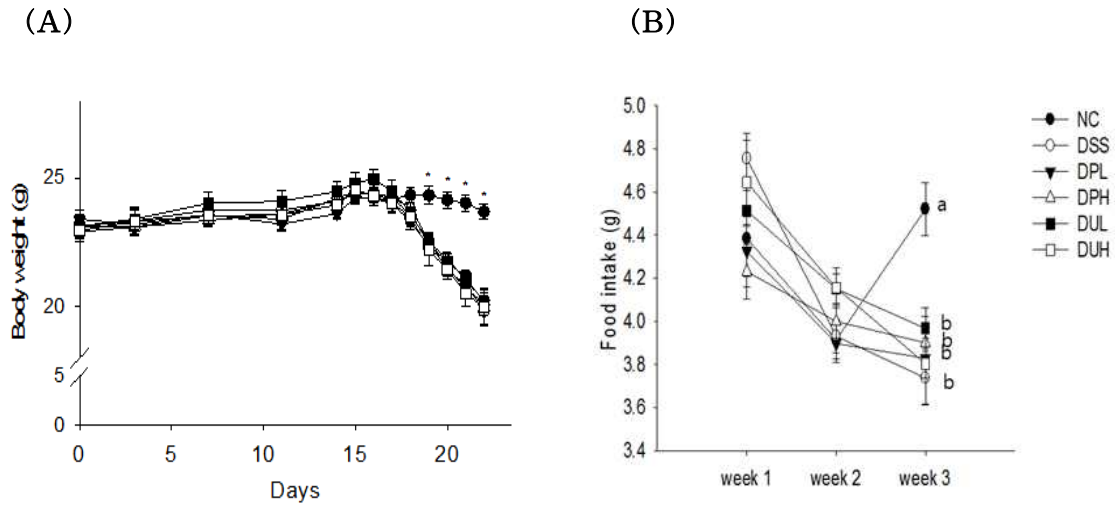


Fig. 76. Effects of concentrate of vinegar on (A) body weight and (B) food intake in DSS-induced colitice mice. All values are expressed at the mean \pm S.E. (NC: 0.9% saline (n=8), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=7), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=6), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=8), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=5)).

나. 장기 및 조직 무게

신장 및 소장 무게는 모든 군 간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 간, 대장 무게를 측정 시, DSS을 섭취한 모든 군에서 무게가 유의적으로 감소하였고 ($p=0.0032$), 비장 무게를 측정 시 유의적으로 증가 하였으나 ($p<0.0001$), DSS군과 비교하여 시료군에서 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다. colon 길이를 측정하였는데, 정상대조군에 비하여 DSS 섭취한 모든 군에서 길이가 유의적으로 감소하였으나 ($p<0.0001$) DSS군과 시료섭취군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

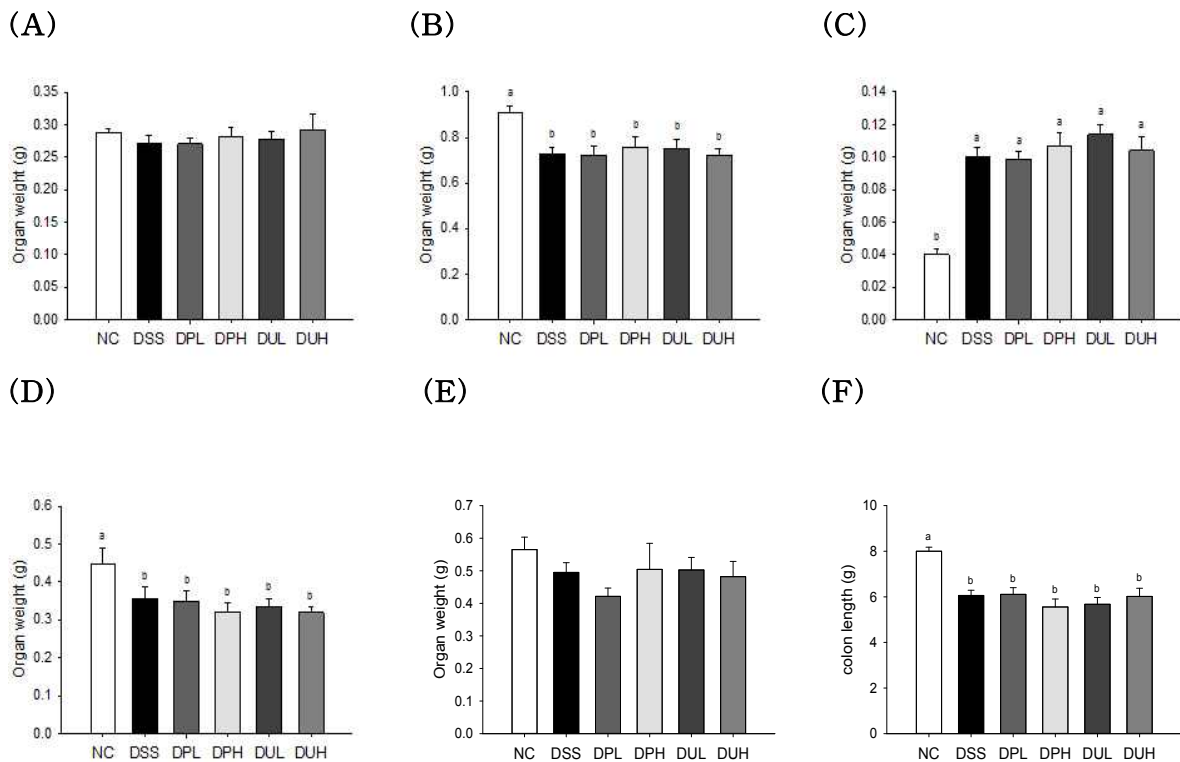


Fig. 77. Effects of concentrate of vinegar on (A) kidney (B) liver (C) spleen (D) colon (E) small intestine weight and (F) colon length in DSS-induced colitic mice. All values are expressed at the mean \pm S.E. Values with different alphabet are significantly different at $P<0.05$ among all ethanol induced group by 1-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (NC: 0.9% saline (n=8), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=7), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=6), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=8), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=5)).

다. Disease activity index (DAI)

9일 간 DSS를 섭취하여 나타나는 증상을 몸무게 감소, 변의 묽기 및 혈변 등을 고려하여 점수화하였다. 3일 째부터 정상 대조군과 DSS군 간 유의적인 차이가 나타나며, 9일 째에 DPL군에서 DSS군에 비하여 감소하는 경향을 보이고, DUL군에서 증가하는 경향을 보였다 ($p < 0.0001$).

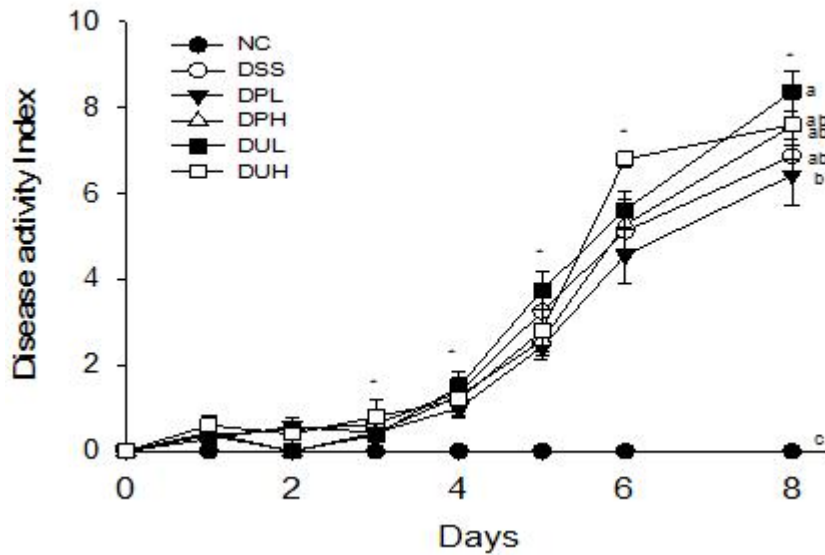
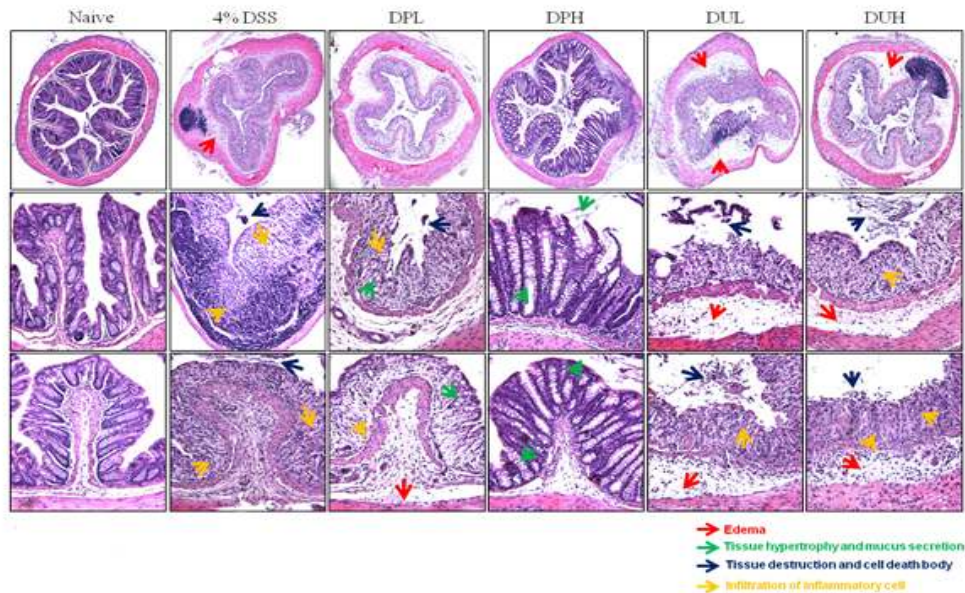


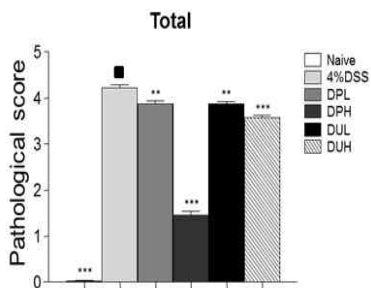
Fig. 78. Effects of concentrate of vinegar on Disease activity index in DSS-induced colitice mice. All values are expressed at the mean \pm S.E. Values with different alphabet are significantly different at $P < 0.05$ among all ethanol induced group by 1-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (NC: 0.9% saline (n=8), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=7), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=6), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=8), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=5)).

라. H&E staining 분석

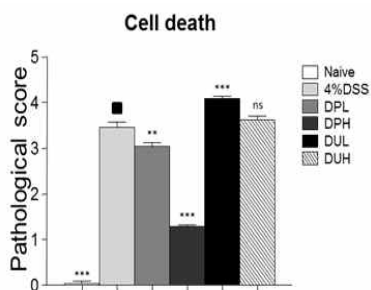
9일 간의 DSS 섭취로 인한 변화 및 식초의 효과를 측정하기 위하여 colon 조직의 H&E staining을 실시하였다. 그 결과, 정상대조군에 비하여 DSS 대조군의 colon 조직 내에 부종, 염증세포의 침입 및 세포사 등이 증가한 것이 관찰되었다. DSS 대조군에 비해 DPL군에서는 부종이 약간 감소하는 것으로 보이고, 경미한 점액 증가가 보였으나 유의적인 차이가 없었다. DPH군에서는 DSS 대조군에 비하여 염증, 세포사 및 재생에서 유의적인 차이를 보였다. DUL 및 DUH 군에서는 유의적인 차이가 없었다.



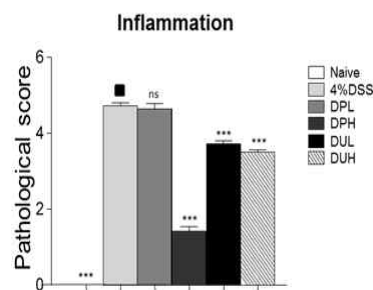
(A)



(B)



(C)



(D)

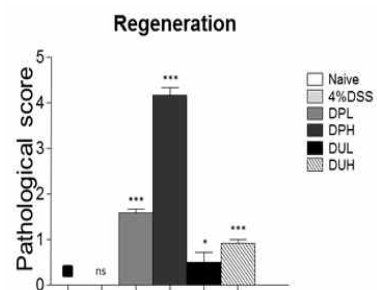


Fig. 79. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic histological changes in chronically ethanol drinking rats. All values are expressed at the mean \pm

S.E. *** $p < 0.05$ by t-test (Naive: 0.9% saline, 4% DSS: DSS + 0.9% Saline, DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar, DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar, DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar, DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar).

마. 생화학적 분석 지표

1) Colon 조직 내 염증 대사 관련 mRNA 발현 측정

DSS에 대한 장관 면역의 약화를 확인하기 위하여 pro-inflammatory cytokine으로 대표되는 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과, IL-6, IL-1 β 에서는 모든 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. TNF- α 는 정상대조군에 비하여 DSS 군에서 증가 경향을 보였으며, DSS 대조군에 비해 DPL 군의 발현이 감소하는 경향을 보였으며, DUL군은 증가하는 경향을 보였다 ($p=0.0358$). NF κ B의 전사를 막는 I κ B의 활성이 감소하면 NF κ B의 활성이 증가하면서 이러한 cytokine의 활성이 증가하므로, 그 발현을 측정하였으나, 모든 군 간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

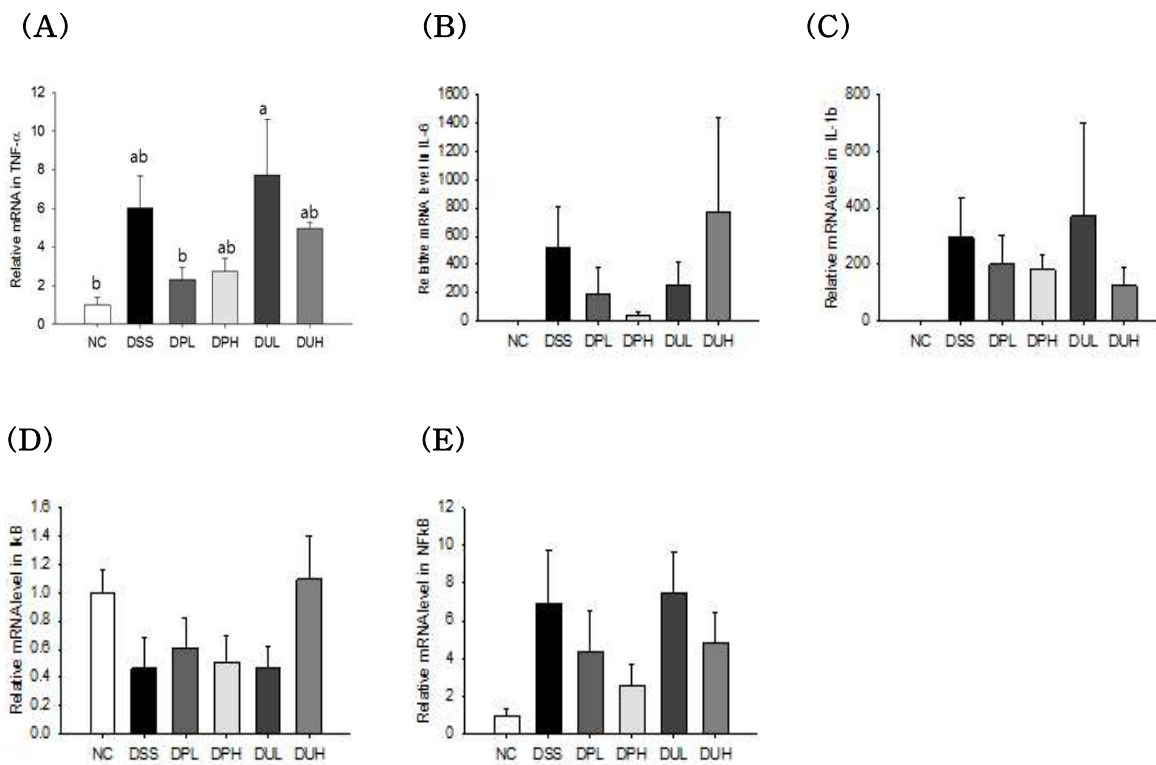


Fig. 80. Effects of concentrate of vinegar on (A) tumor necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukin-6 (IL-6), (C) interleukin-1 β (IL-1 β) (D) Inhibitor kappa B (I κ B) and (E) nuclear factor kappa B (NF κ B) in mice with DSS-induced colitis. All values are expressed at the mean \pm S.E. Values with different alphabet are significantly different at $P < 0.05$ among all ethanol induced group by 1-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (NC: 0.9% saline (n=7), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=5), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=5), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=6), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=4)).

2) Colon 조직 내 cell proliferation 및 cell death 대사 관련 mRNA 발현 측정

DSS에 의해 손상된 Colon 조직의 Cell proliferation에 대한 전통발효식초의 효과를 알아보기 위하여 관련 지표인 β -catenin, C-myc 및 cyclin-D를 측정하였으나, 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다. Apoptosis 관련 지표인 caspase-3 및 caspase-9을 측정하였으나 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

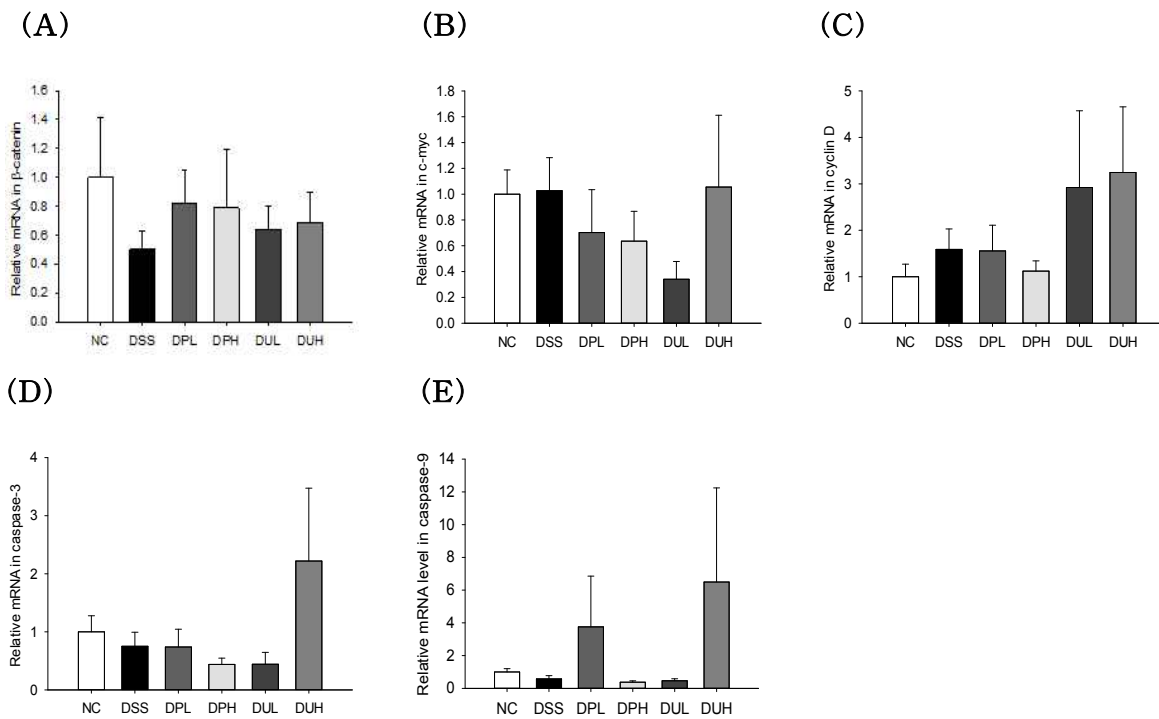


Fig. 81. Effects of persimmon and unpolished rice vinegar on (A) β -catenin (B) c-myc (C) cyclin D (D) caspase-3 and (E) caspase-9 in mice with DSS-induced colitis All values are expressed at the mean \pm S.E. Values with different alphabet are significantly different at $P < 0.05$ among all ethanol induced group by 1-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (NC: 0.9% saline (n=8), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=7), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=6), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=8), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=5)).

3) Colon 조직 내 MUC2의 mRNA 발현

Colon 조직에 대한 식초의 뮤신 분비를 촉진하는 MUC2의 발현을 측정한 결과, 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다.

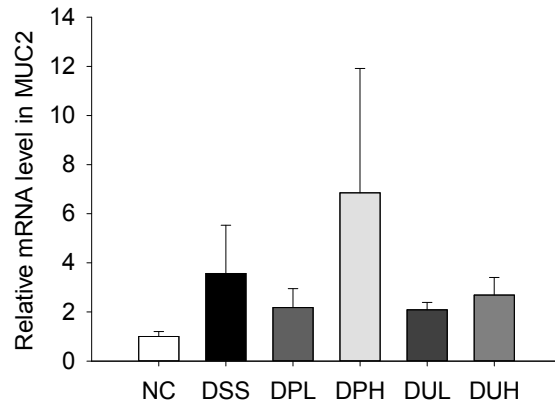


Fig. 82. Effects of persimmon and unpolished rice vinegar on MUC2 in mice with DSS-induced colitis. All values are expressed at the mean \pm S.E. (NC: 0.9% saline (n=8), DSS: DSS + 0.9% Saline (n=8), DPL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=7), DPH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of persimmon vinegar (n=6), DUL: DSS + 200 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=8), DUH: DSS + 400 mg/kg B.W. concentrate of unpolished rice vinegar (n=5)).

바. Inflammatory bowel disease (IBD) 모델에서 전통발효식초의 장관면역 기능성 평가 시험 결과

본 연구에서는 감식초 농축액 (PV) 및 현미식초 농축액 (UV)의 장관 면역에 대한 효능을 DSS를 9일간 제공한 동물 모델을 통해 규명하고자 하였다.

수컷 C57BL/J (6주령)를 23일간 매일 PV 및 UV를 각 200 mg/kg B.W 혹은 400 mg/kg B.W 을 경구투여 하였으며, 시험 시작 후 2주 뒤부터 DSS를 식수에 혼합하여 제공함으로써 장관 면역을 약화시켰다.

9일 간의 DSS 섭취 기간 동안 DAI 측정 결과 DSS군에 비하여 DPL군에서 감소하는 경향을 보였다. 또한 Colon 조직의 형태학적 분석에서 pathological score가 DSS군과 비교하여 감식초 농축액 고용량군 (DPH)에서 DSS군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 염증, 세포사 및 재생에서도 유의적인 효과를 관찰할 수 있었다. 이에 따라 Quantitative real-time-transcription polymerase chain reaction을 이용하여 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 TNF- α , IL-6, 및 IL-1 β 의 발현 정도를 측정하고, I κ B 및 NF κ B를 측정하였으며, 세포 증식 및 세포사에 대한 효과를 확인하고자 기전 인자인 b-catenin, c-myc 및 cyclin d 그리고 caspase-3 및 caspase-9의 발현 정도를 측정하였다. 뮤신 분비를 관여하는 MUC2의 발현 정도를 측정하였다. 그 결과 TNF- α 에서 DSS군이 증가하는 경향을 보였으며, DSS군과 비교하여 DPL군이 감소하는 경향을 보였다.

본 연구 결과들을 통해, 9일 간의 4% DSS는 colon에 세포사 및 염증 인자의 생성을 촉진시키고 이로 인해 정상 대조군에 비하여 몸무게 및 장기 무게의 유의적인 차이를 보임을 확인하였으며, 이에 대해 감식초 농축액이 염증 사이토카인 유전자 발현을 약화시키며, 세포 증식의 조절 인자의 발현 조절 가능성이 있을 것으로 사료된다.

제 6절. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vitro*)

국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초의 간 보호 효과를 human hepatic carcinoma인 HepG2 세포주 모델을 이용하여 확인하였다.

1. 연구방법

가. 재료

국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초는 MeOH 추출하여 시료로 사용하였다. 각각의 시료 농도는 WST-1 assay를 통하여 예비실험을 진행한 후 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 선택하였다. 시험 물질은 FBS가 미함유(serum free)된 세포 배양 배지로 희석하여 사용하였으며, 예비시험 후 효력을 나타내는 농도를 찾아 선정, 시료의 항산화 효능을 확인하였다.

나. 시약

세포배양에는 minimum essential medium(MEM)(Welgene, Korea), fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotics(Hyclone, Logan, UT, USA)을 사용하였으며, ethanol은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

다. 세포주 및 배양

본 실험에 사용된 human hepatic carcinoma인 HepG2는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 10% FBS와 penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 g/ml)이 함유된 MEM 배지를 사용하여 배양하여 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다.

라. 세포독성시험

HepG2 세포에 대한 각 전통발효식초 추출물의 세포독성은 WST-1 assay로 측정하였다. HepG2 세포는 1×10^5 /ml로 48-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 24시간 동안 각각의 전통발효식초 추출물을 농도 별로 처리하였다. 24시간 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 배양세포 부피의 1/10로 처리하거나 배지에 희석하여 이를 각 well 당 200 μ l씩 처리하여 1시간 동안 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

HepG2 세포를 6-well plate에 2×10^5 /well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 시료 및 새로운 배지를 농도 별로 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 3시간 후 ethanol 1 M 을 함께 처리하여 24시간 배양하였다. 그 다음 상층액을 제거한 후 TRIzol reagent 처리하였다. RNA 추출은 Intron(Korea)사에서 제공한 제품 사용설명서에 따라 수행하였고, 추출한 RNA 5 μ l을 0.1% DEPC를 처리한 물(995 μ l)에 희석시킨 후 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 이들 비가 1.7 이상일 때 다음 단계를 진행하였다. RNA 농도는 260 nm의 흡광도값 $\times 40 \mu\text{g/ml} \times$ 희석배수로 계산하였다. cDNA 합성은 oligo dT primer (50 μM) 1 μ l, dNTP Mix(2.5 mM) 1 μ l, 추출한 RNA(5 μg)와 RNase free water로 10 μ l을 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 10X reaction buffer 2 μ l, RNase inhibitor (40 units/ μ l) 0.5 μ l, RTase (200 units/ μ l) 1 μ l, RNase-free water 6.5 μ l를 섞어 10 μ l씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 60분, 70°C에서 10분간 반응시켰다.

제조된 cDNA를 항산화 유전자 발현을 알아보기 위해 PCR을 실시하였다. WizPure HS-PCR FDmix(WizBio, Korea) 1 tube에 증류수 17 μ l, forward primer(10 μM)와 reverse primer(10 μM)을 각각 1 μ l, 그리고 합성한 template cDNA 1 μ l을 PCR tube에 넣은 후 다음과 같은 조건으로 PCR을 하였다. *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *CAT*는 95°C에서 5분, 95°C에서 30초, 55°C에서 40초, 72°C에서 40초, 72°C에서 10분이었고, *GPx*, *GR*, 그리고 *18S* rRNA도 유사한 조건으로 PCR 하였으나, annealing 온도가 각각 60°C로 달랐다. PCR cycles은 30 cycles로 하였다. 18S를 내부 표준 유전자로 사용하였다. PCR 산물은 0.005% red safe(Intron, Korea)가 첨가된 1.0% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 Image Lab(BIO-RAD) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

바. Superoxide dismutase (SOD) 효소활성

Superoxide dismutase(SOD) 효소활성 측정은 Dojindo Molecular Technologies SOD assay kit으로 흡광도 450 nm에서 측정하여, superoxide radical을 50% dismutation 하는데 필요한 SOD량을 1 units으로 하여 분당 활성정도를 단백질 1 mg 단위로 나타내었다.

사. Glutathione Peroxidase (GPx) 효소활성

GPx 효소활성 측정은 GPx assay kit (BioVision, Lyon, France)에 의해 측정되었다. 이 분석법은 GPx에 의해 GSH가 산화된 형태인 GSSG가 환원될 때 소비되는 NADPH의 증감도를 흡광도를 이용하여 측정하는 원리이다. 실험에 사용되는 시약은 NADPH, glutathione, glutathione peroxidase 및 assay buffer의 혼합물로 구성되었다. 반응의 개시는 GPx cumen hydroperoxide의 첨가에 의해 이뤄졌으며 GPx 활성은 NADPH 산화 비율로서 340 nm에서 흡광도를 5분마다 4회 측정하였다.

아. Glutathione Reductase (GR) 효소활성

GPx 효소활성 측정은 GPx assay kit (BioVision, Lyon, France)에 의해 측정되었다. 실험에 사용되는 시약은 H_2O_2 , catalase, TNB, DTNB, NADPH, GSSG 및 assay buffer의 혼합물로 구성되었다. GR 활성은 450 nm에서 흡광도를 5분마다 4회 측정하였다.

생체 내에는 정상적인 대사과정에서나, 외부적인 원인으로 superoxide anion(O_2^-), hydroxy radical($-OH$)와 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등의 자유기 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 존재한다. 이는 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 지질 과산화, 세포막 변화, 단백질 산화 및 DNA 변성 등을 유발하여 암, 심장질환, 동맥경화 및 자가면역질환 등의 각종 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다. 세포에는 이러한 활성산소종의 폐해로부터 세포를 방어하는 항산화 방어체계가 있으며, 그 중 대표적인 것이 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 등의 항산화 효소이다. 이들은 활성산소종에 의한 연쇄반응의 개시를 저해시키는 작용을 하는데 SOD는 과산소 음이온을 과산화수소로 바꾸어주고, CAT는 과산화수소를 분해함으로써 과산소 음이온의 작용으로부터 세포를 보호하게 된다. 또한 GPx는 GR과 함께 작용하여 과산화수소를 물과 산소로 분해 시켜서 과산화수소와 환원형 glutathione으로부터 물과 산화형 glutathione을 만들고, GR은 산화형 glutathione을 다시 환원형 glutathione으로 환원시키는 역할을 한다.

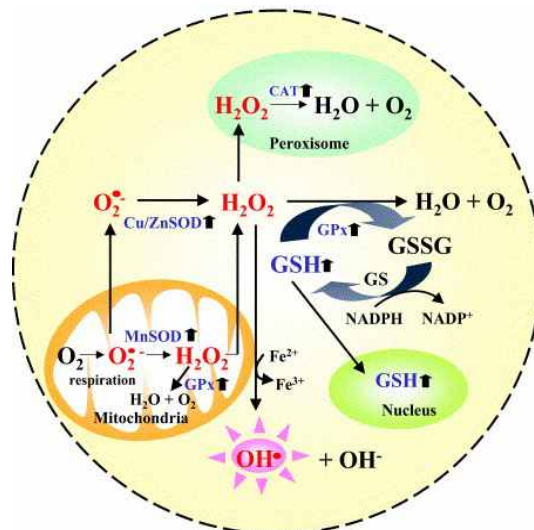


Fig. 83. Enzymatic production and destruction of ROS (Jang JH & Surh YJ, Biochemical Pharmacology, 2003)

2. 연구결과

가. 간 기능 보호 효과 확인을 위한 간세포에서의 손상 유발 물질 및 적정 농도 설정

생체 내에서 생성되는 활성산소(ROS, reactive oxygen species)는 인체의 노화와 질병을 유발하는 주요 원인으로 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있음. 간 기능 보호 효과를 확인하기 위해 간세포에 손상을 유도할 물질로 활성산소 유도물질인 ethanol, H₂O₂, tert-butyl hydroperoxide(tert-BHP)를 검토하였음. HepG2 세포주를 대상으로 3가지 유도 물질의 세포 독성 및 ROS 유발에 대한 예비실험을 통해 3가지 모두 간 손상 유도 물질로 적용 가능함을 확인함. 이 중 Ethanol에 의한 간독성은 실생활에서 간질환과 산화적 스트레스의 원인으로 알려져 있고, 간 기능에 대한 *in vivo* 실험에서도 유도 물질로 적용 가능하여 Ethanol을 선정하여 실험하였음.

Ethanol을 농도별 처리시 간세포의 생존율을 확인함으로써 간 손상을 유발할 수 있는 적정 농도를 확인한 결과 EC₅₀값이 약 1,000 mM (이하 1 M)로 ethanol 1 M을 처리하였을 때 간세포 생존율이 약 50%로 나타났다. 따라서 ethanol 1 M을 간 손상 유발 유효 농도로 설정하였다.

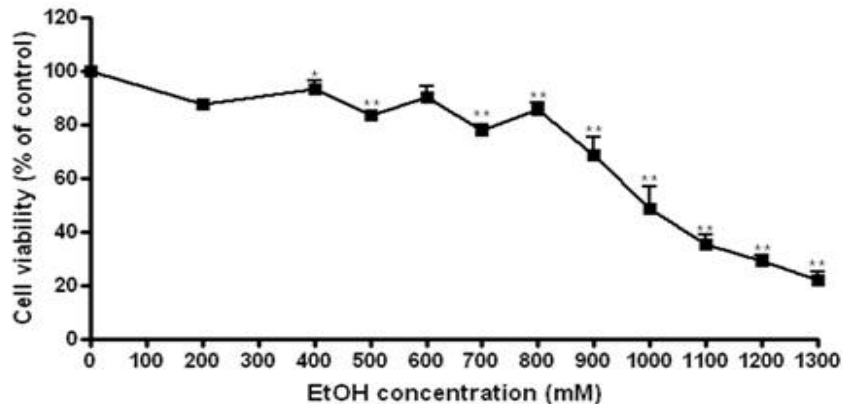


Fig. 84. Ethanol이 HepG2의 세포독성에 미치는 영향

나. 전통발효식초의 처리 농도에 따른 간세포 생존율 확인

전통발효식초의 HepG2에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 WST-1 assay를 실시하였음. 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초를 각각 10, 100, 1000 ng/ml 처리하여 세포독성을 확인한 결과 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초 모두 가장 높은 농도인 1000 ng/ml에서 세포독성이 나타나지 않았다. 이상의 결과를 토대로 추후 실험에서 세포독성이 나타나지 않은 1000 ng/ml 이하의 농도를 처리하여 간 보호 효과 평가를 진행하였다.

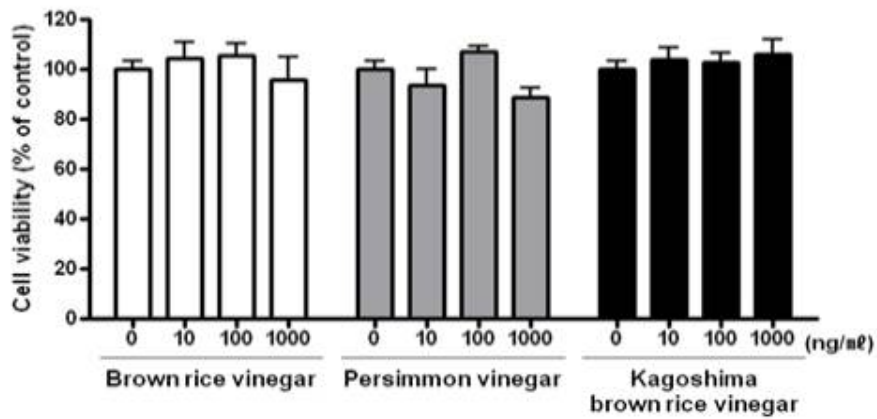


Fig. 85. 전통발효식초가 HepG2의 세포독성에 미치는 영향

다. 전통발효식초의 처리 농도에 따른 항산화 효소의 mRNA 발현 확인

Ethanol에 의해 산화된 HepG2에 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초의 MeOH 추출물을 처리하여 세포 내 항산화 방어시스템인 주요 효소들의 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. HepG2에 전통발효식초를 1, 10, 100 ng/ml의 농도로 각각 3시간 동안 처리한 후 ethanol을 처리하여 24시간 배양하였다. 이때 시료를 처리하지 않은 무처리군을 대조군으로 하였다. 내부 표준 유전자로 18S를 사용하여 각 항산화 유전자 mRNA에 대해 보정한 후 대조군이 1.0배일 때 처리군이 몇 배 증감했는지 나타내었다.

정산군과 비교하여 Ethanol 처리군에서 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GR, CAT의 mRNA 발현이 유의적으로 감소함.

Ethanol을 처리하였을 때 *Mn-SOD* mRNA 발현이 약 15% 정도 유의적으로 감소하는데, 국내산 현미식초를 1 ng/ml을 함께 처리하였을 때 ethanol 처리군과 비교하여 감소한 *Mn-SOD* mRNA 발현율이 약 12% 증가함.

국내산 감식초와 일본산 현미식초는 항산화 효소의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 나타남.

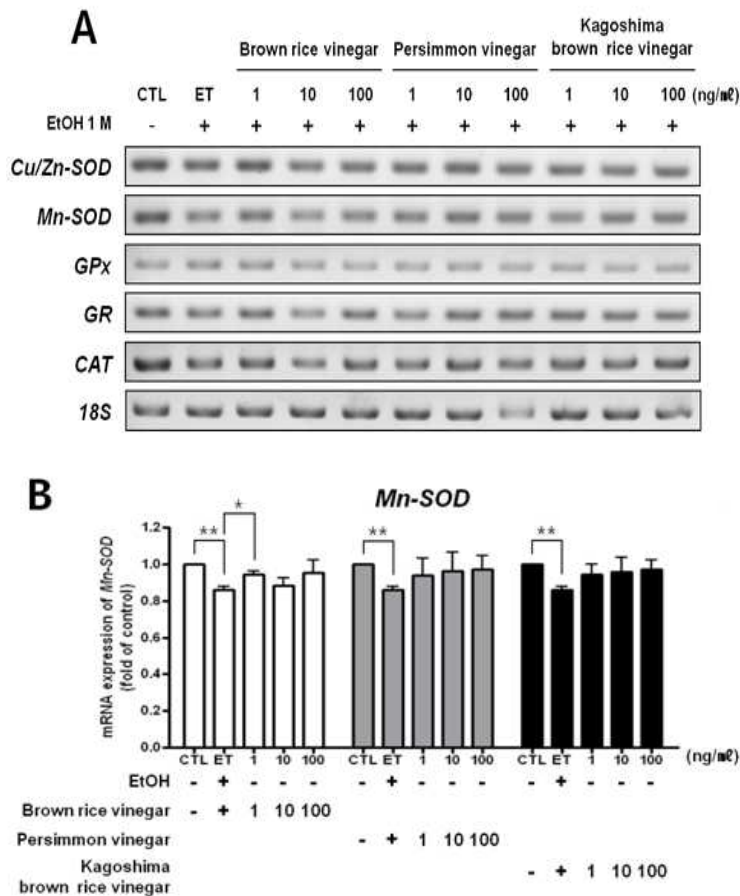


Fig. 86. 전통발효식초의 *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *GPx*, *GR* and *CAT* mRNA 발현 조절

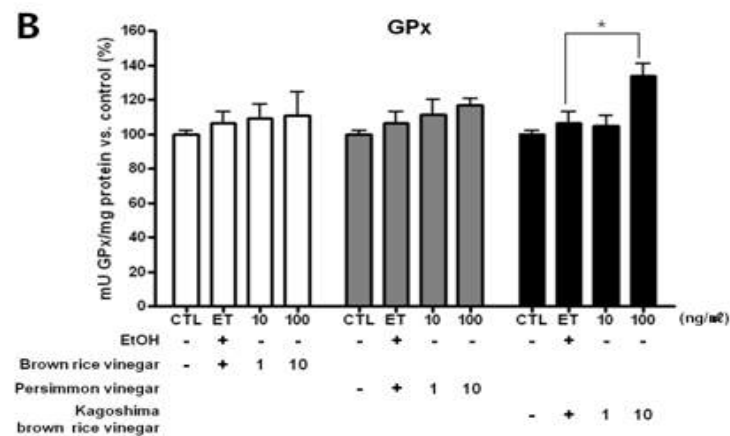
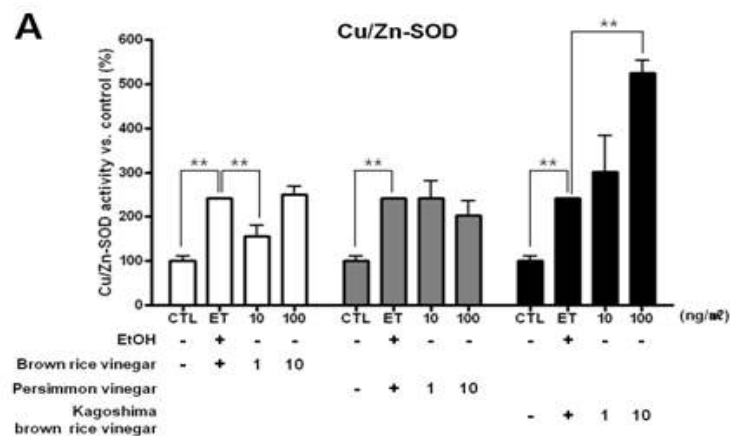
라. 전통발효식초의 처리 농도에 따른 항산화 효소 activity 확인

Ethanol에 의해 산화된 HepG2에 전통발효식초를 각각 10, 100 ng/ml 처리하여 항산화 기능을 가지는 효소 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

국내산 현미식초는 10 ng/ml 함께 처리하였을 때 ethanol 단독 처리군과 비교하여 Cu/Zn-SOD 활성이 약 35% 감소하였다. 일본산 현미식초는 ethanol에 의해 증가한 Cu/Zn-SOD 활성을 10 ng/ml 처리하였을 때 약 24.7%, 100 ng/ml 처리하였을 때 약 217% 증가시켰으며, 국내산 감식초는 Cu/Zn-SOD 활성화에 아무런 영향을 미치지 않았다.

국내산 현미식초와 국내산 감식초는 GPx 활성화에는 변화를 주지 않았다. 반면 일본산 현미식초는 100 ng/ml 처리하였을 때 ethanol 단독 처리군과 비교하여 GPx 활성을 약 25.3% 증가시켰다.

GR 활성을 측정된 결과 국내산 현미식초를 10 ng/ml 처리하였을 때 ethanol 단독처리군에 비해 GR 활성이 약 18.5% 감소하였다. 반면 국내산 감식초와 일본산 현미식초는 각각 10 ng/ml, 100 ng/ml 처리하였을 때, 국내산 감식초군은 26.5%와 91.1% 증가하였으며, 일본산 현미식초군은 45.2%와 177% 증가하여 농도 의존적으로 GR 활성이 증가하는 것이 확인되었다.



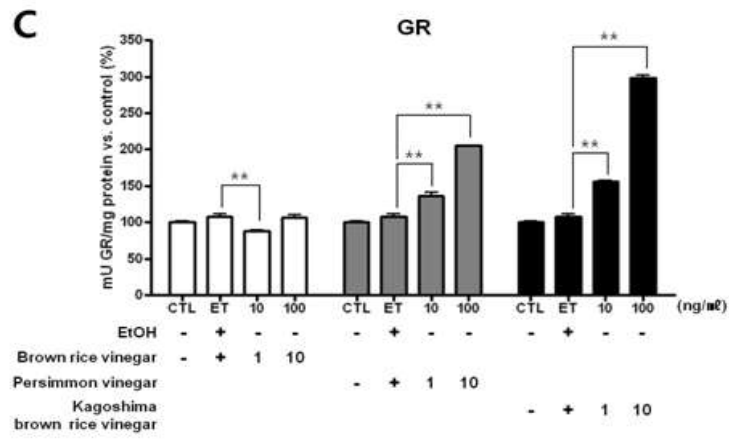


Fig. 87. 전통발효식초의 Cu/Zn-SOD, GPx, GR activity 조절 효과

마. 국내산 감식초 및 국내산 현미식초 분획물의 간보호 효과 평가 (*in vitro*)

국내산 현미식초, 국내산 감식초 분획물의 간 보호 효과를 human hepatic carcinoma 인 HepG2 세포주 모델을 이용하여 확인하였다.

1) 전통발효식초의 처리 농도에 따른 간세포 생존율 확인

전통발효식초의 HepG2에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 WST-1 assay를 실시하였다. 국내산 현미식초 농축액, 현미식초 추출물, 현미식초 침전물, 국내산 감식초 농축액, 감식초 추출물 및 감식초 침전물을 각각 10 ng/ml 처리하여 세포독성을 확인한 결과 모든 실험군에서 세포독성이 나타나지 않았다. 이상의 결과를 토대로 추후 실험에서 세포독성이 나타나지 않은 10 ng/ml 이하의 농도를 처리하여 간 보호 효과 평가를 진행하였다.

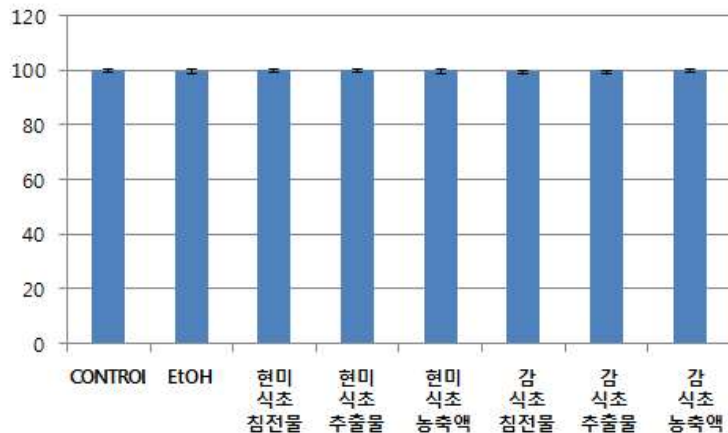


Fig. 88. 전통발효식초가 HepG2의 세포독성에 미치는 영향

2) 전통발효식초의 처리 농도에 따른 항산화 효소 activity 확인

Ethanol에 의해 산화된 HepG2에 전통발효식초를 각각 10 ng/ml 처리하여 Cu/Zn-SOD 효소 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

정상군과 비교하여 Ethanol 단독 처리시, Cu/Zn-SOD 효소의 활성화는 약 35% 정도 유의적으로 감소하여 에탄올이 세포의 항산화 활성을 저하시키는 것으로 나타났으며, 그 후 샘플을 처리하여 각각의 식초 분획물이 항산화 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

국내산 현미식초 분획물 및 국내산 감식초 분획물 모두 10 ng/ml 용량의 함께 처리하였을 때 ethanol 단독 처리군과 비교하여 Cu/Zn-SOD 활성이 약 30-50% 증가함을 관찰하였으며, 현미식초와 감식초 사이의 항산화 활성의 유의적 차이는 보이지 않았으며, 각각의 분획물에서도 마찬가지로의 결과를 얻었다.

이러한 결과를 종합적으로 판단해볼 때 두 가지 전통발효식초 모두 항산화 기능이 있

으며 특히 Cu/Zn-SOD 효소의 활성을 조절함으로써 항산화 기능을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

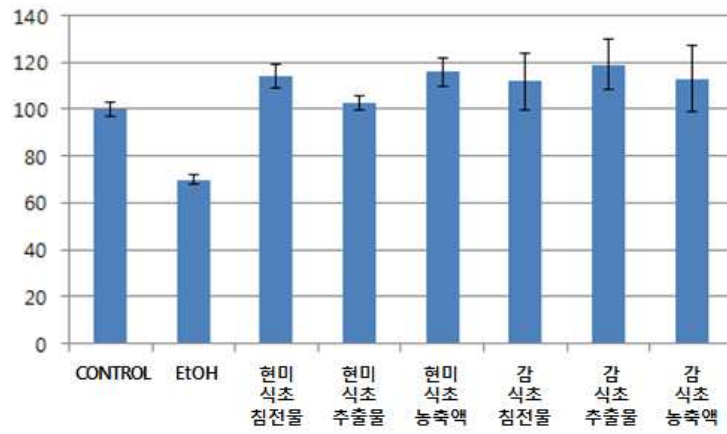


Fig. 89. 전통발효식초의 Cu/Zn-SOD 조절 효과

제 7절. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (*in vivo*)

I. 전통발효식초의 간 보호 효과 평가(*in vivo*)

1. 연구 방법

가. 실험 동물 선정 및 사육

생후 6주령의 수컷 Wistar rats를 5일간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 7주령부터 실험을 진행하였다. 실험동물은 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 적응기간 중 무균음수와 사료 (purina, United states)를 자유롭게 공급하여 적응시킨 후 실험 식이를 공급하였다. 본 연구의 protocol은 이화여자대학교 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No.2013-01-027).

나. 시험물질

경구투여 시료로써 사용된 시험물질은 국내 현미식초(ET_B), 국내 감식초(ET_P), 일본 현미식초(ET_K)로 그 조성은 Table.7.과 같다.

Table 25. Composition of Experimental materials

명칭	제조 물질	총산도 (%)	Acetic acid (%)	TN (%)	AN (%)	총 아미노산 (%)	유리 아미노산 (%)	Total polyphenol (g/L)	crude polysaccharide (%)
국내 현미식초	현미	4.650	1.90	0.150	0.056	0.66	0.280	0.347	16.26
국내 감식초	감	4.260	1.870	0.035	-	-	-	0.438	3.05
일본 현미식초	현미	4.470	2.278	0.134	0.084	-	-	0.523	0.44

다. 실험 디자인

수컷 Wistar rat 50마리를 대상으로 정상 대조군(CON, n=10), 50% 에탄올을 경구투여 하여 간 손상을 유도한 군(ET, n=10), 50% 에탄올 경구투여와 함께 국내산 현미식초를 경구투여한 군(ET_B, n=10), 50% 에탄올 경구투여와 함께 국내산 감식초를 경구투여한 군(ET_P, n=10), 50%

에탄올 경구투여와 함께 일본산 현미식초를 경구투여한 군(ET_K, n=10)으로 나누어 실험을 진행하였다 (Fig. 43.).

5일의 적응 기간 후, 16일 동안 일정한 시간에 50% 에탄올과 각 시험물질을 1일 1회, 강제 경구 투여하였다. 간 손상에 대한 각 시험물질의 보호 효과를 보기 위하여, 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초를 먼저 경구투여하고, 2시간 후 50% 에탄올을 경구투여 하였다.

실험 12일 째, 알코올성 간 손상 여부를 확인하기 위해 경정맥 채혈을 진행하여 얻은 혈액을 분석하여 간 손상 유도를 확인한 후, 실험 16일 째 마지막 경구투여 후 12시간 절식 후에 희생하여 조직과 혈액을 채취하였다.

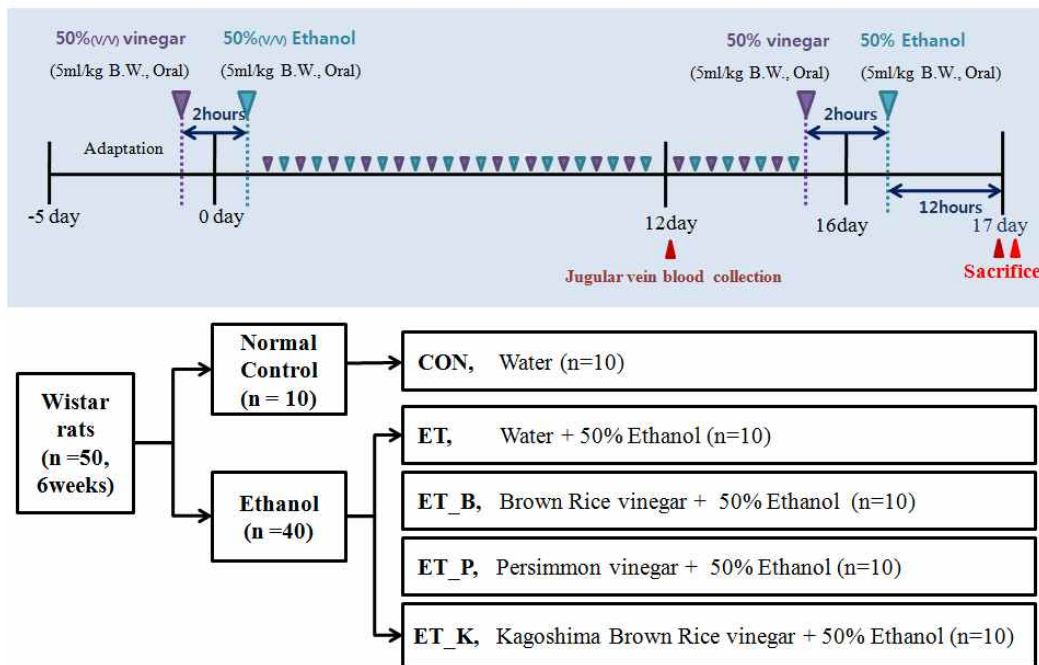


Fig. 90. Experimental Design

2. 분석 지표

알코올 스트레스에 대한 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초의 간 보호효과와 기전을 다음과 같은 분석지표를 통하여 확인하였다.

Table 26. 일반지표 및 생화학 분석 바이오마커 측정 항목

지표	측정 항목	
일반지표	식이섭취량, 체중 변화량 장기 및 조직 무게: 신장, 간, 부고환지방, 신장지방	
생화학적 바이오 마커	간 손상지표	AST, ALT
	염증대사	TNF- α , IL-6, NO
	지질대사	Total lipid, TC, TG
	알코올대사	ADH, ALDH, Catalase
	항산화	SOD, CAT, Total GSH, GSH-px, MDA
조직 병리학적 분석	H&E staining	

가. 일반지표 측정 방법

- ① 체중은 주 3회 일정한 시각에 측정하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 공복 상태에서 측정하였다.
- ② 사육이 끝난 실험동물은 12시간 이상 절식시킨 후, CO₂ gas와 Ether를 이용하여 마취 후, 개복하여 심장에서 채혈함으로써 심정지를 유도하여 희생하였다.
- ③ 희생 후, 혈액을 채취하고 간, 신장, 부고환지방, 신장지방을 적출하여 무게를 측정하였다.
- ④ 적출한 조직은 액체 질소로 급속 동결 시켜 -80°C deep freezer에 보관해 분석 시료로 사용하였다.
- ⑤ 간 조직의 일부는 포르말린 10%용액에 고정 후, H&E staining을 실시하였다.

나. 생화학 바이오마커 실험 방법

1) 혈액 및 장기 채취

실험동물을 12시간 이상 절식시킨 후, CO₂ gas와 에테르로 보정하여 호흡 마취하였다. 혈액은 심장에서 채혈하여 EDTA가 처리된 plasma tube와 별도의 처리가 없는 serum tube에 넣어 4°C, 3,000rpm, 10분 동안 원심 분리한 후 -80°C deep freezer에 보관하여 분석에 이용하였다. 실험 동물의 간, 신장, 지방조직 (부고환, 신장 주변)은 적출하여 식염수로 세척 후 수분을 제거하여 무게를 측정한 다음, 액체질소로 급속 동결하여 분석까지 -80°C에서 보관하였다. 적출한 간 조직 일부를 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 간 조직병리학적 분석용 샘플로 보관하였다.

2) 간 손상 지표

가) 혈청 Aspartate aminotransferase (ALT) 및 Alanine aminotransferase (AST) 활성도

혈청 ALT 및 AST 활성도는 Reitman-Frankel method¹⁾를 바탕으로 상업용 kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용해 측정하였다. ALT는 L-alanine과 ketoglutarate를 pyruvate와 glutamate로 바꾸고 pyruvate는 2,4 dinitrophenyl hydrazine과 반응하여 갈색을 띠는 hydrazine을 생성한다. 이러한 원리로 흡광도를 측정하여 ALT의 활성 수준을 비교하였다.

AST 활성도는 L-aspartate와 ketoglutarate를 oxaloacetate와 glutamate으로 변환시킨다. Oxaloacetate는 2,4 dinitrophenyl hydrazine과 반응하여 갈색을 띠는 알칼리성의 hydrazine을 생성한다. 이때 흡광도를 측정하여 AST의 활성 수준을 확인하였다.

ALT와 AST의 활성 수준은 505nm에서 microplate reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek@Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다.

3) 염증 대사 지표

가) 간 조직에서의 tumor necrosis factor α (TNF- α) 수준

간 조직에서의 TNF- α 수준은 DuoSet ELISA Development kit (Rat TNF- α DuoSet, R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다. Capture antibody와 TNF- α 의 항원항체 반응 후 biotin labeled detection antibody를 항원에 반응시켰다. 이때 streptavidin-HRP와 반응시켜 발색시키고 이때의 흡광도를 측정하여 TNF- α 수준을 측정하였다. 450nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek@Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다. 단백질의 양은 Bradford method²⁾로 정량하여 수치를 보정하였다.

나) 간 조직에서의 interleukin-6 (IL-6) 수준

간 조직에서의 IL-6 수준은 DuoSet ELISA Development kit (Rat IL-6 DuoSet, R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다. Capture antibody와 IL-6 항원항체 반응 후 biotinlabeled detection antibody를 항원에 반응시켰다. 이때 streptavidin-HRP와 반응시켜 발색시키고 이때 흡광도를 측정하여 IL-6 수준을 확인하였다. 450nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek@Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다. 단백질의 양은 Bradford method²⁾로 정량하였다.

다) Serum에서의 interleukin-6 (IL-6) 수준

혈청(Serum)에서의 IL-6 수준은 DuoSet ELISA Development kit (Rat IL-6 DuoSet,

R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다. Capture antibody와 IL-6 항원항체 반응 후 biotin labeled detection antibody를 항원에 반응시켰다. 이 때 streptavidin-HRP와 반응시켜 발색시키고 이때 흡광도를 측정하여 IL-6 수준을 확인하였다. 450nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다.

라) Serum에서의 Nitric Oxide (NO) 수준

혈청(Serum)에서의 NO 수준은 Griess Reagent kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. Sulfanilic acid는 nitrite에 의해 diazonium salt로 변하는 원리를 이용하였다. 이는 Diazonium salt와 N-(1-naphthyl)ethylenediamine이 반응하여 azo dye를 형성하고, 흡광도를 548nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다.

4) 지질 대사 지표

가) 간 조직의 total lipid 추출

간 조직의 total lipid는 간 조직을 유기용매 (chloroform)를 이용하여 지질을 녹여낸 후, 유기물을 water bath 및 dry oven에서 증발시켜 남은 지질의 무게로 계산한다. 남은 지질을 ethanol에 triton X-100가 5%가 되도록 하여 간 내 TG와 cholesterol 농도를 측정하는 시료로 사용하였다.

나) 간 조직 triglyceride (TG) 수준

간 조직 내 TG 수준을 상업용 kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈청 중 TG는 lipoprotein lipase (LPL) 효소 반응으로 지방산과 glycerol로 가수분해된다. 생성된 glycerol은 ATP의 존재 하에 glycerolkinase (GK)의 작용에 의해 glycerol-3-phosphate가 되고, 또한 glycerol 3-phosphate oxidase (GPO)에 의해 H₂O₂를 발생한다. H₂O₂는 peroxidase 존재 하에서 키논을 생성한다. 이 때 TG 수준을 550nm에서 spectrophotometer (T60U Spectrophotometer, PG Instruments Ltd., UK)를 사용하여 분석하였다.

다) 간 조직 Cholesterol 수준

간 조직 Cholesterol 수준을 상업용 kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 간 조직 내 유리형 및 ester형으로 존재하는 cholesterol이 있는데, ester형에 cholesterol ester hydrolase 효소를 반응시켜 유리형과 지방산으로 분해하고, 유리형에 cholesterol 산화 효소를 반응시키면 H₂O₂와 4-cholesterol이 생성된다. 생성된 H₂O₂에 과산화 효소와 4-아미노산티피린 및 phenol을 동시에 반응시키면 산화적 축합 반응으로 키논이 생성된다. 이 때 Cholesterol 수준을 500nm에서 spectrophotometer (T60U Spectrophotometer, PG Instruments Ltd., UK)를 사용하여 분석하였다.

5) 알코올 대사 지표

가) 간 조직 분획법

간 0.5g을 5ml의 5mM EDTA와 1.15% KCl-10mM phosphate buffer (pH 7.4)로 균질화하여 700g, 10분 간 원심분리한 후, 그 상층액을 17,000rpm, 20분간 원심분리하였다. Pellet은 buffer 5ml에 suspension시켜 peroxisome 분획으로 분리시켰다. 상층액은 다시 34,000rpm, 60분 간 원심분리하여 상층액은 cytosol로, pellet은 buffer 0.5ml에 suspension시켜 microsome 분획으로 분리하였다. 앞서 17,000rpm, 20분간 원심분리한 pellet은 buffer 5ml에 suspension하여 10,000rpm, 15분 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet은 다시 buffer 0.5ml에 suspension하여 mitochondria 분획을 분리하였다. Peroxisome, cytosol, microsome, mitochondria 분획의 단백질의 양은 Bradford method²⁾로 정량하여 각 분석실험마다 보정하였다.

나) 간 조직에서의 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성도

간 조직 ADH 활성은 Bonnichsen과 Brink의 method³⁾를 바탕으로 cytosol에서 측정하였다. ADH는 알코올을 아세트알데히드로 변환하는 과정에서 NAD^+ 를 NADH로 환원시킨다. 상온에서 50mM glycine (pH 9.6), 0.8mM NAD, 3mM 에탄올을 첨가한 다음, 시료 50ul를 가하여 이때 생성되는 NADH가 생성되는 비율을 측정하여 ADH의 활성도를 측정하였다. ADH의 활성 수준은 340nm에서 spectrophotometer (T60U Spectrophotometer, PG Instruments Ltd., UK)를 사용하여 측정하였으며 활성 단위는 분당 NADH 1 micro mole의 형성을 촉매하는 효소의 양으로 나타내었다.

다) 간 조직에서의 catalase(CAT) 활성도

간 조직의 catalase 활성은 Johansson LH의 method⁴⁾를 바탕으로 peroxisome 분획에서 측정하였다. Catalase는 알코올을 아세트알데히드로 변환하는 과정에서 H_2O_2 를 H_2O 및 O_2 로 분해시킨다. Catalase를 chromagen인 purpald와 반응시켜 발색 시키고 그 흡광도를 측정하여 catalase의 활성도를 확인하였다. Catalase의 활성 수준은 550nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 분석하였다.

라) 간 조직에서의 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성도

간 조직 ALDH 활성은 Koivula와 Koivusalo의 method⁵⁾를 바탕으로 mitochondria에서 측정하였다. 아세트알데히드를 아세테이트로 변환하는 과정에서 NAD^+ 를 NADH로 환원시킨다. 상온에서 100mM pyrophosphate (pH 8.0), 1mM NAD, 2mM pyrazole, 15mM acetaldehyde를 첨가한 다음, 시료 50ul를 가하여 반응을 시작시켰다. ALDH의 활성 수준은 340nm에서 microplate reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 측정하였으며 활성 단위는 분당 NADH 1 mic

romole의 형성을 촉매하는 효소의 양으로 나타내었다.

6) 항산화 지표

가) 간 조직 Superoxide Dismutase (SOD) 활성 수준

Superoxide dismutase의 활성은 Flohe등의 method⁶⁾를 바탕으로 측정하였다. 이 방법은 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하여 이 superoxide가 Cytochrome C(Fe^{+++})를 ferrous cytochrome C(Fe^{++})로 환원시킬 때 SOD가 존재하면 SOD가 superoxide에 경쟁적으로 작용하여 Cytochrome C의 환원속도를 감소시키는 원리를 이용한 것이다. 간의 SOD 활성은 Cytosol 750ul에 부피비 5:3의 chloroform과 Ethanol 용액을 300ul 가하여 2분간 강렬히 vortex한 후, 20,000xg, 4°C, 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 SOD 효소원으로 사용하였다. 간의 SOD 활성은 0.1mM EDTA를 함유한 50mM phosphate buffer(pH7.8)에 xanthine과 cytochrome C를 넣고 잘 혼합한 후, 25°C로 유지한 용액 2ml에 효소 시료 50ul를 가하고, 사용 직전에 제조한 xanthine oxidase 용액을 50ul 첨가하여 Ferric cytochrome C의 환원이 방해되는 정도를 550nm에서 spectrophotometer (T60U Spectrophotometer, PG Instruments Ltd., UK)를 사용하여 30초 간격으로 4분간 측정하였다. SOD standard로부터 얻은 표준곡선으로부터 SOD 활성을 계산하였다.

나) 간 조직 Total Glutathione (GSH) 수준

간 조직 Total Glutathione 수준은 Akerboom, Sies의 method⁸⁾를 바탕으로 측정하였다. 간 조직을 5% Sulfosalic acid에 0.1g/ml로 균질화하여 10,000 xg, 4°C, 10분 동안 원심분리(Micro 17R, Hanil, Korea)하여 그 상층액을 분석 시료로써 사용하였다. 상층액 10ul에 working mixture(95mM potassium phosphate buffer를 기본으로 하여 각 0.95mM EDTA, 0.031mg/ml DTNB, 0.115units/ml glutathione reductase를 포함하도록 제조) 150ul 가하고 5분동안 실온에서 incubation하였다. 그 다음 즉시, NADPH solution(95mM potassium phosphate buffer를 기본으로 48uM NADPH solution 제조)을 50ul 첨가하여, 반응을 시작시켜 5분 동안의 412nm에서의 흡광도 변화량을 microplate reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 측정하였다.

다) 간 조직 Glutathione peroxidase (GSH-px) 수준

간 조직 GSH-px 활성은 Mohadas 의 Method⁹⁾를 바탕으로 약간 변형하여 cytosol에서 측정하였다. Cytosol 시료 20ul에 reaction mixture(100mM potassium phosphate buffer, pH 7.0을 기본으로 1mM EDTA, 1mM NaN_3 , 2mM NADPH, 1unit/ml glutathione reductase, and 1mM GSH을 포함하도록 제조) 160ul를 첨가하고, 5분 동안 37°C에서 incubation한 후 2.5mM H_2O_2 를 가하여 반응을 시작시켜 340nm에서 5분간 340nm에서의 흡광도 변화량을 microplate reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 측정하였다.

라) 적혈구 Superoxide Dismutase(SOD) 활성 수준

적혈구의 Superoxide dismutase의 활성은 Flohe등의 method⁶⁾를 바탕으로 측정하였다. 이 방법은 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하여 이 superoxide가 Cytochrome C(Fe⁺⁺⁺)를 ferrous cytochrome C(Fe⁺⁺)로 환원시킬 때 SOD가 존재하면 SOD가 superoxide에 경쟁적으로 작용하여 Cytochrome C의 환원속도를 감소시키는 원리를 이용한 것이다. 적혈구의 경우, 적혈구 현탁액 100ul를 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH7.4)로 0.9ml로 용혈시킨 후, 이 hemolysate에 부피비 5:3의 chloroform과 Ethanol 용액을 400ul 가하고 2분간 강렬히 vortex하여 hemoglobin을 침전시켰다. 여기에 140ul의 증류수를 가하고 원심분리기로 20,000xg, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 SOD 활성을 측정하기 위한 효소원으로 이용하였다. 0.1mM EDTA를 함유한 50mM phosphate buffer(pH7.8)에 xanthine과 cytochrome C를 넣고 잘 혼합한 후, 25°C로 유지한 용액 2ml에 효소 시료 50ul를 가하고, 사용 직전에 제조한 xanthine oxidase 용액을 50ul 첨가하여 Ferric cytochrome C의 환원이 방해되는 정도를 550nm에서 spectrophotometer (T60U Spectrophotometer, PG Instruments Ltd., UK)를 사용하여 30초 간격으로 4분간 측정하였다. SOD standard로부터 얻은 표준곡선으로부터 SOD 활성을 계산하였다.

마) 적혈구 Catalase (CAT) 수준

적혈구의 catalase 활성은 Johansson LH의 method⁴⁾를 바탕으로 측정하였다. 적혈구의 경우 그 현탁액을 10배의 10mM Tris -1mM EDTA buffer(pH7.4)로 용혈시킨 적혈구 현탁액을 1500배 희석하여 catalase 측정 효소원으로 사용하였다. polystyrene tube에 NaOH로 pH 7.0을 맞춘 KH₂PO₄ buffer를 300ul, 100% methanol 300ul, 0.27% H₂O₂ 60ul을 넣은 후, 효소원 600ul를 첨가하여 20°C water bath에서 20분간 shaking 시키면서 반응을 일으킨다. 여기에 7.8M KOH 300ul을 가하여 반응을 종결시킨다. 여기에 34.2mM Purpald 용액 600ul를 가하여 20°C water bath에서 10분간 shaking 시킨 후, 65.2mM potassium periodate를 300ul 가하여 발색하여, Catalase의 활성 수준은 550nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였고, 0~60nmol의 formaldehyde 표준용액을 사용하여 얻은 표준곡선을 사용하여 활성을 계산하였다.

바) 간 조직 malondialdehyde(MDA) 수준

간 조직의 MDA 함량은 Buckingham의 method⁹⁾를 이용하였다. 간 1g에 0.1M phosphate buffer (pH7.4) 3ml를 가하여 균질화 한 후, 1.5ml 씩 duplicate로 취하여 33mM FeSO₄용액 50ul, 0.33mM butylated hydroxytoluene(BHT) 50ul, 33mM L-ascorbic acid 용액 50ul를 가하여 잘 섞은 후 37°C에서 30분간 incubation 시킨다. 여기에 10% Trichloroacetic acid (TCA)용액 1.5ml 가하고, 12,000 xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 2ml를 취하여 1% thiobarbituric acid (TBA) reagent 0.5ml를 가하여 10분간 끓인 후, 실온에서 냉각시켜 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 532nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments,

Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

사) Plasma malondialdehyde (MDA) 수준

Plasma malondialdehyde(MDA)수준은 Bachmann의 method¹⁰⁾를 이용하였다. 가열, 산성조건 하에서 MDA는 Thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 붉은 발색물을 형성하는 원리로 측정하였다. MDA 측정의 Standard로써 Tetra-methoxypropane을 사용하였다. plasma 200ul에 200mM phosphoric acid 200ul와 5mM Butylated hydroxytoluene(BHT) 25ul을 첨가한다. 그리고 0.1N NaOH 용액에 녹인 110mM TBA용액 25ul을 첨가하여 잘 섞은 후, 90°C에서 45분간 incubation 한다. 그리고 20분간 실온에서 식힌 다음, 500ul의 n-butanol을 첨가하고 포화 NaCl 용액 50ul을 첨가하여 30초간 vortex한 후, 12,000rpm, 15분 조건에서 원심분리하여 얻은 상층액을 532, 572nm에서 ELISA reader (Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 532, 572nm의 흡광도차를 이용하여 MDA 생성량을 측정하였다.

7) 조직병리학적 분석

가) Hematoxylin and eosin (H&E) staining

간 조직을 10% phosphate-buffered formalin에 넣어 고정시킨 것을 흐르는 물에서 과잉의 고정액을 제거한 후, ethyl alcohol을 이용하여 조직 속의 수분을 제거하였다. Xylene을 이용하여 조직 내의 alcohol을 제거하였다. Paraffin 처리를 하여 조직공간을 채워 5um으로 박절하여 슬라이드에 부착하였다. Hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 200x에서 조직 상태를 관찰하였다.

다. 통계 분석

모든 실험결과는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준 오차 (S.E.)를 산출하였다. 실험군 간 차이는 One-way ANOVA로 검증하였고, 유의성이 있는 경우 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 사용함. 모든 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 연구결과

가. 체중

실험 12일째, 정상대조군(CON)에 비하여 에탄올 대조군(ET)의 체중이 유의적으로 감소하였다($p=0.0092$). 실험 16일째, 최종 체중 측정 시에는 모든 군간의 통계적으로 유의적인 차이는 없었으나, 정상 대조군에 비하여 에탄올 대조군의 체중이 감소하는 경향을 보였다($p=0.2957$).

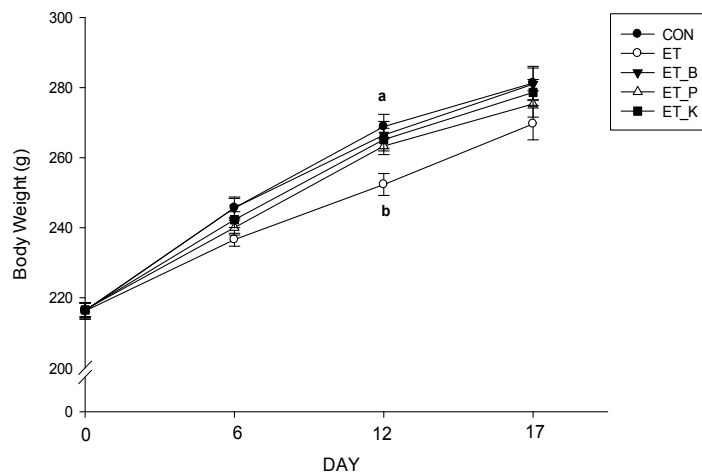


Fig. 91. Body weight change in wistar rats gavaged vinegars and 50% Ethanol during experimental period. Body weight change during 17days. CON(control, $n=10$), ET(Ethanol induced, $n=10$), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, $n=10$), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, $n=10$) All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나. 식이 섭취량

실험 기간 동안 일주일에 3 번 실험동물의 식이 섭취량을 측정한 결과, 실험 12일째, 정상 대조군에 비하여 에탄올 대조군과, 식초 섭취군 모두 식이 섭취량이 유의적으로 감소하였다 ($p=0.0007$).

실험 16일째, 식이 섭취량은 정상 대조군에 비하여 에탄올 대조군과 국내산 현미식초(ET_B)군은 유의적으로 감소하였다. 에탄올 대조군(ET)에 비하여 국내산 감식초(ET_P)군과 일본산 현미식초(ET_K)군은 증가하는 경향을 보였다 ($p=0.0591$).

다. 장기 및 조직 무게

1) 간 및 신장 중량

간과 신장의 무게는 모든 군 간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

2) 신장 주변 지방 및 부고환 지방 중량

신장주변 지방은 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군에서 유의적으로 감소하였다 ($p=0.0466$). 에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초군에서 유의적으로 증가하였으며, 국내산 감식초와 일본산 현미식초군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

부고환 지방은 모든 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

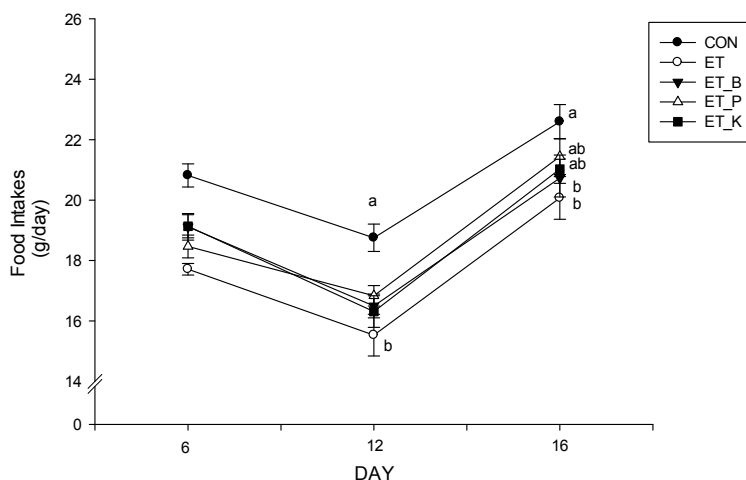


Fig. 92. Food intakes change in wistar rats gavaged vinegars and 50% Ethanol during experimental period. Food intakes during 17days. CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10)All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

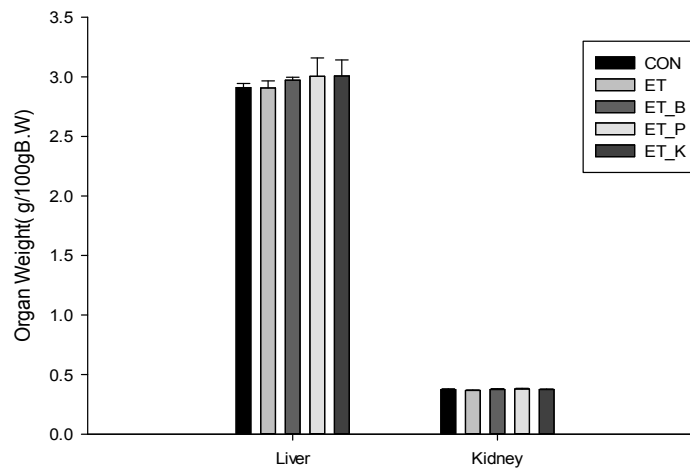


Fig. 93. The effects of vinegar treatments on the liver, kidney weight in non Ethanol induced and Ethanol-induced rats. CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

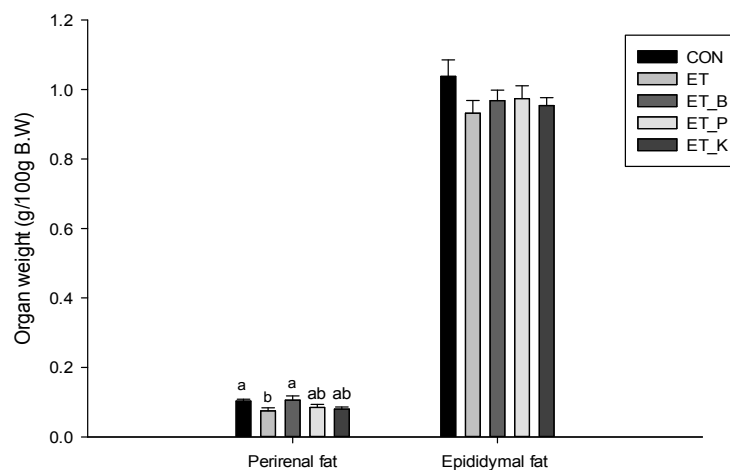


Fig. 94. The effects of vinegar treatments on the perirenal fat, Epididymal fat weight in non Ethanol induced and Ethanol-induced rats. CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

라. 생화학적 분석 지표

1) 간손상 지표

가) Serum Alanine aminotransferase (ALT) 수준

실험 기간 중, 알코올 스트레스로 인한 간 손상 유도를 확인하고자 실험 12일째, 경정맥 채혈로 얻은 혈액(실험 12일째)에서 알코올 스트레스로 유도한 간 손상을 확인할 수 있는 Serum ALT 수준을 분석한 결과, 정상대조군(CON)과 비교해 에탄올대조군(ET)에서 ALT수준이 유의적으로 높았으나, ET_B, ET_P, ET_K군에서는 에탄올대조군(ET)과 비교해 ALT수준이 감소하였다. 특히, ET_P, ET_K군에서의 수준 감소가 통계적으로 유의적인 차이를 보였다 ($p=0.0239$).

실험 17일 째 동물을 희생하여 얻은 Serum의 ALT수준을 분석한 결과, 정상대조군(CON)과 비교해 에탄올 대조군(ET)이 그 수준이 높은 경향을 보였다.

또한, ET_B, ET_P, ET_K군에서는 에탄올 대조군(ET)에 비해 그 수준이 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

나) Serum Aspartate aminotransferase(AST) 수준

실험 기간 중, 알코올 스트레스로 인한 간 손상 유도를 확인하고자 실험 12일째, 경정맥 채혈로 얻은 혈액(실험 12일째)에서 Serum AST수준을 분석한 결과, 에탄올 대조군은 정상 대조군에 비해 AST수준이 증가하는 경향을 보였으나, ET_B, ET_P, ET_K군에서는 에탄올 대조군에 비하여 AST 수준이 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 모든 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다 ($p=0.4606$).

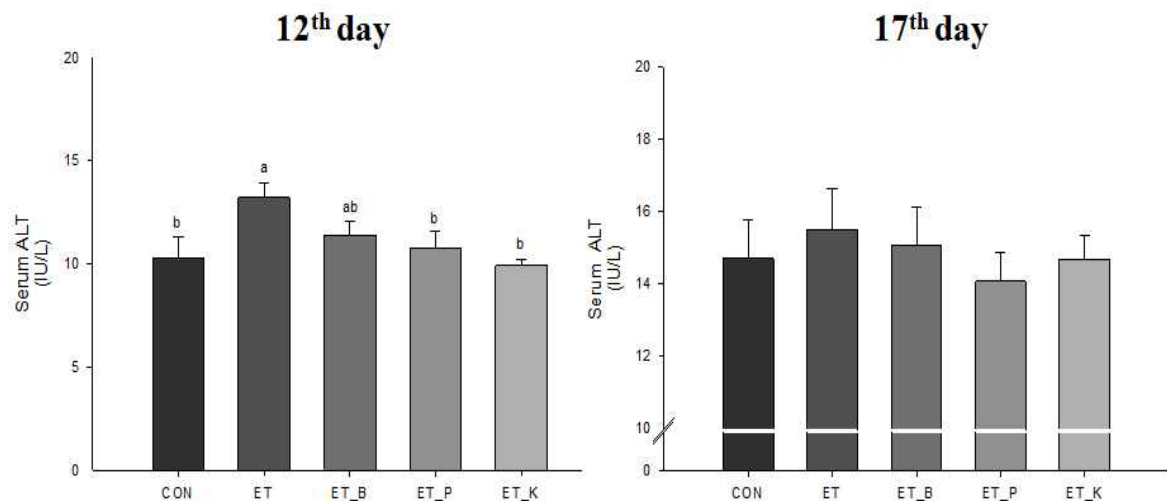


Fig. 95. Effects of vinegars administration on serum ALT activity in wistar rats gavaged 50% Ethanol. ALT, Alanine aminotransferase; CON(control, n=10),

ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

실험 17일 째, 실험동물을 희생하여 얻은 Serum의 AST수준을 분석한 결과, 에탄올 대조군에서 정상대조군(CON)과 비교해 AST 수준이 높은 경향을 보였으나, 에탄올 대조군(ET)과 비교해 ET_B, ET_P, ET_K군에서는 AST 수준이 감소하는 경향을 보였다. 그러나 모든 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다 ($p=0.2223$).

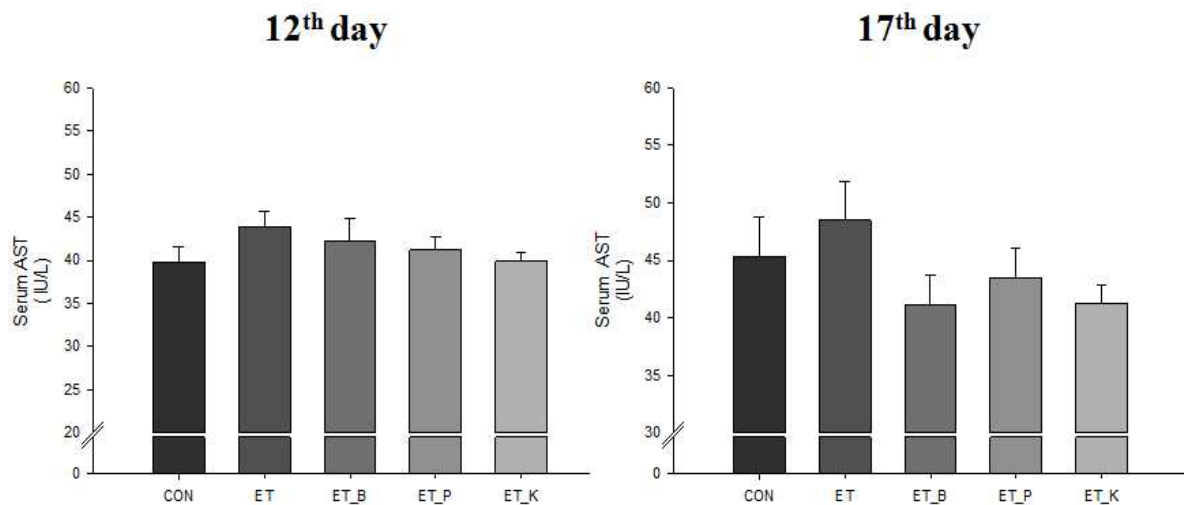


Fig. 96. Effects of vinegars administration on serum ALT activity in wistar rats gavaged 50% Ethanol. AST, Aspartate aminotransferase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

2) 염증 대사

가) Serum Interleukin-6 (IL-6) 수준

실험 기간 중, 알코올 스트레스로 인한 간 손상 유도를 확인하고자 실험 12일째, 경정

맥 채혈로 얻은 Serum에서 염증성 cytokine인 Interleukin-6(IL-6)를 분석한 결과, 정상 대조군에 비하여 에탄올 대조군에서 IL-6 수준이 유의적으로 증가하였다 (p=0.0454, T-test).

반면, 에탄올 대조군과 비교하여 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초군은 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다.

실험 17일 째, 동물을 희생하여 얻은 Serum의 IL-6수준을 분석한 결과, 정상대조군 (CON)과 에탄올 대조군(ET)의 IL-6 수준이 차이가 없었다. 반면, 에탄올 대조군(ET)과 비교해 ET_B, ET_P, ET_K군에서는 오히려 IL-6 수준이 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다 (p=0.7771).

나) 간 조직 Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) 수준

간 조직에서 염증성 cytokine인 Tumore Necrosis Factor alpha (TNF-α) 수준은 정상 대조군에 비해 에탄올 대조군(ET)이 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군(ET)에 비해 ET_B, ET_P 및 ET_K군에서 증가하는 경향을 보였다 (p=0.0542)

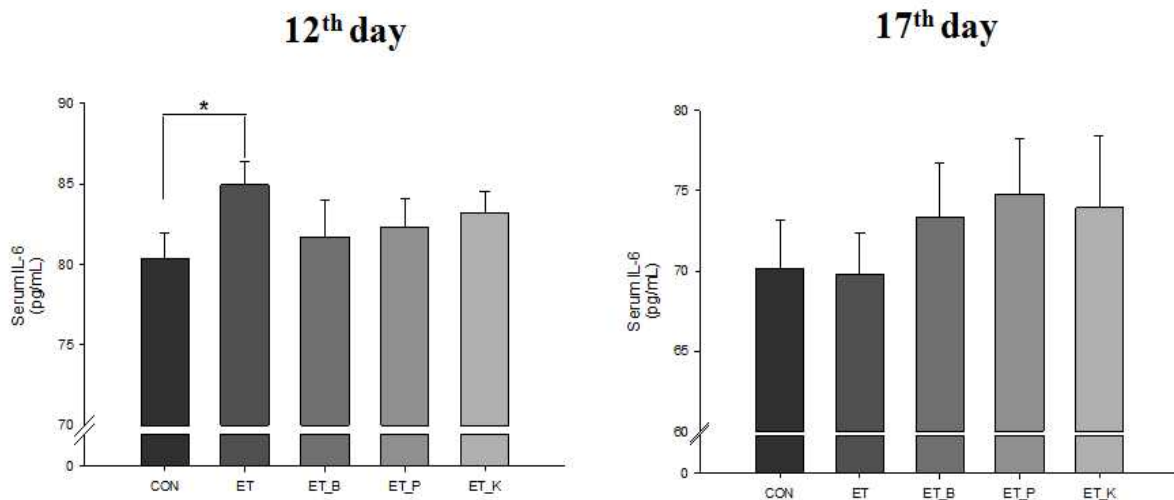


Fig. 97. Effects of vinegars administration on serum IL-6 levels in wistar rats gavaged 50% Ethanol. IL-6, Interleukin 6; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean ± SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. *Differences between groups were evaluated using student T-test (p<0.05)

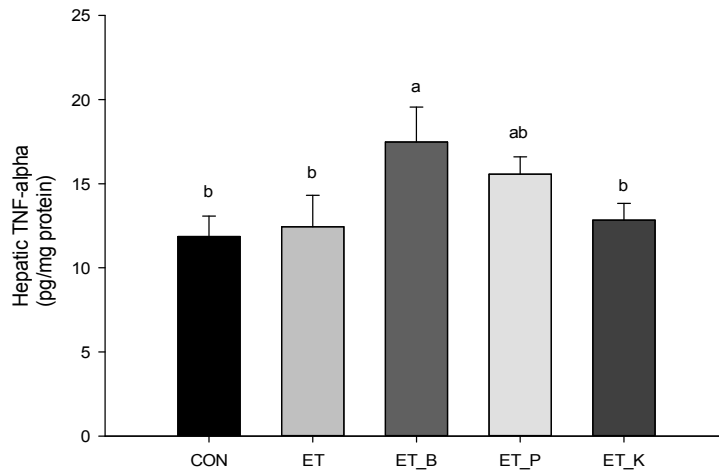


Fig. 98. Effects of vinegars administration on Hepatic Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. TNF- α , Tumor Necrosis Factor -alpha; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

다) 간 조직 Interleukin-6 (IL-6)

간 조직에서 염증성 cytokine인 Interleukin 6(IL-6) 수준은 정상대조군에 비해 에탄올 대조군에서 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군(ET)에 비해 ET_B, ET_P군에서 증가하는 경향을 보였으나, 에탄올 대조군과 ET_K군은 비슷한 수준을 보였다 ($p=0.139$).

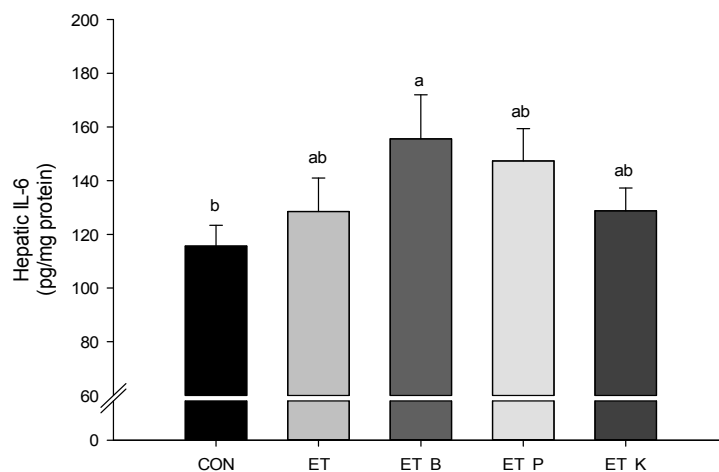


Fig. 99. Effects of vinegars administration on Hepatic Interleukin 6 (IL-6) in

wistar rats gavaged 50% Ethanol. IL-6, Interleukin 6; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

라) Serum Nitric Oxide (NO) 수준

Serum에서 Nitric Oxide(NO) 수준을 분석한 결과, 정상대조군(CON)에 비하여 에탄올 대조군 (ET)의 수치가 증가하는 경향을 보였으며, ET_B, ET_P, ET_K군에서 에탄올 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.3368$).

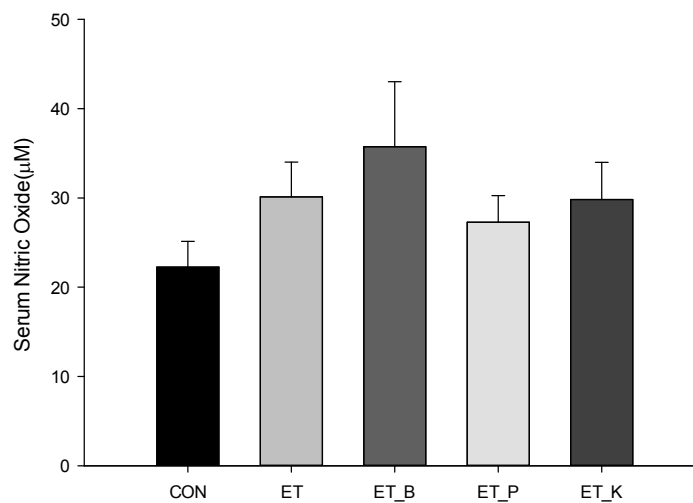


Fig. 100. Effects of vinegars administration on serum NO levels in wistar rats gavaged 50% Ethanol. NO, Nitric Oxide; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

3) 지질 대사

가) 간 조직 Total Lipids

알코올 스트레스로 인한 간 조직 내 lipid 대사와 관련하여 간 조직 내 함유된 Lipid를 분석한 결과, 간 내 Total lipid를 분석한 결과, 정상대조군과 에탄올대조군(ET) 간의 유의적인 차이는 없었으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B, ET_P 및 ET_K 군 간 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.9568$).

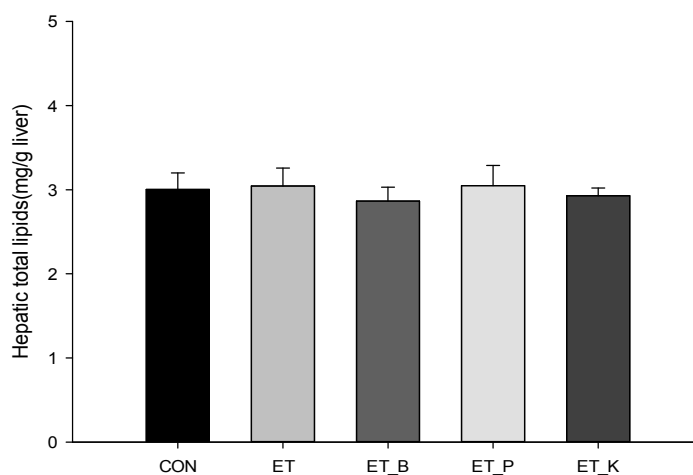


Fig. 101. Effects of vinegars administration on Hepatic Total lipids in wistar rats gavaged 50% Ethanol. CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) 간 조직 Cholesterol 수준

알코올 스트레스로 인한 간 조직 내 lipid 대사와 관련하여 간 조직 내 총 콜레스테롤 함량을 분석한 결과, 정상대조군과 에탄올대조군(ET) 간의 유의적인 차이는 없었으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B, ET_P, ET_K 군 간 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.8417$).

다) 간 조직 Triglyceride (TG) 수준

알코올 스트레스로 인한 간 조직 내 lipid 대사와 관련하여 간 조직 내 중성지방 (Triglyceride) 수준을 분석한 결과, 정상대조군에 비교하여 에탄올대조군(ET)에서 감소

하는 경향을 보였으며, 에탄올대조군(ET)에 비하여 ET_B군에서 감소하는 경향을 보였으나 모든 군간 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.8823$).

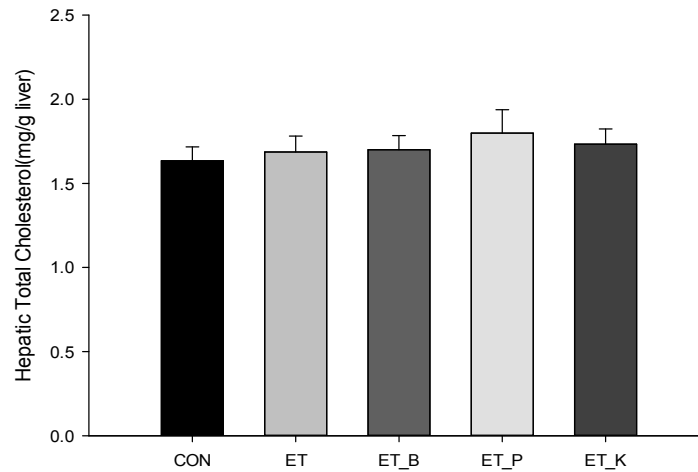


Fig. 102. Effects of vinegars administration on Hepatic Total Cholesterol (TC) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. TC, Total Cholesterol; CON(control, $n=10$), ET(Ethanol induced, $n=10$), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, $n=10$), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, $n=10$). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

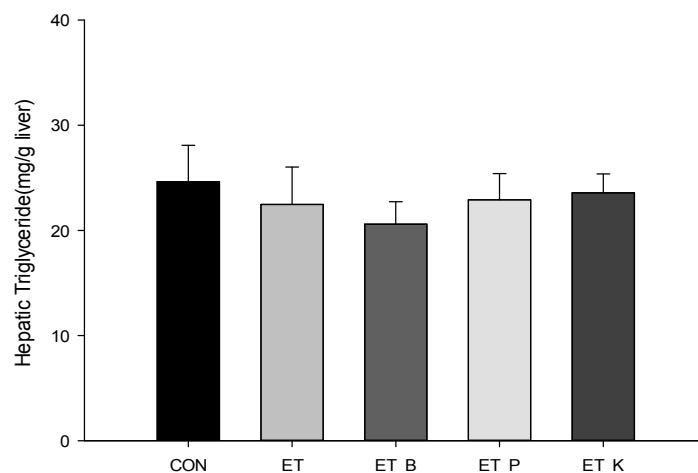


Fig. 103. Effects of vinegars administration on Hepatic Triglyceride (TG) in

wistar rats gavaged 50% Ethanol. TG, Triglyceride; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

4) 알코올 대사

가) 간 조직 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 활성도

간에서 알코올 대사에 관여하여 알코올을 acetaldehyde로 분해시키는데 관여하는 효소인 Alcohol Dehydrogenase(ADH) 활성도를 측정하였다. 간 조직 내 Cytosol 분획에서 ADH 활성도를 분석한 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올대조군(ET)에서 활성이 감소하는 경향을 보였으며, 에탄올대조군(ET)에 비하여 ET_B, ET_P, ET_K군에서 활성이 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.2682$).

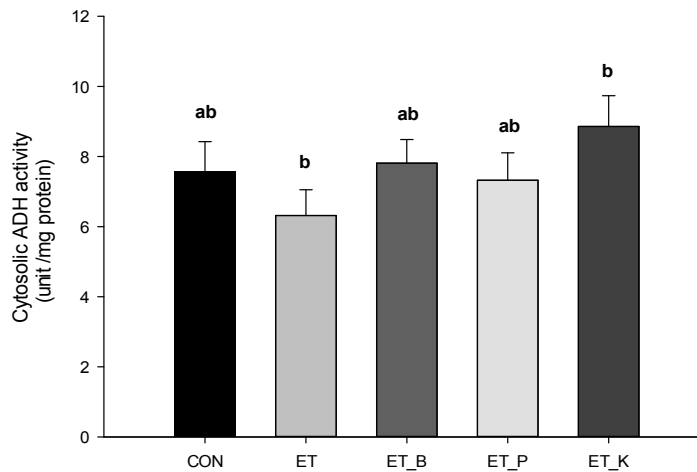


Fig. 104. Effects of vinegars administration on Hepatic Alcohol Dehydrogenase(ADH) activity in wistar rats gavaged 50% Ethanol. ADH, Alcohol Dehydrogenase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) 간 조직 내 Acetaldehyde Dehydrogenase (ALDH) 활성도

간에서 알코올 대사에 관여하여 알코올이 Alcohol Dehydrogenase(ADH)에 의해 분해되면서 생성된 아세트알데히드를 아세테이트로 전환시키는 과정에 관여하는 효소인 Acetaldehyde Dehydrogenase (ALDH) 활성도를 측정된 결과, 정상대조군과 에탄올 대조군(ET) 간의 차이는 없었다. 반면, ET_B군에서는 에탄올 대조군(ET)에 비해 ALDH 활성이 유의적으로 증가하였으며 ET_P군에서 증가하는 경향을 보였다. 반면, ET_K군은 에탄올 대조군의 ALDH 활성과 유사한 수준을 보였다 ($p=0.0546$).

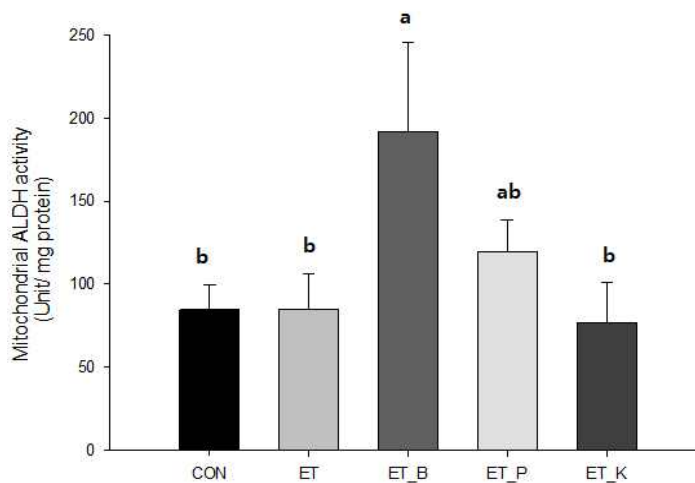


Fig. 105. Effects of vinegars administration on Hepatic Acetaldehyde Dehydrogenase (ALDH) activity in wistar rats gavaged 50% Ethanol. ALDH, Acetaldehyde Dehydrogenase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar), ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

5) 항산화 대사

가) 적혈구 Superoxide Dismutase (SOD) 활성도

적혈구에서 항산화 효소로써 작용하는 SOD 활성을 분석한 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 SOD 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B, ET_P, ET_K군에서 활성이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다

(p=0.8505).

나) 적혈구 Catalase(CAT) 활성도

적혈구에서 항산화 효소로써 작용하는 CAT 활성을 분석한 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 CAT 활성이 감소하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B, ET_P, ET_K군에서 CAT 활성이 감소하는 경향을 보였다 (p=0.0363).

다) Plasma Malondialdehyde (MDA) 수준

혈장에서 지질과산화물로 측정되는 Malondialdehyde (MDA)수준을 분석한 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 MDA 수준이 약간 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B군은 증가하는 경향을 보였고, ET_P 및 ET_K 군에서 수준이 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다 (p=0.7091).

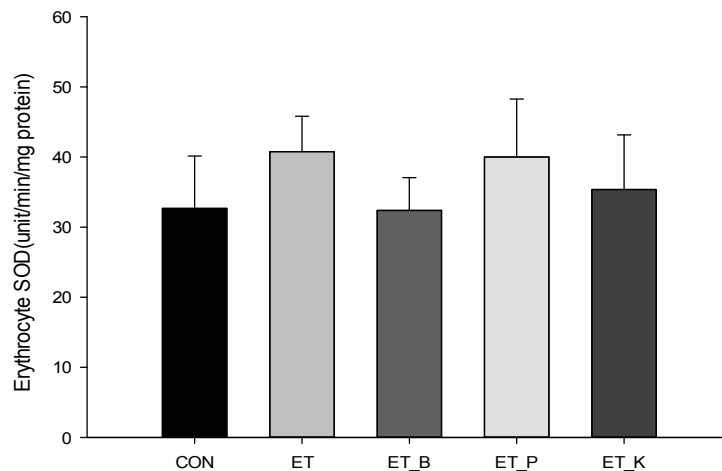


Fig. 106. Effects of vinegars administration on Erythrocyte Superoxide Dismutase (SOD) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. SOD, Superoxide Dismutase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

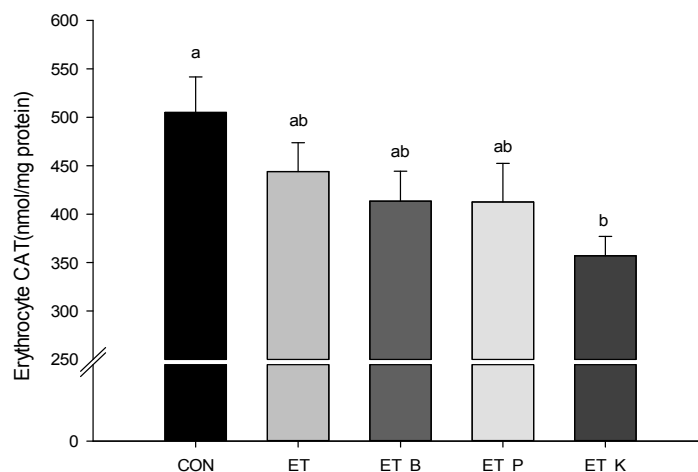


Fig. 107. Effects of vinegars administration on Erythrocyte Catalase(CAT) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. CAT, Catalase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

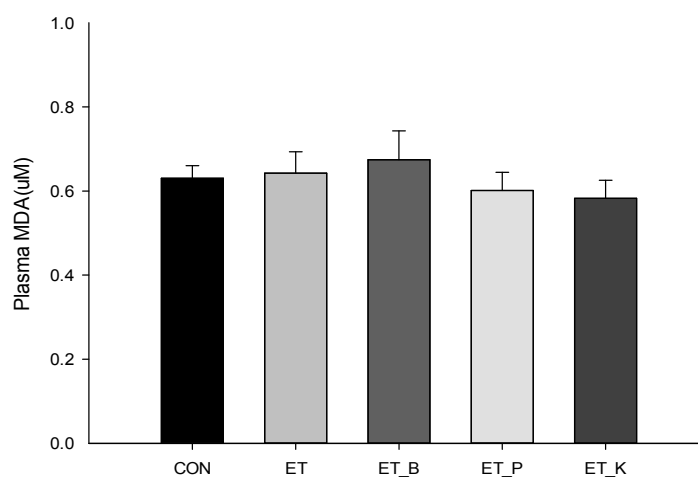


Fig. 108. Effects of vinegars administration on Plasma Malondialdehyde(MDA) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. CAT, Catalase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA.

Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

라) 간 조직 내 Superoxide Dismutase (SOD) 활성도

간 조직 내 cytosol 분획에서 항산화 효소인 SOD 활성을 분석한 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군에서 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비하여 ET_B, ET_K군은 감소하는 경향을 보였으며, ET_P군은 증가하는 경향을 보였다 ($p=0.0405$).

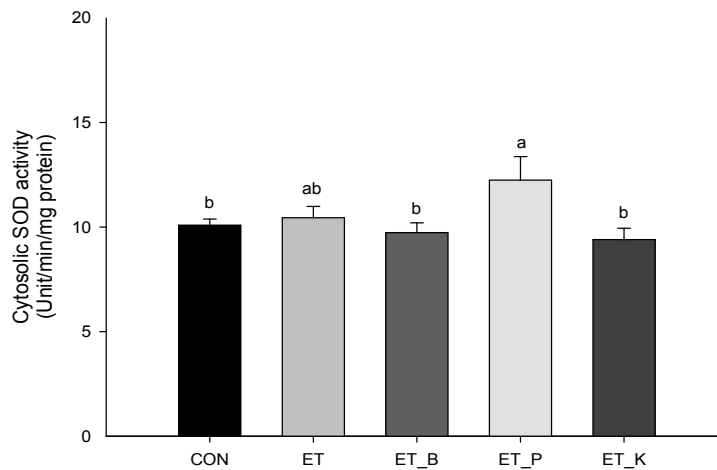


Fig. 109. Effects of vinegars administration on Hepatic Superoxide Dismutase(SOD) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. SOD, Superoxide Dismutase; CON(control, $n=10$), ET(Ethanol induced, $n=10$), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, $n=10$), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, $n=10$). All values are expressed at the mean \pm S.E.. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

마) 간 조직 내 Catalase (CAT) 활성도

간 조직 내 peroxisome 분획에서 항산화 효소인 CAT 활성도는, 정상대조군에 비해 에탄올 대조군(ET)에서 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군(ET)에 비해 ET_B, ET_P 및 ET_K 군에서 감소하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.8156$).

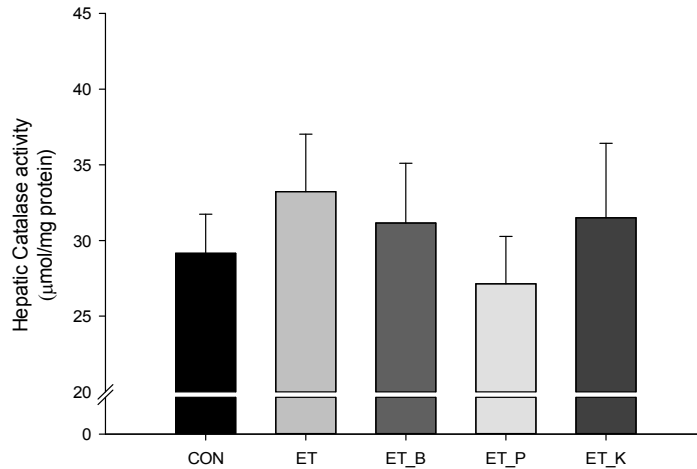


Fig. 110. Effects of vinegars administration on Hepatic Catalase(CAT) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. CAT, Catalase CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

바) 간 조직 내 Total Glutathione (GSH) 수준

간 조직에서 항산화 효소로 작용하는 Total Glutathione (GSH) 수준은 모든 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 에탄올 대조군에 비해 ET_B군에서 증가하는 경향을 보였다($p=0.8642$).

사) 간 조직 Glutathione Peroxidase (GSH-px) 활성화도

간 조직 내 cytosol 분획에서 항산화 효소로 작용하는 Glutathione peroxidase (GSH-px) 수준은 정상대조군에 비해 에탄올 대조군(ET)의 GSH-px 수준이 증가하는 경향을 보였으나, 모든 군간 유의적인 차이는 없었다 ($p=0.9009$).

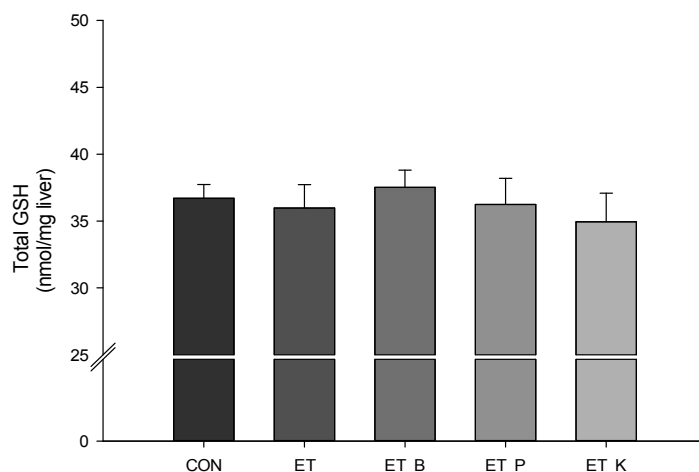


Fig. 111. Effects of vinegars administration on Hepatic Total Glutathione(GSH) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. GSH, Glutathione; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

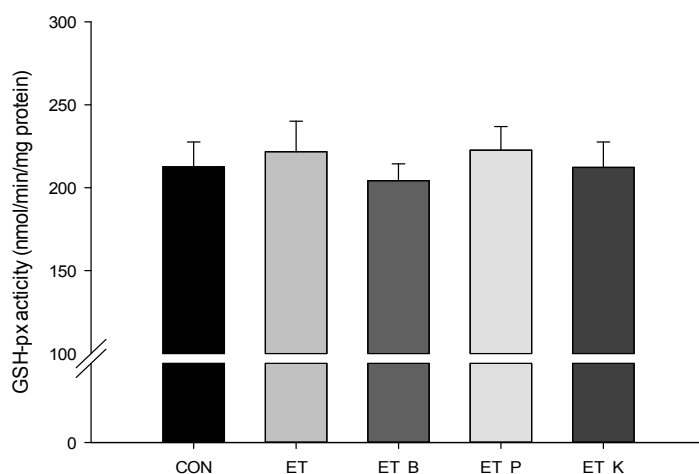


Fig. 112. Effects of vinegars administration on Hepatic Glutathione Peroxidase (GSH-px) in wistar rats gavaged 50% Ethanol. GSH-px, Glutathione Peroxidase; CON(control, n=10), ET(Ethanol induced, n=10), ET_B(Ethanol induced+brown rice vinegar). ET_P(Ethanol induce+persimmon vinegar, n=10), ET_K(Ethanol induced+kagoshima brown rice vinegar, n=10). All

values are expressed at the mean \pm SE. Statistical significances were determined by one-way ANOVA. Alphabets are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

4. 요약

식초의 선행연구 사례를 분석한 결과, 식초를 섭취하였을 때 피로회복, 고혈압, 지방 대사와 관련하여 그 역할이 연구된 사례가 있으나, 알코올 스트레스에 대한 간 보호효과를 연구한 사례는 드문 실정이다. 본 연구에서는 급성으로 알코올성 간 손상을 유도한 동물모델에서 알코올성 간 손상에 대한 전통발효식초의 간 보호 효능을 검증하고자 하였다. 전통발효식초 중 국내산 현미식초 및 국내산 감식초를 선정하였고, 일본의 가고시마 흑초(현미식초)와 그 효능을 비교함으로써 전통발효식초의 우수성을 평가하고자 하였다.

이에 수컷 Wistar Rat에 16일간 강제 경구투여로 50%(v/v) 에탄올을 제공하여 간 손상을 유도하였으며, 동시에 전통발효식초를 경구투여 하여, 알코올성 간 손상에 대한 전통발효식초의 효능을 확인하였다. 그 결과는 다음과 같다.

가. 알코올 섭취에 의한 간 손상 유도

1) 체중

정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 체중이 감소하는 경향을 일시적으로 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2) 식이 섭취량

정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 식이섭취량이 유의적으로 감소하였다.

3) 조직 무게

정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 간 및 신장, 부고환 지방 중량 유의적인 차이를 보이지 않았다. 신장 주변 지방의 경우 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군에서 유의적으로 감소하였다.

4) 간 손상 지표

Serum AST, ALT 수준이 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였다.

5) 염증 대사

Serum IL-6에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 간 조직의 TNF-alpha와 IL-6에서 정상대조군에

비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. Serum NO에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

6) 지질 대사

간 조직의 Total lipids, TC, TG 모두 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 차이를 보이지 않았다.

7) 알코올 대사

간 조직 Cytosol 분획에서의 ADH에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 낮아지는 경향을 보였다. 간 조직 mitochondria분획에서의 ALDH에서 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 차이를 보이지 않았다. 간 조직 Peroxisome 분획에서 Catalase에서 정상대조군에 비하여 에탄올대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였다.

8) 항산화 대사

간 조직 Cytosol 분획에서의 SOD에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다. 적혈구 SOD에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 적혈구 CAT에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 유의적으로 감소하였다. 간 조직 Cytosol 분획에서 GSH-px에서 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 수준이 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었다. 간 조직 Total GSH에서 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 차이를 보이지 않았다. Plasma MDA에서 정상대조군과 에탄올 대조군간의 차이는 보이지 않았다.

나. 급성 알코올 스트레스로 유도된 간 손상에 대한 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초의 간 보호 효과

1) 체중

에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군의 체중이 증가하는 경향을 일시적으로 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2) 식이 섭취량

에탄올 대조군에 비하여 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군의 식이섭취량이 증가하

는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다.

3) 조직 무게

에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군의 간 및 신장 중량의 유의적 차이를 보이지 않았다. 부고환 지방의 경우, 에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군의 중량이 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 신장 주변 지방의 경우 에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초군에서 유의적으로 증가하였으며, 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서도 증가하는 경향을 보였다.

4) 간 손상 지표

Serum AST, ALT 수준이 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 감소하는 경향을 보였다. 특히, 국내산 감식초 군에서의 감소 폭이 가장 컸다.

5) 간 조직 염증 대사

Serum IL-6 수준은 에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 간 조직의 TNF-alpha 및 IL-6 수준은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초 및 국내산 감식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 일본산 현미식초군은 에탄올 대조군과 차이를 보이지 않았다. Serum NO에서 에탄올 대조군에 비하여 국내산 현미식초군의 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 국내산 감식초군과 일본산 현미식초군의 수준이 에탄올 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

6) 간 조직 지질 대사

간 조직의 Total lipids, Cholesterol, TG 수준 모두 에탄올 대조군과 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군 간의 차이를 보이지 않았다.

7) 간 조직 알코올 대사

간 조직 Cytosol 분획에서의 ADH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였다. 간 조직 mitochondria 분획에서의 ALDH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초군과 국내산 감식초 군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 일본산 현미식초군의 수준은 에

탄올 대조군의 활성과 차이를 보이지 않았다. 간 조직 Peroxisome 분획에서 Catalase 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서 그 활성이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 국내산 감식초 군에서 Catalase 활성이 가장 감소하였다.

8) 간 조직 및 적혈구 항산화 대사

간 조직 Cytosol 분획에서의 SOD 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초군의 그 수준이 유의적으로 증가하였으나, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초와 일본산 현미식초군의 활성의 차이는 보이지 않았다. 적혈구 SOD 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 일본산 현미식초의 그 수준이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초 군의 활성의 차이는 보이지 않았다. 적혈구 CAT 활성은 에탄올 대조군에 비해 일본산 현미식초군의 수준이 유의적으로 감소하였다. 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 군의 활성은 감소하는 경향을 보였다. 간 조직 내 Total GSH 및 GSH-px 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초, 일본산 현미식초 간의 차이는 보이지 않았다. Plasma MDA에서 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서 수준이 감소하는 경향을 보였다.

5. 고찰

가. 전통발효식초 체중, 식이섭취량 및 장기중량에 미치는 영향

체중 및 식이섭취량은 정상대조군에 비해 에탄올 대조군에서 감소하는 경향을 보였으나, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군의 경우 정상 대조군과 비슷한 수준으로 회복되어가는 경향을 보임으로써, 식초의 경구투여가 에탄올 경구투여로 인해 감소한 식이섭취량을 정상 수준으로 증가시킨 것으로 보인다.

장기 중량을 비교한 결과 간 조직의 무게는 식초 군간 유의적인 차이가 없었으나, 부고환 지방 및 신장 주변 지방 무게는 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군에서 무게가 감소하는 경향을 보였다. 특히, 신장 주변 지방에서 유의적인 감소를 보였는데, 이는 만성 알코올 섭취가 지방 조직의 기능 장애로 인해 과도한 지방 조직의 분해를 일으킨다고 알려져 있는 결과와 일치한다.

나. 전통발효식초가 간 손상 지표에 미치는 영향

Serum ALT 활성도는 실험 12일 차, 정상 대조군에 비해 에탄올 대조군에서 유의적으로 증가하였으나, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서는 ALT 활성이 에탄올 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 국내산 현미식초군에서는 에탄올 대조군에 비해 감소하는 경향을 보임으로써, 식초에 의한 간 보호 효과를 확인하였다. 또한, 국내산 현미식초에 비해 국내산 감식초 및 일본산 현미식초의 효과가 우수한 것으로 나타났다.

반면, 실험 17일 차 희생 후, Serum ALT 활성도는 정상 대조군과 에탄올 대조군간의 유의적인 차이가 없었는데, 이는 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 ALT 활성 수준의 차이가 12일 차보다 다소 감소하였기 때문으로 보이지만, 국내산 감식초 군과 에탄올 대조군을 비교한 결과에서는 오히려 국내산 감식초 군의 ALT 활성이 에탄올 대조군에 비해 감소 폭이 더 큰 것으로 나타났다.

다. 전통발효식초가 간 조직 내 염증 대사에 미치는 영향

선행 연구결과에 따르면, 알코올로 인한 간 손상이 진행되면 지질 대사 및 염증 대사의 이상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 간 조직 내 TNF- α 및 IL-6 수준이 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 차이가 없었으나, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서는 에탄올 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. Lieber-Decarli 식이를 6주간 사용하여 알코올성 간 손상을 유도한 동물실험 결과에서도¹⁹⁾ 알코올의 섭취가 장 점막에 손상을 주어 염증성 사이토카인을 분비시키는 단계까지는 이르지 못한 것으로 확인되었다. 이에 본 실험에서 단기 알코올 섭취로 인한 염증성 사이토카인의 증가가 일어나기에는 이른 단계로 판단된다.

라. 전통발효식초가 간 조직 내 알코올 대사에 미치는 영향

간 조직에서 알코올 대사와 관련하여 ADH 활성, ALDH 활성 및 catalase 활성을 분석 하였다. 먼저 간 손상 지표로서도 이용되는 ADH 활성도는 알코올 대사 단계 중 알코올을 탈수소화시켜 알데하이드 형성을 촉매하는 효소으로써 간 조직의 cytosol에서 그 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과에서는 정상대조군에 비해 에탄올 대조군의 ADH 활성이 유의적인 차이는 없었으나 감소하는 경향을 보였으나, 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군은 에탄올 대조군에 비해 ADH 활성이 증가하는 경향을 보였다. 이는 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초에 의해 ADH 활성이 정상대조군 수준으로 증가되어 알코올 분해를 도운 것으로 판단된다.

ALDH는 간 조직의 mitochondria에서 아세트알데히드를 아세테이트로 분해하는 과정을 촉매하는 효소로 알려져 있다. 본 연구 결과에서는 정상대조군과 에탄올 대조군 간의 ALDH의 활성 차이는 없었는데 이는 본래 알코올 섭취에 의해 mitochondria 내막 손상이 유도되어 ALDH가 제대로 기능을 하지 못한다는 연구 결과에 미루어 보았을 때, 에탄올 대조군에서의 ALDH 활성저하가 제대로 일어나지 않았을 가능성이 있을 것으로 여겨진다. 반면, 국내산 현미식초군과 국내산 감식초군에서는 ALDH가 에탄올 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 식초 군 간 비교 시 독성물질인 아세트알데히드를 아세테이트로 전환시키는데 관여하는 효소인 ALDH의 활성이 국내산 현미식초 및 국내산 감식초에서 증가된 것은 일본산 현미식초에 비해 아세트알데히드 분해 효능이 더 큰 것으로 판단된다.

마. 전통발효식초가 간 조직 내 항산화 대사에 미치는 영향

에탄올 섭취로 인해 발생한 체내 산화적 스트레스로 인하여 생성된 Reactive Oxygenase Synthase(ROS)에서 생성된 과산화물을 무독화 하는데 관여하는 GSH-px 및 Total GSH의 경우, 모든 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

간 조직 SOD 활성 분석 결과, 정상대조군에 비해 에탄올 대조군에서 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초 및 일본산 현미식초군은 감소하는 경향을 보였으나, 국내산 감식초 군에서는 활성이 유의적으로 증가하였다. 간 조직의 적혈구에서의 항산화 활성 비교 결과, SOD 활성도는 군간 유의적인 차이가 없었으나, 식초 군간 비교에서 국내산 감식초 군의 SOD활성이 가장 높은 경향을 보였고, CAT활성도는 국내산 감식초 및 국내산 현미식초가 일본산 현미식초에 비해 높은 경향을 보였다.

지질과산화물로 대표되는 혈장 MDA 수준 또한, 국내산 감식초 군 및 일본산 현미식초군에서 에탄올 대조군에 비해 감소하는 경향을 보임으로써, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초가 국내산 현미식초에 비해 산화적인 스트레스로 인해 발생하는 지질과산화물 생성을 감소시키는 결과를 나타냈다.

바. 전통발효식초가 간 조직 내 지질 대사에 미치는 영향

알코올을 만성으로 섭취했을 시, 과도한 지방조직의 분해로 인한 간으로의 지방 유입 및 AMPK의 활성 저하로 인해 간의 지질 축적이 증가한다고 알려져 있다.¹⁶⁾¹⁷⁾ 그러나 본 연구에서 정상 대조군에 비해 에탄올 섭취군 간의 간 조직 내 총 지질 함량 및 중성지방, 콜레스테롤 수준이 군 간 차이가 없었다. 이러한 결과는 만성적인 알코올 섭취로 인해 유도된 간 손상 유도에 비해 본 실험은 급성 알코올 투여로써 비교적 짧은 기간으로 설계되어 알코올이 간 조직의 지방대사에는 영향을 미치지 않은 것으로 보이며, 이에 식초의 지질 대사 관련 효능을 확인하기에는 이른 단계로 판단된다.

사. In vivo 실험 결과에 따른 인체시험적용 방안

본 연구에서는 알코올성 간 손상 유도를 위해 50%(v/v) Ethanol을 1일 1회 일정한 시간에 강제 경구투여 하였으며, 시험물질인 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초를 50%(v/v) 희석하여 50% Ethanol의 경구 투여 2시간 전 pre-treatment의 개념으로 먼저 경구투여 하였다. 이는 경구투여로 rat에게 제공할 수 있는 부피가 제한적이라는 한계가 있었기 때문에 50% Ethanol과 식초 모두 경구투여로 진행되어야 함을 고려하여, 간손상을 유도를 위한 50% Ethanol의 volume을 다수의 선행연구들에 제시되었던 5mL/kgB.W. 이상의 용량으로 경구투여 하지 못한 것을 한계점으로 들 수 있다.

한편, 동물에게 제공된 식초의 양을 인체 적용시 섭취되는 양으로 환산하였을 때, 약 0.8mL/ 60kgB.W.으로 산출되어진다. 본 결과에서는 식초원액을 사용하였으므로 인체 적용시, 해당 기능성물질을 고려한 식초의 권장 섭취량을 제안하기에는 근거가 부족하다. 이에, 현재 수행 중인 감식초 분획물(농축원액, 저분자 다당류 분획물, 고분자 다당류 분획물)의 기능성 분석 후, 각 분획물의 유효성분 동정을 바탕으로 해당 기능성의 인체 적용 시, 식초의 권장섭취량을 제안할 수 있을 것으로 사료된다.

II. 전통발효식초 분획물의 간 보호 효과 평가(*in vivo*)

1. 실험디자인

가. 실험 동물 선정 및 사육

생후 6주령의 수컷 Wistar rats를 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 7주령부터 실험을 진행하였다. 실험동물은 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 적응기간 중 무균음수와 사료 (purina, United states)를 자유롭게 공급하여 적응시킨 후 실험 식이를 공급하였다. 본 연구의 protocol은 이화여자대학교 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 수행하였다 (IACUC No.2013-01-027).

나. 시험물질

경구투여 시료로써 사용된 시험물질은 감식초의 총 농축액 (PV) 및 국내산 흑초 농축액 (UV)을 그 시료로써 사용하였다.

Table 27. The composition of PV and its fractions

Ingredient	Sample	PT	PI	PS
고형분 (%)		27.09	< 1.00	21.28
수분 (%)		0.30	0.34	0.83
회분 (%)		3.39	5.19	23.90

다. 실험 디자인

수컷 Wistar-Kyoto 계 흰쥐 (6주령)를 대상으로 1주일 적응기간을 거친 후, 총 4주간 매일 감식초 농축액(PT), 감식초 에탄올 불용성 분획물(PI), 감식초 에탄올 가용성 분획물(PS)을 각 100mg/kg. B.W으로 경구투여 하였으며, 2시간 후 50% 에탄올을 경구투여 하여 알코올 스트레스로 인한 간 손상을 유도하였다. 에탄올 경구투여 용량은, 알코올에 대한 실험동물의 내성을 방어하고, 간 손상을 극대화하기 위한 방법으로 매 주마다 2.5, 4, 5, 6 ml/kg B.W.으로 순차적으로 용량을 늘려 투여하였다. 실험동물은 4주 뒤, 마지막 알코올 경구투여 후 12시간 절식 후에 희생하여 조직 및 혈액을 채취하였다.

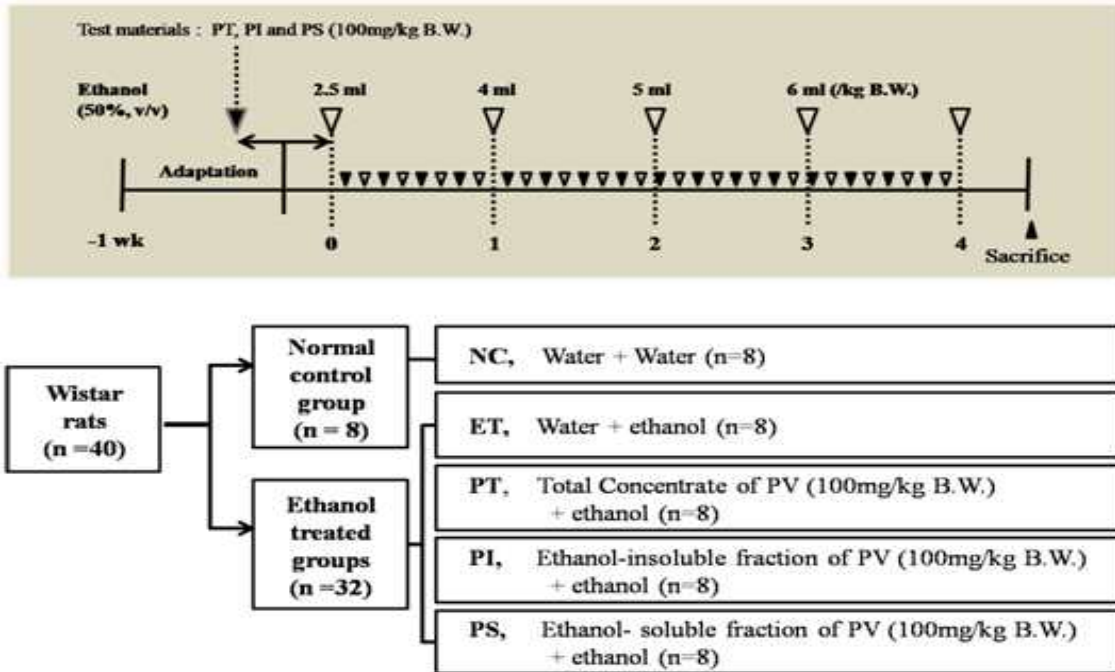


Fig. 113. Experimental design The rats were pretreated PV and its fractions or water once daily and after 2 hours, ethanol treated groups were administrated ethanol (50%, v/v) sequential increase dose (2.5, 4, 5 and 6mL/kg B.W., per week) for the same period. NC, normal control, water (n=8) ET, water + 50% ethanol treated control (n=7) PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV + 50% ethanol (n=8) PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8); PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8).

라. 분석 지표

4주 간의 알코올 스트레스에 대한 국내산 감식초 농축액(PT) 및 에탄올 침전에 의한 불용성(PI) 및 가용성(PS) 침전물의 간 보호 효과와 기전을 다음과 같은 분석 지표를 통하여 확인하였다.

Table 28. 일반지표 및 생화학 분석 바이오마커 측정 항목

지표	측정 항목	
일반지표	식이섭취량, 체중 변화량. 장기 및 조직 무게: 비장, 신장, 간, 부고환지방, 신장지방, 장간막 지방	
바이오 마커	간 손상지표	Serum AST, ALT, LDH
	염증대사	TNF- α , IL-6, IL-10 (liver, ELISA) TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 β MCP-1, COX-2, MIP-2, CD14, TLR4 (Liver, RT-PCR)
	알코올대사	Liver ADH, ALDH, CYP2E1
	항산화	Liver SOD, CAT, GSH-px, Liver MDA and Plasma MDA Erythrocyte SOD, CAT
조직 병리학적 분석	H&E staining	

2. 연구결과

가. 체중

총 4주간의 실험기간 동안 모든 군간에서 체중의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

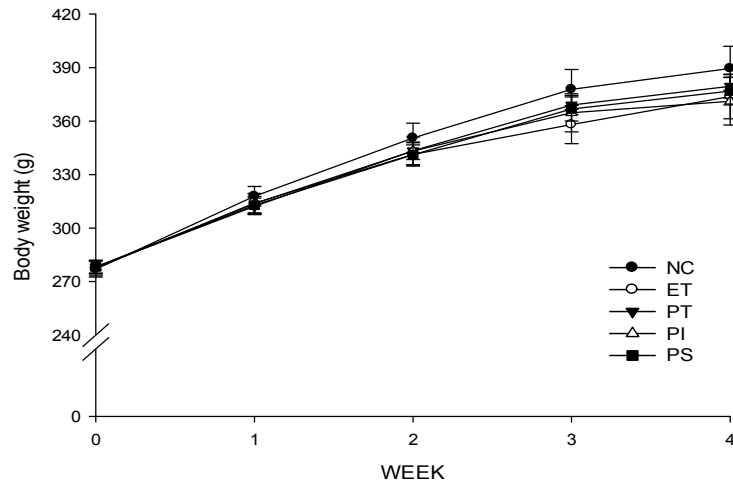


Fig. 114. Body weight changes during experimental period in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol oral administration. NC, normal control, water (n=8); ET, water + 50% ethanol treated control (n=7); PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol (n=8); PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8); PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8). All values are represented at the mean \pm S.E. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나. 식이 섭취량

총 4주간의 실험기간동안, 4주차의 식이 섭취량에 있어 정상대조군에 비하여 PI, PS군에서 유의적으로 감소하는 식이 섭취량을 보였다. ($p=0.0348$)

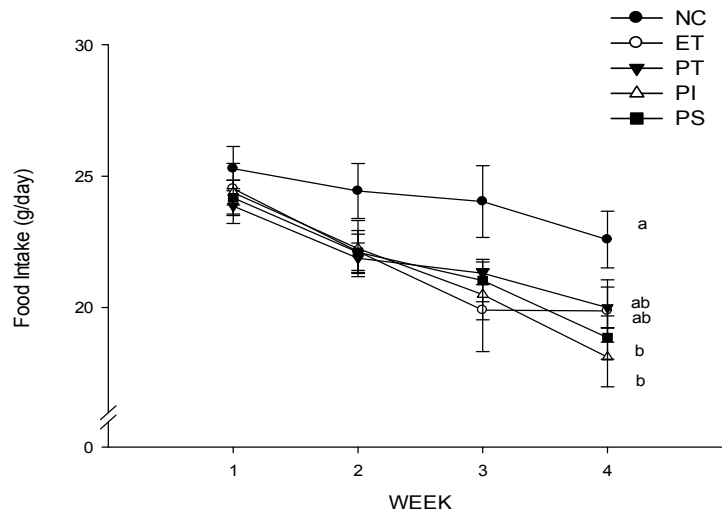
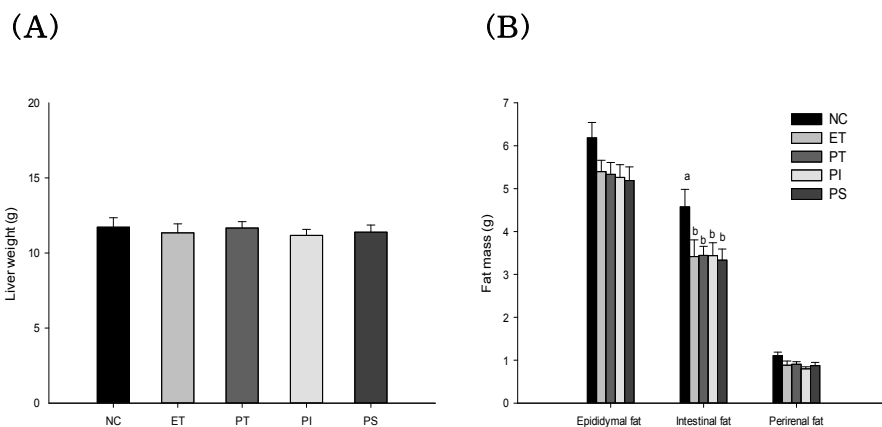


Fig. 115. Food intake during experimental period in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol oral administration. NC, normal control, water (n=8); ET, water + 50% ethanol treated control (n=7); PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol (n=8); PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8); PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8). All values are represented at the mean \pm S.E. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

다. 장기 및 조직 무게

간, 신장 및 비장 무게는 모든 군간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 지방의 무게를 측정 시, 장간막 지방에서만 알코올을 섭취한 모든 군에서 무게가 유의적으로 감소하였으나 ($p=0.0442$), 알코올 대조군과 비교하여 시료군에서 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다.



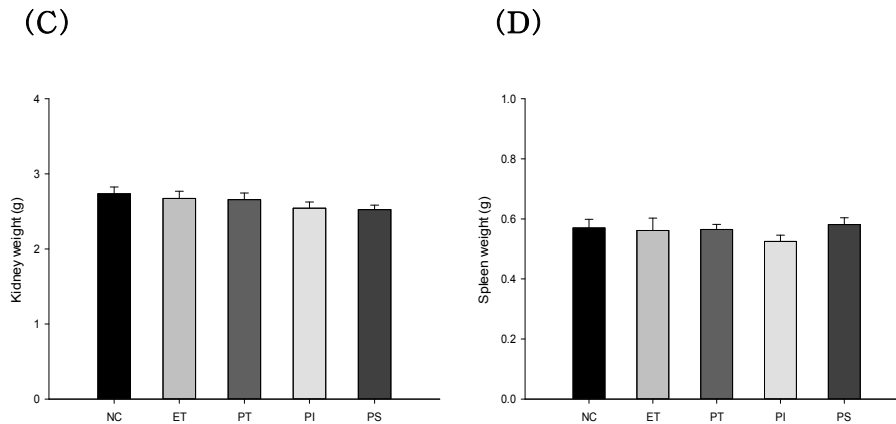


Fig. 116. Effects of persimmon vinegar and its fractions on (A) liver (B) kidney (C) spleen and (D) fat mass weight in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol oral administration. NC, normal control, water (n=8); ET, water + 50% ethanol treated control (n=7); PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol (n=8); PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8); PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol (n=8). All values are represented at the mean \pm S.E. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

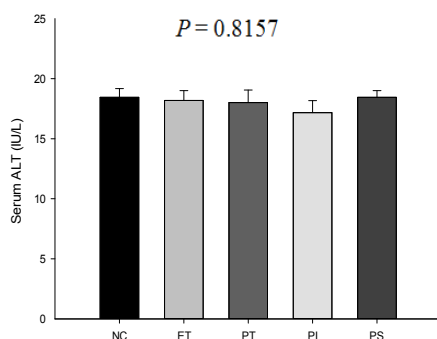
라. 생화학적 분석 지표

1) 간손상 지표

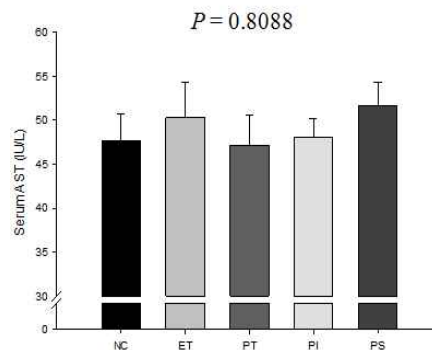
가) Serum Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) 수준

실험동물을 희생하여 얻은 Serum의 ALT, ASTs, LDH 수준을 분석한 결과, 모든 군 간 유의적인 차이는 보이지 않았다.

(A)



(B)



(C)

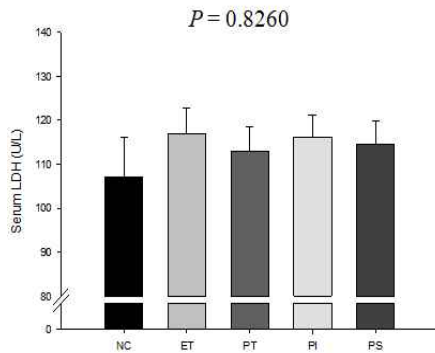


Fig. 117. Effects of persimmon vinegar and its fractions on serum (A) aspartate aminotransferase (AST) (B) alanine aminotransferase (ALT) and (C) lactate dehydrogenase (LDH) levels in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats.

2) 항산화 대사

가) Liver and Plasma MDA

간 조직 내 MDA와 Plasma MDA 두 지표 모두에서 모든 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

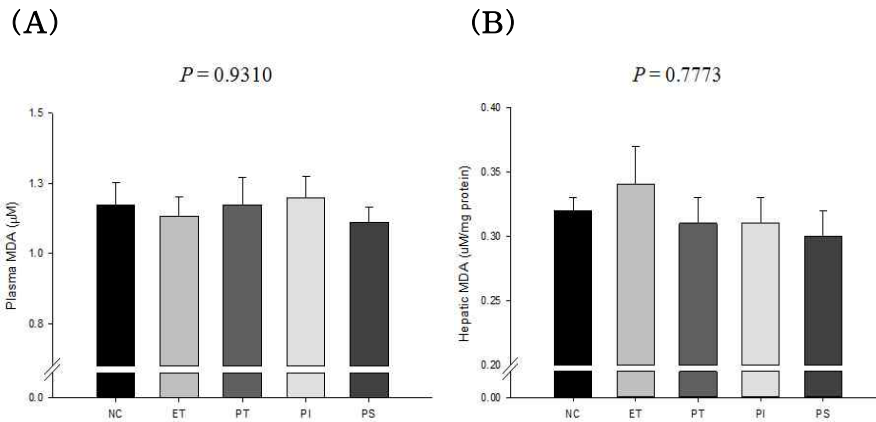
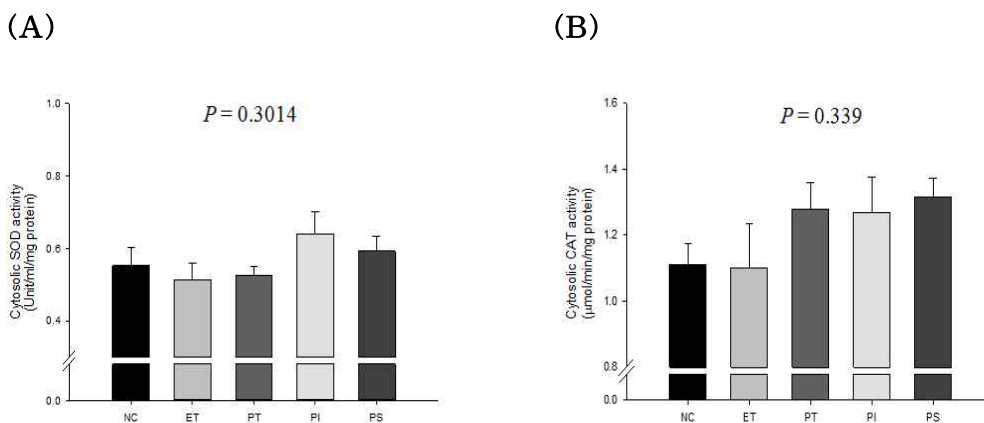


Fig. 118. Effects of persimmon vinegar and its fractions on (A) plasma and (B) liver malondialdehyde (MDA) levels in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) Liver SOD, CAT and GSH-Px

간 조직 내 항산화 효소의 활성을 측정하기 위하여 SOD, CAT, GSH-Px를 측정하였으나, 3 효소 모두 모든 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.



(C)

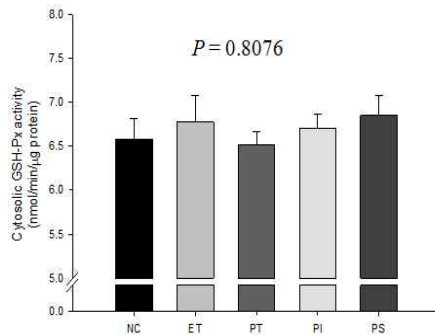
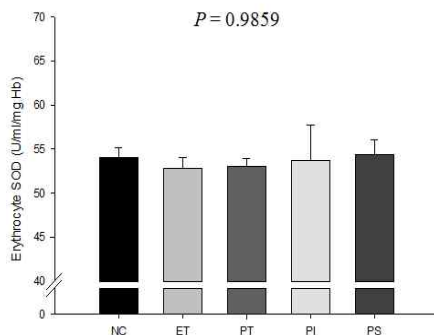


Fig. 119. Effects of persimmon vinegar and its fractions on liver (A) superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) and (C) glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) Erythrocyte SOD, CAT

적혈구 내 항산화 효소를 측정하기 위해 SOD, CAT를 측정하였으나, 2 효소 모두 모든 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만, 적혈구 CAT에서 정상 대조군에 비해 에탄올 대조군의 CAT 활성이 낮아지는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비해 PI, PS 군에서 CAT 활성이 증가하는 경향을 보였다. ($p = 0.0782$)

(A)



(B)

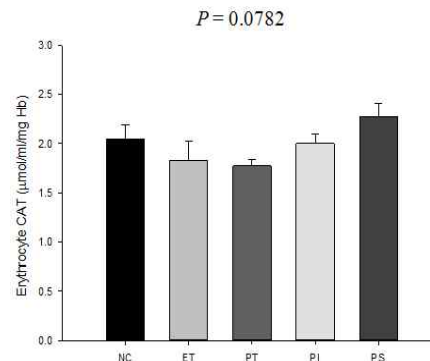


Fig. 120. Effects of persimmon vinegar and its fractions on erythrocyte (A) superoxide dismutase (SOD) and (B) catalase (CAT) activities in chronically

ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

3) 알코올 대사

가) 간 조직 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 및 Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) 활성도

알코올 대사 과정에 관여하는 효소인 ADH 및 ALDH를 측정된 결과, 모든 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

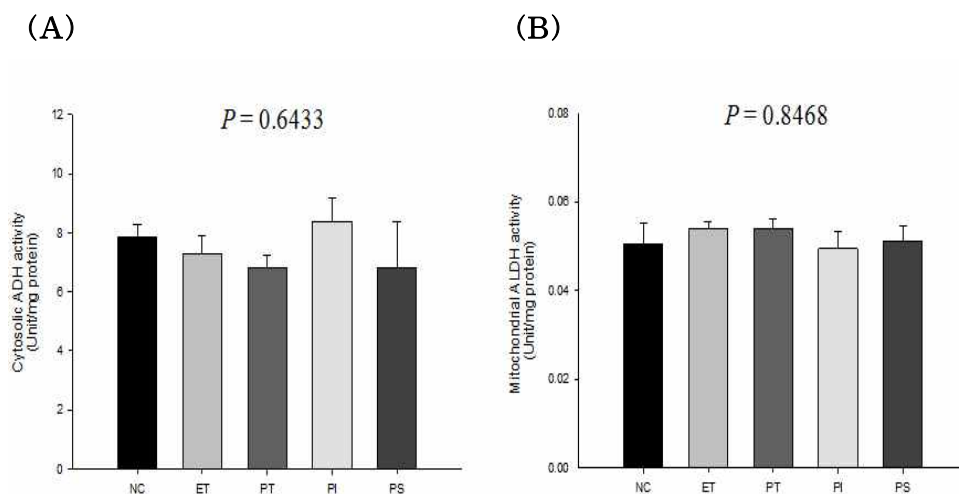


Fig. 121. Effects of persimmon vinegar and its fractions on liver (A) alcohol dehydrogenase (ADH) and (B) acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) 간 조직 CytochromeP450 2E1 (CYP2E1) westrn blot 분석

알코올의 체내 대사과정에 있어 주요 효소 인자로 작용하는 CYP2E1의 단백질 발현을 측정하였을 때, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 활성이 유의적으로 증가하였다. 에탄올 대조군에 비하여 감식초 농축액 (PT)군이 유의적으로 활성이 감소하였으며, 감식초 에탄올 불용성(PI) 및 가용성(PS) 침전물군 모두 에서 감소하는 경향을 보였다. ($p=0.0438$)

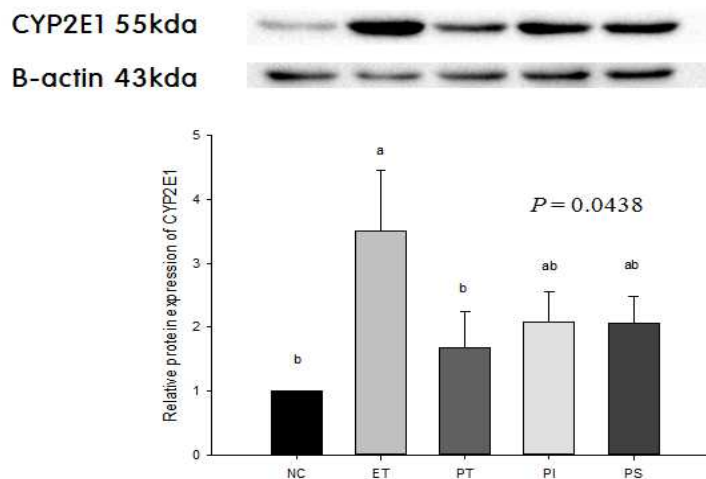


Fig. 122. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) expression in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 3 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

4) 염증 대사

가) 간 조직 Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) 수준

알코올 스트레스에 대한 간 내 염증 대사와 관련된 사이토카인 측정 인자로써 pro-inflammatory cytokine의 일종인 TNF- α 와 IL-6, anti-inflammatory cytokine 인자로써 IL-10을 측정하였다. 측정 결과, TNF- α , IL-6 및 IL-10 모두 모든 군간의 유의적

인 차이를 보이지 않았다.

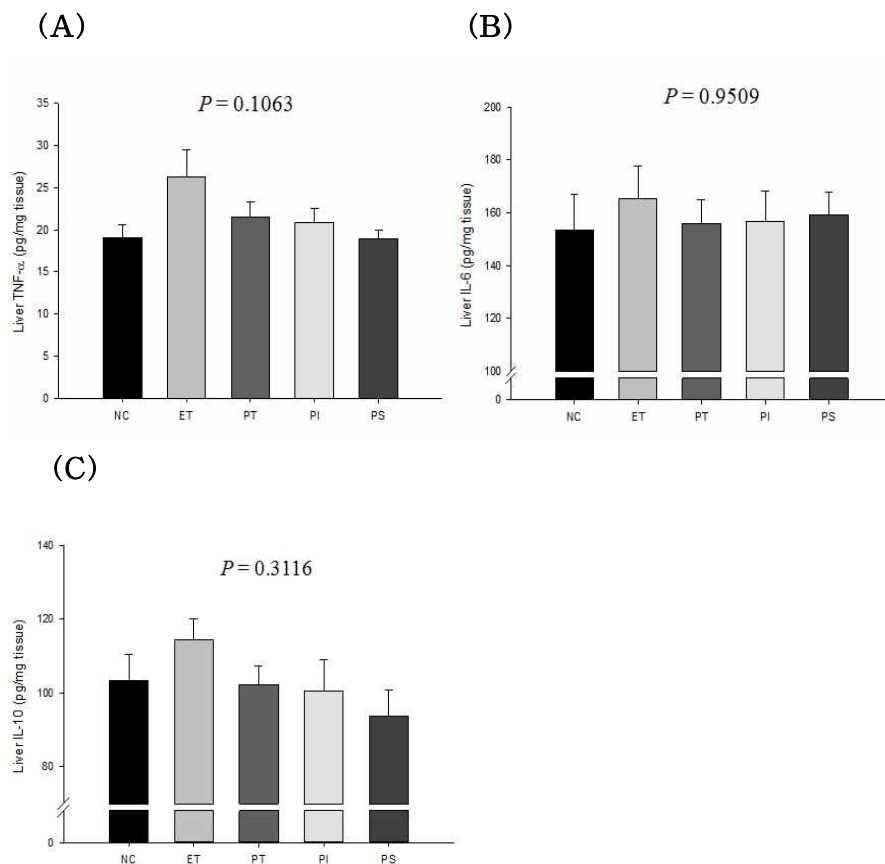


Fig. 123. Effects of persimmon vinegar and its fractions on liver (A) tumor necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukin-6 (IL-6) and (C) interleukin-10 (IL-10) in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV + 50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

나) 간 조직 내 pro-inflammatory cytokined의 mRNA 발현 측정. (Real-Time PCR)

알코올 스트레스에 대한 간 조직 내 mRNA 발현에 있어서 pro-inflammatory cytokine 으로 대표되는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 β 를 측정하였다. 그 결과, TNF- α , IL-6 에서는 모든 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. IL-1 β 는 정상대조군에 비하여 에탄올

대조군에서 증가하는 경향을 보였으며, 에탄올 대조군에 비해 PI, PS 군의 발현이 유의적으로 감소하였다. ($p=0.0076$) IL-12 β 에서는 정상대조군에 비해 에탄올 대조군의 발현이 유의적으로 증가하였으며, 에탄올 대조군에 비해 PT, PI, PS군에서 유의적으로 감소하였다. ($p=0.0009$)

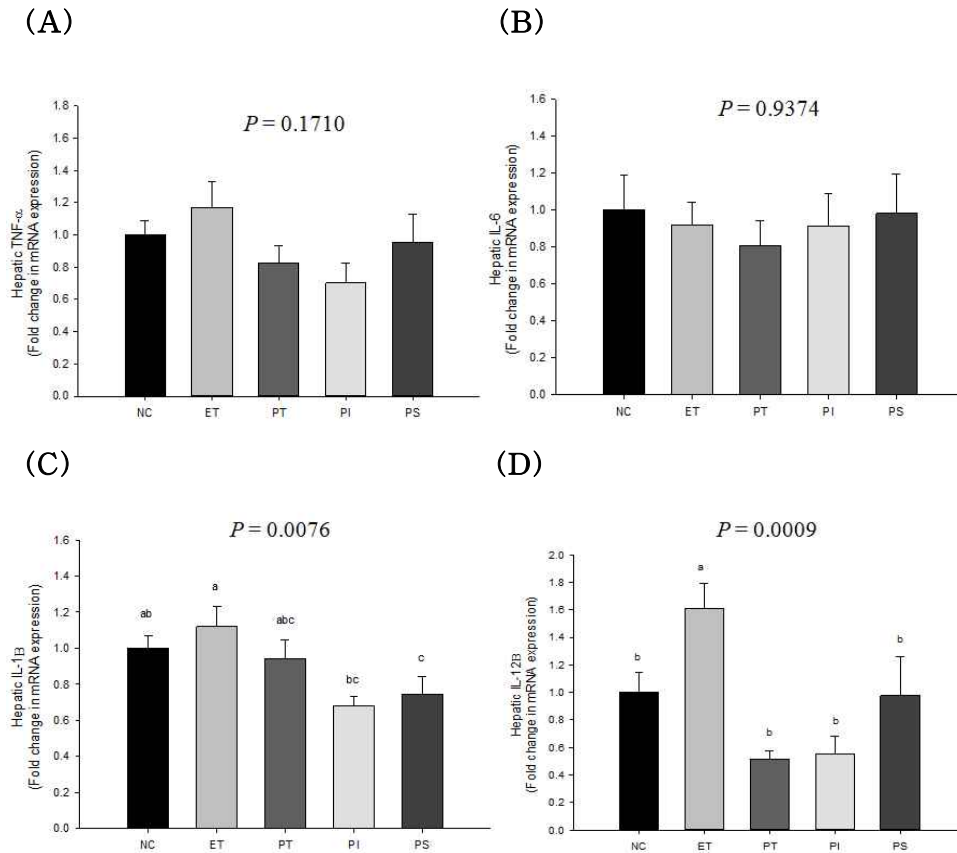


Fig. 124. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic mRNA expression of (A) tumor necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukin-6 (IL-6), (C) interleukin-1beta (IL-1 β) and (D) interleukin-12beta (IL-12 β) in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

다) 간 조직 내 CD14 및 Toll-like receptor 4(TLR4) 의 mRNA 발현 측정. (Real-Time PCR)

알코올 스트레스로 인해 유도되는 TLR4 및 CD14의 간 조직 내 mRNA 발현을 RT-pcr을 통해 측정하였다. 그 결과, TLR4 수용체의 발현에 있어서 정상대조군보다 에탄올 대조군의 발현이 유의적으로 증가하였으며, 에탄올 대조군에 비해 PI, PS 군의 발현이 유의적으로 감소하였고 PT 군의 발현도 감소하는 경향을 보였음 ($p=0.0142$). CD14의 발현은 모든 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

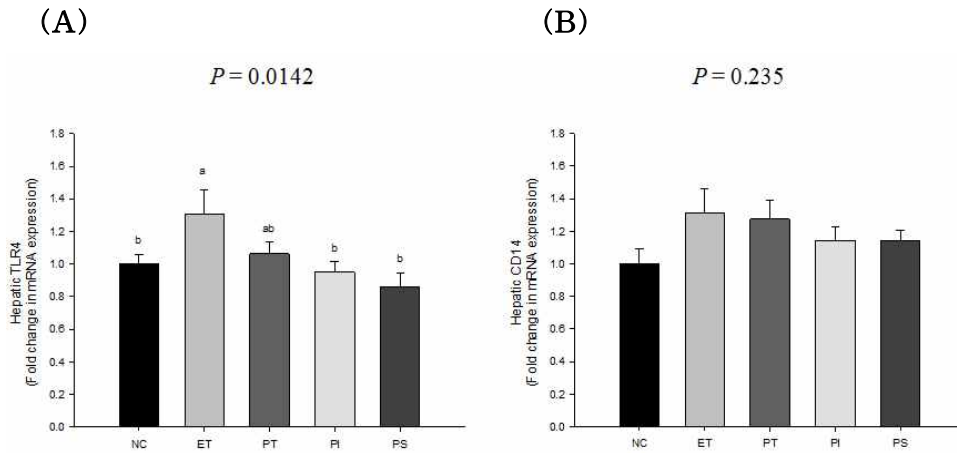


Fig. 125. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic mRNA expression of (A) CD14 and (B) toll-like receptor 4 (TLR4) in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

라) 간 조직 내, cyclooxygenase-2 (COX-2), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)의 mRNA 발현

알코올 스트레스로 인해 유도되는 염증 대사에 있어 발현되는 것으로 알려진 COX-2, MCP-1 와 MIP-2의 mRNA 발현을 측정한 결과, COX-2에서 정상 대조군에 비하여 에탄올 대조군의 발현이 증가하였으며, 에탄올 대조군에 비해 PT, PI, PS 모든 군에서 발현이 유의적으로 감소하였다 ($p= 0.0003$). MCP-1및 MIP-2는 모든 군간의 유의적인 차이가 없었다.

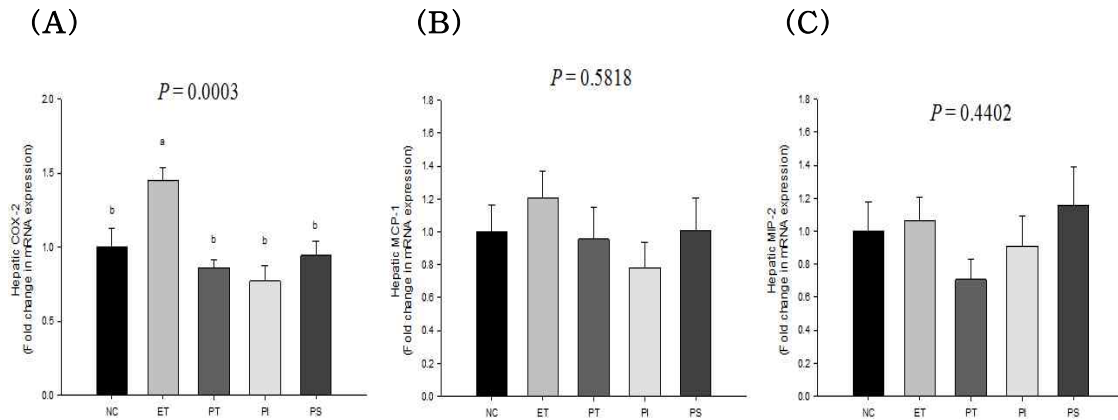


Fig. 126. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic mRNA expression of (A) cyclooxygenase-2 (COX-2), (B) monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and (C) macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) in chronically ethanol drinking rats. Wistar rats were pretreated with PV and its fractions by gavage feeding for 4 weeks before ethanol administration. NC, normal control, water ET, water + 50% ethanol treated control; PT, 100mg/kg B.W. total concentrate of PV +50% ethanol; PI, 100mg/kg B.W. ethanol-insoluble fraction of PV + 50% ethanol; PS, 100mg/kg B.W. ethanol-soluble fraction of PV + 50% ethanol. Each bar was represented at the mean \pm S.E. Each group was 7-8 rats. Values with different alphabet within the row are significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

마) 간 조직 H&E staining 분석

4주간의 알코올 경구투여로 인한 간 조직 내 지방증 (steatosis)와 macrophage infiltration을 측정하기 위한 목적으로 H&E staining을 실시하였다. 그 결과, 정상대조군에 비하여 에탄올 대조군의 간 조직 내 약한 수준의 지방증이 관찰되었다. 에탄올 대조군에 비해 PT, PI, PS 군에서 모두 지방증이 거의 없는 수준으로 관찰되었으나, 시료군 간의 차이는 보이지 않았다.

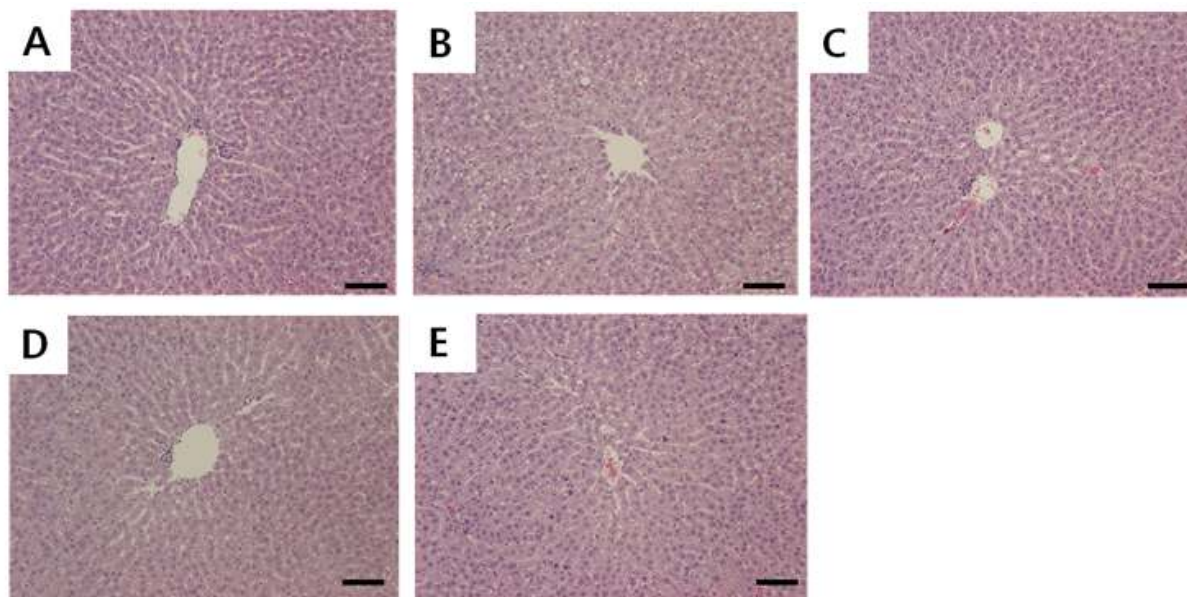


Fig. 127. Effects of persimmon vinegar and its fractions on hepatic histological changes in chronically ethanol drinking rats. (A) NC, normal control, water (B) ET, water + ethanol treated control, ; (C) PT, total concentrate of PV (100 mg/kg B.W.) + ethanol (D) PI, ethanol-insoluble fraction of PV (100 mg/kg B.W.) + ethanol (E) PS, ethanol-soluble fraction of PV (100 mg/kg B.W.) + ethanol. H&E stain, bar, 50um. Each group was 5 rats. The black arrows indicate steatosis.

3. 전통발효식초 분획물의 *in vivo* 간 건강 기능성 평가 결론

본 연구에서는 감식초 농축액 (PT) 및 감식초를 에탄올 침전법으로 분획한 에탄올 불용성 분획물 (PI) 및 에탄올 가용성 분획물(PS)의 알코올 스트레스에 대한 간 내 항염증 및 알코올 대사에 대한 효능을 알코올을 4주간 1일 1회 경구투여한 동물 모델을 통해 규명하고자 하였다.

수컷 Wistar-Kyoto 계 흰쥐 (6주령)를 대상으로 4주간 매일 감식초 농축액(PT), 감식초 에탄올 불용성 분획물(PI), 감식초 에탄올 가용성 분획물(PS)을 각 100mg/kg. B.W으로 경구투여 하였으며, 2시간 후 50% 에탄올을 경구투여 하여 알코올 스트레스로 인한 간 손상을 유도하였다.

간 조직의 형태학적 분석에서 에탄올 대조군(ET)과 비교하여 감식초 농축액 및 에탄올 불/가용성 분획물 투여군에서 간 조직 내 지방의 크기가 작고 분포가 적은 것으로 확인되었다. 산화적 스트레스에 의한 손상을 나타내는 혈액 및 간에서의 지질과산화물의 수준에서는 모든 군 간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

또한, 알코올 스트레스에 대한 항산화 효소 활성을 확인해본 결과, 간 내 SOD, CAT and GSH-Px 에서 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 적혈구 CAT에서 PI와 PS 군이 에탄올 군에 비하여 활성이 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의적인 차이는 없었다.

간 조직에서 알코올 스트레스에 대한 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 quantitative real-time-transcription polymerase chain reaction (qPCR)을 이용하여 TNF- α , IL-6, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-12 (IL-12 β), toll like receptor-4 (TLR 4), CD14, monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1), Macrophage inflammatory protein (MIP-2), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 정도를 측정하였다. 그 결과 염증성 사이토카인인 IL-1 β 에서 PI 및 PS군에서 ET군과 비교하여 그 발현이 유의적으로 감소하였으며, IL-12 β 에서 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 유의적으로 감소하였다. COX-2의 발현 역시 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 현저하게 감소하였다. 또한, 에탄올에 의한 LPS 자극으로 유도되는 TLR4 수용체의 발현 역시 ET군에 비하여 PI 및 PS군에서 유의적인 감소를 보였다.

간 내 에탄올 대사과정의 주요 효소인 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)의 단백질 발현을 측정한 결과, ET군이 NC군에 비해 발현이 유의적으로 증가하였다. 또한, PT군의 발현이 PI와 PS를 투여한 군에 비하여 CYP2E1의 발현이 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

본 연구 결과들을 통해, 4주간의 에탄올 경구투여는 알코올 대사 효소의 발현 증가와 간 내 염증성 사이토카인 및 염증 인자의 생성을 촉진하였으며, 이에 대해 감식초 농축액 및 그 분획물의 투여가 에탄올 섭취로 유도되는 LPS/ TLR4 신호 매개 전달 경로와 관련된 염증성 사이토카인 및 관련 인자를 조절함으로써 면역 기전 조절의 가능성이 있을 것으로 사료된다. 더욱이 감식초 농축액 (PT)의 투여는 에탄올 대사과정에 있어 주요 효소로 작용하는 CYP2E1의 단백질 발현을 억제하였으므로 알코올 대사 효율에 있어 감식초의 가능성을 확인할 수 있었다.

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
전통발효식초의 공시시료 선정	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▫ 공시시료 선정을 위해 시중에 판매되는 식초를 대상으로 주정초가 아니며 원료를 100% 포함하는 국내산 전통발효식초 및 대조군으로 해외산 식초를 수거함. ▫ 수거한 시판 식초(국내식초 6종, 해외식초 5종)의 이화학적 특성(총 산도, 아세트산, 아세트산 순도, TN, 총 아미노산, 유리아미노산, 총 폴리페놀, Crude polysaccharide)을 비교분석하여 국내산 식초 4종(사과식초, 감식초, 와인식초, 현미식초), 해외산 식초 2종(현미식초, 와인식초)를 1차적으로 선별함. ▫ 국내산 식초와 해외산 식초의 이화학적 특성 비교 결과, 국내산 식초는 해외산 식초보다 acetic acid의 순도가 약 3~5% 가량 낮았으며, 발효 과정 중 단백질이 아미노산화로 진행된 것을 확인할 수 있었음. 국내산 식초에서 crude polysaccharide의 함량이 월등히 높게 나타남.
전통발효식초의 기능성분 분획법 수립 및 분획물 확보	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▫ 전통발효식초 중 국내산 감식초 및 국내산 현미식초에서 기능성 성분의 분리를 위하여 에탄올 침전법을 적용하여 분획을 실시하여 각 샘플 별로 3가지의 샘플을 제조함. ▫ 국내산 감식초 및 국내산 현미식초를 각각 25kg를 이용하여 에탄올 침전법으로 대량으로 분리함. 증발농축기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 에탄올을 1:3 비율로 첨가하여 20시간 저온침전시킨 후 동결건조를 거쳐 대량의 식초 샘플을 제조함. ▫ 국내산 현미식초 농축액의 조단백질함량은 17%, 국내산 감식초 농축액의 조단백질함량은 2.4%로써, 7배 이상 국내산 현미식초의 조단백질함량이 높은 것으로 조사됨. 분획물에 따른 총아미노산의 프로파일은 일반성분의 조단백질함량과 유사한 경향을 보여줌. 국내산 현미식초농축액이 감식초 농축액보다 9배 이상 많은 총아미노산 함량을 보여줌. 모든 분획에서 가장 함량이 높은 아미노산은 glutamic acid로 조사됨. 국내산 현미식초 및 감식초에 공통적으로 포함된 유기산은 citric acid, acetic acid, lactic acid, pyroglutamic acid로 조사됨. 곡류보다 유기산 함량이 높은 감은 유기산 분석에서 보듯이 단백질에서 기인한 아미노산인 glutamic acid의 발효로 생성된 pyroglutamic acid를 제외한 모든 유기산이 감식초 분획물에서 많았음. 식초의 기능성 지표물질인 ferulic acid 분석 결과, 감식초에서는 향산화 물질의 대표적인 ferulic acid가 존재하지 않음을 알 수 있었음. 국내산 현미식초에는 유리형의 형태보다는 수용성 식이섬유에 결합된 bound form으로 ferulic acid가 존재함이 밝혀졌으며, 47.5(ug/g)의 함량으로 조사됨. UPLC-QTOF-MS를 이용한 식초의 기타 향산화 물질 정성 및 정량 결과, 국내산 감식초에서 발견되는 향산화 phenolic acid는 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 총 3가지가 발견되었으며, 국내산 현미식초의 경우 caffeic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-hydroxybenzoic acid 이외에 sinapic acid, vanillic acid가 추가적으로 발견되어 총 5가지의 phenolic acid가 포함되어 있는 것으로 분석됨.

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
전통발효식초로부터 폴리사카라이드의 분리 및 화학적 특성 규명	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내산 전통발효식초 4종[사과식초(KAV-0), 와인식초(KWV-0), 현미식초(KBV-0), 감식초(KPV-0)]와 해외산 발효식초 2종[영국와인식초(UWV-0), 일본현미식초(JBV-0)]로부터 다당 분리. ▪ 6종의 다당 시료의 수율, 화학특성 및 면역활성을 비교 검토하여 활성 및 수율이 우수한 3개 다당(KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)을 선정. ▪ 선별 3개 다당시료의 대량 추출 및 화학특성 및 면역활성 재검토. ▪ KBV-0, JBV-0는 발효 미생물 유래 mannan을, KPV-0는 재료 유래 pectin을 주성분으로 함유. ▪ 각 시료는 β-glucosyl Yariv reagent와 반응성을 보임으로써 type II arabinogalactan이 함유되어 있음을 확인.
전통발효식초의 장관면역 활성 기작 규명 (<i>in vitro</i>)	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 전통발효식초 유래 3종의 다당 시료(KBV-0, JBV-0 및 KPV-0)는 높은 항보체 활성을 농도의존적으로 보임. ▪ 가장 높은 활성을 보인 KPV-0는 고전경로와 부경로를 거쳐 보체계 활성화. ▪ KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 mouse 복강 macrophage, Raw 264.7 cell, Caco-2 cell에 대한 세포독성이 없었음. ▪ KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 대식세포를 자극하여 NO, IL-6, IL-12, TNF-α 등의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며 감식초 유래 KPV-0의 활성이 상대적으로 양호. (mRNA level 포함) ▪ 감식초 유래 KPV-0는 FcRII 발현 촉진 ▪ KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 장관면역 Peyer's patch cell을 자극하여 IL-6 생산을 촉진시키고 이들 세포를 경유 골수세포 증식능을 보였으며, 감식초 유래 KPV-0의 활성성이 상대적으로 우수. ▪ KBV-0, JBV-0 및 KPV-0는 Peyer's patch 내 T_{reg} 세포를 활성화하여 자극하여 TGF-β의 생합성을 촉진하고 IgA의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며, 그 활성은 KPV-0가 가장 우수. ▪ Transwell®이 장착된 배양기를 이용한 실험에서 KPV-0는 장관상피 세포를 통과하여 면역세포에 작용할수 있음이 확인. ▪ KBV-0와 KPV-0를 2차년도 실험대상으로 최종 선정.
전통발효식초의 장관면역활성 다당의 정제 및 구조화학적 특성 규명	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1차년도에서 각종 장관면역활성과 수율이 양호했던 한국 전통 현미초 유래 조다당 KBV-0와 감식초 유래 조다당 KPV-0는 Sephadex G-75를 이용, 각각 3개획분으로 정제 완료 ▪ 최종 정제과정에서 얻어진 각 획분들은 Superdex 75 GL을 이용한 HPLC로 순도 및 분자량 결정 ▪ 정제된 현미식초 유래 KBV-I, KBV-II 및 KBV-III와 감식초 유래 KPV-I, KPV-II 및 KPV-III 다당을 대상으로 일반 화학특성 및 구성당 분석 완료 ▪ 현미식초 유래 KBV-I은 발효 중 효모의 세포벽 기원의 mannan인 것으로 추정 ▪ 감식초 유래 정제 다당 KPV-I는 구성당 분석 결과 pectin유래의 RG-I 구조로, KPV-II는 주로 RG-II 다당으로 구성되어 있음을 확인 ▪ 전통 발효식초 유래 다당들의 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토한 결과 감식초 유래 정제다당 KPV-I은 arabino-β-3,6-galactan 구조를 side chain으로 하는 RG-I 구조로 존재함을 확인 ▪ 전통 발효식초 유래 정제다당들은 모두 면역관련 세포에 대한 독성이 없었음. ▪ 전통 발효식초 유래 정제다당은 대식세포를 자극하여 NO를 생성하는 경향을 보였으나 감식초 유래 다당의활성이 상대적으로 우수 ▪ 전통 현미식초 유래 다당들은 모두 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12

		<p>및 TNF-α의 생성을 농도 의존적으로 증진시켰으며, 고분자 다당 KBV-1이 가장 높은 활성을 보임.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 전통 감식초로 부터 정제한 다당 시료들 중 KPV-1 다당 시료들만이 mouse 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF-α의 생성을 증진 ▪ Methyl화 분석에 의한 결합양식 분석 및 전통발효식초 유래 활성 다당체의 전체구조 추정 ▪ KBV-1은 총 25종의 당쇄 결합이 검출되었는데, 주로 mannose 결합 당쇄가 가장 높은 비율(63.9%)로, 그 다음으로 galactose결합 및 glucose결합이 주를 이루고 있었으며 (각각 12.4 및 10.2%) 그외 rhamnose와 arabinose 결합 당쇄가 소량 존재하는 것으로 나타남. ▪ 구성 당조성 및 당쇄의 특성으로 미루어 KBV-1은 단일 다당이 아닌 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었음. 즉, ① 약 60%이상의 고 비율로 존재하는 mannan [(1,6)결합 mannose 주쇄에 C2위치에서 mannose 측쇄연결] ② 약 30%의 비율을 차지하는 pectin 유래의 rhamnogalacturonan I (RG-I) ③ 10% 미만으로 존재하는 전분 및 효모의 β-glucan 유래의 glucan ▪ KPV-1은 총 21종의 당쇄 결합으로 구성되어 있었으며 galactose(30.8%), mannose(23.4%), arabinose(13.7%)의 결합 외에 glucose와 rhamnose 결합 당쇄가 소량 존재하는 것으로 나타남. ▪ KPV-1 역시 단일 다당이 아니라 동일 분자량을 갖는 3종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었음. 즉, ① 약 70%의 고 비율로 존재하며 측쇄에 arabino-(3,6)-galactan을 소유한 RG-I, ② 약 20%fh 존재하는 효모 세포벽 유래의 mannan ③ 10% 정도로 존재하는 감 유래 β-glucan. ▪ 장관면역 활성 다당의 산업화에 필수적인 지표 구성당 및 함량을 설정을 위해 3회에 걸쳐 활성 다당을 조제한 후, 절대값으로 지표다당의 함량을 측정할 결과 산업적 응용 가능획분 KBV-0는 mannose 10% 이상으로, KPV-0는 arabinose와 galactose 각 9% 및 8% 이상으로 결정하였음.
<p>전통발효식초의 장관면역 활성(장관면역 증진) 특성 평가 (<i>in vivo</i>)</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 전통발효식초의 유래 다당의 경구 투여가 Peyer's patch cell의 IgA 및 cytokine 생산에 미치는 효과 검증은 현재 현미식초 유래 조다당 KBV-0와 감식초 유래 조다당 KPV-0를 0, 50, 500, 5,000 μg/mouse/day의 농도로 1일 1회 총 20일간 경구투여 하여 검정하였음. ▪ 그 결과, KBV-0 및 KPV-0의 경구투여는 Peyer's patch에 의한 IgA 항체의 생산량을 증가시켰으며 IgA 생산 관련 cytokine류인 IL-6, GM-CSF 및 TGF-β의 분비를 유의적이고 투여량 의존적으로 촉진시켰음 (<i>ex vivo</i>). ▪ 전통발효식초의 유래 다당의 경구 투여가 소장내액 및 분변 중 분비는 IgA 함량에 미치는 효과를 검토하기 위해 0, 50, 500 5,000 μg/mouse/day 의 농도로 1일 1회 총 30일간 경구투여한 결과, KBV-0 및 KPV-0 투여군에서 투여량 의존적으로 소장내액 및 분변에서 IgA의 증가가 관찰되었음. ▪ 그러나 발효식초 유래 다당의 경구투여 효과는 KPV-0 투여군이 KBV-0 투여군에 비해 상대적으로 훨씬 우수한 것으로 평가되었음. ▪ 한편 발효식초다당의 경구투여에 의한 혈청 내 IL-6와 GM-CSF의 생산은 무투여 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았음. ▪ 이상의 결과는 국내산 전통 발효식초에는 조미성분외에 특별한 다당체를 함유하고 있으며 이들 다당이 인체의 건강 유지에 유용한 장관면역활성을 부여함을 확인할 수 있었음.

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
<p>Inflammatory bowel disease (IBD) 모델에서 전통발효식초의 장관면역 기능성(면역 관용) 평가 (<i>in vivo</i>)</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Inflammatory bowel disease (IBD) 모델에서 전통발효식초의 장관면역 기능성(면역 관용) 평가를 위해 동물시험을 수행함. 구체적으로는, 감식초 농축액 (PV) 및 현미식초 농축액 (UV)의 장관 면역에 대한 효능을 DSS를 9일 간 제공한 동물 모델을 통해 규명함. - 수컷 C57BL/J (6주령)를 23일간 매일 PV 및 UV를 각 200 mg/kg B.W 혹은 400 mg/kg B.W 을 경구투여 하였으며, 시험 시작 후 2주 뒤부터 DSS를 식수에 혼합하여 제공함으로써 장관 면역을 약화시킴. - 9일 간의 DSS 섭취 기간 동안 DAI 측정 결과 DSS군에 비하여 감식초 농축액 저용량군(DPL)에서 감소하는 경향을 보였음. Colon 조직의 형태학적 분석에서 pathological score가 DSS군과 비교하여 감식초 농축액 고용량군 (DPH)에서 DSS군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 염증, 세포사 및 재생에서도 유의적인 효과를 관찰할 수 있었음. - 이에 따라 Quantitative real-time-transcription polymerase chain reaction을 이용하여 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 TNF-α, IL-6, 및 IL-1β의 발현 정도를 측정하고, IκB 및 NFκB를 측정하였으며, 세포 증식 및 세포사에 대한 효과를 확인하고자 기전인자인 b-catenin, c-myc 및 cyclin d 그리고 caspase-3 및 caspase-9의 발현 정도를 측정하였음. 뮤신 분비를 관여하는 MUC2의 발현 정도를 측정한 결과 TNF-α에서 DSS군이 증가하는 경향을 보였으며, DSS군과 비교하여 DPL군이 감소하는 경향을 보였음. - 결론적으로, 9일 간의 4% DSS는 colon에 세포사 및 염증 인자의 생성을 촉진시키고 이로 인해 정상 대조군에 비하여 몸무게 및 장기 무게의 유의적인 차이를 보임을 확인하였으며, 이에 대해 감식초 농축액이 염증 사이토카인 유전자 발현을 약화시키며, 세포증식의 조절 인자의 발현 조절 가능성이 있을 것으로 평가됨.
<p>전통발효식초의 간 보호 효과 평가 (<i>in vitro, in vivo</i>)</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 전통발효식초의 간 보호 효과를 평가하기 위해 세포실험을 수행함 - 생체 내에서 생성되는 활성산소는 인체의 노화와 질병을 유발하는 주요 원인으로 세포와 조직에 해로운 독성을 일으켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있음. 대표적인 활성산소 유도물질인 ethanol을 처리하여 산화된 간세포에 전통발효식초를 처리함으로써 산화방어기전과 관계된 효소들의 mRNA 발현과 활성을 확인하였음. 국내산 현미식초 및 국내산 감식초는 ethanol로 인해 감소한 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 유의적으로 증가시켰으므로 항산화 활성을 증가시켰으며, 각각의 분획물들에서도 같은 결과를 얻었음. ◦ 전통발효식초의 간 보호 효과를 평가하기 위해 동물시험을 수행함 - 수컷 Wistar Rat에 16일간 강제 경구투여로 50%(v/v) 에탄올을 제공하여 간 손상을 유도하였으며, 동시에 전통발효식초를 경구투여 하여, 알코올성 간 손상에 대한 전통발효식초의 효능을 확인하였음 - 간 손상 지표인 serum AST, ALT 수준이 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본산 현미식초군에서 감소하는 경향을 보였음. 특히, 국내산 감식초 군에서의 감소폭이 가장 컸음. - 간 조직 알코올 대사 관련하여 간 조직 cytosol 분획에서의 ADH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 및 일본

	<p>산 현미식초군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보였음. 간 조직 mitochondria 분획에서의 ALDH 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초군과 국내산 감식초 군에서 그 수준이 증가하는 경향을 보임.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pla간 조직 및 적혈구 항산화 대사관현하여, 간 SOD 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초군의 그 수준이 유의적으로 증가하였으나, 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초와 일본산 현미식초군의 활성의 차이는 보이지 않았음. 적혈구 CAT 활성은 에탄올 대조군에 비해 국내산 현미식초, 국내산 감식초 군의 활성은 감소하는 경향을 보였음.sma MDA는 에탄올 대조군에 비해 국내산 감식초, 일본산 현미식초군에서 수준이 감소하는 경향을 보였음. - 감식초 농축액 (PT) 및 감식초를 에탄올 침전법으로 분획한 에탄올 불용성 분획물 (PI) 및 에탄올 가용성 분획물(PS)의 알코올 스트레스에 대한 간 내 항염증 및 알코올 대사에 대한 효능을 알코올을 4주간 1일 1회 경구 투여한 동물 모델을 통해 규명함. - 간 조직의 형태학적 분석에서 에탄올 대조군(ET)과 비교하여 감식초 농축액 및 에탄올 불 /가용성 분획물 투여군에서 간 조직 내 지방의 크기가 작고 분포가 적은 것으로 확인됨. - 간 조직에서 알코올 스트레스에 대한 염증 대사 발현 인자를 확인하고자 qPCR을 이용하여 TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12β, TLR 4, CD14, MCP-1, MIP-2, COX-2의 발현 정도를 측정된 결과 염증성 사이토카인인 IL-1β에서 PI 및 PS군에서 ET군과 비교하여 그 발현이 유의적으로 감소하였으며, IL-12β에서 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 유의적으로 감소하였음. COX-2의 발현 역시 모든 감식초 투여군에서 ET군에 비해 그 발현이 현저하게 감소하였음. 또한, 에탄올에 의한 LPS 자극으로 유도되는 TLR4 수용체의 발현 역시 ET군에 비하여 PI 및 PS군에서 유의적인 감소를 보였음. - 간 내 에탄올 대사과정의 주요 효소인 CYP2E1의 단백질 발현을 측정한 결과, ET군이 NC군에 비해 발현이 유의적으로 증가하였고, PT군의 발현이 PI와 PS를 투여한 군에 비하여 CYP2E1의 발현이 유의적으로 감소됨을 확인함. - 결론적으로 4주간의 에탄올 경구투여는 알코올 대사 효소의 발현 증가와 간 내 염증성 사이토카인 및 염증 인자의 생성을 촉진하였으며, 이에 대해 감식초 농축액 및 그 분획물의 투여가 에탄올 섭취로 유도되는 LPS/ TLR4 신호 매개 전달 경로와 관련된 염증성 사이토카인 및 관련 인자를 조절함으로써 면역 기전 조절의 가능성이 있을 것으로 사료됨. 더욱이 감식초 농축액 (PT)의 투여는 에탄올 대사과정에 있어 주요 효소로 작용하는 CYP2E1의 단백질 발현을 억제하였으므로 알코올 대사 효율에 있어 감식초의 가능성을 확인할 수 있었음.
--	--

본 연구를 통해 전통발효식초의 간 보호 효능 및 면역활성, 특히 장관면역에 있어서 우수성을 확인하였음. 이를 바탕으로 전통발효식초의 우수성을 국내외 학술대회 발표, 논문 게재, 전시회 참여를 통해 학술적으로 홍보하여 한식 세계화를 위한 관련 산업에서의 과학적 data를 제시하고자 한다. 이와 같은 활동이 전통발효식초의 수출 및 대중화에 크게 공헌하리라고 기대하고 있다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

▪ 학술발표 4건

- 2013년 한식세계화 심포지엄(2013.05.15., 경기대 신광순 교수)
 - 전통발효식초 기능성 규명 연구
- 2013년 한국영양학회 추계학술대회 및 제48회 정기총회(13.11.08., 이화여대 이혜민)
 - Persimmon vinegar extract protects alcohol-induced hepatic inflammatory damage in Wistar rats
- 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN(13.11.14, 경기대)
 - Intestinal immune system modulating activities of polysaccharides from Korean traditional vinegars manufactured with different raw materials
- 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (13.08.29, 경기대)
 - Characteristics and immuno-stimulating activities of P/S from Korean Traditional Vinegars

▪ 홍보, 전시회 참여 2건

- 2012년도 생명산업과학기술대전 (12.09.20.~22., 샘표식품(주))
- 2013년도 생명산업과학기술대전 (13.09.26.~28., 샘표식품(주))

▪ 학술논문 5건

- Chemical characteristics and immuno-stimulating activity of the polysaccharides from fermented vinegars manufactured with different raw materials (한국식품영양과학회 투고완료, 2014년 43권)
- Characterization of RAW 264.7 cells stimulating polysaccharides from brown rice and persimmon vinegars (2014년 9월중으로 한국식품영양학회지 투고 예정)
- Effect of oral administration of polysaccharide isolated from Korean black vinegar on intestinal immune system (2014년 9월중으로 Food Chemistry 투고 예정)
- Structural characterization of immuno-stimulating polysaccharide purified from Korean persimmon vinegar (작성 중, 2014년 10월중으로 투고예정)
- Modulatory effects of persimmon vinegar and its fractions on ethanol-induced hepatic inflammatory stress and CYP2E1 expressions in rats (투고예정, 작성 중)

제 5 장 연구개발과정에서 수집한 해당과학기술정보

- 해당 사항 없음

제 6 장 주요 연구사항에 대해 시행기관의 장이 요구하는 사항

- 해당 사항 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당 사항 없음

제 8 장 참고문헌

1. 식품공전, 식품의약품안전청
2. 조경호 외, 발효 현미식초의 발효방법 및 원료함량에 따른 품질변화, Korean J. Food Preserv. Vol. 16, No. 1, pp. 33-39, February 2009
3. 정용진, 국내 식초 시장의 현황 및 전망, 식품과학화 산업, 6월호, 2009
4. 하영득 외, 식초의 문화사, 식품산업과 영양 5(1), 1~6, 2000
5. 길복임, 전통식 및 산업식 현미식초의 이화학적 품질특성, Journal of Natural Science Vol. 11-1, 2004
6. 조은자, 한국전통식품연구, 성신여자대학교출판부, 2008
7. Yamada Y, Kondo K. Gluconoacetobacter, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus Acetobacter. J Gen Appl Microbiol 30:296-303 (1984)
8. 황용철 외, 감식초에서 분리한 면역활성다당의 특성, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNO L. Vol 40, No. 2, pp.220~227 (2008)
9. 권승혁 외, 2단계 발효에 의한 과실식초 제조방법과 식초함유음료, 식품 산업과 영양, 5(1), 18~24, 2000
10. 장세영 외, 교반 및 정치배양에 따른 사과식초의 품질특성, J Korean Soc Food Sci Nutr 39(2), 308~312 (2010)
11. 정용진 외, 2단계 발효에 의한 사과식초와 시판 사과식초의 품질비교, J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28(2), 353~358(1999)
12. Young Ju Song et al, Studies of the Effect of Vinegar Ingestion after the Strenuous Wingate Test on Energy Substrates during Recovery Periods, Journal of Life Science 2010 Vol. 20. No. 9. 1345~1352
13. Shino Kondo et al, Antihypertensive Effects of Acetic Acid and Vinegar on Spontaneously Hypertensive Rats, Biosci, Biotechnol, Biochem., 65(12), 2690-2694, 2001
14. Takashi Fushimi et al, Acetic Acid Feeding Enhances Glycogen Repletion in Liver and Skeletal Muscle of Rats, J. Nutr. 131. 1973-1977, 2011
15. Mikiya Kishi et al, Enhancing Effect of Dietary Vinegar on the Intestinal Absorption of Calcium in Ovariectomized Rats, Biosci, Biotechnol, Biochem., 63(5), 905-910, 1999
16. Yeon-Jeong Moon et al, Effects of Persimmon-Vinegar on Lipid Metabolism and Alcohol Clearance in Chronic Alcohol-Fed Rats, Journal of Medical food, 11(1) 2008, 38-45
17. Kim KJ et al, Influence of vinegar-drink with persimmon on oxygen transport function and recovery capacity in exercise. Korean J Phys Education

1997:36:102-113

18. Kim KJ et al, Effects of sport-drink with vinegar on the activation of lipid metabolism during exercise in obese men. *J Korean Soc Aerobic Exerc*, 1997:1:48-58
19. 유양희 외, 세포 및 동물모델에서의 알코올에 의해 유발된 간손상에 대한 지구자 추출물의 보호효과, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(2), 154~159(2009)
20. 우정부 외, 아세트아미노펜에 의해 유도된 간독성 모델에서의 theanine의 간보호효과, *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(3), 350~355(2010)
21. Hyun-Sung Joh et al, Conjugation of Cyclohexane Metabolite in Liver Damaged Rats, *J. Exp. Biomed. Sci.* 12(2006) 361-370
22. Kwon KH et al, Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 647-654
23. 전통발효식품의 기술동향, 한국과학기술정보연구원 첨단기술정보 분석보고서, 2005
24. Na CS, Yun DH, Choi DH, Kim JS, Cao CH, Eun JB. 2003. The effect of pear pectin on blood pressure, plasma renin, ANP and cardiac hypertrophy in hypertensive rat induced by 2K1C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 700-705.
25. 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.
26. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54:484-489.
27. 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.
28. 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. *Anal Biochem* 85: 595-601.
29. Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatography method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol* 49: 926-936.
30. Kabat EA, Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochimistry*. 2nd ed. Thomas Publisher, Springfield, IL, USA. p 133-240.
31. Platts-Mills TAE, Ishizaka K. 1974. Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J Immunol* 113: 348-358.
32. Shimura K, Ito H, Hibasami H. 1983. Screening of hostmediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *J ap*

- J Pharmacol 33: 403–408.
33. Carpita NC, Gibeau DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growing. *Plant J* 3: 1–30.
 34. Pauty M, Albersheim P, Darvill A, York WS. 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucans network in the cell walls of the higher plants. *Plant J* 20: 629–639.
 35. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectin: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57: 929–967.
 36. O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in Plant Biochemistry Carbohydrates*. Dey PM, ed. Academic Press, London, England. Vol 2, p 415–441.
 37. Ishii T. 1997. O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol* 113: 1265–1272.
 38. Engelsen SB, Cros S, Mackie W, Perez S. 1996. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers* 39: 417–433.
 39. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26: 239–256.
 40. Albersheim P, An J, Freshour G, Fulle MS, Guillen R, Ham KS, Hahn MG, Huang J, O'Neill M, Whitcombe A, Williams MV, York WS, Darvill AG. 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharide. *Biochem Soc T* 22: 374–378.
 41. Saito H, Tomioka H, Sato K. 1988. PSK, a polysaccharide from *Coriolus vesicolor*, enhances oxygen metabolism of murine peritoneal macrophages and the host resistance to listerial infection. *J Gen Microbiol* 134: 1029–1035.
 42. Kwon MH, Sung HJ. 1997. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci Indus* 30: 30–43.
 43. Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2002. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyos kaki* L. *Korean J Food Sci Technol* 34: 879–884.
 44. Kim JH, Shin KS, Lee H. 2002. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 290–295.
 45. Choi JH and Shin KS. 2011. Characterization of Anti-Complementary Polysaccharides Isolated from Fruit Wine Using Korean Pears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 63–69.
 46. Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845–859.

47. Bienenstock J, Befus AD. 1980. Review of mucosal immunology. *Immunol*: 249-270.
48. Bockman DE, Cooper MD. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of labricus, appendix and Peyer's patches: An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-478.
49. Booth JS, Nichani AK, Benjamin P, Dar A, Krieg AM, Babiuk LA, Mutwiri GK. 2007. Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 24-34.
50. Cao H, Urban JF, Anderson RA. 2008. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti- and proinflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr* 138: 833-840.
51. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100: 171-194.
52. Gross SS, Wolin MS. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-769.
53. Hamilton TA, Adams DO. 1987. Molecular mechanism of signal transduction in macrophage. *Immunol Today* 8: 151-158.
54. Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Choi HJ, Shin KS. 2014. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean Citrus Hallabong. *Carbohydr Polym* 13: 72-79.
55. Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. 1997. Phamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr Res* 300: 239-249.
56. Sánchez-Fidalgo S, de Ibarguen LS, Cárdeno A, de la Lastra CA. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *European journal of nutrition* 2012;51(4):497-506.
57. Ye Z, Hong C-O, Lee K, Hostetter J, Wannemuehler M, Hendrich S. Plasma caffeic acid is associated with statistical clustering of the anticolitic efficacy of caffeic acid in dextran sulfate sodium-treated mice. *The Journal of nutrition* 2011;141(11):1989-95.
58. Ogawa Y, Kanatsu K, Iino T, et al. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis by microspheres of ellagic acid in rats. *Life sciences* 2002;71(7):827-39.
59. Kwon HS, Oh SM, Kim JK. Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium induced colitis. *Clinical & Experimental Immunology* 2008;151(1):165-73.

60. Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemical pharmacology* 2005;69(3):395-406.
61. Lim BO. Efficacy of wogonin in the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004;68(12):2505-11.
62. Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, et al. Curcumin prevents the development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Digestive diseases and sciences* 2007;52(11):2993-8.
63. Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Orjales A, La Casa C. A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *International immunopharmacology* 2003;3(13):1731-41.
64. Kim YH, Kwon H-S, Kim DH, et al. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *International immunopharmacology* 2008;8(12):1695-702.
65. Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. Protective effects of Kurozu and Kurozu Moromimatsu on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Digestive diseases and sciences* 2011;56(5):1387-92.
66. Reitman S, Frankel S. (1957), A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am J Clin Pathol* 28(1), 56-63.
67. Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254
68. Bonnichsen, R. K., & Brink, N. G.(1955) Liver alcohol dehydrogenase. *Methods in enzymology*, 1: 495-500.
69. Johansson, Lars H., and L. A. Håkan Borg.(1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples.*Analytical biochemistry* 174(1): 331-336.
70. Koivula, Timo, and Martti Koivusalo.(1975) Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 397(1): 9-23.
71. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (1989): *CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine.III* : Taylor & Francis Group; 287-288.
72. Akerboom TP, SiesH (1981), Assay of glutathione, glutathione disulfate, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*, 77:373-382.

73. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, et al.(1984): Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. *Biochem Pharmacol.* 1984;33:1801-1807.
74. Buckingham KW.(1985) Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr.* 115;1425-35
75. Jentsch AM, Bachmann H, Furst p, et al.(1996), Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.*: 20:251-256
76. Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, et al. (2009); Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 296: G1047 - 53.
77. MD Wheeler (2003), Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease, *Alcohol Research and Health*27, 300
78. Wei Zhong et al.(2012), Chronic Alcohol Exposure Stimulates Adipose Tissue Lipolysis in Mice, *The American Journal of Pathology*, 180 (3), 998-1007
79. Vallee, B., and Hoch, F(1955), Yeast Alcohol Dehydrogenase, A Zinc Metalloenzyme, *J Am Chem Soc* 77, 821
80. Song, Byoung-Joon, et al. (2008) Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of hepatology*, 49(2): 262-273.
81. You M. and Crabb D.W, (2004), Recent Advances in Alcoholic Liver Disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G1-G6
82. Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, et al. (2009), Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 296: G1047 - 53.
83. Apte Udayan M. et al. (2005), Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis, *Toxicology and Applied Pharmacology* 207 (1), 25-38.
84. 채희복 (2009), 알코올 간질환, 대한 소화기학회지 53, 275-282

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 한식 세계화 용역 연구사업(한식 우수성·기능성 연구)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 한식 세계화 용역연구사업(한식 우수성·기능성 연구)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.