

발간등록번호

11-1541000-001748-01

**고품질 한식간장의
항비만 및 장관면역 증진 기능 규명**
**(Intestinal immune and anti-obese functions
of Korean Ganjang)**

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고품질 한식간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

샘표식품(주)

연 구 진

연구기관명 : 샘표식품(주)

연구책임자 : 허 병 석

책임연구원 : 정 경 훈

연 구 원 : 이 재 중

연 구 원 : 박 정 희

연 구 원 : 김 경 옥

연 구 원 : 전 중 은

연 구 원 : 김 선 진

연구기관명 : 고려대학교

책임연구원 : 이 성 준

연 구 원 : 가 요 요

연 구 원 : 이 정 규

연 구 원 : 남 보 라

연 구 원 : 김 연 지

연구기관명 : 경기대학교

책임연구원 : 신 광 순

연 구 원 : 원 혜 진

연 구 원 : 조 선 영

연 구 원 : 박 혜 령

요 약 문

I. 제 목 : 고품질 한식간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 간장은 대두를 주원료로 제조한 한국의 대표적인 발효식품으로 한국인의 식생활에 빠질 수 없는 식품 중의 하나로서 아미노산에 의한 구수한 맛, 당분에 의한 단맛, 소금에 의한 짠맛과 여러 가지 유기 성분에 의한 향기와 색깔이 조화된 이상적인 조미식품임.
 - 특히 한식간장은 3첩, 5첩, 7첩, 9첩, 12첩 반상에 이르기까지 모든 반상에 포함될 만큼 상차림에 중요하게 여겨졌으나, 지금은 왜간장과 많이 혼동되고 있음.
 - 일본에서는 일본식 간장(Soyu)의 건강기능성에 대한 연구를 활발하게 수행하여 다양한 기능성을 세계적으로 인정받고 있으며, 알러지 질환의 일종인 화분병과 장관 면역에 효능을 보이는 Soluble soy polysaccharide를 함유한 제품이 시판되고 있음.
 - 일본식 간장의 기능성 연구에 따르면, 간장의 1%(w/v)를 차지하는 폴리사카라이드 성분이 만성 비염, 계절성 비염 감소 효과, 항알러지 효과를 나타냄. 또한 sIgA의 분비를 통하여 host 방어력을 증가시키며, IL-4, IgE, IFN- γ 등의 생산을 조절하여 Th1/Th2의 밸런스를 맞춰주어 전신면역 및 장관면역을 조절하고 있다고 보고하고 있음. 항알러지 효과는 간장 제조 과정 중 열처리 단계에서의 간장에서 유래한 폴리사카라이드에서는 나타나지 않아, 발효 과정에서 분해된 폴리사카라이드에서 유래한 기능임을 알 수 있음.
 - 국내에서는 간장에 대한 연구 수행 정도가 미흡하여 일본의 8% 수준의 해외논문 발표가 이루어졌으며(된장의 경우는 한국과 일본이 전체 논문의 77%를 점유하고 있으며, 두 국가에서 비슷하게 주도함), 연구내용은 전통 간장의 향암, 혈압강화 및 면역조절 물질에 대한 기능성 연구가 일부 진행되고 있어 한식의 기능성 규명의 연구는 시급하게 진행되어야 함.
 - 이웃국가인 일본에서는 소유, 미소, 나또 등의 발효식품의 기능성을 규명하여 일본음식은 건강한 음식이라는 컨셉을 통해 자국 뿐만 아니라 세계적인 확산을 도모하고 있으며, 현재 대부분 외국의 시장은 일본이 선점하여 장류라 하면 일본 상품이 그 대표성을 확보하고 있는 처지임.
- 반면, 국내에서는 한식간장에 대한 기능성을 체계적으로 규명하고자 하는 노력이 활발하지 못하여 한식의 우수성을 알리는데 한계가 있음
- 최근 식품을 포함한 천연물의 여러 폴리사카라이드에서 강력한 약리 활성이 있는 것으로

보고되고 있음. 식용 및 약용으로 사용되어온 한약재, 식품소재, 담자균류 등에서 유래한 폴리사카라이드에는 보체계 활성화(anti-complementary activity), 림프구 증식자극 활성화(mitogenic activity), 대식세포 증식활성(macrophage activity), 항염증활성(anti-inflammatory) 및 항암활성(anti-tumor activity) 등의 면역증강 활성이 보고되고 있어 이들의 활용이 주목되고 있음.

- 수용성 폴리사카라이드(soluble polysaccharide)는 장내세균에 의해 자화되어 유기산으로 변화하면서 장내 pH를 저하하여 장내 체류시간을 단축시킴으로써 정장작용에 도움을 주며, 간내 콜레스테롤치를 저하하는 효과가 있음. 또한 칼슘대사에도 관여하여 칼슘의 흡수촉진 작용과 대퇴골의 칼슘 농도 저하 방지 효과가 확인되어 골다공증 예방 및 치료에 도움이 되고, 미네랄을 흡수 촉진하여 미네랄 보충에 도움을 준다고 보고되어 있음. 식물성 원료 발효 숙성 과정에 생성되는 수용성 폴리사카라이드는 항알러지 기능을 가지는 것으로도 보고되고 있음.
- 체내 아미노산의 부족은 ATF4, TRB3 등의 활성 증가를 통해 대사 교란을 일으키는 것으로 보고되어 있음. 또한 아미노산의 양이 세포벽에 포도당 운반체(Glucose transporter, GLUT)의 생성에 영향을 주어 포도당의 흡수에도 관여하는 것으로 알려져 있음.
- 채래식 간장에서 소수성의 펩타이드를 분리하여 실험한 결과, 암세포주들에 대한 세포독성을 나타내어 암 예방에 도움이 될 것으로 주장되고 있으며, 오랫동안 발효한 간장은 발효 숙성과정을 거치면서 주원료인 대두에서 유래된 각종 단백질, 펩타이드, 아미노산 성분들이 건강기능성을 높이는 것으로 알려져 있음
- 대두와 밀을 혼합하여 제조하는 일본식 간장과는 달리 한국 전통식 간장은 대두만을 발효하여 제조하기에 단백질 함량이 높고 섬유질이 풍부함. 본 연구를 통해 한식 간장에 풍부하게 포함된 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드의 기능성 규명을 통해 한식의 우수성을 충분히 입증하여 한식 세계화에 기여할 수 있을 것임
- 본 연구를 통해 한식 간장의 항비만 및 면역 조절 등 건강 기능성 효능 평가 및 기작 연구를 통해 한식 간장에 대한 보다 객관적이고 과학적인 근거를 마련하여 고부가가치화하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 한식 간장과 한식 간장에 포함된 성분들의 건강기능성 평가를 통해 한식 간장의 기능성 차별성을 발굴하여 한식의 과학화에 기여하고, 이의 홍보를 통해 한식의 고부가가치를 창출하고자 한다.

- 제1세부과제:

<목표>

본 연구를 통해 한식 간장 성분의 차별성 및 기능성 소재를 발굴하고자 함. 또한, 기능성 소재의 분리방법을 확립하고, 장관면역 효능을 확인하고자 함

<내용>

- 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 조건 최적화
- 한식 간장의 면역관용 평가 (*in vitro*)
- 한식 간장의 장관염증반응 억제 효능 평가 (*in vivo*)

- 제2세부과제:

<목표>

한식 간장의 건강기능성인 당 및 지질 대사의 유효성을 평가하고자 함

<내용>

- 한식간장 성분의 당·지질 대사 조절 효능 및 기작 연구 (*in vitro*)
- 한식 간장의 항비만 효능 평가(*in vivo*)

- 제3세부과제:

<목표>

한식 간장 폴리사카라이드의 화학 특성과 다양한 장관면역기능을 평가하여 한식 간장의 우수성을 규명하고 기능성 소재 발굴에 기여하고자 함

<내용>

- 한식 간장으로부터 폴리사카라이드의 분리 및 화학적 특성 규명
- 한식 간장의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기작 규명 (*in vitro*)
- 한식 간장 유래 활성 폴리사카라이드의 장관면역 활성화 특성 평가 (*in vivo*)

IV. 연구개발결과

- 제1세부과제:

본 연구를 통해 한식간장의 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드의 분리 방법을 최적화하였고, 이 성분들의 면역관용 효능을 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 확인하였음.

한식 간장에 전기투석법, Ultrafiltration을 이용하여 아미노산·펩타이드 10%, 에탄올 침전법을 이용하여 폴리사카라이드 1.5%를 분리하였다. 인간 단핵구, 마우스 대식세포에 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하여 염증을 유도하고, 분리한 아미노산·펩타이드와 단쇄지방산 중 하나인 butyrate, 단일 아미노산인 L-glutamine, L-leucine의 항염증능을 평가한 결과, 네 시료 모두 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제하였다. 또한 랫트에 DSS(dextran sulfate sodium)를 식수로 공급하여 대장 표면의 궤양, 장점막 손상, cytokines과 염증성 mediators의 생산, leukocyte infiltration과 같은 징후를 보이는 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)을 유도한 모델에서 한식간장, 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드, 한식간장에서 분리한 폴리사카라이드의 효과를 확인하였다. 결과적으로, 간장에서 분리한 아미노산·펩타이드를 섭취한 군에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였으며, 설사와 혈변을 나타내는 지표인 Disease activity index(DAI) 역시 DSS만을 처리한 음성 대조군과 비교하여 낮은 경향을 보였다. 또한 대장 조직의 병리학적 분석 결과, 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소하는 경향을 보였으며, 대장조직의 MPO 수준 분석 결과를 통하여 호중구의 침윤이 다른 군과 비교해 감소한 것을 확인하였다. 간장에서 분리한 폴리사카라이드를 섭취한 군에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였으며, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 iNOS의 mRNA 발현이 감소하였다. 폴리사카라이드를 고용량 섭취한 군에서는 MPO 수준이 감소하고, IL-1 β 와 iNOS의 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다. 본 결과를 통해 한식 간장에서 분리한 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드의 IBD 증상 개선 효과 및 장관염증 억제 기능을 확인할 수 있었다.

- 제2세부과제:

본 연구를 통해 한식간장 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드의 항비만 및 항염증 효능을 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 확인하였음.

한식간장에서 분리한 amino acid·peptide와 polysaccharide의 시료를 이용 3T3-L1에서 lipid accumulation을 측정된 결과 cholesterol과 TG 모두 유의적으로 감소하였다.

한식간장 내에 존재하는 peptide 중 지질대사에 영향을 줄 수 있는 peptide의 존재를 가정하고 현재 PPAR- γ 에 대한 activity를 갖는 dipeptide인 WE(Trp-Glu)의 PPARs에 대한 affinity를 SPR(Surface plasmon resonance)을 통해 확인한 결과 α 와 γ isoform이 binding 하는 것을 확인하였다. 또한 TR-FRET을 통해 WE를 확인한 결과 PPAR α 에 대해 agonist 활성을 갖는 것을 확인하였다.

또한 한식간장에서 분리한 amino acid · peptide와 polysaccharide을 대상으로 *in vivo* 실험을 통해 대사질환에 대한 긍정적인 효능을 확인하고자 하였다.

실험 전 10주간 고지방식이와 12주간의 시료 경구투여를 통한 mouse 실험을 수행하였다. 동물실험 후 mice를 희생시켜 간과 지방조직의 H&E staining 실험을 진행하였고 실험결과 간에서 control군을 제외한 대조군은 서로 큰 차이를 확인하기 힘들었으나, 지방조직에서 control군과 비교했을 때 상당한 lipid droplet 감소를 확인할 수 있었다. 반면 adipocyte에서는 한식간장 폴리사카라이드를 섭취한 군(poly군)에서 다른 대조군들과 비교하여 뚜렷한 cell의 size 감소를 확인할 수 있었다. Plasma에서 지질과 당의 농도를 분석한 결과 polysaccharide시료를 처리한 군에서 total cholesterol, HDL, LDL, HDL/LDL결과가 대조군에 비해 유의적인 변화를 보였다. Total cholesterol에서 poly군은 control 대조군과 비교하여 유의적인 감소치를 보였다. Poly군의 HDL, LDL 수치는 대조군과 비교하여 낮아졌지만 HDL/LDL ratio는 증가하였다. 간의 지질 수준을 확인한 결과 대조군 모두 cholesterol과 TG의 유의적인 감소를 확인할 수 있었다.

q-PCR을 통해 실험에 사용된 시료들이 간의 지질대사에 어떠한 영향을 주었는지를 확인하였다. 우선 간의 주요 지질대사 조절인자인 LXR α 와 PPAR α 의 활성을 조사하였고 두 유전자 모두 아미노산 · 펩타이드 시료와 폴리사카라이드&아미노산 · 펩타이드 시료에 의해 활성화된 것을 확인할 수 있었다.

LXR α 의 활성은 SREBP1c와 ChREBP를 활성화 시켰으나 지방생합성 인자인 ACC1, FAS, SCD1의 활성은 나타나지 않았다. SREBP1c의 활성을 저해하는 Insig2a를 확인한 결과 control을 제외한 모든 대조군에서 유의적으로 증가하였고 따라서 SREBP1c에 의한 지질생합성이 억제되었다고 볼 수 있다. LXR α 은 또한 ABCG5, ABCG8, CYP7a1을 활성화시켜 bile을 통한 cholesterol efflux를 활성화 시켰다. poly군의 HDL과 LDL에 대한 효과가 지질대사의 활성화에 의한 것인지 HMG-CoA reductase(HMG-CoAR)와 LDL receptor(LDL-R)의 발현을 통해 확인하였다. 실험결과 Poly군에서 HMG-CoAR이 감소하였고 LDL-R은 변화가 없었다. 또한 Poly군의 경우 LXR α 의 활성과 무관하게 ABCG5와 ABCG8의 활성을 보이는데 이러한 결과들은 Poly군의 시료에 포함된 다른 성분들에 의한 것으로 추측된다. SR-BI의 활성은 HDL을 매개로 진행되는 reverse cholesterol transport의 활성화와 관련이 있다. Control 외의 모든 대조군에서 이들의 활성을 확인하였고 각 조직에 존재하는 cholesterol이 efflux를 위해 간으로 이동되었다는 것을 알 수 있다.

PPAR α 는 fatty acid uptake와 β -oxidation의 주요 조절 인자이다. 그러나 본 실험에서 PPAR α 의 활성은 이들에 직접적인 영향을 주었다고 보긴 힘들다. 다만, poly군의 시료가 multifunctional protein으로 다양한 물질들의 receptor역할을 하는 CD36의 활성을 유도하였고 이를 통해 β -oxidation을 활성화시켰다고 생각된다. CD36에 의해 간으로 유입된 cholesterol은

ACS와 ACOX-1에 의해 peroxisomal β -oxidation을 진행하고 CPT-1에 의해 mitochondrial β -oxidation이 진행된다.

LXR α 또는 PPAR α 의 활성화는 inflammation 관련 인자들의 plasma 농도를 감소시킨다는 보고가 있다. 실험결과 control을 제외한 모든 실험군에서 inflammatory factor인 plasma CRP, TNF- α , IL-6의 감소를 확인하였고 TNF- α , IL-6의 mRNA가 감소하였음을 확인하였다.

진행한 모든 실험결과를 종합했을 때, 한식간장에서 분리한 polysaccharide 시료에 의한 plasma cholesterol감소, HDL/LDL ratio증가, adipocyte의 cell size감소, 간 조직 lipid accumulation 감소는 ABCG5와 ABCG8, SR-BI 활성화에 의한 cholesterol efflux 증가와 HMG-CoAR의 감소로 인한 지질생합성 저해, CD36에 의한 β -oxidation이 복합적으로 작용한 결과라고 보여진다.

한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드 시료는 LXR α 활성화에 의한 지질생합성을 Insig2a의 발현 증가를 통해 억제하였으나 ABCA1, ABCG5, ABCG8, CYP7a1, SR-BI 등의 활성을 통해 bile을 매개로한 cholesterol efflux를 증가시켰다. 또한 LDL-R과 LPL의 증가는 plasma의 VLDL과 LDL의 비율을 낮추어 atherosclerosis와 coronary heart disease(CHD)의 위험성을 낮출 것으로 기대된다.

또한 비만에 의해 증가하는 inflammation도 한식간장 성분들에 의해 감소되는 것을 확인하였다.

- 제3세부과제:

본 연구를 통해 한식간장에서 폴리사카라이드를 분리하였으며, 화학적 특성을 평가하였음. 또한 한식간장 유래 폴리사카라이드의 장관면역계 활성화(장관면역계 증진) 기능을 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 확인하였음.

한국의 재래간장은 대두를 발효하여 생산되는 한국의 대표적 조미료일 뿐만 아니라, 최근에는 인체 건강에 도움을 줄 수 있는 여러 기능성 성분이 존재할 것으로 기재되어 많은 관심이 집중되고 있다. 일반적으로 간장은 한국 고유의 재래 간장과 상업용 간장으로 분류되며 이들은 사용되는 원재료의 차이와 발효시 사용되는 'koji' 및 메주('mezu') 제조 과정으로 알려진 발효 방식 및 미생물의 차이에 의해 기인되는 고유의 특성을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 한식간장의 기능적 우수성을 확인하기 위해 우선 상업용 간장(CSP-0)과 한국 전통방식의 재래 간장(KTSP-0)을 대상으로 다당류를 분리하고 장관면역활성을 포함한 면역전반에 대한 활성평가를 행하였다. 또한 한식간장(KSSP-0)과 간장의 세계적 브랜드인 해외 K사의 간장으로부터 얻은 다당류(JKSP-0)와 비교하여 장관면역 활성화에 대한 전반적 *in vitro* 및 *in vivo* 실험

험을 행하였다.

한국 전통 재래 간장과 시판 상업용 양조간장에서 분리한 다당 KTSP-0 및 CSP-0의 화학 특성을 살펴본 결과, 두 간장 유래 다당은 비슷한 구성당 조성의 다당으로 확인되었으나, KTSP-0의 수율이 약 10.7 g/L로 CSP-0의 약 2배의 수율을 보였다. KTSP-0 및 CSP-0는 인체의 초기면역계에 있어 주요한 역할을 담당하는 보체계에 대해 농도의존적으로 활성화 양상의 보였으나, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 항보체 활성이 KTSP-0는 64.7%, CSP-0는 56%로 나타나 KTSP-0가 상대적으로 우수한 활성을 소유함을 알 수 있었다. 또한 두 시료의 면역활성을 비교하기 위해 mouse 유래의 macrophage 세포주인 Raw 264.7 cell을 이용하여 nitric oxide (NO) 생산량, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 and interleukin 6 (IL-6)의 생산량을 평가하였다. CSP-0와 KTSP-0는 Raw 264.7 macrophage의 NO 생산을 농도 의존적으로 상승시켰지만 KTSP-0의 NO 생산량이 CSP-0에 비해 훨씬 양호한 결과를 보였다. Raw 264.7 cell 의 TNF- α 및 IL-6 생산 유도 효과를 real Time PCR과 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용 측정된 결과, KTSP-0에 의한 TNF- α 및 IL-6 생산량은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 CSP-0에 의한 생산량 대비 약 2.6배 및 28.7배 높은 결과를 보였으며, TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현량도 ELISA의 결과와 유사 경향을 보였다. 한편 탐식기능에 대한 평가를 위해 대표적 opsinization factor로 알려진 macrophage Fc receptor I 및 II (FcR I 및 II)의 mRNA 발현량에 미치는 CSP-0와 KTSP-0의 효과를 평가하기 위해 reverse transcription PCR을 행한 결과, KTSP-0만이 FcR I의 mRNA 발현에 농도적 증가 경향을 보였으며 CSP-0의 경우, FcR I 및 II 발현에 모두 활성이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 한국전통 재래간장 유래 다당이 시판 상업용 양조간장 유래 다당 보다 높은 면역증진활성을 소유함을 알 수 있었다. 이러한 두 종류의 간장 유래 다당의 활성의 차이는 발효방법이 다른 두 간장의 제법에 차이에 의한 것으로 추정되었으며 특히 재래간장이 대두만을 원료로 사용하는 반면, 상업용 양조간장은 대두와 밀을 50:50정도로 혼합하여 발효함에 기인한다고 판단되었다.

한식간장의 다당(KSSP-0)과 해외 간장의 다당(JKSP-0)의 화학 특성 및 면역 활성, 특히 장관면역 활성화에 대한 전반적 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 행하고 그 결과를 비교하였다. JKSP-0와 KSSP-0는 비슷한 조성의 구성당 함량을 보였지만, 수율의 경우 KSSP-0가 11.7 g/L, JKSP-0가 9.5 g/L를 보여 KSSP-0가 약간 높은 경향을 보였다. KSSP-0 및 JKSP-0는 모두 초기면역계에 있어 주요한 역할을 담당하는 보체계에 대해 활성경향을 나타냈으며, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 항보체 활성이 KSSP-0는 40%, JKSP-0는 35%로 나타나 KSSP-0가 약간 높은 활성을 보였다. KSSP-0는 Raw 264.7 macrophage의 NO 및 ROS 생산을 농도 의존적으로 상승시켰지만, JKSP-0는 NO 및 ROS 생산에 어떠한 영향도 보이지 않았다. Raw 264.7 cell 의한 TNF- α 및 IL-6 생산 유도 효과를 real Time PCR과 enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)를 이용 측정된 결과, KSSP-0에 의한 TNF- α 및 IL-6 생산량은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에 서 JKSP-0에 의한 생산량에 비해 약 30.3배 및 3.0배 높은 결과를 보였으며, TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현량도 ELISA의 결과와 잘 일치하였다. 그러나 macrophage의 FcR I 및 II의 mRNA 발현량에 미치는 JKSP-0와 KSSP-0의 효과를 평가하기 위해 reverse transcription PCR을 행한 결과, JKSP-0만이 FcR II의 mRNA 발현에 농도적 증가 경향을 보였다. 한편 KSSP-0와 JKSP-0가 갖는 장관면역활성을 *in vitro*에서 평가하였다. 한식간장에서 분리한 다 당인 KSSP-0만이 장관면역을 경유한 골수세포의 증식활성을 보였으며, 장관면역세포인 Peyer's patch cell과 함께 배양한 경우, JKSP-0와 KSSP-0는 조혈성장인자인 GM-CSF와 IL-6 등의 cytokine 생산 유도 활성을 농도 의존적으로 보였으며, IgA도 농도 의존적으로 생산 을 유도하는 등 비슷한 장관면역 활성을 보였다.

한편, 서로 다른 두 종류의 간장으로부터 분리한 다당의 장관면역계에 미치는 *in vivo* 효과 를 검증하기 위해 JKSP-0 및 KSSP-0를 30일간 4개의 group으로 나누어 경구투여(0, 0.5, 1.0 and 0.5 mg/mouse/day)하고 Peyer's patch cell의 증식, 분변중 IgA 생산량, Peyer's patch cell에 의한 IgA 및 각종 cytokine 생산량을 평가하였다. Peyer's patch cell 의 증식에 효과는 KSSP-0를 30일간 0.5 mg/mouse/day로 경구 투여한 군에서 타 투여군에 비해 유의적인 활성 증가를 나타냈다. 한편 JKSP-0 및 KSSP-0의 경구투여에 의해 Peyer's patch cell에 의한 IgA 의 생산과 분변 중 IgA의 분비를 투여농도 의존적으로 증가시켰다. 하지만 KSSP-0의 경구 투 여가 JKSP-0 투여군에 비해 동일 투여농도에서 유의적으로 IgA 생산을 증가시키는 것으로 나 타났다. KSSP-0를 5 mg/mouse/day 투여한 군에서 분리한 Peyer's patch cell은 타투여군과 달리 항체생산을 촉진한다고 알려진 IL-4의 생산량을 유의적으로 증가시킨 반면, JKSP-0 투 여군에서는 Peyer's patch cell에 의한 IL-6 생산을 무투여군에 비해 유의적으로 증가시키는 결과를 보였다. 이같은 결과는 한식간장 유래 다당인 KSSP-0가 장관면역에서 중추적 역할을 하는 Peyer's patch cell들을 활성화하여, 이에 존재하는 임파구에 의한 IgA 및 다양한 cytokine생산을 촉진함과 동시에 전신면역계의 활성화에도 공헌함을 시사하였으며 그 활성이 시판간장 유래 다당보다 우수함을 보인 결과이다.

이상에서 얻어진 실험결과는 한식간장이 일반적인 조미성분 외에 특징적인 다당류를 함유하 고 있으며, 이 다당들이 인간 건강에 유익한 면역기능을 증진시킴을 최종 결론하게 하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 특허 1건 예정
 - 한식간장 성분 분리 방법에 대한 특허 출원 예정

- 논문 2건 게재, 1건 게재 예정
 - 경기대 신광순 등, 시판양조 및 재래식 조선간장으로부터 분리한 다당의 면역증강 활성 비교, 한국식품과학회지, 2012.
 - 고려대 이성준 등, Fucosterol Is a Selective Liver X Receptor Modulator That Regulates the Expression of Key Genes in Cholesterol Homeostasis in Macrophages, Hepatocytes, and Intestinal Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012
 - 한식간장의 항염증 연구에 대한 논문 게재 예정

- 학술발표 3건
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Polysaccharides Isolated from Korean Commercial and Traditional Soy Sauces, JAFI 2012, (2012.10.16 ~ 10.17)
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Two Polysaccharides Isolated from Soy Sauces Manufactured with Different Raw materials, 2012 Int'l Symposium and Annual Meeting of KFN, (2012.10.31 ~ 11.2)
 - 샘표식품(주) 허병석, 고품질 한식간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명, 2012 한식세계화 심포지엄 (2012.09.21)

- 홍보, 전시회 참여 등 2건
 - 식품위생신문 (2012. 10.)
 - 2012년도 생명산업과학기술대전 (2012. 09. 20 ~ 2012. 09.22)

SUMMARY

■ Title

Intestinal immune and anti-obese functions of Korean Ganjang

■ Part 1 : Optimization for separation of polysaccharide, amino acid/peptide from Korean Ganjang and study on its intestinal immune function (*in vitro*, *in vivo*)

We separated amino acid-peptide from Korean ganjang by using electro dialysis method, Ultrafiltration(MWCO 1000), and also separated polysaccharide from Korean ganjang by using Ethanol Precipitation.

We triggered inflammatory reactions by using LPS on human monocyte, mouse macrophage, and we assess anti-inflammatory activities of amino acid-peptide separated from Korean ganjang, butyrate, L-glutamine and L-leucine. In results, all samples decreased TNF- α production.

Korean ganjang, amino acid-peptide separated from Korean ganjang and polysaccharide separated from Korean ganjang were examined for intestinal immune system-modulating activity on IBD model induced DSS. In conclusion, amino acid-peptide from Korean ganjang administration alleviated weight loss and colon length shortening caused by DSS, and DAI that is index of stool consistency and fecal occult blood. Histopathological features appeared that amino acid-peptide from Korean ganjang administration alleviated glandular epithelium destruction, neutrophil infiltration. Also, MPO level was decreased compare to negative control. Polysaccharide from Korean ganjang administration alleviated weight loss and colon length shortening caused by DSS and decreased the mRNA expression levels of IL-1 β and iNOS.

Based on above data, we concluded that amino acid-peptide and polysaccharide from Korean ganjang provide intestinal immune functions such as protection against gut inflammation.

■ Part 2 : Research of functions and mechanisms of glucose and lipid metabolism of components extracted from Korean ganjang (in vitro) and the anti-obesity effect of components extracted from Korean ganjang (in vivo)

The peptide/amino acid and polysaccharide from Korean ganjang decreased cholesterol and TG level significantly in lipid-loaded 3T3-L1 cells.

Peptides in the Korean ganjang are considered could affect lipid metabolism, and dipeptide WE (Trp-Glu) has been showed its activity as an antagonist of PPAR- γ . We found that WE could bind with PPAR- γ and - α isoforms measured by Surface plasmon resonance (SPR). The Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) assay also confirmed the agonistic effect of WE to PPAR- α .

In this research, we investigated the effects of polysaccharide (poly) and peptide/amino acids (pep/AA) extracted from Korean ganjang on metabolic diseases. After 10 weeks feeding by high fat diet (HFD), we fed the C57/BL6 mice poly or pep/AA, or both poly and pep/AA (poly+pep/AA) for another 12 weeks. The body weight of mice has not been changed compared with the control group. To investigate the effects of treatment groups on insulin metabolism, we investigated the oral glucose tolerance test (OGTT), and found that treatment of extraction of Korean ganjang has not showed significant effect on OGTT compared with the control group, so that we have not investigated the insulin sensitivity test.

We also investigated the weight of liver, fat tissue and muscle of the mice and found that there was no significant difference of treated groups compared with control group. The H&E staining of liver and fat tissue showed that though the hepatic histology of three treatment groups has not showed significant difference compared with each other, they showed less lipid droplet in the liver compared with the control group. And the size of adipocytes in the poly group was significantly lowered compared with other groups. The plasma analysis showed that poly treatment reduced the total cholesterol, HDL, and LDL significantly compared with control group, whereas the ratio of HDL/LDL increased in poly group. The total cholesterol and triglyceride (TG) in liver decreased significantly in polysaccharide group compared with control group as well.

The q-PCR results showed that both the pep/AA and poly+pep/AA treatment activated the gene expressions of LXR- α and PPAR- α , the two major regulators of

hepatic lipid metabolism, in the liver.

However, the activation of LXR- α has not induced the activation of SREBP1c and ChREBP, as well as the downstream genes ACC1, FAS, and SCD1, therefore has not induced the process of lipogenesis. The gene expression of Insig2a, which could inhibit the activation of SREBP1c, has increased significantly in treated groups compared with control group, which may be the reason of inhibiting SREBP1c. Activation of LXR- α activated the gene expressions of ABCG5, ABCG8, and CYP7a1, so that increased the cholesterol efflux via bile acid. In the poly group, the genes involved in HDL and LDL metabolism, such as HMG-CoA reductase (HMG-CoAR) and LDL receptor (LDL-R) have been investigated, and the results showed that the gene expression of HMG-CoAR has been downregulated whereas the gene expression of LDL-R has not been changed. In the poly group, ABCG5 and ABCG8 were activated without activating LXR- α , which assumed the attention of many other compounds in the crude sample of poly group. The activity of SR-BI is associated with a reverse cholesterol transport that progresses by HDL. We confirmed that the activity of SR-BI in treatment groups compared with control group, which transferred cholesterol from other tissues to the liver for an efflux.

PPAR- α is a major transcription factor for fatty acid uptake and β -oxidation. In this research, it is not showed the direct activation of PPAR- α in the liver. However, the poly group induced the activation of CD36 that acted like a receptor of many compounds such as multifunctional proteins in poly group treatment, and so activated the β -oxidation in the liver.

Cholesterol that transferred to the liver by CD36 progresses peroxisomal β -oxidation by ACS and ACOX-1, and mitochondrial β -oxidation by CPT-1, respectively.

It has reported that activation of LXR- α or PPAR- α reduced the plasma levels of factors involved in inflammation. Therefore, we investigated the inflammatory factors in the plasma and found that the levels of CRP, TNF- α and IL-6 were reduce significantly in treated groups compared with control group, along with the reduction of mRNA levels of TNF- α and IL-6 in the liver.

In the poly group, the crude polysaccharide sample induced the reduction of total cholesterol, and the increase of HDL/LDL ratio, as well as the decrease of adipocyte

cell size and lipid accumulation in the liver tissue, via increased cholesterol efflux by the activation of ABCG5, ABCG8 and SR-BI. And the biosynthesis of lipids was decreased as well via the inhibition of HMG-CoAR and activation of β -oxidation by CD36.

In the pep/AA group, the crude peptide/amino acid sample suppressed the biosynthesis of lipids via activated LXR- α and Insig2a gene expressions in the liver. Moreover, the crude peptide/amino acid sample increased cholesterol efflux by the activation of ABCA1, ABCG5, ABCG8, CYP7a1 and SR-BI as well. Also, the gene expressions of LDL-R and LPL were increased, which lowered the VLDL and LDL level in plasma, so that the effects of the crude peptide/amino acid sample could be expected to reduce the occurrence rate of atherosclerosis and coronary heart disease (CHD).

Furthermore, inflammation that increases according to obesity was decreased by these samples as well.

■ Part 3 : Characterization of intestinal immune system modulating polysaccharide from Korean Ganjang (*in vitro*, *in vivo*)

Korean traditional soy sauce is a seasoning produced by fermenting soybeans and is ingredient in Korean cuisines. Recently, Korean soy sauce is considered to be not only a seasoning for the taste and flavor but also a functional ingredient for human health. The varying characteristics between traditional and commercial soy sauce may be initiated by raw materials and fermentation techniques such as *koji* and *mezu* process. In this work, we examined properties of polysaccharides isolated from two different soy sauces made by the commercial process (CSP-0) and the Korean traditional process (KTSP-0) as well as their immuno-stimulating activities. Both CSP-0 and KTSP-0 showed similar sugar compositions, but KTSP-0 was obtained as a higher yield than CSP-0. Anti-complementary activities of CSP-0 and KTSP-0 were increased dose-dependently but KTSP-0 (64.7%) was higher than CSP-0 (56%) at 1,000 μ g/mL. The effects of CSP-0 and KTSP-0 on murine Raw 264.7 macrophage functions were demonstrated by production of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin 6 (IL-6). CSP-0 and KTSP-0 significantly

augmented NO production by Raw 264.7 macrophages in a dose dependent manner. However the activity of KTSP-0 was more potent than that of CSP-0. The productions of TNF- α and IL-6 were determined by Real Time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TNF- α and IL-6 production by KTSP-0 at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed 2.6 and 28.7 fold higher than those by CSP-0, respectively. Also, the mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 were correspond to ELISA results. In order to assess phagocytosis activity, the effects of CSP-0 and KTSP-0 on mRNA expression of Fc receptor I and II (FcR I and II) were determined by PCR products. Only KTSP-0 showed enhanced expression of mRNA expression for FcR I by dose dependent manner whereas CSP-0 did not affect the both FcR I and II expression. These results suggest that the immuno-stimulating activity of Korean traditional soy sauce polysaccharide is higher than that of commercial soy sauce polysaccharide.

We isolated polysaccharides (KSSP-0) from improved Korean ganjang manufactured from only soybeans. And then, chemical properties and several immuno-stimulating activities of KSSP-0 were compared with those of overseas commercial soy sauce (JKSP-0) manufactured from soybeans and wheats. Both JKSP-0 and KSSP-0 showed similar sugar compositions, but KSSP-0 was obtained as a little higher yield than JKSP-0. Anti-complementary activity of KSSP-0 (40%) was higher than that of JKSP-0 (35%) at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. KSSP-0 significantly augmented nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production by Raw 264.7 macrophage cells in a dose dependent manner. However JKSP-0 did not show any inductions in NO and ROS production. The productions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by reverse-transcription PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TNF- α and IL-6 production by KSSP-0 at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed 30.3 and 3.0 fold higher than those by JKSP-0, respectively. Also, the mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 were correspond to ELISA results. However, when the effects of JKSP-0 and KSSP-0 on mRNA expression of Fc receptor I and II (FcR I and II) were determined by PCR products, only JKSP-0 showed enhanced expression for FcR II by dose dependent manner.

KSSP-0 and JKSP-0 were examined for intestinal immune system-modulating activity *in vitro*. Only KSSP-0 showed the higher bone marrow cell proliferation activity

through intestinal immune system than that of untreated group. And KSSP-0 and JKSP-0 from two different soy sauces showed the enhanced production of cytokines such as hematopoietic growth factor (GM-CSF) and IL-6 in culture supernatant of Peyer's patch cells, dose-dependently. Also JKSP-0 and KSSP-0 increased the IgA production by Peyer's patch cells in a dose-dependent manner.

To investigate the *in vivo* effects of soy sauce polysaccharides on intestinal immune system, including Peyer's patch cell proliferation, IgA production, and cytokine production, JKSP-0 and KSSP-0 were administered orally into the mice of four experimental groups (0.0, 0.5, 1.0 and 0.5 mg/mouse/day, 30 days). In an assay for Peyer's patch cell proliferation, the group fed with 5 mg/mouse/day of KSSP-0 showed higher activity than the other groups. Oral administration of JKSP-0 and KSSP-0 induced the IgA production by Peyer's patch cells and increased the IgA excretion into mouse feces in a dose-dependent manner. However, oral administration of KSSP-0 was more effective than that of JKSP-0 at the same dosage. The Peyer's patch cells obtained from the mice which were administered with KSSP-0 (5 mg/mouse/day) showed significantly higher IL-4 production whereas only JKSP-0 administered groups showed significantly higher IL-6 production by Peyer's patch cells than that of the untreated group. These results suggested that oral administration of KSSP-0, the polysaccharide from Korean ganjang might effectively activate Peyer's patch cells and IgA and several cytokines were produced by the activated lymphocytes, and it could induce the enhancement of systemic immune system. Also, the results indicated that the immuno-stimulating activity of the polysaccharide from Korean ganjang was much better than that of commercial one.

Above data lead us conclude that Korean ganjang contains select polysaccharides in addition to seasoning components, and these polysaccharides appear to provide immuno-stimulating activities beneficial to human health.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Contents and Results of research and development

Section 1 Optimization for separation of polysaccharide, amino acid/peptide from Korean ganjang and study on its intestinal immune function

Section 2 Research of functions and mechanisms of glucose and lipid metabolism of components extracted from Korean ganjang and the anti-obesity effect of components extracted from Korean ganjang

Section 3 Characterization of intestinal immune system modulating polysaccharide from Korean ganjang

Chapter 3. Level of target accomplishment and contribution to related fields

Chapter 4. Achievements of research and development and plans for utilizing research results

Chapter 5. Information on international scientific technology collected during research and development

Chapter 6. Specific requirement for the project

Chapter 7. Research equipment status

Chapter 8. References

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 2 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
제 1 절.	한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 조건 최적화 및 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가	25
제 2 절.	한식 간장의 당·지질 대사 조절 효능 평가 및 기작 연구 및 항비만 효능 평가	62
제 3 절.	한식 간장의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기작 규명	94
제 3 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	124
제 4 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	126
제 5 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	127
제 6 장	주요 연구사항에 대해 시행기관의 장이 요구하는 사항	128
제 7 장	연구시설·장비 현황	129
제 8 장	참고문헌	130

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는, 한국의 대표적인 발효식품 중 하나인 한식 간장의 건강기능성인 1) 항비만 효능 2) 장관면역 기능 (면역관용, 면역증진)을 한식 간장의 주 성분인 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드를 중심으로 연구하여, 한식간장의 기능적 차별성을 발굴하고, 이의 홍보를 통해 한식의 과학화와 고부가가치 창출에 기여하고자 함.

2. 연구개발의 필요성

- 간장은 대두를 주원료로 제조한 한국의 대표적인 발효식품으로 한국인의 식생활에 빠질 수 없는 식품 중의 하나로서 아미노산에 의한 구수한 맛, 당분에 의한 단맛, 소금에 의한 짠맛과 여러 가지 유기 성분에 의한 향기와 색깔이 조화된 이상적인 조미식품임.
- 특히 한식간장은 3첩, 5첩, 7첩, 9첩, 12첩 반상에 이르기까지 모든 반상에 포함될 만큼 상차림에 중요하게 여겨졌으나, 지금은 왜간장과 많이 혼동되고 있음.
- 일본에서는 일본식 간장(Soyu)의 건강기능성에 대한 연구를 활발하게 수행하여 다양한 기능성을 세계적으로 인정받고 있으며, 알러지 질환의 일종인 화분병과 장관 면역에 효능을 보이는 Soluble soy polysaccharide를 함유한 제품이 시판되고 있음.
- 일본식 간장의 기능성 연구에 따르면, 간장의 1%(w/v)를 차지하는 폴리사카라이드 성분이 만성 비염, 계절성 비염 감소 효과, 항알러지 효과를 나타냄. 또한 sIgA의 분비를 통하여 host 방어력을 증가시키며, IL-4, IgE, IFN- γ 등의 생산을 조절하여 Th1/Th2의 밸런스를 맞춰주어 전신면역 및 장관면역을 조절하고 있다고 보고하고 있음. 항알러지 효과는 간장 제조 과정 중 열처리 단계에서의 간장에서 유래한 폴리사카라이드에서는 나타나지 않아, 발효 과정에서 분해된 폴리사카라이드에서 유래한 기능임을 알 수 있음.
- 국내에서는 간장에 대한 연구 수행 정도가 미흡하여 일본의 8% 수준의 해외논문 발표가 이루어졌으며(된장의 경우는 한국과 일본이 전체 논문의 77%를 점유하고 있으며, 두 국가에서 비슷하게 주도함), 연구내용은 전통 간장의 항암, 혈압강화 및 면역조절 물질에 대한 기능성 연구가 일부 진행되고 있어 한식의 기능성 규명의 연구는 시급하게 진행되어야 함.

- 이웃국가인 일본에서는 소유, 미소, 나또 등의 발효식품의 기능성을 규명하여 일본음식은 건강한 음식이라는 컨셉을 통해 자국 뿐만 아니라 세계적인 확산을 도모하고 있으며, 현재 대부분 외국의 시장은 일본이 선점하여 장류라 하면 일본 상품이 그 대표성을 확보하고 있는 처지임

(단위: 백만원)

업체명 (국가)	시장점유율 (매출액)		상장여부
	국내	해외	
Kikkoman (일본)	국내	1% 이하	상장
	해외	63% (1,159,537)	
Ajinomoto (일본)	국내	1% 이하	상장
	해외	33% (9,616,726)	

반면, 국내에서는 한식간장에 대한 기능성을 체계적으로 규명하고자 하는 노력이 활발하지 못하여 한식의 우수성을 알리는데 한계가 있음

- 최근 식품을 포함한 천연물의 여러 폴리사카라이드에서 강력한 약리 활성이 있는 것으로 보고되고 있음. 식용 및 약용으로 사용되어온 한약재, 식품소재, 담자균류 등에서 유래한 폴리사카라이드에는 보체계 활성화(anti-complementary activity), 림프구 증식자극 활성화(mitogenic activity), 대식세포 증식활성(macrophage activity), 항염증활성(anti-inflammatory) 및 항암활성(anti-tumor activity) 등의 면역증강 활성이 보고되고 있어 이들의 활용이 주목되고 있음.
- 수용성 폴리사카라이드(soluble polysaccharide)는 장내세균에 의해 자화되어 유기산으로 변화하면서 장내 pH를 저하하여 장내 체류시간을 단축시킴으로써 정장작용에 도움을 주며, 간내 콜레스테롤치를 저하하는 효과가 있음. 또한 갈습대사에도 관여하여 갈습의 흡수촉진 작용과 대퇴골의 갈습 농도 저하 방지 효과가 확인되어 골다공증 예방 및 치료에 도움이 되고, 미네랄을 흡수 촉진하여 미네랄 보충에 도움을 준다고 보고되어 있음. 식물성 원료 발효 숙성 과정에 생성되는 수용성 폴리사카라이드는 항알러지 기능을 가지는 것으로도 보고되고 있음.
- 비교적 상세한 연구가 진행된 부분은 버섯 유래의 폴리사카라이드이며, 그 외에는 구조해명의 어려움으로 인하여 상대적으로 연구가 미진한 실정이며 단순 추출물의 형태가 대부분이고, 유효 성분의 연구와 응용은 초기 단계임.
- 체내 아미노산의 부족은 ATF4, TRB3 등의 활성 증가를 통해 대사 교란을 일으키는 것으로 보고되어 있음. 또한 아미노산의 양이 세포벽에 포도당 운반체(Glucose transporter, GLUT)의 생성에 영향을 주어 포도당의 흡수에도 관여하는 것으로 알려져

있음.

- 재래식 간장에서 소수성의 펩타이드를 분리하여 실험한 결과, 암세포주들에 대한 세포 독성을 나타내어 암 예방에 도움이 될 것으로 주장되고 있으며, 오랫동안 발효한 간장은 발효 숙성과정을 거치면서 주원료인 대두에서 유래된 각종 단백질, 펩타이드, 아미노산 성분들이 건강기능성을 높이는 것으로 알려져 있음
- 대두와 밀을 혼합하여 제조하는 일본식 간장과는 달리 한국 전통식 간장은 대두만을 발효하여 제조하기에 단백질 함량이 높고 섬유질이 풍부함. 본 연구를 통해 한식 간장에 풍부하게 포함된 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드의 기능성 규명을 통해 한식의 우수성을 충분히 입증하여 한식 세계화에 기여할 수 있을 것임
- 본 연구를 통해 한식 간장의 항비만 및 면역 조절 등 건강 기능성 효능 평가 및 기작 연구를 통해 한식 간장에 대한 보다 객관적이고 과학적인 근거를 마련하여 고부가가치화하고자 함.

제 2 절 연구내용

○ 제1세부기관

- 연구개발목표

한식간장의 기능성 소재인 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드의 분리방법을 확립하고, 장관면역 효능(면역 관용)을 평가하고자 함

- 연구개발내용

1) 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 방법 확립

- 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 방법 개발
- 해외 경쟁 제품과의 성분 비교 분석

2) 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 (*in vitro*)

- 배양세포계에서 염증성 사이토카인을 바이오마커로 하여 면역 관용 평가

3) 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 (*in vivo*)

- 한식간장의 폴리사카라이드 섭취에 의한 SCFAs 생성량 분석
- IBD 모델에서의 장관면역계 효능 평가

○ 제2세부기관

- 연구개발목표

한식 간장의 건강기능성인 당 및 지질 대사 및 항염증 효능을 평가하고자 함

- 연구개발내용

1) 한식 간장 유래 생리활성물질의 당·지질 대사 조절 효능 및 기작 연구 (*in vitro*)

- 배양세포계에서 한식 간장 유래 생리활성물질의 당·지질 대사 조절 효능 연구
- PPAR 핵수용체 조절을 통한 지질대사 당대사 조절효능 규명

2) 한식 간장의 항비만 효능 평가 (*in vivo*)

- 비만, 식욕, 당/지방 대사 등의 바이오마커를 관찰하여 한식 간장의 항비만 효능 평가
- 염증반응 바이오마커 관찰을 통한 한식 간장의 항비만(항염증) 효능 평가

○ 제3세부기관

- 연구개발목표

한식 간장 폴리사카라이드의 화학 특성과 다양한 장관면역기능을 평가하여 한식 간장의 우수성을 규명하고 기능성 소재 발굴에 기여하고자 함

- 연구개발내용

- 1) 한식 간장으로부터 폴리사카라이드의 분리 및 화학적 특성 규명
- 2) 한식 간장의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기작 규명 (*in vitro*)
- 3) 한식 간장 유래 활성화 폴리사카라이드의 장관면역 활성화 특성 평가 (*in vivo*)

제 3 절 연구개발에 따른 기대성과

- 전통간장의 항비만, 면역 기능성 자료 구축을 통한 세계 시장에서의 경쟁력 강화
- 한식 기능의 과학화를 통한 대외홍보 - 홍보 책자, 영상 등 콘텐츠 생산 활용
- 한식의 건강 기능성 규명 및 홍보 활동을 통한 한식의 소비 촉진 기여
- 한식이 지닌 건강 지향적 개념과 전통 문화적 요소 등을 결합하여 세계인이 부담 없이 즐길 수 있는 Asian 대표 한식 이미지 창출
- 한식의 기능성에 대한 기초 연구가 부족한 식품산업의 기초 자료로 활용
- 우리 전통음식과 식품의 우수성에 대해 학술적, 산업적으로 체계화

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 조건 최적화 및 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가

1. 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 방법 확립

가. 재료 및 실험방법

(1) 포르말데질소 분석

시료 5ml을 100ml 비이커에 칭량하고 증류수를 가하여 충분히 교반한 후 250ml m-flask에 넣고 비이커는 증류수로 충분히 씻어 m-flask에 넣고 250ml로 정용한 후 충분히 혼합하여 NO.2여지를 이용하여 100ml 삼각 플라스크에 약 90ml 정도 받고 25ml를 흡피펫으로 취한 후 0.1N NaOH를 사용하여 pH 8.4로 적정해둔 formaldehyde를 20ml를 넣고 pH8.4가 될 때까지 적정하여 소비량을 기록하여 산출하였다.

$$\text{성숙도}(mg\%) = \frac{(A - B) \times 1.4 \times \frac{25}{250} \times f \times 100}{S}$$

$$= \text{소비}(ml) \times 0.28$$

A : 시료용액 중화에 소비된 0.1N NaOH 용액 ml수

B : 바탕시험에 소비된 0.1N NaOH 용액 ml수

f : 0.1N NaOH 농도계수

S : 시료무게(g)

(2) 식염 분석

시료 5ml를 250ml m-flask에 넣고 mass up한 후 5ml를 취해 2% K₂CrO₄ 1ml를 넣고 0.02N AgNO₃로 적정하면서 노란색에서 붉은 색으로 변하는 시점에 소비량을 기록하여 산출하였다.

$$\text{NaCl}(\%) = \frac{\text{소비 ml} \times 0.00117 \times F}{\text{sample양} \times \frac{5}{250}} \times 100 = \frac{\text{소비 ml} \times F \times 5.85}{\text{sample양}}$$

(3) T-N 분석

시료 50ml(질소함량이 0.1mg 이상일 경우에는 희석)를 분해병에 넣고 알칼리성 과황산 칼륨 용액 10ml를 넣어 마개를 닫고 흔들어서 섞은 다음 고압증기멸균기에 넣고 가열한 후, 약 120°C가 될 때부터 30 분간 가열 분해하고 분해병을 꺼내어 방냉하였다. 전처리 한 시료의 상등액을 취하여 유리섬유 여지(GF/C)로 여과한 후 여액 25ml를 정확히 취하고 여기에 염산 5ml를 넣어 pH 2~3으로 하였다. 이 용액의 일부를 증장 10 mm 흡수셀에 옮겨 검액으로 하고 물 50

ml를 취하여 시료의 전처리 시험방법에 따라 시험하고 바탕시험액으로 하였다. 바탕시험액을 대조액으로 하여 220nm에서 검액의 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검량선으로부터 질소의 양을 구하여 다음 식으로 시료중의 총 질소 농도(mg/l)를 산출하였다.

$$\text{총질소 (mg N/l)} = a \times \frac{60}{25} \times \frac{1,000}{V}$$

a : 검량선으로부터 구한 질소의 양(mg)

V : 전처리에 사용한 시료량(ml)

(4) 아미노산 조성 분석

아미노산 조성은 AccQ-Tag 법을 이용하여 분석하였다. 즉, 시료 0.5g에 증류수를 가하여 초음파처리(sonication)한 용액을 50ml 취하여 붕산염 완충액(borate buffer) 350ml와 AccQ-Tag 유도체시약 100ml을 넣어 잘 혼합한 후 55℃에서 10분간 유도체화 하였다. 유도체화 되어진 시료를 각각 10ml씩 취한 후 HPLC의 자동시료주입기에 안치하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질은 40ml, 시료용액은 10ml을 HPLC에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, 컬럼(column)은 AccQ-Tag C₁₈(Millipore Co. Milford, MA, USA) 아미노산 분석 컬럼(amino acid analysis column)을 사용하였으며 이동상은 0.14 M 아세트산 나트륨 (sodium acetate)과 10% 트리에틸아민(triethylamine)을 1% 인산 (phosphoric acid) 으로 pH 5.02를 맞춘 용액(eluent A)과 물과 아세토니트릴(acetonitrile)을 4:6으로 혼합한 용액(eluent B)을 선형 구배(linear gradient)로 용출하였다.

Table 1. HPLC analysis condition for amino acid

항 목	실 험 조 건
장비(Instrument)	Waters 1525 Binary Pump, Waters 717 plus Autosampler, Waters 474 Fluorescence detector
컬럼(Column)	AccQ-Tag column C ₁₈
컬럼크기(Column size)	3.9 × 150 mm
용출용매 A(Eluent A)	0.14 M Sodium acetate, 10% triethylamine in water, pH 5.02
용출용매 B(Eluent B)	Acetonitrile : water = 6:4
구배(Gradient)	AccQ-Tag method
유속(Flow rate)	1.0 mL/min
가동시간(Run time)	45 min
파장(Wavelength)	ex. = 250 nm, em. = 395 nm

(5) 한식간장의 분자량 1000 dalton 이하 분획

한식간장에 함유된 아미노산·펩타이드를 분리하기 하기 위해 Ultrafiltration 방법을 통해 시료를 제조하였다. 한식간장 200 ml을 Ultrafiltration Kit(Amicon Co.), YM-10(molecular weight cut-off 10,000 dalton, Millipore Ltd., Milford, Mass.) membrane을 이용하여 분자량

1000 이하의 획분을 획득하였다. 또한, 한식간장의 분획물을 대량으로 확보하기 위해서 Ultra-filtration pilot 장비 (Biryong engineering co.)와 Spirapro HFK - 328 membrane(Koch membrane system co.)을 이용하여 간장 100 리터를 분획화 하였다.

(6) 아미노산·펩타이드 분리

한식간장 시료에서 거대분자(단백질, 폴리사카라이드 등)를 제거하기 위해 Ultrafiltration(MWCO 1000)을 수행한 후, 전기투석법을 이용한 desalting을 수행하여 염분 0.5% 미만의 시료를 제조한다. 여기서 spray drying을 통해 최종적으로 한식간장의 amino acid·peptide 시료를 제조 하였다. 그 모식도는 다음과 같다.



(7) 폴리사카라이드 분리

한식간장 시료에 absolute ethanol을 1:4의 비율로 첨가 후 room temperature에서 overnight reaction함. centrifuge(8,000rpm, 10분, 상온)를 통하여 상등액은 버리고, pellet만 수거하도록 함. pellet에 D.W를 첨가하여 수용성 폴리사카라이드를 녹임. M.W 12,000 다당류 dialysis membrane를 사용하여 dialysis를 overnight 실시함. dialysis가 끝난 시료를 동결건조를 overnight 실시하여 sample내 polysaccharide만을 수거하도록 함.

(8) 폴리사카라이드 분석

(가) 수용성 폴리사카라이드 수율은 다음의 계산법으로 도출됨.

$$\text{soluble polysaccharide (\%)} = \frac{\text{동결건조 sample weight} \times 100}{\text{초기 sample weight}}$$

(나) 한식간장의 폴리사카라이드 분석을 위한 Gas chromatography.

한식간장의 수용성 폴리사카라이드 시료의 다당류 패턴을 분석하고자 gas-chromatography를 실시하였음.

- a. 다당류의 GC 분석을 위해 acetylation하여 유도체를 제조함.
- b. 다음의 조건으로 GC 분석을 실시함.

Table 2. GC analysis condition for polysaccharide

항목	조건
Instrument	GC equipped for use with capillary column
Detection	F.I.D
Capillary column	supelco 2380 capillary column 30m, 0.25 μ m film thickness
Carrier, Flow rate	Helumn at 1mL/min
Split ratio	100:1
Zone temperature	Injector 250 $^{\circ}$ C Detector 270 $^{\circ}$ C
column temperature	60 $^{\circ}$ C -(30 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 220 $^{\circ}$ C (120min) -(8 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (15min)
Injection volumn	1.0 μ L

나. 결과 및 고찰

(1) Amino acid·peptide의 분획 및 구성 아미노산 분석

한식간장의 주요 성분인 Amino acid·peptide를 분리한 시료를 제조하였다. 한식간장에 YM-1(molecular weight cut-off 1,000 dalton) membrane을 이용하여 거대 분자를 제거하고 전기투석법을 이용하여 염분농도 0.5% 미만이 되도록 desalting하였다.

상기 방법을 통해 얻은 아미노산·펩타이드는 약 100g/L으로 높은 획득 수율을 보였다. 제조된 한식간장 Amino acid·peptide 시료의 유리아미노산 및 총아미노산을 분석한 결과 유리아미노산이 42.36g/100g, 총아미노산이 53.51g/100g으로, 펩타이드는 11.15g/100g으로 구성되어 있었다. (Table 3).

Table 3. Amino acid composition of ganjang

구 분	Amino acid content (%)			
	Free	% ¹⁾	Total	% ¹⁾
Glutamic acid	7.65	18.06	12.56	23.45
Aspartic acid	3.64	9.30	6.02	11.24
Threoinine	2.29	5.41	2.63	4.91
Serine	3.02	7.13	3.49	6.51
Proline	2.07	4.89	3.17	5.92
Glycine	1.60	3.78	2.45	4.57
Alanine	3.59	8.47	3.82	7.13
Tyrosine	0.27	0.64	0.38	0.71
Lysine	2.47	5.83	2.87	5.36
Cystein	0.42	0.99	0.48	0.90
Valine	3.37	7.96	3.48	6.50
Methionine	0.99	2.34	0.90	1.68
Isoleucine	2.93	6.92	3.11	5.81
Leucine	4.48	10.58	4.61	8.61
Phenylalanine	2.51	5.93	2.65	4.95
Histidine	0.58	1.37	0.67	1.25
Arginine	0.18	0.42	0.28	0.52
Total	42.36	100.00	53.51	100.00

¹⁾ Ratio to the total solid contents.

(2) 폴리사카라이드의 구성 당 분석

한식간장에서 폴리사카라이드는 약 15g/L 얻을 수 있었으며, 제조된 한식간장 폴리사카라이드 시료의 구성 당을 분석한 결과 xylose(20.0%)가 가장 많았으며, galactose(13.4%), fucos(9.0%)로 구성되었고 미량의 mannose, fucose, rhamnose, arabinose가 검출되었다 (Table 4).

Table 4. Component sugar composition of ganjang

구 분	Component sugar composition (%)
Rhamnose	5.8±0.6
Fucose	9.0±0.1
Arabinose	3.2±0.1
Xylose	20.0±0.6
Mannose	8.7±0.2
Galactose	13.4±0.7
Glucose	2.8±0.1
Gal A+Glc A	37.0±2.3

(3) 해외 경쟁 제품과의 비교 분석

해외 간장으로 간장제조의 오랜 역사를 지니고 있으며 세계시장점유율 1위 기업인 해외 기업의 가장 높은 시장점유율을 차지하고 있는 제품을 선정하여, 이를 한식간장과 비교분석하였음

< 일반성분 분석 >

구 분	한식간장	해외간장
TN(%)	1.63	1.67
염분(%)	16.5	17.0
pH	5.2	4.7
산도	14.9	22.2
총당(%)	0.42	3.1
환원당(%)	0.27	1.2

한식간장과 해외간장의 TN, 염분에서는 큰 차이가 없으나, 산도, pH, 총당, 환원당에서는 큰 차이를 보이고 있음. 한식간장은 밀을 사용하는 해외간장에 비해 콩만으로 제조하기 때문에 탄수화물유래의 당성분이 적은 반면, 밀을 사용하여 당성분이 높은 해외간장은 유기산발효가 왕성하여 낮은 pH와 높은 산도를 보이는 것으로 추정됨.

<유기산 분석>

(단위 : ppm)

구 분	한식간장	해외간장
Citric acid	8224	10433
Malic acid	8710	13613
Succinic acid	3637	1887
Lactic acid	16248	37639
Acetic acid	2197	1896
Pyroglutamic acid	4686	5696

한식간장은 해외간장에 비해 Succinic acid를 제외한 citric acid, malic acid, lactic acid를 적게 함유하고 있음. 이것은 앞서 일반분석에서 한식간장이 해외간장에 비해 pH가 높고 산도가 낮은 것이 유기산에 의한 것임을 보여주고 있음. 또한 이러한 특성이 한식간장의 부드러운 맛에 크게 기여하는 것으로 판단됨.

<아미노산 분석>

(단위 : %)

구 분	한식간장		해외간장	
	유리아미노산	총 아미노산	유리아미노산	총 아미노산
Glutamic acid	1.2	1.96	1.01	1.96
Aspartic acid	0.03	0.41	0.16	0.48
Threonine	0.37	0.41	0.3	0.34
Serine	0.52	0.57	0.43	0.48
Proline	0.38	0.44	0.39	0.53
Glycine	0.32	0.44	0.23	0.34
Alanine	0.98	1.05	0.73	0.74
Tyrosine	0.04	0.05	0.05	0.09
Lysine	0.58	0.64	0.41	0.46
Cystein	0.13	0.18	0.04	0.09
Valine	0.46	0.52	0.44	0.48
Methionine	0.16	0.14	0.14	0.14
Isoleucine	0.45	0.48	0.40	0.43
Leucine	0.67	0.73	0.62	0.65
Phenylalanine	0.38	0.42	0.37	0.39
Histidine	-	0.09	0.17	0.30
Arginine	0.09	0.13	0.47	0.55
합 계	6.76	8.66	6.35	8.45

¹⁾-: not detected.

한식간장과 해외간장의 아미노산함량을 비교해 보면, 총 아미노산중 glutamic acid는 한식간장과 해외간장이 각각 1.96%로 동일하지만, 감칠맛의 주성분으로 알려져 있는 유리형태의 glutamic acid는 한식간장(한식간장 1.2%; 해외간장 1.01%)에서 더 높게 나타나고 있다. 이렇게 해외간장이 유리형태의 glutamic acid 함량이 한식간장에 비해 낮은 함량을 보이는 것에서 낮은 pH가 관여한 것으로 보임. pH가 낮을수록 glutamic acid가 안정한 형태의 pyro-glutamic acid로 전환됨이 알려져 있음. 그리고 단맛의 특성을 나타낸다고 알려진 유리 아미노산(Threonine, Serine, Proline, Glycine, Alanine, Tyrosine, Lysine)의 총 함량이 한식간장의 경우 3.19%인 반면, 해외간장은 2.54%로 한식간장에서 단맛 특성의 유리아미노산이 높음을 알 수 있음. 이와 같은 차이는 간장 제조시 원료의 차이, 발효과정 중 미생물 유래의 단백질 분해효소의 차이, 간장 제조시 관여하는 미생물의 대사 차이 등이 복합적으로 관여한 것으로 보임.

(4) 간장의 염분 농도

전세계적으로 나트륨 과다섭취로 인한 고혈압을 비롯한 심혈관계 질환에 대한 우려가 높아지고 있다. 한국인은 국, 찌개에서의 염분 섭취량이 많아 식단에서의 저염화가 필요한 실정이나, 단순하게 음식에 들어가는 나트륨의 양을 줄일 경우 맛에 대한 만족도도 함께 떨어진다는 문제가 있다.

간장에 풍부하게 포함되어 있는 아미노산·펩타이드와 같은 성분들은 짠맛을 더 잘 느낄 수 있도록 해준다고 보고되고 있다(맛의 상승효과). 그래서 간장을 사용하여 나물, 국 등의 요리를 조리하였을 때, 소금의 60% 수준의 나트륨 함량으로도 요리의 전반적 맛 강도와 만족도가 높게 나타난다. 이에 간장이 적은 염분 섭취를 할 수 있는 방안으로 기대되고 있다. (Stefanie, K et al., 2009)

2. 한식간장의 면역관용 평가 (*in vitro*)

가. 실험재료 및 방법

(1) 세포주 및 배양

세포주는 human 단핵구인 THP-1, mouse 대식세포인 Raw264.7, human 장세포인 HT-29 세포를 이용하였으며, 배양접시 바닥에 접종한 후 페니실린(100IU/ml), 스트렙토마이신(100 μ g/ml), 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 medium(Welgene, Korea)을 넣고 37 $^{\circ}$ C를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

(2) 검액의 조제

butyrate, 한식간장의 아미노산·펩타이드, L-glutamine과 L-Leucine을 시료로 사용하였다. 각각의 시료 농도는 WST-1 assay를 통하여 예비실험을 진행한 후 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 선택하였다. 시험 물질은 세포 배양 배지로 희석하여 사용하였으며, 예비시험 후, 효력을 나타내는 농도를 찾아 선정, 검액의 항염 효능을 확인하였다. 양성 대조군 역시 세포 배양 배지로 희석하여 전처리하였다.

(3) 세포독성시험

시험 시료의 독성을 확인하기 위하여, 각 세포에서 세포독성을 측정하였다. 96 well plate에 각각의 세포를 적당한 농도로 분주한 다음 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고, PBS로 세척한 후, 검액 및 새로운 배지(serum free) 배지를 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 이후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 배양세포 부피의 1/10로 처리하거나 배지에 희석하여 이를 각 well 당 100 μ l씩 처리하여 1시간 동안 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) TNF- α assay

cell을 48 well plate에 well 당 알맞은 농도로 분주한 후 THP-1에는 LPS 0.5 μ g/ml, Raw264.7에는 LPS 500ng과 시료를 혼합 또는 단독으로 처리하여 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 수거하여 ELISA법으로 TNF- α 양을 측정하였다. 한편, 세포는 PBS로 세척한 후, 1N NaOH로 lysis 시켜 총 단백질 양을 측정하여 일정 단백질 당 TNF- α 분비 양을 구하였다. 각각의 TNF- α 양과 단백질 양은 검량선에 따라 계산하였다.

(4) NF- κ B western blot analysis

HT-29 cell을 6 well plate에 well 당 알맞은 농도로 분주한 후 시간별로 TNF- α 10ng/ml 과 시료를 혼합 또는 단독으로 처리하여 배양하였다. 배양된 세포는 DPBS로 3회 washing 후 Proprep buffer로 세포를 깨서 세포 내 단백질을 얻는다. Bradford assay를 통해 단백질을 정량 후 western blot analysis를 통해 NF- κ B의 활성을 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 세포독성 평가

시료의 *in vitro* 세포독성은 세포의 미토콘드리아 활성에 의존하여, 세포의 생존을 결정할 수 있는 WST-1 반응액에 의해 측정되어졌다. 세포생존율은 각 세포에서 평가하였으며, 시료를 제외한 배양배지만 처리한 값 (control)에 대한 백분율로 나타내었다.

그 결과, butyrate는 THP-1 세포에 대해 3mM 농도까지, Raw264.7 세포에서 100mM 농도까지 HT-29 세포에서 3mM 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. rapamycin은 THP-1 세포에서 1 μ M 농도까지, HT-29 세포에서 10 μ M 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. Raw264.7 세포에서 한식간장 아미노산·펩타이드는 1000 μ g/ml까지, L-Glutamine과 L-Leucine은 1000mM까지 세포독성 실험 결과 모두 80% 이상의 생존율을 보였다.

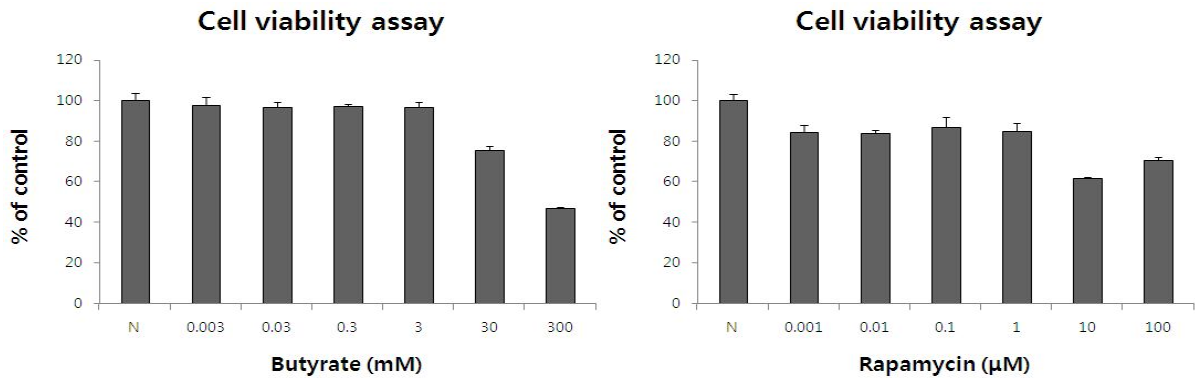


Fig. 1. Cytotoxicity of butyrate and rapamycin on THP-1

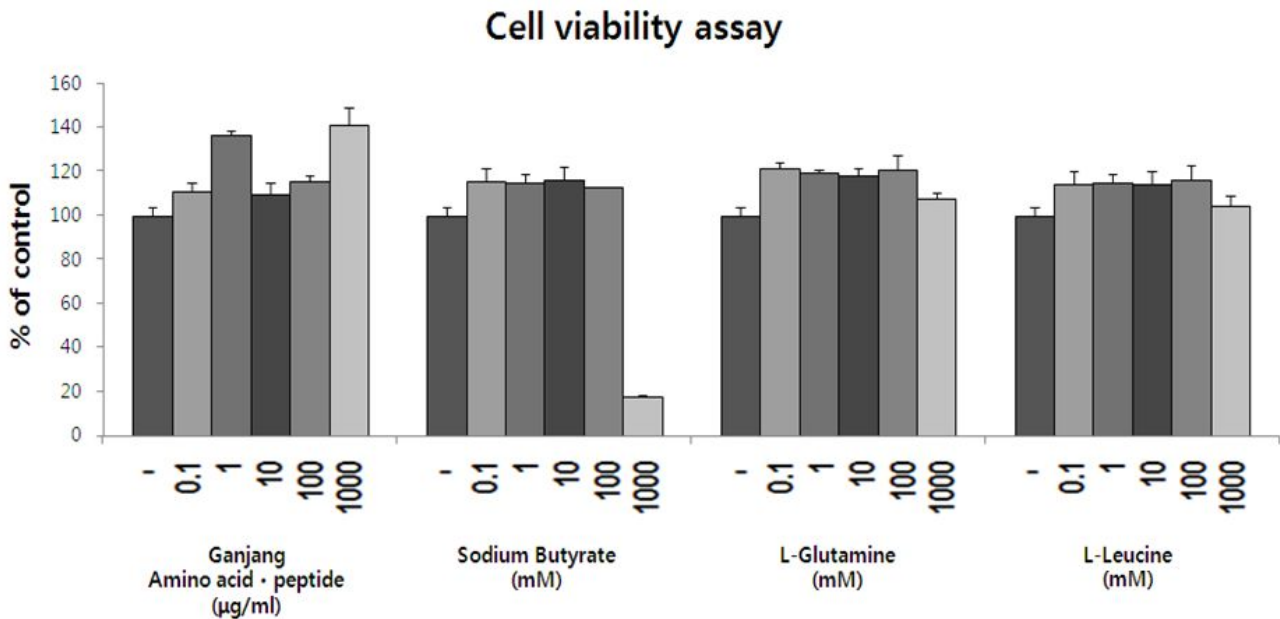


Fig. 2. Cytotoxicity of Korean ganjang extract(amino acid · peptide), butyrate, L-glutamine and L-Leucine on Raw264.7

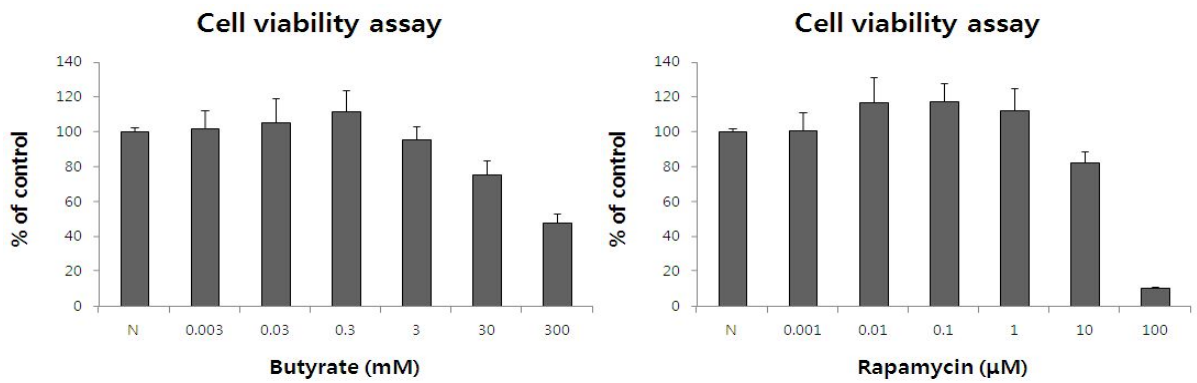


Fig. 3. Cytotoxicity of butyrate and rapamycin on HT-29

(2) TNF- α assay

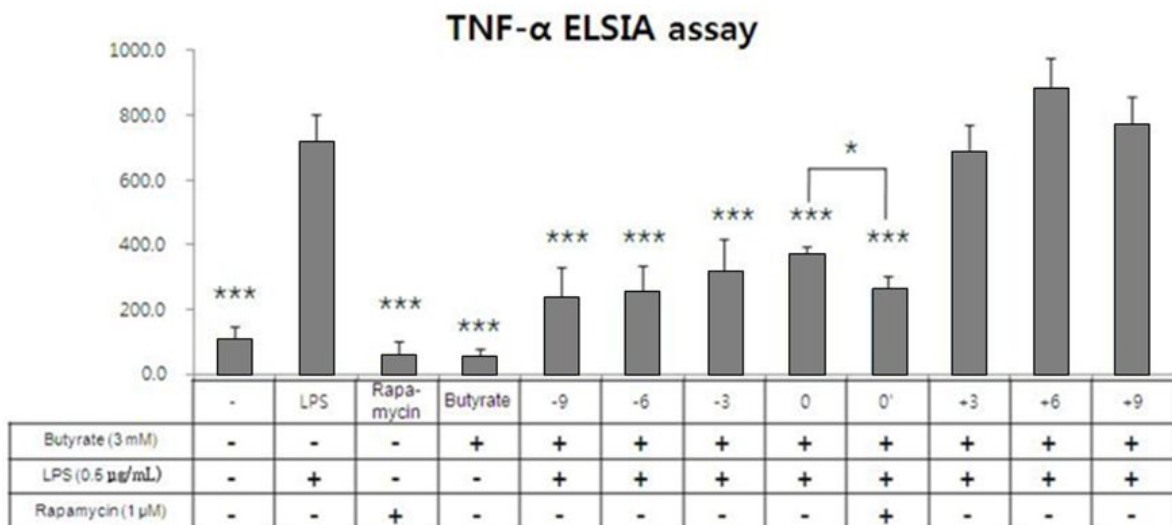
염증에 관여하는 면역세포는 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 TNF- α 가 과도하게 생성되면서 염증이 유발된다. 따라서 본 시험 역시 면역세포인 THP-1 세포와 Raw264.7 세포에 LPS로 염증을 유도하여 시료의 TNF- α 억제능을 평가하였다. 시험에 사용된 농도는 앞서 진행한 세포독성시험을 통해 독성이 없는 농도를 설정하여 평가하였다.

LPS를 처리하였을 때, 처리하지 않은 대조군에 비해 TNF- α 가 유의적으로 증가함을 통해 THP-1 세포와 Raw264.7 세포가 LPS에 의해 염증이 유도됨을 확인할 수 있었다.

이를 바탕으로 Butyrate를 THP-1 세포에 LPS 처리 시간을 기준으로 전처리(-9, -6, -3 시간), 동시처리 그리고 후처리(+3, +6, +9)하여 생성된 TNF- α 양을 측정하였다.

그 결과, butyrate는 전처리, 동시처리군에서 LPS에 의한 TNF- α 생성 억제 효능을 보였다 (Fig. 4).

한식간장 아미노산 · 펩타이드, butyrate, L-glutamine, L-Leucine는 Raw264.7 세포에 LPS와 동시처리하였는데, 이 역시 LPS에 의한 TNF- α 생성 억제 효능을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).



(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005)

Fig. 4. TNF- α assay of butyrate on THP-1

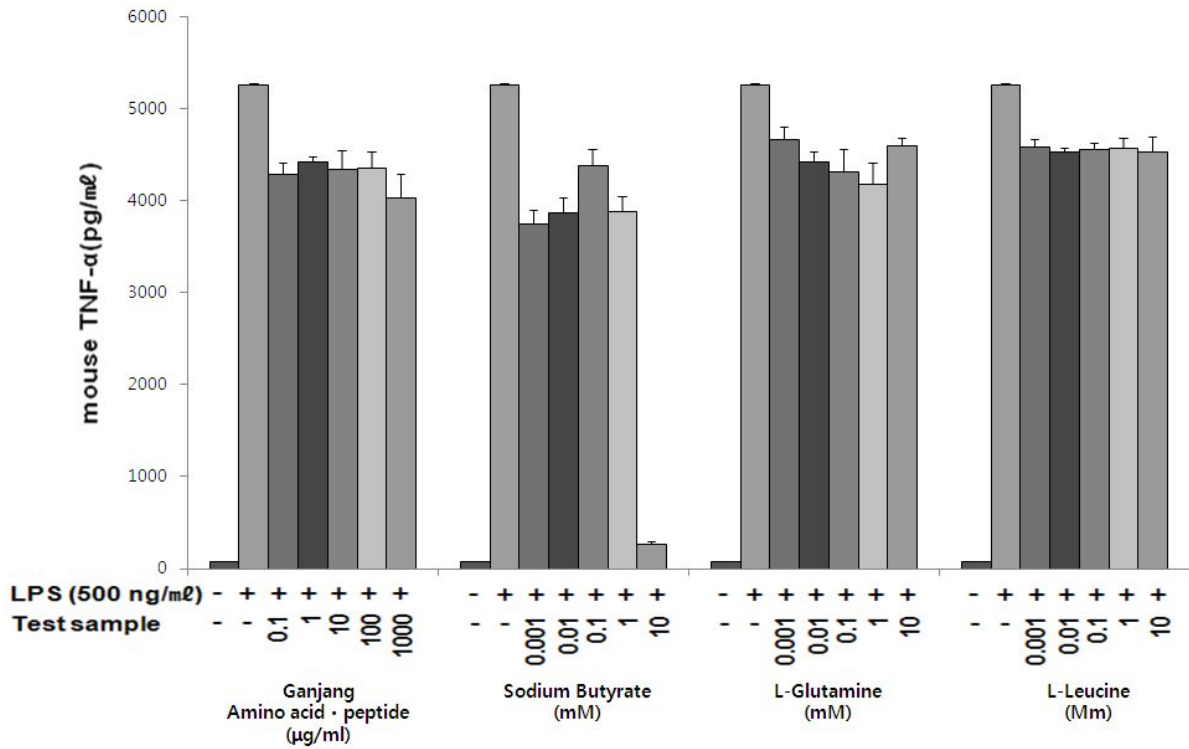


Fig. 5. TNF- α assay of Korean ganjang extract(amino acid, peptide), butyrate, L-glutamine and L-Leucine on Raw264.7

(3) NF- κ B western blot analysis

NF- κ B는 세포에서 면역반응 또는 염증반응에 중요한 신호전달 물질로 알려져 있으며, phospho 형태로 활성화되면 핵내로 들어가 염증관련 사이토카인의 전사인자로 작용한다. 또한 butyrate에 의해 NF- κ B가 억제된다는 보고가 있었다. 따라서 본 실험에서 장내 세포인 HT-29 세포에서 butyrate에 의한 NF- κ B 활성 억제 효능을 처리 시간에 따라 평가하였다. 그 결과 NF- κ B의 활성이 TNF- α 에 의하여 증가되는 것은 확인하였으나 반복되는 실험에도 시료 처리군 별로 NF- κ B 활성 차이를 확인할 수 없었다.

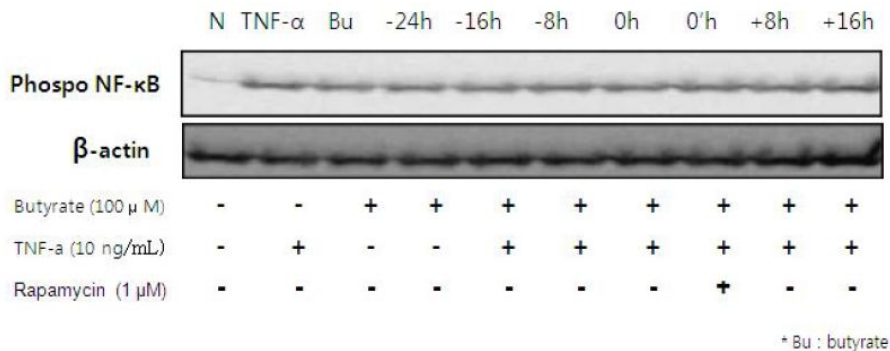


Fig. 6. Western blot analysis of butyrate on HT-29

3. 한식 간장 유래 폴리사카라이드를 제공하여 혈액 및 장관에서 단쇄지방산 분석

가. 실험재료 및 방법

(1) 실험동물 및 설계

SD rats을 대상으로 한식간장 폴리사카라이드 저용량, 한식간장 폴리사카라이드 고용량, 탈염 한식간장을 3주간 경구투여함.

구분	실험시료
CON	-
PL	폴리사카라이드 100mg/kg/day
PH	폴리사카라이드 200mg/kg/day
KG	탈염 한식간장 1100mg/kg/day

(2) 시료 수거 및 실험 방법

랫트를 새로운 깔개 위에 둔 후 아무런 자극없이 자연적으로 분비되는 분변을 모아 -80°C deep freezer에 보관하였다가 LC로 단쇄지방산 분석을 진행하였음. 랫트를 킬링 후 맹장 조직을 적출하여, 맹장에 있는 내용물을 분리하여 -80°C deep freezer에 보관하였다가 LC로 단쇄지방산 분석을 진행하였음.

랫트 킬링 후 심장 채혈하였고, 원심분리하여 Plasma만을 GC-TOF-MS를 이용하여 단쇄지방산 분석하였음.

(3) GC-TOF-MS를 활용한 plasma 내 단쇄지방산 분석

(가) 지방산 대사체 성분 추출 및 유도체화

시료 내 지방산 성분을 추출하기 위하여 1.5mL eppendorf tube에 시료 50µL와 80% methanol 500µL를 넣고 1분간 vortexing 시켰다. 여분의 단백질을 제거하기 위하여 얼음 속에 10분간 시료를 방치한 후, 상온에서 30분간 sonication을 이용하여 용매추출한 후 원심분리를 수행하였다(4°C, 3,000rpm, 15min). GC-MS를 이용한 대사체 분석은 기기 특성상 모든 물질을 휘발성으로 변환시켜주는 방법이 필요하다. 따라서 비휘발성 물질을 휘발성으로 바꿔주는 derivatization 방법이 필요하며, derivatization reagent 반응을 위해서 시료에 존재하는 수분을 최대한 제거시켰다. 추출하여 원심 분리한 용액 중 상층액 500µL를 취하여 eppendorf tube에 넣은 후 centri-vap에서 30°C, 24시간 이상 완전 건조시켰다. 본 실험에서는 TMS-derivatization을 위해 N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) REAGENT를 사용하였다. 완전 건조된 시료에 acetonitrile 70µL, BSTFA 70µL를 넣고 65°C에서 90분간 반응 시킨 후, 상온에서 냉각시켰으며, autosampler vial에 담은 후 GC-TOF-MS로 분석하였다(Fig. 7).

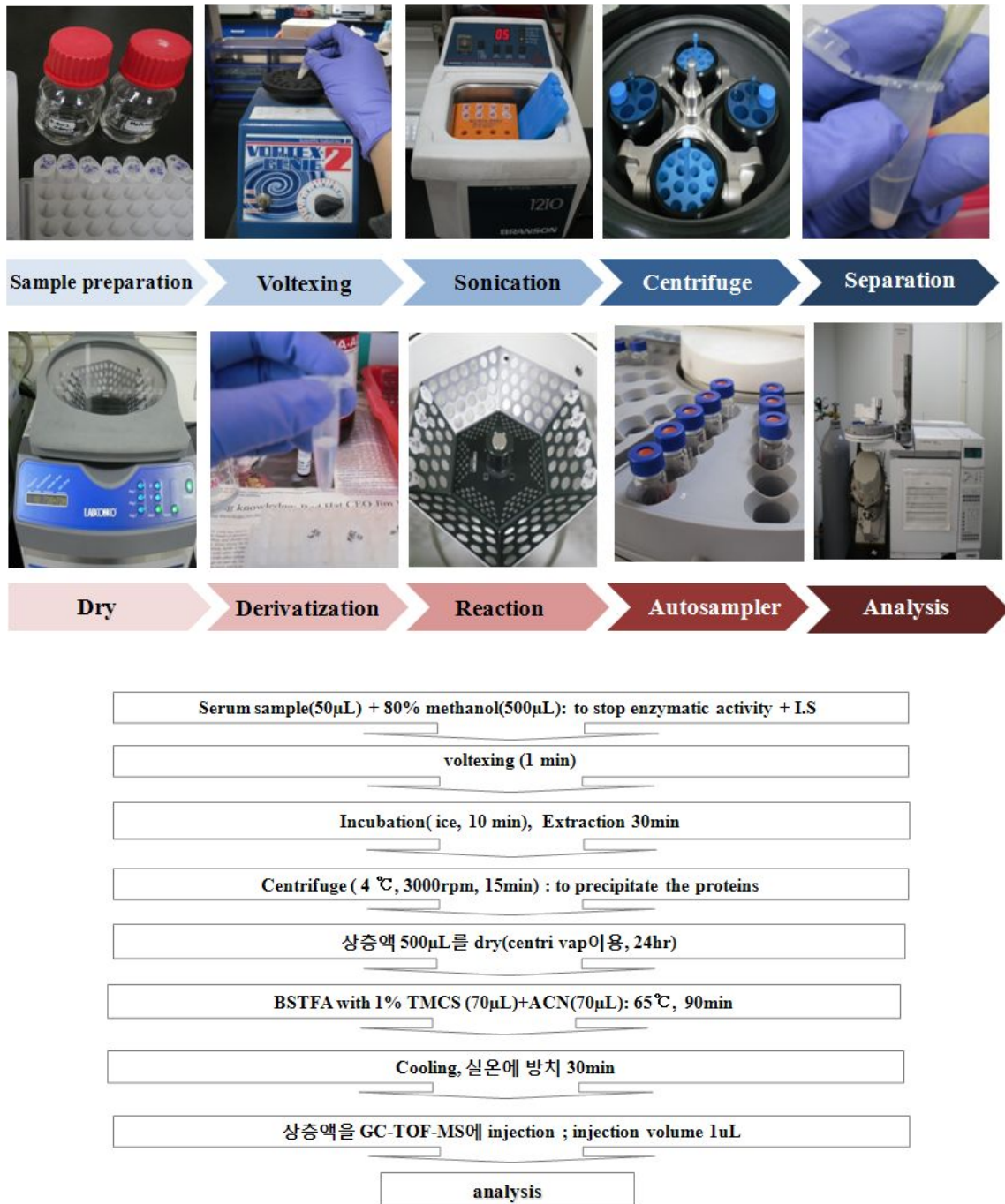


Fig. 7. The procedure for the analysis of fatty acids in plasma

(나) GC-TOF-MS를 이용한 지방산 대사체 성분 분석

Agilent 6890N gas chromatograph에 연결된 time-of-flight(TOF) Pegasus III mass spectrometer(Leco, St. Joseph, MI, USA)에 DB-5MS column (30m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 장착하여 사용하였다. 생체 시료 내 지방산 대사체 성분을 분석하기 위한 GC-TOF-MS 조건은 다음과 같다(Table 5).

Table 5. GC-TOF-MS conditions

Column	DB-5MS column (30m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
injector temperature	250 °C
flow rate	0.8 mL/min
oven temperature	85 °C (5min) → 8 °C/min → 205 °C (5min) → 8 °C/min → 300 °C (5min)
split ratio	splitless
mass conditions	detector transfer line temperature 250 °C mass scan range 35 - 550 a.m.u. mass spectrometer acquisition rate 20 scans s ⁻¹ 70 eV electron ionization mode

(다) 지방산 대사체 성분 동정 및 정량 분석

GC-TOF-MS로 분석된 혈액의 지방산 대사체 성분들은 Chroma TOF에 의해 자동 deconvolution 되었으며, mass spectrum data를 근거로 Chroma TOF에 mass spectral database(mainlib과 Wiley 8 library 및 standard compound로 직접 작성한 user library)를 이용하여 동정하였다. 내부표준물질로 tropic acid (1,000ppm w/v in 80% methanol) 20 μL를 사용하였으며, 이것의 peak area에 대한 각 성분들의 peak area를 비교하여 독립적인 3반복 결과의 평균값과 표준편차로 정량값을 제시하였다.

나. 연구 결과 및 고찰

(1) 맹장내용물과 대변 내 단쇄지방산 분석 결과

acetic acid가 동정된 지방산 중 가장 높은 수준으로 검출되었음. 맹장내용물과 대변 내 단쇄지방산 분석 결과 폴리사카라이드의 용량별 섭취와 단쇄지방산 생성량의 상관성이 없는 것으로 나타남. 한식간장을 섭취시킨 군의 대변에서 단쇄지방산 함량이 다른 군과 비교하여 높게 나타남.

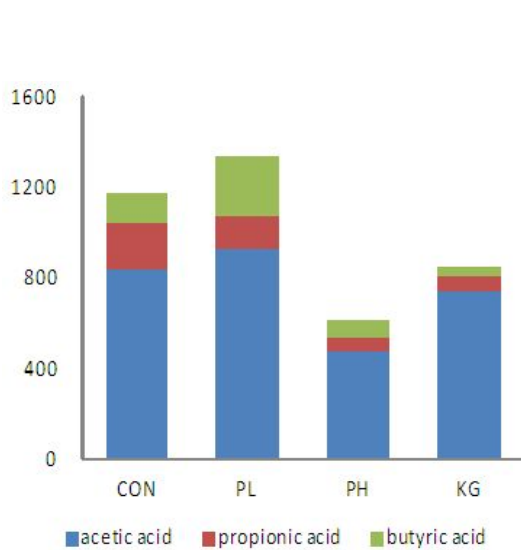


Fig. 11. Levels of fatty acids in cecal content

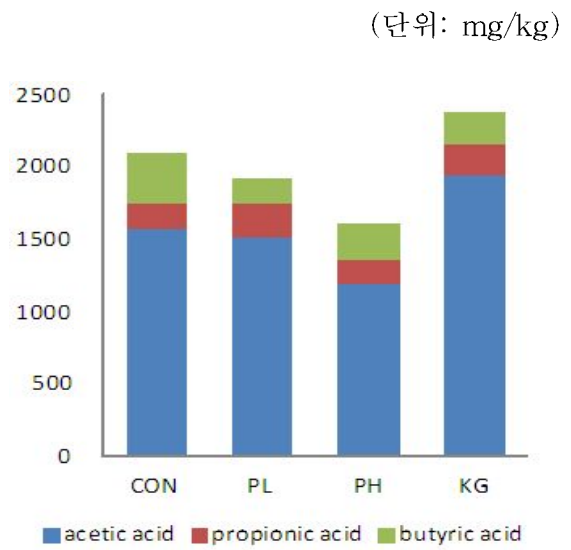


Fig. 12. Levels of fatty acids in feces

(2) Plasma 내 단쇄지방산 분석 결과

Propionic acid는 동정된 지방산 중 가장 높은 수준으로 검출되었으며, 폴리사카라이드 고용량군과 한식간장군이 높은 함량으로 나타났으나, 그룹간 유의적인 차이는 보이지 않았다. butyric acid는 대조군과 폴리사카라이드 저용량군이 폴리사카라이드 고용량군과 한식간장군에 비해 유의적으로 함량이 높았다. 각 그룹별로 동정된 지방산 대사체를 전체적으로 비교한 결과 대조군과 폴리사카라이드 저용량군에 비하여 폴리사카라이드 고용량군과 한식간장군이 동정된 일부 지방산의 함량이 전반적으로 낮은 수준이었다. 이에 한식간장의 폴리사카라이드 섭취가 단쇄지방산 생성과 큰 연관성이 없다고 결론내림.

Table 6. Levels of fatty acids in plasma

Metabolites	RT	Relative peak areas			
		CON	PL	PH	KG
Propionic acid	6.48	20.43±5.53 ^a	19.58±5.42 ^a	21.49±8.17 ^a	21.52±3.36 ^a
Butyric acid	9.13	2.88±1.52 ^c	2.36±0.66 ^{bc}	1.76±1.06 ^a	1.96±0.61 ^{ab}
Palmitic acid	24.36	2.31±1.28 ^b	2.60±1.40 ^b	1.45±0.57 ^a	1.18±0.25 ^a
Linoleic acid	28.10	0.35±0.19 ^b	0.31±0.10 ^{ab}	0.34±0.18 ^b	0.25±0.08 ^a
Oleic acid	28.17	0.33±0.18 ^b	0.32±0.15 ^b	0.29±0.16 ^{ab}	0.22±0.07 ^a
Stearic acid	28.49	3.30±1.64 ^b	3.41±2.13 ^b	1.42±0.70 ^a	1.39±0.25 ^a
Linolenic acid	30.38	0.09±0.05 ^C	0.07±0.02 ^{ab}	0.08±0.02 ^{bc}	0.06±0.02 ^a

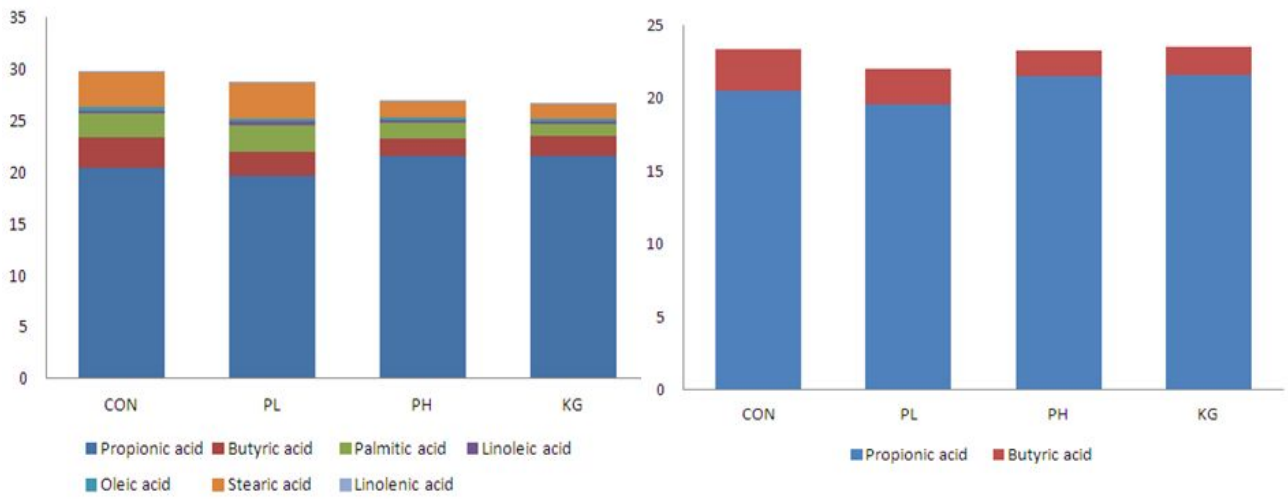


Fig. 13. Relative peak areas of fatty acids in plasma

4. 한식간장의 장관염증반응 억제 효과 규명 (*in vivo*)

가. 재료 및 실험방법

(1) 실험 동물

생후 7주령의 SD rats를 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후에 8주령부터 실험에 들어감. 실험동물은 온도 (21~23°C), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 적응기간 중 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하여 적응 후 실험 식이를 공급함.

(2) 실험 설계

시험의 설계는 SD rat 60마리를 대상으로 일반 식이만을 공급하는 대조군 (CON, n=10)과 DSS 유도하여 일반 식이를 공급군 (DSS, n=10), DSS유도와 한식 간장에서 분리한 폴리사카라이드 저용량 공급군 (PL, n=10), DSS유도와 한식 간장에서 분리한 폴리사카라이드 고용량 공급군 (PH, n=10), DSS유도와 한식 간장에서 분리한 아미노산 펩타이드 공급군 (AP, n=10), DSS유도와 탈염 한식간장 공급군 (SN, n=10) 으로 나누어 3주간 실험을 진행함 (Fig. 14).

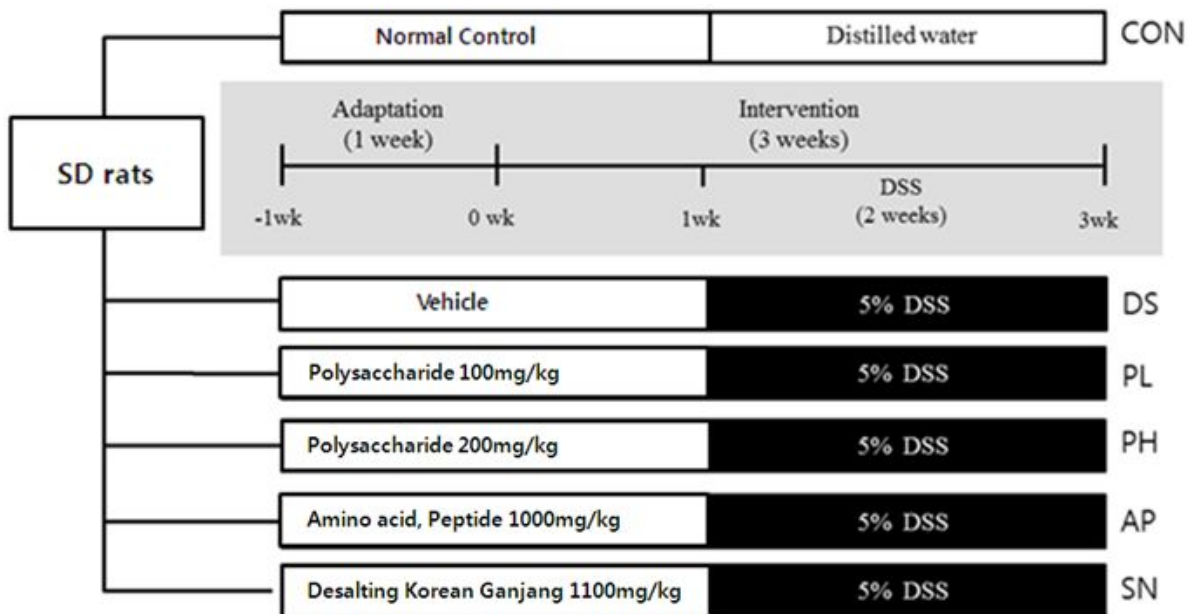


Fig. 14. Experimental design

1주의 적응 기간을 거친 뒤, 3주간 하루 한 번씩 일정한 시간에 각 시험물질을 강제 경구로 투여함. 총 3주의 시험기간 중 후반기 2주 동안 IBD 유도를 하기 위해 대조군은 증류수를, 대조군을 제외한 나머지 5군은 5%의 DSS를 식수로 자유롭게 공급함.

(3) 분석 지표

한식 간장의 장관 염증반응 억제 기능을 다음과 같은 분석지표를 통하여 확인함 (Table 7).

Table 7. Biomarkers on IBD on Korean Ganjang extracts

지표	측정 항목	
일반 지표	식이 섭취량, 물 섭취량, 체중 변화량 장기 및 조직 무게 : 간, 비장, 대장	
염증 관련 지표	Plasma	CRP
	Colon	MPO level, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , iNOS
	Histopathology	Disease activity index (DAI), colon length, histological analysis

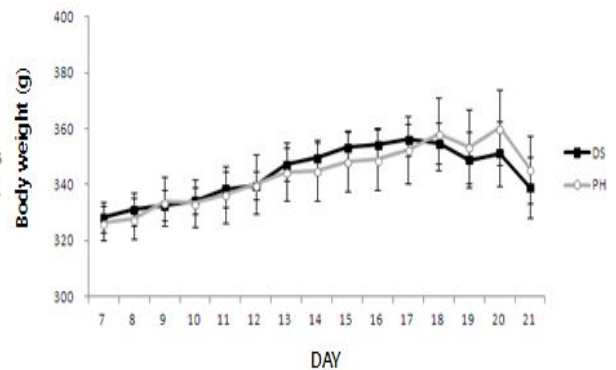
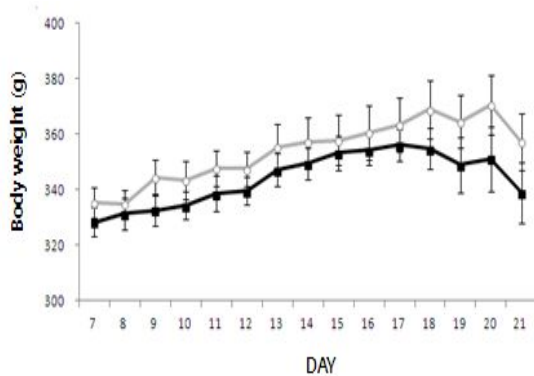
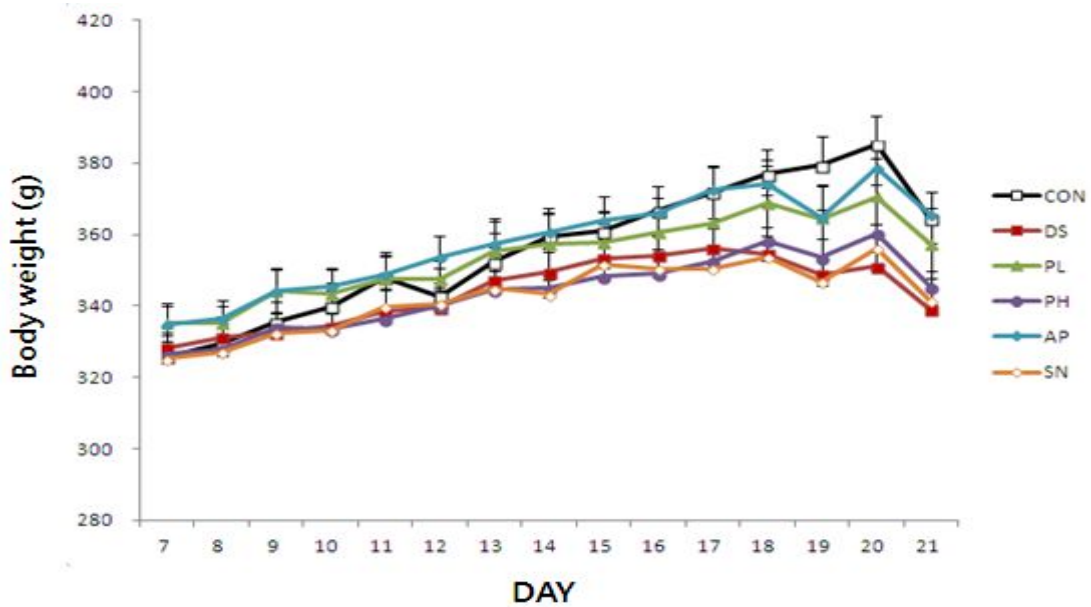
(4) 동물 실험 자료 및 시료의 수집 · 처리

- ① 체중은 주 5-7회 일정한 시각에 측정하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 2시간 공복 상태에서 측정함.
- ② DSS 유도 기간 동안, 각 개체의 매일 혈변 정도, 경도, 체중의 변화량을 0-4점으로 나누어 점수를 준 뒤, 이 3가지의 점수의 평균을 매일의 disease activity index (DAI)로 평가함.
- ③ 사육이 끝난 실험동물은 12시간 이상 절식시킨 후, 마취제 (Zoletile/Xylazine HCl)를 이용하여 마취 후, 개복하여 심장에서 채혈하여 EDTA 처리 후 혈장을 분리함.
- ④ 간, 비장 및 대장조직을 적출하여 무게와 길이를 측정함.
- ⑤ 적출한 조직은 액체 질소로 급속 동결 시켜 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관해 시료로 사용함.
- ⑥ 대장 조직의 일부는 Histological 분석을 위하여 10% 포르말린 용액에 고정 후, 파라핀으로 포매하여 H&E염색함.

나. 연구 결과

(1) Body weight

- 실험기간 동안의 체중 변화를 측정함 (Fig. 15).
- CON군과 비교하여 DSS유도군인 DS, PL, PH, AP 및 SN군의 체중의 감소가 점진적으로 나타났음.
- 총 3주 동안의 체중 변화를 비교한 결과, DSS유도군인 DS, PL, PH, AP 및 SN군이 CON군에 비해 체중 변화의 감소 경향을 보였음 ($p=0.04$). PL, PH 및 AP군에서는 DS군과 비교해 체중의 증가가 큰 경향을 보였음.



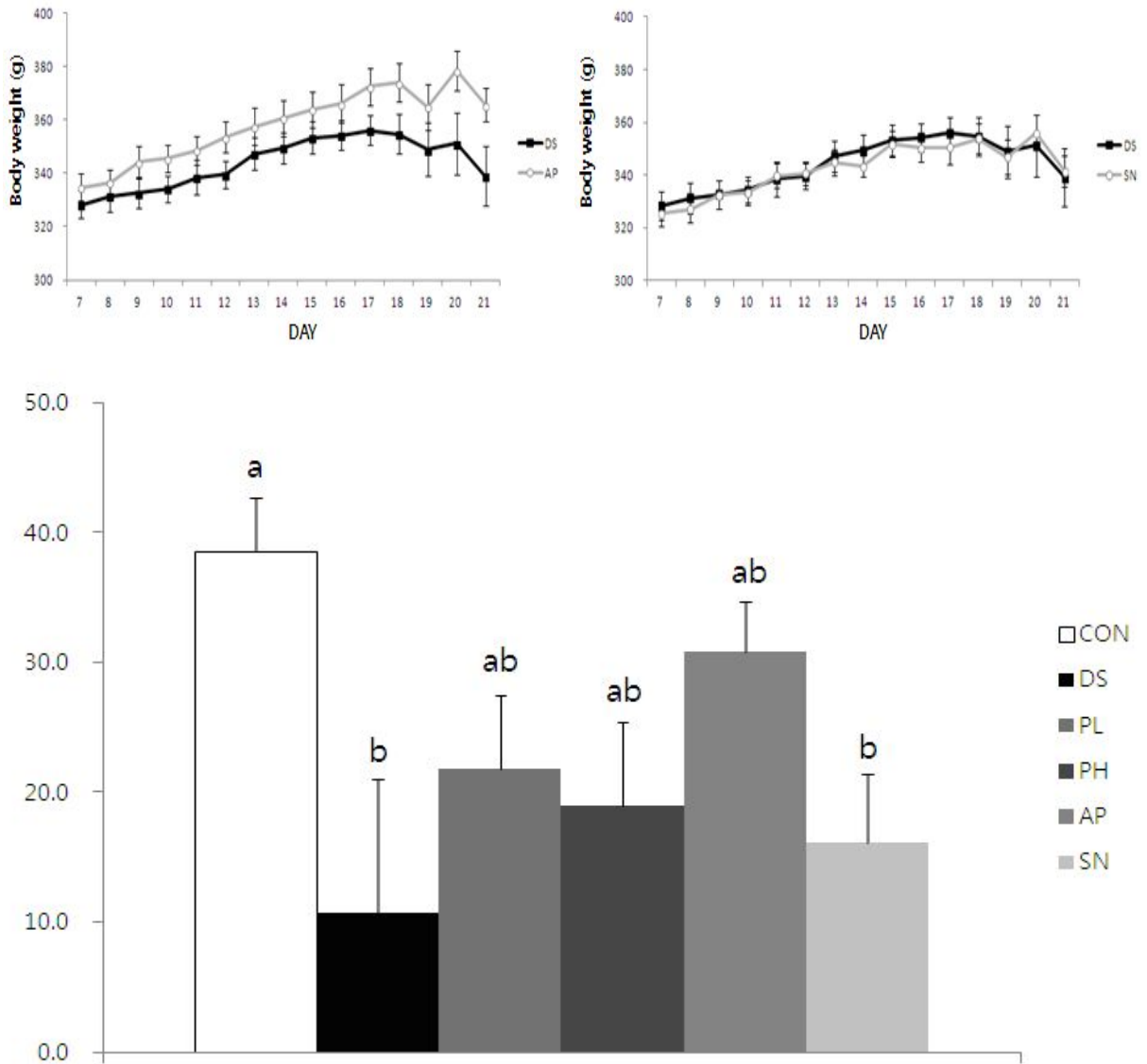


Fig. 15. The effects of Korean ganjang extracts administration on Body weight change in rats for experimental period

(2) Disease Activity Index (DAI)

- 실험 기간 동안 DAI를 평가함 (Table 8).

Table 8. Guideline of Disease Activity Index

Score	Weight loss (%)	stool consistency	Fecal occult blood
0	<0	Normal	Normal
1	1-5	-	-
2	6-10	soft	slightly bloody
3	11-20	loose	bloody
4	>20	diarrhea	severe bloody

- 총 14일간 DSS를 통한 대장염을 유도한 결과, DSS 유도 2일째부터 14일째까지 CON군과 비교해 대장염을 유도한 DS군, PL군, PH군, AP군 및 SN군에서 유의적으로 DAI가 증가하였음 ($p < 0.001$). 특히 AP군에서 DS군과 비교해 DAI가 낮게 평가되었음. (Fig. 16).
- DAI가 증가하는 기울기를 분석한 결과, PL군, PH군, AP군 및 SN군이 DS군과 비교하여 낮은 경향을 보임 ($p = 0.03$).

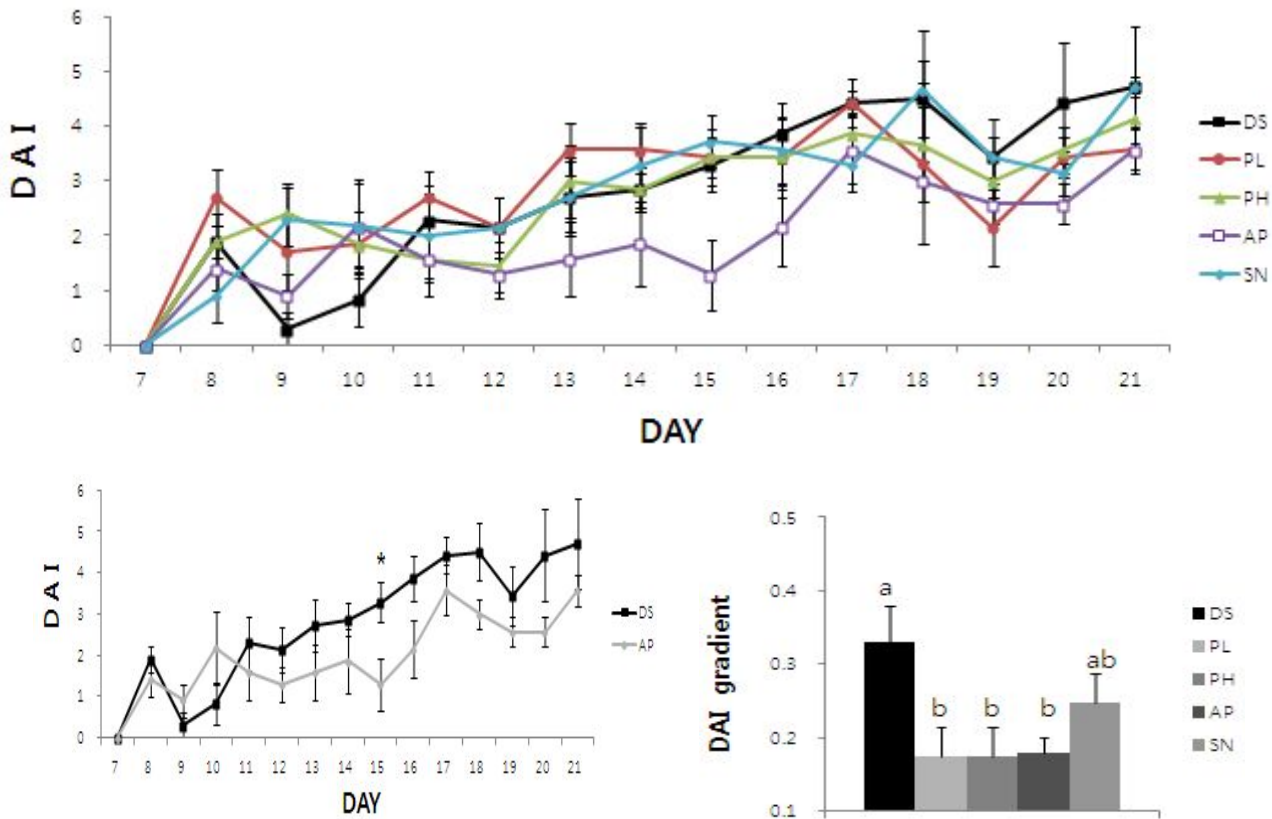


Fig. 16. The assessment of Disease activity index (DAI) in DSS-induced colitis rats

(3) Food and DSS intake

(가) Food intake

- 실험 기간 동안 일주일에 두 번 실험동물의 식이 섭취량을 측정하였음.
- 총 3주의 실험 기간 동안의 하루 식이 섭취량 (g/day)은 군 간 유의적인 차이는 없었으나, DSS유도 시작한 2주차부터 CON군에 비해 DSS유도군인 DS, PL, PH, AP 및 SN군에서 하루 식이 섭취량이 감소하는 경향을 보였음 (Fig. 17).

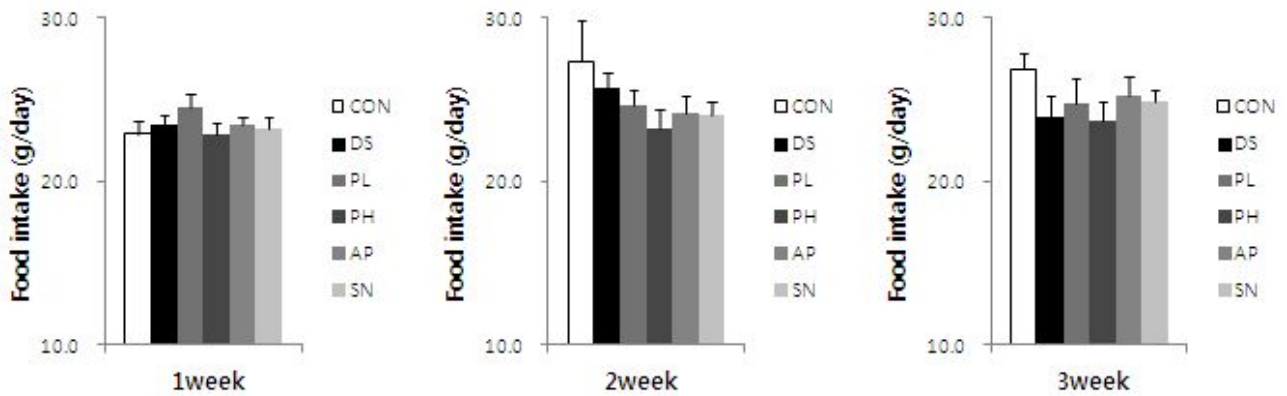


Fig. 17. Food intake in DSS-induced colitic rats during experimental period

(나) DSS intake

- DSS 유도 2주 동안 2-3일에 한 번씩 실험동물의 DSS 음수량 (ml)을 측정하였음.
- DSS유도 기간 동안의 DSS 음수량을 측정한 결과, AP군이 다른 DSS유도군과 비교해 유의적으로 많은 양의 DSS를 섭취한 것으로 나타남 ($p=0.0007$). 반면, 나머지 DSS유도군인 DS, PL, PH 및 SN군 간에는 DSS 음수량의 차이가 없었음 (Fig. 18).

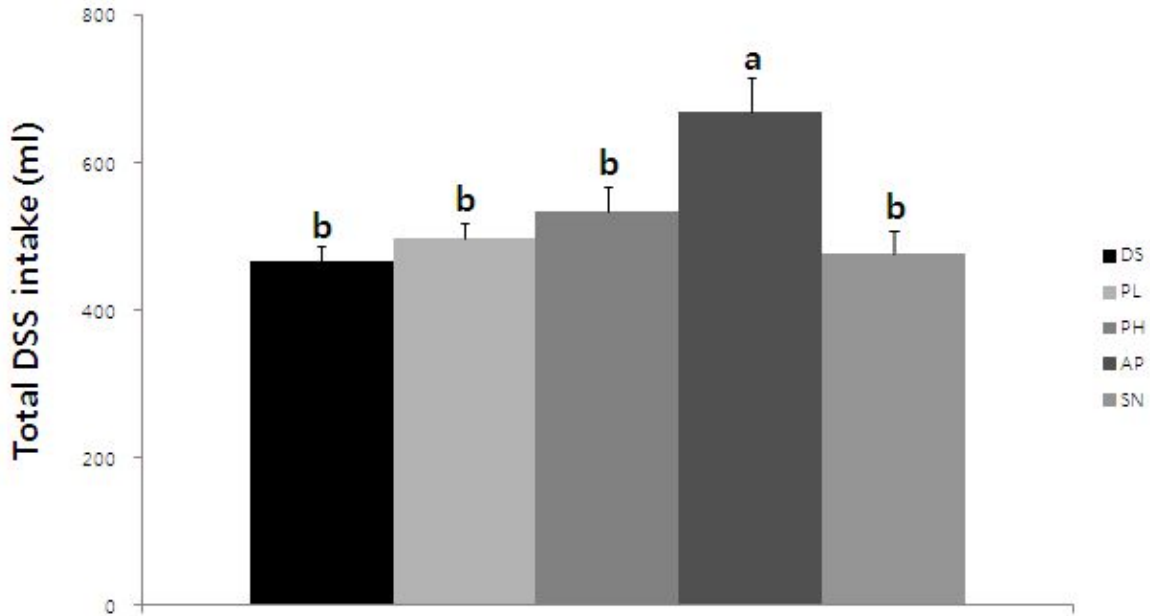


Fig. 18. DSS intake in DSS-induced colitic rats during experimental period for 2weeks

(4) Tissue length and weight

(가) Colon length

- 대장의 길이는 CON군(20.3 ± 0.6 cm)에 비해 대장염을 유도한 군에서 대장의 길이가 유의적으로 감소하였음 ($p=0.004$). 각 군의 대장길이는 DS군 (16.2 ± 0.7 cm), PL군 (18.9 ± 0.9 cm), PH군 (18.1 ± 0.7 cm), AP군 (18.9 ± 0.3 cm), SN군 (18.0 ± 0.5 cm)으로 PL군과 AP군 및 SN군에서 DS군에 비해 대장 길이 감소가 완화된 경향을 보였음 ($p=0.04$, $p=0.004$, $p=0.0496$) (Fig. 19).

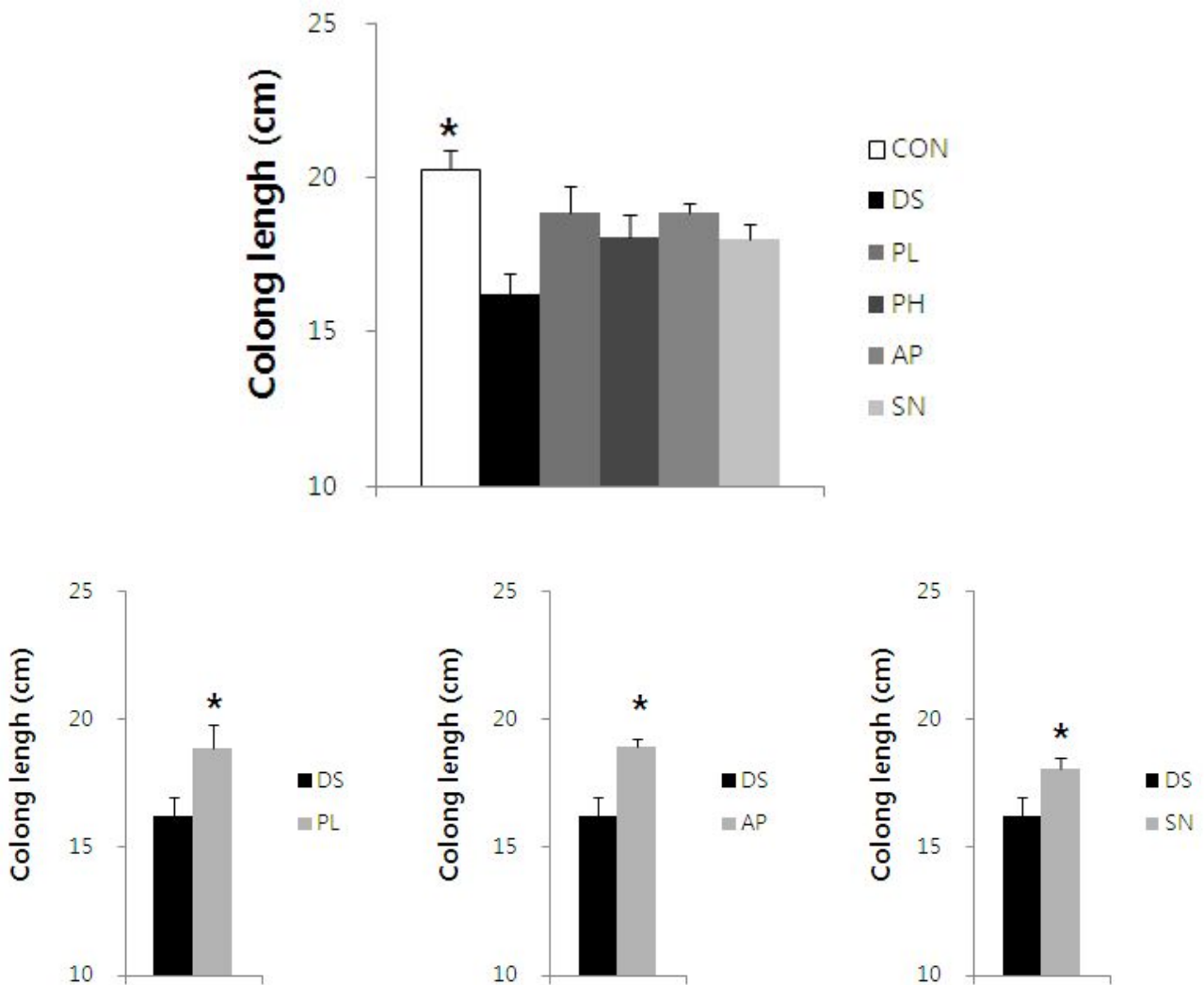


Fig. 19. The effects of Korean ganjang extracts administration on the colon length in DSS-induced colitic rats

(나) Colon weight

- 대장조직의 무게는 모든 군 간 유의적인 차이를 보이지 않았음 (p=0.7277) (Fig. 20).

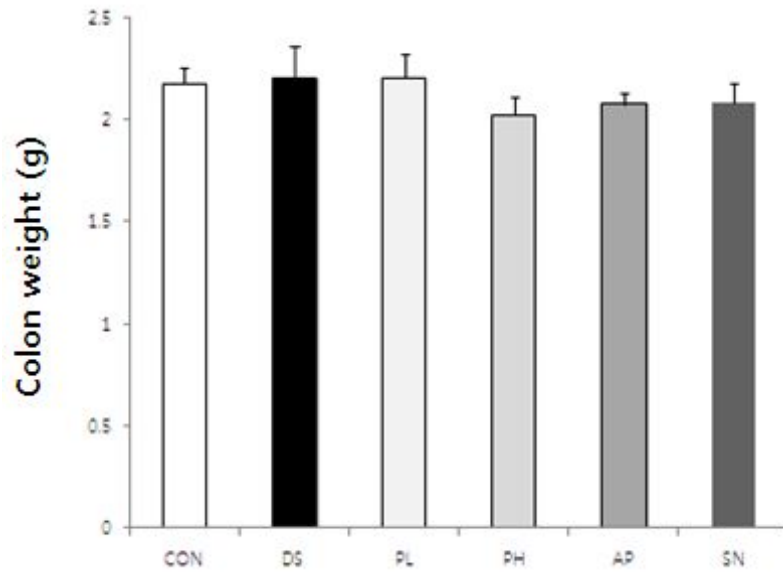


Fig. 20. The effects of Korean ganjang extracts administration on the colon weight in non DSS-induced and DSS-induced colitic rats

(다) liver and spleen weight

- 간 및 비장 조직 무게는 모든 군 간 유의적인 차이를 보이지 않았음 (p=0.4615, p=0.8694) (Fig. 21).

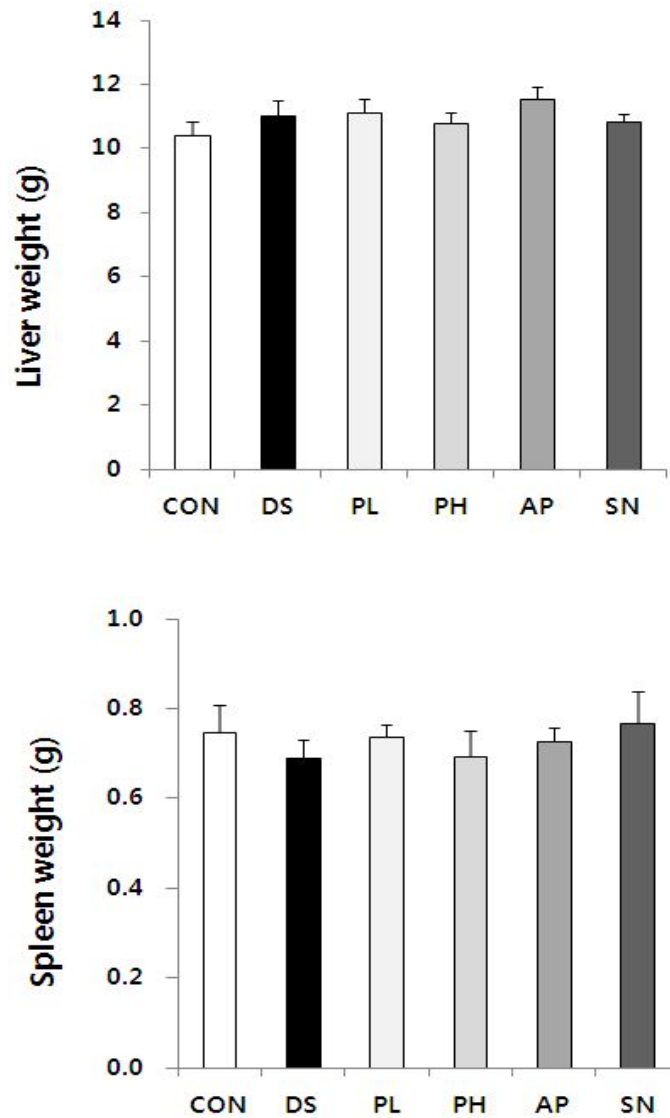


Fig. 21. The effects of Korean ganjang extracts administration on the liver and spleen weight in non DSS-induced and DSS-induced colitic rats.

5) Histopathology

- H&E 염색을 통해 대장을 조직병리학적으로 관찰한 결과, CON군의 대장 조직은 용모 및 점막의 상태가 정상적인 장의 형태를 가지고 있으나 (Fig. 22A), DS군에서는 상피세포의 탈락 및 crypt의 확장과 더불어 점막고유층 내에 백혈구의 침윤이 관찰됨. 또한, 점막하층의 수용성 변화도 관찰됨 (Fig. 22B). PL군과 PH군의 대장 모두 DS군에 비해 위와 같은 변화가 유의적으로 감소되지 않았으나, AP군에서는 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소되는 경향을 보임 (Fig. 22.C, D, E). 또한 SN군의 대장 관찰 결과, 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소하는 경향이 관찰되었으나, AP군만큼 그 정도가 크게 나타나지는 않았음(Figure 22.E, F).

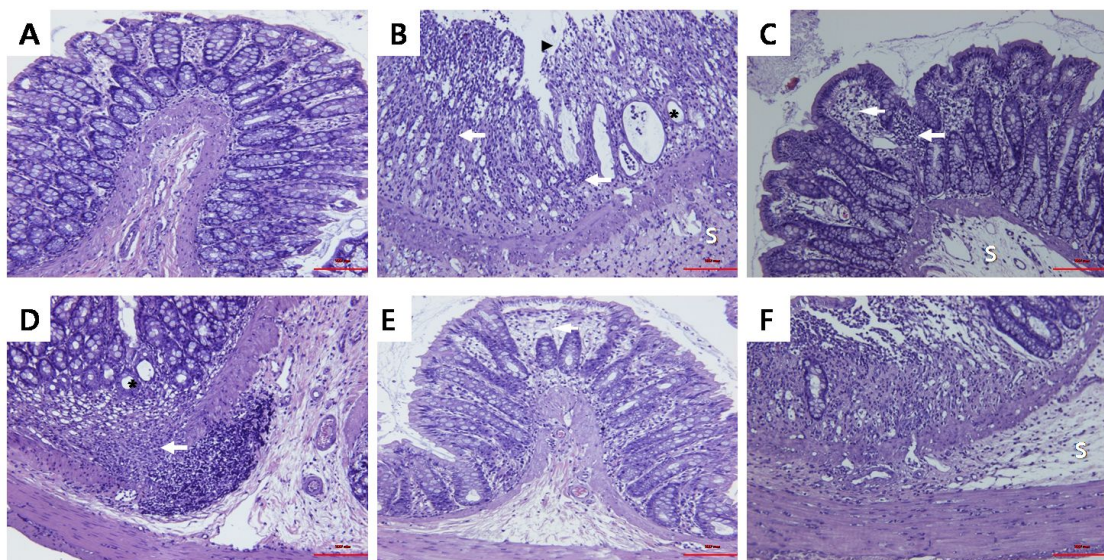


Figure 22. Histopathological features on Korean ganjang extracts administration of colon from DSS-induced colitic rats. Representative colon histopathological figures of each group. (A) CON, (B) DS, (C) PL, (D) PH, (E) AP, (F) SN. Glandular epithelium destruction (arrow head), neutrophil infiltration (arrow), edema (sharp arrow), cryptic dilatation (*) or submucosa extension of inflammation (S). HE stain, bar, 500mm.

6) Biochemical measurements

(1) Plasma C-reactive protein (CRP) level

- Plasma에서 급성 염증반응 단백질인 CRP 수준을 분석한 결과, 모든 군간 통계적으로 유의적인 차이는 없었으나, CON군과 비교해 DS군, PL군, PH군, AP군 및 SN군에서 감소하는 경향을 보였음 ($p=0.22$) (Fig. 23).

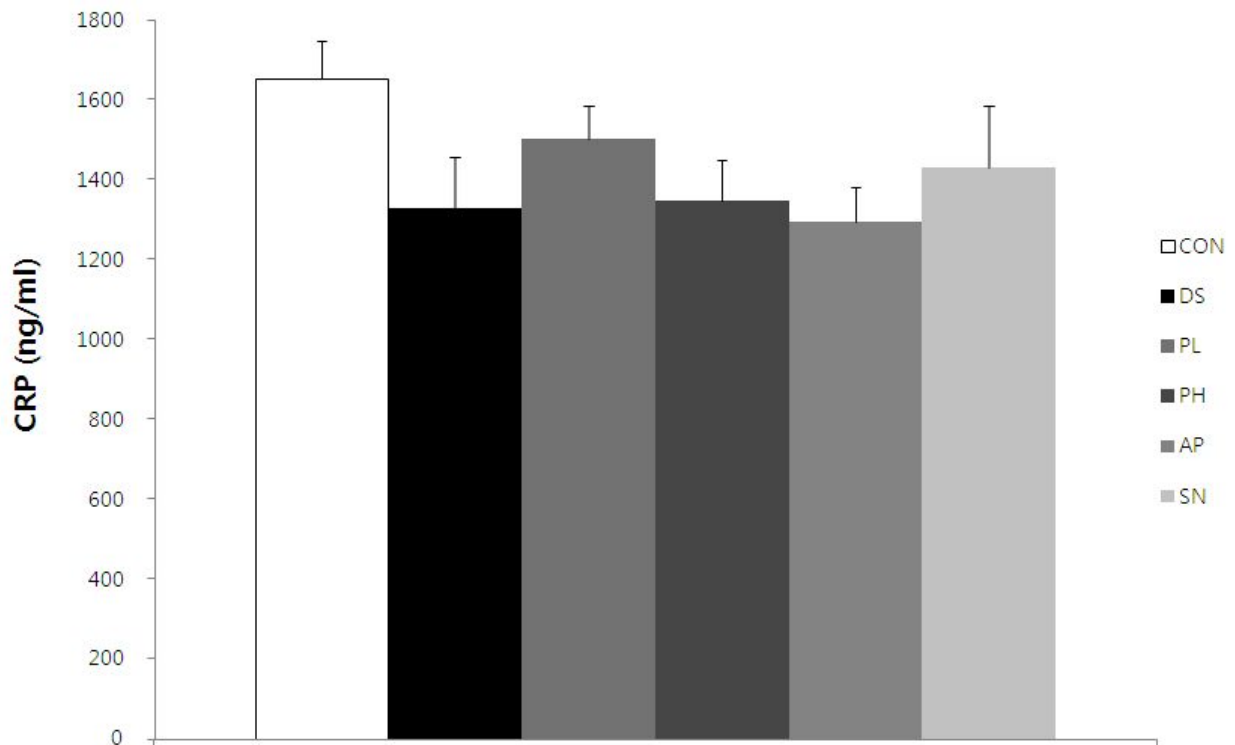


Fig. 23. The effects of Korean ganjang extracts administration on plasma C-reactive protein (CRP) in DSS-induced colitic rats.

(2) Colon myeloperoxidase (MPO) level

- 대장 조직에서 호중구 침윤 정도를 확인 할 수 있는 MPO의 수준을 분석한 결과, 대장염 유도군인 DS, PL, PH, AP 및 SN군에서 CON군과 비교하여 MPO 수준이 증가하였음 ($p=0.12$). DS군과 비교하여 PH군과 AP군에서 MPO 수준이 감소하는 경향을 보였음 (Fig. 24).

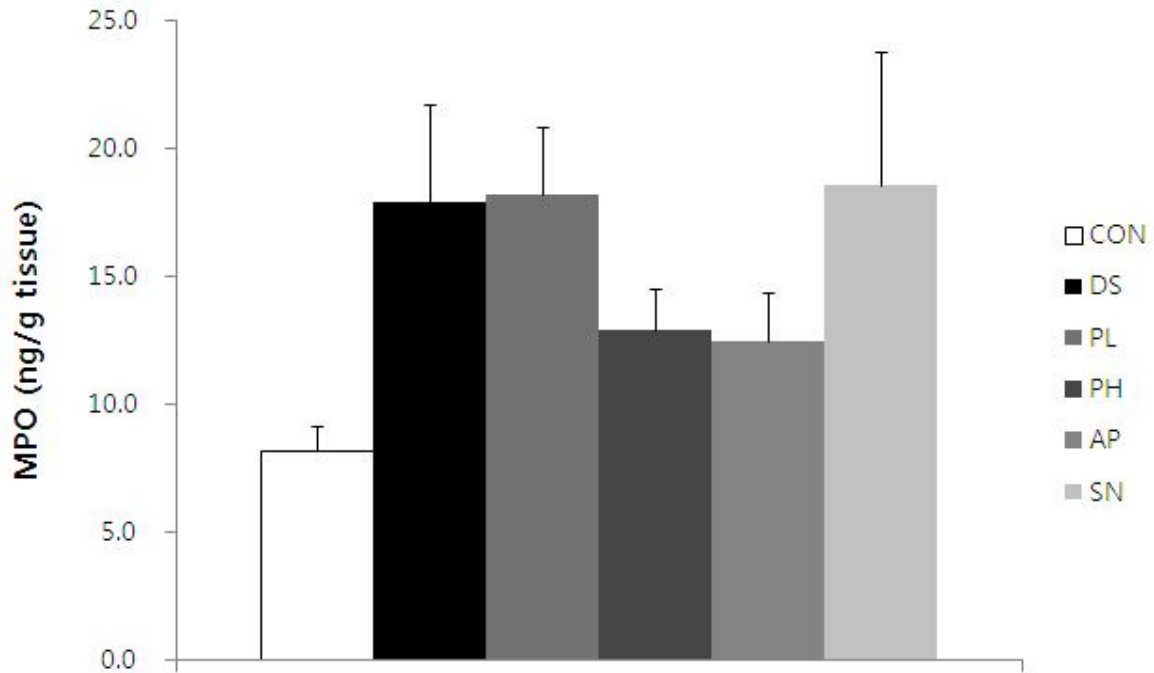


Fig. 24. The effects of Korean ganjang extracts administration on colon Myeloperoxidase (MPO) in DSS-induced colitic rats.

(3) Colon tumor necrosis factor- α (TNF- α)

- 대장 조직에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 수준을 분석한 결과, CON군과 비교하여 DS군에서 TNF- α 수준이 증가하는 경향을 보임. DS군과 비교해 SN군에서 TNF- α 수준이 감소하는 경향을 보였으나, 모든 군간 유의적인 차이는 없었음 ($p=0.28$) (Fig. 25).

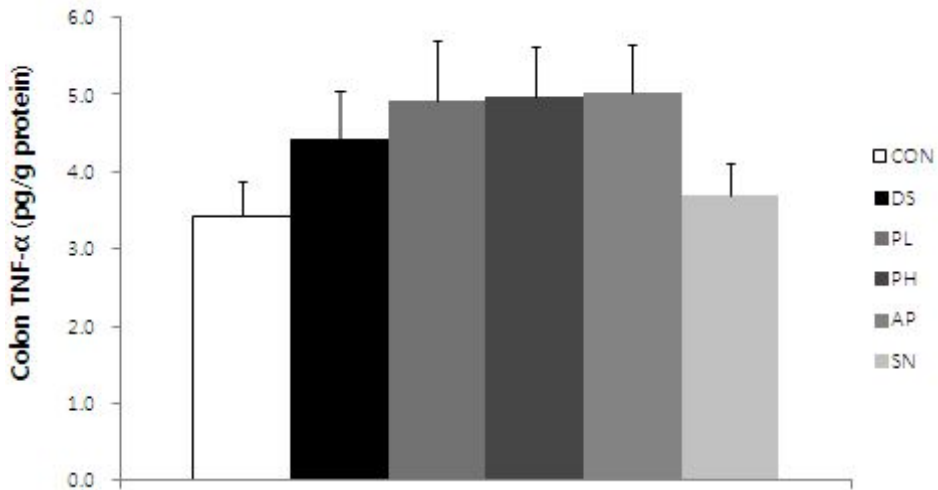


Fig. 25. The effects of Korean ganjang extracts administration on colon Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in DSS-induced colitis rats.

(4) Colon Interleukin-6 (IL-6)

- 대장 조직에서 염증성 사이토카인인 IL-6 수준을 분석한 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음 ($p=0.52$). (Fig. 26).

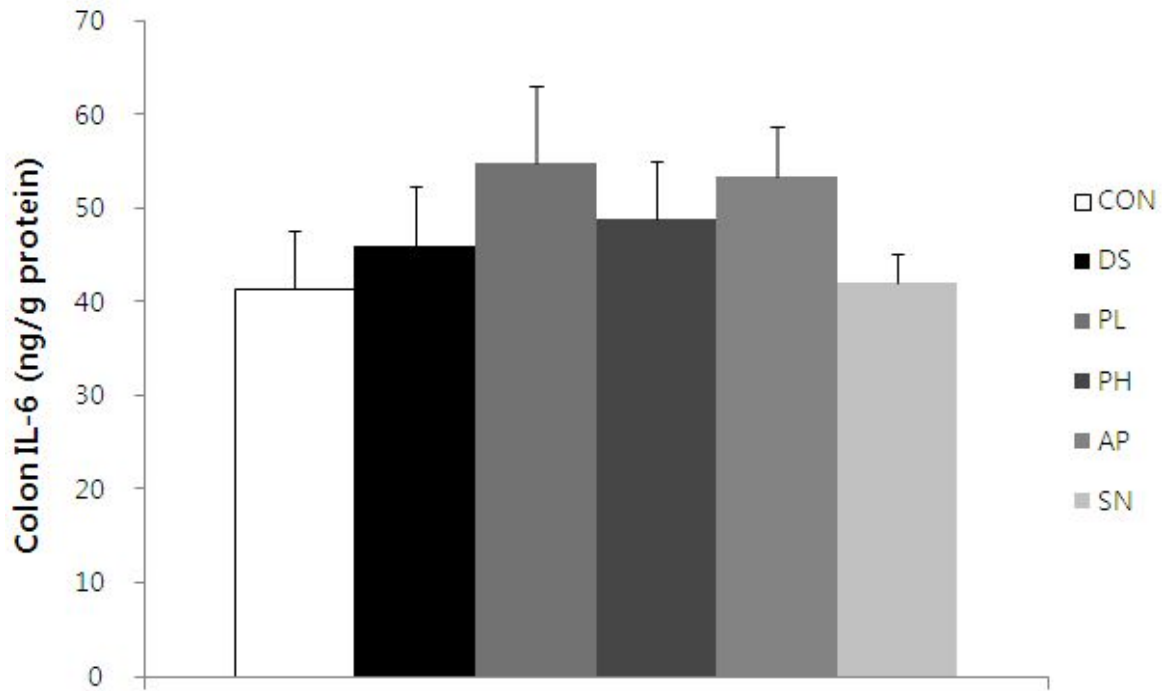


Fig. 26. The effects of Korean ganjang extracts administration on colon Interlukine-6 (IL-6) in DSS-induced colitis rats.

(5) Colon Interleukin-10 (IL-10)

- 대장 조직에서 항염증성 사이토카인인 IL-10수준을 분석한 결과, CON군과 비교해 DS군에서 IL-10수준이 감소하는 경향을 보였음. 반면 AP군에서는 DS군에 비해 증가하는 경향을 보임. (Fig. 27).

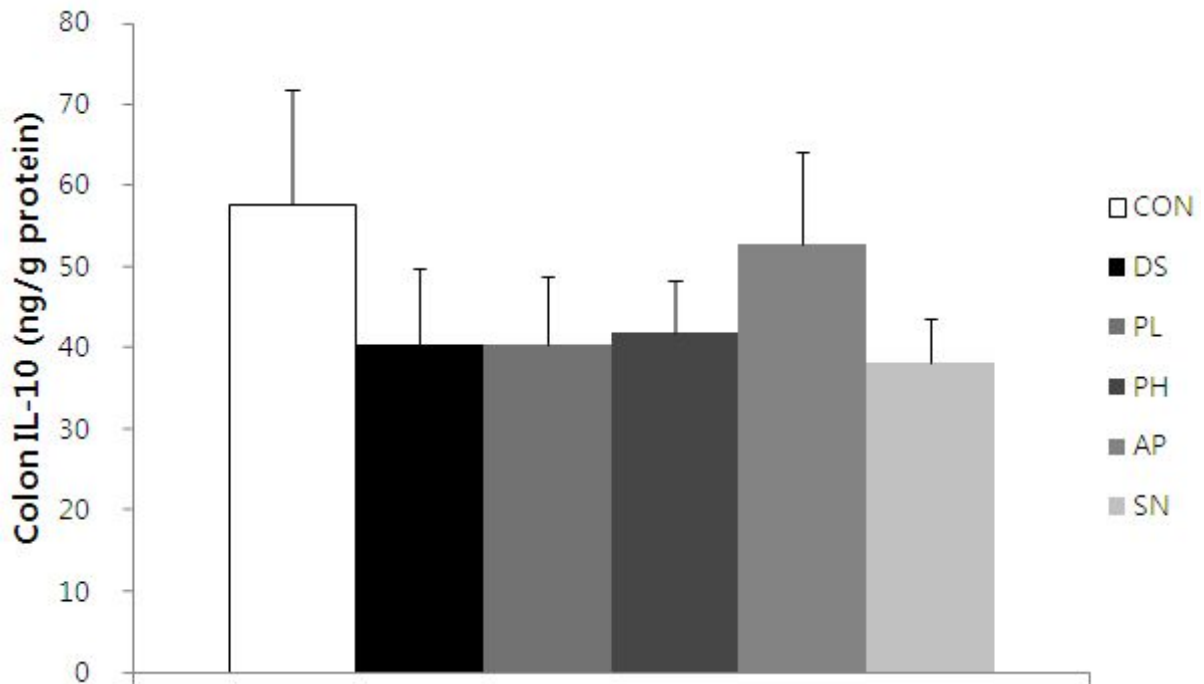


Fig. 27. The effects of Korean ganjang extracts administration on colon Interlukine-10 (IL-10) in DSS-induced colitis rats

7) mRNA expression

(1) Colon Interleukin-1beta (IL-1 β)

- 대장 조직에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 mRNA 발현을 측정된 결과, CON군과 비교해 DSS로 인한 대장염이 유도된 군에서 IL-1 β mRNA 발현이 증가하였음. 특히, PH군에서는 DS군과 비교해 IL-1 β mRNA 발현이 유의적으로 감소하였으며 ($p=0.0002$), PL군에서는 감소하는 경향을 보임. 반면 AP 및 SN군에서는 DS군과 비교해 IL-1 β mRNA 발현이 증가하는 경향을 보임 (Fig. 28).

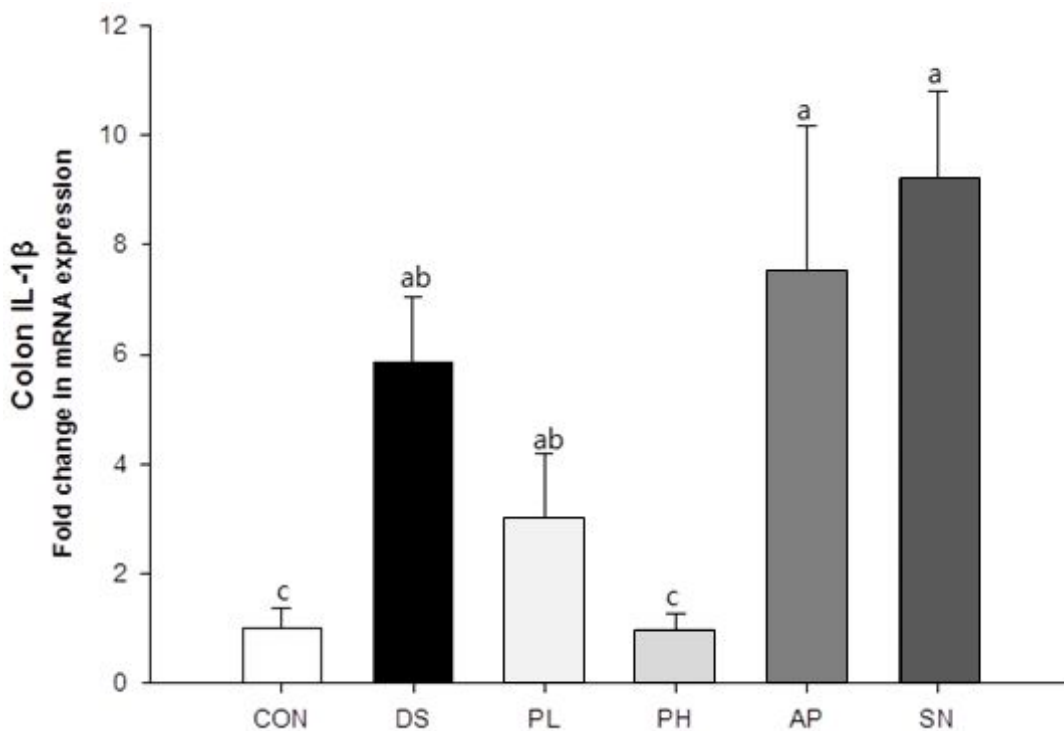


Fig. 28. The effects of Korean ganjang extracts administration on colonic mRNA expression of Interleukin-1beta (IL-1 β) in DSS-induced colitic rats

(2) Colon inducible nitric oxide synthase (iNOS)

- 대장 조직에서 염증유도 관련 지표인 iNOS의 mRNA 발현을 측정된 결과, CON군과 비교해 DSS로 인한 대장염이 유도된 군에서 iNOS mRNA 발현이 유의적으로 증가하였음 ($p=0.0003$). PL 및 PH군에서는 DS군과 비교해 낮은 경향을 보였으나, AP 및 SN군에서는 증가하는 경향을 보임 (Fig. 29)

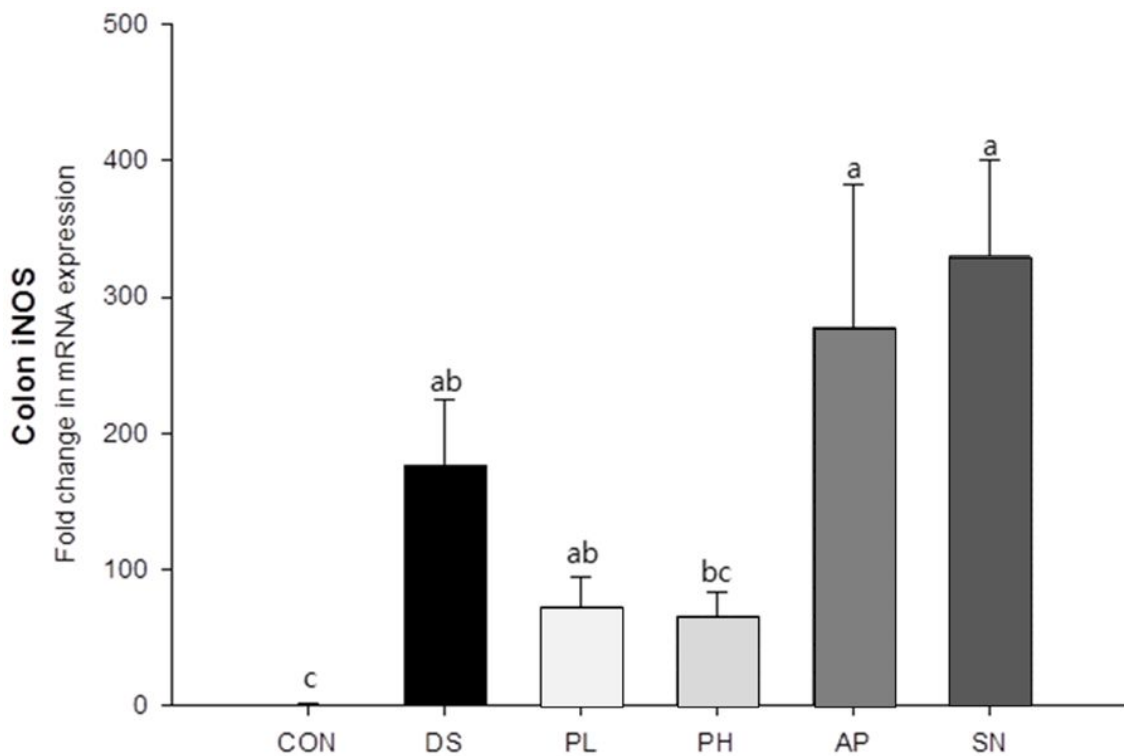


Fig. 29. The effects of Korean ganjang extracts administration on colonic mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in DSS-induced colitic rats

다. 고찰

본 연구는 DSS로 유도한 대장염 동물모델에서 한식간장과 한식간장에서 분리한 아미노산 · 펩타이드, 폴리사카라이드의 IBD의 증상 개선 효과 및 장관 염증 억제 기능 확인을 통하여 한식간장의 장관 면역 시스템 조절 기능을 확인하고자 수행되었음.

본 실험의 결과로 다음과 같은 내용이 확인되었음.

- DSS로 유도한 대장염 동물모델에서 간장-폴리사카라이드(PL, PH) 및 간장-아미노산 펩타이드(AP)의 섭취는 DSS유도에 의한 체중 감소의 개선 경향을 보임.
- Disease Activity Index(DAI) 평가에서 간장-아미노산 펩타이드 섭취군(AP)에서 DAI가 감소하는 경향이 나타남.
- 간장-폴리사카라이드 저용량(PL), 간장-아미노산 펩타이드(AP), 탈염 간장(SN) 섭취에서 DS군과 비교하여 대장 길이가 감소되는 증후를 개선시키는 경향이 나타남.
- 대장 조직의 조직병리학적 분석 결과, 간장-아미노산 펩타이드군(AP) 및 탈염 간장군(SN)에서는 DS군과 비교하여 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소되는 경향을 보였음. 반면 간장-폴리사카라이드의 섭취(PL, PH)는 DSS로 인한 대장의 염증 및 부종을 개선시키지 못하였음.
- 대장 조직 내 MPO 수준은 간장-폴리사카라이드 고용량군(PH)과 간장-아미노산 펩타이드군(AP)에서 DS군에 비해 감소하는 경향을 보임으로써 조직의 염증 손상으로 인한 호중구의 침투를 저해하는 것으로 판단됨.
- 대장 조직에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6 수준은 간장의 섭취(PL, PH, AP 및 SN)에 따른 유의적인 차이가 없었음.
- 대장 조직에서 항염증성 사이토카인인 IL-10수준은 AP군에서 DS군과 비교해 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 없었음.
- 대장 조직에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 mRNA 발현을 비교한 결과, 간장-폴리사카라이드군 (PL, PH)의 IL-1 β mRNA 발현이 DS군과 비교하여 감소하였음. 반면 간장-아미노산 펩타이드군(AP) 및 탈염간장 섭취군(SN)군에서는 DS군과 비교해 IL-1 β mRNA 발현이 증가하였음.
- 대장 조직에서 염증유도 물질인 iNOS mRNA 발현은 DS군과 비교하여 간장-폴리사카라이드군(PL, PH)에서 낮은 수준을 보였으나, 간장-아미노산 펩타이드군(AP) 및 탈염간장 섭취군(SN)군에서는 발현 수준이 증가하였음.

DSS에 의한 대장염 유도는 체중 감소, colon 길이와 무게 감소, 설사와 혈변, 대장 점막 손상, cytokines 및 염증성 mediators의 생성, leukocyte infiltration과 같은 특징을 보이는데 본 실험결과 DSS에 의한 대장염 유도군에서 정상대조군에 비해 colon 길이의 감소, DAI 및 염증성

사이토카인의 mRNA 발현이 증가하였고, 대장 상피조직의 탈락 및 crypt의 확장 현상과 함께 점막 고유층 내 백혈구의 침윤과 점막하층의 부종이 관찰됨으로써 DSS에 의한 대장염 유도 증상을 확인할 수 있었음.

간장-폴리사카라이드군(PL, PH)에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였음. 또한 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 염증성 매개체인 iNOS의 mRNA 발현이 감소하였음. 특히 간장-폴리사카라이드 고용량 섭취군(PH)의 경우 대장 조직의 MPO 수준이 감소하고, IL-1 β 와 iNOS의 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였음. 이에, 간장-폴리사카라이드의 농도 의존적 효과를 확인할 수 있었음.

간장-아미노산 펩타이드군(AP)에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였으며, 설사와 혈변을 나타내는 지표인 DAI 역시 DSS 유도 기간 동안 다른 군에 비해 낮은 경향을 보였음. 또한 대장조직의 병리학적 분석 결과, 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소하는 경향을 보였으며, 대장조직의 MPO 수준 분석결과를 통하여 호중구의 침윤이 다른 군과 비교해 감소한 것을 확인함. 그러나 대장 조직에서 염증성 사이토카인과 iNOS 수준의 유의적인 차이는 없었음. 그러나 DSS 유도 기간 동안 AP군에서 유의적으로 DSS의 섭취가 많아 다른 군과의 비교에 한계점을 가짐.

본 연구에서는 한식 간장 추출물의 장관염증 억제 효과 확인을 위한 실험 결과, DSS로 유도한 대장염 모델에서 간장-폴리사카라이드 섭취는 대장염의 증상 완화와 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 대장 면역시스템을 조절하여 장관 염증을 억제하는 효과를 가질 것으로 기대됨. 그러나 추후 장관염증 면역 관련 추가 연구를 통한 검증이 필요할 것으로 사료됨. 반면 간장-아미노산 펩타이드 추출물의 섭취는 대장염증의 징후를 완화시켰으며, 대장 조직의 손상이 적은 것을 확인함. 반면 대장 조직의 염증성 사이토카인의 수준은 차이가 없는 것으로 보아 장관염증성 사이토카인 조절이 아니라, 뮤신 생성 등 장관 손상 후 회복하는 과정에서 도움을 주었을 것으로 사료됨. 또한 다른 DSS 유도군에 비해 DSS 음수량이 유의적으로 많았다는 제한점이 있으므로 후속 연구를 통한 추가 기전 연구가 필요할 것으로 판단됨.

제 2 절. 한식 간장의 당·지질 대사 조절 효능 평가 및 기작 연구, 항비만 효능 평가

1. 비만과 그 위험성

대부분의 경우 비만은 체중이 정상치보다 많이 나가는 것을 뜻하지만 체중이 적더라도 몸의 구성 성분 중 체지방 비율이 높은 것도 비만이라 함. 비만은 그 자체로 큰 문제가 되지 않지만, 비만으로 야기될 수 있는 사회적 장애와 2차적인 대사성 질환인 고지혈증, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 지방간, 관절 이상 등의 발생비율 증가는 현대 인류의 커다란 문제점으로 대두되고 있음.

비만은 식습관의 문제나 유전적인 요인으로도 발생하는데 우리는 이와 관련해 비만의 원인을 대사의 불균형으로 생각하고 섭취하는 음식에 따른 호르몬의 변화와 에너지 대사 기전의 개선을 통해 해결하고자 지질대사의 주요 유전자인 Peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)와 Liver X Receptors(LXRs)의 역할에 초점을 맞추었음.

2. 핵수용체 PPARs 및 LXR의 조절을 통한 당 및 지질대사 개선 효능 연구

당 및 지질 대사 조절 기전에는 여러 가지 방법이 알려져 있으나, 최근 10년 간 세포 내 핵수용체 조절을 통한 기전이 새로이 알려지고 있음. 세포질에 존재하는 핵수용체에 리간드가 결합하여 활성화 되면, 핵수용체는 핵으로 이동한 후 일련의 타겟 유전자 프로모터에 결합하여 유사한 대사과정에 관여하는 유전자들의 발현을 한번에 조절하게 됨. 이러한 핵수용체 가운데 peroxisome proliferator-activated proteins(PPARs; α , γ , β/δ forms)와 liver X-receptors(LXRs; α and β forms)는 당 및 지질 대사를 조절하는 대표적인 핵수용체로 알려져 있음.

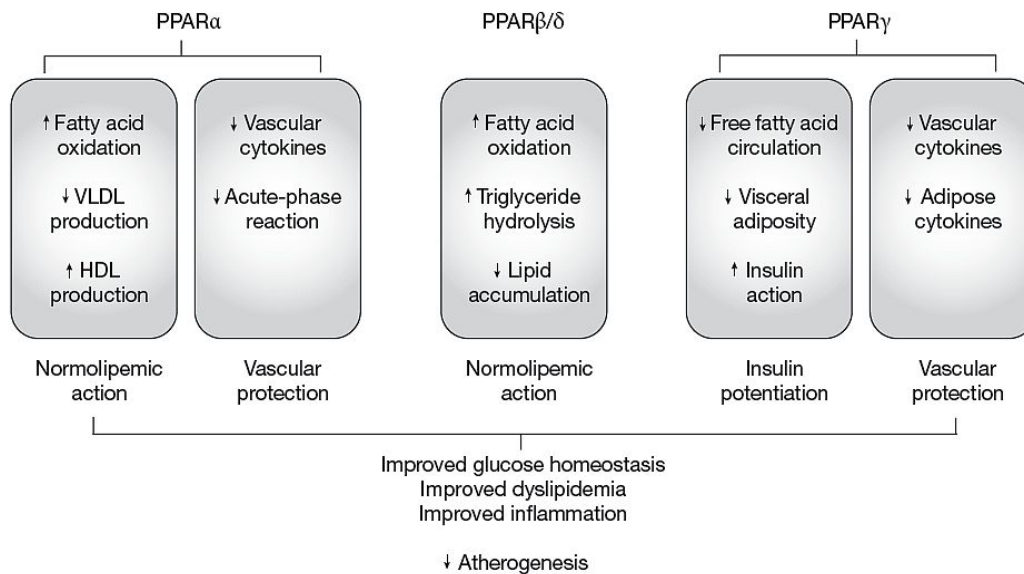


Fig. 30. PPARs 활성을 통한 당 및 지질대사 조절(Gervois et al. Nature. 2007)

PPAR- α 는 주로 간조직에서 주요한 역할을 하며, 지방산과 중성지질 합성 및 분해 관련 유전자 발현을 조절함. PPAR- γ 는 지방 및 근육조직에서 혈당 흡수 촉진 등을 통해 인슐린 민감도(insulin sensitivity)를 증가시킴. PPAR- β/δ 는 주로 지방조직에서 발현되며 지방산화와 열 발생(thermogenesis)을 촉진시키는 것으로 알려지고 있음(Fig. 30).

LXRs는 간조직에서 담즙산 합성을 통해 콜레스테롤 배설을 촉진시키고, 소장 내 콜레스테롤 흡수를 저해함. 또한, 말초조직의 콜레스테롤을 HDL로 전달하는 콜레스테롤 역수송을 유도하여 혈 중 HDL-콜레스테롤의 양을 높임. LXRs는 지질대사뿐만 아니라 당대사에도 관여함. 간에서 포도당신생합성 관련 유전자의 발현을 감소시키고, 인슐린 분비량 및 민감도를 향상시킴(Fig. 31).

PPARs 및 LXRs 조절을 통한 지질 및 당 대사 개선용 식품은 개발된 바가 없음. 또한, 국제 저널에 발표된 현미발효물의 건강기능성은 항암, 장내 세균 억제 등과 같은 효능이 보고 (Katara et al. 2007; Tomita et al. 2008; Shibata et al. 2006 등)되었으나, 당 및 지질 대사 조절 효능에 대한 연구는 전무함.

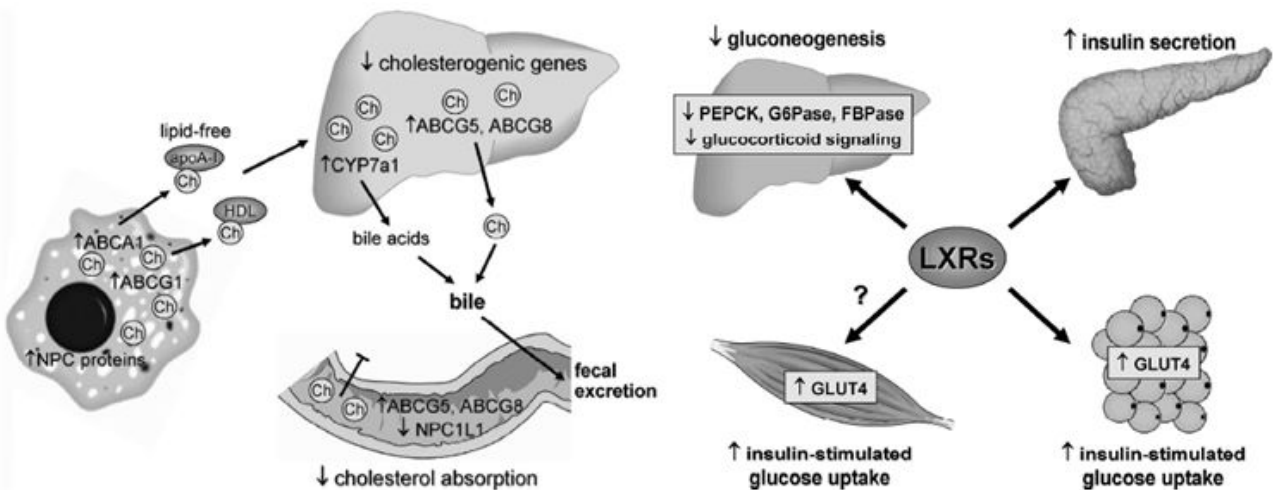


Fig. 31. LXRs 조절을 통한 지질(좌) 및 당 대사(우) 조절(M. Baranowski)

3. 한식간장 성분의 당·지질 대사 조절 효능 및 기작 연구 (*in vitro*)

가. Acetic acid의 지질대사 조절 효과 확인(*in vitro*)

(1) MTT assay : HepG2 cell에서 sodium acetate의 농도별 cell viability

- Acetic acid는 낮은 pH를 가지기 때문에 pH로 인한 cell damage를 줄 수 있음.
- Acetic acids에 의한 pH 변화를 방지하기 위해 중성화시킨 형태인 sodium acetate를 사용해 실험을 진행함.(Kondo et al.)

- Sodium acetate에 의한 pH 변화를 측정함

Sodium Acetate Concentration	pH
0 uM	7.73
50 uM	7.74
100 uM	7.71
200 uM	7.72
400 uM	7.73
800 uM	7.74

Fig. 32. Sodium acetate medium samples의 pH 측정

- HepG2 cell에서 acetate의 세포독성을 알아보기 위하여 농도별로 처리하여 cell viability를 측정함.

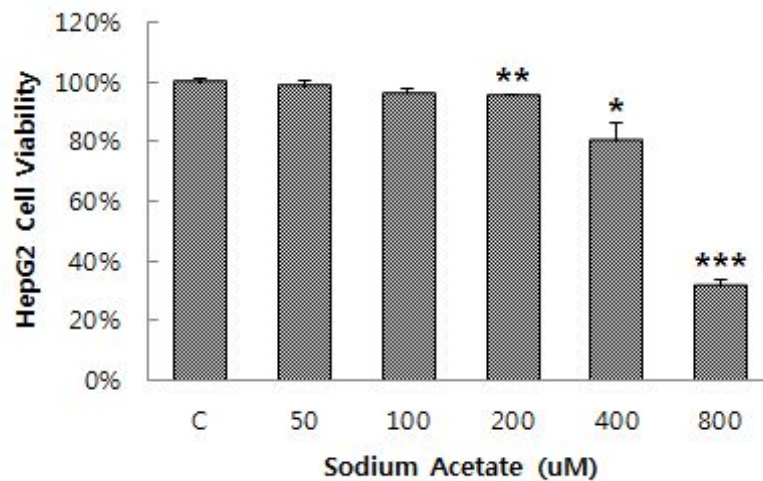


Fig. 33. HepG2 cell의 sodium acetate에 의한 세포 생존률 (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)

- 실험에서 sodium acetate는 각 0, 50, 100, 200, 400, 800 uM의 농도로 처리함.

- HepG2 cell의 생존률은 100uM 농도까지 큰 변화가 없다가 400uM에서 19.5%, 800uM에서 68.4%가 각각 감소하여 sodium acetate가 세포독성이 있음을 확인함.

(2) Sodium acetate가 intracellular lipid accumulation에 미치는 영향

- *In vivo* 실험에서 acetic acid가 lipid metabolism에 긍정적인 영향을 미친다는 연구 결과가 있음
- *In vitro*에서 sodium acetate가 지질대사에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 3T3-L1 cell과 HepG2 cell을 이용하여 세포내 cholesterol과 TG accumulation을 확인.
- Differentiation 과정을 거친 3T3-L1 cell은 lipid droplet을 형성하여 처리물질의 지질대사에 미치는 영향을 볼 수 있고, HepG2 cell은 lipid loading을 통하여 인위적으로 세포내 지질대사를 활성화시킴.

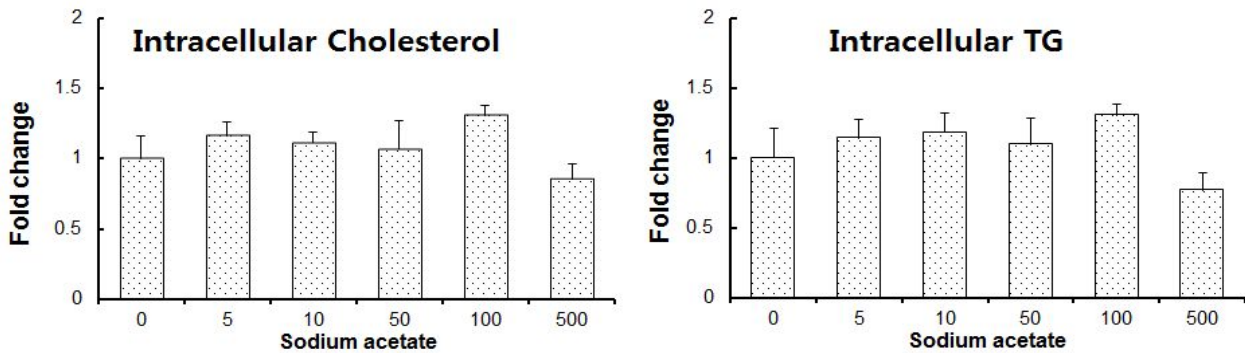


Fig. 34. 3T3-L1 cell에서 저농도 sodium acetate의 lipid accumulation 효과

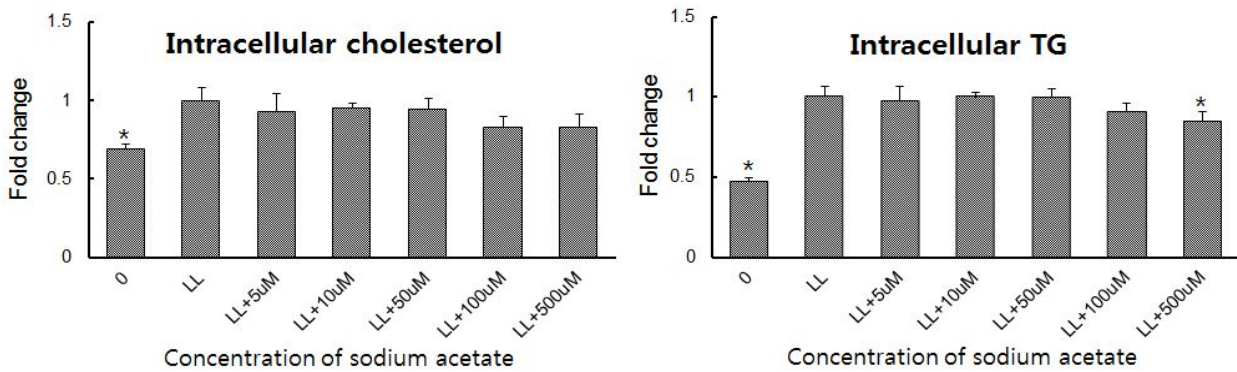


Fig. 35. Lipid loading(LL)한 HepG2 cell에서 저농도 sodium acetate의 lipid accumulation 효과

- 3T3-L1 cell의 경우 sodium acetate에 대한 유의성 있는 결과는 확인할 수 없었음.
- HepG2 cell에서 lipid level이 500uM에서 유의성이 있는 TG의 감소가 보였지만 큰 의미는 없음.
- *In vitro*에서 sodium acetate의 lipid metabolism에 대한 영향은 없다고 보여짐.

나. 한식간장의 3T3-L1에서의 lipid accumulation 저하 효과

- 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드(pep/AA) 분획과 polysaccharide(poly) 분획의 지질 대사 조절능력을 확인하기 위해 3T3-L1에서 각각 0.1mg/ml, 1.0mg/ml의 농도로 실험을 진행함.
- 실험결과 pep/AA군과 poly군 모두 1.0mg/ml의 농도에서 유의적인 cholesterol, triglyceride(TG)의 감소를 확인.
- Cholesterol의 감소량은 Pep/AA군이 11.1%, 32.8%, poly군이 0.8%, 26.9% 감소하였고, TG에서는 각각 Pep/AA군이 13.1%, 31.5%, poly군이 5.2%, 32% 감소하였음.
- 이 실험을 통해 pep/AA 시료와 poly 시료 모두 지질대사에 영향을 주는 효과가 있음을 확인.

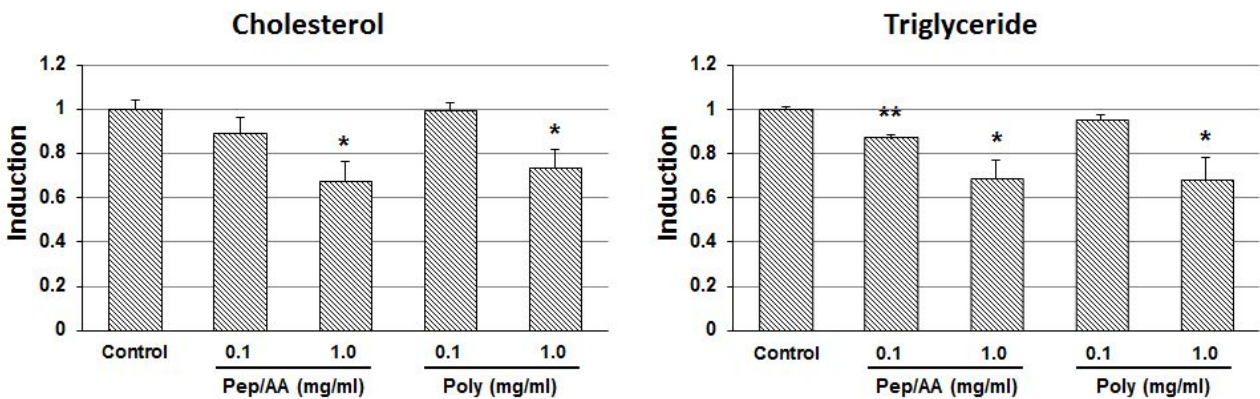


Fig. 36. 3T3-L1 cell에서 pep/AA와 poly시료의 농도별 lipid accumulation 효과

다. SPR과 TR-FRET assay를 통한 dipeptide WE(Trp-Glu)의 PPAR binding affinity 확인

- 한식간장 내에 존재하는 peptide 중 지질대사에 영향을 줄 수 있는 peptide의 존재를 가정하고 현재 PPAR- γ 에 대한 activity를 갖는 dipeptide인 WE(Trp-Glu)를 실험에 사용함.
- Dipeptide WE(Trp-Glu)는 PPAR- γ antagonistic activity를 갖는 것으로 알려져 있음.(Ye F et al.)
- Ligand와 Analyte간의 binding정도를 측정할 수 있는 실험인 SPR(Surface plasmon resonance)을 이용해 WE의 PPARs와의 binding affinity를 구함.

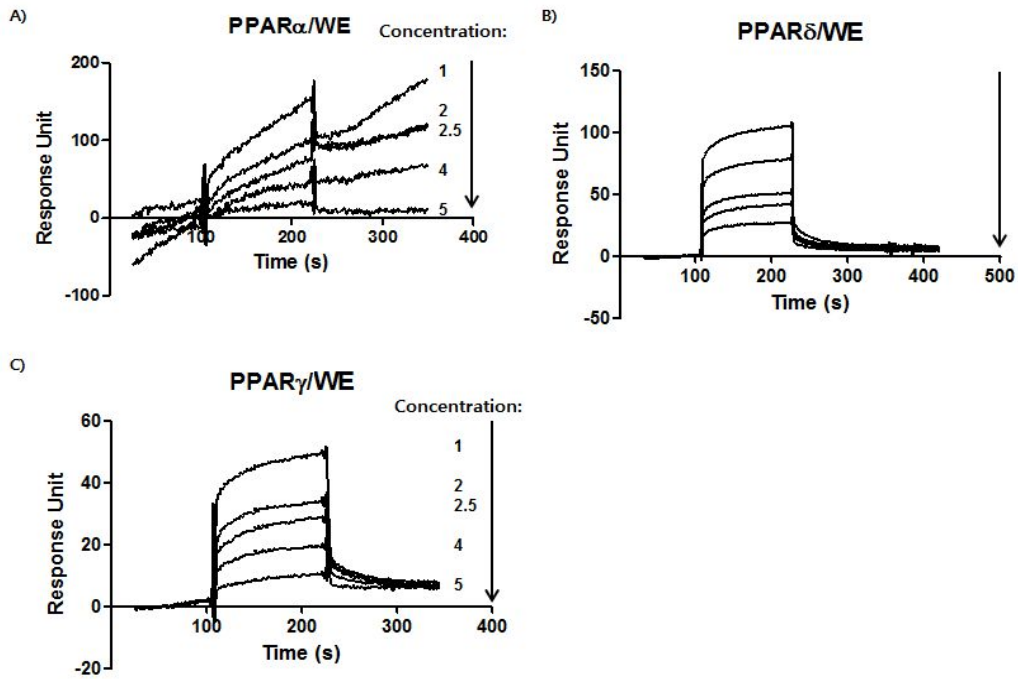


Fig. 37. SPR로 측정된 PPAR에 대한 WE의 binding affinity. 농도는[mM] 화살표 옆에 표시

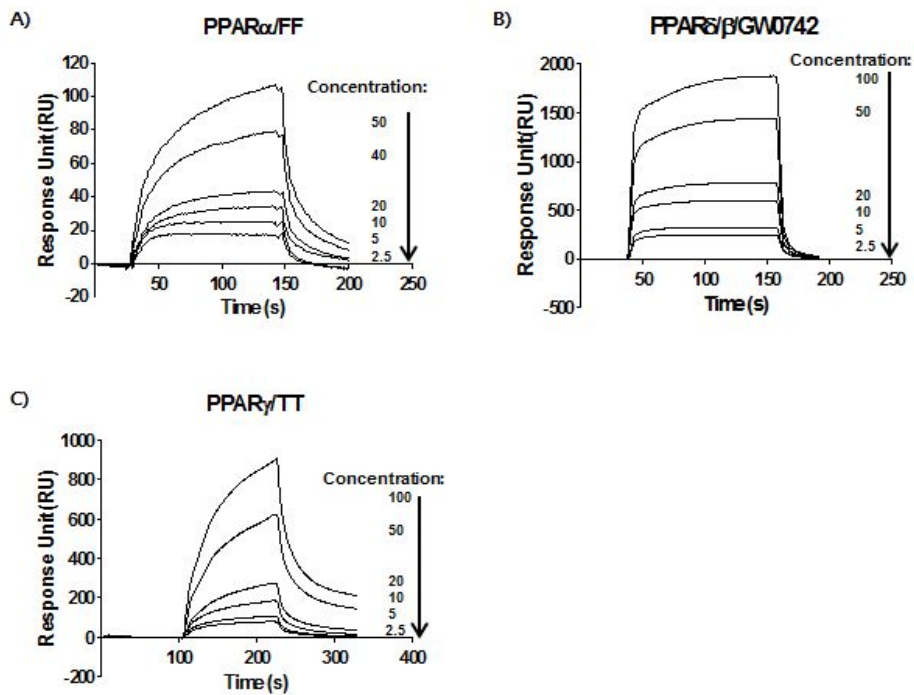


Fig. 38. SPR로 측정된 PPAR에 대한 agonist들의 binding affinity. 농도는[μ M] 화살표 옆에 표시

Table 9. SPR로 측정된 PPAR에 대한 WE와 PPAR agonist들의 Equilibrium dissociation constant(K_D).

Compound	Equilibrium dissociation constant(K_D)		
	PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
WE	0.12mM	19mM	5.32uM
Fenofibrate	301.02nM	-	-
GW0742	-	44.80nM	-
Troglitazone	-	-	254.03nM

- K_D 값은 ligand와 analyte가 얼마나 잘 붙어있는지 나타낸 지표로써 값이 작을수록 더 강하게 결합하고 있는 것을 의미함.
- 이미 발표된 논문에 의하면 WE와 PPAR γ 와의 K_D 값은 8.34uM임. (Ye F et al.) 이번 실험 결과와 큰 차이가 없음을 알 수 있음.
- Table 9의 K_D 값을 통해 WE의 PPAR γ 에 대한 binding affinity를 확인할 수 있음. PPAR α , PPAR δ 또한 PPAR γ 만큼은 아니지만 어느 정도 binding한다는 것을 알 수 있음.
- SPR실험 결과를 통해 WE와 PPAR α 와의 binding affinity의 존재 가능성을 봤으므로, TR-FRET assay를 이용해 결과를 확인하고, PPAR α 의 활성을 저해하는지, 억제하는지 알아봄.
- TR-FRET은 ligand가 receptor와 반응하여 나타나는 에너지 이동 변화를 측정하여 두 물질의 binding 정도를 알 수 있는 실험임. control group과 에너지 변화 정도를 비교하여 반응이 촉진되었는지 억제되었는지 또한 알 수 있음.

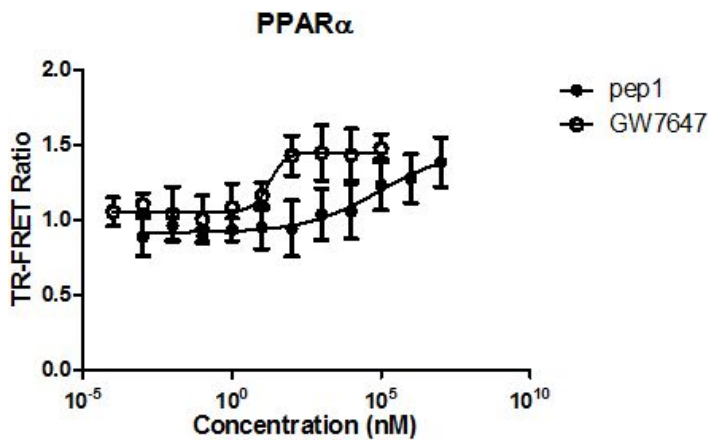


Fig. 39. TR-FRET assay로 측정된 PPAR α 에 대한 WE와 positive control인 GW7647의 농도별 binding

Compound	EC ₅₀ value
	PPAR α
WE	83.41 μ M
GW0742	18.63nM

Fig. 40. TR-FRET assay로 측정한 PPAR α 에 대한 WE와 GW7642의 EC₅₀ value

- EC₅₀값은 어떤 물질의 생물학적 생화학적 촉진 정도를 판단할 수 있는 지표로써, 반응을 촉진하기 위해서 얼마나 많은 농도의 물질이 필요한지를 나타내는 값임. EC₅₀값이 적을수록 반응 촉진 능력이 좋은 것임.
- 이 실험을 통하여 WE가 PPAR α 와 binding하여 PPAR α 의 반응을 촉진시킨다는 것을 확인할 수 있었음.
- PPAR α 의 활성화로 인한 지질대사의 변화가 WE, 즉 한식 간장에 있다고 추측되는 물질에 의해서 촉진된다는 것을 확인할 수 있으므로 이를 통해 한식 간장의 건강기능성을 증명할 수 있음.

라. 한식간장의 항비만 효능 평가(*in vivo*)

(1) 실험의 목적

본 실험의 목적은 한식간장에서 추출한 폴리사카라이드 분획과 아미노산·펩타이드 분획의 당·지질대사 조절 효능과 항염증 효과를 동물실험을 통해 확인하는 것임.

(2) 재료 및 실험 방법

(가) 실험의 진행과정

실험의 진행 과정은 Fig. 41과 같이 샘표식품(주)에서 분리한 한식간장의 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드의 투여량을 결정하고 동물실험을 진행하였음. 이후 혈액과 각 조직을 채취하여 plasma를 이용하여 lipid 분석과 ELISA를 통한 inflammation 측정을 진행하였으며, 간조직에서 mRNA를 추출하여 당·지질대사의 조절 효능을 확인하였음.

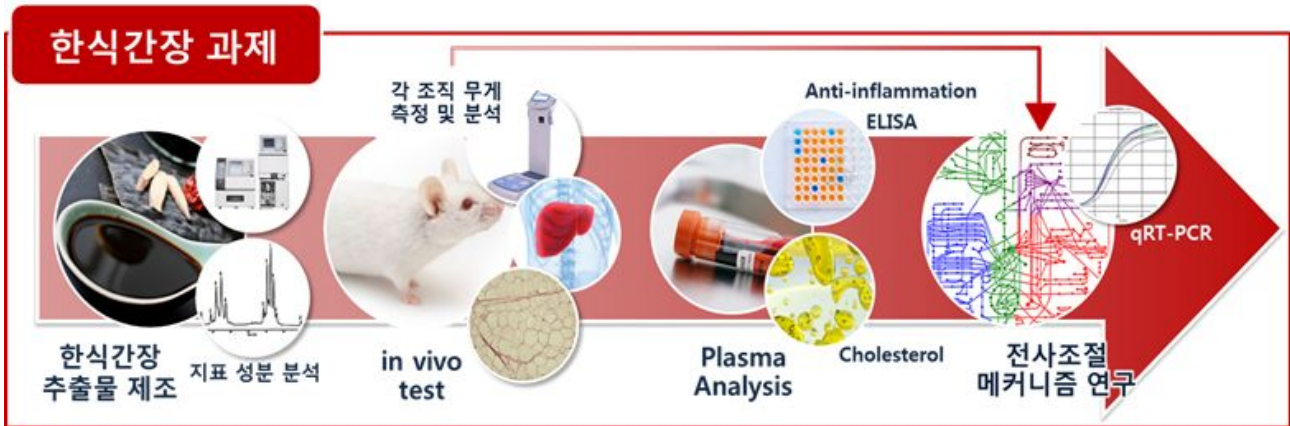


Fig. 41. 실험의 진행과정

(나) 실험시료

실험에 사용된 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드 시료는 샘표식품(주)에서 제공받았고 각 샘플의 조성은 표 2, 표 3과 같음.

두 시료의 열량을 맞추기 위해 폴리사카라이드군의 대조 시료는 sodium carboxymethyl cellulose (CMC; #419338, Sigma-Aldrich Korea, Yongin-city, Kyunggi-do, Korea)를 사용하였고 아미노산·펩타이드군의 대조 시료는 casein sodium salt (#C8654, Sigma-Aldrich Korea, Korea)를 사용하였음

Table 10. Composition of Korean ganjang polysaccharide sample

chemical composition	(%)
neutral sugar	62.97 (± 1.0)
uronic acid	37.03 (± 2.3)
protein	0 (±0)
KOD-liked material	0 (±0)
component sugar	(%)
rhmnose	9.20 ± 1.0
fucose	14.24 ± 0.2
arabinose	5.12 ± 0.2
xylose	31.83 ± 1.0
manose	13.75 ± 0.4
galactose	21.36 ± 1.1
glucose	4.50 ± 0.2

각 시료의 경구투여 용량은 폴리사카라이드와 CMC는 50mg/kg BW, 아미노산·펩타이드와 casein sodium salt는 500mg/kg BW를 기준으로 하였음.

Table 11. Composition of Korean ganjang peptide/amino acids sample

	총 아미노산(%)	유리 아미노산(%)
ASP	6.02	3.94
THR	2.63	2.29
SER	3.49	3.02
GLU	12.6	7.65
PRO	3.17	2.07
GLY	2.45	1.6
ALA	3.82	3.59
CYS	0.48	0.42
VAL	3.48	3.37
MET	0.9	0.99
ILE	3.11	2.93
LEU	4.61	4.48
TYR	0.38	0.27
PHE	2.65	2.51
HIS	0.67	0.58
LYS	2.87	2.47
ARG	0.28	0.18
합계(%)	53.57	42.36

(다) 실험동물 사육 및 사료제작

실험동물은 8주령의 수컷 C57BL/6J mouse를 샘타코 (Samtako Co., kyunggido, Korea)로부터 분양 받아 25±1 °C, 12시간 간격의 조명, 50%의 상대습도 조건에서 1주일간 적응시킨 후 45% 고지방식이 (HFD based on AIN93G; Feedlab Korea Co., Ltd., Korea)를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였음.

HFD로 10주간 비만을 유도한 후 임의로 4개의 그룹으로 분리한 뒤 12주간 경구투여 하였고 시료는 경구투여를 위해 distilled water에 녹여서 사용했고 -20°C에서 보관하였음.

폴리사카라이드는 50mg/kg BW, 대조군은 sodium carboxymethyl cellulose (CMC; #419338, Sigma-Aldrich Korea, Yongin-city, Kyunggi-do, Korea)를 동량 사용하였고, 아미노산·펩타이드는 500mg/kg BW, 대조군은 casein sodium salt (#C8654, Sigma-Aldrich Korea)를 동량으로 사용하였음.

식이 샘플 투여는 200µl씩 경구투여 하였고 사육 중 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 식이섭취량 및 체중은 주 1회 측정함.

(라) 해부 및 장기적출

0주, 4주, 8주째의 혈액 분석은 안와채혈법으로 채혈하였고 채혈 전 12시간 동안 절식시킴. 채혈한 혈액은 즉시 12000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 후 분석 및 -80°C에서 냉동 보관하였음.

12주의 사육기간이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후, 심장 채혈하였고 채혈한 혈액은 12000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리 후 -80℃에 냉동 보관함. 간과 근육, 백색 지방 장기조직은 채혈 후 적출하여 생리식염수에 씻은 후 표면의 수분을 제거하여 중량을 측정하였으며 측정 후 액체 질소에 냉각시켜 -80℃에 냉동 보관하였음.

Table 12. Composition of oral food intake samples for each group

Formulation	HFD 45% cal		
	g/837.54g	g/1kg.	cal.
Casein(milk)	200	238.8	955.2
corn starch	155.036	185.1	740.4
Sucrose	50	59.7	238.8
Dextrose	132	157.6	630.4
Cellulose	50	59.7	0
Soybean Oil	25	29.8	268.6
Lard	175	208.9	1,880.50
Mineral Mixture	35	41.8	0
Vitamin Mixture	10	11.9	47.8
TBHQ	0.014	0.0168	0
L-cystine	3	3.6	14.3
Choline Bitartrate	2.5	2.98	0
Total	837.54	1000	4776.1

	Pep/AA 대조군		Poly 대조군	
	Casein	Pep/AA	Cellulose	Polysaccharide
Control	○		○	
polysaccharide(Poly)	○			○
Peptide/Amino acid(Pep/AA)		○	○	
Poly + Pep/AA		○		○

Fig 42. Composition of experimental diets

(마) 간조직 및 지방조직의 조직학적 분석(H&E staining)

희생 후 적출한 간과 복부 지방 조직은 10% formalin 에서 48hr 고정 후 탈수 및 파라핀 침투과정을 거쳐, 파라핀 포매기로 포매하였음. 포매한 조직은 rotary microtoome으로 5µm의 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin(H&E) 염색을 수행하여 광학현미경과 형광정립현미경(Axio Imager M1 Microscope; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 지방조직의 크기를 측정, 분석함.

(바) 지질 및 콜레스테롤 분석 (Plasma Lipid and Cholesterol)

0주, 4주, 8주, 그리고 12주째의 혈액 분석은 Cobas C111 automatic analyzer (Roche, Basel, Switzerland)를 사용한 효소적 기법으로 측정하였다. 8주째까지는 total cholesterol, glucose, TG만을 측정하였고, 12주째는 total cholesterol, glucose, TG, HDL, LDL의 5종류를 측정함.

간 내 지질은 Zhang, L. et al의 프로토콜을 이용하여 추출, 지질 함량을 측정하였음. 마우스의 간 40mg을 acetone (HPLC grade) 800 μ l에 넣고 homogenizing 후 18시간동안 추출하였으며 이후 12000g에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 Cobas C111을 이용하여 total cholesterol과 TG함량을 측정함.

(사) Total RNA 분리 및 cDNA합성, quantitative PCR 분석

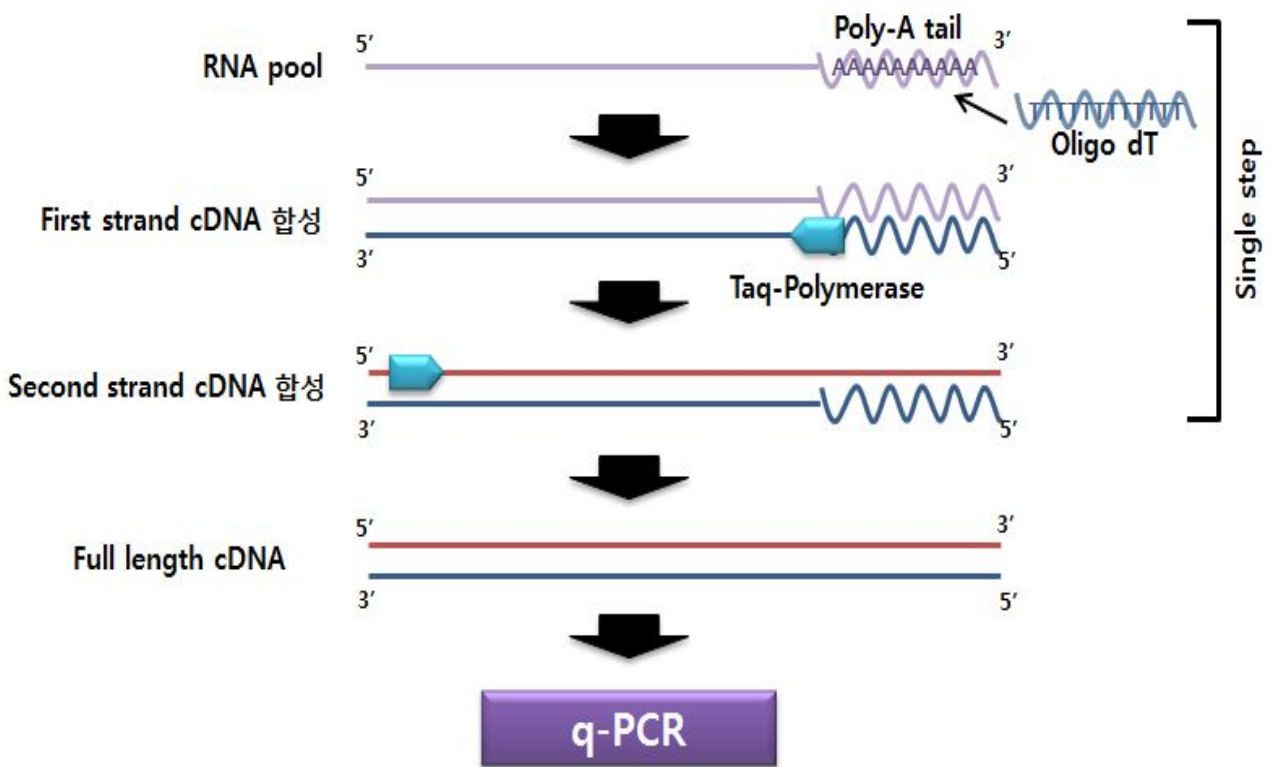


Fig 42. cDNA의 합성 과정

RNA iso Plus kit(Takara Bio, Otsu, Japan)을 이용하여 mouse 조직으로부터 total RNA를 추출하였으며 실험 방법은 제조사의 protocol에 따름.

cDNA 합성은 추출된 total RNA 1 μ g을 oligo dT와 M-MLV Reverse Transcriptase(M biotech, Inc., Kyunggi, Korea)을 이용해 역전사 하였음.

Quantitative real-time polymerase chain reaction(PCR)에 이용된 마우스 primer는 표 5에 정리하였으며, 각각의 primer들은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 nucleotide정보를 이용하여 primer blast software를 통해 디자인하였으며 Bionics(Seoul, Korea)에서 제작함.

Table 13. Sequences of primers of investigated genes in q-PCR analysis

		Forward	Backward
Reference	mGAPDH	aac ttt ggc att gtg gaa gg	aca cat tgg ggg tag gaa ca
LXRa pathway	mLXRa	gca gga cca gct cca agt ag	ggc tca cca gct tca tta gc
	mSREBP1c	ccc tgt gtg tac tgg cct tt	ttg cga tgt ctc cag aag tg
	mChREBP	cct cac ttc act gtg cct ca	aca ggg gtt gtt gtc tct gg
	mACC1	gcc tet tcc tga caa acg ag	tga ctg ccg aaa cat ctc tg
	mFAS	gtg agt cta tcc tgc get cc	ccc aag gag tgc cca atg at
	mSCD1	gcg ata cac tct ggt gct ca	ccc agg gaa acc agg ata tt
	mABCA1	cgc tca act ttt acg aag gcc	gag cga atg tcc ttt ccc ca
	mABCG5	tca ctt gca ttt gct tcc tg	ctt ctg ctg gca tga ttt ga
	mABCG8	gga ttt atc tgg ggg cat tt	ggc aat cag agt caa cag ca
	mInsig2a	cca ttg aaa cat tgg tet gc	gga tca cca cgt tca cac tc
	mHMG-CoA R	gtc caa ttt ggc agc tca gcc att	tcc agc gac tat gag cgt gaa caa
	mLDL-R	caa caa tgg tgg ctg ttc cca cat	act cac act tgt agc tgc ctt cca
	mCYP7a1	aca cca ttc ctg caa cct tc	gct gtc cgg ata ttc aag ga
mSR-BI	aag tgg tca acc caa acg ag	acg gtg tgc ttg tca ttg aa	
PPARa pathway	mPPARa	atg cca gta ctg ccg ttt tc	ggc ctt gac ctt gtt cat gt
	mLPL	gaa acc agt agg gca tgt tga	cag cag gga gtc aat gaa gag
	mCD36	gca aag aag gaa agc ctg tg	cca atg gtc cca gtc tca tt
	mFATP5	tcg gat ctg gga att cta cg	cag gaa tgc aaa aac cct gt
	mFABP1	cat cca gaa agg gaa gga ca	ccc agt cat ggt ctc cag tt
	mACS	cag aac atg tgg gtg tcc ag	ggt acc aac atg ggc tgc tt
	mCPT1a	cat gtc aag cca gac gaa ga	tgg tag gag agc agc acc tt
	mACOX1	tta tgc gca gac aga gat gg	agg cat gta acc cgt agc ac
Inflammation	mTNFa	ccg atg ggt tgt acc ttg tc	cgg act ccg caa agt cta ag
	mIL-6	ctg atg ctg gtg aca acc ac	tccacgattcc cag aga ac

Quantitative PCR은 AccuPower® 2X Greenstar master mix solution (Bioneer Co. Ltd., Korea)와 iQ5 icycler system (Bio-rad)를 이용하여 수행되었음. 수행된 조건은 95℃에서 30초 동안 denature시킨 후 60cycle에 걸쳐 95℃에서 10초 동안 추가적인 denature과정을 거쳐 55~61℃사이에서 15분간 annealing을 하였고 68℃에서 20초간 신장함. 형광 신호(cyber green dye)는 각 PCR cycle이 끝난 뒤 자동으로 측정되며 각 유전자의 발현 정도는 각각의 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 reference로 사용하여 분석하였음.

(아) 혈액 내 염증반응 지표 측정

채혈한 혈액의 plasma로부터 CRP, TNF-α, IL-6를 측정하기 위해 ELISA kit을 사용하였

음. CRP는 IBL-America의 mouse C-reactive protein ELISA(Cat# IB66102, IBL America, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였고 TNF- α 와 IL-6는 Pierce Biotechnology사의 mouse TNF- α ELISA kit (Cat# EMTNFA, Pierce Biotechnology, Rockford, USA)와 mouse IL-6 ELISA kit (Cat# EMIL6, Pierce Biotechnology, Rockford, USA)를 사용하여 측정하였고 제조사에서 제공한 protocol에 따랐음. 샘플은 12주째 심장 혈액의 plasma를 이용하였음.

(3) 결과 및 고찰

(가) 식이 기간 중 체중변화

한식간장에서 분리한 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드 분획이 고지방 식이를 섭취한 마우스의 체중증가에 미치는 영향을 측정하기 위해 비만 유도 10주, 샘플 적용 12주, 총 22주에 걸쳐 동물실험을 진행하였음.

폴리사카라이드의 대조군에는 sodium carboxymethyl cellulose(CMC)를 처리하였고 아미노산·펩타이드의 대조군에는 casein sodium salt를 처리하여 처리 물질로 인한 차이를 최소화하였음.

실험결과 poly군의 몸무게 증가가 가장 완만하고 pep/AA 군의 몸무게 증가가 가장 컸고 poly+pep/AA는 control과 비슷한 경향성을 보였는데 pep/AA와 poly군의 상호작용에 의한 것으로 보여짐.

각 군의 mouse 한 마리당 하루 사료 섭취량의 평균은 각각 2.33g, 2.32g, 2.42g, 2.14g로 섭취량의 차이로 인한 몸무게 변화의 가능성은 낮다고 판단됨.

결론적으로 Pep/AA군의 샘플시료 경구투여로 mouse의 BW이 증가되었고 poly군은 감소했음. 그러나 통계학적인 유의성은 없었음(Fig. 43).

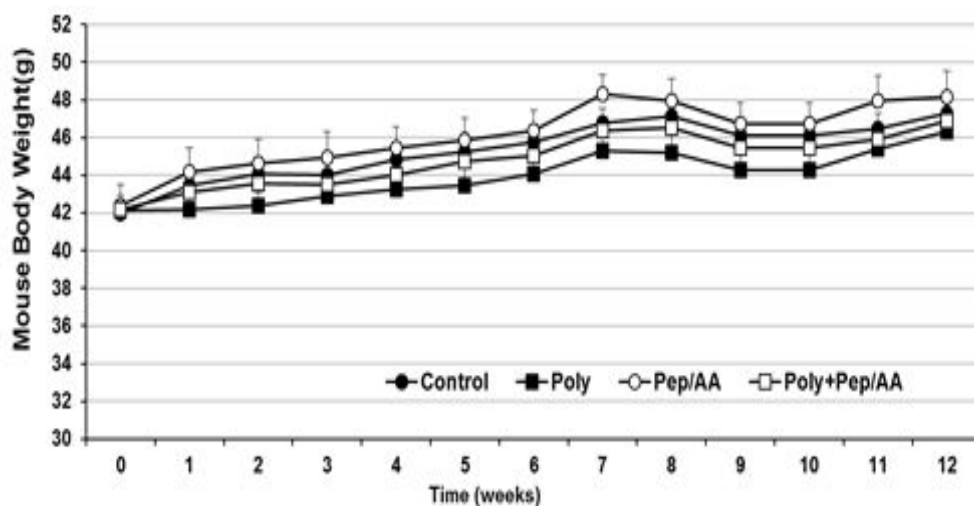


Fig. 43. Changes of body weight in mice fed with high fat diets

(나) OGTT (Oral Glucose Tolerance test)

시료의 장기간 투여에 의한 insulin의 민감도 변화를 확인하기 위해 OGTT를 수행하였음.

실험결과 유의성을 확인하지는 못했으나 plasma glucose level이 poly군에서 다른 군에 비해 완만하게 증가하였고 60min 이후 빠른 감소치를 보여주었음. (Fig. 44).

OGTT 실험의 그래프를 이용하여 AUC(area under the curve)를 구함. 분석 결과 그룹간의 통계학적 차이를 확인할 수 없었음(Fig. 45).

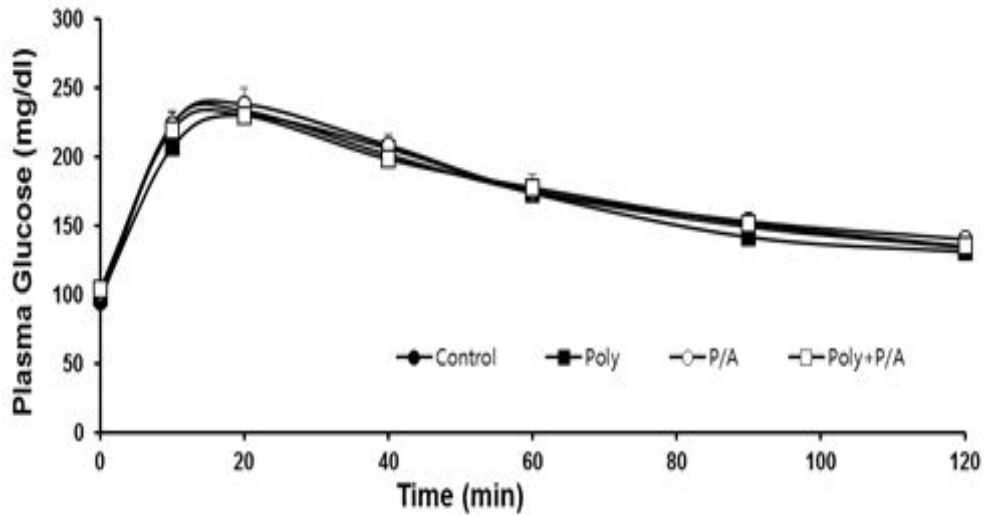


Fig. 44. Oral glucose tolerance test of each group

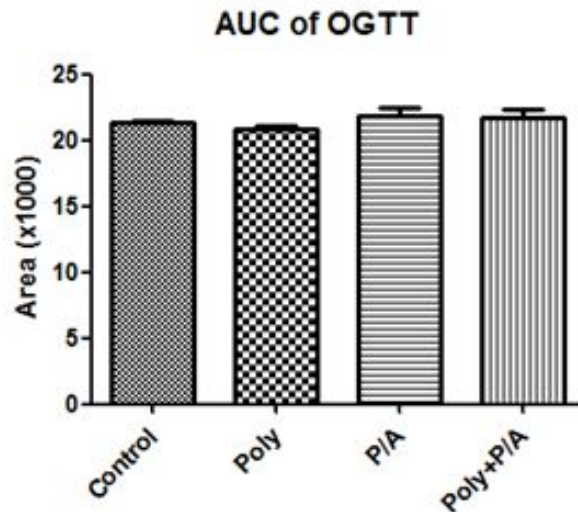


Fig. 45. Area under the curve of Oral glucose tolerance test of each group.

(다) 간비대 개선 효과 및 지방조직의 무게

각 군의 장기의 무게를 측정하기 위하여 간과 양 대퇴부의 근육을 채취하였고, white adipose tissue(WAT)의 측정을 위해 abdominal fat(복부지방), kidney fat(신장 지방), intestinal fat(장간막 지방)을 채취하여 그 무게를 측정하였음(Fig. 46).

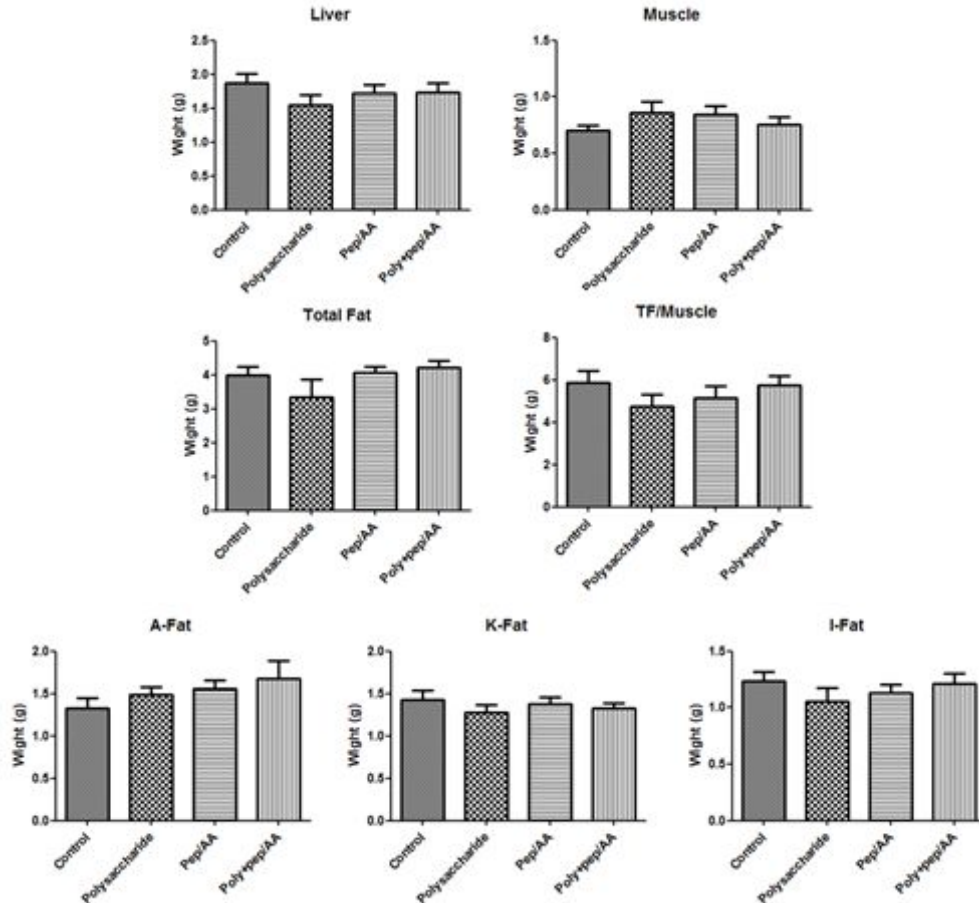


Fig. 46. Weights compared to the body weight of liver, muscle and WAT

Poly군에서 liver와 total fat의 무게가 가장 적게 나타났고 muscle의 무게가 가장 높게 나타났다. 각 그룹간의 근육대비 지방의 양을 비교하기 위해 total fat/muscle의 값을 그래프로 나타내었음(TF/Muscle). 모든 그래프에서 유의성은 없지만 poly군이 다른 군에 비해 지방의 양이 줄고 근육의 양이 증가하였다고 보여짐.

Pep/AA군은 poly군에 비해 지방의 양에 큰 변화는 없으나 control군과 비교하여 근육의 양이 증가한 것으로 보임. 따라서 근육양 대비 지방의 양은 control보다 적고 poly군보다 많으나 역시 유의성은 확인할 수 없었음.

(라) H&E staining을 통한 지방조직의 크기와 간의 지방 확인

Poly군의 섭취가 마우스의 주요 지질대사 조절기관에 어떠한 영향을 미쳤는지를 파악하기 위해 간 조직과 복부 백색 지방 조직 (abdominal White Adipose Tissue(WAT))의 H&E staining을 진행하였음.

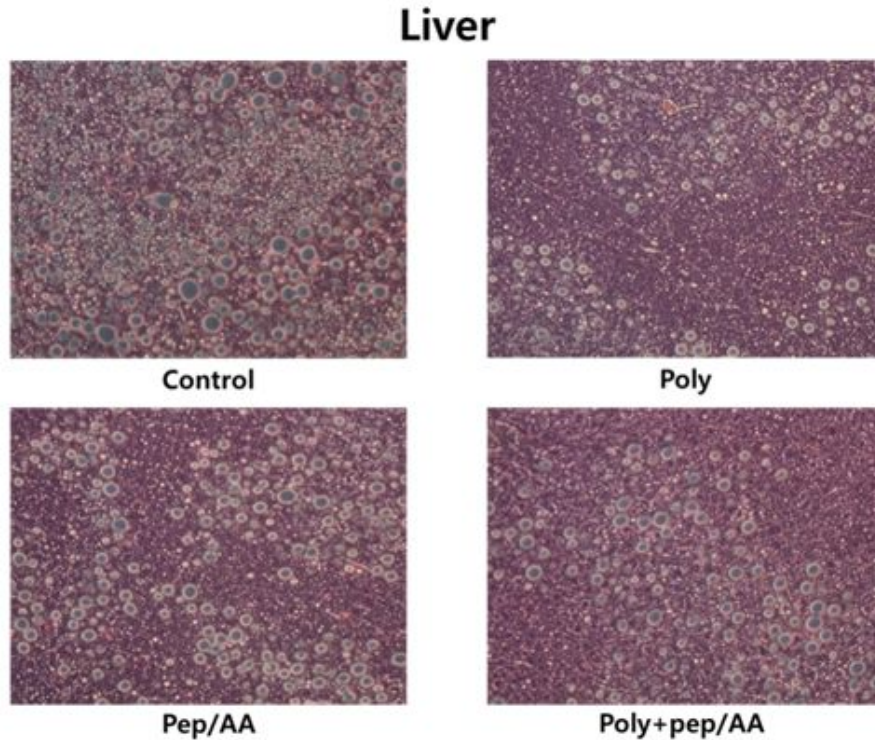


Fig. 47. H&E staining of Liver tissue

실험결과 간에서 control의 경우 크고 많은 lipid droplet의 흔적들을 확인할 수 있었음. 이들은 비만으로 인하여 간에 지방이 축적되어 형성된 droplet으로 poly군에서는 control과 비교하여 현저히 감소하였음을 확인할 수 있음.

Mouse body weight (BW)이 더 높았던 pep/AA와 유사했던 poly+pep/AA군에서도 간에 축적된 지방이 control보다 적었다는 사실을 확인할 수 있고 이를 통해 몸무게에는 큰 영향을 주진 못했지만 체내 지질 대사에 긍정적인 효과를 미쳤을 것이라 추정할 수 있음(Fig. 47).

WAT의 H&E staining 결과 poly 그룹 ($6902.8 \pm 364.5 \mu\text{m}^2$)의 경우 adipocyte의 단면적이 상당히 감소하여 control ($10120 \pm 765.1 \mu\text{m}^2$), pep/AA ($10902.5 \pm 670.9 \mu\text{m}^2$), poly+pep/AA ($9394.3 \pm 616.3 \mu\text{m}^2$)에 비하여 통계학적인 유의성을 보였음(Fig. 48).

이는 폴리사카라이드 시료가 지질대사에 영향을 주어 adipocyte cell의 lipogenesis를 억제 하였기 때문으로 보인다.

Fat

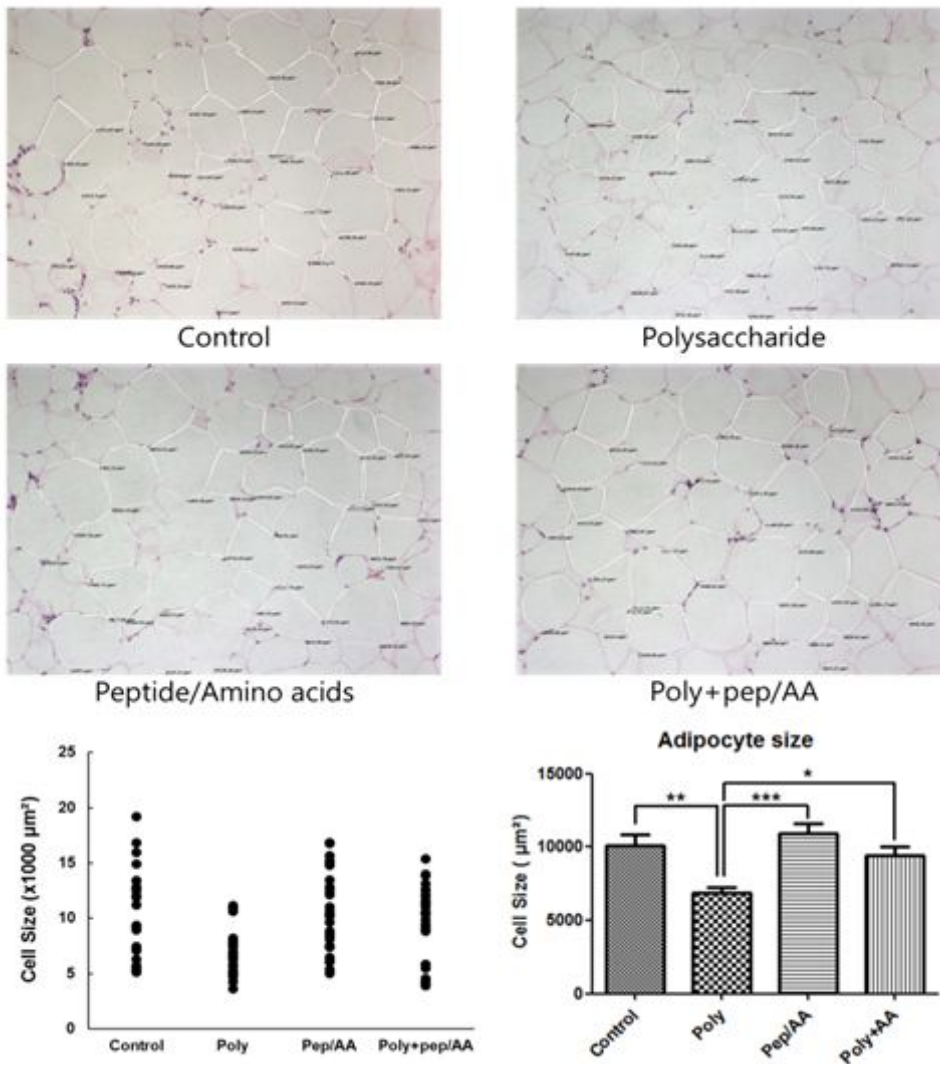


Fig. 48. H&E staining of WAT

(마) 혈중 지질 농도의 변화

0, 4, 8 그리고 12주차의 plasma 샘플의 cholesterol, TG, glucose level을 측정 한 결과 cholesterol을 제외한 TG, glucose에서 그룹간의 차이를 확인할 수 없었음. 그러나 total cholesterol에서 poly 군이 control 군과 비교하여 유의적인 차이를 보였음(Fig. 49).

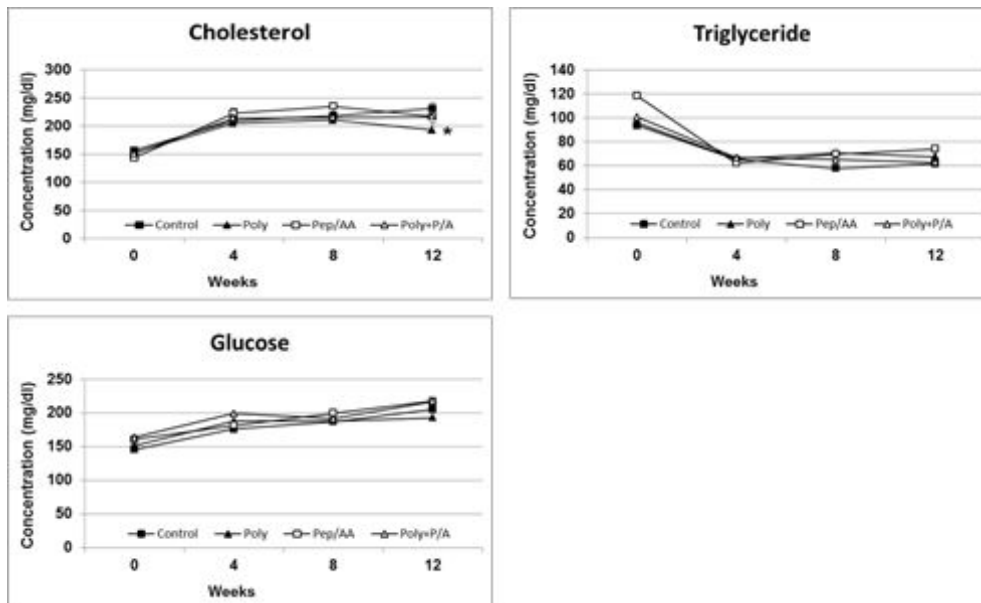


Fig. 49. Biochemical characteristics from mouse blood

각 시료가 혈중 지질 농도에 미치는 영향을 확인하기 위해 mouse sacrifice 후 심장 채혈한 plasma(12주차)를 통해 total glucose, cholesterol, triglyceride, HDL, LDL을 측정하여 ANOVA test를 이용하여 분석하였음.

또한 각 그룹에서 HDL과 LDL의 조성에 변화가 있었는지 확인하기 위하여 HDL/LDL ratio를 계산하였고, HDL대비 total cholesterol의 비율에 변화가 있었는지를 확인하기 위하여 TC/HDL ratio를 계산한 후 분석하였음(Fig. 50).

실험결과 poly 군에서 전체적인 cholesterol의 유의적인 감소가 확인되었음. 이러한 감소는 total cholesterol 뿐 아니라 HDL과 LDL에서도 나타났는데 이는 체내 지방의 양이 poly 시료에 의해 전반적으로 감소하였다는 사실을 보여줌.

또한 HDL/LDL ratio를 개선하여 단순히 cholesterol의 감소뿐 아니라 plasma에 존재하는 HDL의 비율을 높여주어 atherosclerosis와 coronary heart disease의 위험성을 낮추는 결과를 보여주었음(Fig. 50).

이러한 결과가 어떠한 경로를 통해 나타난 것인지 확인하기 위해 이후의 과정에서 q-PCR을 사용하여 지질대사 과정을 조사하였음.

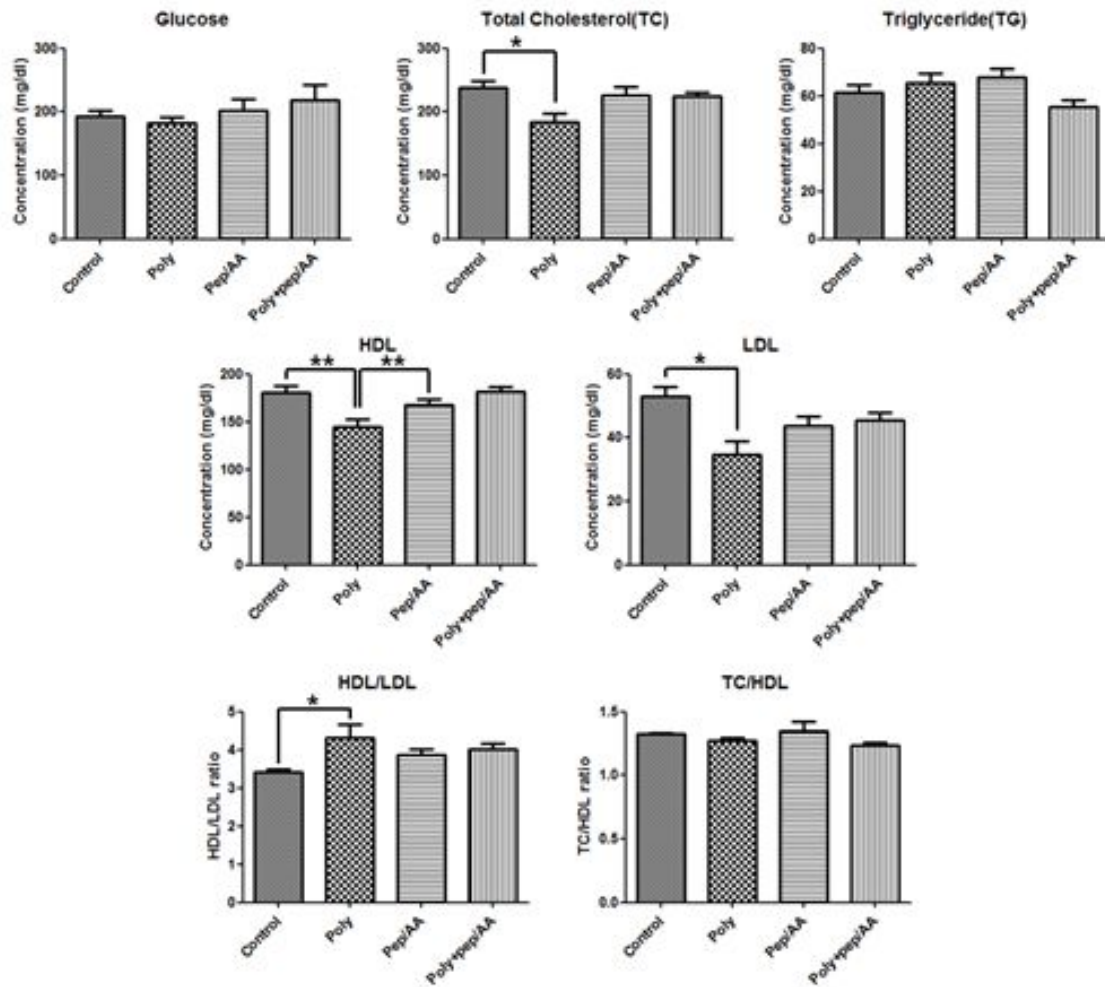


Fig. 50. Biochemical characteristics from mouse blood

(바) 간에서의 total cholesterol과 TG 측정

간에서 lipid accumulation을 측정한 결과 control과 비교하여 poly, pep/AA, poly+pep/AA 군 모두에서 유의적인 cholesterol과 TG의 감소를 확인할 수 있었음. Cholesterol에서는 control 군과 비교하여 각각 20.0%, 18.4%, 23.0%의 cholesterol level 감소를 보였음.

그러나 pep/AA 그룹에서는 cholesterol이 감소하는 경향은 확인하였으나 유의성은 확인할 수 없었음(Fig. 51 left).

TG 군 역시 마찬가지로 각각 23.4%, 16.0%, 26.5%의 유의적인 TG level 감소를 확인할 수 있었다 (Fig. 51 right).

위의 결과로 미루어봤을 때 한식간장에서 분리한 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드는 모두 간에서의 지질 축적을 감소시키는 효과가 있다고 판단됨.

다만 폴리사카라이드의 일종인 glucomannan과 chitosan은 lipid의 absorption을 낮추어 간의 지질 수준을 낮추고 fat의 excretion을 향상시킨다는 결과를 보인다는 연구 결과가 있음 (Gallaher, C.M., et al.) 따라서 이 실험에서 제시된 간의 지질 저하가 체내 지질의 감소로 나타난 현상인지 혹은 간 기능 향상에 의한 결과인지는 확인할 필요성이 있음.

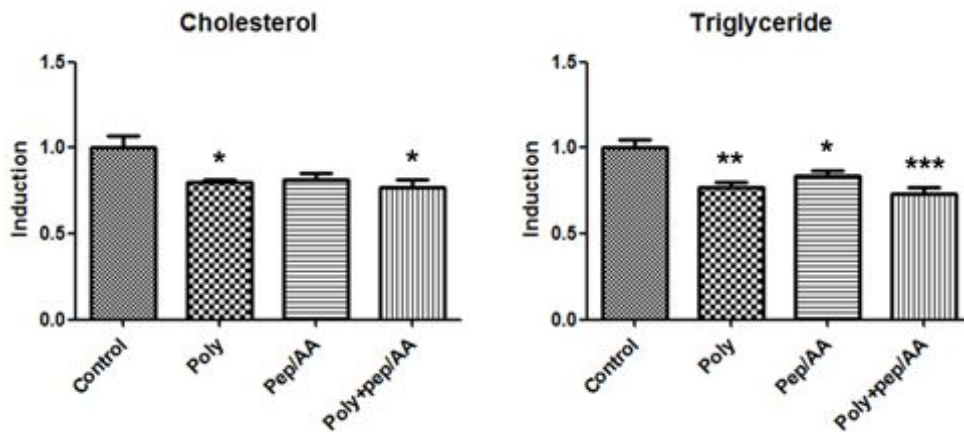


Fig. 51. Lipid accumulation of liver tissue

(사) 간에서의 지질대사 조절능력 확인

실험 후 쥐에서 분리해낸 간에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 각각의 primer를 통해 주요 지질대사 조절 유전자의 발현을 확인하였음. 다음 그림은 q-PCR 실험에 사용된 유전자의 상관관계를 나타낸 그림이다(Fig. 52).

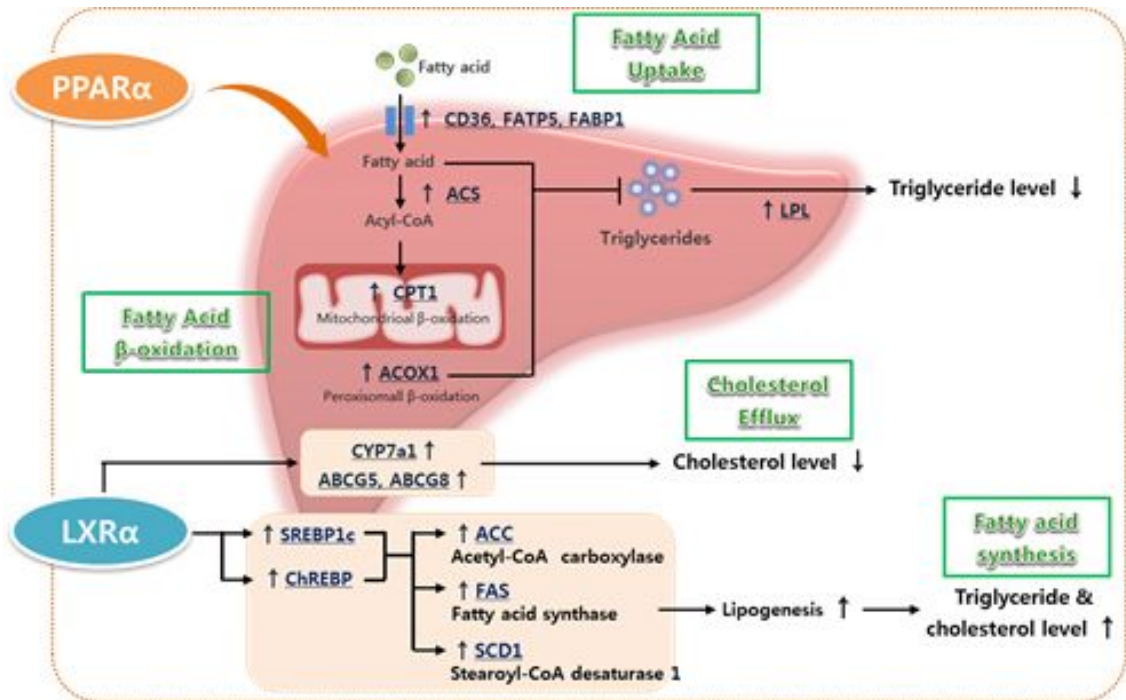


Fig. 52. Lipid metabolism in the liver activating by PPARα and LXRα.

LXRα와 PPARα는 당과 지질 대사의 주요 조절인자로 많은 연구에서 주목 받고 있음. 그 중에서도 LXRα와 PPARα는 간에서 특히 그 역할이 큰데 LXRα는 간의 fatty acid synthesis와 cholesterol efflux에 영향을 주어 간의 지질대사를 조절함(Baranowski, M et al.).

PPARα는 간의 fatty acid uptake와 β-oxidation을 활성화시켜 LXRα와 함께 간의 지질 대사 조절에 중요한 요소임. 이 실험에서는 q-PCR을 통해 실험에 사용된 시료들이 LXRα와 PPARα 두 nuclear receptors의 활성화에 어떤 영향을 주었는지 조사하고 그 활성화가 간의 지질 대사에 어떤 변화를 일으키는지 확인하고자 하였음.

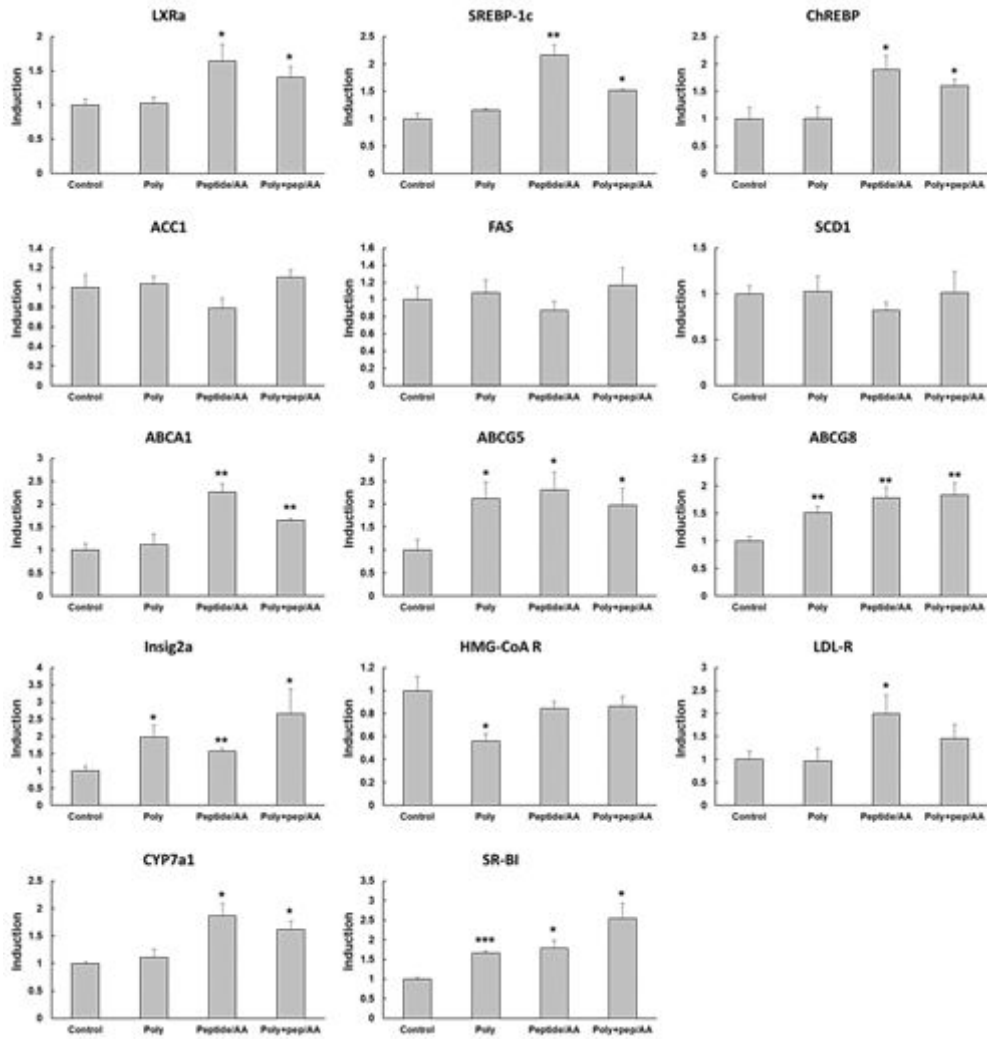


Fig. 53. Gene expression related with lipid metabolism 1

간에서 시료의 효능 확인을 위해 우선 LXRα와 PPARα의 활성을 조사하였고 실험 결과 Pep/AA군과 Poly+pep/AA군에서만 LXRα와 PPARα의 활성을 확인할 수 있었음.

이후 LXRα 활성에 의한 순차적인 대사 과정을 확인하기 위해 fatty acid synthesis를 조절하는 SREBP1c와 ChREBP, 그리고 이들에 의해 활성화되어 직접적으로 지질생합성에 관여하는 효소인 ACC1, FAS, SCD1의 활성을 측정하였음.

실험 결과, SREBP1c와 ChREBP의 활성이 LXRα에 의해 높아졌음을 확인할 수 있었음 (Fig. 53). 반면 ACC1, FAS, SCD1에서는 SREBP1c와 ChREBP에 의한 활성이 나타나지 않았음.

SREBP1c는 SCAP과 complex를 이루어 ER에서 golgi로 이동하는데 이 complex에 Insig2a가 결합하여 translocation을 저해한다고 알려져 있다(Yecies, J.L., et al., Yellaturu C.R., et al.). 따라서 이러한 결과가 Insig2a에 의한 것인지를 확인하기 위해 해당 gene의 expression을 확인하였고 control군을 제외한 실험군에서 Insig2a의 활성이 증가하는 것을 확인

할 수 있었음.

결론적으로 Insig2a가 과발현되어 SREBP1c에 의한 ACC1, FAS, SCD1의 지방생합성을 저해하였을 것이라 생각됨.

ChREBP는 SREBP1c와 함께 지방생합성을 조절하는 단백질임. 기존 논문에 따르면 SREBP1c가 제거된 mice에서 지방생합성이 50% 감소된다는 결과가 있음(Liang, G., et al.) 이는 SREBP1c 하나의 활성화로는 완전한 지방생합성을 유도하지 못한다는 말과 같음. 즉 ChREBP와 함께 활성화 되어야 충분한 지방 생합성이 이루어짐.

LXR α 은 지방생합성뿐 아니라 cholesterol efflux도 활성화시킴. LXR α 에 의해 활성화 되는 CYP7a1, ABCG5, ABCG8는 간 내의 cholesterol을 bile을 통해 소장으로 배출함(Yu, L., et al., Repa, J.J., et al., Peet, D.J., et al.)

ABCA1은 LXR α 에 의해 활성화되지만 plasma HDL의 수준을 조절하고 SREBP2와 더 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있음(Tamehiro, N., et al.)

실험결과 ABCA1과 CYP7a1은 LXR α 에 의한 활성이 있는 pep/AA, poly+pep/AA에서만 활성을 보였고, ABCG5와 ABCG8은 control군을 제외한 모든 실험군에서 유의적인 활성을 보였음.

이는 LXR α 의 활성화에 의해 cholesterol efflux가 활성화되었기 때문으로 보임. 다만 Poly군의 경우 LXR α 의 활성이 없음에도 두 유전자의 활성이 확인되었는데 실험에 사용된 시료가 crude sample이므로 그 중의 한 요소에 의한 것이라고 추측됨.

Fig. 50에 나타난 Poly군의 유의적인 HDL증가와 LDL, cholesterol 저하 효과가 간 내부의 지질대사 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 HMG-CoA reductase와 LDL-R의 활성을 확인하였음.

HMG-CoAR은 mevalonate pathway의 rate-controlling enzyme으로 감소시 체내 cholesterol 합성이 저하하고, LDL-R은 혈중 LDL을 간으로 수용하는 receptor로 혈중 LDL의 농도를 낮추는 역할을 함.

실험결과 Poly군은 HMG-CoAR이 감소하여 cholesterol의 합성이 저해되었을 것으로 생각됨.

앞에서 언급했듯이 폴리사카라이드는 intestine에서 cholesterol의 흡수를 저해함(Gallaher, C.M., et al.) 이러한 논문들과 실험에 이용된 crude한 샘플의 주요성분이 폴리사카라이드인 점을 감안하여 HMG-CoAR과 LDL-R의 결과를 통해 Poly군의 cholesterol 저하는 ABCG5, ABCG8의 efflux 효과에 더하여 cholesterol의 흡수가 저하되어 나타난 결과라고 생각할 수 있

음. 그러나 이 실험에서는 intestine에서의 흡수억제는 확인하지 않았음.

SR-BI은 HDL을 인식하는 scavenger receptor로 HDL을 매개로 cholesterol의 uptake와 bile로의 수송을 활성화시킴(Kozarskky, K.F., et al., Acton, S., et al.). 이러한 기작은 reverse cholesterol transport로 알려져 있는데 peripheral tissue에 존재하는 cholesterol을 배출을 위해 간으로 이동시키고 bile을 통해 배출함.

이는 atherosclerosis를 방지하고 심장관련 질환의 위험을 줄여주는 역할을 함. 따라서 SR-BI의 활성 역시 간의 지질 수준을 낮추는 역할을 할 것으로 보여짐.

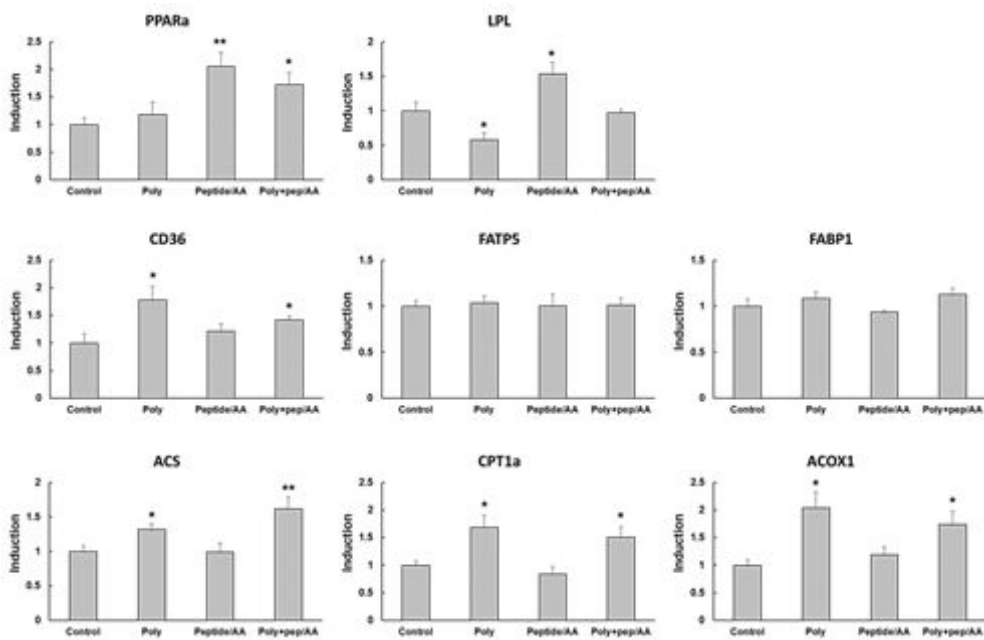


Fig. 54. Gene expression related with lipid metabolism 2

PPARα는 fatty acid uptake 경로를 통한 간으로의 cholesterol 유입에 관여하는 것으로 알려져 있음.

Fatty acid uptake의 주요 단백질은 CD36, FATP5, FABP1, caveolin-1이 존재하는데 90% 이상의 long chain fatty acid(LCFA)의 uptake는 이 transporter에 의해 일어남(Rajaraman, G., et al., Stump, D.D., et al.)

이 실험에서는 CD36, FATP5, FABP1 3가지 transporter를 통해 fatty acid uptake를 확인하였음(Fig. 54). 실험결과 CD36에서 Poly군과 Poly+Pep/AA군의 유의적인 발현 증가를 확인하였고 FATP5에서는 Pep/AA군, FABP1에서는 유의적인 차이를 확인하지 못했음.

CD36은 multifunctional protein으로 long chain fatty acid(LCFA) uptake 뿐만 아니라 collagen, 산화 LDL 등의 receptor 역할을 겸하고 있다. 따라서 Poly군의 CD36의 활성화는 crude

sample에 존재하는 다양한 성분에 의한 것이라고 생각됨.

β -oxidation이 이루어지기 위해서는 혈액 내의 fatty acid가 간으로 유입되는 과정을 거쳐야 하는데 그 과정에 대해서는 아직까지 논란이 있음. 그러나 많은 *in vitro* 결과들이 Fatty acid transporter(FATP/CD36)가 주로 그 역할을 하는 것으로 보고하고 있다(Febbraio, M, et al., Steinbrecher, U.P.) 이 수송단백질은 그들의 promoter에 PPARs와 특이적인 PPRE(PPARs responsible elements)를 가짐으로써 직접적인 PPAR α 의 표적 유전자임이 확인되었다(Armesilla, A.L., and M.A. Vega, Sao, O., et al.)

간 내부로 수송된 지방산은 불활성화 상태이기 때문에 추가적인 경로를 거쳐 활성화됨. Acyl-CoA 유도체로 활성화되는 지방산 활성화 단계는 세포 내 여러 부위에서 이루어지며 주요 조절효소인 ACS(fatty acyl-CoA synthetase)와 peroxisomal β -oxidation의 주요 타겟인 ACOX-1(peroxisomal acyl-CoA oxidase 1)이 PPAR α 에 의해 활성화 된다고 보고되어있다(Dreyer, C., et al, Fruchart, J.C., et al).

활성화 된 지방산은 PPAR α 의 표적 유전자인 CPT-1 (Carnitine palmitoyl transferase-I)에 의해 mitochondria로 이동하고 mitochondrial β -oxidation을 수행하게 됨.

실험결과 β -oxidation의 주요 인자로 알려진 ACS, CTP1a, ACOX1의 활성을 보면 Poly군과 Poly+Pep/AA군에서 유의성을 보이며 β -oxidation의 활성이 이루어졌음을 보여주는데 이는 CD36에 의해 유입된 FA가 β -oxidation 과정에 직접적으로 사용되기 때문인 것으로 보여짐.

PPAR α 는 triglyceride hydrolase인 lipoprotein lipase(LPL)를 활성화 시킴. LPL은 ApoC-III에 의해 억제되는데 ApoC-III는 간에서 PPAR α agonist에 의해 억제되기 때문에 PPAR α 에 의해 LPL이 활성화됨.

LPL은 간에서 VLDL형성을 억제해 plasma VLDL의 수준을 낮추고 LDL로 전환시켜 LDL-R에 의한 간의 LDL흡수를 촉진시킴(Gervois, P., et al., Lefebvre, P., et al., Peters, J.M., et al.)

LPL은 중요한 지질과 lipoprotein 대사의 조절 인자이며 서로 다른 조직에서 다양한 경로를 통해 지질과 에너지 대사에 영향을 줌. 비록 대부분의 조직에서 lipase는 유사하게 나타나지만 그 발현의 조절과 translation 과정은 조직마다 다양함(Eckel, R.H.)

LPL의 활성은 간의 VLDL형성을 억제하고 LDL-R을 통한 plasma LDL의 흡수를 통해 plasma lipid level을 낮추었을 것임.

(아) Plasma와 간의 q-PCR 분석을 통한 inflammatory factor 확인

PPAR α 의 활성화와 polysaccharide 시료는 anti-inflammatory effect를 가지고 있다고 알려져 있고, 또한 LXRs 역시 macrophage에서 lipid metabolism과 inflammatory gene expression을 조절한다는 보고가 있었음 (Fruchart, J.C., et al., Joseph, S.B., et al., Staels, B., et al.)

따라서 PPAR α 와 LXR α 의 활성화에 의해 inflammatory process에 어떤 변화가 생겼는지 알고자 ELISA와 q-PCR을 통해 anti-inflammation 효과를 확인하였음.

PPAR α 와 PPAR γ 를 대상으로 실험한 결과 PPAR α 에서 inflammatory process에 의한 atherosclerotic lesions이 억제되었고, PPAR α 의 ligand가 IL-6 (interleukin-6)의 생산을 유도하는 IL-1 (interleukin-1)과 cyclooxygenase-2의 발현을 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 조절하여 억제하였음. PPAR α 의 agonist인 fenofibrate의 치리가 plasma에서 IL-6와 fibrinogen, C-reactive protein (CRP)의 농도감소를 유도하였다(Staels, B., et al.) 또한 Polysaccharide와 peptide가 anti-inflammatory effects를 보인다는 연구 결과(Bauerova, K., et al.)도 있다.

LXRs의 연구는 in vitro에서 LXR ligands는 lipopolysaccharide (LPS)나 bacterial infection에 의한 nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 (COX-2) 그리고 interleukin-6 (IL-6) 등의 inflammatory 매개체들의 발현이 억제되었고 in vivo에서는 대동맥에 atherosclerosis를 가진 mice를 이용해 LXR agonist에 의해 inflammatory gene의 발현이 감소되었음을 확인하였다(Joseph, S.B., et al.)

이 실험결과들을 토대로, 실험에 사용된 한식간장 분획의 항염 효과에 대해 항염증 지표인 CRP, TNF- α , IL-6를 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 확인하였고, TNF- α 와 IL-6를 q-PCR을 통해 확인하였음.

Adipocyte는 단순히 TG를 저장하고 free fatty acids(FFAs)를 제공하는 저장소의 역할뿐 아니라 다양한 enzyme, cytokine, growth factor, hormone을 생산 분비하는 역할을 함(Ahima, R.S.)

또한 최근에는 혈관손상, 인슐린 저항, atherogenesis 등과 직접적으로 관련된 pro-inflammatory mediator의 근원지로 알려지고 있음. 이러한 pro-inflammatory adipocytokine (adipokine)으로는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), leptin, resistin, C-reactive protein (CRP) 등이 존재함(L며, D.C., et al.)

CRP는 간에서 합성되는 단백질(Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield)이며 IL-1과 TNF- α 에 의해서도 조절되지만 주로 혈류 내에 순환되는 IL-6의 농도에 따라 조절됨(Yudkn, J.S., et al.) 또한 최근에는 coronary heart disease(CHD)의 예측인자로 떠오르고 있음(Ridker, P.M.).

혈류 내 CRP는 인슐린 저항에 의한 신진대사장애로 인한 비만인 개체(Visser, M., et al.,

Senn, J.J., et al.)와 Type 2 diabetes에서 증가함(Pradhan, A.D., et al.)

TNF- α 는 inflammatory cytokine으로 비만이나 인슐린 저항이 있는 환자에서 많이 발현됨. TNF- α 는 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 transcription을 활성화 시키고 NF- κ B는 atherogenesis를 가속하고 대동맥(aortic)과 혈관평활근(vascular smooth muscle)에서 VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, E-selectin의 발현을 유도함(Ouchi, N., et al.) 또한 TNF- α 는 endothelial cell에서 protein kinase B나 AKT를 탈인산화시켜 apoptosis를 유도함(Choy, J.C., et al, Hermann, C., et al.)

IL-6는 근육과 지방 조직에서 체온을 증가시키기 위해 에너지의 전환을 자극하고 병원균과 관련된 미생물 분자패턴(pathogen associated molecular patterns; PAMPs)에 대한 반응으로 macrophage에서 분비됨. PAMPs는 수신수용체 (TLRs) 등 패턴인식 수용체 (PRRs)와 결합하여 염증성 cytokine의 생산을 유도함. IL-6는 adipocytes에 의해 생성되며, 비만인 개체의 CRP를 높이는 이유로서 작용할 것으로 예상되고 있음(Bastard, J.P., et al.)

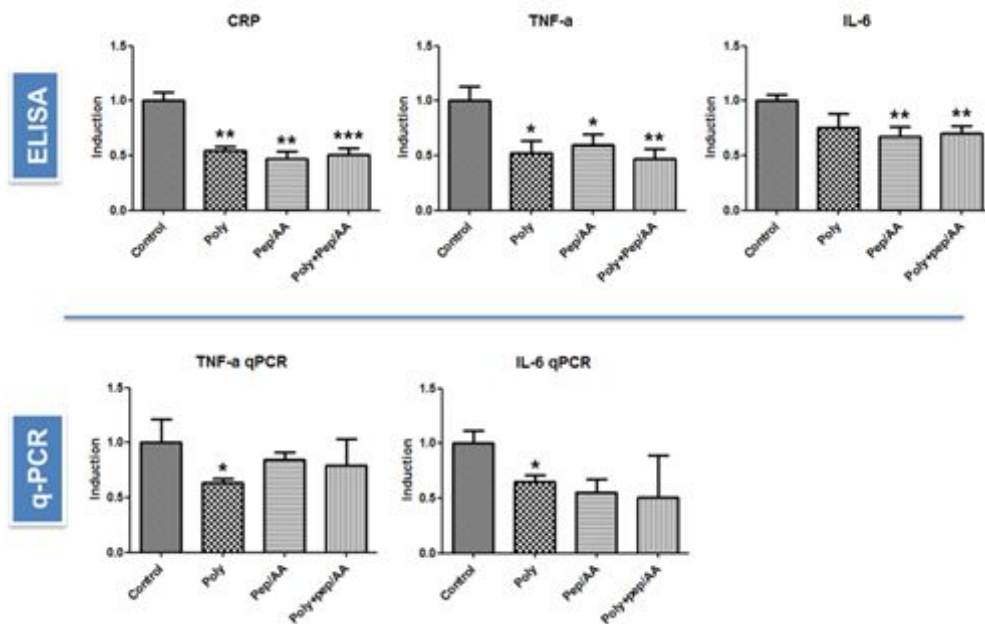


Fig. 55. Inflammatory effects of samples by ELISA and q-PCR

Plasma 샘플을 이용한 ELISA 실험결과 Poly군과 peptide군 그리고 두 샘플을 함께 처리한 실험군에서 각각 CRP에서 44.5%, 53.1%, 49.6% 감소, TNF- α 에서 47.8%, 40.5%, 52.7% 감소, IL-6에서 24.3%, 32.8%, 30.1%의 감소를 확인하였고 이는 실험에 사용된 시료들이 항염증 효과가 있다는 것을 의미함.

또한 q-PCR을 통해 확인한 TNF- α (100%, 63.4%, 84.3%, 79.0%)와 IL-6(100%, 64.8%, 55.5%, 50.9%)의 gene expression도 감소하였고, 두 실험결과의 일치성을 통해 DNA에서 전사된 mRNA가 대부분 각각의 단백질로 translation 되었다는 사실을 확인할 수 있었음.

(자) 실험결과에 의한 고찰

최근 우리 사회는 식생활과 생활 습관의 변화로 비만과 당뇨 등의 만성질환이 큰 문제로 대두되고 있음. 비만은 이러한 만성질환으로 이어지는 심각한 질환이며 이를 해결하고 아름다운 몸을 가꾸기 위해 많은 사람들이 다이어트라는 수단을 이용함. 그러나 급격한 운동, 체중의 감소, 식사량의 제한은 신체의 균형을 무너뜨려 많은 문제를 야기할 수 있기에 균형 잡힌 식사와 기능성 식품 소재를 통해 이러한 문제를 해결하고자 노력하고 있음.

우리는 이 연구에서 한식간장의 대사질환에 대한 긍정적인 효능을 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드 분획을 통해 확인하고자 하였음.

12주간의 시료 경구투여를 통한 mouse 실험결과 그룹 간 몸무게는 경향성은 있었지만 유의성은 확인할 수 없었음. 이는 실험 전 10주간의 HFD를 통해 상당한 체중의 증가가 있었고 따라서 실험을 진행했던 12주의 기간 동안 체중 변화가 크게 나타나기 힘들었던 것이 원인으로 생각됨.

실험에 사용된 한식간장의 장기간 처리가 insulin의 민감도에 영향을 주었는지 확인하기 위해 OGTT(oral glucose tolerance test)를 진행하였으나 실험결과 그룹간의 차이는 확인할 수 없었고 이 결과를 토대로 이후의 실험 중 insulin sensitivity에 관련된 실험은 진행하지 않았음.

12주간의 동물실험 후 mice를 희생시켜 간과 양 대퇴부의 근육을 채취하였고, white adipose tissue(WAT)의 측정을 위해 abdominal fat(복부지방), kidney fat(신장 지방), intestinal fat(장간막 지방)을 채취하여 그 무게를 측정하였음. 각 조직의 무게를 비교한 결과 유의성은 없었지만 폴리사카라이드군이 대조군들에 비해 간의 무게가 적고 근육량이 많은 것을 확인할 수 있었음.

간과 지방세포조직을 통해 H&E staining 실험을 진행하였고 실험결과 간에서 control군을 제외한 대조군은 서로 큰 차이를 확인하기 힘들었으나 control군과 비교했을 때 상당한 lipid droplet 감소를 확인할 수 있었음. 실험에 사용된 시료들이 간세포 내 지방의 양을 감소시켜 지방간의 형성을 억제하였다고 생각됨.

반면 adipocyte에서는 poly군에서 다른 대조군들과 비교하여 작은 cell size를 보였고 모든 그룹이 고지방 식이를 하였기에 대부분 큰 규모의 cell을 형성하였지만 poly군에서는 다른 군에 비해 뚜렷한 cell의 size 감소를 확인할 수 있었음. 이 결과로 미루어 혈중 내 cholesterol의 농도와 adipocyte의 size에는 일련의 상관관계가 있을 것으로 보임.

Plasma에서 지질과 당의 농도를 분석한 결과 polysaccharide시료를 처리한 군에서 total cholesterol, HDL, LDL, HDL/LDL결과가 대조군에 비해 유의적인 변화를 보임.

Total cholesterol에서 poly군(184.47mg/dl)은 control 대조군(231.7mg/dl) 과 비교하여 유의적인 감소치를 보였음. Poly군의 HDL, LDL 수치는 대조군과 비교하여 낮아졌지만 HDL/LDL ratio는 증가하였음. HDL의 농도는 높을수록 심혈관 질환 문제의 발생이 적고 심혈관을 건강하게 하지만 HDL의 농도가 감소할 경우 심장질환의 발생이 증가함(Marchall, E.)

폴리사카라이드군은 혈액 내 HDL이 증가하였기에 atherosclerosis와 심혈관 관련 질환의 예방에 효능이 있다고 판단됨.

간의 지질 축적을 확인한 결과 대조군 모두 cholesterol과 TG의 유의적인 감소를 확인할 수 있었음. Control과 비교하여 cholesterol은 각각 20.0%, 18.4%, 23.0%씩 감소하였고 TG는 각각 23.4%, 16.0%, 26.5%씩 감소하였음을 확인하였음.

Plasma의 cholesterol 농도와 달리 모두 유의적인 감소를 보였는데 이는 실험에 사용된 시료가 간에서의 지질대사를 활성화시킨 결과라고 생각됨. 이후 간에서의 지질대사가 어떠한 경로를 거쳐서 활성화 되는지를 q-PCR을 통해 확인하였음.

이 실험에서는 q-PCR을 통해 실험에 사용된 시료들이 간의 지질대사에 어떠한 영향을 주었는지를 확인하였음. 우선 간의 주요 지질대사 조절인자인 LXRα와 PPARα의 활성을 조사하였고 두 유전자 모두 pep/AA와 poly+pep/AA 시료에 의해 활성화 된 것을 확인할 수 있었음.

LXRα와 관련하여 fatty acid synthesis를 확인하기 위하여 SREBP1c와 ChREBP의 발현을 확인하였고 pep/AA(216%, 190%), poly+pep/AA(152%, 160%)의 활성이 있음을 확인하였음. 이를 통해 LXRα에 의해 SREBP1c와 ChREBP가 정상적으로 활성화되었음을 확인함.

SREBP1c와 ChREBP에 의해 활성화 되는 지방생합성 효소인 ACC1, FAS, SCD1의 활성을 측정한 결과 pep/AA군의 활성이 나타나지 않았음.

SREBP1c는 SCAP과 complex를 이루어 ER에서 golgi로 이동하는데 SREBP1c·SCAP complex에 Insig2a가 결합하여 translocation을 저해함(Yecies, J.L., et al.) 따라서 이러한 결과가 Insig2a에 의한 것인지 확인할 필요가 있었고 Pep/AA군에서 Insig2a가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 이에 따라 Insig2a의 gene expression이 증가하여 SREBP1c에 의한 ACC1, FAS, SCD1의 지방생합성을 저해하였다고 판단함.

LXRα은 지방생합성의 활성인자이지만 또한 cholesterol efflux의 주요 인자임. LXRα에 의해 활성화 되는 ABCG5와 ABCG8, CYP7a1는 간 내의 cholesterol을 bile을 통해 소장으로 배출함. 실험결과 ABCG5와 ABCG8에서 control군을 제외한 모든 실험군의 활성이 증가하였음. 따라서 Fig. 53과 관련하여 ABCG5/8을 통한 cholesterol 배출로 간의 지질농도가 감소하였을 것이라고 생각할 수 있음.

Fig. 50에서 보여준 Poly군의 HDL/LDL ratio 증가와, cholesterol 저하 효과가 간 내부의

지질대사 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 HMG-CoA reductase와 LDL-R의 활성을 확인하였고, HMG-CoAR이 감소하여 cholesterol의 합성이 저해되었으나 LDL-R의 활성 역시 감소하였음.

Polysaccharide는 small intestine에서 cholesterol의 흡수를 저해한다고 알려진(Gunness, P. and M.J. Gidley) 논문들과 실험에 이용된 crude한 샘플의 주요성분이 polysaccharide인 점을 감안하여 Poly군의 cholesterol 농도 저하는 간 지질대사의 효과보다 cholesterol의 흡수를 저해하여 체내의 cholesterol 농도가 떨어진 것이라고 생각됨.

SR-BI의 활성화는 HDL을 매개로 진행되는 reverse cholesterol transport의 활성화와 관련이 있고 이 실험에서 SR-BI은 각각 poly 67%, pep/AA 79%, poly+P/A 154% 증가하였는데 이를 통해 각 조직에 존재하는 cholesterol이 배출을 위해 간으로 이동되었다는 것을 알 수 있음.

PPAR α 는 fatty acid uptake와 β -oxidation을 조절함. CD36, FATP5, FABP1 3가지 transporter를 통해 fatty acid uptake를 확인하였고 실험결과 CD36에서 Poly군과 Poly+Pep/AA군에서 각각 78%, 41%의 발현 증가를 확인하였음.

앞에서 언급했듯이 CD36은 multifunctional protein으로 다양한 물질들의 receptor 역할을 겸하고 있음(Febbraio, M. and R.L. Silverstein). 따라서 Poly군의 CD36의 활성화는 crude sample에 존재하는 다양한 성분이 가진 효능일 수 있음. 또한 체내로 흡수되는 cholesterol의 감소로 야기된 지질대사 활성화의 결과라고도 볼 수 있음.

PPAR α 에 의해 유도되는 β -oxidation은 Fatty acid transporter(FATP/CD36)가 그 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 이 수송단백질은 그들의 promoter에 PPARs와 특이적인 PPRE(PPARs responsible elements)를 가짐으로써 직접적인 PPAR α 의 표적 유전자임. 간 내부로 수송된 지방산은 주요 조절효소인 ACS, CPT-1, ACOX-1에 의해 β -oxidation을 진행하게 됨.

실험결과 ACS, CPT-1, ACOX-1는 Poly군과 Poly+Pep/AA군에서 활성이 증가하였고 이는 CD36의 활성화와 유사한 발현상태를 보여줌. 이 결과를 통해 crude polysaccharide 시료에 포함된 성분이 CD36을 활성화 시켰고 CD36을 통한 fatty acid의 유입이 β -oxidation을 더욱 활성화 시켰을 것이라고 생각해볼 수 있음.

LXR α 또는 PPAR α 의 활성화는 inflammation 관련 인자들의 plasma 농도를 감소시킨다는 보고에 따라 이들에 의한 항염증 효과를 확인하였고 Inflammatory factor로 CRP, TNF- α , IL-6의 plasma level을 ELISA를 통해 확인한 결과 CRP에서 각각 45.44%, 53.08%, 49.61% 감소하였고 TNF- α 에서 47.79%, 40.44%, 52.7% 감소, IL-6에서는 24.26%, 32.79%, 30.12% 감소하였음.

이 결과를 토대로 각 시료가 anti-inflammation effect를 가지고 있음을 확인하였다. 또한

추가적으로 진행된 TNF- α 와 IL-6에 대한 q-PCR 실험 역시 같은 효과를 보여주어 anti-inflammation 효과가 유전자의 전사단계에서 조절되고 있음을 알 수 있음.

진행한 모든 실험결과를 종합했을 때 polysaccharide 시료에 의한 plasma cholesterol 감소, HDL/LDL ratio 증가, adipocyte의 cell size 감소, 간조직 lipid accumulation 감소는 ABCG5와 ABCG8에 의한 cholesterol efflux의 결과로서 이루어졌다고 생각됨. PPAR α pathway에서는 CD36에 의한 fatty acid uptake를 활성화시켰으나 FATP5와 FABP1에 의한 활성화는 확인할 수 없었음. 즉 polysaccharide 시료 내 어떤 성분에 의해 CD36의 발현이 활성화되었고 CD36에 의해 수송된 fatty acid가 β -oxidation 과정으로 전달되면서 ACS, CPT1a, ACOX1의 단백질 발현이 증가하였을 것이라고 생각됨. 이러한 종합적인 대사를 통해 poly군은 대조군들과 비교해 상당한 수준의 cholesterol 감소를 보였다고 결론내림.

Peptide/amino acid 시료에서는 LXR α 에 의한 SREBP1c와 ChREBP의 활성을 확인할 수 있었음. 그러나 Insig2a의 발현에 의해 SREBP1c의 translocation이 억제되어 지방생합성 단백질의 활성이 낮아짐. 또한 cholesterol efflux의 주요 단백질인 ABCG5와 ABCG8의 활성이 높아지고 bile을 통한 cholesterol 배출이 많아져 체내 cholesterol의 간의 지질 농도가 떨어졌다고 보여짐. 그 외에 SR-BI를 통해 cholesterol의 배출과 LDL-R의 활성화를 통해 plasma LDL의 농도가 control군에 비해 낮아졌다고 판단됨. PPAR α 의 활성은 높아졌으나 β -oxidation은 활성화 되지 않았는데 CD36의 활성이 적은 것이 그 원인으로 생각됨. 그러나 LPL의 발현이 증가하여 plasma VLDL, IDL, LDL 등의 TG를 FA로 전환하여 간으로 이동시킴으로 혈중 지질을 낮추어 atherosclerosis와 CHD의 위험성을 낮출 것으로 기대됨.

또한 비만에 의해 증가하는 것으로 알려진 염증 반응도 이 샘플들의 LXR α 와 PPAR α 활성화를 통해 감소되는 것을 확인하였음.

모든 결과를 종합해볼 때 poly군은 ABCG5/8의 cholesterol efflux와 PPAR α 의 β -oxidation, HMG-CoA reductase의 감소에 의한 복합적인 효과로 plasma와 liver에서 lipid level이 감소하였다.

또한 Pep/AA와 Poly+pep/AA의 간 내 지질수준 저하는 LXR α 의 활성화로 인한 cholesterol efflux의 활성화와 Insig2a에 의한 fatty acids synthesis 억제, LDL-R과 LPL의 활성화 등이 복합적으로 작용한 결과이다.

모든 대조군의 plasma ELISA에서 CRP, TNF- α , IL-6는 감소하였고 q-PCR을 통해 그 결과가 유전자 전사 수준에서 조절되었음을 확인하였다. 따라서 각 시료는 anti-inflammatory effect를 가지고 있다.

제 3 절 한식 간장의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기작 규명

1. 연구개요

간장은 우리나라의 가장 중요한 조미료 중 하나로 오랜 전통을 가진 한국의 발효식품으로 주로 아시아권에서 많이 이용되어 왔으나 건강에 대한 관심의 증대와 세계화와 더불어 점차 전세계적으로 사용범위가 넓어지고 있다. 우리나라에서 간장을 언제부터 만들기 시작했는지는 정확히 알 수 없으나 삼국사기에 638년 신문왕이 왕비를 맞을 때 폐백 품목으로 간장과 된장이 기록되어 있는 것으로 보아 삼국시대에 이미 장류가 사용되었음을 알 수 있다. 조선시대 대표적인 조리서인 요록, 주방문, 시의전서에는 대부분 간장 담그는 법이 기록되어 있다.

재래식 조선간장은 대두를 수침 자숙한 후 성형해 메주를 만들어 자연 상태에서 발효시킨 후, 메주에 염수를 넣어 담금하고 메주 중에 생육하는 각종 균류의 효소작용을 이용하여 숙성 발효시켜 덩의 건데기와 액을 분리하여 얻은 액을 달인 후 숙성시켜 만들어 진다. 이런 재래식 조선간장은 주로 일부 가정이나 사찰에서 자연접종된 미생물로 메주를 만들어 간장을 만들고 있다. 그러나 시판되고 있는 대부분의 간장은 대두와 밀을 주원료로 사용하며 인위적으로 *Aspergillus oryzae*나 *A. sojae*와 같은 종균을 접종배양한 koji 중의 효소를 이용하고 염수를 가한 후 발효시켜 제조하는 개량식이 대부분이다.

재래식 조선간장이나 양조간장 모두 재료에 들어 있는 단백질은 peptide로 거의 분해되어, 분해된 peptide는 발효과정 중 아미노산으로 전환되면서 간장 특유의 맛을 만들어낸다. 반면 탄수화물은 숙성과정에서 완전히 분해되지 않고 간장 내에 일부분만 분해된 다당(polysaccharide)의 형태로 존재한다. 간장은 조미료의 기능 이외에도 간장에 함유된 향기성분의 항암활성, *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성, 혈전 생성 억제 활성, angiotensin I-converting enzyme (ACE) 억제활성 등을 가지고 있다고 알려져 있으며, 최근 일본식 간장(shoyu)으로부터 얻어진 다당이 알레르기 억제 효과(anti-allergic effects), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과, 장관면역 증진활성 및 철분 흡수 증진 효과등이 있다고 보고되고 있다. 그러나 현재까지 알려진 간장 유래 다당의 활성화는 모두 일본식 간장인 shoyu에서 얻어진 다당에 대한 활성화로 아직까지 우리나라 재래식 간장의 생리활성에 대한 연구는 전무하다. 현재 시판되는 대부분의 양조간장은 일본의 shoyu처럼 밀과 콩을 원료로 하여 koji방식으로 만들어지는 반면 우리나라의 재래식 조선간장은 대두만으로 만들어진 메주에 벧짚과 공기 중의 미생물이 자연적으로 접종하게 한 후 1-2 개월 발효시키는 과정에서 대두의 단백질 및 당류 성분이 별도의 가공처리 없이 분해되는 과정을 통해 만들어 진다.

면역반응에서 대식세포는 항원의 감시, 화학주성에 의한 이동, 탐식 및 표적항원의 제거에 이르는 일련의 복잡한 항원 제거 기능을 수행하는 세포이다. 최근 많은 연구들은 질병이 발생한 이후가 아니라 이에 대처한 예방 전략의 개발이 장기적으로 건강유지라는 측면에서 보다 효과적이며 유익하다고 제안하고 있다. 이러한 관점에서 대식세포의 활성화인자 (macrophage immunomodulator)가 그 대안이 될 수 있다는 점이 많은 보고를 통해 제안되고 있다. 본 실험에서도 간장에서 유래된 다당들이 대식세포 면역기능을 어떻게 조절하는지 연구하고자 하였다. 또한 동물실험을 통하여 경구투여 후 동물의 선천적인 면역과 장관면역에서 각각 간장에서 유

래된 다당들의 면역활성 차이를 알아보려고 하였다.

본 연구는 일차적으로 상업적으로 만들어진 양조간장과 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래식 조선간장으로부터 얻어진 다당의 면역증진활성을 비교하였고, 해외간장과 고품질 한식간장의 면역증진활성을 비교함으로써 우리나라 한식 간장의 면역활성 능력의 우수함을 알리기 위한 기초자료를 제공하고자 한다.



2. 한국 재래간장과 시판 양조간장의 장관면역 증진 기능 평가

가. 한국 재래간장과 시판 양조간장으로부터 다당류의 분리 및 이들의 화학적 특성

(1) 실험재료 및 방법

(가) 재료

본 연구에서는 시중에 판매되고 있는 양조간장과 전북 순창에 소재한 농림부 지정 전통식품 제조업체(제 26호)인 이기남할머니고추장에서 전통방식으로 제조 및 숙성한 간장을 구입하여 사용하였다.

(나) 양조간장과 재래간장으로부터 조다당 분리

재래간장과 양조간장으로부터 조다당을 분리하기 위하여 80% EtOH를 첨가하여 하룻밤 방치하고, 원심분리 (6000 rpm, 30 min) 하여 침전을 회수하였다. 침전물은 소량의 물에 재용해한 후 투석막 (MWCO : 12,000-14,000, Sigma, Louis, MO, USA)을 이용하여 2-3일간 투석한 다음 동결건조하여 재래간장으로부터 분리한 조다당 KTSP-0와 양조간장으로부터 분리한

조다당 CSP-0를 얻었다(Fig. 56).

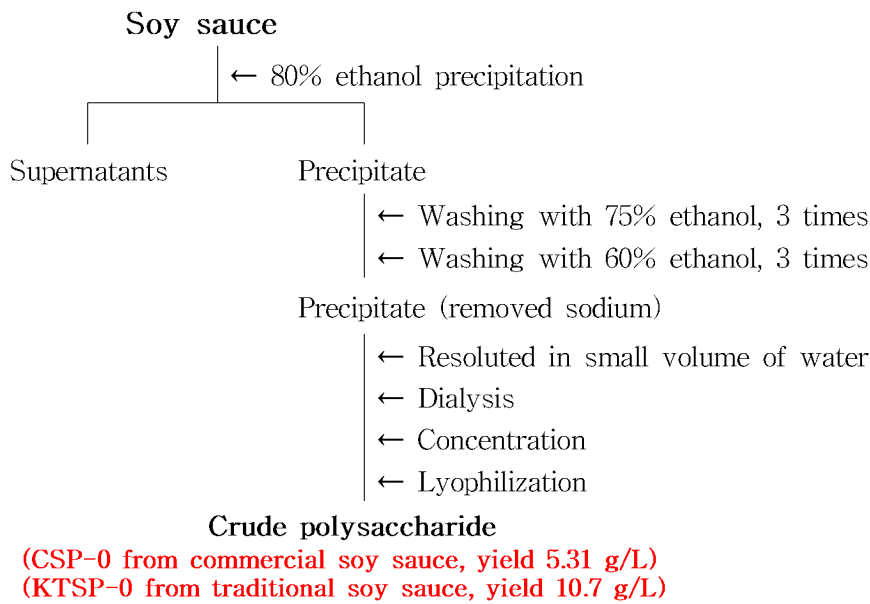


Fig. 56. Isolation of two crude polysaccharides from commercial and traditional soy sauces

(다) 양조간장과 재래간장으로부터 분리한 조다당의 일반화학특성

양조간장으로부터 분리한 조다당 CSP-0와 재래간장으로부터 분리한 조다당 KTSP-0의 일반 성분을 분석하기 위해 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(68)으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법(69)으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법(70)으로, TBA-positive material의 함량은 2-*keto*-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법(71)으로, 각각 정량 분석하였다.

구성당 분석은 Albersheim 등의 방법(72)을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화 하여 GC를 이용하여 분석하였다. 다당 시료를 2 M TFA (trifluoroacetic acid) 중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 M NH₄OH (Ammonia solution)에 용해하여 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 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 SP-2380 capillary column (0.25 mm×30 m, 0.2 mm film thickness, Supelco)이 장착된 Young-Lin ACME-6100 GC를 사용하여 최적온도 조건 [60°C (1 min), 60°C → 180°C (30°C/min), 180°C → 250°C (1.5°C/min), 250°C (5 min)]에서 splitless injection mode (1/20)로 분석하였으며, 이때 carrier gas (N₂)의 flow rate는 1 mL/min로 조정하였다. HPSEC (Superdex 75, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 이용하여 양조간장으로부터 분리한 조다당 CSP-0와 재래간장으로부터 분리한 조다당 KTSP-0의 시료의 정제도와 분자량을 확인하였다.

(2) 결과 및 고찰

(라) 양조간장 및 재래간장 유래 조다당의 화학적 특성

양조간장 및 재래간장으로부터 조다당을 분리한 결과는 Table 14와 같다. 양조간장으로부터 분리한 조다당 CSP-0는 5.3 g/L의 조다당을 얻었으며, 재래간장으로부터 분리한 조다당 KTSP-0는 양조간장보다 2배 더 많은 10.7 g/L의 조다당을 회수할 수 있었다. CSP-0의 일반 화학특성을 분석한 결과, 중성당 64.2%, 산성당 35.7%로 구성되어 있었으며, 일반적으로 식물 추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO 물질은 함유하고 있지 않았다. 한편, CSP-0와 KTSP-0를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과(Fig.57), CSP-0는 galactose(18.0%), xylose(15.6%), mannose(10.9%)가 높은 비율로 함유하고 있었으며, 그 외 rhamnose, fucose가 미량 검출되었다. 반면 KTSP-0의 경우, 중성당 73.5%, 산성당 25.5%로 구성되어 있었으며, 미량의 KDO가 1.1%로 검출되었다. 구성당을 분석한 결과 CSP-0와 동일한 당들로 주로 구성되어 있었으나, 구성당의 조성이 다르게 나타났다. KTSP-0는 mannose(18.2%)가 가장 많았으며, galactose(15.9%), xylose(12.7%)로 구성되었고 미량의 rhamnose, glucose와 fucose가 검출되었다.

두 간장으로부터 분리한 조다당 CSP-0와 KTSP-0의 분자량 분포의 변화를 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 측정한 결과(Fig. 58), CSP-0의 경우에는 고분자 물질보다 저분자 물질로 주로 구성되어 있었으며, 이와는 반대로 KTSP-0의 경우에는 저분자 물질보다는 주로 고분자 물질들로 존재하고 있다는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 CSP-0보다는 KTSP-0가 추후에 정제를 할 경우 정제도가 우수한 고분자 물질을 획득하는데 더 용이하다고 사료되며, 특히 고분자 다당에서 높은 면역활성을 나타낼 것이라 추측된다.

Table. 14. Chemical properties of CSP-0 and KTSP-0 purified from commercial and traditional soy sauces

Chemical composition	CSP-0	KTSP-0
Neutral sugar	64.2±2.7	73.5±3.6
Uronic acid	35.8±1.7	25.5±0.6
Protein	-	1.0±0.7
KDO	-	-
Component sugar		
Rhamnose	6.6	9.2
Fucose	6.1	7.5
Arabinose	4.5	2.9
Xylose	15.6	12.7
Mannose	10.9	18.2
Galactose	18.0	15.9
Glucose	2.4	7.1
Gal A+Glc A	35.8	25.5

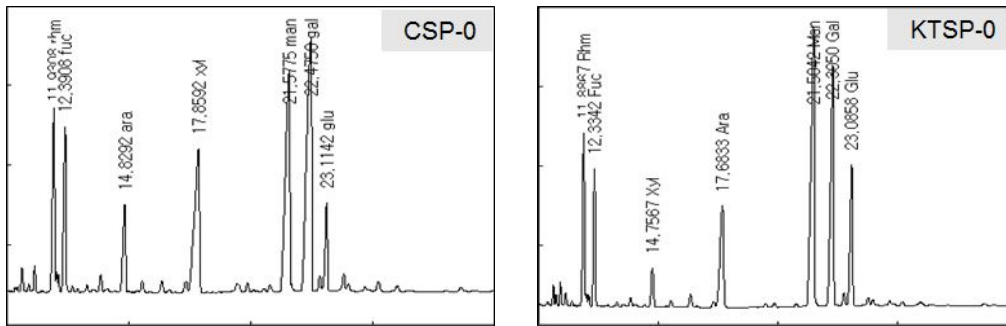


Fig. 57. GC chromatogram for the determination of sugar composition of CSP-0 and KTSP-0.

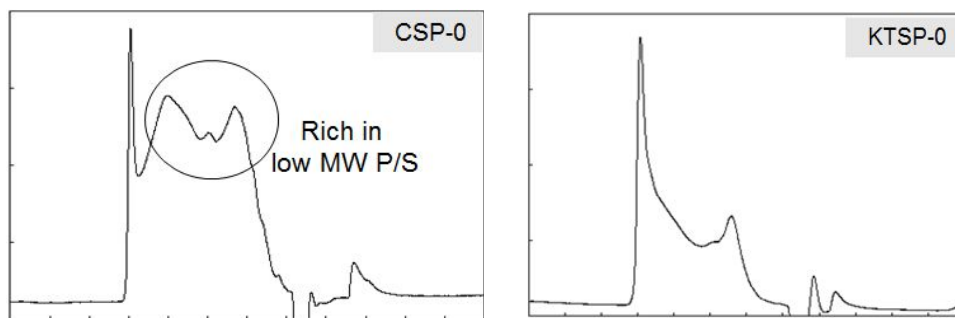


Fig. 58. Elution pattern of CSP-0 and KTSP-0 purified from commercial and traditional soy sauce on size-exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75 GL columns.

나. 제래간장과 시판양조간장에서 분리한 다당류의 면역활성

(1) 제래간장과 시판양조간장에서 분리한 조다당의 보체계 활성화능

(가) 실험재료 및 방법

① 보체계 활성화능

항보체 활성화는 Meyer법(73)을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였다. 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.

② 금속이온 존재에 의한 보체계 활성화능 비교

보체계의 활성화 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.

③ 2차원 면역전기영동에 의한 보체계 활성화 경로의 검토

보체계 활성화 경로의 확인을 위한 2차원 면역전기영동은 Morrison 등의 방법(7)에 따라 실시하였다. GVB^{2+} buffer, Mg^{2+} -EGTA- GVB^{2-} buffer와 EDTA- GVB^{2-} buffer에 각각 정상인의 혈청과 정제 다당 시료를 동량(50 μ L 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 μ L씩 loading하고, 4°C에서 약 3시간 동안 1차 전기영동(75 mA/plate)을 실시하였다. 이후 1% anti-human C_3 가 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 C_3 의 활성화 여부를 관찰하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 양조간장 및 재래간장 유래 다당의 보체계 활성화능

인체의 초기 감염 방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 토란 유래 다당의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer의 방법에 따라 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성화 다당체인 PSK (polysaccharide K)를 사용하였으며, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였다. 음성대조군에서의 활성화 정도를 $ITCH_{50}$ 0%로 하여 양조간장으로 부터 분리한 조다당 CSP-0와 재래간장으로 부터 분리한 조다당 KTSP-0의 활성화능을 확인한 결과, 두 시료 모두 1,000 μ g/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군에 준하는 우수한 항보체 활성을 보였다(Fig. 59). 특히, KTSP-0가 CSP-0보다 훨씬 우수한 항보체 활성을 나타내었으며, 저농도인 250 μ g/mL의 농도에서는 CSP-0의 1,000 μ g/mL의 농도에서 나타난 항보체 활성과 비슷한 활성을 나타내어 양조간장보다 재래간장으로 부터 분리한 조다당이 보체계 활성화능이 우수하다는 것으로 확인되었다. 양성대조군인 PSK는 현재 항암제로 시판되는 면역활성 다당이며, 일반적으로 1,000 μ g/mL의 농도에서 50% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있기 때문에, 250 μ g/mL의 농도인 KTSP-0는 저농도에서도 보체계 활성화능이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 시료의 농도에 차이를 두어 실험한 결과 CSP-0와 KTSP-0 모두 활성이 농도 의존적임을 알 수 있었다.

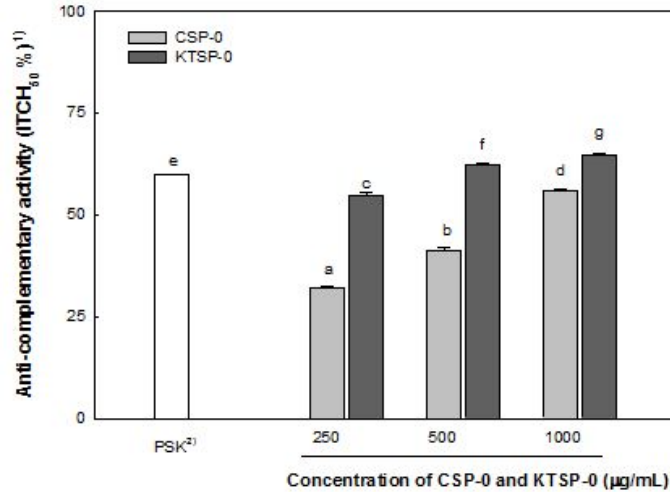


Fig. 59. Anti-complementary activity of CSP-0 and KTSP-0 purified from commercial and traditional soy sauce

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.

② 보체계 활성화 경로 검토

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 예측할 수 있게 된다. 보체계 활성능이 비교적 우수한 것으로 확인된 CSP-0와 KTSP-0를 대상으로 특정 금속이온을 제거한 반응계에서 항보체 활성을 측정하였다. Fig. 60에서 보는 바와 같이 Ca^{++} 가 선택적으로 제거된 반응계에서는 Ca^{++} 와 Mg^{++} 가 모두 존재하는 기본 반응계에 비해 CSP-0(Fig.60(A))는 1000 µg/mL의 농도에서 약간 나타났으며, Ca^{++} 및 Mg^{++} 모두가 제거된 반응계에서는 활성이 거의 소실됨을 확인하였다. KTSP-0(Fig.60(B))는 CSP-0보다는 높은 활성을 나타내어 보체계 활성화가 고전경로와 부경로 모두를 경유하여 나타남을 말해주는 결과였다.

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 활성화 되면 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분인 C_3 이 C_{3a} 와 C_{3b} 로 분해되고 이 후 연속적으로 C_5 의 활성화, $C_6 \sim C_9$ 의 항원으로의 결합반응을 진행하여 보체계가 활성화된다. 따라서 2차원 면역 전기영동을 이용해 C_3 의 활성화 여부를 확인함으로써 Mayer법에 의해 확인된 시료의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기인한 것인지, 혹은 보체 저해인자에 의한 결과인지를 확인할 수 있다.

CSP-0와 KTSP-0를 기본 반응계와 특정 금속이온이 제거된 반응계에서 각각 반응시킨 후 C_3 인자의 분해여부를 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. Ca^{++} 와 Mg^{++} 가 모두 존재하는 정상 반응계에서는 well로부터의 첫 번째 두 번째 침강선이 첫 번째보다 크게 나타남을 확인할 수 있

었다. Well로부터 첫 번째 침강선은 C_3 , 두 번째 침강선은 분해산물인 C_{3a} 와 C_{3b} 에 의해 기인함을 고려해 볼 때 이는 CSP-0와 KTSP-0 모두 항보체 활성이 보체 저해인자에 의한 것이 아님을 증명할 수 있었다. 반면 금속이온이 모두 제거된 반응계에서는 첫 번째 침강선만이 뚜렷하게 나타나고 두 번째 침강선은 관찰되지 않았다. 한편 Ca^{++} 만이 선택적으로 제거된 반응계에서는 정상 반응계에서 보다 두 번째 침강선의 높이가 상대적으로 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 이는 고전경로가 저해된 상태에서 부경로만으로도 C_3 의 활성화가 일어났음을 의미하며, 따라서 CSP-0와 KTSP-0 모두 보체계 활성화는 고전경로 및 부경로 모두를 경유하여 나타남을 재차 확인시켜주는 결과였다.

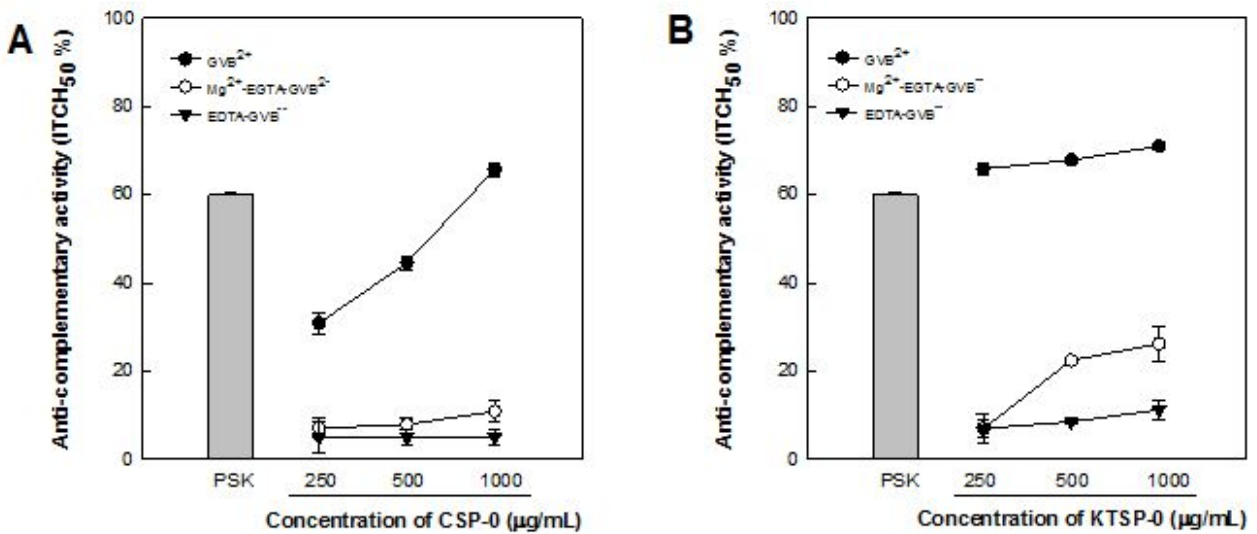


Fig. 60. Effect of calcium and magnesium ions on the anti-complementary activity of Taro-4-I purified from *Colocasia esculenta*.

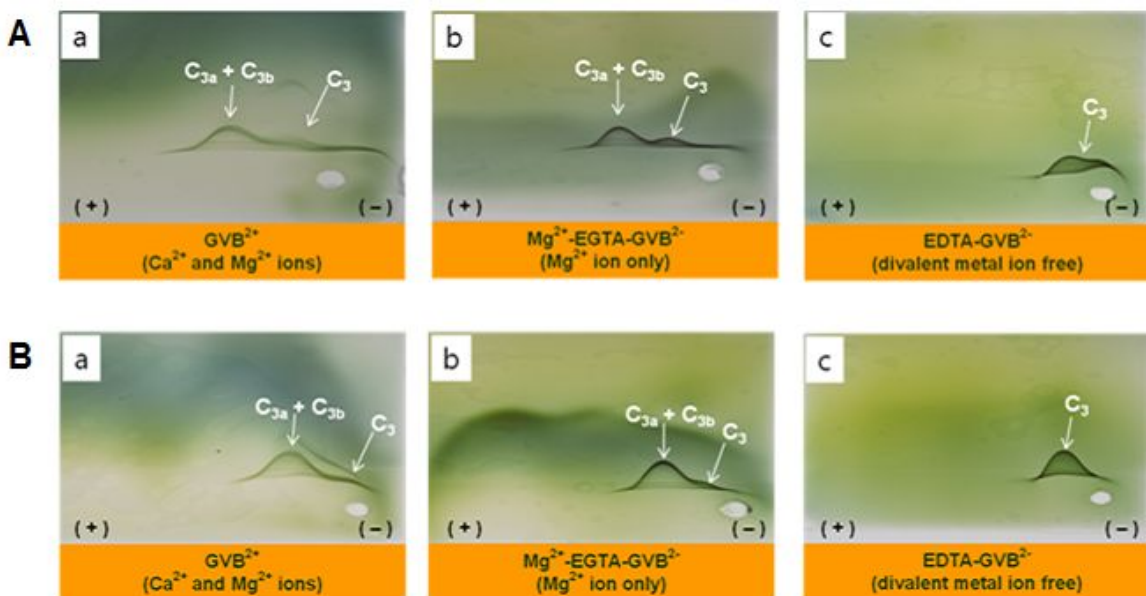


Fig. 61. Cross-immunoelectrophoretic patterns of C_3 converted by CSP-0(A) and

KTSP-0(B) in the presence of Ca⁺⁺ ion. 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 locate C₃ cleavage products.

(2) 제라간장과 시판양조간장에서 분리한 조다당의 대식세포 면역활성

(가) 실험재료 및 방법

① 세포배양 및 세포독성 측정

Mouse leukaemic monocyte macrophage 유래 세포주인 RAW 264.7 cell은 미국 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 10% FBS를 함유한 MEM배지에서 배양하여 실험에 사용하였다. Raw 264.7 cell을 4×10^3 cells/ μ L이 되도록 flat-bottomed 96-well microplate에 분주하였고, 농도를 달리한 시료를 가한 후 CO₂배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포배양액 100 μ L를 제거한 후 Phenol-Free MEM에 4~5배 희석한 CCK 시약을 100 μ L씩 가한 후 CO₂배양기에서 1시간 동안 반응시켜 450 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

② Nitrite와 Reactive oxygen species 측정

Nitrite를 측정하기 위해 Raw 264.7 cell을 2×10^5 cells/ μ L이 되도록 조정된 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하였고, 농도를 달리한 시료를 100 μ L 가한 후 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포배양액 50 μ L를 회수한 후 Greiss reagent (Premega, G2930) 추가로 가한 후 암실에서 반응 시키고 520nm에서 흡광도 값을 측정하였다. ROS측정은 Raw 264.7 cell을 2×10^5 cells/mL이 되도록 조정된 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하였고, 농도를 달리한 시료를 100 μ L 가한 후 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCF 시약 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 100 μ L씩 가한 후 4시간 배양한 후 형광값을 측정하였다.

③ RNA 분리 및 cDNA 제조

Raw 264.7 Cell의 배양액을 제거 후 PBS로 세척한 후 Tri-reagent (MRC, Tri-zol, Cat No. TR118)을 첨가하여 균질화한다. Chloroform을 균질액에 1/10되게 첨가하고, 15초간 잘 혼합한 다음 상온에 3분간 방치한다. 13,000×g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 Isopropyl을 가한 후, 실온에서 15분간 방치한다. 다시 13,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 에탄올로 세척, 총 RNA를 추출한다. RNA의 농도는 NanoDrop spectrophotometer로 측정한다.

④ 역전사중합연쇄반응(RT-PCR)

위와 같이 분리한 총 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 cDNA 일부를 대량으로 증폭한다. 총 RNA 1 μ g에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 1 μ l 넣어, 65°C에서 10분간 반응시킨 후에 RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ l, RiboLockTM Rnase Inhibitor 1 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, 5×buffer 4 μ l, 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 20 μ l로 하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻는다.

⑤ 중합연쇄반응 (PCR)

PCR은 PCR 자동화기계에서 template로 cDNA 1 μ l, *Taq* polymerase 2 unit, 2.5 mM dNTP 2 μ l, sense primer 10 pmole 1 μ l, antisense primer 10 pmole 1 μ l, 10×buffer 2 μ l 및 탈이온수를 첨가하여 총 20 μ l로 하며, PCR 후에 1.2% 한천 겔에서 전기영동 한다. Fc receptor, IgG, high affinity I (FcRI) primer는 5'-TTACCACGCCAGTGCTGAGAG-3'와 5'-ACTGAGCTTCGAGGTCCATC-3'쌍, Fc receptor, IgG, low affinity II (FcRII) primer는 5'-TGGATCCAGGTGCTCAAGGAA-3'와 5'-CTTCCTTTGCAGTAGTAGTCC-3'를 사용하였으며, 내부표준물질로는 beta-actin (β -actin) primer 5'-GCAGATGTGGATCAGCAAGC-3'와 5'-GTCAAAGAAAGGGTGTAAAACG-3'을 사용하여 유전자발현정도를 보정하였다.

⑥ Real-time PCR

DNA 정량을 실시간으로 정확하게 측정하기위해서 CFX96TM Real-time PCR Detection System을 이용하여 IL-6, TNF- α 사이토카인의 DNA의 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'-GGCAGGICTACTTTGGAGTCATTG-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. Sample data의 Comparative C_T값을 구한 후, 표준물질로 GAPDH 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 방법을 통하여 계산하여 정량하였다.

⑦ Cytokine

Macrophage(or Raw 264.7) cells에 의해 생산된 cytokine의 함량은 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 분석하였다. 각 cytokine 의 항체는 coating buffer에 희석하여 flat-bottomed 96-well microplate에 coating한 후 4°C에서 24시간 방치하였다. Coating이 완료된 microplate는 washing buffer를 이용하여 3차례 세척하고, assay diluent를 가하여 1시간 동안 상온에 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. Blocking 완료 후 각 well은 washing buffer를 이용하여 재차 3회 세척하고 연속 희석한 표준 물질(recombinant mouse cytokine)과 면역세포배양액을 각각 분주하였다. 이를 37°C에서 2시간 동안 방치한 다음 washing buffer로 세척하고 detection antibody, enzyme reagent (in assay diluent)를 혼합하여 37°C에서 40분간 방치하였다. 방치 후 washing buffer로 세척하고 substrate solution을 가하여 발색시킨다. 발색의 종료는 stop solution 가하여 종료시키고

450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 결과 및 고찰

① Raw 264.7 세포독성 및 NO, ROS 생성

간장으로부터 유래된 다당 시료는 둘다 높은 농도에서까지 대식세포 (Raw 264.7 cell)에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 두 시료 모두 농도의존적으로 ROS, NO를 생성하였다. 그 중 양조간장으로부터 유래된 다당 시료(CSP-0)는 재래간장재래부터 유래된 다당시료(KTSP-0)보다 1,000 mg/mL 농도에서 1.28배 많은 ROS를 생성하였고, 이와 반대로 KTSP-0는 CSP-0보다 1,000 mg/mL 농도에서 1.98배 많은 NO를 생성하였다.

② Cytokine 생성

대식세포는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역활성을 조절하며, 항원에 대한 제시를 함으로써 면역작용에 중추적인 역할을 한다. 양조간장과 재래간장 유래 다당 시료들은 IL-6, TNF- α 의 생성을 유도하였고 그 중 재래간장으로부터 유래된 다당시료(KTSP-0)는 양조간장으로부터 유래된 다당 시료(CSP-0)보다 높은 cytokine의 생성을 유도하였다. KTSP-0는 CSP-0보다 1,000 mg/mL 농도에서 32.27배의 IL-6와 2.61배의 TNF- α 생성을 유도하였고 realtime-PCR을 이용한 유전자의 발현을 확인한 실험에서도 KTSP-0가 CSP-0보다 6.50배 (IL-6), 46.01배 (TNF- α)의 높은 cytokine mRNA의 발현을 나타내었다. 그러므로 재래간장으로부터 유래된 다당이 더 대식세포에서 더 높은 면역활성능을 가진 것으로 관찰되었다.

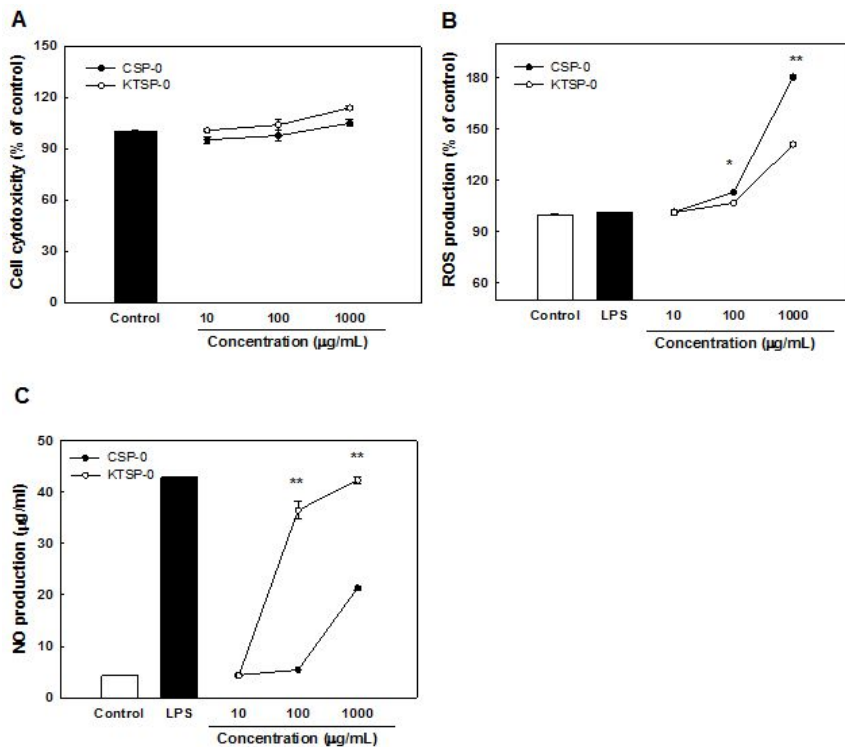


Fig. 62. Cytotoxicity, NO, ROS production of CSP-0 and KTSP-0 by Raw 264.7 macrophages.

③ FcR receptor의 발현

대식세포는 보체(C3b) receptor와 IgG Fc receptor를 가지고 항원항체 복합체를 세포표면에 부착시켜 탐식을 실시한다. 면역세포의 Fc 수용체에 대한 연구의 일환으로 대식세포의 Fc 수용체를 통한 탐식에 대한 연구는 면역체계에서 대식세포의 바이러스 등 다양한 항원들의 세포내흡수(탐식)이 인접 T 세포에 항원 인식을 유도하는데 중요하게 관여하며, 인체 면역체계에 그 중요성을 갖고 있으며 탐식과정 자체가 아주 복잡한 과정을 거치므로 Fc 수용체를 통한 신호전달 연구에 많이 이용되고 있다.

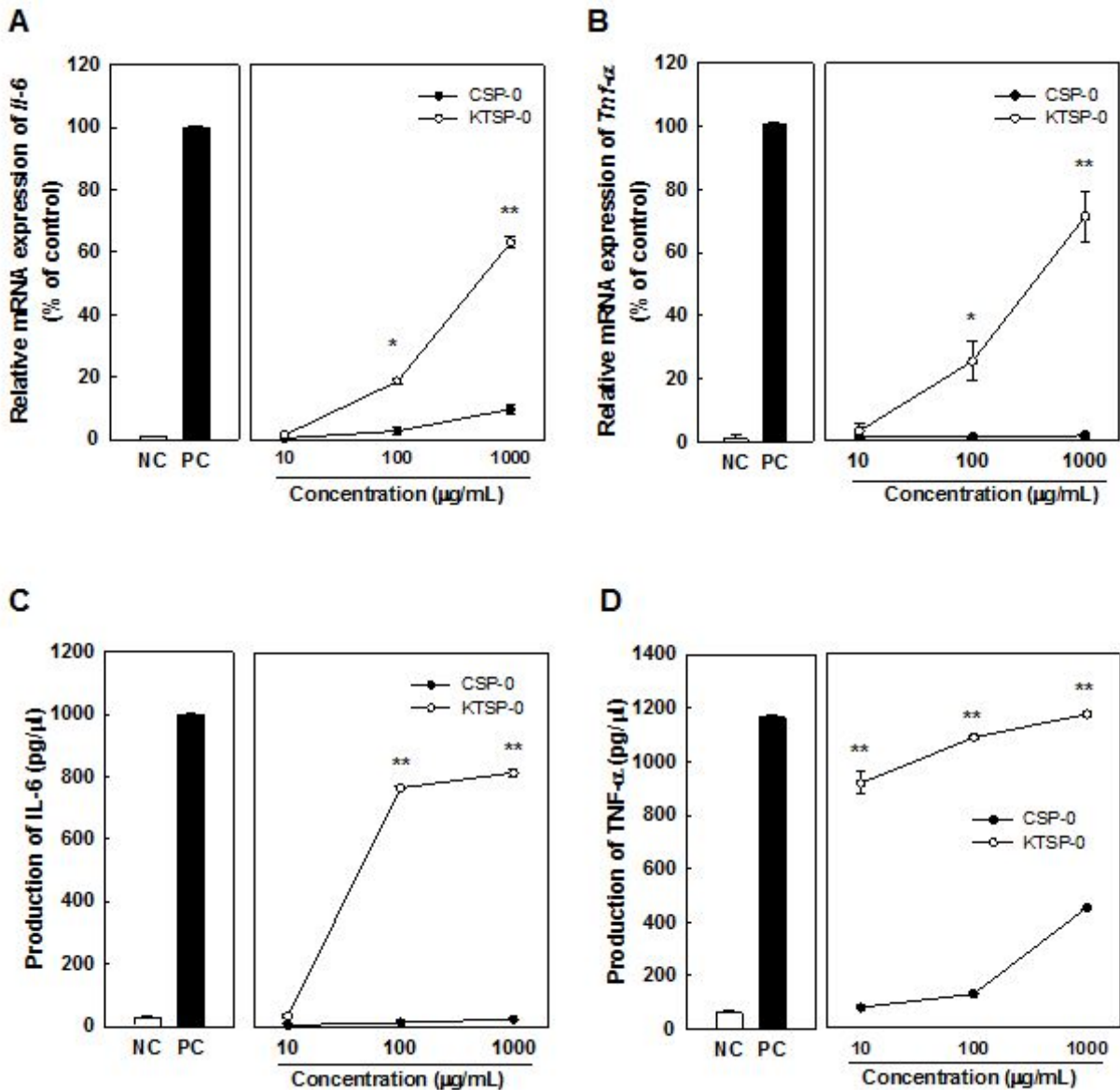


Fig. 63. Effect of CSP-0 and KTSP-0 on IL-6 and TNF- α production by Raw 264.7 macrophages

대식세포의 세포막에는 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb 및 Fc γ RIII 등의 subtype 들이 있으며, 이들 중 Fc γ RI, Fc γ RIIa, 및 Fc γ RIII들은 활성 수용체로서 세포질 영역에 공통적으로 immunoreceptor tyrosine activation motif (ITAM)가 존재하여 ITAM 특정부위의 타이로신 인

산화를 통해 Fc 수용체를 통한 탐식과정에 양성적으로 작용하고, Fc γ RIIb는 억제 수용체로써 immunoreceptor tyrosine inhibition motif (ITIM)을 갖고 있어 음성적으로 작용함이 밝혀졌다. 그중에 FcRI과 FcRII의 mRNA 발현을 관찰한 결과, FcRII receptor에서는 두가지 간장시료가 영향을 미치지 않았으며, 그와는 반대로 FcRI에서는 양조간장으로부터 유래된 다당과는 달리 재래간장으로부터 유래된 다당이 10-1000 μ g/ml까지 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

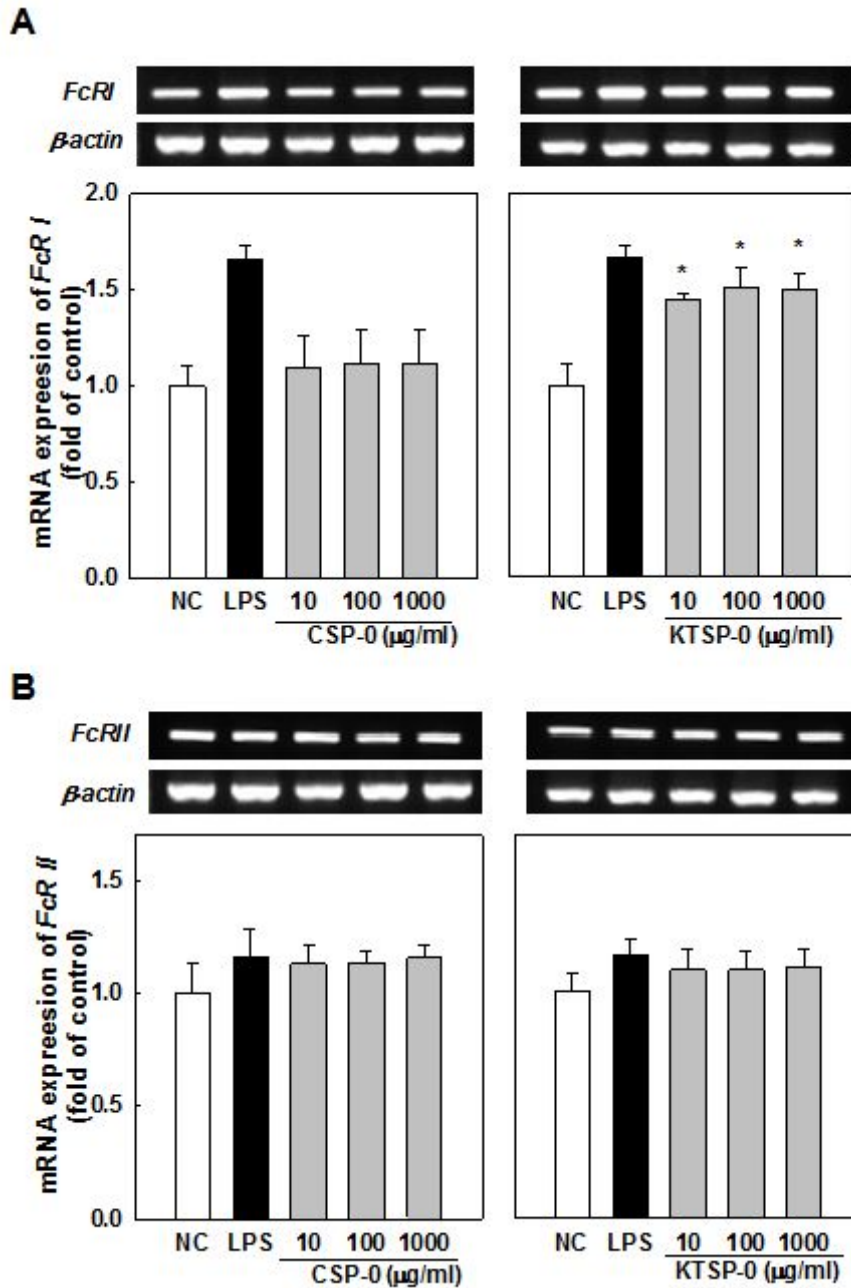


Fig. 64. Effect of CSP-0 and KTSP-0 on mRNA expression of FcR of macrophage cell line, Raw 264.7

(3) 제라간장과 시판양조간장에서 분리한 조다당의 장관면역 활성화 (in vitro)

(가) 실험재료 및 방법

① 실험동물과 세포배양

면역활성 측정을 위한 실험동물은 6주령된 Halan 모체의 female C3H/HeJ mouse를 코아텍(Gyeonggi Pyeongtaek, Korea)로부터 분양 받아 고형 사료(카길애그리퓨리나 Co Ltd, kungi, Bundang, Korea)와 여과기를 거친 물을 자유로이 공급하면서 3일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 20 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기 (Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다. 동물세포 배양을 위한 RPMI-1640 배지와 Phosphate Buffered Saline (PBS), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 모두 Gibco(Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다.

② 장관면역활성 (Peyer's patch cell을 경유한 골수세포 증식활성)

C3H/HeJ 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 무균적으로 적출한 후 PBS 용액이 담겨진 petridish에 옮겨 화염 멸균한 100 mesh에 1 mL Syringe의 plunger로 마쇄하고 0.2% NaCl 과 200 mesh를 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포액을 조제하였다. 세포 현탁액은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 medium으로 세척하여 2×10^6 cells/mL의 세포농도로 조정된 후 96-well plate에 180 μL 씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μL 씩 넣어주어 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 이를 골수세포 증식활성에 사용하였다. 한편, 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL의 세포농도로 조정된 후 96-well plate에 100 μL 씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액과 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지를 각각 50 μL 씩 첨가하고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 6일간 배양하였다. 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화는 6일간 배양된 배양액에 CCK-8 kit 용액 20 μL 을 첨가하고 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 상대활성(%)으로 평가하였다.

③ Cytokine 함량 측정

Cytokine 측정은 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하였다 (77). 분석 하루 전, anti-GM-CSF mAb(anti-mouse GM-CSF monoclonal antibody)를 coating buffer(0.1 M Carbonate, pH 9.5)에 섞어 96 well ELISA plate(NuncTM immuno plate)에 100 μL 씩 분주하고 4°C 에서 하루밤 반응시켜 well 표면에 부착시켰다. 다음 날 plate를 PBST(PBS with 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후, assay diluent(PBS with 10% FBS)를 200 μL 씩 분주하고 실온에서 1시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 recombinant mouse GM-CSF를 연속 희석한 용액 또는 5일 간 배양한 Peyer's patch 반응 상등액인 시료를 50 μL 씩 분주하고 assay diluent를 50 μL 분주하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다. 반응 상등액을 제거하고 assay diluent를

50 μl 씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking 시킨 후, PBST로 5회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 biotinylated anti-GM-CSF mAb와 avidin-horseradish peroxidase의 conjugate를 assay diluent에 희석하여 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well에 존재하는 상등액을 제거하고 PBST로 7회 세척한 후 TMB substrate (3, 3',5, 5' tetramethylbenzidine 와 hydrogen peroxide, Pharmingen) 첨가하여 30분 배양하였으며, 50 μl 2 N H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(나) 결과 및 고찰

① Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성

Peyer's patch는 T 세포와 B 세포등으로 구성이 되어져 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데 이중 골수의 증식에 관여를 하는 GM-CSF와 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 된다. 이를 확인하기 위하여 시료에 의한 Peyer's patch cell에서의 GM-CSF의 생성량과 이를 Bone marrow에 적용하여 cytokine에 의해 골수 세포의 proliferation을 확인한 결과, KTSP-0와 CSP-0에서의 농도별 GM-CSF의 생성량에서는 positive control인 LPS(lipopolysaccharide)보다 높지는 않았지만 CSP-0의 100 mg/mL의 농도에서 유의적인 차이를 확인하였다. 골수세포의 증식에서는 KTSP-0가 CSP-0보다 증식이 많이 일어난 것을 확인하였다.

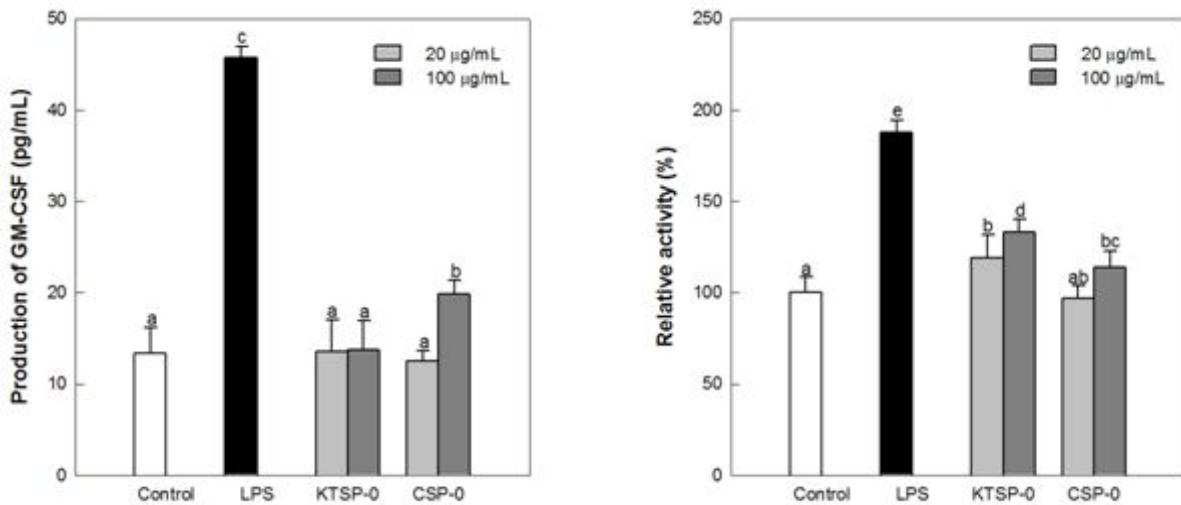


Fig. 65. Effect of CSP-0 and KTSP-0 on GM-CSF-production and bone marrow-proliferating activity through Peyer's patch cells

(4) 제라간장과 시판양조간장에서 분리한 조다당의 경구투여 후 장관면역

(가) 실험재료 및 방법

① 실험동물 및 경구 투여

본 연구에 사용된 동물은 6주령된 Halan 모체의 female Balb/c mouse를 코아텍(Gyeonggi Pyeongtaek, Korea)로부터 분양 받아 사료와 물을 자유로이 공급하면서 3일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 20 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 동물실 온도는 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기 (Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다. 경구투여 실험에서 시료의 투여는 시료를 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 대조군에는 PBS를, 투여군에는 선행연구를 바탕으로 각각 0.5, 1, 5 mg/mouse 의 농도로 1일 1회 총 30회를 경구투여 하였다.

② 분변내 IgA의 함량 측정

경구투여를 30회 시행 후 깔짚이 없는 빈 케이지에 각 실험군별로 이동 후 아무런 자극없이 10분간 방치 자연적으로 분비되는 분변을 모아 무게를 측정 후 100 mg/mL의 농도가 되도록 PBS를 넣어 주었다. 이를 3분간 mix를 하고 1시간후 2000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만을 취하고 이를 이용하여 IgA를 측정하였다. IgA의 측정은 IgA ELISA kit(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

③ Serum내 IL-6 함량 측정

경구투여 후 경추탈골하여 심장채혈로 전혈을 채취하고 이를 4°C 에 30분간 저장하여 10000 rpm에서 2분 원심분리하여 serum을 분리하였다. 이를 가지고 IL-6 ELISA kit(BD biosciences, Co, Ltd, San Diego, CA, USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 serum내 IL-6 함량을 측정하였다.

④ Payer's patch cell의 준비

경구투여 후 경추탈골 하여 안락사를 시킨 female balb/c mouse의 복부를 절개하여 소장외벽에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 적출한 후 PBS 용액이 담겨진 petridish에 옮겨 화염멸균한 mesh에 마쇄하여, 0.2% NaCl 과 mesh를 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포액을 조제하였다. 세포 현탁액은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 medium으로 세척하여 1×10^7 cells/mL의 세포농도로 조정한 후 12 well plate에 분주하고 RPMI 1640 medium을 넣어주어 37°C , 5% CO_2 배양기에서 3일간 배양한 후 상등액을 회수하여 이를 IgA, IL-4, IL-6의 생성능을 확인하는데 이용하였고, 7일 배양 하여 Peyer's patch cell의 세포증식능을 확인하였다. IgA, IL-4, IL-6의 각각 cytokine은 cytokine에 대한 특이적 단일클론 항체인 capture antibody를 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 세포증식능을 확인하기 위하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 7일 동안 배양한 것에 WST를 이용하는 cell counting kit (Dojindo)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 경구투여 후 Peyer's patch cells 성장

간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch의 면역세포 증식을 확인하기 위하여 0.5, 1, 5 mg/mouse 의 농도로 1일 1회씩 30회를 투여하였고, 이를 안락사 시켜 장관외벽의 Peyer's patch로부터 면역세포를 획득 1×10⁷cells/mL농도로 조정 이를 7일간 배양하였다. 그 결과 PBS 를 투여한 대조군과 비교하였을 때 전통적인 재래간장제조법으로 만들어진 KTSP-0 가 시판 되는 양조간장(CSP-0)보다 5 mg/mouse의 농도에서 50% 정도 더 많은 증식능을 확인할 수가 있었다.

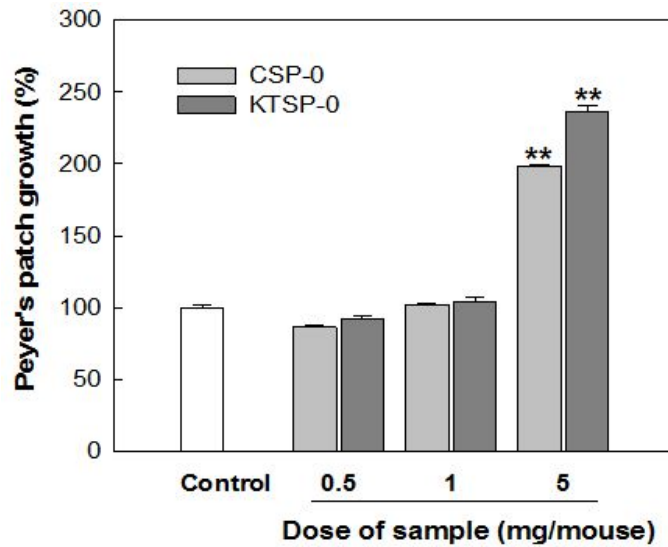


Fig. 66. Peyer's patch cells proliferation activity of CSP-0 and KTSP-0

② 분변 및 Peyer's patch cell에서 항체농도

IgA는 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.

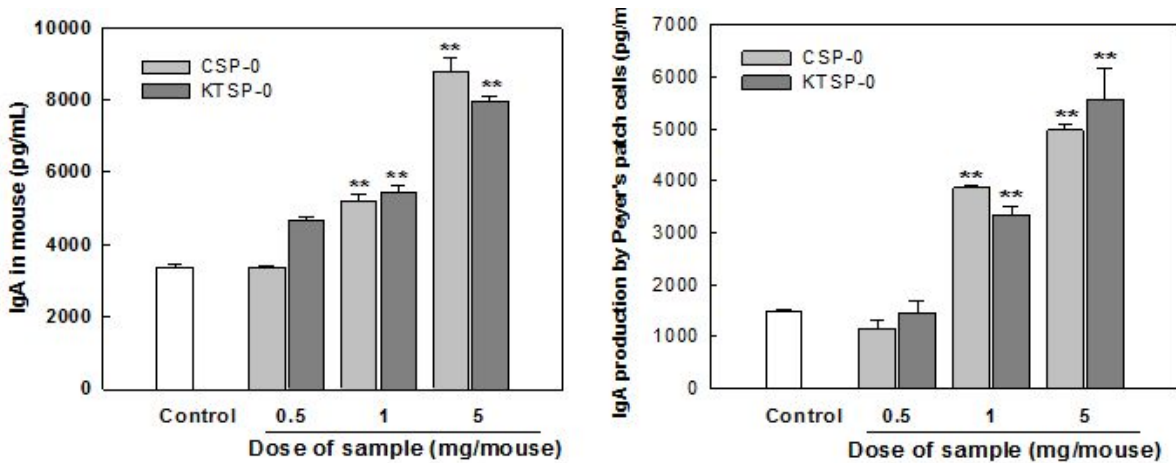


Fig. 67. IgA production of CSP-0 and KTSP-0 on mouse feces and peyer's patch cells

간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch에서의 IgA의 생산을 확인하기 위하여 장관을 통과한 분변과 Peyer's patch 세포에서의 생산된 IgA 항체량을 측정하였다. 그 결과, 분변에서 모든 실험군에서 농도 의존적으로 IgA의 함량이 높았다. CSP-0와 KTSP-0를 비교한 결과 두 실험군간에 큰 차이가 나타나지 않았다. Peyer's patch cell에서의 IgA의 생산량을 측정한 결과에서도 분변에서 비슷하게 모든 실험군에서 농도 의존적으로 IgA의 생산량이 증가하였다. CSP-0와 KTSP-0 비교한 결과 분변에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

③ Peyer's patch cell에서의 IL-4, IL-6 cytokine의 생산량 측정

간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch의 면역세포 증식을 확인하기 위하여 0.5, 1, 5 mg/mouse 의 농도로 1일 1회씩 30회를 투여하였고, 이를 안락사 시켜 장관외벽의 Peyer's patch로부터 면역세포를 획득 1×10^7 cells/mL 농도로 조정 이를 3일간 배양하였다. 이 상등액을 가지고 IL-4, IL-6를 측정하였다. IL-4는 naïve T cell을 Th2 cell로 분화시키는 인자로서 항체생산과 밀접한 관련을 가지고 있다. 측정 결과, KTSP-0가 CSP-0보다 생산량이 100%정도 증가를 하였다. IL-6의 생산량을 측정한 결과에서는 KTSP-0의 투여군과 CSP-0군에서는 KTSP-0가 CSP-0보다 더 많은 생산량이 측정되었다.

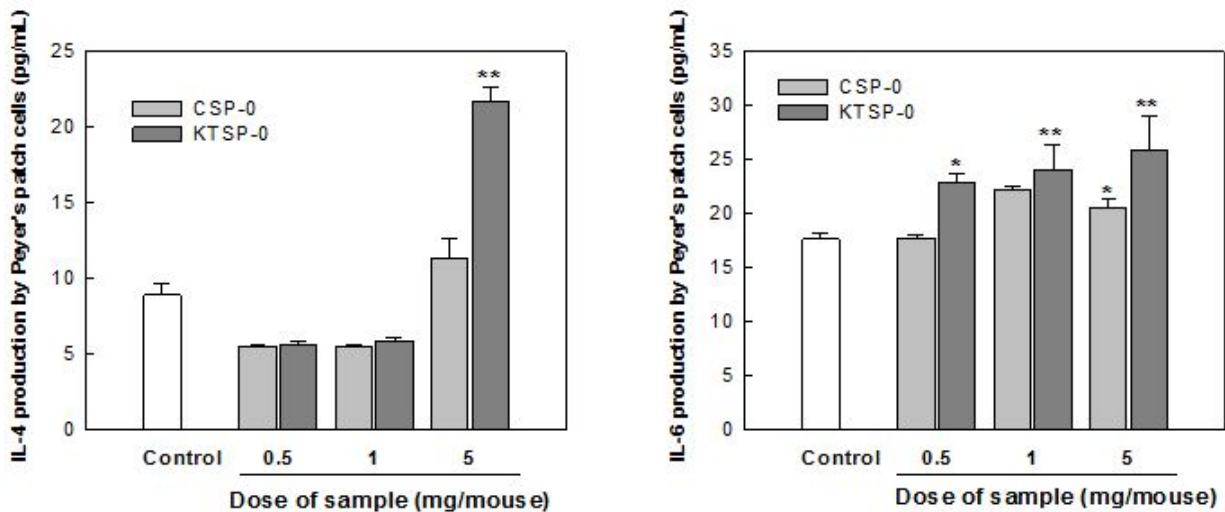


Fig. 68. Effect of CSP-0 and KTSP-0 on IL-4 and IL-6 production by murine peyer's patch cells

3. 한식간장과 해외간장의 장관면역 증진 기능 평가

가. 한식간장과 해외간장으로부터 다당류의 분리 및 이들의 화학적 특성

(1) 실험재료 및 방법

(가) 재료

고품질 한식간장과 간장의 세계시장점유율 1위 해외기업의 제품을 이용, 실험에 사용하였다.

(나) 한식간장과 해외간장으로부터 조다당 분리

한식간장과 해외간장으로부터 조다당을 분리하기 위하여 80% EtOH를 첨가하여 하룻밤 방치하고, 원심분리 (6000 rpm, 30 min) 하여 침전을 회수하였다. 침전물은 소량의 물에 재용해한 후 투석막 (MWCO : 12,000-14,000, Sigma, Louis, MO, USA)을 이용하여 2-3일간 투석한 다음 동결건조하여 해외간장으로부터 분리한 조다당 KSSP-0와 해외간장으로부터 분리한 조다당 JKSP-0를 얻었다(Fig. 69).

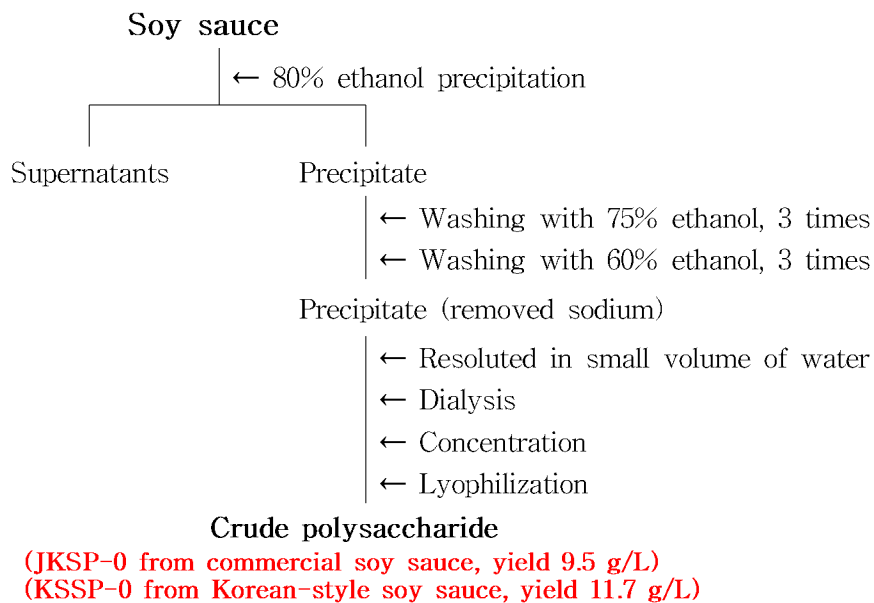


Fig. 69. Isolation of two crude polysaccharides from commercial and Korean ganjang

(다) 한식간장과 해외간장으로부터 분리한 조다당의 일반화학특성

2-가-(1)-(다)항의 재료 및 방법과 동일

(2) 결과 및 고찰

(가) 한식간장과 해외간장 유래 조다당의 화학적 특성

해외간장 및 한식간장으로부터 조다당을 분리한 결과는 Table 15와 같다. 해외간장으로부터 분리한 조다당 JKSP-0는 9.5 g/L의 조다당을 얻었으며, 한식간장으로부터 분리한 조다당 KSSP-0는 해외간장보다 더 많은 11.7 g/L의 조다당을 회수할 수 있었다. JKSP-0의 일반화학 특성을 분석한 결과, 중성당 68.2%, 산성당 31.8%로 구성되어 있었으며, 일반적으로 식물 추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO 물질은 함유하고 있지 않았다. 한편, JKSP-0와 KSSP-0를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과(Fig. 70), JKSP-0는 galactose(19.5%), xylose(17.3%), rhamnose(10.4%)가 높은 비율로 함유하고 있었으며, 그 외 mannose, fucose가 미량 검출되었다. 반면 KSSP-0의 경우, 중성당 63.0%, 산성당 37.0%로 구성되어 있었으며, JKSP-0와 마찬가지로 식물 추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO 물질은 함유하고 있지 않았다. 구성당을 분석한 결과 JKSP-0와 동일한 당들로 주로 구성되어 있었으나, 구성당의 조성이 다르게 나타났다. KSSP-0는 xylose(20.0%)가 가장 많았으며, galactose(13.4%), fucose(9.0%)로 구성되었고 미량의 mannose와 fucose가 검출되었다. 두 간장으로부터 분리한 조다당 JKSP-0와 KSSP-0의 분자량 분포의 변화를 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 측정된 결과(Fig. 71), 두 시료 모두 비슷한 패턴의 결과를 나타내었다.

Table. 15. Chemical properties of JKSP-0 and KSSP-0 purified from commercial and Korean ganjang

Chemical composition	JKSP-0	KSSP-0
Neutral sugar	68.2±0.6	63.0±1.0
Uronic acid	31.8±3.5	37.0±2.3
Protein	-	-
KDO	-	-
Component sugar		
Rhamnose	10.4±0.5	5.8±0.6
Fucose	7.0±0.1	9.0±0.1
Arabinose	3.7±0.2	3.2±0.1
Xylose	17.3±0.5	20.0±0.6
Mannose	9.3±0.2	8.7±0.2
Galactose	19.5±1.2	13.4±0.7
Glucose	0.9±0.1	2.8±0.1
Gal A+Glc A	31.8±3.5	37.0±2.3

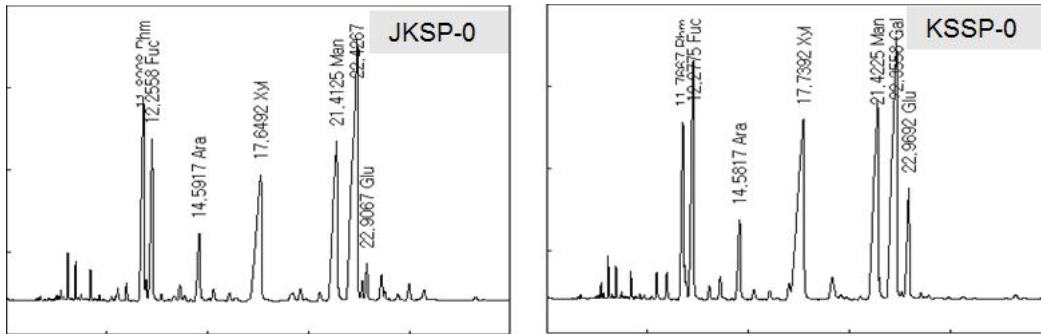


Fig. 70. GC chromatogram for the determination of sugar composition of JKSP-0 and KSSP-0.

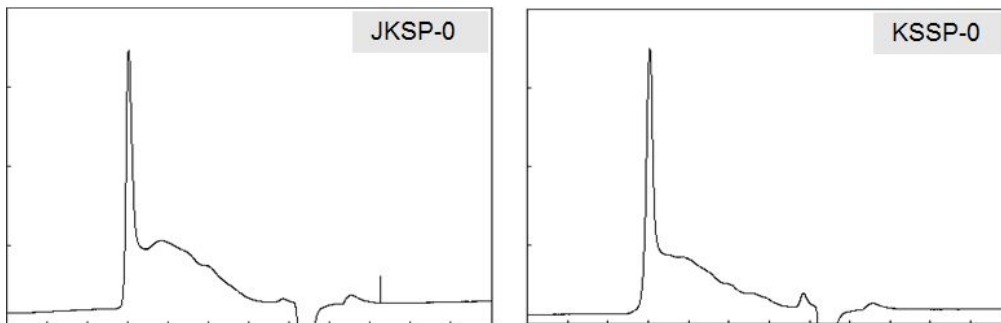


Fig. 71. Elution pattern of JKSP-0 and KSSP-0 purified from commercial and Korean ganjang on size-exclusion HPLC.

HPLC equipped with Superdex 75 columns.

나. 한식 간장과 시판 해외간장으로부터 분리한 다당류의 면역활성

(1) 한식간장과 해외간장으로부터 분리된 조다당의 보체계 활성화능

(가) 실험재료 및 방법

① 보체계 활성화능

2-나-(1)-(가)-①항의 보체계 활성화능 측정방법과 동일

(나) 결과 및 고찰

① 한식간장과 해외간장 유래 조다당의 보체계 활성화능

인체의 초기 감염 방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 토란 유래 다당의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer의 방법에 따라 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성 다당체인 PSK (polysaccharide K)를 사용하였으며, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였다. 음성대조군에서의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 해외간장으로부터 분리한 조다당 JKSP-0와 한식간장으로부터 분리한 조다당 KSSP-0의 활성화능을 확인한 결과, 두 시료 모두 1,000 µg/mL의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군에 준하는 우수한 항보체 활성을 보였으며(Fig. 72), KSSP-0가 더 높은 활성을 나타내었다. 양성대조군인 PSK는 현재 항암제로 시판되는 면역활성 다당이며, 일반적으로 1,000 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있기 때문에 KSSP-0의 보체계 활성화능이 우수함을 확인할 수 있었다.

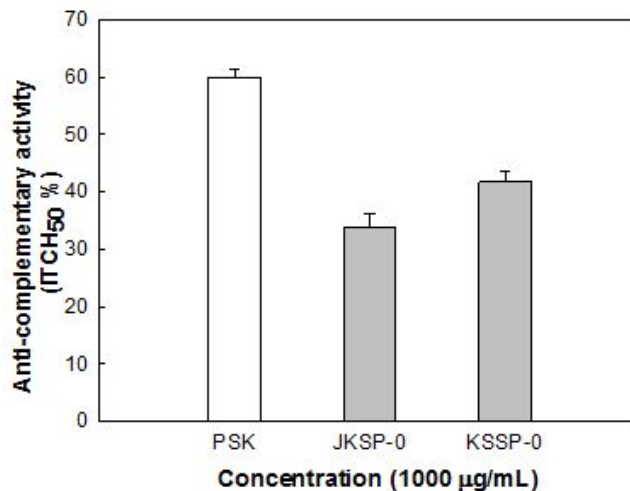


Fig. 72. Anti-complementary activity of JKSP-0 and KSSP-0 purified from commercial and Korean ganjang.

(2) 한식간장과 해외간장으로부터 분리된 조다당의 대식세포의 면역활성

(가) 실험재료 및 방법

① 세포배양 및 세포독성 측정

나-(2)-(가)-①항의 세포배양 및 세포독성 측정방법과 동일.

② Nitrite와 Reactive oxygen species 측정

나-(2)-(가)-②항의 nitrite와 reactive oxygen species 측정방법과 동일.

③ RNA 분리 및 cDNA 제조

나-(2)-(가)-③항의 RNA 분리 및 cDNA 제조방법과 동일.

④ 역전사중합연쇄반응(RT-PCR)

나-(2)-(가)-④항의 역전사 중합연쇄반응(RT-PCR) 방법과 동일.

⑤ 중합연쇄반응 (PCR)

나-(2)-(가)-⑤항의 중합연쇄반응 (PCR) 방법과 동일.

⑥ Cytokine

나-(2)-(가)-⑦항의 cytokine 측정 방법과 동일.

(나) 결과 및 고찰

① Raw 264.7 세포독성 및 NO, ROS 생성

간장으로부터 유래된 다당 시료는 둘다 높은 농도에서까지 대식세포 (Raw 264.7 cell)에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 두 시료 모두 농도의존적으로 ROS, NO를 생성하였다. 그 중 해외간장으로부터 유래된 다당시료 (JKSP-0)는 한식간장으로부터 유래된 다당시료 (KSSP-0)보다 1,000 mg/mL 농도에서 1.07배 많은 ROS를 생성하였고, 이와 반대로 KSSP-0는 JKSP-0보다 1,000 mg/mL 농도에서 1.49배 많은 NO를 생성하여 유의적으로 차이가 있었다.

② Cytokine 생성

대식세포는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역활성을 조절하며, 항원에 대한 제시를 함으로써 면역작용에 중추적인 역할을 한다.

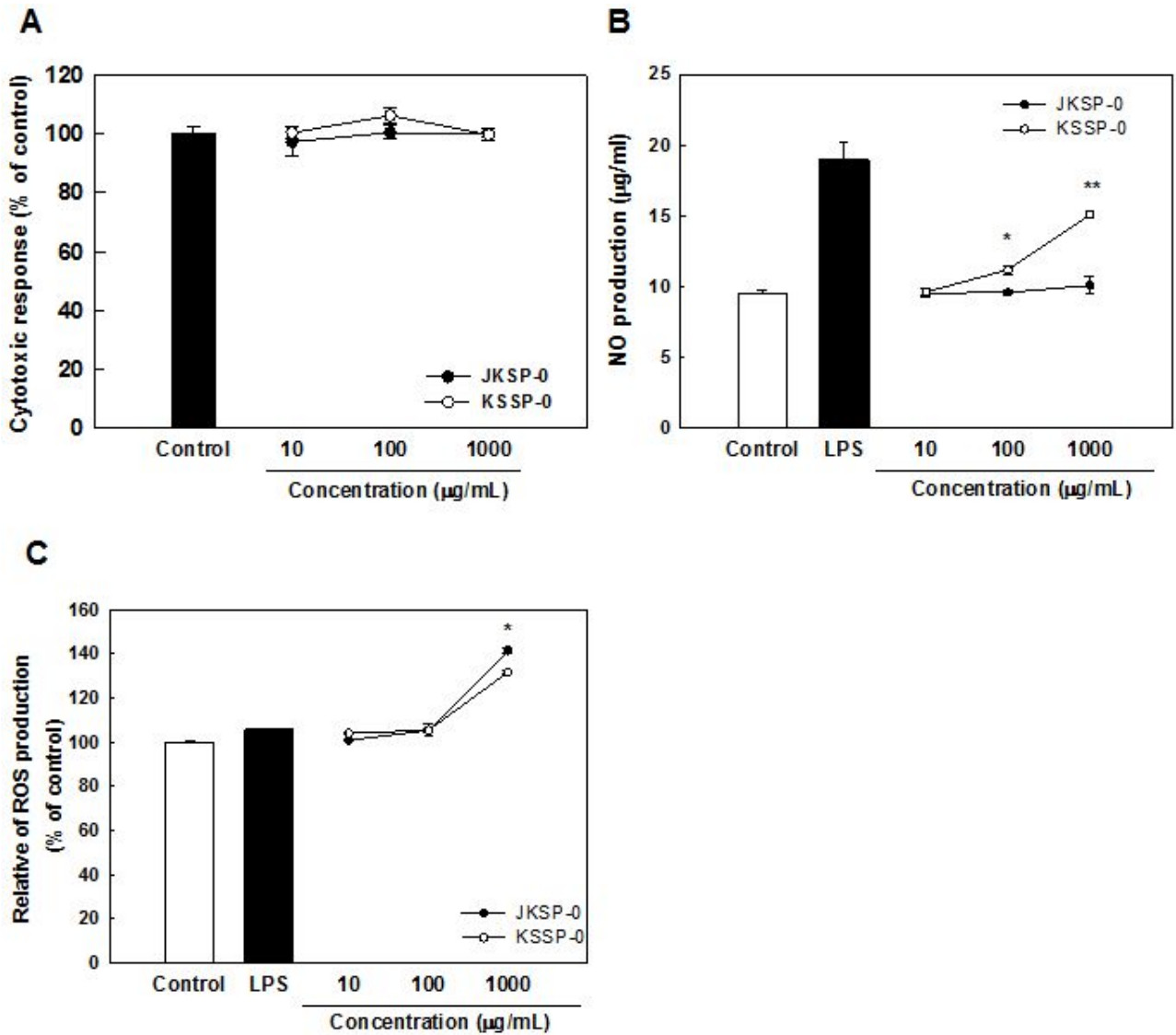


Fig. 73. Cytotoxicity, NO, ROS production of KKSP-0 and JKSP-0 by Raw 264.7 macrophages

한식간장과 해외간장 유래 다당 시료들은 IL-6, TNF- α 의 생성을 유도하였고 그 중 재래간장으로부터 유래된 다당시료(KTSP-0)는 양조간장으로부터 유래된 다당 시료(CSP-0)보다 높은 cytokine의 생성을 유도하였다. KSSP-0는 JKSP-0보다 1,000 mg/mL 농도에서 5.69배의 IL-6와 30.31배의 TNF- α 생성을 유도하였고 PCR을 이용한 유전자의 발현을 확인한 실험에서도 KTSP-0가 JKSP-0보다 12.64배 (IL-6), 1.55배 (TNF- α)의 높은 cytokine mRNA의 발현을 나타내었다. 그러므로 진간장으로부터 유래된 다당이 더 대식세포에서 더 높은 면역활성능을 가진 것으로 관찰되었다.

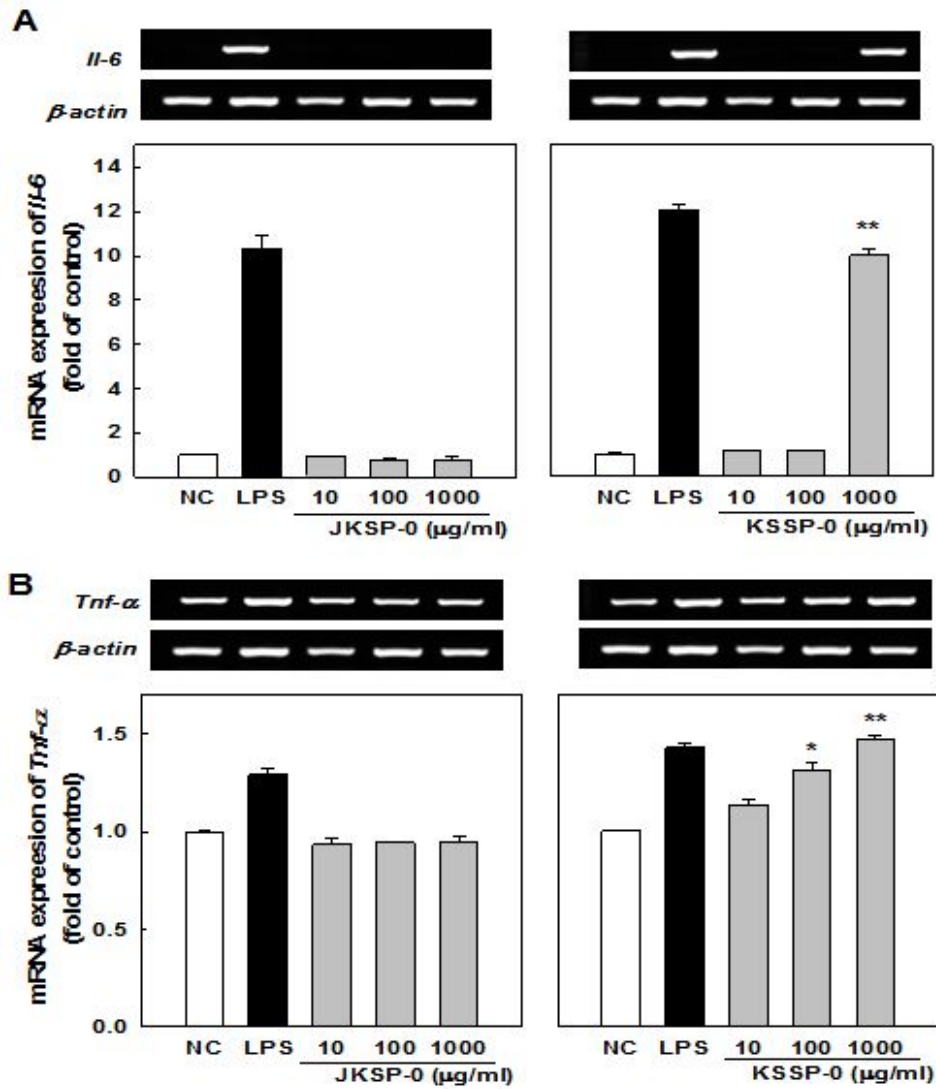


Fig. 74. IL-6 and TNF- α mRNA expression of KKSP-0 and JKSP-0 on Raw 264.7 macrophages

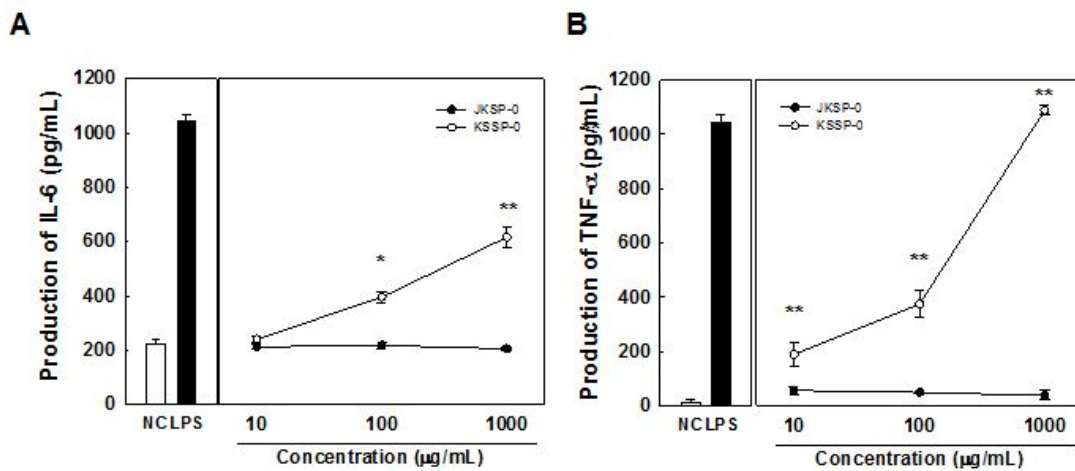


Fig. 75. Effect of KKSP-0 and JKSP-0 on IL-6 and TNF- α production by Raw 264.7 macrophages

(3) 한식간장과 해외간장으로부터 분리된 조다당의 장관면역 활성화

(가) 실험재료 및 방법

① 실험동물과 세포배양

면역활성 측정을 위한 실험동물은 6주령된 Halan 모체의 female C3H/HeJ mouse를 코아텍(Gyeonggi Pyeongtaek, Korea)로부터 분양 받아 고형 사료(카길애그리퓨리나 Co Ltd, kungi, Bundang, Korea)와 여과기를 거친 물을 자유로이 공급하면서 3일 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후 체중이 20 g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기 (Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다. 동물세포 배양을 위한 RPMI-1640 배지와 Phosphate Buffered Saline (PBS), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 모두 Gibco(Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. IL-6, GM-CSF 정량하기 위한 ELISA kit는 BD Bioscience(SanDiego, CA, USA)에서 입수하여 실험에 사용하였고 IgA의 측정은 IgA ELISA kit(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

② Peyer's patch cell에 의한 IgA 및 cytokine 생성

C3H/HeJ 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 무균적으로 적출한 후 PBS 용액이 담겨진 petridish에 옮겨 화염 멸균한 100 mesh에 1 mL Syringe의 plunger로 마쇄하고 0.2% NaCl 과 200 mesh를 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포액을 조제하였다. 세포 현탁액은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 medium으로 세척하여 2×10^6 cells/mL의 세포농도로 조정한 후 96-well plate에 180 μL 씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μL 씩 넣어주어 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 이를 IgA, IL-6, GM-CSF의 생성능을 확인하는데 이용하였다.

③ 장관면역 활성화 (Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식 활성화)

C3H/HeJ 마우스 복부를 절개하여 소장벽 위에 존재하는 Peyer's patch를 무균적으로 적출한 후 PBS 용액이 담겨진 petridish에 옮겨 화염 멸균한 100 mesh에 1 mL Syringe의 plunger로 마쇄하고 0.2% NaCl 과 200 mesh를 이용하여 적혈구와 이물질을 제거한 후 Peyer's patch 세포액을 조제하였다. 세포 현탁액은 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 medium으로 세척하여 2×10^6 cells/mL의 세포농도로 조정한 후 96-well plate에 180 μL 씩 분주하고 적당한 농도로 희석한 시료를 20 μL 씩 넣어주어 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 이를 골수세포 증식활성에 사용하였다. 한편, 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고 2.5×10^5 cells/mL의 세포농도로 조정한 후 96-well plate에 100 μL 씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액과 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지를 각각 50 μL 씩 첨가하고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 6일간 배양하였다. 시료의 Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성화는 6일간 배양된 배양액에 CCK-8 kit 용액 20 μL 을 첨가하고 4시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 saline 대조군의 골수세포 증식도에 대한 상대활성(%)으로 평가하였다.

(나) 결과 및 고찰

① Peyer's patch cells에 의한 IgA 및 cytokine 생산 활성화

시료 자극에 의해 Peyer's patch의 T 세포를 자극하게 되면 골수세포 증식에 영향을 줄 수 있는 IL-6와 CSF(colony-stimulating factor)등의 cytokine의 생산이 촉진되고, 점막 면역과 관련된 IgA 항체의 생성이 증가하게된다. 이에 Peyer's patch cell의 cytokine 및 IgA의 생성을 조사한 결과, IL-6, GM-CSF의 경우에는 실험군간 유의적인 차이가 크게 보이지를 않았지만 IgA의 생산량은 농도 의존적으로 높아지는 경향을 확인할 수가 있었다.

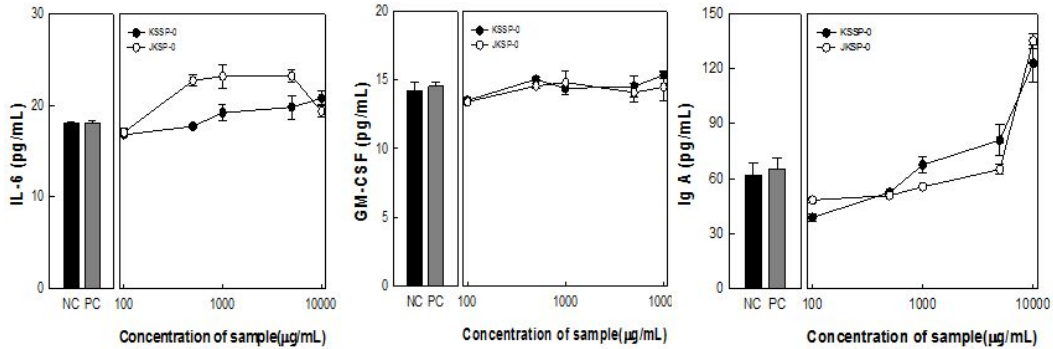


Fig. 76. Effect of KSSP-0 and JKSP-0 on IL-6 and cytokine production by Peyer's patch cells of C3H/HeJ mouse

② Peyer's patch cell을 경유한 골수세포 증식활성 및 GM-CSF 생산

Peyer's patch는 T 세포와 B 세포등으로 구성되어 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데 이중 골수의 증식에 관여를 하는 GM-CSF와 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 된다. 이를 확인하기 위하여 시료에 의한 Peyer's patch cell에서의 GM-CSF의 생산량과 이를 Bone marrow에 적용하여 cytokine에 의해 골수 세포의 proliferation을 확인한 결과, GM-CSF에서는 KSSP-0의 100 µg/mL의 농도에서 control 대비 유의적으로 생산량이 증가하였고 골수세포의 증식에서도 마찬가지로의 결과를 확인할 수 있었다.

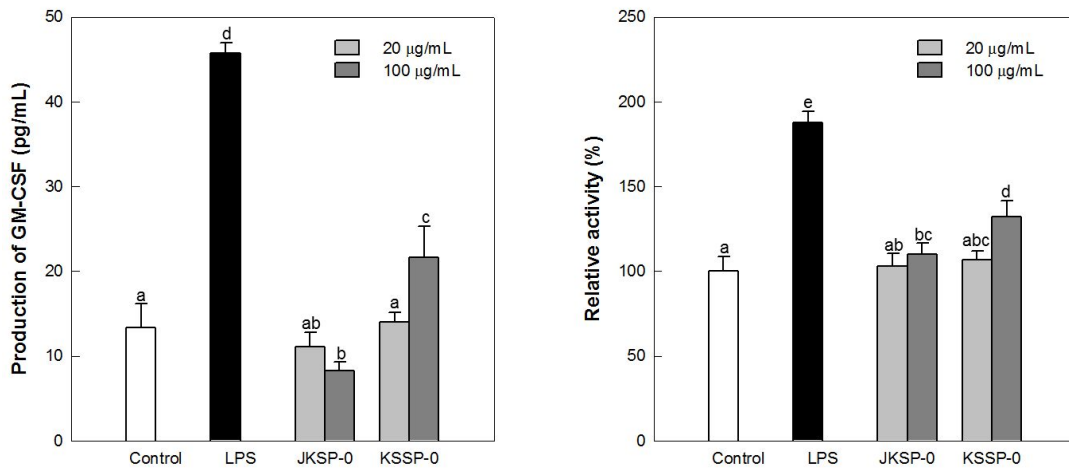


Fig. 77. Effect of KSSP-0 and JKSP-0 on GM-CSF-production and bone marrow-proliferating activity through Peyer's patch cells

(4) 한식간장과 해외간장으로부터 분리된 조다당의 경구투여 후 장관면역

(가) 실험재료 및 방법

① 실험동물 및 경구 투여

2-나-(4)-(가)-①항의 실험동물 및 경구 투여 방법과 동일.

② 분변내 IgA의 함량 측정

2-나-(4)-(가)-②항의 분변내 IgA의 함량 측정방법과 동일.

③ Serum내 IL-6 함량 측정

2-나-(4)-(가)-③항의 Serum내 IL-6 함량 측정 방법과 동일.

④ Payer's patch cell의 준비

2-나-(4)-(가)-④항의 Payer's patch cell의 준비 방법과 동일.

(나) 결과 및 고찰

① 경구투여 후 Peyer's patch cells 성장

간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch의 면역세포 증식을 확인하기 위하여 0.5, 1, 5 mg/mouse 의 농도로 1일 1회씩 30회를 투여하였고, 이를 안락사 시켜 장관외벽의 Peyer's patch로부터 면역세포를 획득 1×10^7 cells/mL 농도로 조정 이를 7일간 배양하였다. 그 결과 PBS 를 투여한 대조군과 해외간장의 다당(JKSP-0), 한식간장의 다당을 비교하였을 때 JKSP-0는 증식능을 확인할 수가 없었고 KSSP-0는 0.5, 1 mg/mouse의 농도에서는 증식능을 확인할수 없었지만 5 mg/mouse 농도에서 300%로 대조군 대비 3배의 증식능을 확인할 수 있었다. 이로써 간장 다당을 경구 섭취하였을 때 장관 면역계를 활성화시키는것으로 사료된다.

② 분변 및 Peyer's patch cell에서 항체농도

IgA는 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. 간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch에서의 IgA의 생산을 확인하기 위하여 장관을 통과한 분변과 Peyer's patch 세포에서의 생산된 IgA 항체량을 측정하였다. 그 결과, JKSP-0와 KSSP-0를 투여했던 실험군에서는 KSSP-0가 JKSP-0보다 유의적으로 높은 함량을 가지고 있는 것을 확인 할수 있었다. Peyer's patch cell에서의 IgA의 생산량을 측정한 결과에서도 분변에서 비슷하게 모든 실험군에서 농도의존적으로 IgA의 생산량이 증가하였다. JKSP-0와 KSSP-0를 비교하여보면 KSSP-0이 IgA 생산량이 JKSP-0보다 유의적으로 높게 생산되는 것을 확인하였다.

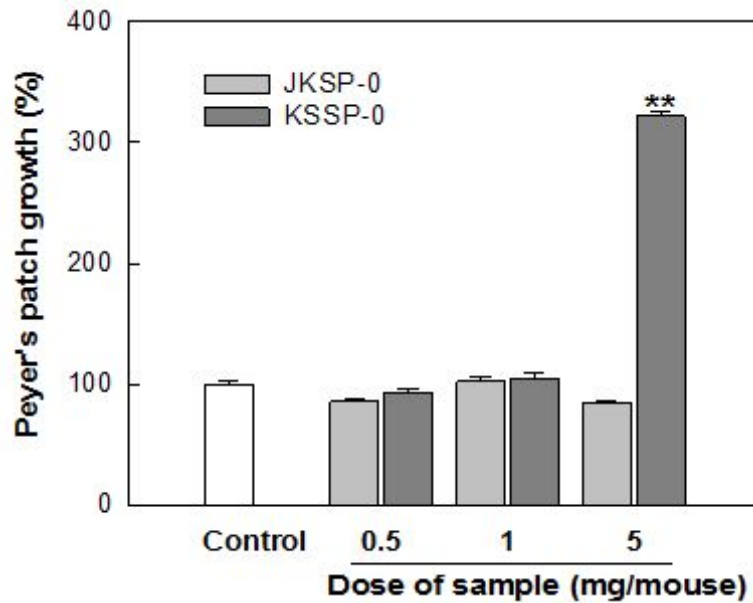


Fig. 78. Peyer's patch cells proliferation activity of JKSP-0 and KSSP-0

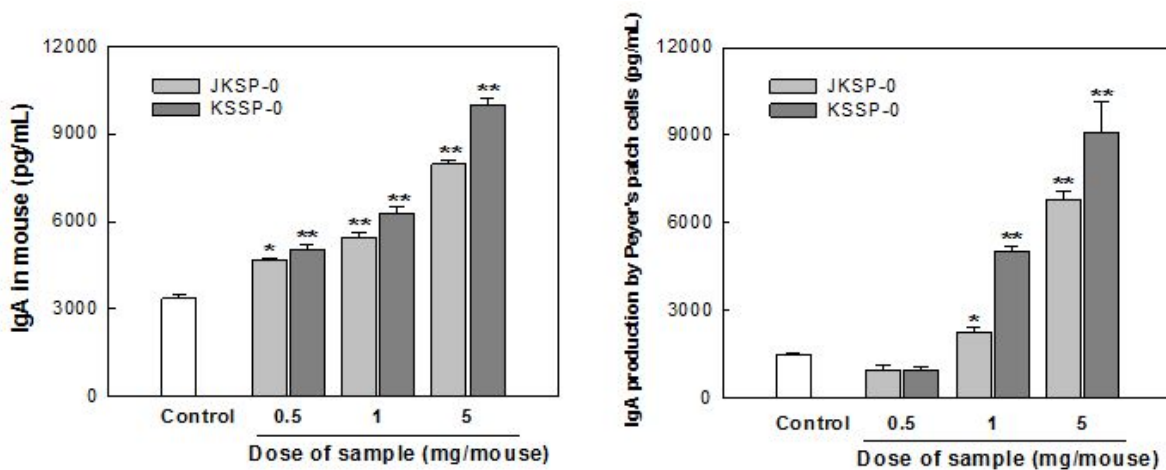


Fig. 79. IgA production of JKSP-0 and KSSP-0 on mouse feces and peyer's patch cells

③ Peyer's patch cell에서의 IL-4, IL-6 cytokine의 생산량 측정

간장 다당들의 경구투여를 통한 Peyer's patch의 면역세포 증식을 확인하기 위하여 0.5, 1, 5 mg/mouse 의 농도로 1일 1회씩 30회를 투여하였고, 이를 안락사 시켜 장관외벽의 Peyer's patch로부터 면역세포를 획득 1×10^7 cells/mL 농도로 조정 이를 3일간 배양하였다. 이 상등액을 가지고 IL-4, IL-6를 측정하였다. IL-4는 naïve T cell을 Th2 cell로 분화시키는 인자로서 항체 생산과 밀접한 관련을 가지고 있다. 측정 결과, JKSP-0는 대조군 대비 증가하지 못하였고, KSSP-0 투여군에서는 농도의존적으로 증가하지는 않지만 5 mg/mouse의 농도투여군에서 42.7 ± 5.1 pg/mLfh 유의적으로 높은 IL-4의 생산량을 확인 할수 있었다. IL-6의 생산량을 측정한 결과에서는 JSKP-0와 KSSP-0 투여군에서는 JKSP-0가 더 많은 IL-6를 생산하는 것을 확인할 수 있었다.

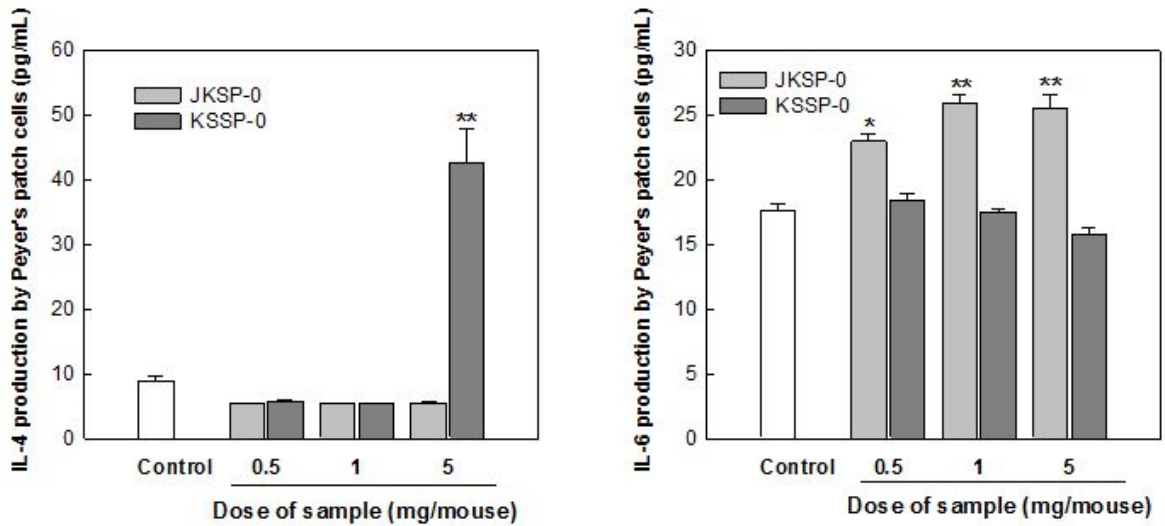


Fig. 80. Effect of JKSP-0 and KSSP-0 on IL-4 and IL-6 production by murine peyer's patch cells

④ 혈청내 IL-6 함량 측정

IL-6는 염증초기에 염증반응에 관여를 하거나 B-cell를 분화 유도하는 역할을 하는 cytokine의 한 종류이다. 이를 측정한 결과 JKSP-0, KSSP-0의 실험군 둘다 IgA의 함량이 낮은 것으로 확인하였다.

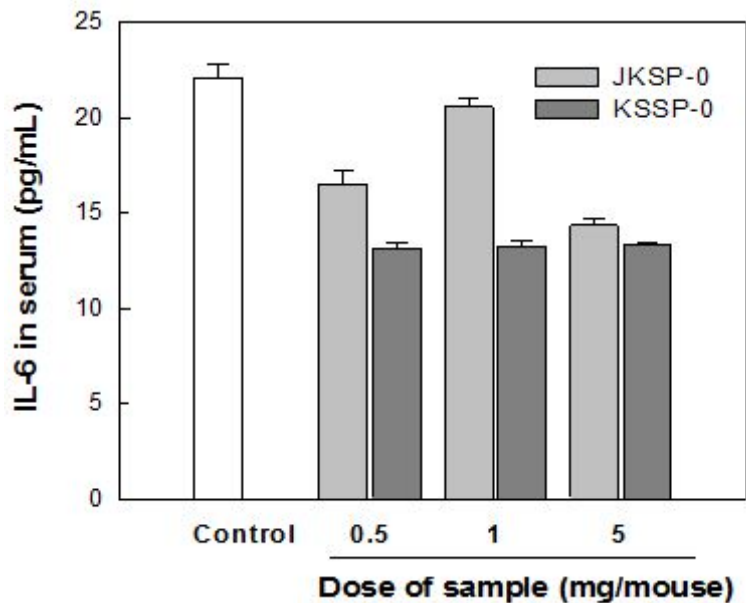


Fig. 81. Effect of JKSP-0 and KSSP-0 on IL-6 production by murine in serum

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
<p>■ 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산-펩타이드 분리 조건 최적화 및 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 (<i>in vitro, in vivo</i>) (제1세부)</p>	100%	<p>** 한식 간장의 아미노산-펩타이드, 폴리사카라이드 분리</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 아미노산·펩타이드 분리 : 전기투석법, Ultrafiltration(MWCO 1000) 이용 ● 폴리사카라이드 분리: 에탄올 침전법 이용 <p>** 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 (<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 배양세포계에서 염증성 사이토카인을 바이오마커로 하여 면역 관용 평가 진행 <ul style="list-style-type: none"> - butyrate, 단일 아미노산인 L-glutamine, L-leucine, 한식간장의 아미노산·펩타이드의 항염증능 평가 결과, LPS에 의한 TNF-α의 생성을 억제함 <p>** 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 (<i>in vivo</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 한식간장의 폴리사카라이드 섭취에 의한 SCFAs 생성량 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 혈액, 맹장내용물, 대변의 SCFAs 생성량 분석 결과, 폴리사카라이드와 한식 간장 섭취에 의한 농도 의존적 상관관계가 나타나지 않아, 한식간장의 폴리사카라이드 섭취가 SCFAs 생성과 연관성이 없을 것으로 결론지음 ● IBD 모델에서의 장관면역계 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드를 섭취한 군에서 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였음. 설사와 혈변을 나타내는 지표인 Disease activity index(DAI) 역시 DSS만을 처리한 음성 대조군과 비교하여 낮은 경향을 보임. 대장 조직의 병리학적 분석 결과, 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소하는 경향을 보였음. 대장조직의 MPO 수준 분석 결과를 통하여 호중구의 침윤이 다른 군과 비교해 감소한 것을 확인. - 한식간장에서 분리한 폴리사카라이드를 섭취한 군에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보임. 염증성 사이토카인인 IL-1β와 iNOS의 mRNA 발현이 감소함.
<p>■ 한식 간장의 당-지질 대사 조절 효능 평가 및 기작 연구 (<i>in vitro</i>) 및 항비만 효능 평가 (<i>in vivo</i>) (제2세부)</p>	100%	<p>** 한식간장 성분의 당-지질 대사 조절 효능 및 기작 연구 (<i>in vitro</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드를 3T3-L1에 처리한 결과 cholesterol과 TG 감소 ● 한식 간장에 포함된 dipeptide 중 지질대사에 영향을 줄 것으로 예상되는 PPAR-γ에 대한 activity를 갖는 dipeptide인 WE(Trp-Glu)를 통해 SPR과 TR-FRET 실험 진행 하여 WE가 PPARα를 활성화하여 지질대사에 변화를 줄 것을 확인함 <p>** 한식간장의 항비만 효능 평가 (<i>in vivo</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● H&E staining 결과 poly군의 지방세포에서 cell size 감소 ● Polysaccharide 시료에 의한 plasma cholesterol, HDL, LDL저하 및 HDL/LDL ratio 증가, 간의 lipid accumulation 감소 ● qPCR 결과 폴리사카라이드군의 시료가 ABCG5, ABCG8, SR-BI의 발현을 증가시켜 cholesterol efflux를 증가시켰고 HMG-CoAR을 감소시켜 지질생합성을 저해. 또한 β-oxidation을 통해 체내 cholesterol을 감소시킴. ● 아미노산·펩타이드군의 시료는 LXRα의 활성결과 ABCA1, ABCG5/8, CYP7a1, SR-BI의 발현 증가를 통해 cholesterol efflux를 활성화시켰고 insig2a를 증가시켜 지질생합성의 주요인자인 SREBP1c를 억제. 또한 LDL-R과 LPL을 통해 LDL 수준을 저하시켰을 것으로 예상 ● 각 시료는 CRP, TNF-α, IL-6를 감소시켜 anti-inflammation 효과를 가짐

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
<p>■ 한식 간장의 장관면역계 활성화(장관면역 증진) 기작 규명 (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>) (제3세부)</p>	100%	<p>** 한식간장의 기능적 우수성을 확인하기 위해 시판 상업용양조 간장(CSP-0)과 한국 전통 방식의 재래 간장(KTSP-0)을 대상으로 다당류를 분리, 면역계 전반에 대한 활성평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ● KTSP-0와 CSP-0의 화학 특성: 다당의 구성당 유사 ● 간장으로부터의 다당 수율: KTSP-0는 10.7 g/L로 CSP-0의 약 2배 ● 항보체 활성: KTSP-0(64.7%) > CSP-0 (56%) ● Macrophage 활성화: KTSP-0의 NO 생산량, TNF-α, IL-6의 생산량이 상대적으로 훨씬 우수, KTSP-0만이 macrophage FcR I의 mRNA 발현에 활성을 보임. ● 장관면역 활성화: <i>in vitro</i>에서 KTSP-0가 상대적으로 높은 장관면역활성, <i>in vivo</i> 경구투여 실험에서 KTSP-0 투여군이 높은 Peyer's patch cell 증식능, 분변 중 IgA 분비능, IL-4 및 IL-6 생산능 보임. <p>** 고품질 한식간장으로부터 다당(KSSP-0)을 분리, 해외 간장 유래 다당류(JKSP-0)와 화학특성 및 면역활성 전반을 비교 검토</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 화학 특성: 다당의 구성당 유사 ● 간장으로부터의 다당 수율: KSSP-0 (11.7 g/L) > JKSP-0 (9.5 g/L)로 한식간장이 다소 높은 수율 ● 항보체 활성: KSSP-0(40%) > JKSP-0 (35%) ● Macrophage 활성화: KSSP-0는 NO 및 ROS 생산을 농도 의존적으로 증가, KSSP-0는 TNF-α, IL-6의 생산능에서 상대적으로 훨씬 우수, 단, macrophage FcR III의 mRNA 발현은 JKSP-0가 높은 결과, ● 장관면역 활성화: <i>in vitro</i>에서 KTSP-0와 JKSP-0는 모두 비슷한 정도로 Peyer's patch cell을 자극, GM-CSF와 IL-6 등의 cytokine 생산 유도 및 IgA 생산 유도, <i>in vivo</i> 경구투여 실험에서 KSSP-0 투여군이 유의적으로 높은 Peyer's patch cell 증식능, 분변 중 IgA 분비능을 보임. IL-4 생산능은 KTSP-0가, IL-6는 JKSP-0가 상대적으로 우수

본 연구를 통해 고품질 한식간장의 지질대사 조절 작용 및 면역활성, 특히 장관면역에 있어서 우수성을 확인하였음. 이를 바탕으로 한식간장의 우수성을 국내외 학술대회 발표, 논문 게재, 전시회 참여를 통해 학술적으로 홍보하여 한식 세계화를 위한 관련 산업에서의 과학적 data를 제시하고자 한다. 또한 한식간장의 마케팅에 있어서 광고, 홍보책자 제작 등 본 자료를 적극 활용하고자 하며, 이와 같은 활동이 한식간장의 수출 및 대중화에 크게 공헌하리라고 기대하고 있다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 특허 1건 출원 예정
 - 한식간장 성분 분리 방법에 대한 특허 출원 예정

- 논문 2건 게재, 1건 게재 예정
 - 경기대 신광순 등, 시판양조 및 재래식 조선간장으로부터 분리한 다당의 면역증강 활성 비교, 한국식품과학회지, 2012.
 - 고려대 이성준 등, Fucosterol Is a Selective Liver X Receptor Modulator That Regulates the Expression of Key Genes in Cholesterol Homeostasis in Macrophages, Hepatocytes, and Intestinal Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012
 - 한식간장의 항염증 연구에 대한 논문 게재 예정

- 학술발표 3건
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Polysaccharides Isolated from Korean Commercial and Traditional Soy Sauces, JAFI 2012, 2012.10.16 - 10.17
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Two Polysaccharides Isolated from Soy Sauces Manufactured with Different Raw Materials, 2012 Int'l Symposium and Annual Meeting of KFN, 2012.11.31 - 11.2
 - 샘표식품(주) 허병석, 고품질 한식간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명, 2012 한식세계화 심포지엄 (2012.09.21)

- 홍보, 전시회 참여 등 2건
 - 식품위생신문 (2012. 10.)
 - 2012년도 생명산업과학기술대전 (2012. 09. 20 ~ 2012. 09.22)

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. Roger A Vaughan, Randi Garcia-Smith, Marco Bisoffi, Carole A Conn and Kristina A Trujillo, Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11:142
2. Yi Wanga, Yi Taoa, Yunjin Lina, Liang Liangb, Yi Wub, Haibin Qua, Tingbo Liangb, Yiyu Chenga, Integrated analysis of serum and liver metabolome in liver transplanted rats by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2009, 633:65-70
3. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. [DaneseS,SansM, FiocchiC. *AutoimmunRev.*2004Jul;3\(5\):394-400.](#)
4. Bacterial flora in irritable bowel syndrome: role in pathophysiology, implications for management. [QuigleyEM. *JDigDis.*2007Feb;8\(1\):2-7.](#)
5. Dietary Guidelines for Americans 2010 Committee (DGAC)
6. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis *Clinical Nutrition.* 2006. 25, 477 - 88
7. Protective Effect of Lactulose on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Inflammation in Rats. *Digestive Diseases and Sciences, Vol. 49, No. 9.* 2004
8. Preventative Effects of Lactulose in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:265 - 71
9. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut* 2011;60:923
10. Comparison of Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Korean Traditional Kanjang and Garlic Added Kanjang. *Journal of Agriculture & Life Science* 2010;44(2);39-48
11. The effects of isoflavone on lipid metabolism and Immune responses in SD rats. *Korean J. Nutr* 2002;35:635-642
12. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. [DaneseS,SansM, FiocchiC. *AutoimmunRev.*2004Jul;3\(5\):394-400.](#)
13. Bacterial flora in irritable bowel syndrome: role in pathophysiology, implications for management. [QuigleyEM. *JDigDis.*2007Feb;8\(1\):2-7.](#)
14. Dietary Guidelines for Americans 2010 Committee (DGAC)
15. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis *Clinical Nutrition.* 2006. 25, 477 - 88
16. Protective Effect of Lactulose on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Inflammation in Rats. *Digestive Diseases and Sciences, Vol. 49, No. 9.* 2004

17. Preventative Effects of Lactulose in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:265 - 71
18. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut* 2011;60:923
19. Comparison of Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Korean
20. Traditional Kanjang and Garlic Added Kanjang. *Journal of Agriculture & Life Science* 2010;44(2):39-48
21. The effects of isoflavone on lipid metabolism and Immune responses in SD rats. *Korean J. Nutr* 2002;35:635-642
22. Sagara, M., et al., Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland. *J Am Coll Nutr*, 2004. 23(1): p. 85-91.
23. Lichtenstein, A.H., Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr*, 1998. 128(10): p. 1589-92.
24. Potter, S.M., Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev*, 1998. 56(8): p. 231-5.
25. Rettberg, J.R., et al., The effect of dietary soy isoflavones before and after ovariectomy on hippocampal protein markers of mitochondrial bioenergetics and antioxidant activity in female monkeys. *Brain Res*, 2011. 1379: p. 23-33.
26. Marsh, T.G., et al., Soy protein supports cardiovascular health by downregulating hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and sterol regulatory element-binding protein-2 and increasing antioxidant enzyme activity in rats with dextran sodium sulfate-induced mild systemic inflammation. *Nutr Res*, 2011. 31(12): p. 922-8.
27. Jayagopal, V., et al., Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2002. 25(10): p. 1709-14.
28. Gallaher, C.M., et al., Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr*, 2000. 130(11): p. 2753-9.
29. Yecies, J.L., et al., Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab*, 2011. 14(1): p. 21-32.
30. Yellaturu, C.R., et al., Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex. *J Biol Chem*, 2009. 284(46): p. 31726-34.
31. Liang, G., et al., Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem*, 2002. 277(11): p. 9520-8.
32. Dentin, R., et al., Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP

- and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*, 2004. 279(19): p. 20314-26.
33. Yu, L., et al., Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(25): p. 16237-42.
 34. Repa, J.J., et al., Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem*, 2002. 277(21): p. 18793-800.
 35. Yu, L., et al., Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 15565-70.
 36. Peet, D.J., et al., Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998. 93(5): p. 693-704.
 37. Tamehiro, N., et al., Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem*, 2007. 282(29): p. 21090-9.
 38. Kozarsky, K.F., et al., Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 1997. 387(6631): p. 414-7.
 39. Acton, S., et al., Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996. 271(5248): p. 518-20.
 40. Rajaraman, G., et al., Membrane binding proteins are the major determinants for the hepatocellular transmembrane flux of long-chain fatty acids bound to albumin. *Pharm Res*, 2005. 22(11): p. 1793-804.
 41. Stump, D.D., et al., Characteristics of oleate binding to liver plasma membranes and its uptake by isolated hepatocytes. *J Hepatol*, 1992. 16(3): p. 304-15.
 42. Baillie, A.G., C.T. Coburn, and N.A. Abumrad, Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol*, 1996. 153(1): p. 75-81.
 43. Tandon, N.N., U. Kralisz, and G.A. Jamieson, Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*, 1989. 264(13): p. 7576-83.
 44. Endemann, G., et al., CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1993. 268(16): p. 11811-6.
 45. Nicholson, A.C., et al., Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(2): p. 269-75.
 46. Febbraio, M. and R.L. Silverstein, CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(11): p. 2012-30.
 47. Febbraio, M., et al., Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, 2000. 105(8): p. 1049-56.
 48. Steinbrecher, U.P., Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1436(3): p. 279-98.

49. Armesilla, A.L. and M.A. Vega, Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*, 1994. 269(29): p. 18985-91.
50. Sato, O., et al., Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem*, 2002. 277(18): p. 15703-11.
51. Dreyer, C., et al., Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992. 68(5): p. 879-87.
52. Fruchart, J.C., P. Duriez, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 1999. 10(3): p. 245-57.
53. Gervois, P., J.C. Fruchart, and B. Staels, Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. 3(2): p. 145-56.
54. Lefebvre, P., et al., Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*, 2006. 116(3): p. 571-80.
55. Peters, J.M., et al., Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem*, 1997. 272(43): p. 27307-12.
56. Eckel, R.H., Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med*, 1989. 320(16): p. 1060-8.
57. Joseph, S.B., et al., Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*, 2003. 9(2): p. 213-9.
58. Staels, B., et al., Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 1998. 393(6687): p. 790-3.
59. Bauerova, K., et al., Glucomannan in prevention of oxidative stress and inflammation occurring in adjuvant arthritis. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008. 29(5): p. 691-6.
60. Ahima, R.S., Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. 14 Suppl 5: p. 242S-249S.
61. Lau, D.C., et al., Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 288(5): p. H2031-41.
62. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 2003. 111(12): p. 1805-12.
63. Yudkin, J.S., et al., C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(4): p. 972-8.
64. Ridker, P.M., Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 2003. 107(3): p. 363-9.
65. Visser, M., et al., Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults.

- JAMA, 1999. 282(22): p. 2131-5.
66. Senn, J.J., et al., Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*, 2003. 278(16): p. 13740-6.
 67. Pradhan, A.D., et al., C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2001. 286(3): p. 327-34.
 68. Ouchi, N., et al., Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 1999. 100(25): p. 2473-6.
 69. Choy, J.C., et al., Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33(9): p. 1673-90.
 70. Hermann, C., et al., Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(2): p. 402-9.
 71. Bastard, J.P., et al., Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation*, 1999. 99(16): p. 2221-2.
 72. Marshall, E., Nestle letter stops NIH talk. *Science*, 1983. 219(4584): p. 469.
 73. Gunness, P. and M.J. Gidley, Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct*, 2010. 1(2): p. 149-55.
 74. Zhang, L., et al., Proteomic analysis of fructose-induced fatty liver in hamsters. *Metabolism*, 2008. 57(8): p. 1115-24.
 75. Baranowski, M., Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*, 2008. 59 Suppl 7: p. 31-55.
 76. Ye F, Zhang ZS, Luo HB, Shen JH, Chen KX, Shen X, et al. The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPAR gamma: Bioassay with molecular modeling simulation. *Chembiochem* 2006;7(1):74-82.
 77. Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Kaga T. Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *J Agric Food Chem* 2009;57(13):5982-6.
 78. Bienenstock J, Befus AD. Review of mucosal immunology. *Immunol*. 41: 249-270 (1980)
 79. Bienenstock J, Clancy R. Bronchial mucosal lymphoid tissue. In *Handbook of Mucosal Immunology*, Orga PL, Mestechy J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J. (eds.), p. 529-538, Academic Press, San Diego, USA (1994)
 80. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. biochem*. 54: 484-489 (1973)
 81. Bockman DE. Cooper MD. 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 (1973)

82. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
83. Brekhman II. In *Man and biologically active substance*. Pergamon Press. New York. (1980)
84. Dao T, Mehal WZ, Crispe LN. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* 161: 2217 (1998)
85. Dimond PF. Complement-inhibiting protein reduces inflammatory events. *Gen. Eng. News.* 22(1): 22-23 (1995)
86. Dubosis M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
87. Hay GW, Lewis BA, Smith F. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R. L. (ed), 5: p. 347, Academic Press Inc., New York and London, USA and England (1973)
88. Hiroshi H, Chohachi K. Anti-complementary principle of Ephedra herbs. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 2900 (1980)
89. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360 (1998)
90. Hugihara M, Nagumo T. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophage and the anti-tumor activity. *Carbohydr. Res.* 243: 211-216 (1993)
91. James DW, Preiss J, Elbein AD. *The polysaccharides*. Aspinall (ed.). Academic Press. London. pp. 142 (1985)
92. James SP, Zeitz M. Human gastrointestinal mucosal T cells. In *Handbook of Mucosal Immunology*, Pearay LO., Jiri M, Michael EL, Warren S, Jerry RM. John B. (eds.), p.275-285, Academic Press, London, England (1994)
93. Kabat EE, Meyer MM. Complement and complement fixation, Chales C. In *Experimental Immunolochemistry*. Thomas Publisher. Illinois. 138 (1964)
94. Kato T Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In *Handbook of Mucosal Immunology*, Orga, P. L., Mestechy, J., Lamm, M. E., Strober, W., McGhee, J. R. and Bienenstock, J. (eds.), p. 11-26, Academic Press, San Diego, USA (1994)
95. Kawamura H, Maruyama H, Takemoto N, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S, Hosoya E. Accelerating effects of Japanese Kampo medicine on recovery of murine haematopoietic stem cells after administration of Mitomycin C. *Int. J. Immunotherapy* V: 35-42 (1989)
96. Kim BH, Kweon MH, Lim WJ, Song CH, Yang HC. Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bispororus*. *Food Sci. Technol. Kor.J.* 30: 709 (1998)
97. Kim ZY. Activations of the complement system. *Allergy.* 6: 61-68 (1986)

98. Kiyohara H, Yamada H. Characterization of vitro IL-2 production enhancing and anti-complementary pectic polysaccharides from Kampo (Japanesase herbal) medicine 'Zuzen Taiho To'. *Phytochem. Res.* 7: 367 (1993)
99. Krahenbuhl J-P, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72: 853-879 (1992)
100. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. rev.* 156: 145-166 (1997)
101. Playfair JHL. In *Immunology at a Glance*, 4th ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, London, England (1987)
102. Ptak J, Lochman J. Immunoabsorption therapy and complement activation. *Transfus Apher Sci.* 32: 263-267 (2005)
103. Rus H, Cudrici C, Nucleescu F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res.* 33: 103-112 (2005)
104. Sminia T, Wilders MM, Janse EM, Hoefsmit EC. Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiology* 164: 136-143 (1983)
105. Srivastava R, Kulshreshtha DK. Bioactive polysacchrides from plant. *Phytochemistry.* 28: 2877-2883 (1989)
106. Trier J. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20: 531-547 (1991)
107. Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujil G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. Krestin(PSK). *Cancer Treat. Rev.* 11: 131-155 (1984)
108. Wang HX, Liu WK. Immunomodulatory and antitumor ativities of polysaccharides complex from a mycelial culture of *Tricholoma* S.P.A local edible mushroom. *Life Science.* 57: 269-281 (1995)
109. Wynn TA, Freund YR, Paulnock DM. TNF-alpha differntially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines. *Cell Immunol.* 140: 184-196 (1992)
110. Yamada H, Kiyohara H. Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines. *Chinese Medicines.* 3: 104-124 (1989)
111. Yamada H. Chemical and pharmacological studies on efficacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kiasato Arch. Exp. Med.* 65: 1-22 (1992)
112. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst.* 85(13): 1038-1049 (1993)
113. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Her E, Kim SH, Kim K, Azuma I, Kim JB. Cellular and humoral adjuvant acticity of lectins isolated from korean mistletoe(*Viscum album colaratum*). *Int. Immunopharmacol.* 1: 881-889 (2001)
114. Stefane Kremer, Jozina Mojet, Ryo Shimojo, Salt reduction in foods using naturally brewed soy sauce. *Journal of Food Science.* 74 : 255-262 (2009)

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 고품질 한식 간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명		
	(영문) Intestinal immune and anti-obese functions of Korean Ganjang		
연 구 기 관	샘표식품(주), 고려대학교, 경기대학교	연 책 임 자	(소속) 샘표식품(주)
참 여 기 관	샘표식품(주), 고려대학교, 경기대학교		(성명) 허 병 석
연 구 비	계	155,000,000	총 연 구 기 간
			2011.12.30 ~ 2012.12.29 (1년)
참 여 연 구 원	16 명 (연구책임자: 3명, 책임연구원: 1명, 연구원: 6명, 연구보조원 6명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>1. 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> • 한식 간장의 기능성 소재 발굴 통한 가치 증대 • 한식 간장에 포함된 폴리사카라이드와 아미노산·펩타이드의 건강기능성 평가를 통한 한식의 고부가가치 창출 • 한식 간장의 기능적 차별성 발굴 및 홍보를 통해 한식의 과학화에 기여 <p>2. 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> • 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 조건 최적화 • 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가 • 한식 간장의 항비만 효능 평가 및 기작 연구 • 한식 간장의 장관면역 활성화 평가 및 기작 연구 <p>○ 연구결과</p> <p>1. 한식 간장의 폴리사카라이드, 아미노산·펩타이드 분리 조건 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 아미노산·펩타이드 분리 : 전기투석법, Ultrafiltration 이용 • 폴리사카라이드 분리: 에탄올 침전법 이용 <p>2. 한식 간장의 장관면역계 효능(면역 관용) 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 염증성 사이토카인을 바이오마커로 하여 면역 관용 평가 진행 (<i>in vitro</i>) <ul style="list-style-type: none"> - 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드, butyrate, 단일 아미노산인 L-glutamine, L-leucine의 항염증능 평가 결과, LPS에 의한 TNF-α의 생성을 억제함 			

- 한식간장의 폴리사카라이드 섭취에 의한 SCFAs 생성량 분석
 - 혈액, 맹장내용물, 대변의 SCFAs 생성량 분석 결과, 폴리사카라이드와 한식간장 섭취에 의한 농도 의존적 상관관계가 나타나지 않아, 한식간장의 폴리사카라이드 섭취가 SCFAs 생성과 연관성이 없을 것으로 결론지음
- IBD 모델에서의 장관면역계 효능 평가 (*in vivo*)
 - 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드를 섭취한 군에서 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보였음. 설사와 혈변을 나타내는 지표인 DAI 역시 DSS만을 처리한 음성 대조군과 비교하여 낮은 경향을 보임. 대장 조직의 병리학적 분석 결과, 백혈구 침윤 및 장상피의 탈락이 감소하는 경향을 보였음. 대장조직의 MPO 수준 분석 결과를 통하여 호중구의 침윤이 다른 군과 비교해 감소한 것을 확인.
 - 한식간장에서 분리한 폴리사카라이드를 섭취한 군에서는 DSS에 의한 체중 감소와 대장 길이가 짧아지는 증상을 완화시키는 경향을 보임. 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 iNOS의 mRNA 발현이 감소함.

3. 한식 간장의 항비만 효능 평가 및 기작 연구

- 한식간장 성분의 당·지질 대사 조절 효능 및 기작 연구 (*in vitro*)
 - 한식간장에서 분리한 아미노산·펩타이드와 폴리사카라이드를 3T3-L1에 처리한 결과 cholesterol과 TG 감소
 - 한식 간장에 포함된 dipeptide 중 지질대사에 영향을 줄 것으로 예상되는 PPAR- γ 에 대한 activity를 갖는 dipeptide인 WE(Trp-Glu)를 통해 SPR과 TR-FRET 실험을 진행한 결과, WE가 PPAR α 를 활성화하여 지질대사에 변화를 줄 것을 확인함
- 한식간장의 항비만 효능 평가 (*in vivo*)
 - H&E staining 결과 poly군의 지방세포에서 cell size 감소
 - Polysaccharide 시료에 의한 plasma cholesterol, HDL, LDL저하 및 HDL/LDL ratio 증가, 간의 lipid accumulation 감소
 - qPCR 결과 폴리사카라이드군의 시료가 ABCG5, ABCG8, SR-BI의 발현을 증가시켜 cholesterol efflux를 증가시켰고 HMG-CoAR을 감소시켜 지질생합성을 저해. 또한 β -oxidation을 통해 체내 cholesterol을 감소시킴.
 - 아미노산·펩타이드군의 시료는 LXR α 의 활성결과 ABCA1, ABCG5/8, CYP7a1, SR-BI의 발현 증가를 통해 cholesterol efflux를 활성화시켰고 insig2a를 증가시켜 지질생합성의 주요인자인 SREBP1c를 억제. 또한 LDL-R과 LPL을 통해 LDL 수준을 저하시켰을 것으로 예상
 - 각 시료는 CRP, TNF- α , IL-6를 감소시켜 anti-inflammation 효과를 가짐

4. 한식 간장의 장관면역 활성 평가 및 기작 연구

- 한식간장의 기능적 우수성을 확인하기 위해 시판 상업용양조 간장 (CSP-0)과 한국 전통방식의 재래 간장(KTSP-0)을 대상으로 다당류를 분리, 면역계 전반에 대한 활성평가
 - KTSP-0와 CSP-0의 화학 특성: 다당의 구성당 유사
 - 간장으로부터의 다당 수율: KTSP-0는 10.7 g/L로 CSP-0의 약 2배
 - 항보체 활성: KTSP-0(64.7%) > CSP-0 (56%)
 - Macrophage 활성화: KTSP-0의 NO 생산량, TNF- α , IL-6의 생산량이 상대적으로 훨씬 우수, KTSP-0만이 macrophage FcR I의 mRNA 발현에 활성을 보임.
 - 장관면역 활성: *in vitro*에서 KTSP-0가 상대적으로 높은 장관면역활성, *in vivo* 경구투여실험에서 KTSP-0 투여군이 높은 Peyer's patch cell 증식능, 분변 중 IgA 분비능, IL-4 및 IL-6 생산능 보임.
- 고품질 한식간장으로부터 다당(KSSP-0)을 분리, 해외 간장 유래 다당류(JKSP-0)와 화학특성 및 면역활성 전반을 비교 검토
 - 화학 특성: 다당의 구성당 유사
 - 간장으로부터의 다당 수율: KSSP-0 (11.7 g/L) > JKSP-0 (9.5 g/L)로 한식간장이 다소 높은 수율
 - 항보체 활성: KSSP-0(40%) > JKSP-0 (35%)
 - Macrophage 활성화: KSSP-0는 NO 및 ROS 생산을 농도 의존적으로 증가, KSSP-0는 TNF- α , IL-6의 생산능에서 상대적으로 훨씬 우수, 단 macrophage FcR III의 mRNA 발현은 JKSP-0가 높은 결과,
 - 장관면역 활성: *in vitro*에서 KTSP-0와 JKSP-0는 모두 비슷한 정도로 Peyer's patch cell을 자극, GM-CSF와 IL-6 등의 cytokine 생산 유도 및 IgA 생산 유도, *in vivo* 경구투여 실험에서 KSSP-0 투여군이 유의적으로 높은 Peyer's patch cell 증식능, 분변 중 IgA 분비능을 보임. IL-4 생산능은 KTSP-0가, IL-6는 JKSP-0가 상대적으로 우수

- 연구성과 및 성과활용 계획
 - 특허 1건 예정
 - 한식간장 성분 분리 방법에 대한 특허 출원 예정
 - 논문 2건 게재, 1건 게재 예정
 - 경기대 신광순 등, 시판양조 및 채래식 조선간장으로부터 분리한 다당의 면역증강 활성 비교, 한국식품과학회지, 2012.
 - 고려대 이성준 등, Fucosterol Is a Selective Liver X Receptor Modulator That Regulates the Expression of Key Genes in Cholesterol Homeostasis in Macrophages, Hepatocytes, and Intestinal Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012
 - 한식간장의 항염증 연구에 대한 논문 게재 예정
 - 학술발표 3건
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Polysaccharides Isolated from Korean Commercial and Traditional Soy Sauces, JAFI 2012, 2012.10.16 - 10.17
 - 경기대 신광순 등, Comparison with Immuno-stimulating Activities of Two Polysaccharides Isolated from Soy Sauces Manufactured with Different Raw Materials, 2012 Int'l Symposium and Annual Meeting of KFN, 2012.11.31 - 11.2
 - 샘표식품(주) 허병석, 고품질 한식간장의 항비만 및 장관면역 증진 기능 규명, 2012 한식세계화 심포지엄 (2012.09.21)
 - 홍보, 전시회 참여 등 2건
 - 식품위생신문 (2012. 10.)
 - 2012년도 생명산업과학기술대전 (2012. 09. 20 ~ 2012. 09.22)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식 우수성·기능성 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식 우수성·기능성 연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.