

GOVP1200514602

GA 0394-0251

최종
연구보고서

미강발효액의 생리활성 및 실용화

Functionality of fermented rice bran and its utilization

연구기관
한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미강발효액의 생리활성 및 실용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 30 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 윤 숙

세부연구책임자 : 김 윤 숙

연 구 원 : 박 용 곤

연 구 원 : 석 호 문

연 구 원 : 최 인 옥

협동연구기관명 : 경기대학교

협동연구책임자 : 신 광 순

협동연구기관명 : 고려대학교병설보건대학

협동연구책임자 : 서 형 주

요 약 문

I. 제목

미강 발효액의 생리활성 및 실용화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구의 목적은 미강을 이용하여 생체조절 물질의 생산에 적합한 미생물을 선정 후, 미강발효액 생산에 있어서의 최적조건과 공정 확립하고 미생물에 의해 생산된 미강 발효액으로부터 우수한 macrophage 및 장관면역의 활성 등 면역계의 활성과 고혈압의 예방과 관련된 ACE 저해활성을 촉진하는 성분을 탐색하며 이 성분을 포함하는 미강발효액을 의약 또는 기능성식품의 중간원료로 소재화하고 미강의 미생물 발효액을 소재로 한 안전성이 확립된 일상섭취 가능한 생체조절용 질병예방 가공식품을 개발하는 것에 있다.

III. 연구개발내용 및 범위

가) 세부과제 : 미강 발효액을 소재로 한 가공식품 개발

- 미강 발효액의 이화학적 특성 및 가공적성 검토
- 미강 발효액의 식품가공공정 중의 생리 활성 잔존성 분석
- 미강 발효액 첨가에 의한 가공식품 제조 특성화

나) 협동과제 : 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화

- 생리활성 물질 함유 미강 발효물 생산 균주 선별
- 생리활성 물질 함유 미강 발효물 생산 최적화
- 생리활성 물질 함유 미강 발효물의 산업적 적용을 위한 생산 최적화

다) 협동과제 : 미강 발효액의 생리활성 성분 규명

- 미강 발효액으로부터 생리활성 성분의 검색
- 미강 발효액의 생리활성 성분의 분리 및 정제
- 미강 발효액의 생리활성 성분 물질 규명과 구조와 작용양식 해명
- *In vivo*에서의 생리활성 및 독성실험

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

세 부 과 제 : 미강 발효액을 소재로 한 가공식품 개발

Monascus pilosus 균을 이용하여 미강을 포함하는 액체 및 고체 배지에서 발효액을 생산하고 생산된 미강 발효액의 이화학적 특성 검토를 위하여 일반성분을 분석을 검토한 결과 액체 발효액의 수분함량은 93.97%였으며 조지방이 0.3%, 조단백이 0.73%, 조회분이 0.74%를 나타낸 반면 고체 발효액에서는 수분함량이 68.13%, 조지방이 6.68%, 조단백이 4.80%, 조회분이 3.71%를 나타내었다. 섬유질을 포함하는 탄수화물은 액체발효액의 경우 4.26%, 고체발효액의 경우 16.6%로 나타났다. 액체 미강 발효액의 식이섬유 함량과 유리당 함량은 총식이 섬유함량은 건물중으로 24.1%였으며 유리당으로서 glucose는 1.9%, fructose는 4.1 %의 함량을 가지는 것으로 나타났다. 미강 발효액의 무기질 조성을 분석한 결과, Cd, Pb, As와 같은 중금속은 검출되지 않았으며 가장 많은 함량을 나타낸 것은 P이었고 K, Mg, Na의 순으로 함량이 높았다. Fe도 미량 함유되어 있었다. 미강 발효액의 아미노산 조성을 분석한 결과주요 아미노산으로는 aspartic acid, glutamic acid, serine, alanine순으로 나타났다. 미강 액체 및 고체발효액을 생산하고 이들 물질을 가공에 사용되는 공정을 이용하여 시료를 제조한후 생리활성을 측정 한 결과, 액체발효액을 습열 처리한 결과 macrophage

phosphatase activity는 증자의 온도가 높을수록 또 증자의 시간이 증가될수록 활성이 증가하여 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다. 건열처리 조건에서는 온도가 증가할수록 시간이 증가할수록 활성은 감소하는 것으로 나타났다. 액체배양액을 건조방법별로 처리한 후 macrophage phosphatase activity를 측정된 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 극미하였다. 미강 액체배양액의 증자온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정된 결과는 습열 처리 조건에서는 95℃에서 45분을 초과하지 않는 것이 효과적이라고 사료되었다. 121℃에서 처리한 시료도 활성이 유지됨을 확인할 수 있었다. 액체배양액의 건열처리별 온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정된 결과 온도가 증가할수록 활성은 증가하는 것으로 나타났으나 같은 온도 조건에서는 처리시간이 증가할수록 활성이 감소하여 높은 온도에서 4시간 이상 장시간 처리되는 공정에서는 활성의 유지가 용이하지 않음을 알 수 있었다. 액체배양액을 건조방법별로 처리하여 시료의 mitogenic activity를 측정된 결과 동결건조방법에 의하여 제조된 시료의 활성과 열풍 건조된 시료의 활성이 비슷한 것으로 나타나 건조의 방법은 미강 발효액의 mitogenic activity에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

고체배양액의 macrophage phosphatase activity는 대부분의 시료에서 액체 배양액에 비하여 다소 낮은 수치를 나타내었으며 증자온도 및 시간에 따른 macrophage phosphatase activity를 측정된 결과 액체배양액과 비슷한 결과를 보여 95℃보다는 121℃에서 증자 추출된 시료에서 더 높은 활성을 보였으나 그 차이는 액체 배양액과 같이 현저하지는 않았다. 그러나 고체배양액에서도 95℃에서 증자된 시료의 경우 증자시간이 증가함에 따라 시료의 활성도 높은 것으로 나타나 증자가 진행될수록 그 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다. 건열처리의 온도 및 시간에 따른 macrophage phosphatase activity를 측정된 결과 온

도의 변화나 처리시간의 증가에 따른 차이는 크지 않았고 일정한 경향을 보이지 않았다. 고체배양액을 건조방법별로 처리하여 macrophage phosphatase activity를 측정된 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 거의 나타나지 않았다. 고체배양액의 가공처리조건별 mitogenic activity 변화는 온도가 높을수록 증자시간이 증가할수록 시료의 활성도 높은 것으로 나타나 증자가 진행될수록 그 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다.

고체배양액의 건열처리의 온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정된 결과 온도가 증가 할수록 시간이 증가할수록 활성은 감소하는 것으로 나타났으나 그 차이는 크지 않았다. 건조방법별로 처리하여 mitogenic activity를 측정된 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 거의 나타나지 않았다.

미강발효액을 이용하여 중간제품인 powder와 granule을 제조한 결과 식품 공전 상의 기준을 충족하였다. 미강발효액을 이용하여 제조된 타블렛은 타정효율을 높이기 위하여 배합비에 맥주효모를 같은 량 사용하였으며 폴리덱스트로스를 배합비에 첨가한 처리구는 명도가 밝아지고 적색도와 황색도가 다소 감소하여 기호도가 높았다. 미강발효액을 이용한 음료의 생산을 위하여 미강발효액에서 유효성분의 추출을 극대화하고 수율을 증가시킬 수 있고, 제조공정을 최소화 할 수 있는 미강액의 제조 조건을 설정하였다. 황정추출물을 1.0% 수준으로 첨가한 시료에서 이취에 대한 마스킹 효과가 가장 뛰어났으며 cyclodextrin 또는 maltodextrin의 첨가에 의한 이취에 대한 마스킹의 상승효과는 나타나지 않았다. 당의 함량은 고과당이 5.1%, 설탕이 8.1% 첨가되었을 때 가장 높은 기호도를 나타내었으며 이보다도 높거나 낮은 당함량을 가지는 시료의 기호도는 다소 낮게 나타났다. 적절한 신맛을 부여하기 위하여 첨가한 산미료의 수준은 비타민C의 함량과 구연산 나트륨의 함량은 조절하여 얻었다. 관능검사결과 비타민C의 함량이

0.34% 구연산 나트륨의 함량이 0.34% 였을 때 가장 높은 기호도를 보였다. 복숭아향을 첨가한 시료에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. 최적 배합비에 의하여 생산된 음료의 pH가 4.6로 음료의 저장성에 필요한 pH보다 다소 높았으므로 저장성을 향상시키고 다른 관능적 품질에 영향을 최소화하기 위하여 보존제로 안식향산을 0.05% 수준으로 첨가하였다. 최종 배합비에 의하여 제조된 미강발효음료의 저장 중 품질 변화를 조사하기 위하여 각각 4℃, 실온, 37℃의 온도에서 80일간 저장하면서 pH, 산도, 전체적 기호도 및 색도등의 변화를 관찰한 결과 저장기간 대부분의 항목에서 그 변화는 크지 않았다.

협 동 과 제 :미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화

미강배지를 이용한 각종 균주 발효액 및 발효조건을 달리한 미강발효액을 대상으로 Peyer's patch cell 자극을 통한 bone marrow cell의 증식 정도를 측정하는 장관면역 활성화와 mouse 복강 macrophage를 이용하여 시료의 phosphatase 자극활성을 측정하는 macrophage 활성화, 그리고 mouse의 비장세포의 증식도를 측정하는 lymphocyte mitogen 활성을 측정하였다. 균종 및 발효조건이 상이한 발효액의 수용획분을 추출하여 활성을 측정한 결과 장관 면역 활성화의 경우 *Asp. oryzae* 액체배양액(rb2)와 *Monascus pilosus*를 액체 또는 고체배양액(rb3와 C)에서 다소 높은 활성을 보였다. Macrophage 활성화에서도 위에 언급한 시료들은 LPS 이상의 높은 활성화 양상을 보였다.. Mitogen 활성의 경우는 6종(rb2, rb3, rb4, rbA, rbC, rbD 및 rbE)이 높은 활성을 보여 2차 검색의 시료로 하였다. 2차 검색에서는 상기 7개 시료만을 대상으로 면역활성을 재평가한 결과 미강 발효액으로부터 생리활성 소재의 생산을 위해선 *Monascus pilosus*를 이용한 액체 배양액 조제가 가장 적절한 방법으로 사료되었다. 미강, 부산물 첨가와 효소처리 에 따른 exo-biopolymer (활성다당)의 생성량을 비교하기 위하여 기본배

지에 미강의 농도를 각각 달리하여 5일간 배양한 결과, 미강 2% 첨가가 exo-biopolymer 생산에 가장 적합했다. 미강 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%에 농산 부산물인 당밀 (전당 50% 함유), 전분박 (탄수화물 7.7%, 단백질 0.05%), 순물 (탄수화물 1.4%, 단백질 0.3%), 효모 가수분해물, corn steep liquor (CSL)을 각각 고형분 함량으로 0.5% 첨가에 따른 효과를 측정한 결과, 당밀과 CSL 첨가시 14.2 mg/ml과 13.2 mg/ml의 생산량을 보였다. 당밀을 각각 0-2% 첨가시, 0.5%와 1.0% 첨가시 14.2 mg/ml과 14.3 mg/ml의 exo-biopolymer의 생산량을 보였다. 기본배지에 당밀 0.5% 첨가 후 질소원에 해당되는 peptone 첨가시, peptone과 CSL 혼합 첨가시를 각각 비교 하였다. CSL과 peptone을 혼합 사용시 보다 CSL 단독 사용시 exo-biopolymer 생산량이 13.2 mg/ml에서 15.3 mg/ml로 증가하였다. CSL 0.5% 첨가시 가장 높은 exo-biopolymer 생산량을 보였다. 미강발효액으로부터 얻은 조효소액에 의한 미강 가수분해시 exo-biopolymer의 생산량은 미미하였고 생리활성도 나타나지 않았다. 미강 발효과정중에 amylase 와 protease 를 각각 배양액의 0.5% 첨가시 macrophage 활성화나 splenocyte proliferation 활성이 amylase 첨가하여 배양한 경우 효소를 첨가하지 않은 경우에 비해 다소 높은 활성 증진을 보였으며, 특히 macrophage 활성화 증진 보다는 splenocyte proliferation 효과 더욱 뚜렷하게 나타났다. 미강 2%, 당밀 2.0%, CSL 0.5%, KH_2PO_4 0.1%의 기본배지에 amylase 0.5%를 첨가하여 배양시 배양시간에 따른 전당, 환원당, 전분, 5탄당 및 uronic acid의 변화량을 측정한 결과, 생리활성물질인 exo-biopolymer의 양은 5일 배양시 최대의 양을 보이고 있으며, 6일과 7일 배양시 다소 감소하거나 5일 배양시와 큰 차이를 보이지 않고 있다. 또한 전당, 환원당과 전분은 유사한 변화경향을 보였으며, uronic acid의 생산량의 변화는 미미하였다. 오탄당은 4일 배양시 가장 높은 함량을 보인 반면 환원당은 5일째 가장 높은 경향을 보였다.

협동과제 : 미강 발효액의 생리활성 성분의 규명

미강 발효액의 유효성분을 규명하고 기능성소재로써의 이용성을 검토하기 위하여, 발효공업에서 주로 사용되고 있는 버섯류, 곰팡이, 효모의 균주를 이용하여 약 50여종의 미강 발효액을 조제하고, 이들을 대상으로 4차에 걸쳐 macrophage활성, lymphocyte mitogen 활성 및 장관면역활성등 면역증강활성에 대해 검색하였다. 검색 결과 *Monascus pilosus*로 액체 발효하여 조제한 미강 발효액 rb-C가 가장 양호한 면역 증강 활성을 보였으며, 따라서 *Monascus pilosus*를 미강 발효액 생산 균주로 최종 선정하였다.

*Monascus pilosus*로 발효한 미강 발효액은 ethanol 침전 처리하여 고분자 획분을 회수하고 amylase 처리하여 잔존 전분을 제거한 후, 투석과 동결건조를 거쳐 고분자 획분인 FRB를 조제하였다. Macrophage 활성화의 경우는 murine peritoneal macrophage를 이용하여 lysosomal phosphatase activity를 측정하였으며, lymphocyte mitogen 활성의 경우 MTT assay로, 장관면역활성은 Peyer's patch cell을 경유한 골수세포 증식도로 면역 활성을 측정한 결과, FRB는 농도의존적으로 각 면역세포에 대해 높은 활성을 보였다. 또한 FRB 면역자극 활성을 확인하기 위해 면역세포의 활성화, 성장 및 분화를 촉진하는 mediator로써의 기능을 담당하고 있다고 알려져 있는 cytokine 생산능을 측정하였다. FRB로 lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 ELISA법으로 측정한 결과, IL-2, IL-6, IL-12, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생산량 증가를 유도하였으며, macrophage를 자극한 경우에는 IL-1, IL-6, IL-12 및 TNF- α 을 생산하는 결과를 보여 주었다. FRB 중 실제 면역활성을 책임지는 본체를 확인하기 위해 periodate, pronase 및 chlorite 처리를 행한 후 활성을 비교한 결과, 공히 periodate 산화 처리 시 활성의 현저한 감소가 이루어진 반면 타 처리에서는 활성의 변화가 거의 없었다. 이들 결과와 FRB가 갖는 열안정성 및 ethanol 침전성을 고려할 때 활성화의 본체는 당 부위에 기인하는 것으로 판단되었다.

활성이 양호했던 FRB는 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form)를 이용, 비흡착 1개 획분 (FRB-a)과 흡착 11개 획분(FRB-b~FRB-i) 분획하였으며 이중 0.1 M과 0.2 M에서 용출된 FRB-c 및 FRB-d가 상대적으로 높은 mitogen 활성, macrophage 활성 및 장관 면역활성을 보였다. 이들 획분을 대상으로 Bio-gel P-30 및 Bio-gel A-0.5m 등을 이용하여 겔 여과를 행한 결과, FRB-c-IIb 및 FRB-d-I, FRB-d-II가 활성과 수율 면에서 가장 양호하였다. 이들 정제다당으로 lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 측정 한 결과, IL-2, IL-6, IL-12, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생산량 증가를 유도하였으며, macrophage를 자극한 경우에는 IL-1, IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생산 증가가 관찰되었다. 이들 고효능 획분에 대한 화학 조성을 분석한 결과 FRB-c-Ib는 중성당 함량이 약 92.4%, 산성당 함량이 약 7.6%이고 단백질은 검출되지 않았다. 또한 FRB-d-I, -II, -III는 중성당 (50.1 - 82.2%) 및 산성당 (16.0 - 44.9%)이 다양한 비율로 함유되어 있었다. 이들 다당의 구성당을 살펴본 결과, arabinose, galactose, xylose 및 산성당이 주요 구성당이었으며, 그외 rhamnose, fucose, mannose 및 glucose가 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다. 한편 FRB-c-Ia 및 FRB-d-II 획분은 HPLC상에서 단일 peak로 나타났으며 분자량은 각각 298 kDa, 44 kDa이었다.

정제 다당 중 정제도, 활성 및 수율 면에서 양호 하였던 FRB-c-Ib와 FRB-d-II는 서로 상이한 분자량을 가진 획분임에도 불구하고 비슷한 화학 조성으로 구성되어 있는 사실은 이들의 구조적 유사성을 반증하였다. 한편 이들의 구조해석을 위해 methylation을 행한 결과, arabinose 잔기 중에는 terminal과 4 or 5-linked 결합이 전체의 30%이상을 차지하였으며, 그외 4 or 5-linked Xyl, terminal-Gal, 6-linked Gal, 4-linked Gal 및 4,6-branched Gal이 높은 비율로 함유된 특성을 나타냈다.

산업화가 가능한 것으로 판단된 FRB의 in vivo 면역 증강 활성을 측정

하기 위해 FRB를 정맥 및 복강 투여하고 임파구 증식활성, macrophage활성을 비교한 결과, in vivo에서도 대조군보다 양호한 면역활성을 나타냈다. 이상의 결과로부터 미강발효액에 존재하는 활성 성분들은 in vitro 및 in vivo에서 각종 면역 활성이 우수한 것으로 판명되었으며 따라서 이들 활성 물질이 in vivo에서도 항종양 활성을 보일 가능성이 제시되었다. Colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용한 in vivo 항전이 실험에서 FRB획분은 10 mg/kg을 정맥 투여 시 최대 85%의 강력한 전이 저해율을 나타냈다.

이상의 결과로부터 *Monascus pilosus*에 의해 조제된 미강발효액은 전신 면역계에 효과적으로 작용할 수 있음을 확인하였다.

SUMMARY

I. Title

Functionality of fermented rice bran and its utilization

II. Objectives and Significance

The objectives of this project was to select of proper strains for mass production of fermented rice bran containing physiological activity and optimization of its culture condition, to characterize physiologically active components in fermented rice bran products, to develop of processed products from fermented rice bran products containing physiological activity

III. Scope and content

Part I : Development of processed products from fermented rice bran products

- Physicochemical properties and processibility of fermented rice bran products
- Changes of functional activity during food processing procedures
- Development of characteristic processed products with fermented rice bran products

Part II : Selection of strains for production of fermented rice bran and its optimization

- Screening and selection of strains for production of fermented rice

bran having functional properties

- Optimization of producing fermented rice bran having functional properties
- Scale up production of fermented rice bran having functional properties

Part III : Characterization of physiologically active components in fermented rice bran products

- Screening of physiologically active components from fermented rice bran products
- Separation and purification of physiologically active components from fermented rice bran products
- Identification and characterization of physiologically active components from fermented rice bran products
- Toxicity and activities *In vivo*

IV. Results and Recommendation

Part I: Development of processed products from fermented rice bran products

Liquid and solid culture of rice bran with *Monascus pilosus* were produced and their physicochemical properties were investigated. Proximate composition of liquid fermented rice bran products were 93.97% for moisture, 0.3% for crude lipid, 0.73% for crude protein, 0.74% for crude ash. Proximate composition of solid fermented rice bran products were 68.1% for moisture, 6.7% for crude lipid, 4.8% for crude protein, 3.7% for crude ash. Total dietary fiber contents were 4.26%, for

liquid fermented rice bran products and 16.6% for solid fermented rice bran products. Mineral and amino acid composition of liquid fermented rice bran products was also analysed. There were no heavy metal like Cd, Pb, As and P was the highest following K, Mg, Na in content. Major amino acids were aspartic acid, glutamic acid, serine and alanine. Changes of macrophage phosphatase activity and mitogenic activity during food processing procedures of Liquid and solid culture of rice bran with *Monascus pilosus* were investigated. Remained macrophage phosphatase activity after steaming of liquid culture were increased with treated time and temperature. Remained macrophage phosphatase activity after dry heat treatment of liquid culture were higher with higher temperature and time. Drying method did not effect the macrophage phosphatase activity after treatments. Results from remaining mitogenic activity after steaming of liquid culture showed that 45min at 95°C was the upper limit of steaming condition but samples from 121°C treatment retained its initial activity. Mitogenic activity after dry heat treatment of liquid culture were higher with higher temperature up to 4 hrs. Drying method did not effect the mitogenic activity after treatments. Solid solid culture of rice bran with *Monascus pilosus* had similar trend as liquid culture but lower activities for all samples.

Powder and granule type intermediate products from fermented rice bran products were produced and meet the standard from Food Addendum. Tablet type products were made with beer yeast to improve tablet forming property and polydextrose to improve color. Beverages from fermented rice bran products were produced by procedures to

maximize yield and extractability of active compounds and minimize processing steps. Hot water extract of 황정추출물 at 1.0% level was most effective to mask off flavor but addition of cyclodextrin or maltodextrin had no additional effect on removing off flavor. Samples with 5.1% high fructose syrup and 8.1% sucrose as a sweetener were more preferred. 0.34% Ascorbic acid and 0.34% sodium citrate were chosen as a proper level of acidulant level. Peach flavor was preferred by panels most. To improve storage stability, 0.05% benzoic acid were added to final formulation. Beverages produced with final formulation were stores at 4°C, room temperature for 80 days and determined quality changes in pH, acidity, overall desirability and color. Most values were retained after storage. and acceptable.

PART II: Selection of strains for production of fermented rice bran and its optimization

About 50 rice bran products which were fermented by mushrooms, fungi and yeasts, were examined for their immuno-stimulating activities such as macrophage stimulating activity, lymphocyte mitogenic activity, intestinal immune system modulating activity. Among them, *Asp. oryzae* liquid culture(rb2) and fermented rice bran product by *Monascus pilosus*(rb-C as liquid and rb-3 as solid culture), showed the higher immuno-stimulating activity and rb-C was selected as the most potent candidate containing active components by showing higher values in macrophage stimulating activity, lymphocyte mitogenic activity, intestinal immune system modulating activity.

To determine production of exo-biopolymer(active polysaccharide) by

enzyme treatment and by-product, different level of rice bran was added to basal media. After 5 days of cultivation, addition of 2% rice bran was best in production of exo-biopolymer. Agricultural by-products including molasses, soybean whey, yeast hydrolyzate, corn steep liquor (CSL) were added at 0.5% level to basal media including rice bran 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%. to determine exo-biopolymer production . Addition of molasses and CSL showed 14.2 mg/ml and 13.2 mg/ml production. Molasses with 0-2% addition, 0.5% and 1.0% addition showed 14.2 mg/ml and 14.3 mg/ml of exo-biopolymer production. Addition of peptone alone and peptone and 0.5% CSL to basal media was compared and media with CSL alone increased exo-biopolymer production from 13.2 mg/ml to 15.3 mg/ml.. Crude enzyme from rice bran culture with *Monascus pilosus* produces little exo-biopolymer after hydrolysis. Amylase and protease were added to media at 0.5% level during incubation. Addition of amylase increased macrophage activity and splenocyte proliferation compared to culture without amylase. Media consisted of rice bran 2%, molasses 2.0%, CSL 0.5%, KH_2PO_4 0.1% and amylase 0.5% were fermented with *Monascus pilosus*. Changes in content of exo- biopolymer, total sugar, reducing sugar, starch, pentoses and uronic acid were determined and 5 days of incubation showed maximum production of exo-biopolymer and further incubation showed similar productions or decrease. Total sugar and reducing sugar had similar trend with production of exo-biopolymer. There was no significant changes in content of uronic acid. Pentoses were produced most after 4days of incubation.

PART III: Characterization of physiologically active components in
fermented rice bran products

Mushrooms, fungi and yeasts, were used to produce fermented rice bran products containing immuno-stimulating activities such as macrophage stimulating activity, lymphocyte mitogenic activity, intestinal immune system modulating activity. Among them, rb-C, the fermented rice bran product by *Monascus pilosus* showed the highest immuno-stimulating activity and was selected as the most potent candidate containing active components.

The high molecular weight fraction, FRB was prepared by ethanol precipitation, amylase treatment, dialysis and lyophilization from the culture broth (rb-C) by *Monascus pilosus*. FRB from the fermented rice bran products showed potent stimulating activity in a dose dependent fashion toward the immune-related cells such as macrophages, lymphocytes and Peyer's patch cells. FRB fraction potently induced the production of hematopoietic growth factor (GM-CSF) and cytokines such as IL-2, IL-6, IL-12 and IFN- γ in lymphocytes. It also showed strongly augmented cytokine production (IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- α) in macrophages. The chemical properties of FRB such as heat-stability, periodate-lability, pronase-resistance and precipitation by ethanol, indicated that the activities of FRB were due to polysaccharide moiety.

The active fraction FRB which showed the highest activity, was further fractioned by anion-exchange chromatography on DEAE-sepharose FF (Cl⁻ form), and an unabsorbed fraction (FRB-a) and eleven absorbed fractions (FRB-b~FRB-i) were obtained. Of these fractions. FRB-c and FRB-d showed the most potent immuno-

stimulating activity and were purified, respectively by gel filtration on Bio-gel P-30 and/or Bio-gel A-0.5m. Among the subfractions obtained by gel filtration, three major purified polysaccharides, FRB-c-IIb, FRB-d-I, and FRB-d-II showed high immuno-stimulating activity and yield. They also enhanced the production of various cytokines in macrophages and lymphocytes. Each FRB-c-Ib and FRB-d-II were eluted as single HPLC peaks and their molecular weights were estimated to be 298 and 44 kDa, respectively. Component sugar analysis indicated that FRB-c-Ia, FRB-d-I and FRB-d-II mainly consisted of arabinose, xylose, galactose and uronic acid in addition to the small amounts of rhamnose, fucose, mannose and glucose. Methylation analysis indicated that the purified polysaccharides FRB-c-Ib and FRB-d-II contained mainly of terminal-Ara, 4-/5-linked Ara and 4-/5-Xyl linkages in addition to terminal-, 6-linked, 4-linked and 4,6-branched galactopyranosyl residues. The immuno-stimulating activities of FRB were examined *in vivo*. The immuno-stimulating activities were increased significantly in comparison with the control group by intravenous and intraperitoneal injection of FRB. Intravenous administration of FRB (10 mg/kg) inhibited tumor metastasis produced by colon 29-M3.1 lung carcinoma cells more than 85% as compared with the control group. Based upon these results, the rice bran products fermented by *Monascus pilosus* might effectively contribute to the systemic immune system to protect human bodies from several diseases and cancers.

Contents

Summary	
Chapter 1. Summary of study	
I. Significance	
II. Objectives and Scope	
Chapter II. State of the art	
Chapter III. Contents and Results	
I. Development of processed products from fermented rice bran products	
1. Introduction	
2. Materials and methods	
3. Results and discussions	
II. Selection of strains for production of fermented rice bran and its optimization	
1. Introduction	
2. Materials and methods	
3. Results and discussions	
III. Characterization of physiologically active components in fermented rice bran products	
1. Introduction	
2. Materials and methods	
3. Results and discussions	
Chapter IV. Future plans	
Chapter V. References	

목차

요약문	
Summary	
제 1 장 연구개발과제의 개요	
제 1 절 연구개발의 필요성	
1. 기술적 측면	
2. 경제·산업적 측면	
3. 사회·문화적 측면	
제 2 절 연구개발 목표와 범위	
1. 연구개발 목표	
2. 연구 범위	
가. 세부과제 : 미강 발효액을 소재로 한 가공식품 개발	
나. 협동과제: 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화	
다. 협동과제: 미강 발효액의 생리활성 성분 규명	
3. 연차별 연구개발목표와 내용	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	
제 1 절 미강 발효액을 소재로 한 가공제품의 개발	
1. 서 설	
2. 재료 및 방법	
가. 시료	
나. 미강발효액의 이화학적 특성	

다. 미강 발효액의 가공처리조건에서의 생리활성 잔존성 분석	
1) 시료제조	
가) 증자처리	
나) 건열처리	
다) 건조방법	
2) 생리활성 측정	
가) Macrophage 활성화	
나) Mitogenic activity	
다) 장관면역 활성화 측정	
라) ACE 저해활성 측정	
라. 미강발효액의 중간소재화	
1) 미강발효액 powder제조	
2) 미강발효액 granule 제조	
마. 미강발효액을 이용한 가공식품제조 특성화	
1) 미강 발효액 이용한 타블렛 제조	
2) 미강 발효액 음료 제조	
가) 제조배합비 결정	
나) 미강발효음료의 특성 검사	
3) 미강발효 음료의 저장성 시험	
가) 시료제조 및 저장시험	
나) 저장 중의 이화학적 특성 변화	
3. 결과 및 고찰	
가. 미강발효액의 이화학적 특성	
1) 일반성분 분석	
2) 식이섬유 및 유리당 함량 분석	
3) 무기질 조성 분석	

4) 아미노산 성분 분석
나. 가공처리조건에 따른 생리활성 잔존성 분석
1) 액체발효액의 생리활성 잔존성
2) 고체배양액
라. 미강발효액의 중간소재화
1) 미강발효액 powder 및 granule 제조
마. 미강발효액첨가에 의한 가공식품제조 특성화	
1) 미강 발효액 이용한 타블렛 제조
2) 미강 발효액 음료 제조
가) 제조공정
나) 이취 제거제 처리효과
(1) 생약 추출물의 처리
(2) cyclodextrin 및 maltodextrin 첨가 효과
다) 감미료의 첨가비율
라) 산미료의 첨가비율
마) 향의 종류 및 첨가비율
바) 최종배합비
사) 저장중의 품질 변화
제 2 절 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화
1. 서 설
2. 재료 및 방법
가. 사용균주 및 배지
나. 배양조건 최적화
다. 미강 농도에 의한 영향
라. 부산물 첨가효과
마. 당밀과 CSL 첨가 농도에 따른 효과

3) 시약
4) Resin
나. 실험방법
1) 면역활성 미강 발효액 제조를 위한 발효 균주의 screening
2) 일반 분석 방법
3) 구성당 분석
4) 면역 증강 활성 측정
가) Mitogen 활성 측정
나) Macrophage 활성화능 측정
다) 장관면역 활성측정
(1) 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응
(2) 회수한 Peyer's patch 세포 배양액과 골수세포와의 반응
(3) 장관면역 활성도 측정
라) 미강 발효액의 ACE 저해활성 측정
마) 면역세포에 의해 생산된 cytokine 측정
5) 면역 활성화 물질의 본체 규명
6) 미강 발효액의 활성성분 농축을 위한 효소 처리
7) 미강 발효액 중 면역 활성화 다당의 정제
가) Anion exchange chromatography(AEC)
나) Gel permeation chromatography
다) HPLC에 의한 분자량 측정 및 순도 확인
8) 미강발효액 중 면역 활성화다당의 구조 특성 실험
9) 활성화다당의 in vivo 활성
10) 미강발효액 면역활성 획분 FRB의 독성실험
2. 결과 및 고찰
가. 면역활성이 우수한 미강발효액 선별

1) 미강발효액에 대한 면역활성 1차 screening	
2) 미강발효액에 대한 면역활성 2차 screening	
3) 미강발효액에 대한 면역활성 3차 screening	
4) 미강발효액에 대한 면역활성 4차 screening	
나. 미강발효액에 대한 ACE 저해 활성 측정	
다. 미강발효액 중 면역활성물질의 예비 정제조건 설정	
1) 예비정제조건 설정을 위한 enzyme 처리	
2) 예비정제조건 설정을 위한 HPLC 분석	
라. 미강발효액 중 면역활성 고분자 획분 FRB의 화학적 조성	
마. FRB획분의 면역활성 본체검토의 검토	
바. FRB획분이 면역세포의 cytokine 생산에 미치는 영향	
1) 활성획분 FRB의 자극에 의한 splenocyte의 cytokine 생산	
2) 활성획분 FRB의 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산	
사. FRB 획분으로부터 면역활성 다당의 분리 및 정제	
1) Anion exchange chromatography (AEC)	
2) Gel permeation chromatography (GPC)	
3) 정제획분의 면역활성 측정	
4) 정제 다당의 순도 및 분자량 확인	
아. 미강발효액에서 정제한 면역활성 다당의 구조 특성	
1) 정제다당의 일반 구조 특성	
2) 활성 다당의 결합양식	
자. 미강 발효액 유래 FRB획분의 in vivo 면역 증강 활성	
1) 활성획분의 in vivo 투여에 의한 대식세포 활성화	
2) 활성획분의 in vivo 투여에 의한 비장 림프구 증식활성	
3) 미강 발효액 유래 활성획분의 시판 활성다당의 항전이 활성 비 교	

차. 미강 발효액 유래 면역활성 다당체 FRB의 독성실험

1) FRB의 경구투여 급성독성 실험

2) FRB의 꼬리정맥투여 급성독성 실험

3) FRB의 마우스 꼬리정맥 주사시 장기무게변화

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

제 5 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 미강의 생산량은 연간 385,000톤에 달하며 지방, 비타민 B군 및 양질의 단백질과 섬유질을 풍부하게 함유하고 있으나 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지 70%는 사료나 비료 등의 저가치 물질로 이용되거나 농산 폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있음
- 미강은 지방 함량이 높아 변패되기 쉬운 문제점을 가지고 있어 국내의 경우 주로 미강의 산패와 관련된 연구와 미강유 토크페롤 또는 불포화 지방산에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 미강의 화학적인 성분 및 약리작용에 대한 일부 보고가 있음. 면역기능과 detoxication에 대한 연구결과는 거의 없는 실정으로 이들 유효성분의 연구와 소재화는 중요한 의의가 있음
- 최근 미강은 건강식품으로서의 인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구가 진행되고 있어 일본의 경우 피부 보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있음
- 또한 미강 발효액은 풍부한 양의 아미노산뿐만 아니라 효모에 의한 발

효과정에서 생성된 알코올 등을 다량으로 함유하고 있어 masking제 및 조미료의 베이스로 이용 가능성이 예상된다.

- 미강 발효액을 이용한 손상된 생체 내 여러 생리활성 기능을 회복하고 숙주의 방어기능을 조절할 수 있는 생체조절 물질의 생산은 현재까지 연구 개발되어 온 식품신소재들 중에서 향후 고령화 사회의 건강유지 및 공해문제와 관련하여 제 2세대의 식품신소재로 분류됨
- 생체조절 물질을 소재화함에 있어 오랫동안 식품소재로 이용되어 온 미강을 미생물에 의해 발효화 하는 것은 최종물질의 안전성 확보가 용이하므로 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률이 높음
- 미강 발효액은 앞서 언급한 필수 아미노산 뿐 만 아니라 다양한 종류의 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 새로운 형태의 건강 및 기능성 식품 등 다양한 산업적 용도로의 개발이 가능할 것으로 생각됨
- 최근 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절 기능 효과를 나타낸다는 사실들이 과학적으로 밝혀지고 있음
- 그러나 미강으로부터 이러한 생리활성 성분들을 생산할 수 있는 미생물의 선정과 생산 최적화에 따른 발효기술 및 생체조절 활성성분에 대한 정확한 활성연구 및 screening 기술, 물질의 분리 및 정제기술은 미생물을 미강에 발효시켜 검토한 연구는 거의 없는 실정임
- 특히 미강 발효액 생리활성 물질의 구조와 기능의 상호관계를 밝히는

것은 천연물로부터의 신약개발을 가능하게 할 수 있으나 기능성 물질의 본체규명과 구조결정기술, *in vivo* test, 독성실험, 활성성분의 작용기작 및 생체에서의 정확한 기능의 파악이 어려워 이들을 이용한 기능성식품의 개발 또는 의약품 제재로서의 응용에 큰 진전을 보지 못하고 있음

- o 활성화된 macrophage는 항미생물 작용, 항암작용 그리고 tissue damage의 effector function을 가지게 되며 서로 다른 이물질 인식 receptor에 의하여 식품이나 천연물에 의하여 또는 이들의 complement나 다른 lymphocyte의 활성을 통한 2차적 작용에 의하여 활성화될 수 있음

- o 장관의 점막부위에 존재하는 장관관련림프상조직 (GALT: gut-associated lymphoid tissue)은 장관면역계내 IgA response를 비롯하여 생체방어에 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며 특히 Peyer's patch는 장관내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 유도부위로 알려져 있음

- o 사람이 먹는 물질들은 림프조직에 전달된 후 림프구들과 상호작용하기 때문에 어떤 면역활성을 증가시키는 물질의 존재는 Peyer's patch 세포의 기능에 역할을 주게 됨

- o 생약에서의 Peyer's patch 세포중 T-cell 활성화에 의한 골수 세포증식 인자의 생산 촉진에 대한 보고가 있으나 식품으로부터의 연구가 부족함

- o Renin-angiotensin system에 의한 일차성(본태성) 고혈압은 Angiotensin converting enzyme (Kininase II, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.1.5 이하 ACE로 칭함)에 의하여 불활성인 angiotensin I의 COOH 말단 dipeptide (His-Leu)를 절단해서 강력한 혈관수축을 일으키는 angiotensin II로 전환하는 것에 의하여 발생함
- o ACE 저해물질로는 뱀 (*Bothrops jararaca*, *Agkistrodon blysi*, *Bothrops mhoffii*)의 독에서 추출하거나 합성에 의한 ACE 저해제 (Capropril, Enalapril 등)를 사용하고 있으나 사람에 대한 투여량, 합성제에 의한 문제가 되고 있어 이러한 문제점을 해결하고자 이미 안전성이 확보된 식품으로부터 ACE 저해활성을 가진 물질의 검색이 요구되고 있음

2. 경제·산업적 측면

- o WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방 하에서 국내 농산물 특히 주식인 쌀의 부산물로부터 고부가가치성 물질의 창출은 농산물 가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상됨
- o 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용 농산자원을 대상으로 한 신물질을 탐색하고 개발하여 경쟁력 있는 의약품, 식품용, 화장품용 신소재의 창출임
- o 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해 산업종으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것이며 특히 제조공정 상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하

고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 발전시킬 수 있음

- 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질이므로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하여 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있음
- 최근 국내 제약과 식품업체들이 의약품의 판매량 감소와 식품산업의 물류비 증가로 수익악화에 처해있는 실정임. 그러나 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 될 경우 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내 생물산업 육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것임

3. 사회·문화적 측면

- 식품에 도입되고 있는 생체조절성 3차기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있음
- 현재 우리 나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 아직 낮은 수준에 있지만 평균수명은 73세에 이르렀으며 2,000년 이미 고령화인구 비율이 전 인구의 6.8%로 317만 명에 이르렀으며 사망원인 또한 감염형 질환의 비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 순환기계 질환과 암에 의한

사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있음

- 국민들의 고령화 사회 인식, 건강하게 장수하고자 하는 욕구증대, 고령화병에 대한 불안감 및 일상생활을 통한 높은 예방에 대한 관심은 일본의 특정보건용 식품제도의 도입을 초래하였으며 식품소재를 통하여 고령화로 인한 질병을 예방함으로써 정부의료비 부담을 경감시키고 활동력을 갖는 고령화 노동인력을 확보하는 효과가 있음
- 성인병 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 소재화는 Micro적으로는 국민 개개인의 건강장수 욕구를, Macro적으로는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안임

본 연구는 미강을 미생물로 발효시켜 얻은 생리활성 함유 발효액의 생산 최적화 및 발효액으로부터 약리 · 생리활성 성분을 탐색하고 이 성분들을 의약 및 기능성식품용 중간원료로 소재화 하며 생체조절 기능성성분들이 크게 기여하는 새로운 차원의 질병예방제품을 개발 하는데 최종목표를 두고 있다. 최종목표를 달성하기 위해 분야에 따라 제 1, 2, 3 세부과제(1 세부과제 및 2 협동과제)로 구성하였으며 주요 연구 개발 목표와 내용을 세부과제별로 요약하면 다음과 같다.

제 2 절 연구개발 목표와 범위

1. 연구개발 목표

- 미강을 이용하여 생체조절 물질의 생산에 적합한 미생물을 선정 한 후, 미강발효액 생산에 있어서의 최적조건과 공정 확립
- 미생물에 의해 생산된 미강 발효액으로부터 우수한 macrophage 및 장관면역의 활성화 등 면역계의 활성화와 고혈압의 예방과 관련된 ACE 저해 활성을 촉진하는 성분을 탐색하고 이 성분을 의약 또는 기능성식품의 중간원료로 소재화
- 미생물 미강 발효액을 소재로 한 안전성이 확립된 일상섭취 가능한 생체조절용 질병예방 가공식품을 개발

2. 연구 범위

가. 세부과제 : 미강 발효액을 소재로 한 가공식품 개발

- 미강 발효액의 이화학적 특성 및 가공적성 검토
- 미강 발효액의 식품가공공정 중의 생리 활성 잔존성 분석
- 미강 발효액 첨가에 의한 가공식품 제조 특성화

나. 협동과제: 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화

- 생리활성 물질 함유 미강 발효물 생산 균주 선별
- 생리활성 물질 함유 미강 발효물 생산 최적화

- 생리활성 물질 함유 미강 발효물의 산업적 적용을 위한 생산 최적화
- 미강 발효액 생산 균주에서 생산된 crude 효소를 이용한 활성물질 생산검토

다. 협동과제: 미강 발효액의 생리활성 성분 규명

- 미강 발효액으로부터 생리활성 성분의 검색
- 미강 발효액의 생리활성 성분의 분리 및 정제
- 미강 발효액의 생리활성 성분 물질 규명과 구조와 작용양식 해명
- *In vivo*에서의 생리활성 및 독성실험
- 분리 정제물의 시판 arabinoxylan과의 생리활성 비교

3. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	세부과제: 미강발효액의 이화학적 특성, 가공적성 검토 및 생리활성 잔존성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 미강발효액의 이화학적 특성 검토 - 식품가공시 이용되는 공정에 대한 개발 물질의 가공적성 검토 - 가공공정에 따른 미강 발효액의 생리활성 잔존 여부 확인 - 생리활성 물질의 정제를 위한 특성 검토 및 추출물의 전처리 중 생리활성 조사
	협동과제: 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 생리활성 성분 함유 미강 발효액 생산 대상 균주 선정 - 생리활성 성분 함유 발효액 분리 - 생리활성이 높은 성분을 함유하고 있는 발효액을 생산하는 균주를 선별 - 합성배지를 중심으로 배지성분 및 배양조건 확립(탄소원, 질소원, 무기질, 통기량, pH, 온도등)
	협동과제: 미강 발효액으로부터 생리활성 성분의 검색	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 생산조건에서 생산된 미강 발효액을 대상으로 <ul style="list-style-type: none"> : macrophage 활성화 : 장관면역 활성화 : ACE 저해활성 등 검색 - 선정된 균주로부터 최대 활성을 나타내는 미강 발효액 조건 선정 - 활성본체의 예비동정 - 활성물질의 예비정제

2차년도 (2002)	<p>세부과제 : 미강 발효액 첨가에 의한 가공 식품제조 특성화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 분리한 물질의 식품 소재화를 위한 분리조건과 신속정제 방법 확립 - 상기의 조성물과 부분 정제물질을 식품용 중간소재화 - 중간원료로 소재화한 각 형태의 소재를 실제 가공 및 품질 적성을 검토하여 제품화 - 식품으로서의 기호에 적합한 관능적 품질개선
	<p>협동과제:미강발효액의 산업적 적용을 위한 생산 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 부산물(커피박, 커피박 추출물, 당밀, 순물, 비지, whey)을 활용한 배지성분 및 배양조건 검토 - 통기량, pH, 온도 등 배양조건 최적화 - 부산물을 이용한 생산공정 확립 및 대량생산 - 미강발효시 생산된 crude 효소를 이용한 활성물질 생산
	<p>협동과제: 미강 발효액의 분리 정제 및 생리활성 성분 물질 규명 및 작용양식의 해명</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 정제방법을 통한 활성물질의 분리정제 및 순도 검정 - 생리활성 성분 물질 규명 - 활성물질의 작용양식 규명과 구조와의 상관성을 해명 - in vivo에서의 생리활성 실험 및 급성독성 검사 - 정제물의 시판물질과의 생리활성 비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

미강은 현미의 도정중 생산되는 부산물로 연간 385,000 톤에 달하는 생산량을 보이나 우수한 영양적 가치에 비해 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지 70%는 사료나 비료 등의 저가치 물질로 이용되거나 농산 폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

미강에는 단백질이 12-16%, 식이 섬유가 20-25%, 지방이 16-22% 함유되어 있으며 지방을 구성하는 지방산의 70% 이상이 불포화지방산으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있으며 비타민 류, 식이 섬유, 오리자놀, 불포화지방산 등 유효성분들이 콜레스테롤 상승 억제 효과를 비롯한 여러 가지 생리적 활성을 나타내는 것이 보고되고 있다. 한편 미강에서 분리한 가용성 단백질의 가수분해물은 혈압상승 관련 효소인 angiotensine converting enzyme의 활성을 저해하여 혈압상승을 억제하는 것으로 알려져 있으며 이는 쥐를 이용한 동물실험에서도 입증 된 바 있다. 미강의 화학적인 성분 및 주요 면역활성 다당성분으로 알려진 arabinoxylan의 약리작용에 대한 일부 보고가 있으나, 면역기능과 그의 산업적 활용에 대한 연구결과는 거의 없는 실정으로 이들 유효성분의 연구와 소재화는 중요한 의의가 있다고 사료된다.

최근 미강은 건강식품으로서의 인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구가 진행되고 있으나 대부분의 생리 활성에 관한 연구가 미강이 가지고 있는 화학적 조성 성분인 1차 물질에만 집중되어 있으며 미생물을 이용한 발효와 같이 2차 대사물 생산에 의한 생리 활성 물질의 대량 생산에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

미강을 미생물 발효에 사용한 예는 많지 않으나 버섯의 탄소원으로 미

강을 사용하여 배지로의 이용성을 검토한 연구결과가 보고되어 있으며 미강을 이용하여 에탄올, 초산발효를 동일계 내에서 시행하는 식초제조법이 보고되었으나 산업화는 되지 못하였다. 일본의 경우 피부 보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있다. 국내에서는 곡류를 압출공정처리한 후 효소를 첨가하여 페루릭산(ferulic acid), 폴리페놀(polyphenols)와 아라비노키실란(arabinoxylan) 등의 유용한 생리활성물질을 제조하는 연구가 진행되기도 하였다. 또한 미강을 효소처리한 후 효모로 발효시켜 얻은 미강발효액기스의 제조방법 연구와 이를 주방제제, 천연 입욕제와 조미료로 활용하고자 하는 연구가 진행되었다.

예로부터 인간들이 이용해 왔던 천연물 중에는 생체에 대하여 다양한 생리기능을 수행하는 물질이 함유되어 있다고 알려져 왔으며 실제로 이를 응용하여 건강유지를 위해 사용해 왔던 많은 예들이 있다. 이러한 생리활성 물질들을 생체반응조절제(biological response modifiers, BRM)라 하는데 이는 생체내 생물반응을 조절하여 항상성을 유지시켜 주는 기능을 한다고 보고되고 있다. 현재까지도 전 인류의 75%가 건강유지 및 질병방지의 목적으로 천연물을 이용하고 있다고 보고되어 있는데, 이는 최근 현대의약으로 치료가 어려운 성인병군 및 암과 같은 만성 난치성질환의 급증과 합성의약품에 의한 심각한 부작용 및 현대의약에 대한 저항성 증가 때문에 새로운 의약 소재에 대한 관심 대상이 전환되었기 때문이라고 할 수 있다. 따라서 천연물, 특히 식품이나 전통 생약재로부터 새로운 약리활성 물질을 선별하여 대체 의약품 또는 기능성 식품으로 이용하고자 하는 연구가 계속되고 있다. 특히 오랫동안 식용이나 약용으로 이용되어온 담자균류, 한약재, 향신료 및 여러 식품소재에서 유래한 항암 활성(anti-tumor activity), 항염증 활성(anti-inflammatory), 대식세포 활성화능(macrophage activation), 인터페론 유도활성(interferon inducing activity) 및 보체계 활

성화능(anti-complementary activity) 등의 다양한 면역 증강물질이 존재한다고 보고되고 있다. 이들 중 비교적 상세한 연구가 진행된 부분에는 상황버섯(*Phelinus linteus*), 저령(*Grifora umbellata*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 송이버섯(*Tricholima matsutake*), 당귀(*Angelica acutiloba*), 구름버섯(*Doriols versicolor*) 및 양송이(*Agaricus bisporus*) 등 버섯유래의 다당체 들이며, 이들은 대부분 오랫동안 식용 내지는 약용으로 사용되었던 소재로써 인체에 대한 안정성이 확보된 물질들이라 하겠다.

장관면역 활성화 물질에 관한 연구는 한약재로부터 추출한 면역활성성분에 의해 Peyer's patch의 T cell을 활성화시켜 IL-6 및 GM-CSF 같은 조혈계 세포의 성숙 및 분화에 필요한cytokine을 생산함으로써 골수세포를 증식시킨다는 연구나 십전대보탕 내 장출 성분에 의한 장관면역 자극을 통한 골수세포 증식 활성화, 굴의 껍질부에 존재하는 pectic polysaccharide와 flavone glycoside에 같은 활성이 있음이 보고되고 있으며, 솔잎의 methanol 추출물에서도 높은 장관면역 활성을 통한 골수세포 증식활성능이 보고되는 등 장관면역활성을 통한 전신 면역계 활성화에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 미강 발효액에 대해서도 면역기능 조절물질의 연구가 요구되나 국내 면역조절기능 성분의 연구는 아직 체계적으로 이루어져 있지 않다.

미강의 미생물 발효액에는 이 외에도 생체에서의 기능이 다양한 성분들이 존재할 것으로 기대된다. 그러나 미강으로부터 이러한 생리활성 성분들을 생산할 수 있는 미생물의 선정과 생산 최적화에 따른 발효기술 및 생체조절 활성성분에 대한 정확한 활성연구 및 screening 기술, 물질의 분리 및 정제기술은 미생물을 미강에 발효시켜 검토한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 미강 발효물 생리활성 물질의 구조와 기능의 상호관계를 밝히는 것은 천연물로부터의 신약개발을 가능하게 할 수 있으나 기능성 물질의 본체규명과 구조결정기술, *in vivo* test, 독성실험, 활성성분의 작용기작 및 생체

에서의 정확한 기능의 파악이 어려워 이들을 이용한 기능성식품의 개발 또는 의약품 제재로서의 응용에 큰 진전을 보지 못하고 있다.

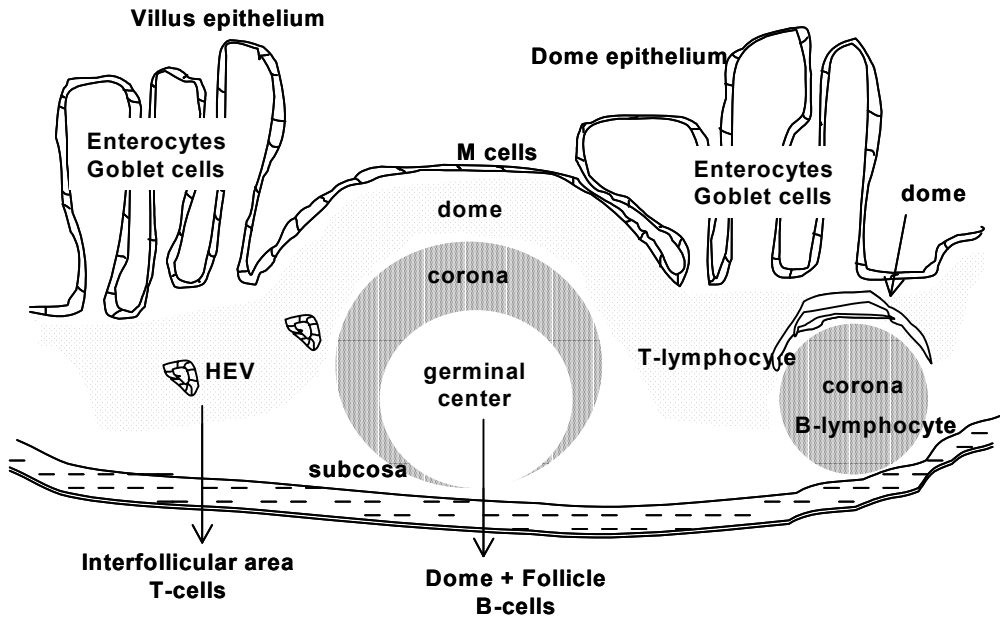


Fig. 2-1 An ileal Peyer's patch in the gut associated lymphoid tissue (GALT)

따라서 본 연구에서는 그간 식품에 응용되어 왔던 미생물을 이용, 미강 발효액을 조제하여 미강 중 면역활성물질 및 소재를 분리하고자 하였으며, 그들을 대상으로 macrophage의 활성화, lymphocyte의 증식 및 장관 면역 활성화 등의 in vitro 및 in vivo test를 실시하였다. 그리고 이들을 기능성식품 중간소재로 이용하기 위한 기초조사를 행하였다.

미강 발효액을 이용한 새로운 형태의 건강 및 기능성 식품으로의 용도 개발이 이루어지기 위하여는 미강 발효액의 이화학적 특성, 가공 시의 생

리활성 잔존성, 식품으로서의 기호적 관능품질 등에 대한 연구가 이루어져야하나 현재까지의 연구는 거의 없는 실정으로 이 분야에 다각적인 관련 연구 및 기술개발이 필요하다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 미강 발효액을 소재로 한 가공제품의 개발

1. 서 설

우리나라의 주식인 쌀의 도정과정 중에 얻어지는 미강은 그 생산량이 상당하나 그 수거가 용이하지 않았다. 그러나 근래 미곡종합처리장의 보급 등으로 대량 생산과 수거가 가능하게되어 그 이용방안에 관심이 기울여지고 있다. 미강은 많은 양의 지방, 무기질, 비타민 B군 및 양질의 단백질, 섬유질을 함유하여 우수한 영양적 가치를 지니고 있으나 도정 후 효소에 의한 산패와 난소화성의 섬유질함량이 높은 단점으로 인해 식품에의 적용이 제한되었다. 최근 압출공정 등 미강 안정화 및 수용성 식이섬유 용출 증가 기술이 계속 개발되어 식품으로서의 이용 가능성을 증가시키고 있으나 아직도 약 30% 정도만이 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지 70%는 사료나 비료 등의 저가치 물질로 이용되거나 농산 폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 최근 미강은 건강식품으로서의 인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구도 진행되고 있다. 미강을 이용하기 위하여 효모와 버섯 등에 의한 미생물 발효가 연구되고 있는데 일본의 경우 피부 보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있다. 국내에서는 곡류를 압출공정을 처리한 후 세포벽 가수분해효소를 첨가함으로써 페루릭산 (ferulic acid), 폴리페놀 (polyphenols)과 아라비노키실란 (arabinoxylan) 등의 유용한 생리활성물질을 제조하는 연구가 진행되었으며, 미강을 액화효소 및 당화효

소로 전처리한 후 효모로 발효시켜 얻은 미강발효액기스의 제조방법과 이를 주방세제, 천연 입욕제와 조미료로 활용하고자 하는 연구가 진행되었다. 특히 손 등은 *Saccharomyces* 속 효모를 이용하여 얻은 미강 발효액의 산업적 이용가능성을 검토하였다. 또한 버섯의 탄소원으로서 미강을 이용하여 배지로의 이용성을 검토한 보고도 있으나 본 연구의 목적인 생리활성 물질의 생산을 다양한 미생물을 미강에 발효시켜 검토한 예는 없다.

건강한 신체의 기본은 항상성 유지에 있으며 항상성 유지는 호르몬, 신경계외에도 생체방어계 등 각종 대사계가 상호 적절히 작동함으로써 이루어질 수 있다. Macrophage는 면역세포로 자극에 의하여 활성화되면 염증대식세포 (inflammatory macrophage)와 활성화된 대식세포 (activated macrophage)로 나누어진다. 염증대식세포(Inflammatory macrophage)는 thioglycollate와 같은 염증유발 물질에 노출되었을 경우 기능적 변화나 세포분비물들이 증가하게 된다. 여러 면역반응과 독소현상을 유발시키는 lipopolysaccharide(LPS) 등의 면역조절물질에 의해 분비된 cytokine, hydrogen peroxide, nitric oxide(NO), cytolytic protease 등이 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로서 제시되어져 왔다. 활성화된 macrophage는 항미생물 작용, 항암작용 그리고 tissue damage의 effector function을 가지게 된다.

장관의 점막부위에 존재하는 장관관련림프상조직 (GALT: gut associated lymphoid tissue)은 장관면역계내 IgA response를 비롯하여 생체방어에 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 특히 Peyer's patch는 장관내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 유도부위로 알려져 있다. 사람이 먹는 물질들은 림프조직에 전달된 후 림프구들과 상호작용하기 때문에 어떤 면역활성을 증가시키는 물질이 있다면 이는 Peyer's patch 세포의 기능을 활성화하게 된다.

성인병의 하나인 고혈압은 그 여러 기작에 의해 기인되지만 renin-angiotensin system으로 인한 시스템이 그 중의 하나이며 이는 Angiotensin converting enzyme(Kininase II, peptidyl dipeptide hydrolase,

EC 3.4.1.5 이하 ACE로 칭함)에 의하여 활성화되며 뱀의 독주출물 또는 합성 ACE 저해제 (Capropril, Enalapril 등)의 사용에 의하여 억제된다.

자연계에 존재하는 천연물질 중에는 생체에 다양한 기능을 하는 물질들이 존재할 것으로 기대되어 이에 대한 관심이 날로 증가되고 있다. 특히 담자균류 (Yamada, 1984), 한약재 (Yamada and Kiyohara, 1989), 고등식물 (Roesler et al., 1991), 곰팡이류 (Saito et al., 1992)로부터 면역활성 조절물질을 얻으려는 노력이 계속되고 있다. 미강 발효액을 이용한 손상된 생체 내 여러 생리활성 기능을 회복하고 숙주의 방어기능을 조절할 수 있는 생체조절 물질의 생산은 이러한 맥락에서 매우 귀중한 시도이다. 이러한 면역조절물질들은 주로 저분자 물질보다는 고분자 물질로 항암효과 (Ohmori et al., 1988; Kanayama et al., 1983), 항보체활성 (Saito et al., 1992), lymphocyte 분열 유도활성 (Hara et al., 1991) 등의 면역활성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 이들 활성의 일부는 다당에 기인한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 균주 탐색 결과 생리활성 물질 생산이 가장 우수한 것으로 밝혀진 *Monascus pilosus*을 생산 균주로하여 생리활성을 가지는 미강 발효액 제조하고 기능성 식품의 소재로 사용하고자 그 이화학적 성질 및 가공과정 중의 처리특성에 따른 잔존 macrophage 및 장관면역의 활성화 등의 면역계의 활성화와 고혈압의 예방과 관련된 ACE 저해활성을 조사하였으며 최종적으로 가장 적합한 형태의 가공제품을 생산하기 위한 조건을 비교 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료

본 실험에 미강 발효액을 생산하기 위하여 사용한 균주는 한국중균협회에서 분양받은 *Monascus pilosus* KCCM 60029였으며, 보관용배지로는 PDA (potato dextrose agar) 사면배지를, 액체배양 기본배지로는 5% rice bran, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.25% KH₂PO₄ (pH 6.0)의 배지를, 고체 배양을 위한 배지로는 rice bran 100 g에 120 ml의 증류수를 가하여 혼합하고 멸균 후 사용하였다. 배지에 접종된 균주는 20℃에서 3일 배양하였다.

나. 미강발효액의 이화학적 특성

1) 일반성분 분석

일반성분은 AOAC 방법에 따라 다음과 같이 분석하였다. 수분함량은 oven dry법으로 단백질 함량은 Kjeldahl auto 1030 analyser(Tecator Co., Sweden)를 이용하여 micro Kjeldahl법으로 측정하였으며, 회분은 건식회화법으로 분석하였다. 조지방 함량은 soxhlet법으로 측정하였다.

2) 식이섬유 함량 분석

식이 섬유 함량은 AOAC 방법에 따라 total dietary fiber assay kit법 (Sigma TDF 100A)으로 정량하였다.

3) 무기질 함량 분석

무기질 함량 분석은 AOAC 방법에 따라 동결 건조한 시료들을 예비탄화한 후 550℃ 회화로에서 회화시킨 회분을 염산으로 용해하고 정용한 후 ICP(Jovin Yvon 38, France)로 분석하였다.

4) 아미노산 조성 분석

아미노산 조성은 아미노산 자동 분석기로 분석하였다. 즉 건조시료를 각각 1.86 mg 씩 분주하고 100℃에서 24시간 염산 가수분해시켰다(트립토판 분석을 위해서는 methanesulfonic acid로 가수분해). 가수분해된 아미노산을 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화 시킨 후 시료를 완전히 건조시켜 200 μ l의 HPLC용매로 녹였다. 이를 원심분리 및 membrane filter로 여과시키고 상정액을 취하여 HPLC(HP 1100 series)로 분석하였다. HPLC 분석조건은 : PICO-TAG column(3.9 \times 300 mm), 용매: A) 1.4mM NaHAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN(pH 6.1), B) 60% CH₃CN, 용출조건 : linear gradient of solvent B(0-100%), flow rate: 1.0 mL/min, 검출: UV 254 nm 이었다.

다. 미강 발효액의 가공처리조건에서의 생리활성 잔존성 분석

1) 시료제조

Monascus pilosus 균을 이용하여 미강함유 액체 및 고체배지에서 생산된 미강발효액은 증자, 건열, 건조등의 가공공정에 대한 처리조건별로 시료를 제조하고 각각의 시료에 대한 수용성 가용획분을 추출하고 동결건조한 후 생리활성 측정의 시료로 하였다. 각각의 처리방법은 다음과 같았다.

가) 증자치리

액체배양액과 고체배양액을 균질화 한 후 각각 일정량 씩 취하여 95℃에서 15, 30, 45, 60분간 상압증자하였으며 121℃ 가압증자조건에서는 15분간 증기를 이용하여 가열처리하였다. 증자 처리한 시료는 상온으로 냉각시킨 다음 동결건조하고 -20℃에 보관하였다.

나) 건열처리

환류냉각기가 부착된 oil bath를 이용하여 시료를 각각 130, 150, 180℃에서 4, 8, 12시간 가열처리한 후 상온으로 냉각시킨 다음 동결건조하고 -20℃에 보관하였다.

다) 건조방법

액체배양액과 고체배양액을 균질화 한 후 각각 convection oven을 이용한 열풍건조(55℃) 및 동결건조하여 -20℃에 보관하였다.

2) 생리활성 측정

가) Macrophage 활성화

Macrophage 활성화는 macrophage의 lysosomal phosphatase의 활성측정을 이용하여 실시하는데 이 방법은 다음과 같이 진행하였다. 즉, 5-10주령 웅성 ICR Mouse의 복강에 1 ml의 thioglycollate medium을 주입한 뒤 48-72시간 후에 RPMI-1640 medium으로 mouse의 복강을 세척한 후 macrophage를 복강으로부터 회수하였다 (Herscowitz et al., 1981). 회수된 macrophage를 RPMI-1640 medium으로 두 번 세척하고 세포수가 1×10^6 cells/ml RPMI-1640이 되도록 RPMI-1640 medium에 재분산시켰다. 이 분산액을 96-well plate의 각 well에 180 μ l씩 분주한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 macrophage cell이 각각의 well plate의 기벽에 부착하여 monolayer를 형성시켰다. 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 180 μ l씩 분주하고 시료 20 μ l을 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 재배양하여 macrophage를 활성화시켰다. 이렇게 활성화된 macrophage의 monolayer에 0.1% triton X-100 (25 μ l)을 가하여 macrophage의 세포막을 용해시켜 이 때 분비되는 lysosome의 phosphatase에 기질로서 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate (150 μ l) 및

0.1 M citrate buffer (50 μ l)와 같이 넣어주어 1시간 동안 산성상태에서 반응시킨 후 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 phosphatase의 활성을 측정하였다 (Suzuki et al., 1990).

나) Mitogenic activity

Lymphocyte mitogenic activity는 MTT assay법 (Takemoto et al., 1988)으로 측정하였다. MTT assay는 ICR mouse로 부터 비장을 적취한 후, ice cold RPMI-1640 medium이 담겨져 있는 petri dish에 옮기고 금속체 (mesh #100)를 patch위에 위치시킨 다음 주사기의 고무마개로 누르면서 patch로부터 세포를 방출시켰다. 이 액을 금속체 (mesh #200)를 사용하여 여과하고 상기 medium으로 세 번 세정한 후 세포농도를 5×10^6 cells/ml RPMI-1640으로 조정, 90 μ l씩을 96 well plate에 분주한 다음 시료 10 μ l(대조군은 생리 식염수)를 가하고 37 $^{\circ}$ C, 3일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그후 1 mg/mL농도의 MTT solution을 가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 5-6시간 반응시키고 생성된 MTT formazan 침전물을 얻기 위해 조심스럽게 상등액을 제거하고 이때 얻어진 formazan은 100 μ l의 0.04N HCl/isopropanol을 가하고 5분간 용해하고 동량의 물을 가한 후 한 후, 570 nm에서 흡광도를 비교하여 lymphocyte의 증식도를 비교하였다.

다) 장관면역 활성 측정

장관면역 활성은 Hong 등 (1998)의 방법에 의거하여 측정하였다. 7주령 C3H/HeN female mouse를 경추탈구하여 치사시켜 소장벽에 부착되어 있는 Peyer's patch를 잘라내어 Hank's balanced salt solution (HBSS)이 담겨져 있는 cell culture용 petri dish로 옮기고, 금속체(100 mesh)를 Peyer's patch 위에 놓은 다음, 주사기 고무마개로 누르면서 patch로 부터 세포를

방출시켰다. 이 세포 현탁액을 금속체(200 mesh)로 여과시키고, HBSS로 세척한 후 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포 농도를 2.0×10^6 cells/ml 조정하여 세포용액을 조제하였다. 이를 96 well plate에 200 μ l 씩 분주한 후 일정 농도의 시료를 20 μ l 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양하였다. 이 배양 상등액을 취하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 한편 동일 종의 mouse 대퇴부 뼈를 적출하여 주사기 바늘을 이용하여 HBSS를 뼈 속으로 넣어 골수세포를 회수한 후, 위와 같이 여과, 세척하고 세포농도를 2.5×10^5 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 100 μ l 씩 분주하였다. 그 후 Peyer's patch cell과 시료와 반응시킨 배양상등액 50 μ l와 RPMI 1640 배지를 50 μ l를 각각 plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. Bone marrow cell의 증식도 활성 측정은 AlamarBlue™ assay 법을 이용하였다. 골수세포의 배양 종료 18시간 전에 AlamarBlue™ 용액 20 μ l를 첨가하여 반응시킨 후에, 형광정도를 excitation 544 nm 와 emission 590 nm에서 형광분석기(Luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer Limited. U.K)로 측정하였다.

라) ACE 저해활성 측정

시료 0.05 mL에 Hip-His-Leu을 0.1 mL 첨가한 후 37°C, 5분간 방치한 후 ACE 효소액을 0.15 mL 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시키고 0.5 N HCl 0.25 mL 첨가하여 반응 정지시킨 후(Control : 시료용액 대신 증류수 0.05 mL 사용, Blank : HCl을가한 후 효소액을 첨가) ethylacetate 1.5 mL을 첨가하여 15초간 혼합하고 2,800 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 0.5 mL 회수하여 상등액을 oil bath에서 140°C로 15분간 건조 후, 1 M NaCl 3 mL 첨가로 용해하고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{저해율 (\%)} : (E_c - E_s) / (E_c - E_b) \times 100$$

(Ec, control 흡광도; Eb, blank 흡광도; Es, sample 흡광도)

라. 미강발효액의 중간소재화

1) 미강발효액 powder제조

미강발효액을 분말화 하기 위하여 열풍건조(55℃)와 동결건조를 실시하였다. 먼저 homogenizer를 이용하여 균질화하고(22000 rpm, 10분) 건조시간을 단축하고 건조 효율을 높이기 위하여 균질화 한 미강발효액에 maltodextrin을 첨가하였다(maltodextrin : 미강발효액 = 1 : 20). 혼합액을 열풍건조(55℃)하거나 동결건조한 후 blender로 분말화하였다.

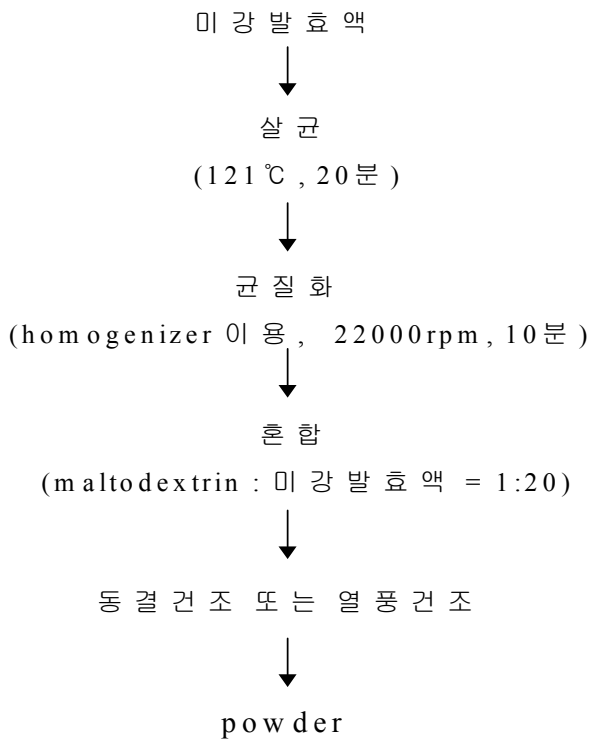


Fig 3-1-1. 미강발효액 powder의 제조공정

2) 미강발효액 granule 제조

미강발효액 granule을 제조하기 위하여 미강 발효액 powder를 ethanol과 수분을 Table 3-1-1과 같은 비율로 혼합하여 체(18~20 mesh)에 밀어내는 방법으로 일정한 크기의 과립화를 실시한 후 50℃에서 열풍건조 하였다.

Table 3-1-1. 미강발효액 granule의 배합비

	구성비
미강발효액 powder	100g
ethanol	30g
물	5g

가) 이화학적 특성 조사

(1) 색도

시료의 색도는 Color and color difference meter(Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 표면색도 값인 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였다.

(2) 수분

수분함량은 AOAC 방법에 따라 oven dry법으로 측정하였다.

(3) 대장균군

대장균군은 식품공전의 대장균군 검사법으로 측정하였다.

마. 미강발효액을 이용한 가공식품제조 특성화

1) 미강 발효액 이용한 타블렛 제조

미강발효액의 면역활성을 가지는 미강발효액을 이용한 타블렛을 만들기 위하여 Table 3-1-2에서 제시된 배합비와 같이 미강발효액 powder에 폴리

텍스트로즈, 맥주효모, ethanol, 물 등을 첨가하여 혼합하였다. 혼합물을 체(18~20 mesh)에 밀어내는 방법으로 일정한 크기의 과립화를 실시한 후 50℃에서 열풍건조 하고 과립을 생산한 후 타블렛 제조기(극동신약)를 이용하여 타블렛을 제조하였다(Fig.3-1-2)

Table 3-1-2. 미강발효액 tablet의 배합비

	A	B
미강 powder	90g	90g
폴리덱스트로즈	-	18g
맥주효모	90g	72g
ethanol	60g	60g
물	12g	12g

가) 특성 조사

(1) 색도

시료의 색도는 Color and color difference meter(Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 표면색도 값인 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였다.

(2) 수분

수분함량은 AOAC 방법에 따라 oven dry법으로 측정하였다.

(3) 대장균군

대장균군은 식품공전의 대장균군 검사법으로 측정하였다.

(4) 관능검사

예비실험을 통해 결정된 각 조건별로 제조한 미강발효액 타블렛은 즉시

10명의 훈련된 패널을 통해 2회 반복 관능적 평가를 실시하였다. 관능평가 항목은 이취(off-flavor)와 전체적인 기호도(overall acceptability)를 평가하였다. 특성평가는 9점 척도법을 사용하였다.

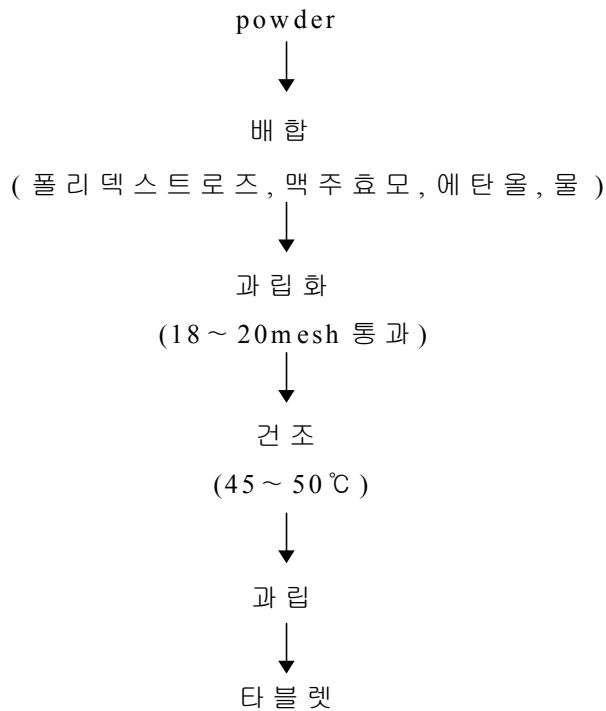


Fig 3-1-2. 미강발효액 타블렛의 제조공정

2) 미강 발효액 음료 제조

가) 제조배합비 결정

미강발효액은 Fig 3-1-3로 같은 공정으로 제조하였다. 음료의 최적 배합비는 미강 발효액을 기초물질로 하여 당의 함량, 산미료의 함량, 향의 적용, 최적의 효과를 가지는 이취제거물질을 적용하여 시료를 제조하고 그 특성을 조사하여 결정하였다. 이취제거 효과를 검사하기 위하여 사용된 한약재의 열수 추출물은 10배 량의 물을 첨가하여 환류장치가 있는 추출장치

에서 95℃에서 4시간 추출하여 얻었으며, 황정 알코올 추출물은 10배 량의 99% 에틸알코올을 첨가하여 위와 같은 추출방법으로 얻었다.

나) 미강발효음료의 특성 검사

(1) 색도

시료의 색도는 Color and color difference meter(Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 표면색도 값인 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였다.

(2) 산도

산도는 미강액 10ml을 증류수 25ml로 희석한 다음 pH 8.0이 될 때까지 0.1 NaOH의 소비량을 측정하여 얻었다.

(3) 당도

디지털 당도계 (Atago, PR-100, Japan)를 이용하여 측정하였다..

(4) 관능검사

예비실험을 통해 결정된 각 조건별로 제조한 미강발효액 타블렛은 즉시 10명의 훈련된 패널을 통해 2회 반복 관능적 평가를 실시하였다. 관능평가 항목은 이취(off-flavor)와 전체적인 기호도(overall acceptability)를 평가하였다. 특성평가는 9점 척도법을 사용하였다.

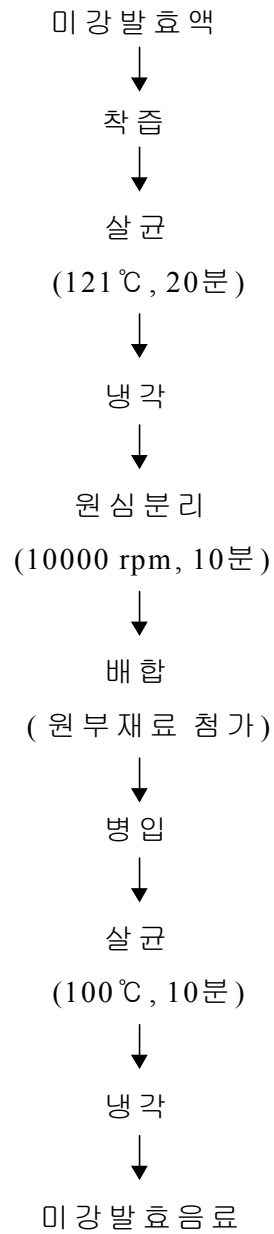


Fig 3-1-3. 미강발효 음료의 제조과정

3) 미강발효 음료의 저장성 시험

가) 시료제조 및 저장시험

최종 배합비에 따라 미강발효 음료의 제조공정에 의하여 제조한 시료는 각각 4℃, 실온, 37℃에서 저장하면서 저장기간 중의 변화를 관찰하였다.

나) 저장 중의 이화학적 특성 변화

(1) 색도

시료의 색도는 Color and color difference meter(Minolta CR-200, Japan)를 이용하여 표면색도 값인 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)를 측정하였다.

(2) 산도

산도는 미강액 10ml을 증류수 25ml로 희석한 다음 pH 8.0이 될 때까지 0.1 NaOH의 소비량을 측정하여 얻었다.

(3) 당도

디지털 당도계 (Atago, PR-100, Japan)를 이용하여 측정하였다..

(4) pH

pH meter(Orion 720A, Japan)를 이용하여 측정하였다..

(5) 관능검사

예비실험을 통해 결정된 각 조건별로 제조한 미강발효액 타블렛은 즉시 10명의 훈련된 패널을 통해 2회 반복 관능적 평가를 실시하였다. 관능평가 항목은 이취(off-flavor)와 전체적인 기호도(overall acceptability)를 평가하였다. 특성평가는 9점 척도법을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 미강발효액의 이화학적 특성

1) 일반성분 분석

미강 발효액의 이화학적 특성 검토를 위하여 수분, 지방, 단백질, 회분 등 일반성분분석을 검토하기 위한 시험법을 확립하고 이에 필요한 시료를 대량생산하여 이들 항목에 대한 시험 검사를 실시한 결과는 Table 3-1-3과 같았다. 액체 발효액의 수분함량은 93.97%였으며 조지방이 0.3%, 조단백이 0.73%, 조회분이 0.74%를 나타내었다. 반면 고체 발효액에서는 수분함량이 68.13%, 조지방이 6.68%, 조단백이 4.80%, 조회분이 3.71%를 나타내었다. 이를 제외한 부분은 섬유질을 포함하는 탄수화물로 산출할 수 있으며 액체발효액의 경우 4.26%, 고체발효액의 경우 16.6%로 나타났다.

Table 3-1-3. Proximate composition of fermented rice bran with *Monascus pilosus*

	Liquid culture	Solid culture
moisture(%)	93.97±0.04	68.13±0.24
crude lipid(%)	0.30±0.03	6.68±0.26
ash(%)	0.74±0.07	3.71±0.03
crude protein(%)	0.73±0.11	4.80±0.23

2) 식이섬유 및 유리당 함량 분석

액체 발효된 미강 발효액의 식이섬유 함량과 유리당 함량을 측정된 결과는 Table 3-1-4와 같았다. 총 식이 섬유함량은 건물중으로 24.1%였으며

유리당으로서 glucose는 1.9%, fructose는 4.1 %의 함량을 가지는 것으로 나타났다. 이는 발효의 원료로 사용한 미강의 일반적인 총 섬유질 함량이 건물중으로 56.0%인 것으로 볼 때 미강의 함량이 건물중으로 80% 수준으로 첨가된 초기발효 발효액의 섬유질 함량이 44.8%이므로 균체 중량을 고려하지 않을 경우 미강의 섬유질 중 약 54% 정도가 단당 또는 이당 등 가용 당으로 분해된 것으로 생각되며 이 고정에서 활성 다당도 생산되는 것으로 사료된다.

Table 3-1-4. Dietary fiber and sugar content of fermented rice bran with *Monascus pilosus*

	Content(%)*
TDF	24.1
glucose	1.9
fructose	4.1

* dry base

3) 무기질 조성 분석

미강 발효액의 무기질 조성을 분석한 결과는 Table 3-1-5과 같았다. 무기질 중 Cd, Pb, As와 같은 중금속은 검출되지 않았으며 가장 많은 함량을 나타낸 것은 P이었고 K, Mg, Na의 순으로 함량이 높았다. Fe도 미량 함유되어 있었다.

Table 3-1-5. Mineral composition of fermented rice bran liquid with *Monascus pilosus*

	Content (mg%)
Na	96.4
Ca	9.0
Fe	0.9
K	351.2
Pb	-
Mg	123.2
Cd	-
Zn	0.7
Cu	0.14
Se	-
As	-
P	398.5

4) 아미노산 성분 분석

미강 발효액의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 3-1-6과 같았다. 주요 아미노산으로는 aspartic acid, glutamic acid, serine, alanine 순으로 나타났다. 고체발효액에서 가장 풍부한 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid으로 전체 량의 1/5을 차지하였으며 가장 적은 아미노산은 트립토판과 메티오닌인 것으로 나타났다. 액체 발효액에서는 히스티딘, 알라닌, 타이로신 순으로 나타났으며 고체발효액과는 달리 aspartic acid와 glutamic acid의 함량은 높지 않았다. 가장 적은 아미노산은 트립토판과 페닐알라닌, 메티오닌인 것으로 나타났다. 전체적인 함량에서는 고체 배양액의 함량이 다소 높게 나타났으나 이는 고형분의 차이가 반영된 결과이며 이들의 조성비

는 액체배양액과 고체배양액에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 3-1-6. Amino acid composition of fermented rice bran with *Monascus pilosus*

AA	content(nM/mg)	
	Solid culture	Liquid culture
Cya*	4.70	2.81
Asx**	24.32	6.90
Glx**	21.52	5.41
Ser	12.02	6.06
Gly	5.57	1.80
His	20.82	8.96
Arg	10.47	2.79
Thr	11.42	4.68
Ala	21.66	8.78
Pro	12.59	5.38
Tyr	8.99	7.11
Val	15.69	5.05
Met	2.17	1.10
Ile	8.84	2.84
Leu	15.26	3.61
Phe	7.44	1.87
Trp	1.45	0.68
Lys	9.21	2.62
TOTAL	214.12	78.46

나. 가공처리조건에 따른 생리활성 잔존성 분석

Monascus pilosus 균을 이용하여 미강을 포함하는 액체 및 고체 배지에서 발효액을 생산하고 이들 물질을 가공에 사용되는 공정을 이용하여 시료를 제조한후 수용성 가용획분을 추출하고 동결건조 한 후 생리활성을 측정한 결과는 다음과 같았다.

1) 액체발효액의 생리활성 잔존성

가) 액체배양액의 가공처리조건에 따른 macrophage phosphatase활성변화

*Monascus pilosus*에 의한 미강 액체발효액을 습열 처리조건 하에서 각기 다른 온도 및 시간을 처리하여 macrophage phosphatase activity를 측정한 결과는 Fig 3-1-4과 같았다. 미강발효액의 습열처리온도 온도를 95℃에서 처리한 것보다는 121℃에서 증자 추출된 시료에서 더 높은 macrophage phosphatase 활성을 보였다. 증자온도를 95℃로 처리된 시료에서는 증자시간이 증가함에 따라 시료의 macrophage phosphatase 활성도 높은 것으로 나타나 증자의 온도가 높을수록 또 증자의 시간이 증가될수록 macrophage phosphatase 활성이 증가하여 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다.

액체배양액을 건열처리 조건에서 온도 및 시간을 달리하여 macrophage phosphatase 활성을 측정한 결과 온도가 증가 할수록 시간이 증가할수록 활성은 감소하는 것으로 나타났다(Fig 3-1-5). 이는 높은 온도에서 처리할 경우 처리시간의 증가가 macrophage phosphatase 활성의 저하를 초래하며 이러한 조건에서 가공될 경우 최종제품의 활성이 감소할 가능성이 크다는 것을 시사하였다. 액체배양액을 건조방법별로 처리한 후 macrophage phosphatase activity를 측정한 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 극미하였다. 이로서 비용이 높은 동결건조법을 고집하지 않아도 가공 및 중간재료의 처리가 가능하다는 결론을 내릴 수 있었다.

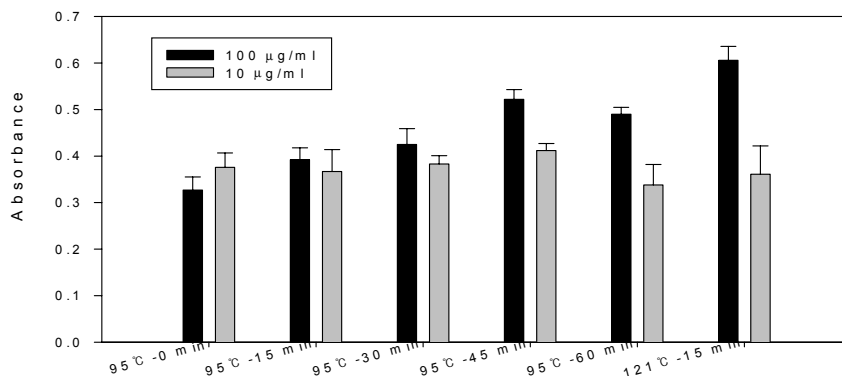


Fig 3-1-4. Effect of steaming temperature and time on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran product(Liquid culture by *M. pilosus*).

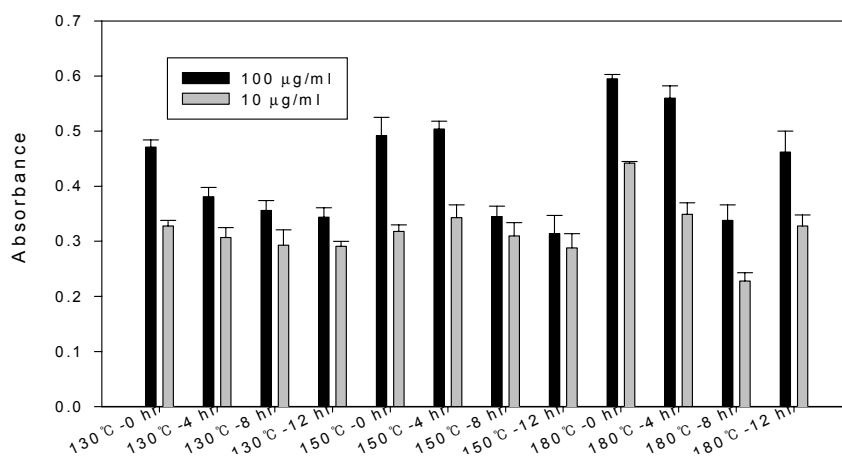


Fig 3-1-5. Effect of time and temperature of dry heat treatment on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran product(Liquid culture by *M. pilosus*).

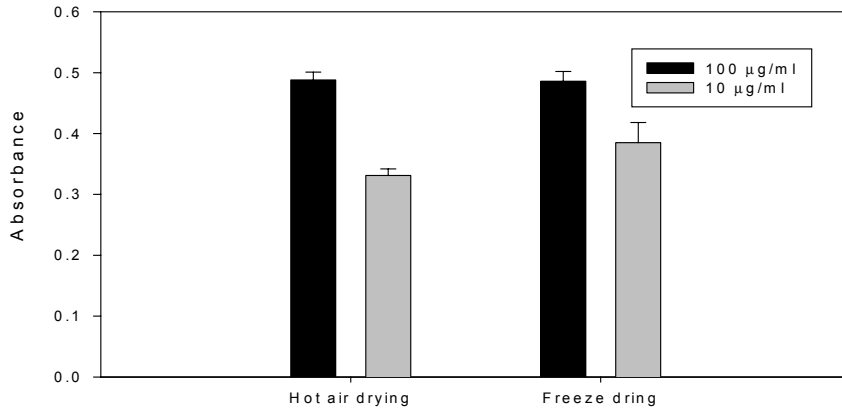


Fig 3-1-6. Effect of drying method on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran product(Liquid culture by *M. pilosus*).

나) 액체 배양액의 가공처리조건에 따른 mitogenic activity 변화

미강 액체배양액의 증자온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정 한 결과는 Figure 3-1-6과 같았다. 습열 처리 조건에서는 95℃에서 처리 시간이 증가 될수록 활성이 증가하여 45분 처리한 시료가 첨가된 시료농도 에서 모두 가장 높은 활성을 보였으나, 60분 처리에서는 그 활성이 감소하 여 가공과정에서의 습열 처리조건은 45분을 초과하지 않는 것이 효과적이 라고 사료되었다. 121℃에서 처리한 시료는 활성 검사시 시료 첨가량 10µg /ml인 경우에서는 95℃처리보다 활성이 낮았으나 100µg/ml의 농도에서는 비슷한 활성을 보여 가압 살균이 필요한 제품의 생산 공정에서도 활성이 유지될수 있음을 확인할 수 있었다. 특히 95℃에서는 45분 처리까지는 증 자된 시료에서 증자시간이 증가함에 따라 시료의 활성도 높아지는 것으로 나타나 증자가 진행될수록 그 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아 지는 것으로 추정할 수 있었다.

액체배양액의 건열처리별 온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정한 결과 온도가 증가할수록 활성은 증가하는 것으로 나타났으나 처리시간이 증가함에 따라서는 활성을 감소가 가시적은 관찰되었다. 그러나 시료간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 같은 온도 조건에서는 처리시간이 증가 할수록 활성이 감소하여 높은 온도에서 4시간 이상 장시간 처리되는 공정에서는 활성의 유지가 용이하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 미강 발효액의 가공시 캔디의 제조와 같은 건열처리조건이 4 시간이하의 처리시간을 적용한다면 최종제품의 mitogenic activity에는 영향을 미치지 않음을 시사하였다.

액체배양액을 건조방법별로 처리하여 시료의 mitogenic activity를 측정한 결과 동결건조방법에 의하여 제조된 시료의 활성과 열풍건조된 시료의 활성이 비슷한 것으로 나타났으나 10 μ g 수준에서는 동결건조시료가 약간 낮은 것으로 나타났다. 결과적으로 건조의 방법은 미강 발효액의 mitogenic activity에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

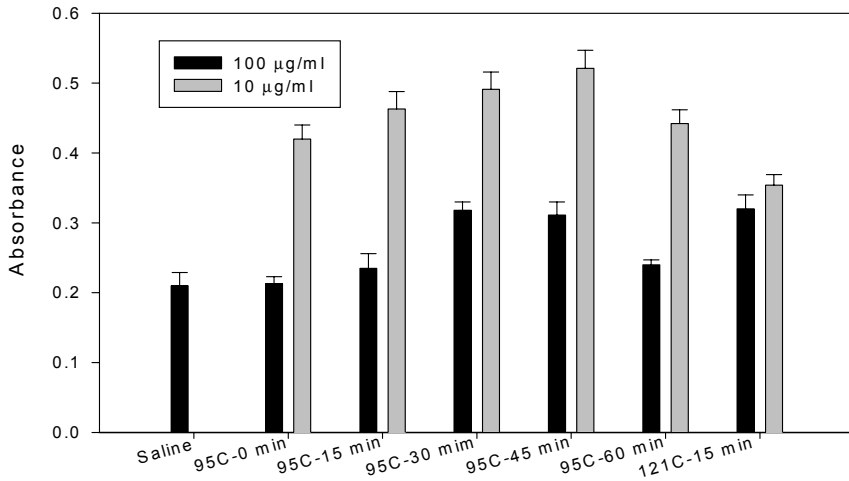


Fig 3-1-7. Effect of steaming temperature and time on mitogenic activity of fermented rice bran products(Liquid culture by *M. pilosus*).

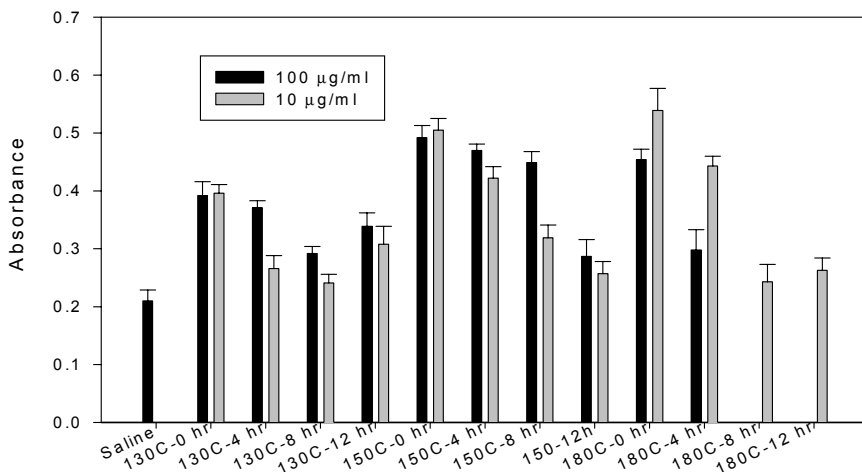


Fig 3-1-8. Effect of time and temperature of dry heat treatment on mitogenic activity of fermented rice bran product(Liquid culture by *M. pilosus*).

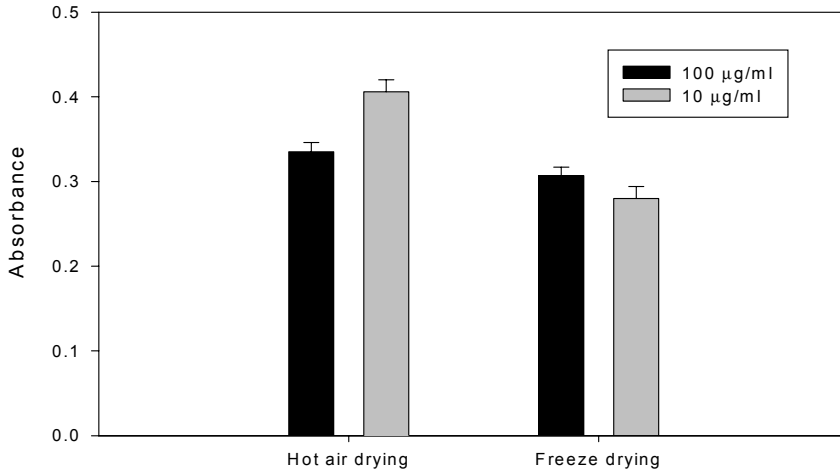


Fig 3-1-9. Effect of drying method on mitogenic activity of fermented rice bran products(Liquid culture by *M. pilosus*).

1) 고체배양액

가) 고체배양액의 가공처리 조건별 macrophage phosphatase활성 변화

고체배양액의 macrophage phosphatase activity는 대부분의 시료에서 액체 배양액에 비하여 다소 낮은 수치를 나타내었다. 고체배양액에 대하여 증자온도 및 시간에 따른 macrophage phosphatase activity를 측정한 결과 액체배양액과 비슷한 결과를 보여 95℃보다는 121℃에서 증자 추출된 시료에서 더 높은 활성을 보였으나 그 차이는 액체 배양액과 같이 현저하지는 않았다. 그러나 고체배양액에서도 95℃에서 증자된 시료의 경우 증자시간이 증가함에 따라 시료의 활성도 높은 것으로 나타나 증자가 진행될수록 그 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다.

고체배양액의 건열처리의 온도 및 시간에 따른 macrophage phos-

phatase activity를 측정된 결과 온도의 변화나 처리시간의 증가에 따른 차이는 크지 않았고 일정한 경향을 보이지 않았다.

고체배양액을 건조방법별로 처리하여 macrophage phosphatase activity를 측정된 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 거의 나타나지 않았다.

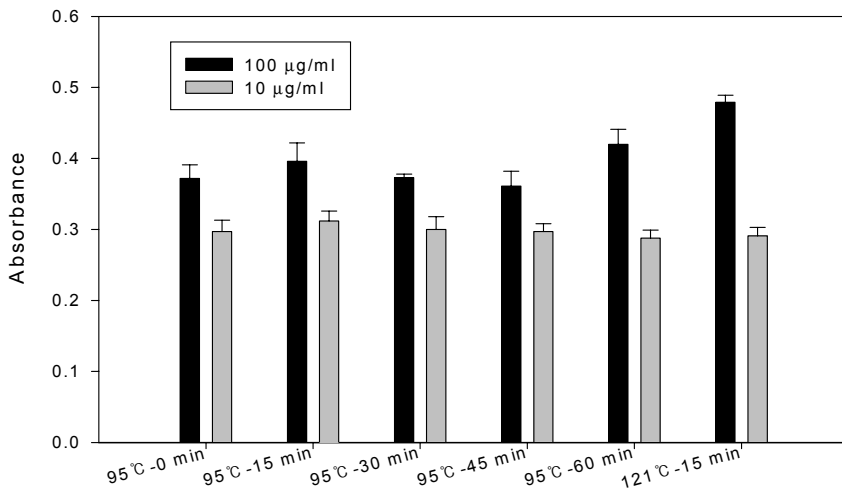


Fig 3-1-10. Effect of steaming temperature and time on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*).

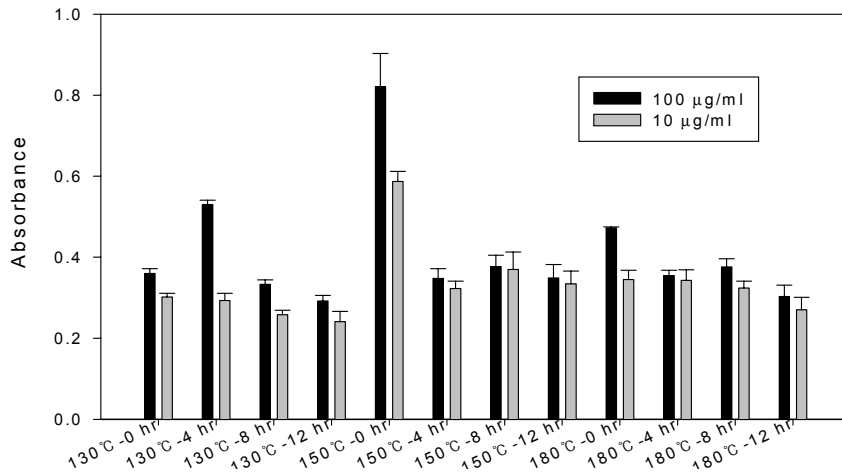


Fig 3-1-11. Effect of time and temperature of dry heat treatment on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*).

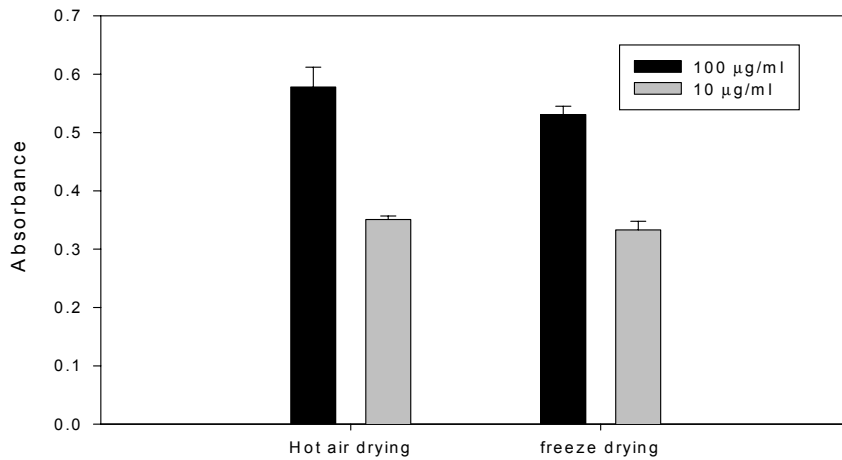


Fig 3-1-12. Effect of drying method on macrophage phosphatase activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*).

나) 고체배양액의 가공처리조건별 mitogenic activity 변화

고체배양액의 증자온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정된 결과 액체배양액과 비슷한 결과를 보여 95℃보다는 121℃에서 증자 추출된 시료에서 더 높은 활성을 보였으며 95℃에서 증자된 시료의 경우 증자시간이 증가함에 따라 시료의 활성도 높은 것으로 나타나 증자가 진행될수록 그 활성의 본체가 되는 물질의 추출효율도 높아지는 것으로 추정할 수 있었다.

고체배양액의 건열처리의 온도 및 시간에 따른 mitogenic activity를 측정된 결과 온도가 증가 할수록 시간이 증가할수록 활성은 감소하는 것으로 나타났으나 그 차이는 크지 않았다.

고체배양액을 건조방법별로 처리하여 mitogenic activity를 측정된 결과 건조방법에 따른 활성의 변화는 거의 나타나지 않았다.

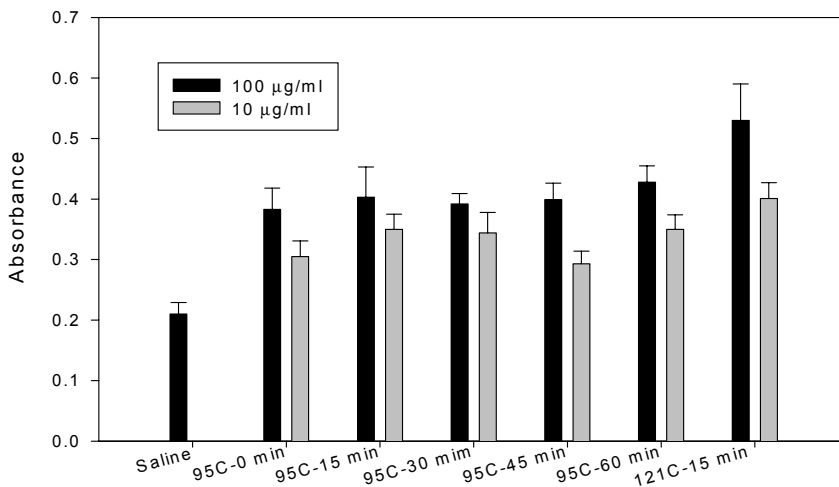


Fig 3-1-13. Effect of steaming temperature and time on mitogenic activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*).

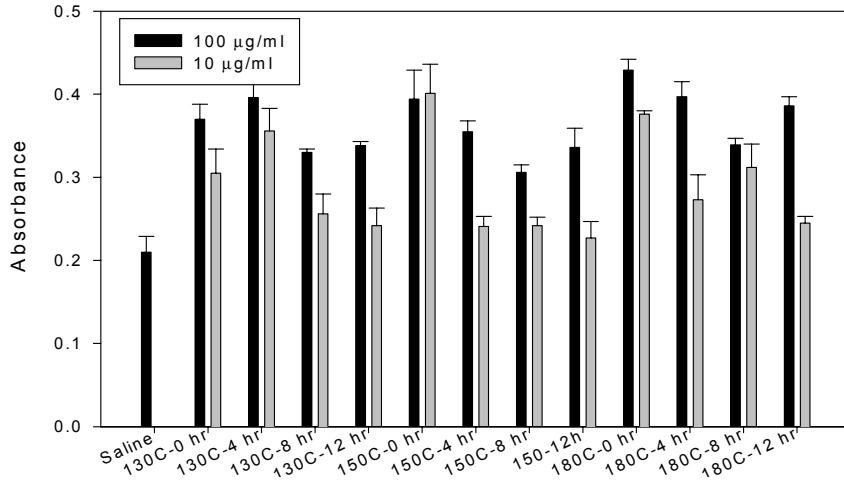


Fig 3-1-14. Effect of time and temperature of dry heat treatment on mitogenic activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*)

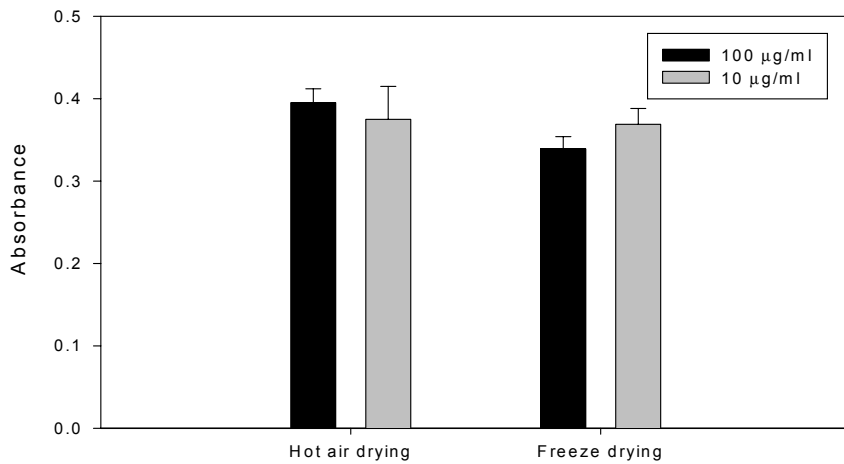


Fig. 3-1-15. Effect of drying method on mitogenic activity of fermented rice bran products(Solid culture by *M. pilosus*).

라. 미강발효액의 중간소재화

1) 미강발효액 powder 및 granule 제조

미강발효액을 이용하여 제조된 granule은 powder의 뭉침성을 위하여 에탄올과 물을 첨가하였다. 건조한 후 제조된 granule은 식품 공전 상의 기준을 충족하였다.

Table 3-1-7. 미강발효액 granule의 배합비 및 특성

	A
미강 powder	100g
ethanol	30g
물	5g
색도	
L	62.14
a	3.90
b	14.49
관능적 특성	
이취	1.9
수분(%)	3.21
붕해도	적합
대장균군	음성

마. 미강발효액첨가에 의한 가공식품제조 특성화

1) 미강 발효액 이용한 타블렛 제조

미강발효액을 이용하여 제조된 타블렛은 타정효율을 높이기 위하여 배합비에 맥주효모를 같은 량 사용하였다. A 처리구로 제조된 타블렛은 타블렛의 식품 공전 상의 기준을 충족하였다. 색도 개선과 점착성 개선을 위하여 폴리덱스트로즈를 배합비에 첨가한 B 처리구는 명도가 밝아지고 적색도와 황색도가 다소 감소하여 기호도가 A 처리구에 비하여 높았다.

Table 3-1-8. 미강발효액 tablet의 배합비 및 특성

	A	B
미강 powder	90g	90g
폴리덱스트로즈	-	18g
맥주효모	90g	72g
ethanol	60g	60g
물	12g	12g
색도		
L	61.49	64.22
a	1.90	1.65
b	11.49	10.85
관능적 특성		
이취	1.3	0.9
수분(%)	3.91	3.83
붕해도	적합	적합
대장균군	음성	음성

2) 미강 발효액 음료 제조

가) 제조공정

미강발효액을 이용한 음료의 생산을 위하여 미강발효액에서 유효성분의 추출을 극대화하고 수율을 증가시킬 수 있고, 제조공정을 최소화 할 수 있는 미강액의 제조 조건을 설정하였다.

예비실험으로 미강발효액을 여과포를 이용하여 수작업으로 착즙한 것과 원심분리(5,000 rpm, 10min)하여 상정액을 회수하는 것과의 결과를 비교해 본 결과 원심분리를 이용하였을 때 부유물질의 침전이 용이하지 않고 이로 인하여 수율이 여과포로 착즙한 것에 비하여 낮게 나타나 본 실험에서는 여과포에 의한 착즙으로 착즙 방법을 설정하였다.

착즙 미강 발효액은 *M. Philosus*균의 성장을 멈추게 하고 착즙 후에도 수용액 중에 현탁되어 있는 미세입자를 제거하기 위한 가열처리를 하기 위하여 살균공정을 실시하였다. 살균된 미강 발효액은 실온으로 냉각한 후

원심분리(10000 rpm, 10min)를 하여 침전물을 제거하였다. 미강 발효액 중에서 발효의 원료로 사용된 미강을 비롯한 불용성 성분중 식이섬유의 일부는 미생물에 의하여 발효과정중 분해되고 *M. Philosus* 균사체는 자가분해되어 일부 분해되는 것으로 추정되나 발효 후 효소 (hemincellulase, cellulase, pronase, amylase)를 첨가하여도 추가적인 분해는 미미하여 불용성 고형분의 함량을 줄이는 데는 효과가 적었다.

청징한 미강액은 여러 가지의 원부재료를 넣어 배합비에 따라 음료로 배합하여 그 특성을 비교검토 후 최종 배합비를 결정하였다. 제조된 미강발효액 음료는 유리병에 담아 100℃에서 10분간 살균한 후 냉각하고 저장하면서 특성을 검사하였다.

나) 이취 제거제 처리효과

(1) 생약 추출물의 처리

미강발효액의 이취를 마스킹하기 위하여 오향, 황정, 정향, 대회향, 소회향 등 한약재에서 향재로 사용하는 재료의 추출물을 Table 3-1-9과 같은 배합비에 의하여 음료를 제조하는 데 적용한 후 시료에 대한 관능검사를 실시하여 이들 물질의 이취 제거효과를 평가하였다. 오향, 정향, 대회향, 소회향은 열수추출물을 사용하였으며 이취의 마스킹 효과가 가장 높은 것으로 나타난 황정의 경우 알코올 추출물 또는 알코올추출물과 열수추출물의 혼합액(1:1)을 사용하였다. 관능검사 결과 황정추출물을 1.0% 수준으로 첨가한 시료에서 이취에 대한 마스킹 효과가 가장 뛰어났으며 전체적인 선호도가 높게 나타났다. 황정 추출물을 0.1% 첨가한 시료에 있어서는 이취의 강도는 1.0% 첨가 한 시료에 비하여 상대적으로 높았으나 다른 생약 추출물에 비하여 기호도가 높게 나타나 이취를 제거하고 미강발효음료를 제조하는 데 있어서 황정의 사용이 적합한 것으로 판단되었다. 황정의 알코올 추출물의 경우 이취의 강도는 0.1% 황정추출물을 포함하는 시료보다 낮았

으나 기호도가 낮았고 이는 알코올추출물과 열수추출물의 혼합액(1:1)을 사용한 경우에도 같은 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 황정 1.0%를 미강발효음료의 최종배합비에 채택하였다.

Table 3-1-9. 이취 마스킹을 위한 여러 가지 추출물의 함량을 달리한 미강 발효음료의 배합비 및 특성

(단위: %)

원부재료	처리구								
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
미강액	84.9	85.8	84.9	85.8	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9
오향	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
오향(열수)	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-
황정(열수)	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-
황정(열수)	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-
소회향(열수)	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-
대회향(열수)	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-
정향(열수)	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-
황정(에탄올)	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-
황정(열수:에탄올)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
고과당	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
설탕	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
비타민 C	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
감초농축액	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
구연산나트륨	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
이취강도	6.9	2.9	1.5	3.2	3.2	3.3	3.1	2.9	3.1
기호도	1.8	4.8	7.0	5.8	2.6	3.2	4.4	4.0	3.4

(2) cyclodextrin 및 maltodextrin 첨가 효과

미강발효액의 이취를 마스킹하기 위하여 황정의 열수추출물과 함께 cyclodextrin 및 maltodextrin의 첨가 효과를 Table 3-1-10과 같은 배합비에 의하여 음료를 제조한 후 관능검사를 이용한 이취 제거효과를 검사하였다. 관능검사 결과 황정추출물을 1.0% 수준으로 첨가한 시료와 비교하였을 때 cyclodextrin 또는 maltodextrin의 첨가에 의한 이취에 대한 마스킹의 상승효과는 나타나지 않았으며 오히려 음료의 점도 증가에 의하여 기호도의 저하현상이 나타나 미강발효음료의 최종배합비에 cyclodextrin 및 maltodextrin의 첨가는 고려되지 않았다.

Table 3-1-10. 이취 마스킹을 위한 cyclodextrin 및 maltodextrin 함량을 달리한 미강발효음료의 배합비 및 특성

(단위: %)

원부재료	처리구				
	A	B	C	E	F
미강액	84.9	79.9	80.9	79.9	80.9
황정 열수	1.0	1.0	-	1.0	-
cyclodextrin	-	5.0	5.0	-	-
maltodextrin	-	-	-	5.0	5.0
고과당	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
설탕	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
비타민 C	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
감초농축액	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
구연산나트륨	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
이취강도	1.5	1.4	2.9	1.6	3.4
기호도	7.0	5.0	2.5	4.8	2.0

다) 감미료의 첨가비율

미강발효액의 제조에 사용되는 당과 산미료의 비율을 결정하기 위하여 감미료로 사용되는 고과당과 설탕의 양과 산미료의 첨가량을 조절하여 제조한 시료에 대하여 관능검사를 실시한 결과 Table 3-1-11과 Table 3-1-12과 같은 결과를 얻었다. 당의 함량에 따른 관능적 성질에서는 당의 함량이 고과당이 5.1%, 설탕이 8.1% 첨가되었을 때 가장 높은 기호도를 나타내었으며 이보다 도 높거나 낮은 당함량을 가지는 시료의 기호도는 다소 낮게 나타났다.

Table 3-1-11. 감미료의 함량을 달리한 미강발효음료의 배합비 및 특성

(단위: %)

원부재료	처리구				
	A	B	B	C	D
미강액	82.9	84.9	87.0	87.0	89.1
황정 열수	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
고과당	6.1	5.1	3.0	5.1	3.0
설탕	9.1	8.1	8.1	6.0	6.0
비타민 C	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
감초농축액	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
구연산나트륨	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
당도(。 Bx)	16.5	14.5	12.1	11.4	10.3
기호도	4.2	5.5	4.3	3.8	3.5

라) 산미료의 첨가비율

적절한 신맛을 부여하기 위하여 첨가한 산미료의 수준은 비타민C의 함량과 구연산 나트륨의 함량은 조절하여 얻었다. 관능검사결과 비타민C의 함량이 0.34% 구연산 나트륨의 함량이 0.34% 였을 때 가장 높은 기호도를

보였다.

Table. 3-1-12 산미료의 함량을 달리한 미강발효음료의 배합비 및 특성
(단위: %)

원부재료	처리구			
	A	B	C	D
미강액	84.9	84.8	84.8	84.8
황정 열수	1.0	1.0	1.0	1.0
고과당	5.1	5.1	5.1	5.1
설탕	8.1	8.1	8.1	8.1
비타민 C	0.34	0.4	0.34	0.4
감초농축액	0.2	0.2	0.2	0.2
구연산나트륨	0.34	0.34	0.4	0.4
당도(。 Bx)	13.5	13.4	13.2	13.4
산도(%)	0.29	0.31	0.31	0.33
당/산비	46.5	43.2	42.5	40.6
신맛강도	4.3	5.5	5.2	7.0
기호도	7.5	4.1	4.0	1.8

라) 향의 종류 및 첨가비율

향의 종류를 달리하여 미강발효음료를 제조한 후 관능검사한 결과는 Table 3-1-13과 같았다. 패널들은 복숭아향을 첨가한 시료에서 가장 높은 기호도를 나타내었으며 레몬향과 오렌지 향이 그 뒤를 이었다. 따라서 최종배합비에서는 복숭아향을 채택하였으며 이 복숭아 향은 미강발효액이 가지는 독특한 향과도 가장 유사한 노트를 가져 잘 어울리는 것으로 판단되었다.

Table. 3-1-13 향의 종류 및 첨가량을 달리한 미강발효음료의 배합비 및 특성

(단위: %)

원부재료	처리구				
	A	B	C	D	E
미강액	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9
황정 열수	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
감초농축액	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
고과당	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
설탕	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
비타민 C	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
구연산나트륨	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
복숭아향	0.02	-	-	-	-
오렌지향	-	0.02	-	-	-
사과향	-	-	0.02	-	-
배향	-	-	-	0.02	-
레몬향	-	-	-	-	0.02
당도(。 Bx)	13.4	13.4	13.4	13.5	13.3
산도(%)	0.28	0.30	0.27	0.27	0.28
당/산비	55.0	51.3	57.0	57.4	54.6
기호도	6.5	3.5	2.6	2.1	3.8

마) 최종배합비

실험 결과 결정 된 최종 배합비는 Table 3-1-14와 같았다. 최종 배합비에 의하여 생산된 음료의 pH가 4.6으로 음료의 저장성에 필요한 pH보다 다소 높았으므로 저장성을 향상시키고 다른 관능적 품질에 영향을 최소화하기 위하여 보존제로 안식향산을 0.05% 수준으로 첨가하였다.

Table. 3-1-14 미강발효음료의 최종 배합비 및 특성

원부재료	배합비	비고
미강액	84.9	
황정 열수	1.0	
감초농축액	0.2	
고과당	5.1	
설탕	8.1	
비타민 C	0.34	
구연산나트륨	0.34	
복숭아향	0.02	
안식향산	0.05	
당도(。 Bx)	13.4	
산도(%)	0.28	
당/산비	47.8	
pH	4.6	
성상	좌동	고유의 향미를 가진 액체
대장균군	음성	음성
세균수(cfu/ml)	25	1ml당 100이하
보존료(g/kg)	0.05 (배합비로)	안식향산 (0.05이하)

바) 저장중의 품질 변화

최종 배합비에 의하여 제조된 미강발효음료의 저장 중 품질 변화를 조사하기 위하여 음료를 100℃에서 10분간 살균한 후 냉각하여 각각 4℃, 실온, 37℃의 온도에서 80일간 저장하면서 pH, 산도, 전체적 기호도 및 색도등의 변화를 관찰하였다(Fig 3-1-16 부터 Fig 3-1-17) 그 결과 저장기간 중 전체적인 기호도를 제외한 대부분의 항목에서 그 변화는 크지 않았다. 다만 전체적인 기호도의 경우 37℃ 저장 시료에서 저장 20일이 지난 후부터 다른 시료에 비하여 기호도가 저하되는 것으로 나타났으며 실온 저장의 경우에도 약간의 기호도 감소가 있었으나 미미하였고 냉장온도에서 저장된 시

료의 경우에는 초기의 기호도에서 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 저장중 색도의 변화를 살펴보면 명도는 저장기간이 증가함에 따라 모든 시료에서 약간 감소하였다. 황색도에서는 대부분의 시료에서 큰 변화가 없었으나 적색도는 60일 저장 후 약간 감소하였다가 다시 증가하는 경향을 보였다.

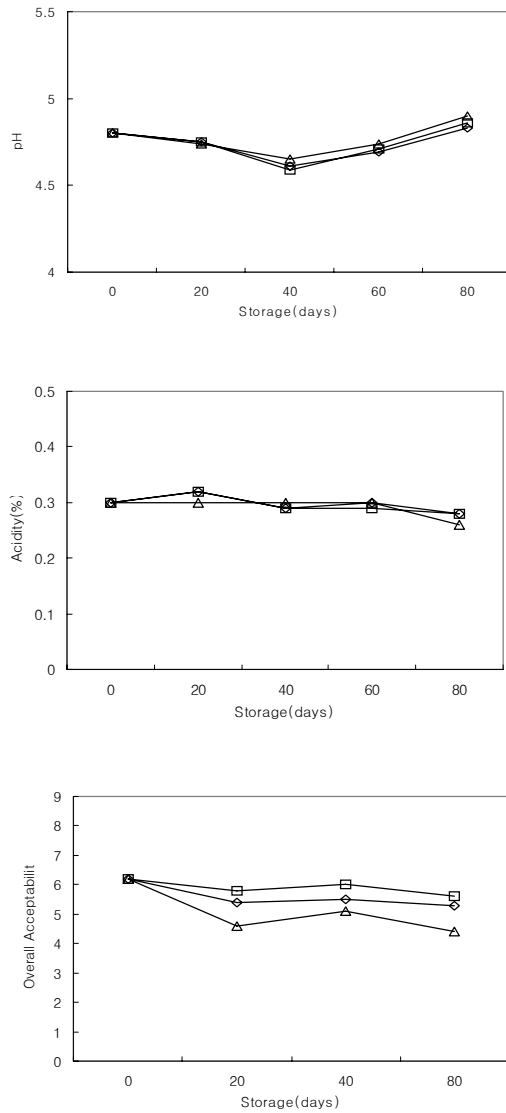


Fig 3-1-16. Changes in acidity, pH and overall desirability of fermented rice bran beverage during storage at 4°C, room temperature and 37°C (□-□: 4°C, ◇-◇: room temperature, △-△: 37°C)

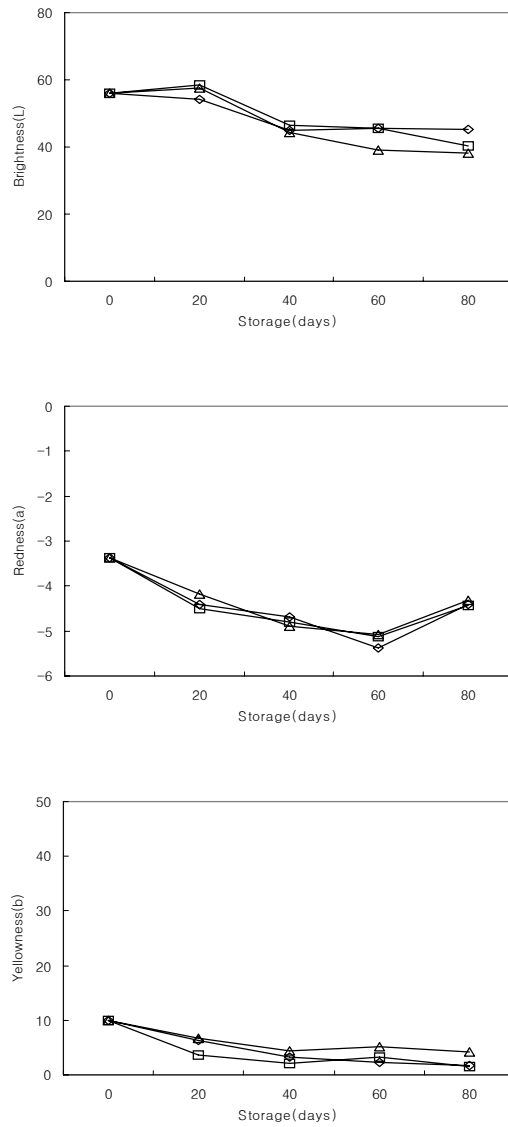


Fig 3-1-17. Changes in color of fermented rice bran beverage during storage at 4°C, room temperature and 37°C
 (□-□: 4°C, ◇-◇: room temperature, △-△: 37°C)

제 2 절 미강 발효액 생산 균주 선정 및 생산 최적화

1. 서 설

미강은 현미의 도정중 생산되는 부산물로 많은 양의 지방, 비타민 B군 및 양질의 단백질, 섬유질을 함유하고 있다 (Juliano, 1985). 연간 385,000 톤에 달하는 생산량을 보이는 미강은 이러한 우수한 영양적 가치에 비해 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지 70%는 사료나 비료 등의 저가치 물질로 이용되거나 농산 폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적 이용에 대한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 최근 미강은 건강식품으로서의 인식이 새로워지면서 이들을 이용한 많은 가공 및 건강보조식품에 대한 연구가 진행되고 있어 일본의 경우 피부 보습효과를 목적으로 미강을 미생물 발효시킨 발효액을 화장품 및 입욕제에 이용하고 있는 실정이다 (Nakayama and Horii, 1988). 국내에서는 곡류를 압출공정을 처리한 후 세포벽 가수분해효소를 첨가함으로써 페루릭산 (ferulic acid), 폴리페놀 (polyphenols)와 아라비노키실란 (arabinoxylan) 등의 유용한 생리활성물질을 제조하는 연구가 진행되었으며 (황 등, 2001), 미강을 액화효소 및 당화효소로 전처리한 후 효모로 발효시켜 얻은 미강발효액기스의 제조방법과 이를 주방세제, 천연 입욕제와 조미료로 활용하고자 하는 연구가 진행되었다 (손 등, 1991).

미강 발효액을 이용한 손상된 생체 내 여러 생리활성 기능을 회복하고 숙주의 방어기능을 조절할 수 있는 생체조절 물질의 생산은 현재까지 연구 개발되어 온 식품신소재들 중에서 향후 고령화 사회의 건강유지 및 공해문제와 관련하여 제 2세대의 식품신소재로 분류되고 있으므로, 미강에 함유된 생체조절 물질을 소재화함에 있어 오랫동안 식품소재로 이용되어 온 미강을 미생물에 의해 발효화 하는 것은 최종물질의 안전성 확보가 용이하므

로 의약품 및 기능성식품 소재로 활용이 가능할 것이다.

자연계에 존재하는 천연물질 중에는 생체에 다양한 기능을 하는 물질들이 존재할 것으로 기대되어 이에대한 관심이 날로 증가되고 있다. 특히 담자균류 (Yamada, 1984), 한약재 (Yamada and Kiyohara, 1989), 고등식물 (Roesler et al., 1991), 곰팡이류 (Saito et al., 1992)로부터 면역활성 조절 물질을 얻으려는 노력이 계속되고 있다. 이들은 주로 저분자 물질보다는 고분자 물질로 항암효과 (Ohmori et al., 1988; Kanayama et al., 1983), 항보체활성 (Saito et al., 1992), lymphocyte 분열 유도활성 (Hara et al., 1991) 등의 면역활성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 이들 활성의 일부는 다당에 기인한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 생리활성을 가지는 미강 발효액 제조를 위해 효모, 곰팡이, 버섯류의 배양액에 대한 활성을 측정 후 이들 균주중에 가장 생리활성 물질 생산이 우수한 *Monascus pilosus*을 선별하여, 선별된 균주에 의한 생리활성 물질, 즉 활성다당 생산에 대한 발효조건을 비교 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 한국중균협회에서 분양받은 *Monascus pilosus* KCCM 60029를 사용하였으며, 보관용배지로는 PDA (potato dextrose agar) 사면배지를, 액체배양 기본배지로는 5% rice bran, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.25% KH₂PO₄ (pH 6.0)의 배지를 사용하였다.

나. 배양조건 최적화

생리활성 다당의 생산을 위한 배지의 최적화를 위해, 탄소원, 질소원, 무기질 및 pH와 온도에 대한 영향을 측정하고자, 각 탄소원을 기본배지에

2% 첨가하여 5일간 배양 후 활성다당생산량을 측정하였다. 질소원은 미강 2%를 함유한 기본배지에 0.5% 질소원을 첨가하여 활성 다당 생산량을 측정하였다. 무기질은 미강 2%, peptone 0.5% 첨가된 기본배지에 무기질 0.1%를 각각 첨가하여 활성다당 생산량을 측정하였으며, pH 및 온도에 따른 영향은 각각 20, 30, 40, 50℃와 pH 4, 5, 6, 7, 8에서 각각의 활성 다당 생산량을 측정하였다.

다. 미강 농도에 의한 영향

기본배지 (초기 pH 5.0, 배양온도 20℃)에 미강의 농도를 각각 달리하여 5일간 배양하여 활성 다당 및 glucosamin의 함량을 조사하였다.

라. 부산물 첨가효과

미강 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%에 농산 부산물인 당밀 (전당 50% 함유), 전분박 (탄수화물 7.7%, 단백질 0.05%), 순물 (탄수화물 1.4%, 단백질 0.3%), 효모 가수분해물, corn steep liquor (CSL)을 각각 고품분 함량으로 0.5% 첨가에 따른 활성 다당 및 glucosamin의 생산량에 미치는 효과를 조사하였다.

마. 당밀과 CSL 첨가 농도에 따른 효과

미강 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%에 농산 부산물인 당밀과 CSL을 각각 0-2% 첨가하여 활성 다당 및 glucosamin의 생산량에 미치는 효과를 조사하였다.

바. 효소첨가 효과

미강의 생리활성 물질로 추정되는 arabinoxylan이 미강내의 단백질 또는 전분과 결합되어 있어 *M. pilosus* 발효시 생산되는 효소의 작용에 의해 유

리·분해되어 생리활성물질인 exo-biopolymer로 전환되는 것을 가정하여 미강발효액을 ammonium sulfate 농도 30%-70%로 분획을 이룰 20 mM 인산염완충용액 (pH 6.5)에 투석하여 얻은 투석액을 조효소액으로 사용하여 미강 가수분해를 실시하여 생리활성물질인 exo-biopolymer의 생산 경향을 측정하였다.

사. 활성 다당

생리활성 물질인 활성 다당의 생산량은 박등 (2001)의 방법에 준하여 측정하였다. 미강 발효액을 12000 g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상정액에 4배량에 해당되는 에탄올을 가하여 4℃에서 12시간 방치하였다. 12시간 후 12000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전을 80℃에서 12시간 건조 후 무게를 측정하여 활성다당을 측정하였다.

아. Glucosamine 측정

발효과정중의 곰팡이의 성장은 glucosamine 함량을 측정하여 나타내었다. 발효액을 80℃에서 12시간 동안 건조 후 분쇄하여 400 mg을 cap tube에 취하고 6 N HCl 5 ml를 가하여 121℃에서 60분간 처리하였다. 이것을 원심분리 (2,800 g, 15분)하고, 상정액 0.5 ml을 취하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 HCl을 완전히 제거한 다음 다시 1 ml의 증류수로 용해시켜 Swift 법 (1968)에 따라 glucosamine 함량을 구하였다. 각 농도별 glucosamine 수용액 3 ml에 6 N HCl 3 ml를 가하여 동일한 방법으로 처리하여 얻은 검량선에 의해 각 시료의 glucosamine 함량을 구하였다.

자. Macrophage 활성화 측정

Macrophage 활성도는 macrophage의 lysosomal phosphatase의 활성측정을 이용하여 실시하는데 이 방법은 다음과 같이 진행하였다. 즉, 5-10주

령 음성 ICR Mouse의 복강에 1 ml의 thioglycollate medium을 주입한 뒤 48-72시간 후에 RPMI-1640 medium으로 mouse의 복강을 세척한 후 macrophage를 복강으로부터 회수하였다 (Herscowitz et al., 1981). 회수된 macrophage를 RPMI-1640 medium으로 두 번 세척하고 세포수가 1×10^6 cells/ml RPMI-1640이 되도록 RPMI-1640 medium에 재분산시켰다. 이 분산액을 96-well plate의 각 well에 180 μ l씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 macrophage cell이 각각의 well plate의 기벽에 부착하여 monolayer를 형성시켰다. 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 180 μ l씩 분주하고 시료 20 μ l을 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 재배양하여 macrophage를 활성화시켰다. 이렇게 활성화된 macrophage의 monolayer에 0.1% triton X-100 (25 μ l)을 가하여 macrophage의 세포막을 용해시켜 이 때 분비되는 lysosome의 phosphatase에 기질로서 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate (150 μ l) 및 0.1 M citrate buffer (50 μ l)와 같이 넣어주어 1시간 동안 산성상태에서 반응시킨 후 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 phosphatase의 활성을 측정하였다 (Suzuki et al., 1990).

차. Mitogenic activity

Lymphocyte mitogenic activity는 MTT assay법 (Takemoto et al., 1988)으로 측정하였다. MTT assay는 ICR mouse로 부터 비장을 적취한 후, ice cold RPMI-1640 medium이 담겨져 있는 petri dish에 옮기고 금속체 (mesh # 100)를 patch위에 위치시킨 다음 주사기의 고무마개로 누르면서 patch로부터 세포를 방출시켰다. 이 액을 금속체 (mesh # 200)를 사용하여 여과하고 상기 medium으로 세 번 세정한 후 세포농도를 5×10^6

cells/ml RPMI-1640으로 조정, 90 μ l씩을 96 well plate에 분주한 다음 시료 10 μ l(대조군은 생리 식염수)를 가하고 37°C, 3일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그후 1 mg/mL농도의 MTT solution을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5-6시간 반응시킨고 생성된 MTT formazan 침전물을 얻기 위해 조심스럽게 상등액을 제거하고 이때 얻어진 formazan은 100 μ l의 0.04N HCl/isopropanol을 가하고 5분간 용해하고 동량의 물을 가한 후 한 후, 570 nm에서 흡광도를 비교하여 lymphocyte의 증식도를 비교하였다.

카. 장관면역 활성화 측정

장관면역 활성화는 Hong 등 (1998)의 방법에 의거하여 측정하였다. 7주령 C3H/HeN female mouse를 경추탈구하여 치사시켜 소장벽에 부착되어 있는 Peyer's patch를 잘라내어 Hank's balanced salt solution (HBSS)이 담겨져 있는 cell culture용 petridish로 옮기고, 금속체(100 mesh)를 Peyer's patch 위에 놓은 다음, 주사기 고무마개로 누르면서 patch로 부터 세포를 방출시켰다. 이 세포 현탁액을 금속체(200 mesh)로 여과시키고, HBSS로 세척한 후 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포 농도를 2.0×10^6 cells/ml로 조정하여 세포용액을 조제하였다. 이를 96 well plate에 200 μ l 씩 분주한 후 일정 농도의 시료를 20 μ l 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 5일간 배양하였다. 이 배양 상등액을 취하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다. 한편 동일 종의 mouse 대퇴부 뼈를 적출하여 주사기 바늘을 이용하여 HBSS를 뼈 속으로 넣어 골수세포를 회수한 후, 위와 같이 여과, 세척하고 세포농도를 2.5×10^5 cells/ml로 조정하여 96 well plate에 100 μ l 씩 분주하였다. 그 후 Peyer's patch cell과 시료와 반응시킨 배양상등액 50 μ l 와 RPMI 1640 배지를 50 μ l를 각각 plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 6일간 배양하였다. Bone marrow cell의 증식도 활성화 측정은 AlamarBlue™ assay 법을 이용하였다.

골수세포의 배양 종료 18시간 전에 AlamarBlue™ 용액 20 μ l를 첨가하여 반응시킨 후에, 형광정도를 excitation 544 nm 와 emission 590 nm에서 형광분석기(Luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer Limited. U.K)로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 생산균주에 따른 면역증강효과

미강배지를 이용한 각종 균주 발효액 및 발효조건을 달리한 미강발효액을 대상으로 2차에 걸친 생리활성 검색과정을 행하였다. 생리활성은 Peyer's patch cell 자극을 통한 bone marrow cell의 증식정도를 측정하는 장관면역 활성화와 mouse 복강 macrophage를 이용하여 시료의 phosphatase 자극활성을 측정하는 macrophage 활성화, 그리고 mouse의 비장세포의 증식도를 측정하는 lymphocyte mitogen 활성을 기준으로 screening을 행하였다.

미강 발효액은 Table 3-2-1에 제시되어 있는 바와 같이 균종 및 발효조건이 상이한 상태 였으며 활성측정을 위해 수 가용획분만을 추출하고 동결 건조하여 시료를 조제하였으며 모두 동일농도로 생리 식염수에 녹여 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

1차 검색에서는 주류, 장류등 발효식품 제조에 많이 사용되는 *Aspergillus* 2개 균종과 *Monascus* 5개 균종으로 액체배양과 고체배양으로 발효조건을 달리하여 배양하였으며 액체발효에 의한 시료 rb1 - rb7번, 고체발효에 의한 시료 rbA - rbG 등 총 14개 시료를 대상으로 생리활성을 측정하였다. 장관 면역 활성화의 경우, Fig. 3-2-1에 나타난 바와 같이 100 μ g/ml 농도에서 무첨가군에 비해 대체로 높은 활성이 나타났으며 특히 *Asp. oryzae*를 미강 기질로 액체배양한 rb2 시료와 *Monascus pilosus*를

액체 또는 고체배양한 rb3와 C에서 LPS의 활성보다 다소 높은 활성을 보였다. 또한 rb4 (*M. anka*, 액체), rbA (*A. sojae*, 고체), rbD (*M. anka*, 고체), rbE (*M. ananesus*, 고체)시료에서도 양호한 활성이 관찰되었다. Macrophage 활성화에서도 위에 언급한 시료들은 LPS 이상의 높은 활성화 양상을 보였으며 대체로 농도 의존적인 경향을 나타내었다 (Fig. 3-2-2). Mitogen 활성의 경우는 양성 대조군 보다는 낮았지만 무침가균에 비해서 상기 6개 균종은 공히 높은 활성을 보였다 (Fig. 3-2-3). 따라서 rb2, rb3, rb4, rbA, rbC, rbD 및 rbE 시료를 2차 검색을 통하여 재차 활성여부를 검토하였다.

2차 검색에서는 상기 7개 시료만을 대상으로 면역활성을 재평가하였다. 장관면역활성의 경우 1차 결과와 유사하게 높은 활성을 보였으며 특히 rb-2, rb-3와 rb-C의 경우 농도의존적으로 높은 활성을 보였다 (Fig. 3-2-4). Mitogen 활성과 macrophage 활성의 경우도 (Fig. 3-2-5, 3-2-6) 모두 양호한 활성을 보였으며 특히 rb-2, rb-3와 rb-C 시료는 저농도에서도 안정적으로 고활성을 나타냈다.

이상의 결과로 부터 미강 발효액으로부터 생리활성 소재의 생산을 위해 선 *Monascus pilosus*를 이용한 액체 배양액 조제가 가장 적절한 방법으로 사료되었다.

Table 3-2-1. Several microbial strains for the production of fermented rice bran products

	Sample	Strain name	Culture condition
1st Screening	rb1	<i>Asp. sojae</i>	Liquid
	rb2	<i>Asp. oryzae</i>	"
	rb3	<i>Monascus pilosus</i>	"
	rb4	<i>M. anka</i>	"
	rb5	<i>M. ananesus</i>	"
	rb6	<i>M. pupuresus</i>	"
	rb7	<i>M. ruber</i>	"
	rbA	<i>Asp. sojae</i>	Solid
	rbB	<i>Asp. oryzae</i>	"
	rbC	<i>Monascus pilosus</i>	"
	rbD	<i>M. anka</i>	"
	rbE	<i>M. ananesus</i>	"
	rbF	<i>M. pupuresus</i>	"
rbG	<i>M. ruber</i>	"	
2nd Screening	rb-2	<i>Asp. oryzae</i>	Liquid
	rb-3	<i>Monascus pilosus</i>	"
	rb-4	<i>M. anka</i>	"
	rb-A	<i>Asp. sojae</i>	Solid
	rb-C	<i>M. pilosus</i>	"
	rb-D	<i>M. anka</i>	"
	rb-E	<i>M. pupuresus</i>	"

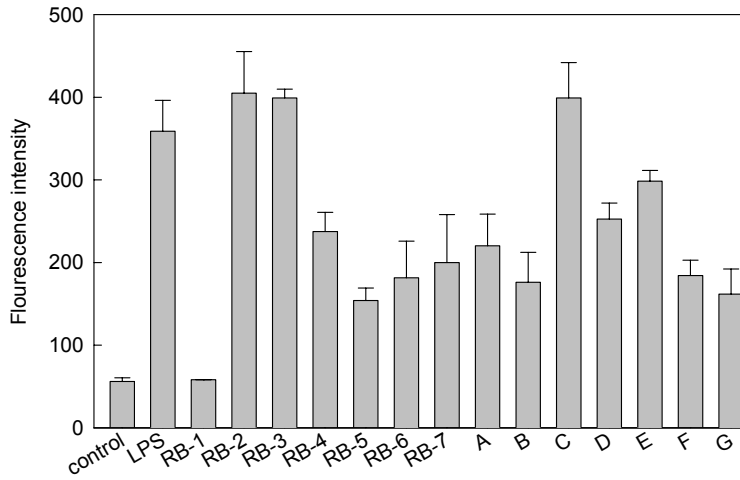


Fig. 3-2-1. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

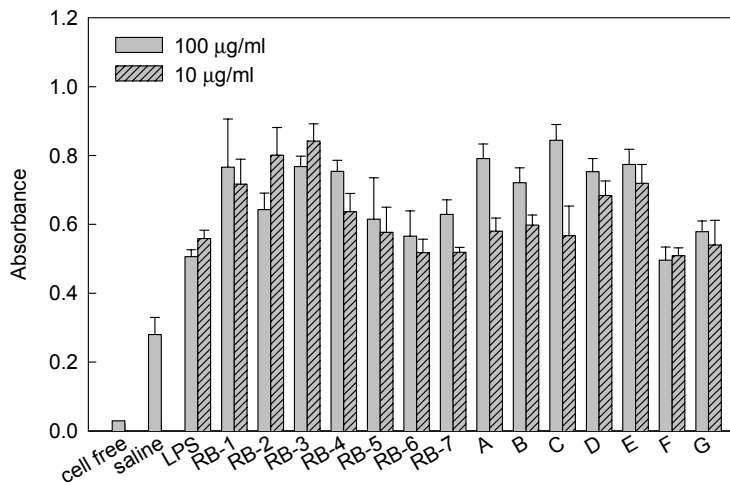


Fig 3-2-2. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

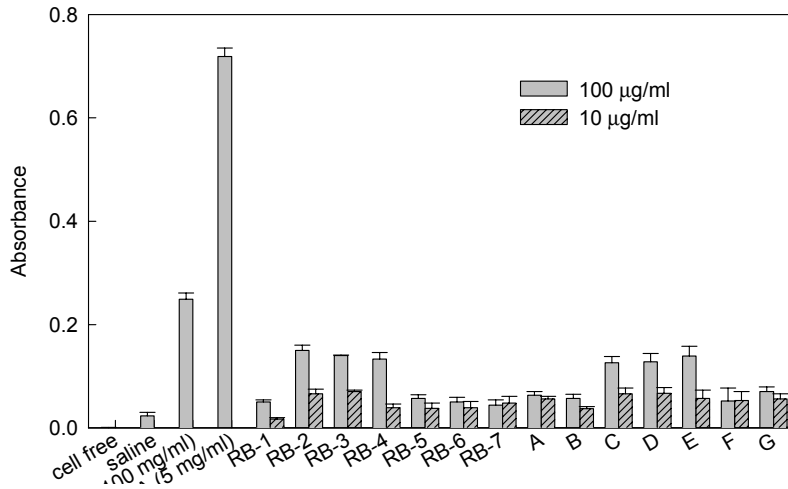


Fig 3-2-3. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

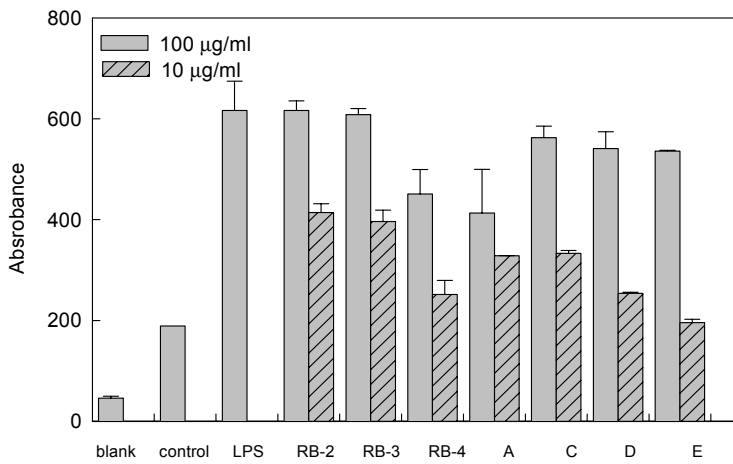


Fig 3-2-4. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

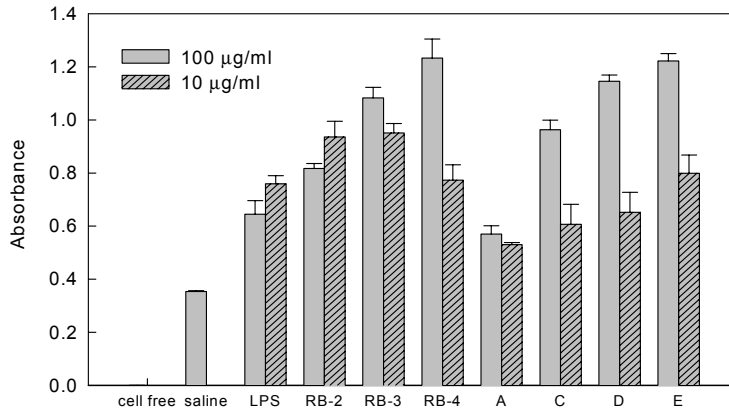


Fig 3-2-5. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

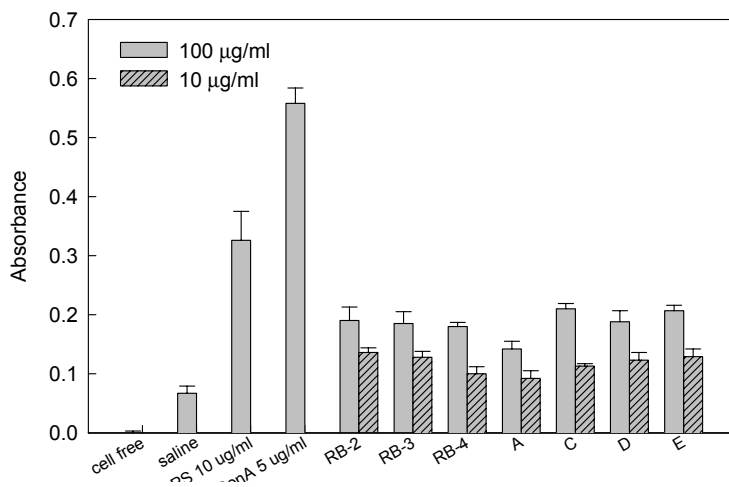


Fig 3-2-6. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

나. 면역활성 다당 최적 생산조건 확립

1) 탄소원의 영향

미강, sucrose, glucose 등 탄소원을 각각 2%씩 기본배지에 첨가한 후 5일간 배양한 결과 (Fig 3-2-7), 활성 다당의 생성량이 미강 첨가시 가장 높은 13.8 mg/ml이었으나, 균체 증식을 나타내는 glucosamine의 양은 74.1 µg/ml로 sucrose와 maltose의 첨가시 86.7 µg/ml와 77.2 µg/ml 보다는 다소 낮은 균체량을 보였다. Xylose 첨가시 활성 다당은 13.2 mg/ml로 비교적 높은 다당 생산량을 보였으나, glucoseamine의 양은 44.2 µg/ml로 낮은 균체량을 보였다. 다당의 생성량과 균체 증식량은 상호 연관성이 없는 것 같으며, 배양이 진행될수록 pH가 증가되는 경향을 보였다.

Flammulina velutipes (이 등, 1994)와 *Pleurotus sajor-caju* (송 등, 1996)에 의한 항보체 활성을 지닌 exo-biopolymer생산시 탄소원으로 galactose와 lactose를 각각 선정하였으며, 생리활성 물질 생산과 균사체 증식과는 상호 연관성이 없는 것으로 보고하고 있다.

2) 질소원의 영향

탄소원으로 미강을 선정한 기본배지에 다양한 질소원을 배지에 첨가하여 배양한 후 배양액으로부터 활성다당의 생성량을 측정한 결과 (Fig 3-2-8), 질소원을 0.5%첨가시 균체의 증식이 73.7 µg/ml에서 149.7-263.9 µg/ml로 질소원 첨가에 따른 균사체 증식 효과를 보였으며, 활성다당의 생성량은 peptone 첨가시 15.1 mg/ml로 질소원을 첨가하지 않은 경우 (13.5 mg/ml) 보다 증가하였다. 그러나 ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate와 sodium nitrate 첨가시 활성다당 생성량은 10.6-13.3 mg/ml로 질소원을 첨가하지 않은 경우보다 활성 다당의 생성량이 적었다. 균사체 증식은 ammonium nitrate 첨가시 가장 높은 양을 보였다. 이는 *F. velutipes*에 의한 항보체 다당 생성시 ammonium nitrate 첨가시 가장 높

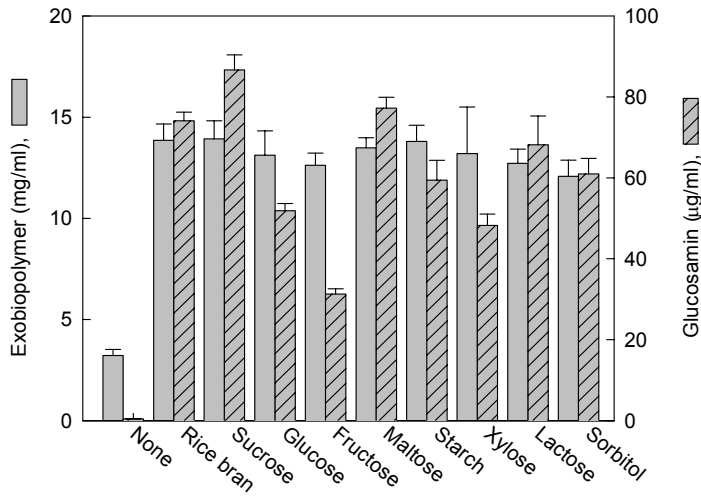


Fig 3-2-7. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various carbon sources.

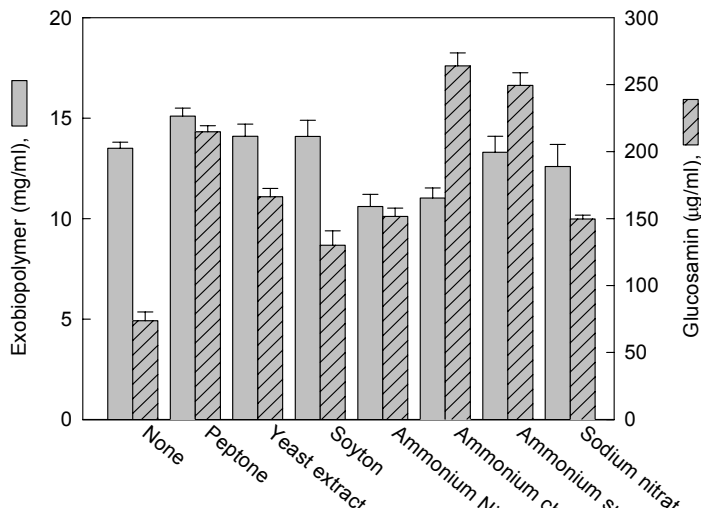


Fig 3-2-8. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various nitrogen sources.

은 규체 증식을 보였으나 활성다당의 생성량은 적었다는 보고 (이 등, 1994)와 일치한다. 또한 느타리 버섯 균사체 배양시도 ammonium tartrate가 가장 높은 균사체 증식을 보였으나 항보체 활성 다당의 생성이 적었다 (송 등, 1996). 탄소원의 첨가 효과와는 달리 대체로 균사체 증식이 적었을 때 활성 다당의 생성량이 높은 결과를 보였다.

3) 무기질의 영향

탄소원으로 미강, 질소원으로 peptone을 배지에 첨가하여 배양한 배양액으로부터 균사체량과 활성다당의 생성량을 측정한 결과 (Fig 3-2-9), KH_2PO_4 를 0.1% 첨가시 가장 높은 활성 다당 생성량을 보였으며, 균사체 증식 역시 가장 높은 균사체 증식을 보였다. 그러나 다른 무기질 첨가시의 다당 생성량과 균사체 증식량은 무기질은 첨가하지 않았을 경우보다 낮은 생성량과 증식량을 보였다. KH_2PO_4 를 0.1% 첨가가 활성다당의 생성과 균사체 증식에 효과가 있는 듯하다.

4) pH의 영향

Macrophage 활성을 지닌 활성 다당 생산에 미치는 pH와 온도의 영향을 측정한 결과, pH 5에서 가장 높은 활성 다당의 생성량과 균사체 증식을 보였으며 (Fig 3-2-10), 균사체의 증식과 활성 다당의 생성량이 앞서 첨가 효과를 보았던 탄소원이나 질소원의 경향과는 달리 상호 연관성을 지니고 있는 듯하다.

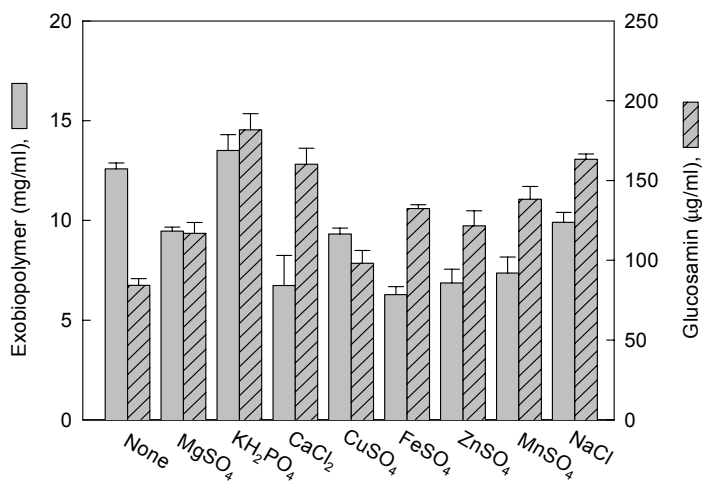


Fig 3-2-9. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various mineral sources.

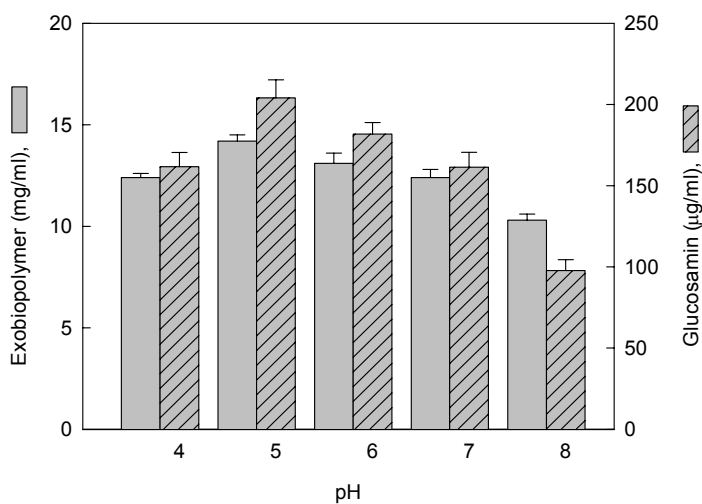


Fig 3-2-10. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various pHs.

5) 배양온도의 영향

온도에 의한 영향은 20℃일 때 가장 높은 활성 다당생성량 (17.4 mg/ml)을 보였으며, 균사체량은 137.1 µg/ml로 30℃에 비해 다소 낮은 균사체량을 보였다 (Fig 3-2-11). 활성 다당의 생성량은 20℃가 가장 높았으며, 균사체량은 30℃일 때가 가장 높았다. 이 등 (1994)과 송 등(1996)도 25℃에서 활성다당의 생성량이 가장 높았다고 보고하였다.

6) 배양시간의 영향

위의 결과를 토대로 미강 2%, peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%의 배지조상과 초기 pH 5.0, 배양온도 20℃의 배양조건에서 활성 다당과 균사체 증가량을 측정한 결과 (Fig 3-2-12), 활성 다당과 균사체 증식은 배양시간이 증가할수록 증가하는 경향을 보였으나 3일 이후에는 활성 다당의 생성량간의 유의적 차이가 없었다.

배양시간에 따른 macrophage활성을 측정한 결과 (Fig 3-2-13), 배양시간이 3일 이전에는 배양시간에 증가할수록 macrophage의 활성이 증가하는 경향을 보였으나, 3-5일 사이의 배양시간동안에는 macrophage 활성의 변화가 있었으나 유의적 차이는 없었다. 즉, 배양시간이 길어질수록 활성다당의 생성량이 증가하였으나 3일 이후부터는 활성다당외에 다른 다당의 생성이 더 많이 이루어지는 듯하므로 macrophage 활성을 지닌 활성 다당생산은 3일 배양시 가장 높았다.

7) 미강 농도에 의한 영향

Peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%의 기본배지 (초기 pH 5.0, 배양온도 20℃)에 미강의 농도를 각각 달리하여 5일간 배양한 결과 (Fig 3-2-14), 미강을 첨가하지 않은 경우 생리활성 물질인 exo-biopolymer가 3.2 mg/ml의 생산량을 보인 반면, 미강을 1-10% 첨가시 exo-biopolymer는 11.8-13.8 mg/ml

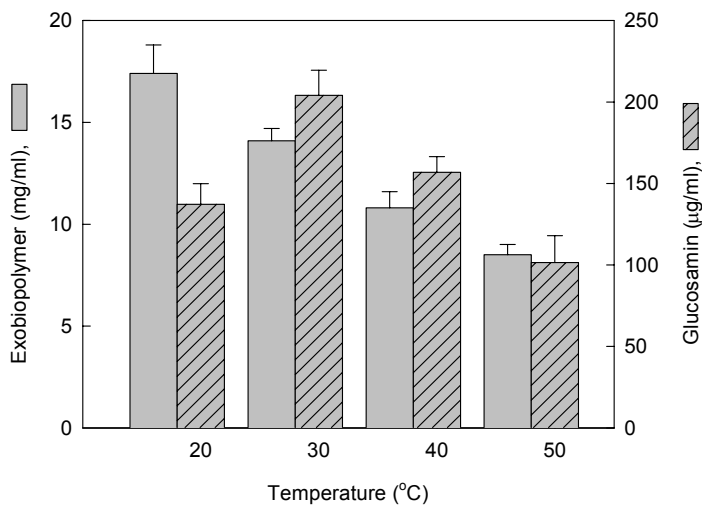


Fig 3-2-11. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various temperatures.

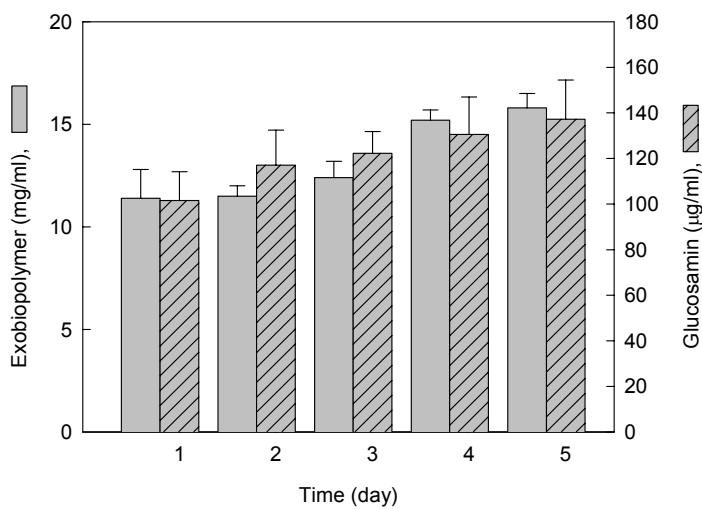


Fig 3-2-12. Exo-biopolymer production from cultured *M. pilosus* in various culture times.

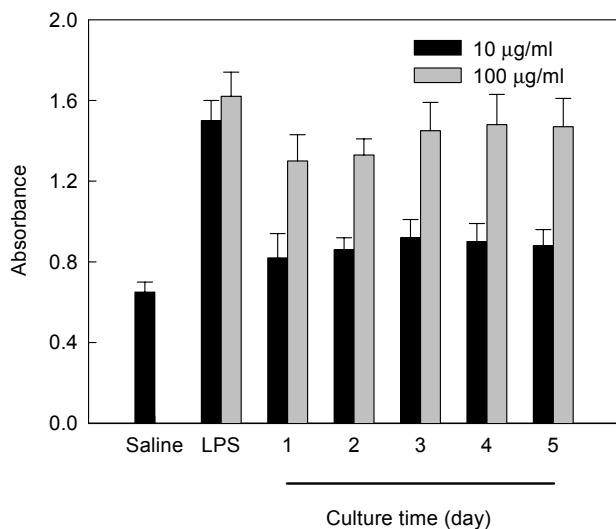


Fig 3-2-13. Macrophage activity of exo-biopolymer from cultured *M. pilosus* in various culture times.

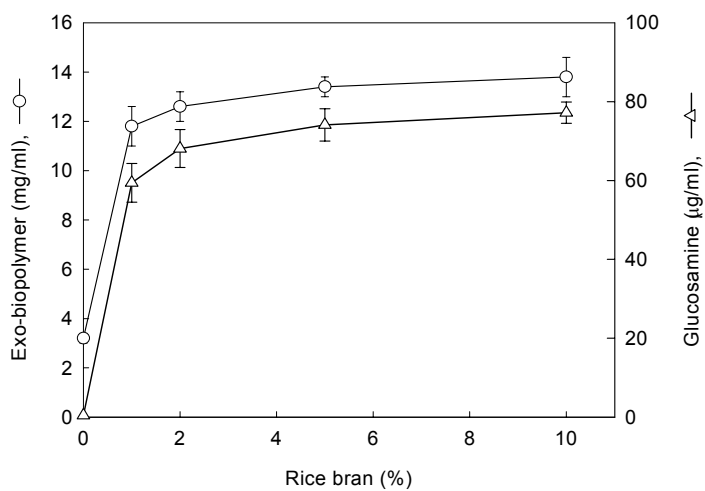


Fig 3-2-14. Effect of rice bran concentration on the production of exo-biopolymer and cell mass

의 생산량을 보임에 따라 미강이 생리활성물질인 exo-biopolymer 생산에 필수적인 영양원임을 확인하였으며, 균체량과 밀접한 glucosamine의 함량 역시 exo-biopolymer 생산 경향과 동일한 경향을 보였다. 미강 2% 이상 첨가시 exo-biopolymer와 glucosamine의 증가량을 미미하였으므로 미강 2% 첨가가 exo-biopolymer 생산에 가장 적합한 것으로 생각된다.

8) 부산물 첨가효과

미강 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%에 농산 부산물인 당밀 (전당 50% 함유), 전분박 (탄수화물 7.7%, 단백질 0.05%), 순물 (탄수화물 1.4%, 단백질 0.3%), 효모 가수분해물, corn steep liquor (CSL)을 각각 고형분 함량으로 0.5% 첨가에 따른 효과를 측정하여 (Fig 3-2-15), 농산부산물을 첨가하지 않은 기본 배지에서는 12.6 mg/ml의 exo-biopolymer의 생산량을 보였으나, 부산물 첨가한 경우 exo-biopolymer의 생산량이 11.8-14.2 mg/ml의 생산량을 보였다. 특히 당밀과 CSL 첨가시 14.2 mg/ml과 13.2 mg/ml의 생산량을 보였다. 균체량은 일반적으로 질소원으로 사용되는 순물, 효모 가수분해물, CSL에서 72.3-77.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였다. 이상의 결과에 의해 기본배지에 당밀 0.5%를 첨가할 경우 생리활성물질인 exo-biopolymer 생산량이 13%정도 증가하였다.

9) 당밀과 CSL 첨가 농도에 따른 효과

미강 2%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%에 농산 부산물인 당밀을 각각 0-2% 첨가 시 (Fig 3-2-16), exo-biopolymer의 생산량은 1.0% 첨가 시까지는 증가하는 경향을 보였으나, 2.0% 첨가 시에는 다소 감소하였다. 0.5%와 1.0% 첨가 시 14.2 mg/ml과 14.3 mg/ml의 exo-biopolymer의 생산량을 보였다. 반면, 균체량은 당밀의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여 2.0% 첨가 시 75.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 균체 증가량을 보였다. 기본배지에

당밀 0.5% 첨가 시 가장 높은 exo-biopolymer의 생산량을 보임에 따라 당밀의 농도를 0.5%로 선정 후 질소원에 해당되는 peptone 첨가 시, peptone과 CSL 첨가시를 각각 비교 하였다 (Fig 3-2-17). Peptone과 CSL을 각각 0.5%, peptone + CSL을 1.0% 첨가 시 CSL과 peptone을 혼합 사용시 보다 CSL 단독 사용시 exo-biopolymer 생산량이 13.2 mg/ml에서 15.3 mg/ml로 증가하였다. 반면 peptone 단독 사용 시에는 12.6 mg/ml의 exo-biopolymer 생산량을 보였다. CSL의 첨가농도에 따른 영향을 측정한 결과 (Fig. 3-2-17), 0.5% 첨가시 가장 높은 exo-biopolymer 생산량을 보였으며, 0.5% 이상의 농도 첨가시 exo-biopolymer 생산량은 다소 감소하였다. 따라서 질소원으로는 peptone을 사용하는 것 보다 CSL을 0.5% 첨가 사용하는 것이 바람직하다.

10) 효소첨가 효과

미강의 생리활성 물질로 추정되는 arabinoxylan은 미강 내의 단백질 또는 전분과 결합되어 있어 *M. pilosus* 발효시 생산되는 효소의 작용에 의해 유리·분해되어 생리활성물질인 exo-biopolymer로 전환되는 듯 하다. 이러한 가정하에 미강발효액을 ammonium sulfate 농도 30%-70%로 분획을 이를 20 mM 인산염완충용액 (pH 6.5)에 투석하여 얻은 투석액을 조효소액으로 사용하여 미강 가수분해를 실시하여 생리활성물질인 exo-biopolymer의 생산 경향을 측정한 결과, 당의 생산량도 미미하였고 또한 알콜에 의해 회수한 당에는 생리활성이 나타나지 않음에 따라 미강 발효액을 효소로 활용하여 생리활성물질을 얻는 것은 바람직하지 않았다. 따라서 미강 발효과정중에 arabinoxylan의 유리 또는 분해를 원활히 하고자 amylase (AM-100, (주)선인)와 protease (Pronase, Sigma)를 각각 배양액의 0.5% 첨가한 결과 (Fig 3-2-18), macrophage 활성이나 splenocyte proliferation 활성이 amylase 첨가하여 배양한 경우 효소를 첨가하지 않은 경우에 비해

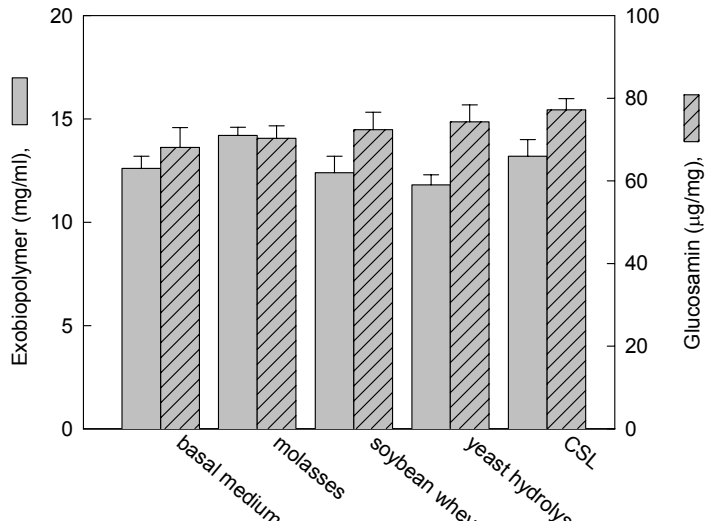


Fig 3-2-15. Effect of 5 by-product on the production of exo-biopolymer and cell mass

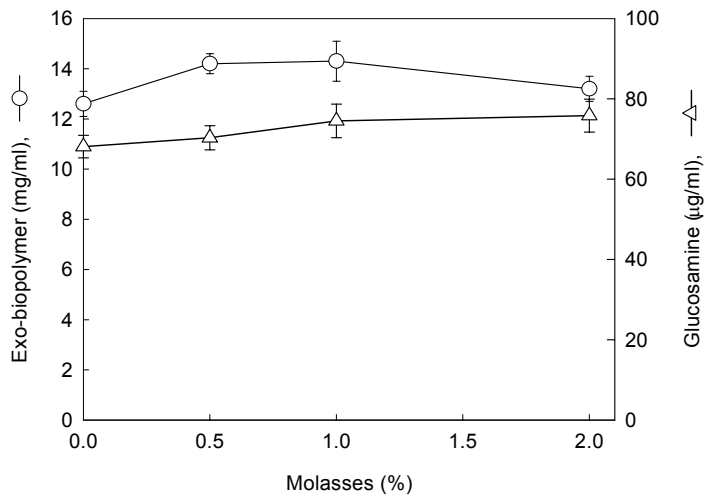


Fig 3-2-16. Effect of Molasses concentration on the production of exo-biopolymer and cell mass

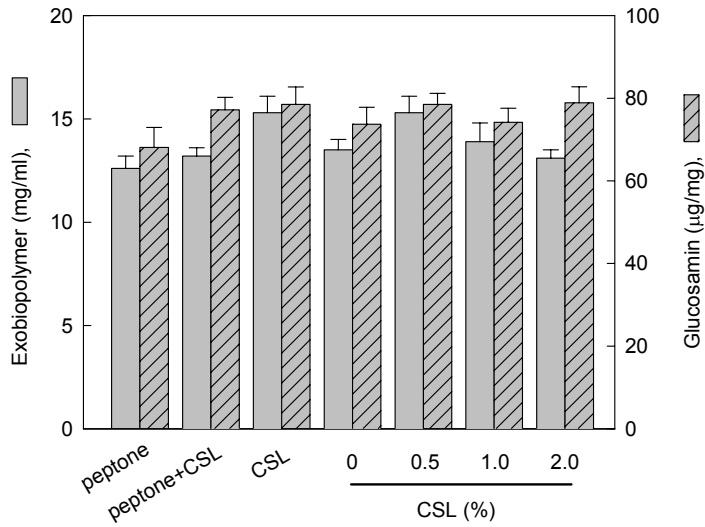
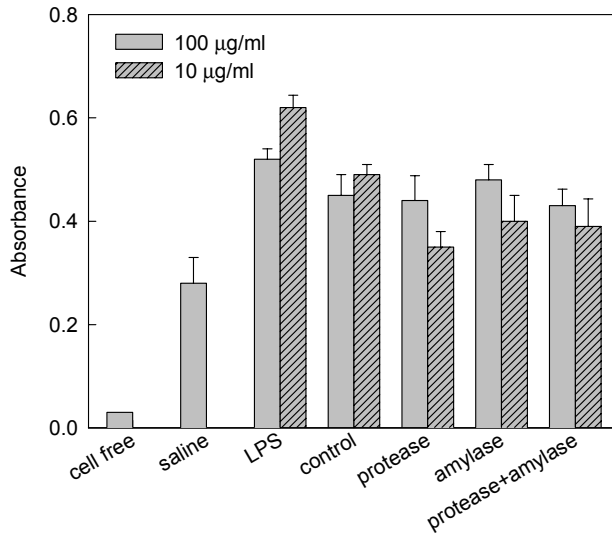
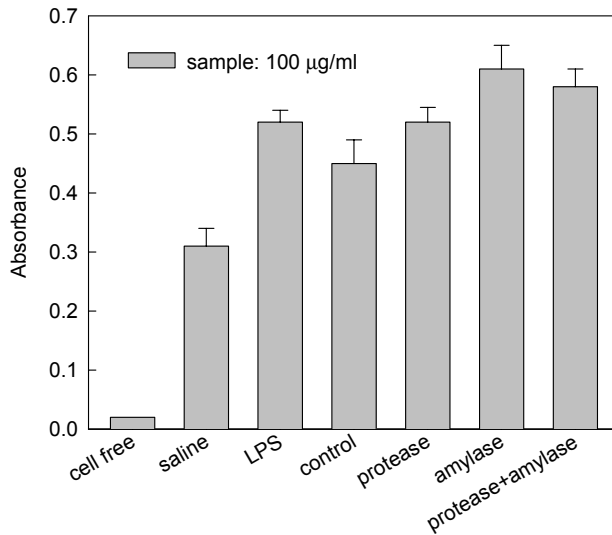


Fig 3-2-17. Effect of CSL concentration on the production of exo-biopolymer and cell mass with or without peptone



A) Macrophage activity



B) Splenocyte proliferation

Fig 3-2-18. Effect of protease and amylase addition during cultivation

다소 높은 활성 증진을 보였으며, 특히 macrophage 활성 증진보다는 splenocyte proliferation 효과 더욱 뚜렷하게 나타났다. Protease 단독 첨가 시 보다 amylase와 혼합 사용 시 활성 증진을 보임에 따라 amylase 효소에 의해 생리활성 물질의 유리가 원활히 진행됨을 확인하였다.

11) 배양시 탄수화물의 동향

지금까지 실험을 통해 선정한 미강 2%, 당밀 2.0%, CSL 0.5%, KH_2PO_4 0.1%의 기본배지 (초기 pH 5.0, 배양온도 20°C)에 amylase 0.5%를 첨가하여 배양 시 배양시간에 따른 전당, 환원당, 전분, 5탄당 및 uronic acid의 변화량을 측정된 결과 (Fig 3-2-19), 생리활성물질인 exo-biopolymer의 양은 5일 배양 시 최대의 양을 보이고 있으며, 6일과 7일 배양시 다소 감소하거나 5일 배양 시와 큰 차이를 보이지 않고 있다. 또한 전당, 환원당과 전분은 유사한 변화경향을 보였으며, uronic acid의 생산량의 변화는 미미하였다. 오탄당은 4일 배양 시 가장 높은 함량을 보인 반면 환원당은 5일째 가장 높은 경향을 보였다. *M. pilosus*를 미강배지를 사용하여 배양 시 생리활성물질과의 상관성을 측정하고자 전당, 환원당과 전분의 변화가 exo-biopolymer생산량과 밀접한 연관성이 있는 듯하며, Fig 3-2-18의 결과에서 알수 있듯이 amylase가 직·간접적으로 생리활성 물질 생산에 커다란 역할을 하는 듯 하다.

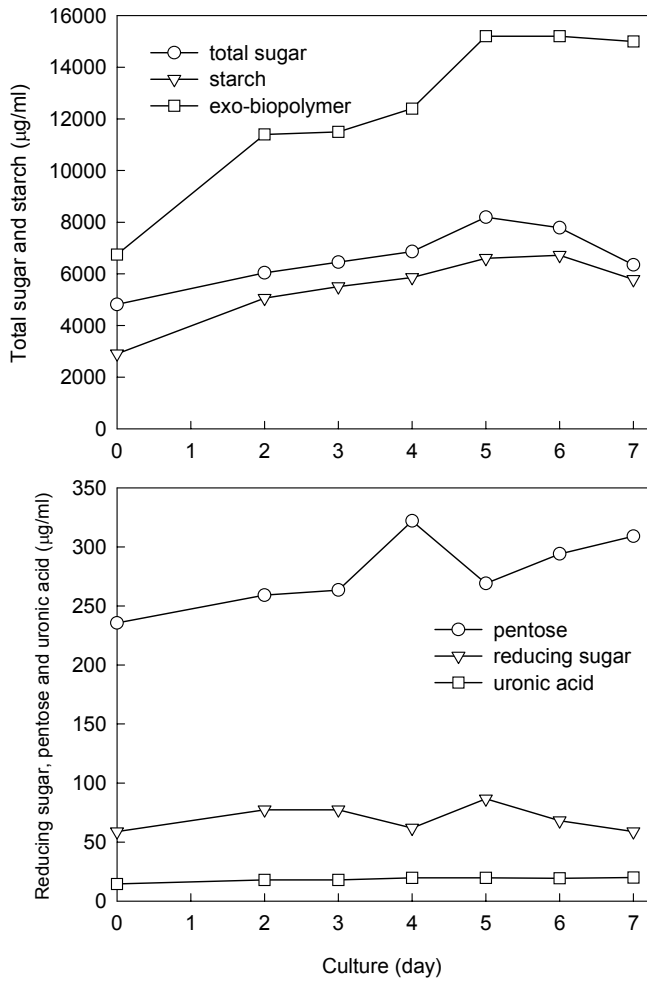


Fig 3-2-19. Carbohydrate changes during cultivation.

제 3 절 미강 발효액의 생리활성 성분 규명

1. 서 설

예로부터 인간들이 이용해 왔던 천연물 중에는 생체에 대하여 다양한 생리기능을 수행하는 물질이 함유되어 있다고 알려져 왔으며 실제로 이를 응용하여 건강유지를 위해 사용해 왔던 많은 예들이 있다. 이러한 생리활성 물질들을 생체반응조절제(biological response modifiers, BRM)라 하는데 이는 생체내 생물반응을 조절하여 항상성을 유지시켜 주는 기능을 한다고 보고되고 있다(1,2). 현재까지도 전 인류의 75%가 건강유지 및 질병방지의 목적으로 천연물을 이용하고 있다고 보고되어 있는데, 이는 최근 현대의약으로 치료가 어려운 성인병군 및 암과 같은 만성 난치성질환의 급증과 합성의약품에 의한 심각한 부작용 및 현대의약에 대한 저항성 증가 때문에 새로운 의약 소재에 대한 관심 대상이 전환되었기 때문이라고 할 수 있다. 따라서 천연물, 특히 식품이나 전통 생약재로 부터 새로운 약리활성 물질을 선별하여 대체 의약품 또는 기능성 식품으로 이용하고자 하는 연구가 계속되고 있다. 특히 오랫동안 식용이나 약용으로 이용되어온 담자균류(3,4), 한약재(5,6), 향신료(7,8) 및 여러 식품소재(8)에는 유래한 항암 활성(anti-tumor activity)(9,10), 항염증 활성(anti-inflammatory)(11), 대식세포 활성화능(macrophage activation) (12,13), 인터페론 유도활성(interferon inducing activity)(14) 및 보체계 활성화능 (anti-complementary activity)(8,15,16,17)등의 다양한 면역 증강물질이 존재한다고 보고되고 있다. 이들 중 비교적 상세한 연구가 진행된 부분에는 상황버섯(*Phelinus linteus*)(18), 저령(*Grifora umbellata*)(19), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)(20,21), 송이버섯(*Tricholima matsutake*)(6), 당귀(*Angelica acutiloba*)(22-25), 구름버섯(*Doriols versicolor*)(26) 및 양송이(*Agaricus*

bisporus)(13)등 버섯유래의 다당체 들이며, 이들은 대부분 오랫동안 식용 내지는 약용으로 사용되었던 소재로써 인체에 대한 안정성이 확보된 물질 들이라 하겠다.

면역계(immune system)의 역할은 인체를 공격하는 각종 감염성 미생물 (pathogenic bacteria, virus 등), 이물질 및 변형된 자기세포(transformed self cells, malignant cells)의 위협으로부터 생체를 보호하여 항상성 (homeostasis)을 유지하게 하는 숙주의 기관, 조직, 세포 및 각종물질을 총 칭하는데 기능적으로는 선천적 면역(innate immunity, nonspecific immunity)과 후천적 면역(adaptive immunity, specific immunity)으로 분리 된다. 감염원에 대하여 비특이적으로 최초의 방어를 담당하는 선천성 면역 계는 macrophage, natural killer cell (NK-cell)과 같은 세포와 complement, interferon, tumor necrosis factor (NGF-a)로 구성되며, 항원 특이적인 반응을 담당하는 후천적 면역계는 T-lymphocyte 및 B-lymphocyte 등이 관여하게 된다. 또한 이들 각 면역 구성요소 사이에는 다양한 종류의 cytokine류가 존재하여 긴밀한 상호 활성화와 엄밀한 제어 (cytokine network)가 이루어지고 있으며, 따라서 이상의 면역성분들이 복잡하게 연계되어 전체 면역반응의 활성화와 효율화를 담당하게 된다(27).

Macrophage는 골수로부터 혈류로 들어간 단핵구(monocyte)가 신체의 곳곳에 분포하는 망상 내피계 같은 조직 구조 형성부에서 성숙되어 생성된다.(28) 망상 내피계의 주요 기능은 혈류와 다양한 조직에 침입한 외부물질을 포획하여 식작용 세포에게 노출시키는 것이다. 단핵구 자체는 작고 약간의 돌기를 갖은 구형이며 원형질과 과립은 풍부하지만 내질 망상조직은 적은 것이 특징이다. 이러한 단핵구가 특별한 조직에 정착하게 되면 kupffer cell, alveolar macrophage, splenic macrophage, peritoneal macrophage, microglial cell 등으로 분화하게 된다. 비록 정착 위치에 따라 명명은 다르지만 항원을 포획하여 탐식작용을 일으키는 기능은 동일하며,

이는 항원 침입시 항체 형성 이전의 단계에서 즉시 반응할 수 있는 주요 방어기구이다.(29) 이러한 macrophage는 탐식작용 뿐만 아니라 내화한 항원을 부분적으로 소화해서(processing) 그것을 자신의 표면에 점착(presentation)시켜 후천적 면역계 세포가 항원을 인식할 수 있도록 antigen-presenting cell(APC)로서의 역할을 수행하며 종양 세포에 대한 상해능을 갖고 있다.(30, 31) 결과적으로 macrophage는 후천적 면역계의 effector로서 병원체의 치사율을 증강시키고 항종양 효과를 나타낸다.(24)

비장(spleen)은 면역계에서 중추적 역할을 하는 B 및 T lymphocyte의 성숙과 항원(antigen)에 의해 자극을 받은 후 분열과 분화가 이루어지는 주요 임파기관이다.(27) B cell은 stem cell에서 분화하여 성숙된 B cell이 되며 최초에는 항체(antibody)를 분비하는 세포는 아니지만 항원의 자극에 의해 항체 생산세포로 쉽게 분화 된다고 알려져 있다. 항원 자극에 의한 분화과정의 마지막 단계는 plasma cell인데 이는 소포체 안에 많은 세포질을 함유하고 있으며, 약 2~3일 동안 생존 가능한 것으로 알려져 있다. 한편 T cell은 기능에 따라 cytotoxic T cell (T_C), helper T cell (T_H), suppressor T cell (T_S)로 구분할 수 있는데 T_C 는 표면 항원과 결합한 이후 lymphokine을 방출하여 다른 T cell의 작용을 활성화하거나 macrophage를 유인하게 된다. 또한 T_H 는 plasma cell의 분화와 성숙에 도움을 주고, T_S 는 면역 반응을 억제시키는 주요 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

B cell이 자극을 받게 되면 항원에 특이적인 immunoglobulin(Ig)을 생산하여 혈류로 방출하게 되며, 이러한 기능을 보조해 주는 여러 분자들을 B cell의 표면에 갖고 있다. $Ig\alpha$ 와 $Ig\beta$ 는 항원이 Ig에 결합하게 되면 그 신호를 전달받아서 B cell 내부의 kinase를 자극하는 signal transduction의 역할을 하며 CD19, CD20, CD21도 유사한 역할을 수행하게 된다. 또한 CD40은 T cell이 분비한 cytokine의 자극을 받아 Ig의 isotype switching에

관여한다. 그리고 B cell은 MHC (major histocompatibility complex)에 내화한 항원의 일부를 결합시켜 T cell의 cytokine 유출을 증가시키며 그 외에 IgG를 위한 Fc receptor로서의 CD32 등이 있다. T cell 표면은 항원과 결합할 수 있는 $\alpha\beta$ 를 갖고 있으며 그 주변에 signal transduction complex인 CD3+ ζ 를 갖고 있다. 또한 CD4 혹은 CD8은 표적세포나 APC의 MHC분자와 결합하는 보조 수용체이며, 이 또한 signal transduction분자로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

면역반응에 관여하는 세포들은 효과적인 기능의 수행을 위하여 림프계(lymphoid system)라는 조직이나 기관을 구성하며 크게 1차(중추) 림프계(primary lymphoid system)와 2차(말초) 림프계(secondary lymphoid system)로 분류된다(30). 실질적으로 림프구를 생산하고 분화, 성숙시키는 1차 림프계는 흉선(thymus)와 골수(bone marrow)로 구성되며, 림프구와 항원과의 접촉 또는 림프구간의 상호작용을 돕는 2차 림프계는 비장(spleen), 림프절(lymph node), 점막림프기관(mucosal associated lymphoid tissue; MALT)으로 이루어진다(32). 2차 림프계 중 생체 림프조직의 1/3 이상을 차지하고 있는 점막림프기관은 수많은 필수영양소의 소화와 흡수를 담당하며, 유해물질과 병원성 세균 등에 물리적 장벽의 역할을 수행할 뿐 아니라 면역학적 barrier로서의 기능도 갖고 있다(33,34). 이들 점막림프기관 중 장관의 점막부위에 존재하는 장관관련 림프조직(gut associated lymphoid tissue; GALT)은 생체 내에서 가장 넓은 점막림프조직으로 Peyer's patch, lamina propria, 장관막 림프절(MLN) 등으로 구성되며(25), 점막표면에 IgA를 분비하기 위한 inductive site로 알려져 있다. 이중 Peyer's patch는 공장(ileum)과 결장(colon)의 antimesenteric side에 존재하는 림프구 집합체로써, 이들의 분포도와 수는 개인이나 종(species)에 따라 다르고 회장에 이르러 가장 뚜렷하게 나타나는 것으로 알려져 있으며, 나이가 들면서 그 수와 크기가 점차 작아지는 것으로 보고되고 있다(35).

Peyer's patch의 lumen dome을 덮고 있는 세포층에는 전문화된 상피세포인 M cell이 존재한다. M cell은 phagocytosis에 의해 장 내강의 항원을 직접 포획할 수 있어 Peyer's patch 내 림프구와 대식세포로 운반하여 림프구를 활성화시키고 대식세포에 항원을 제시(presentation)하는 역할도 한다. 따라서 Peyer's patch에서 감작된 림프구들은 germinal center에서 분화하고 성숙하여 장관막 림프절을 통해 다른 점막 조직으로 이동하며 체내를 순환할 수 있게 된다(36). 또한 이와는 별개로 Peyer's patch의 몇몇 활성화된 림프구는 독소나 바이러스를 중화시키는 작용 및 상피세포에 bacteria가 점착되는 것을 조절하는 역할을 하는 분비형 IgA(sIgA)를 생산하는 plasma cell로 분화하기 위해 다시 lamina propria로 돌아오기도 한다(37,38). 즉, 장 관내에 들어온 활성물질은 M cell에 의해 포획되어 Peyer's patch 내 lymphocyte를 활성화시키고, 주변 대식세포에 항원을 제시함으로써 다른 면역기관의 세포들을 자극시킬 수 있어 궁극적으로 전신 면역활성화에 기여할 수 있게 되는 것이다.

최근 한약재로 부터 추출한 면역활성성분에 의해 Peyer's patch의 T cell을 활성화시켜 IL-6 및 GM-CSF 같은 조혈계 세포의 성숙 및 분화에 필요한 cytokine을 생산함으로써 골수세포를 증식시킨다는 연구나 십전대보탕 내 창출 성분에 의한 장관면역 자극을 통한 골수세포 증식 활성화(39), 꿀의 껍질부에 존재하는 pectic polysaccharide와 flavone glycoside에 같은 활성이 있음이 보고되고 있으며(40), 술잎의 methanol 추출물에서도 높은 장관면역 활성을 통한 골수세포 증식활성능이 보고(41)되는 등 장관면역활성을 통한 전신 면역계 활성화에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

미강의 생산량은 연간 385,000톤에 달하며 지방, 비타민 B군 및 양질의 단백질과 섬유질을 풍부하게 함유하고 있으나 30% 정도가 미강유 제조에 사용되고 있을 뿐 나머지 70%는 사료나 비료 등의 저가치 물질로 이용되거나 농산 폐기물로 처리되고 있어 미강의 고부가가치화 및 폭넓은 산업적

이용에 대한 연구가 요구되고 있다.(42-46) 미강은 지방 함량이 높아 변패되기 쉬운 문제점을 가지고 있어 국내의 경우 주로 미강의 산패와 관련된 연구와 미강유 토크페롤 또는 불포화지방산에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 미강의 화학적인 성분 및 주요 면역활성 다당성분으로 알려진 arabinoxylan (Table 3-3-1 참조)의 약리작용에 대한 일부 보고가 있을 뿐, 면역기능과 그의 산업적 활용에 대한 연구결과는 거의 없는 실정으로 이들 유효성분의 연구와 소재화는 중요한 의의가 있다고 사료된다.

그러나 미강으로부터 이러한 생리활성 성분들을 생산할 수 있는 미생물의 선정과 생산 최적화에 따른 발효기술 및 생체조절 활성성분에 대한 정확한 활성연구 및 screening 기술, 물질의 분리 및 정제기술은 미생물을 미강에 발효시켜 검토한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 미강 발효물 생리활성 물질의 구조와 기능의 상호관계를 밝히는 것은 천연물로부터의 신약개발을 가능하게 할 수 있으나 기능성 물질의 본체규명과 구조결정기술, *in vivo* test, 독성실험, 활성성분의 작용기작 및 생체에서의 정확한 기능의 파악이 어려워 이들을 이용한 기능성식품의 개발 또는 의약품 제재로서의 응용에 큰 진전을 보지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 그간 식품에 응용되어 왔던 미생물을 이용, 미강 발효액을 조제하여 미강 중 면역활성물질 및 소재를 분리하고자 하였으며, 그들을 대상으로 macrophage의 활성화, lymphocyte의 증식 및 장관 면역활성 등의 *in vitro* 및 *in vivo* test를 실시하였다. 그리고 이들을 기능성식품 중간소재로 이용하기 위한 기초조사를 행하였다.

6.0)의 조성의 배지를 사용하였으며, 곰팡이용 기본배지로는 5% rice bran, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.25% KH₂PO₄, 2% sucrose (pH 6.0)의 배지를, 효모의 경우는 버섯류 기본 배지에 0.1% CaCl₂, 0.1% K₂HPO₄ (pH 6.0)를 보강하여 각각 발효하였다.

2) 실험 동물

실험동물은 Balb/c 계, ICR계 mouse (6~8주령의 웅성), C3H/HeN계 mouse (6-8 주령의 자성)를 (주) 대한 바이오링크로부터 구입하여 실험실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3°C, 습도 55~70%조건에서 물과 사료를 자유 급식하며 사육하였다.

3) 시약

Mitogen과 macrophage의 활성능을 측정하기 위한 시약으로서 RPMI medium 1640, Penicillin/Streptomycin, Fungizone[®]은 Gibco BRL사(Grand Island Co., NY., USA)로 부터 구입하였고 HEPES powder, fetal calf serum(FCS), *p*-nitrophenylphosphate disodium salt (*p*-NPP) 및 MTT (Tiazolyl blue)는 Sigma사(St. louis MO., U.S.A.)로 부터 구입하여 사용하였다. 그리고 lipopolysaccharide(LPS; from *Escherichia coli* Serotype O127:B8)과 concanavalin A(conA) 또한 Sigma사로부터 구입하였다.

분자량 측정에 사용된 표준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)는 일본 Showa Denko사로 부터 구입하였다.

4) Resin

활성 물질의 정제에 사용된 DEAE Sepharose FF (Cl⁻ form)와 Sepharose CL-6B는 Pharmacia Biotech사(Sweden) 제품을, Bio gel P-30 및 Bio gel A-0.5m은 Bio-Rad사의 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

Table 3-3-2. Several microbial strains for the production of fermented rice bran products

	Sample	Strain name	Culture condition
1st Screening	A	<i>Cordyceps cinensis</i>	Liquid
	B	<i>Cordyceps cinensis</i>	"
	C	<i>Cordyceps cinensis</i>	"
	D	<i>Cordyceps cinensis</i>	"
	1	<i>Lentinus edodes</i>	미강
	1'	<i>Lentinus edodes</i>	발효미강
	2	<i>Agaricus blazei</i>	미강
	2'	<i>Agaricus blazei</i>	발효미강
	3	<i>Flammulina velutipes</i>	미강
	3'	<i>Flammulina velutipes</i>	발효미강
	4	<i>Lentinus edodes-27</i>	미강
	4'	<i>Lentinus edodes-27</i>	발효미강
2nd Screening	rb1	<i>Cordyceps cinensis</i>	Liquid
	rb2	<i>Lentinus edodes-27</i>	"
	rb3	<i>Flammulina velutipes</i>	"
	rb4	<i>Lentinus edodes</i>	"
	rb5	<i>Agaricus blazei</i>	"
	rb6	<i>Auricularia auricula</i>	"
	rb7	<i>Flammulina velutipes-3</i>	"
	rb8	Yeast strain 7112	"
	rb9	Yeast strain 7910	"
	rb10	Yeast strain 7905	"
	rb11	Yeast strain 7918	"
	rb12	Yeast strain 7906	"
	rb13	Yeast strain 7904	"
	rb14	Yeast KCCM 11201	"
	rb15	Yeast KCTC 7106	"
	rb16	Yeast strain 7911	"

Table 3-3-2. (계속)

3rd Screening	rb1	<i>Asp. sojae</i>	Liquid
	rb2	<i>Asp. oryzae</i>	"
	rb3	<i>Monascus pilosus</i>	"
	rb4	<i>M. anka</i>	"
	rb5	<i>M. ananesus</i>	"
	rb6	<i>M. pupuresus</i>	"
	rb7	<i>M. ruber</i>	"
	rbA	<i>Asp. sojae</i>	Solid
	rbB	<i>Asp. oryzae</i>	"
	rbC	<i>Monascus pilosus</i>	"
	rbD	<i>M. anka</i>	"
	rbE	<i>M. ananesus</i>	"
	rbF	<i>M. pupuresus</i>	"
	rbG	<i>M. ruber</i>	"
4th Screening	rb-2	<i>Asp. oryzae</i>	Liquid
	rb-4	<i>M. anka</i>	"
	rb-A	<i>Asp. sojae</i>	Solid
	rb-C	<i>M. pilosus</i>	"
	rb-D	<i>M. anka</i>	"
	rb-E	<i>M. pupuresus</i>	"

나. 실험방법

1) 면역활성 미강 발효액 제조를 위한 발효 균주의 screening

Table 2에 제시된 바와 같이 각종 버섯류, 곰팡이 및 효모로 발효된 액체 미강발효액(제2 세부과제, 고려대병설 보건대로부터 공여받음)은 12000 g에서 5분간 원심분리하고 그 상등액에 4배량에 해당되는 에탄올을 가하여 4℃에서 12시간 방치하여 침전시켰다. 미강 발효액의 침전은 원심분리하여 회수한 후, 80% 에탄올로 2회 세척하고 동결건조를 거쳐 검색용 시료를 조제하였다. 한편 고체 배양한 배양물은 5배부피의 증류수를 가하여 열수 추출하고 위의 방법과 동일하게 에탄올 처리후 동결건조하여 시료를 조제하고 면역활성검색에 사용하였다.

2) 일반 분석 방법

총당 함량은 galactose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(47)으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법(48)으로, 단백질 함량은 bovine albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법(49)으로 각각 정량 분석하였다.

3) 구성당 분석

다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid로 121℃에서 1.5시간 가수분해시켜서 중성당(aldose)과 산성당(aldonic acid)으로 전환시킨 후 NaBH₄를 이용하여 각각 alditol 및 aldonic acid로 환원시켰다. 이렇게 생성된 alditol은 acetic anhydride를 이용하여 alditol acetate유도체로 전환시키고 gas-liquid chromatography (GLC)로 구성당을 분석하였다(50). GLC의 분석 조건은 Table 3-3-3에 나타난 바와 같으며 표준 구성당들의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 mol %는 peak

의 면적비와 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

Table 3-3-3. Analytical conditions of gas chromatography for component sugars

Apparatus	GC M600D (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column (Supelco USA)
Column size	0.25 mm × 30 m × 0.2 μm film thickness
Oven temp.	60°C (1 min) → 220°C (12 min) → 250°C (15 min) 30°C/min 8°C/min
Injector temp.	250°C
Detector temp.	250°C
Carrier gas	N ₂ (1.5 ml/min)
Intergrator	D520B Intergrator (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

4) 면역 증강 활성 측정

가) Mitogen 활성 측정 (lymphocyte mitogenic activity)

Lymphocyte mitogenic activity는 MTT assay법으로 측정하였다.

MTT assay는 ICR mouse로 부터 비장을 적취한 후, ice cold RPMI-1640 medium이 담겨져 있는 petri dish에 옮기고 금속체 (mesh # 100)를 patch위에 위치시킨 다음 주사기의 고무마개로 누르면서 patch로부터 세포를 방출시켰다. 이 액을 금속체 (mesh # 200)를 사용하여 여과하고 상기 medium으로 세 번 세정한 후 세포농도를 5 X 10⁶ cells/ml

RPMI-1640으로 조정, 90 μl 씩을 96 well plate에 분주한 다음 시료 10 μl (대조군은 생리 식염수)를 가하고 37°C, 3일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그후 1 mg/mL농도의 MTT solution을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5-6시간 반응시킨고 생성된 MTT formazan 침전물을 얻기 위해 조심스럽게 상등액을 제거하고 이때 얻어진 formazan은 100 μl 의 0.04N HCl/isopropanol을 가하고 5분간 용해하고 동량의 물을 가한 후 한 후, 570 nm에서 흡광도를 비교하여 lymphocyte이 증식도를 비교하였다. (Fig 3-3-1)

나) Macrophage 활성화능 측정 (Macrophage lysosomal enzyme activity)

6~8주령의 ICR mouse의 복강에 5% thioglycollate medium을 2.5 ml 주사한 후 72~96시간 내에 유도된 복강 macrophage를 회수하여 RPMI 1640으로 2~3회 세척하고 세포 수를 1×10^6 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 200 μl 씩 분주하였다. 이들은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하여 macrophage monolayer를 형성시키고 각 well에 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 활성화된 macrophage monolayer는 RPMI 1640으로 세척한 후, Triton X-100을 가하여 세포막을 용해한다. 유리된 lysosomal phosphatase를 기질인 p-NPP와 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.(Fig 3-3-2참조)

Spleen of ICR mouse (6~8 weeks, ♂)

- suspend lymphocyte with RPMI medium 1640
- centrifuge (1500rpm, 4°C, 10min)
- remove erythrocyte with 0.2% NaCl
- wash with RPMI medium 1640
- adjust the cell number (5×10^6 cell/ml, use
RPMI medium 1640 without or with 10% FCS)
- dispense 90 μl of cell suspension into the microplate
- add 10 μl of sample
- incubate (5% CO₂, 37°C, 72hr)

MTT activity

- add 50 μl of MTT
- incubate (5% CO₂, 5hr)
- aspirate the supernatant
- add 0.04N HCl in iso-propanol
- add DIW

read absorbance at 570 nm

Fig 3-3-1. Procedure for the assay of mitogenic activity.

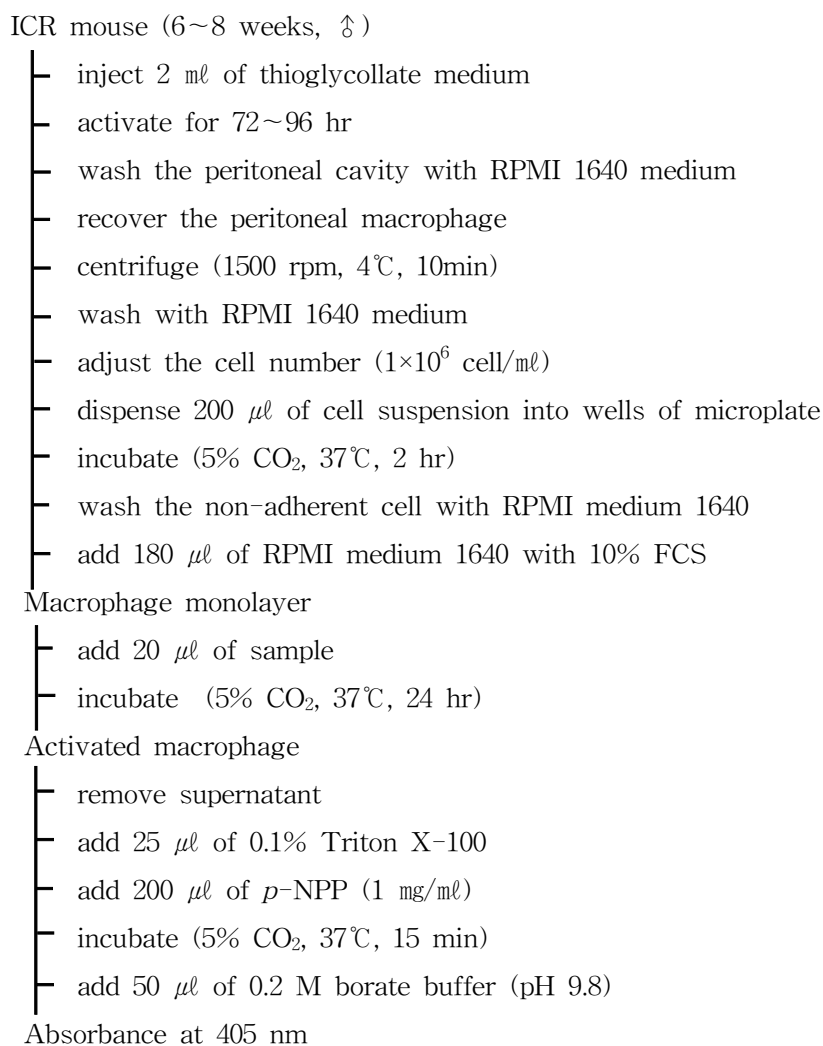


Fig 3-3-2. Procedure for the assay of macrophage lysosomal enzyme activity.

다) 장관면역 활성화 측정

(1) 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응

장관면역 활성화는 Hong 등의 방법(51)에 따라 측정하였다. 즉 C3H/HeN 마우스(5-7주, 암컷)의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution(HBSS)이 담겨진 petri dish에 옮기고 금속체(No. 100)를 patch 위에 올려놓은 다음, 주사기 고무마개로 눌러 조직을 파괴하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시킨다. 세포현탁액을 금속체(No. 200)로 여과한 후 RPMI 1640-FBS(5% FBS 함유된 RPMI-1640)로 세척하고 2×10^6 cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정된 후 96-well plate에 180 μ L씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 20 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용한다.

(2) 회수한 Peyer's patch 세포 배양액과 골수세포와의 반응

동일종 마우스의 대퇴부 뼈를 이용하여 골수세포를 회수하는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세척하여 2.5×10^5 cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정하고 96-well plate에 100 μ L씩 분주한다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양한다.

(3) 장관면역 활성화도 측정

장관면역의 활성화도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™의 형광시약이 살아 있는 골수세포의 전자

전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다. 즉, 골수세포와 위의 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar Blue™ 20 μ L를 첨가한 다음 형광도를 SPECTRAFluor Plus(TECAN Co. Ltd., Austria)을 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여, 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다. (Fig 3-3-3참조)

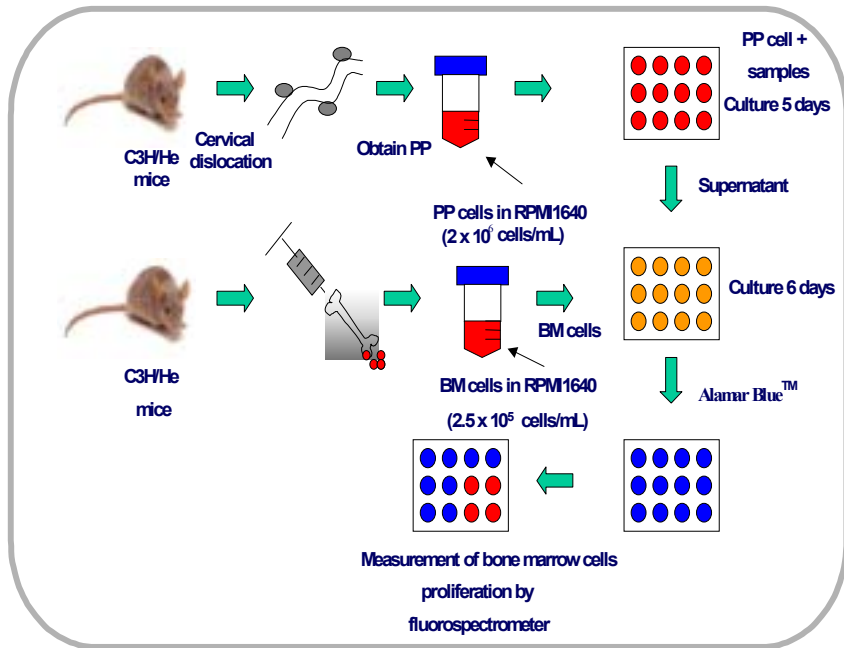


Fig 3-3-3. Assay of intestinal immune system modulating activity by measurement of bone marrow cell proliferation

라) 미강 발효액의 ACE 저해활성 측정

코오지 10 g을 증류수 400 ml에 넣고 100°C에서 최종부피가 50 ml될때 까지 열수추출한 후 이를 8,000 x g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 취하고 Whatman No. 41 여지로 여과한 후 시료로 사용하였으며, Cushman 등의 방법을 이용하여 코오지의 ACE 저해활성을 측정하였다. 액체 발효액의 경우 3,000 g에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 시료로 사용하였다.

즉, 시료 0.05 ml에 Hip-His-Leu을 0.1 ml 가한 후 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.15 ml 가하고 다시 37°C 에서 1시간 반응시킨 후 0.5 N HCl을 0.25 ml 가하여 반응을 정지시켰다. 공실험은 시료용액 대신 증류수 50 µl를 사용하였으며 대조구는 HCl을 가한후 효소액을 가하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5 ml을 가하여 15초간 섞어준 후 2,800 x g에서 10분간 원심분리시켜 상정액을 0.5 ml 취하였다. 이 상정액을 oil bath 140°C에서 15분간 건조후 1 M NaCl을 3 ml 가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 혈압강하효과를 측정하였다.

마) 면역세포에 의해 생산된 cytokine 측정

Cytokine 측정은 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하였다. 분석 하루 전, anti-cytokine mAb(anti-mouse cytokine 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°C에서 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 µl씩 분주하고 실온에서 1시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 recombinant mouse cytokine를 연속 희석한 용액 또는 시

료를 50 μ l 씩 분주하고 assay diluent를 50 μ l 분주하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다. 반응 상등액을 제거하고 assay diluent를 50 μ l 씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking 시킨 후, PBST로 5회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 biotinylated anti-cytokine 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 μ l 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ 및 TNF- α 함량 측정은 모두 위와 동일한 방법으로 측정하였다(Fig. 3-3-4).

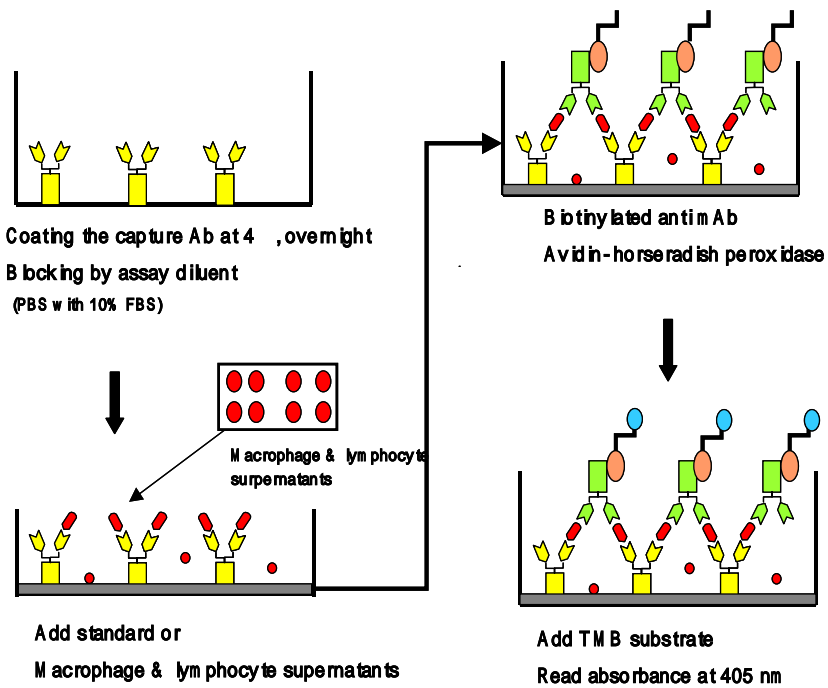


Fig 3-3-4. Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of cytokine content

5) 면역 활성화 물질의 본체 규명

가) Periodate oxidation

활성시료 20 mg을 0.05 M acetate buffer (pH 4.5) 50 ml에 녹인 후, 0.05 M NaIO_4 를 5 ml 첨가하고 4°C의 암소에서 72시간 산화시켰다. 이 산화물 중 잔존 NaIO_4 를 제거할 목적으로 ethylene glycol을 첨가한 후 투석을 행하고 투석 내액에 NaBH_4 20mg을 첨가하여 하룻밤 교반시켜 환원시켰다. 반응액은 0.1 M acetic acid로 중화하여 투석 및 동결 건조를 행하여 periodate 산화물을 얻었다.(52)

나) Pronase digestion

시료 20 mg을 0.01 M CaCl_2 를 포함한 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 50 mg에 녹인 후 20 mg의 pronase를 첨가하고 37°C incubator에서 48시간 반응시키고 잔존 효소를 불활성화시킬 목적으로 5분간 끓인 후 원심분리하였다. 상등액은 투석과 동결 건조를 행하여 pronase 소화물을 얻었다.(52)

다) Chlorite treatment

시료 20 mg을 4% acetic acid 50 mg에 녹인 후 NaClO_2 100 mg을 첨가하고 색이 변할 때까지 70°C에서 교반시켰다. 이후 4°C를 유지한 상태에서 3 N NaOH를 첨가하여 중화시키고 투석 및 동결 건조를 거쳐서 chlorite 처리 획분을 얻었다.(53)

라) Polymyxin B treatment

시료를 2 mg/ml의 농도로 제조한 뒤 같은 농도의 polymyxin B sulfate를 동량 섞어 최종농도 1 mg/ml의 polymyxin B sulfate 처리 획분을 얻었다.

6) 미강 발효액의 활성성분 농축을 위한 효소 처리

미강발효액은 미강에서 기원한 전분이 과다 존재하여 정제에 어려움이 있었던 바, 각발효액을 4배의 ethanol을 가하여 침전시켜 얻은 동결건조물 1 g을 100 ml의 0.05 M acetate buffer (pH5.2)에 용해시킨 후, 1000 IU의 amylase(Sigma Co.)를 첨가하여 4시간 반응시켜 전분을 가수분해시켰다. 반응액은 효소활성을 실험시키기 위해 100℃에서 20분 처리하고, 원심분리하여 침전을 제거하였으며, 상등액은 증류수를 이용하여 48시간 투석을 행하여 저분자를 제거하고 동결건조한 후 분석에 사용하였다.

7) 미강 발효액 중 면역 활성화 다당의 정제

가) Anion exchange chromatography(AEC)

면역활성 검색과정 중 가장 높은 활성을 보였던 rb-C 획분 (*Monascus pilosus*에 의한 미강 발효액)은 시료 중 고농도로 존재하는 전분을 제거하기 위해 amylase처리하여 FRB 획분을 조제하였다. FRB는 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화된 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form)에 흡착시킨 후 증류수, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 M의 NaCl로써 단계적으로 용출시켰다. 이때 얻어진 각 획분은 농축 및 투석 후 동결 건조를 행하여 1개의 비흡착획분(FRB-a)과 11개의 흡착획분(FRB-b, c, d, e, f-I, f-II, f-III, f-IV, g, h, i.)을 얻었다. 특히 0.4 M NaCl로 용출시에는 4개 획분(FRB-f-I ~ FRB-F-IV)이 얻어졌다. (Fig 3-3-5참조)

나) Gel permeation chromatography

Anion exchange chromatography 정제 획분 중 높은 활성을 보이는 FRB-c (0.1 M), FRB-d (0.2 M)를 대상으로 Biogel P-30과 Biogel A-0.5m을 이용하여 겔 여과를 행하여 FRB-c로부터 FRB-c-I, c-II 획분

을, FRB-d로부터 FRB-d-I, d-II, d-III 획분을 각각 얻을 수 있었다. FRB-c-I은 void volume에서 용출되었던 바, Biogel A-0.5m colume에 의해 재차 겔 여과를 행하여 FRB-c-Ia, FRB-c-Ib 및 FRB-c-Ic 3개 획분으로 정제하였다. 이들을 투석, 감압 농축 및 동결 건조를 행하여 이후의 실험이 사용하였다(Fig 3-3-5참조).

다) HPLC에 의한 분자량 측정 및 순도 확인

GPC 정제 획분의 정제 정도 및 분자량을 예측하기 위하여 Table 3-3-4의 분석 조건으로 HPLC (high performance liquid chromatography)를 행하였다. 분자량 측정시에는 표준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준 곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

Table 3-3-4. Analytical condition of HPLC for the purified polysaccharides

Apparatus	HPLC-9500 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive Index (RI, Waters, USA)
Column	Shodex GS520+GS320+GS220 Packed Column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan)
Column size	Φ7.6×300 mm
Flow rate	0.5 ml/min
Eluent	0.2 M NaCl
Intergrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Injection vol.	10 μl

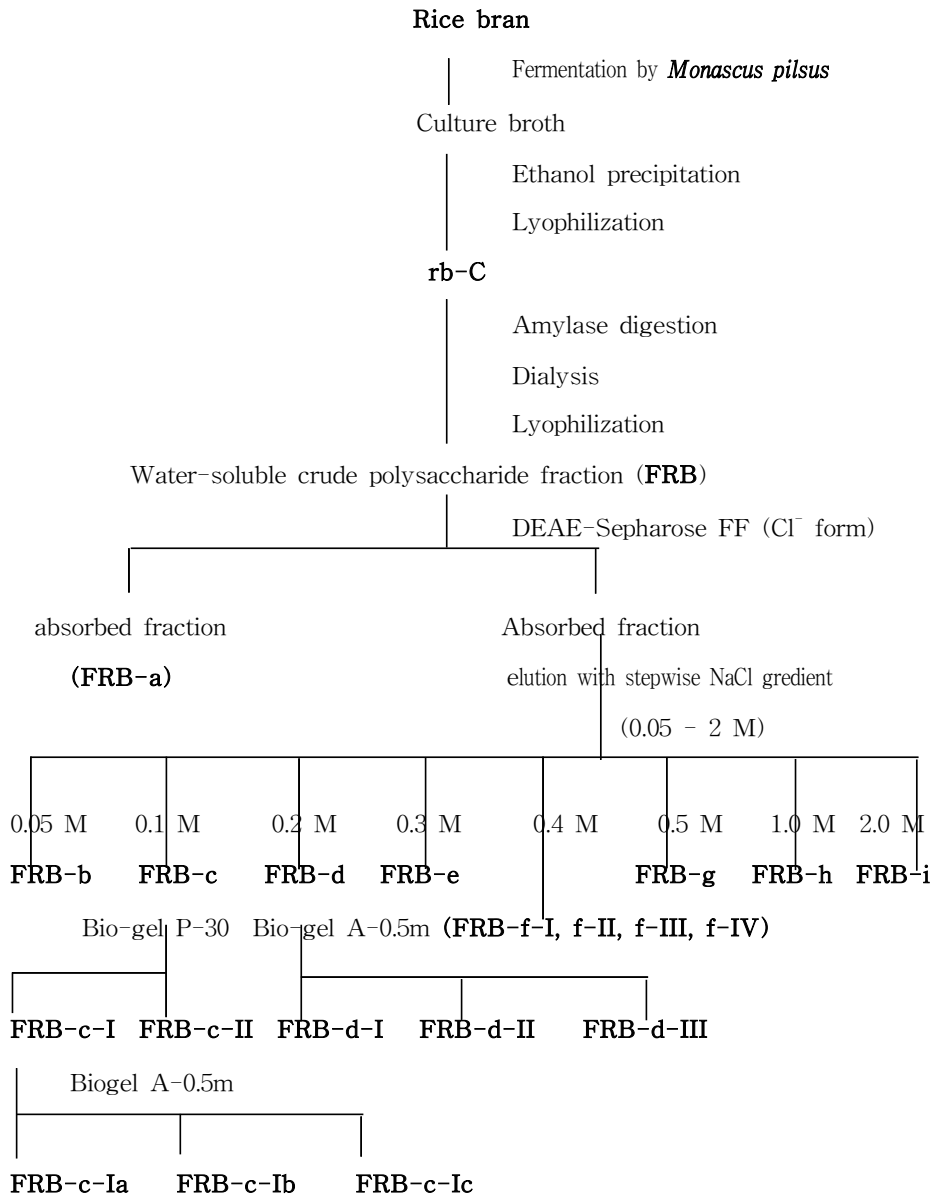


Fig 3-3-5. purification procedure of immunostimulating polysaccharides from rb-C fermented by *Monascus pilosus*.

8) 미강발효액 중 면역 활성다당의 구조 특성 실험

가) β -glucosyl Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion

다당시료(5 μ g)을 β -goucosyl-Yariv antigen [10 μ g/ml, 1,3,5-tri-(4- β -D glucopyranosyl-oxyphenylazo) 2,4,6-trihydroxybenzene]을 함유한 agarose plate상의 well에 첨가후 실온에서 하룻밤 방치하여 반응시키고 형성된 hollow를 분석하였다. 이때 대조군으로 gum arabic을 농도별로 첨가하여 함께 분석하였다.

나) Methyl화 분석에 의한 결합위치 결정

다당시료의 결합위치 결정을 위한 methyl화는 Hakomori 방법에 따라 실시하였다. 각 다당은 methyl화 이전에 0.2 M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 탈 ester화 하고, 반응중 β -elimination이 일어나지 않도록 methyl화는 한차례만을 수행하였다. 그러나 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록, 필요한 경우 methylsufinyl carbanion을 수차례 첨가하였고 잔존량은 triphenylmethane으로 확인하였다. Methyl화 다당은 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용, 회수하였다. Methyl한 다당 및 oligo당은 1M TFA로 100°C에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 (0.2 μ m film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco) capillary column이 장착된 Hewlett-Packard 5890A GC를 사용하여 최적온도조건 [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 mode로 분석하였으며, 한편 GC-MS는 동일 column을 장치한 Hewlett-Packard 5890A GC system과 5970 mass selective detector를 이용하여 최적온도조건 [60°C (1 min), 60°C→150°C (30°C/min), 150°C→250°C (1.5°C/min)]에서 분석하였다. (He 압력 : 0.5

ml/min) 각 peak는 MS에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole %는 peak 면적과 응답계수로 부터 산출하였다.

9) 활성화당의 in vivo 활성화

가) In vivo 면역 증강활성

활성 시료의 in vivo 면역활성을 측정하기 위해, C3H/HeN mouse에 FRB를 정맥, 복강을 통하여 5일간 농도별 연속 투여하였다. 시료 투여 6 일째에 mouse를 치사시켜, 복강으로부터는 macrophage를, spleen으로부터는 lymphocyte를, 소장으로부터는 Peyer's patch cell을 각각 분리하였으며, 이들은 ex vivo 상태에서 각각 macrophage 활성화, mitogen활성 및 장관면역 활성화 측정에 사용하였다.

나) In vivo 항전이 활성화

시료의 항전이 활성화는 colon26-M3.1 lung carcinoma를 이용하는 실험동물 종양 전이모델을 이용하였다. 실험동물로는 Balb/c mouse를 사용하였으며, colon26-M3.1 lung carcinoma 2.7×10^4 세포를 꼬리정맥을 통하여 접종하였다. 종양 이식 14일 후 mouse는 치사시켜 종양의 표적기관인 폐를 적출하고, Bouin's solution에서 전이된 종양을 고정시킨 후 폐에 형성된 종양의 군집 수(colony number)를 세었다. 활성화 시료에 의한 항전이 효과는 종양 접종 2일전과 1일 후 각각 1회 투여하여 조사하였으며, 이때의 효과는 종양만을 접종한 무투여 대조군과 비교하여 측정하였다.

10) 미강발효액 면역활성 획득 FRB의 독성실험

산업적으로 응용 가능한 것으로 판단된 면역활성 소재 FRB의 급성독성(acute toxicity)을 확인하기 위하여 경구 및 꼬리정맥을 통해 투여하여 실

시하였다. 경구투여의 경우는 ICR계 mouse (♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후, 각 군당 6마리씩 총 30마리를 이용하였으며 생리식염수에 녹인 시료를 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 5,000 mg/kg 농도로 1회 경구 투여하였다. 이때 대조군은 생리식염수만을 투여하였으며, 투여후 14일까지 관찰하고 생존한 마리 수를 측정하여 백분율로 표시하였다.

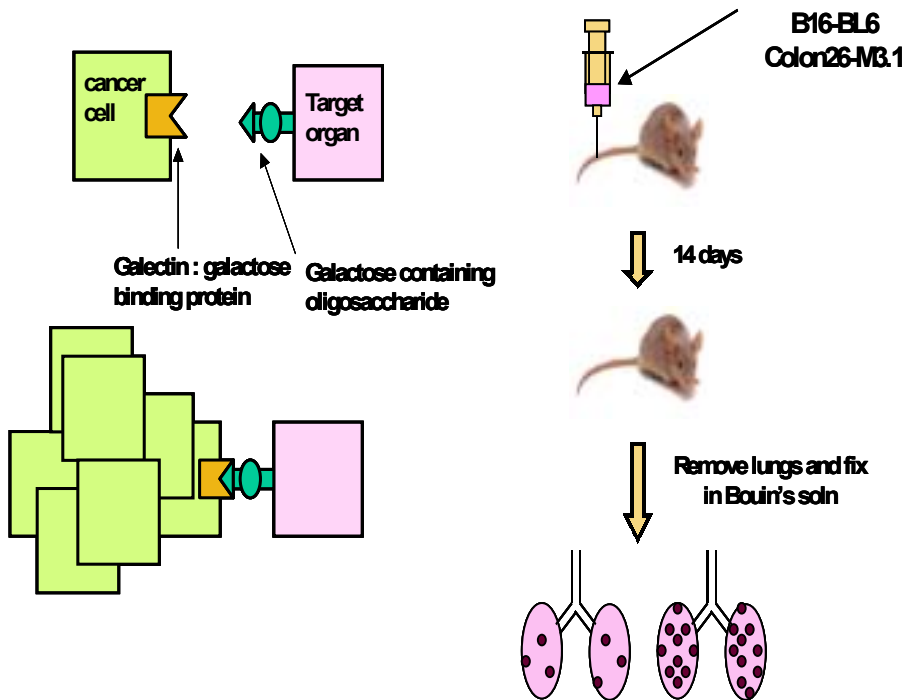


Fig 3-3-6. Cancer-metastasis occurring mechanism and the assay for anti-metastasis activity

FRB의 정맥 투여시의 독성검사를 위하여 ICR계 mouse(♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후 각 군당 6 마리씩 시료(FRB)를 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 농도로 1회 꼬리정맥에 주사하였고 대조군은 saline을 사용하였으며 48시간 동안 생존율을 관찰하였다. 이들은 7일 후 치사하여 각종 장기를 적출하고 중량을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 면역활성이 우수한 미강발효액 선별

1) 미강발효액에 대한 면역활성 1차 screening

각종 균주 발효액 및 발효조건을 달리한 미강발효액(Table 3-3-2참조)을 대상으로 4차에 걸친 생리활성 검색과정을 행하였다. 생리활성은 Peyer's patch cell 자극을 통한 bone marrow cell의 증식정도를 측정하는 장관면역 활성화와 mouse 복강 macrophage를 이용하여 시료의 phosphatase 자극 활성을 측정하는 macrophage 활성, 그리고 mouse의 비장세포의 증식도를 측정하는 lymphocyte mitogen 활성을 기준으로 screening을 행하였다.

발효액은 Table 3-3-2에 제시되어 있는 바와 같이 균종 및 발효조건이 상이한 상태였으며 활성측정을 위해 수가용 고분자 획분만을 추출하고 동결건조하여 시료를 조제하여 동일농도로 생리 식염수에 용해시켜 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

1차 검색에서는 주로 식용버섯으로 사용되는 균주를 이용하여 조제한 총 12종의 미강 발효액을 사용하여 100 µg/mL 농도에서 장관면역의 활성을 측정한 결과, 각 시료에서 공히 활성이 발견되지 않았다.(Fig 3-3-7 참조) 음성대조군은 시료를 첨가하지 않은 군으로 각시료는 대조군과 유의적 차를 보이지 않았다. 반면에 각종 면역활성 측정에 양성 대조군으로 사용한 세균 기원의 하는 LPS(lipopolysaccharide) 는 상대적으로 높은 활성을 보

였다. Macrophage의 활성화의 경우, 모든 시료에서 무첨가군에 비해 높은 활성을 나타내었으며 LPS의 활성화와 유사한 정도의 고활성을 나타내는 시료가 비교적 다수 관찰되었다. (Fig 3-3-8. 참조) 한편 lymphocyte mitogen 활성화의 경우에는 각 시료에서 양성 대조군으로 사용한 LPS나 conA에 비하여 상대적으로 미미한 활성을 나타내었다. (Fig 3-3-9. 참조) 비록 1차 검색시 사용되었던 미강 발효액이 macrophage 활성화가 비교적 높게 나타나고 약간의 mitogen 활성을 보이기는 하였으나, 그 활성 정도가 낮은 편이고, 여러 면역활성을 소유한 발효액 선정이 본 실험의 목적이었으므로 1차 검색에서는 적절한 시료가 없는 것으로 판단하고 이 후의 실험을 진행하였다.

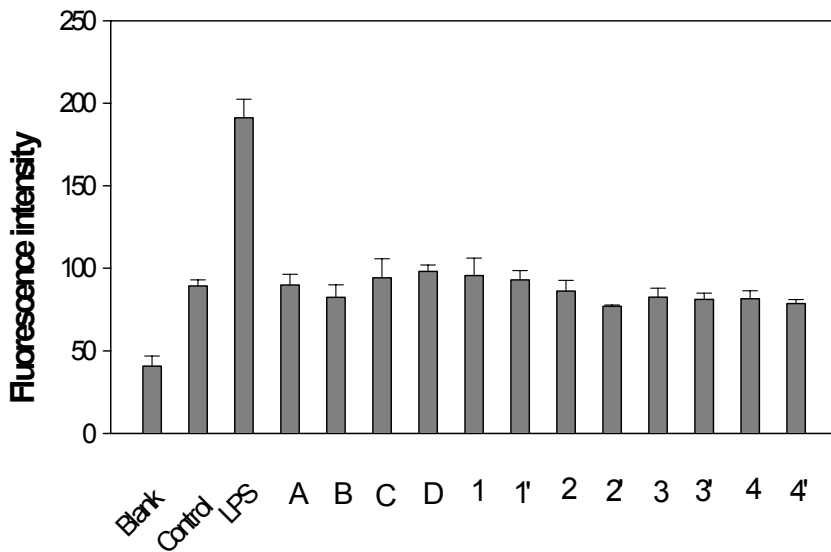


Fig 3-3-7. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

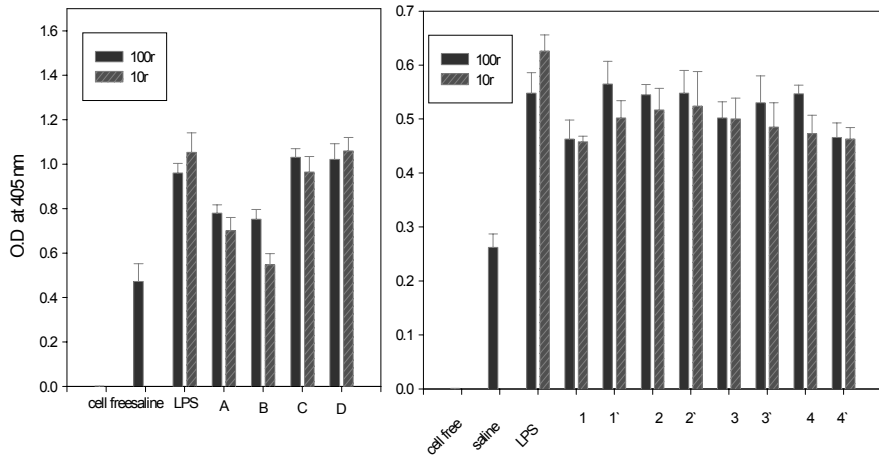


Fig 3-3-8. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

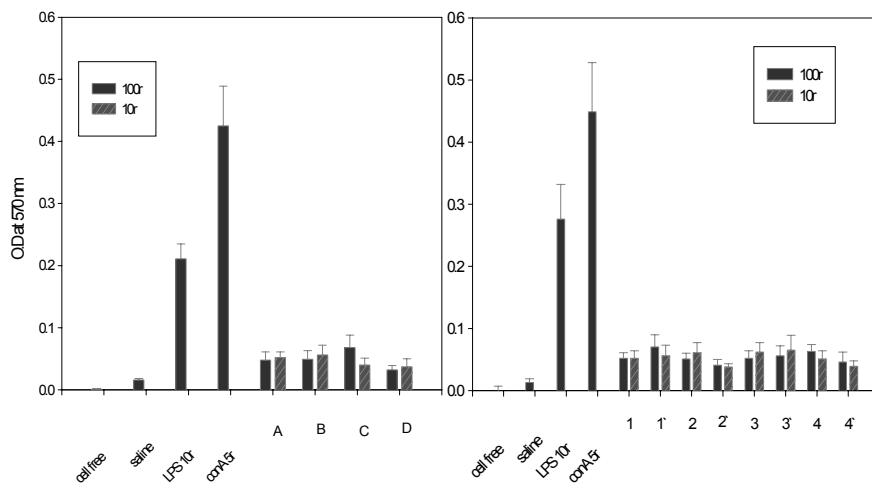


Fig 3-3-9. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 1st screening procedure.

2) 미강발효액에 대한 면역활성 2차 screening

2차 검색에서는 식용버섯 균사체를 이용한 미강 발효 시료 7종과 strain 이 상이한 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 균주를 이용한 미강발효 시료등 총 16종의 미강발효액을 대상으로 각종 면역활성을 측정하였다. 장관면역 활성의 경우 각 시료들은 무침가 대조군 수준의 낮은 활성을 보였으며 Peyer's patch를 통한 골수세포의 증식에 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. (Fig 3-3-10 참조) Macrophage의 활성화 정도는 각 시료에서 전반적으로 상당한 수준의 활성을 보였지만 시료간의 활성 차가 인정되지 않았으며 특히 농도를 달리해도 별다른 활성의 변화 양상을 보이지 않았다. (Fig 3-3-11. 참조) Mitogen 활성의 경우 LPS 수준의 활성을 보였지만 conA에 비해서는 전체적으로 미약한 결과를 나타내었으며 각 시료간 활성의 차이가 별로 없고 농도의존적 활성 증가의 결향도 보이지 않았다. (Fig 3-3-12. 참조)

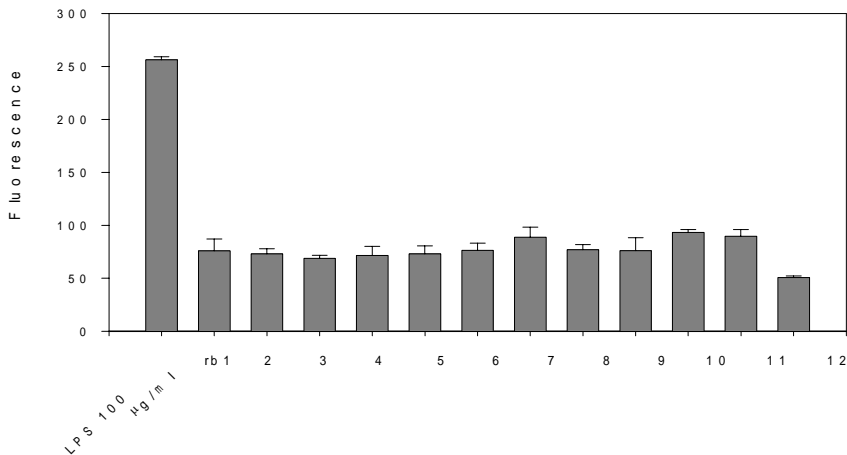


Fig 3-3-10. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

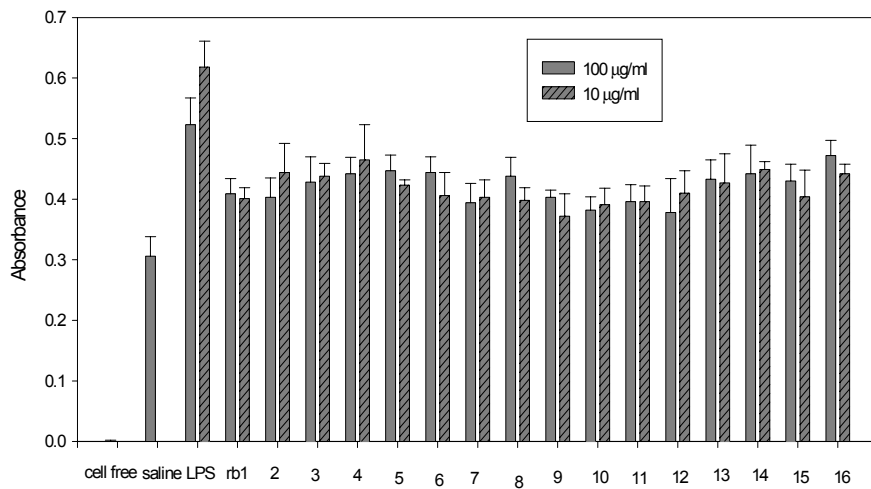


Fig 3-3-11. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

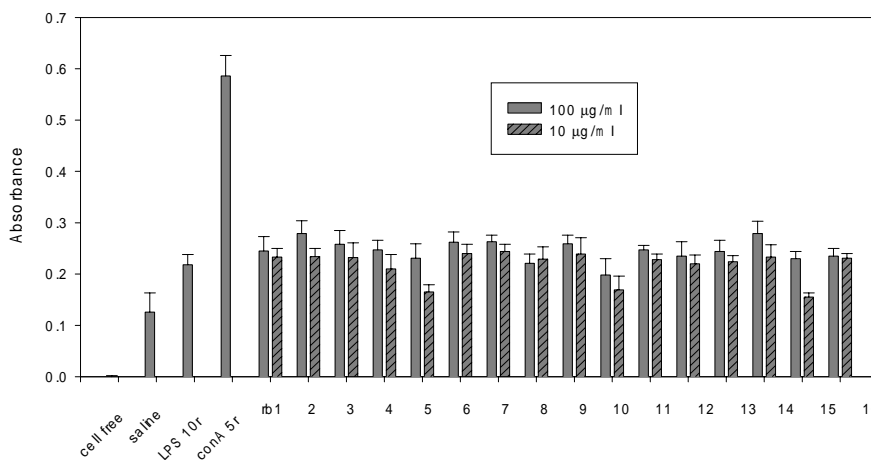


Fig 3-3-12. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 2nd screening procedure.

3) 미강발효액에 대한 면역활성 3차 screening

3차 검색에서는 주류, 장류등 발효식품 제조에 많이 사용되는 *Aspergillus* 2개 균종과 *Monascus* 5개 균종으로 액체배양과 고체배양으로 발효조건을 달리하여 배양하였으며 액체발효에 의한 시료 rb-1 ~ rb-7번, 고체발효에 의한 시료 rb-A ~ rb-G 등 총 14개 시료를 대상으로 생리활성을 측정하였다. 장관면역 활성의 경우, Fig 3-3-13에 나타난 바와 같이 100 µg/ml 농도에서 무침가균에 비해 대체로 높은 활성이 나타났으며 특히 *Asp. oryzae*를 미강기질로 액체 배양한 rb-2시료와 *Monascus pilosus*를 고체 배양한 rb-C에서 LPS의 활성과 유사한 강력한 활성을 보였다. 또한 rb-4 (*M. anka*, 액체), rb-A (*A. sojae*, 고체), rb-D (*M. anka*, 고체), rb-E (*M. ananesus*, 고체)시료에서도 양호한 활성이 관찰되었다. Macrophage 활성화에서도 위에 언급한 시료들은 LPS 이상의 높은 활성화 양상을 보였으며 대체로 농도 의존적인 경향을 나타내었다. (Fig 3-3-14. 참조) Mitogen 활성의 경우는 양성 대조군 보다는 낮았지만 무침가균에 비해서 상기 6개 균종은 공히 높은 활성을 보였다. (Fig 3-3-15 참조) 따라서 rb-2, rb-4, rb-A, rb-B, rb-D 및 rb-E 시료를 4차 검색을 통하여 재차 활성여부를 검토하였다.

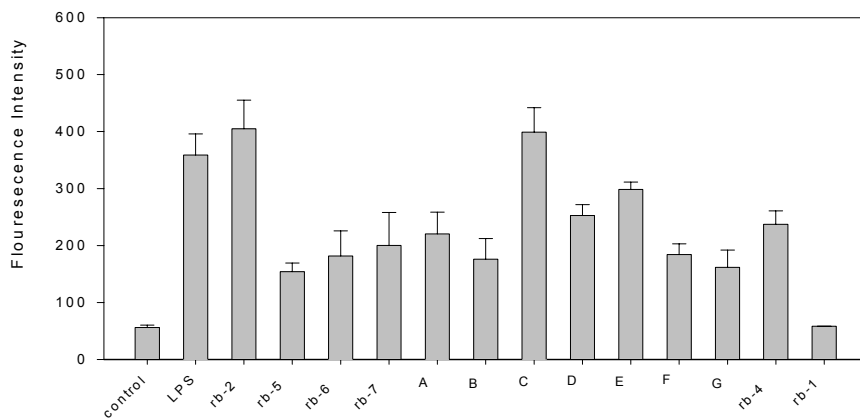


Fig 3-3-13. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 3rd screening procedure.

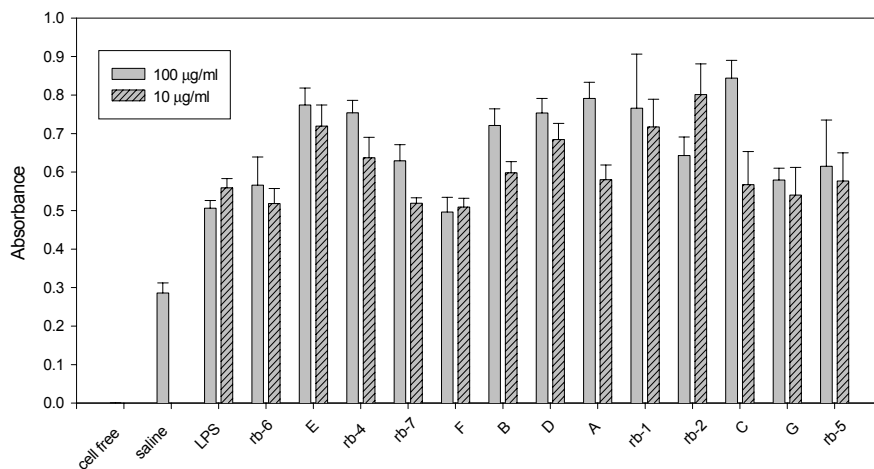


Fig 3-3-14. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 3rd screening procedure.

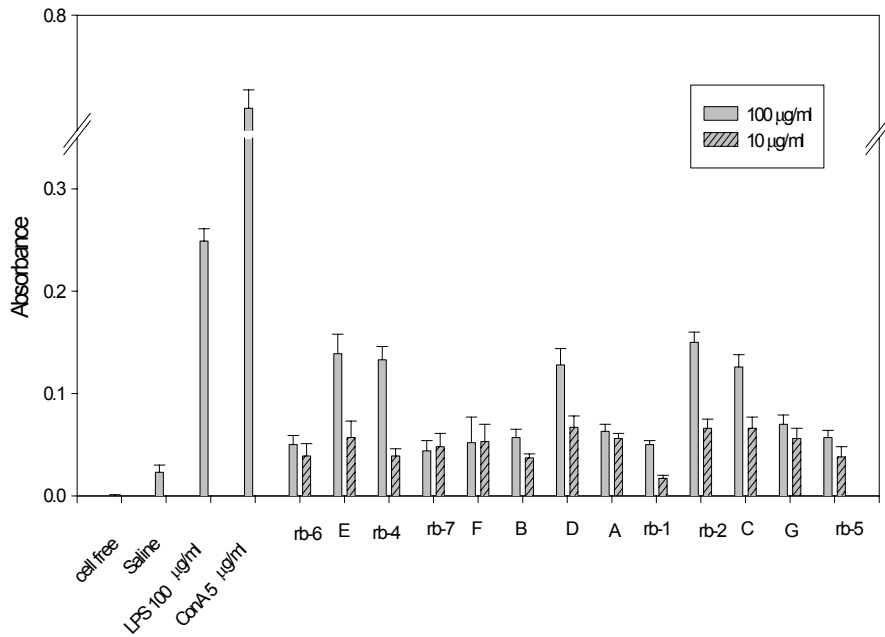


Fig 3-3-15. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 3rd screening procedure.

4) 미강발효액에 대한 면역활성 4차 screening

4차 검색에서는 상기 6개 시료만을 대상으로 면역활성을 재평가하였다. 장관면역활성의 경우 3차 결과와 유사하게 높은 활성을 보였으며 특히 rb-2와 rb-C의 경우 농도의존적으로 높은 활성을 보였다. (Fig 3-3-16 참조) 여러 면역기관 중 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프기관으로, 소화관내 항원의 흡수에 중요한 specialized M cell로 구성된 flattered epithelium으로 덮여있다. 이와 같은 M cell은 lumen으로부터 저분자 뿐만 아니라 고분자 물질도 engulf하여 림프세포에 이동시킴으로써 세포의 활성화에 기여하는데 즉, 장관 내에 있는 Peyer's patch의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원과 반응하여 활성화된 후, 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하여 MLN(Mesenteric Lymph Node, 장관막 림프절)을 거쳐 체내를 순환하게 된다. 따라서 면역활성화 물질을 소재화하기 위해선 섭취 후, 제일 먼저 접촉이 이루어지는 장관면역계의 활성화가 중요한 의미를 갖게된다. 미강발효액 중 Peyer's patch cell을 통한 장관 면역활성이 가장 높게 나타난 rb-2와 rb-C의 경우 양성대조군인 LPS에 상당하는 높은 장관면역계를 통한 골수세포 증식활성을 보여주었다. 이러한 결과는 현재 상품화되어 시판되고 있는 면역활성소재인 Agaricus (Oubiken, Japan, 버섯류인 Agaricus blezai의 β -glucan), AHCC (active hexose correlated compound, Amino-Up, Japan, 표고), Bio-Bran (미강중 존재하는 arabinoxylan 성분)과 비교했을 때 보다 높은 수치로 CH-1이 면역활성 소재로 이용하기에 충분한 활성을 소유하고 있음을 시사하였다.

Macrophage 활성화의 경우, 대부분의 시료에서 양성 대조군인 LPS이상의 양호한 농도 의존적 활성을 나타냈다. 그러나 rb-2의 경우는 고농도에서 상대적으로 약간 낮은 활성을 나타내었으며 이러한 현상은 3차 검색시에도 동일한 양상이었다. 따라서 이들 시료의 경우 고농도에서는 macrophage

에 약간의 독성을 갖을 것으로 추정되었다. (Fig. 3-3-17) Lymphocyte mitogen 활성의 경우는 모든 시료군에서 모두 양호한 활성을 보였으며 (Fig 3-3-18 참조) 특히 rb-2와 rb-C 시료의 경우, 각 면역활성에 대한 반복실험의 결과 저농도에서도 안정적으로 고효성을 나타내는 것으로 판단되었다.

따라서 이상의 결과로부터 미강발효액으로부터 생리활성 소재의 생산을 위해선 *Asp. oryzae*를 이용한 미강 액체배양법 또는 *Monascus pilosus*를 이용한 발효액 조제가 가장 적절한 방법으로 사료되었다.

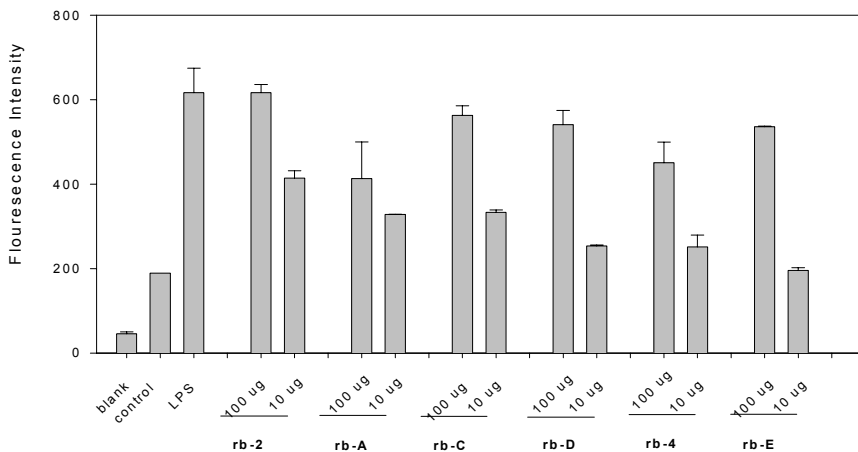


Fig 3-3-16. Intestinal immune system modulating activity of several fermented rice bran products in 4th screening procedure.

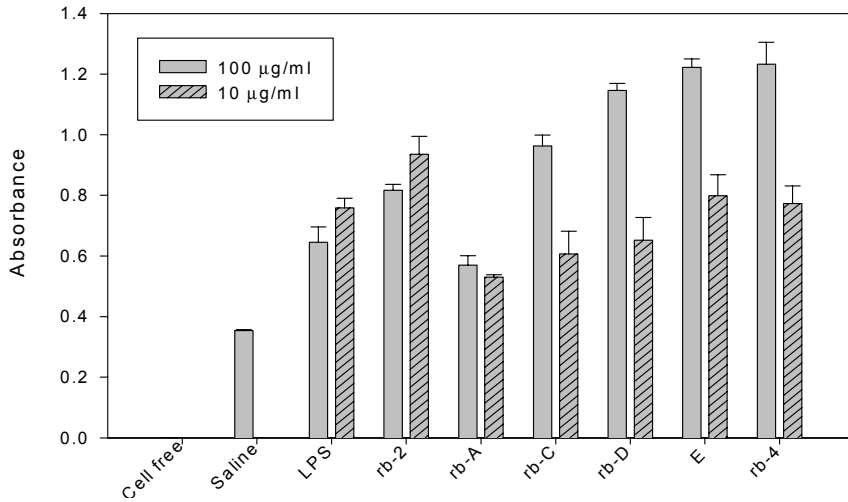


Fig 3-3-17. Macrophage activity of several fermented rice bran products in 4th screening procedure.

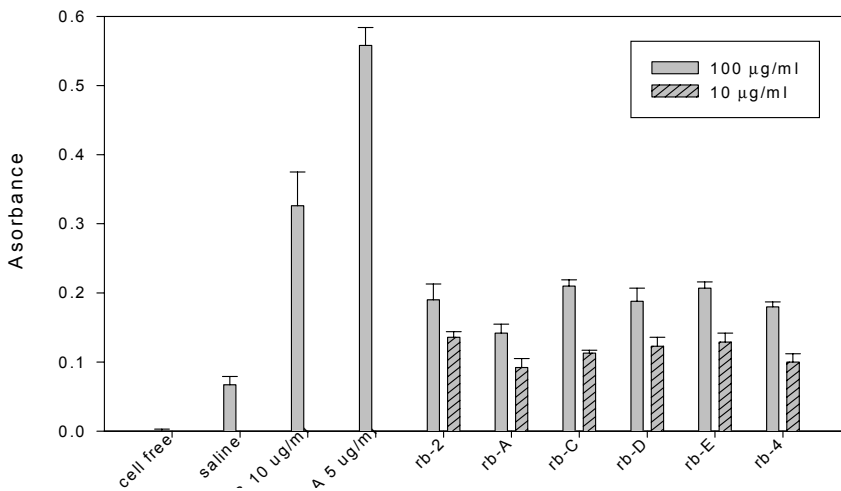


Fig 3-3-18. Lymphocyte mitogenic activity of several fermented rice bran products in 4th screening procedure.

나. 미강발효액에 대한 angiotensin-converting enzyme 저해 활성 측정

한편 각 균주로 발효한 미강발효액들을 대상으로 항고혈압 활성물질을 선별하기 위해 angiotensin converting enzyme (ACE)의 저해 활성을 측정 한 결과는 Table 3-3-5와 같다. 미강 발효액 중 표고, maitake, *Asp. sojae*를 이용한 일부 발효액에서 30% 이상의 저해활성을 보였으나 대부분 미강 발효액은 상대적으로 낮은 활성을 보였으며, 따라서 미강발효액은 ACE저해 활성물질로의 개발에는 상당한 문제점이 있음을 시사하였다.

따라서 이상의 결과로부터 미강 발효액으로부터 생리활성은 주로 면역활성이 우수한 소재로의 개발이 가장 절절한 것으로 판단하였으며, 반복 실험의 결과 면역활성물질의 수율과 안정적 활성을 보인 *Monascus pilosus*를 이용한 발효액 조제가 가장 적절한 방법으로 사료되어 동 균주를 면역 활성 미강발효액 제조 생산 균주로 선별하였다.

Table 3-3-5. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of several fermented rice bran products

A. 다양한 배지조성

균주	배지	ACE 활성	비고
<i>Cordyceps sinesis</i>	발효미강 5%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%, CaCl ₂ 0.4%, K ₂ HPO ₄ 0.3%	12.5%	
	미강 5%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%, CaCl ₂ 0.4%, K ₂ HPO ₄ 0.3%	23.3%	
상황버섯	발효미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%,	24.7%	1번
	미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%	15.4%	1'
신령버섯	발효미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%,	28.9%	2
	미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%	8.9%	2'
표고	발효미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%,	30.5%	3
	미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%	18.6%	3'
상황 1	발효미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%,	-	4
	미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%	-	4'

B. 배지: 미강 10%, dextrose 1%, yeast ex. 1.0%

균주	ACE 활성	비고
<i>Cordyceps sinensis</i>	12.5%	macrophage011113 (rb1-16) 1번 시료
표고	17.4%	2
<i>L. edodes</i>	-	3
<i>P. lenteus</i>	-	4
<i>A. blazei</i>	18.9%	5
maitake	38.4%	6
<i>L. edodes -1</i>	-	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7112	-	8
KCTC 7910	-	9
KCTC 7905	-	10
7918	-	11
7906	-	12
7904	-	13
11201	-	14
7106	-	15
7911	-	16

C. 액체배양배지: 미강 5%, sucrose 2%, NaNO₃ 0.15%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.25%

균주	ACE 활성	비고
<i>Asp. sojae</i>	32.5%	macrophage020115Asp. sojae 시료
<i>Asp. oryzae</i>	27.4%	rb2
<i>Monascus pilosus</i>	12.5%	3
<i>M. anka</i>	-	M. anka
<i>M. araneus</i>	13.9%	rb5
<i>M. pupuresus</i>	-	rb6
<i>M. ruber</i>	-	rb7

D. 고체배양배지: 미강 100 g+증류수 120 ml→살균 후 균주접종 (5일 배양)

균주	ACE 활성	
<i>Asp. sojae</i>	22.5%	A번 시료
<i>Asp. oryzae</i>	17.4%	B
<i>Monascus pilosus</i>	-	C
<i>M. anka</i>	-	D
<i>M. araneus</i>	-	E
<i>M. pupuresus</i>	-	F
<i>M. ruber</i>	-	G

다. 미강발효액 중 면역활성물질의 예비 정제조건 설정

1) 예비정제조건 설정을 위한 enzyme 처리

*Monascus pilosus*로 배양한 미강발효액은 미강에서 유래한 전분이 과다 존재하여 정제에 어려움이 예상되었으므로 방법에서 언급한 바와 같이 미강 발효물 1 g당 1000 IU의 amylase 처리하여 전분을 가수분해시킨 후, 그 수율을 검토한 결과는 Table 3-3-6과 같다. 각 미강 발효물은 모두 enzyme 처리에 의해 약 80%정도의 수율 감소를 보임으로써 단순추출에 의한 발효물은 많은 전분을 함유하고 있으며 이들의 제거가 생리활성 소재로의 개발이나 활성물질의 정제에 필수적임을 알수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 *Monascus pilosus*로 액체 배양하여 얻은 미강 발효액 rb-C를 amylase 처리로 잔존 전분을 제거하여 활성 획분 **FRB**로 조제하고 시료로 사용하였다.

Table 3-3-6. Yields of fermented rice bran products after amylase treatment

Femented rice bran products	Strain name	Cultural condition	Yield after enzyme treatment
rb-C (Sample 1)	<i>Monascus pilosus</i>	liquid	19.3%
rb-C (Sample 2)	<i>Monascus pilosus</i>	liquid	20.2%
rb-C (Solid sample)	<i>Monascus pilosus</i>	solid	20.2%

2) 예비정제조건 설정을 위한 HPLC 분석

*Monascus pilosus*에 의해 배양하여 얻어진 활성 획분 rb-C는 활성물질의 정제를 위한 예비정제조건을 설정할 목적으로 amylase 처리하여 FRB 획분을 조제하고 Asahipak GS520+GS320+GS220를 장착한 HPLC를 이용하여 분자량에 따라 분획하였다. Fig 3-3-19에 보는 바와 같이 *Monascus pilosus*로 배양한 미강 발효물은 분자량 1만 이하의 위치에서 주요 peak를 나타내었으며 산성당 및 단백질 함량은 매우 낮거나 함유하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 미강에 존재한다고 알려진 arabinoxylan의 분자량 위치와도 일치하는 내용이다.

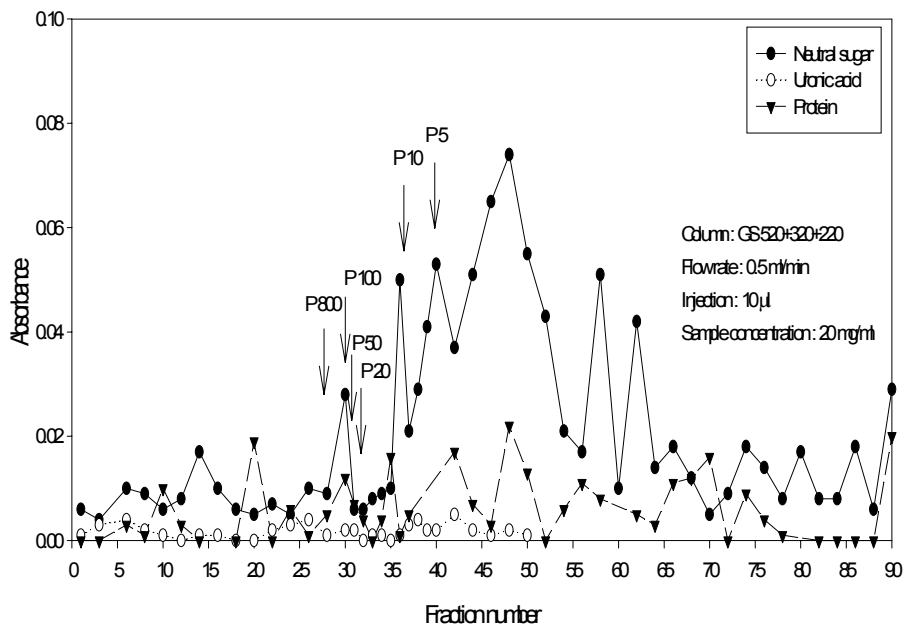


Fig 3-3-19. HPLC peak patterns of the rice bran product fermented by *Monascus pilosus*. (Gel permeation chromatography)

라. 미강발효액 중 면역활성 고분자 획분 FRB의 화학적 조성

*Monascus pilosus*에 의해 생산한 미강발효액 중 면역활성 획분인 FRB에 대한 화학조성을 분석한 결과, Table 3-3-7에 나타난 바와 같이 중성당, 산성당 및 단백질의 함량이 각각 81.82%, 18.18%, 0%로 나타났으며 주요 성분은 탄수화물로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 한편 이들을 가수분해하여 alditol acetate로 유도체를 조제하고 GC에 의해 구성당의 조성을 살펴본 결과, FRB는 23.18%의 galactose와 17.25%의 glucose를 함유하고 있었으며 19.62%의 arabinose와 8.7%의 xylose 조성을 보여 약 28%의 arabinoxylan을 함유하고 있을 가능성을 제시하였다. 또한 rhamnose, fucose, mannose 등이 소량 함유되어 있었으며 18.18%의 galacturonic acid로 판단되는 산성당을 함유하는 특성을 보여 주었다. 이러한 당 조성은 활성 획분 FRB의 활성물질이 arabinoxylan외에도, 다양한 당조성으로 구성된 side chain을 갖는 pectic substance로 존재할 가능성이 예견되었다.

마. FRB획분의 면역활성 본체검토의 검토

FRB획분은 화학 조성 분석 결과, 다당성분 이외에 별다른 성분은 검출되지 않았지만 약한 갈색으로 착색되어 있었다. 이러한 조성은 화학적 분석법 발색정도의 차이에 기인하여 타 미량 성분이 검출되지 않았을 가능성을 배제할 수 없으며, 착색물질의 존재로부터 판단할 때 식물 중에 광범위하게 존재하고 있는 polyphenol의 존재를 추정할 수 있었다. 따라서 시료 중의 활성이 다당부위에 기인하는 것인지, 그 외의 성분에 의한 것인지 확실히 구별할 수 없으므로 CH-1의 당 부위를 산화 개열시키는 periodate처리와 단백질부위를 가수분해하는 protease처리 및 polyphenol류를 산화시

키는 chlorite처리를 행한 후 활성을 비교하였다.(Fig 3-3-20, 3-3-21, 3-3-22참조) 미처리 FRB의 각종 면역활성과 비교했을 때 protease의 처리한 FRB에서는 미처리군과 거의 동일한 활성을 보인 반면, periodate 산화물에서는 급격한 활성의 감소가 나타났으며 chlorite 처리 경우에는 활성의 변화가 인정되지 않았다. FRB 획분이 나타내는 이러한 특성과 FRB가 열에 안정한 비투석 고분자 획분인 점을 고려할 때 활성에 주로 기여하는 활성 본체는 다당류임을 알 수 있었다.

Table 3-3-7. Chemical composition of immuno-stimulating fraction,. FRB from the fermented rice bran products

Chemical composition	FRB fraction (%)
Neutral sugar	81.82
Uronic acid	18.18
Protein	0.00
Component sugar	(Mole%)
Rhamnose	3.19
Fucose	0.58
Arabinose	19.62
Xylose	8.70
Mannose	9.31
Glucose	17.25
Galactose	23.18
Galacturonic acid + GlcA	18.18

한편 면역활성 측정시 양성대조군으로 사용되는 lipopolysaccharide (LPS)의 활성을 저해한다고 알려진 polymyxin B를 FRB에 처리하여 미처리 FRB와의 면역 활성을 비교한 결과, Fig 21 - 23에 나타난 바와 같이 활성의 저하는 거의 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 FRB의 면역활성은 혼입될 수 있는 LPS에 기인한 것이 아니며, FRB의 다당 차체가 소유한 활성임을 알 수 있었으며 FRB의 활성이 LPS와는 상이한 활성 기작을 소유하고 있음을 알 수 있었다.

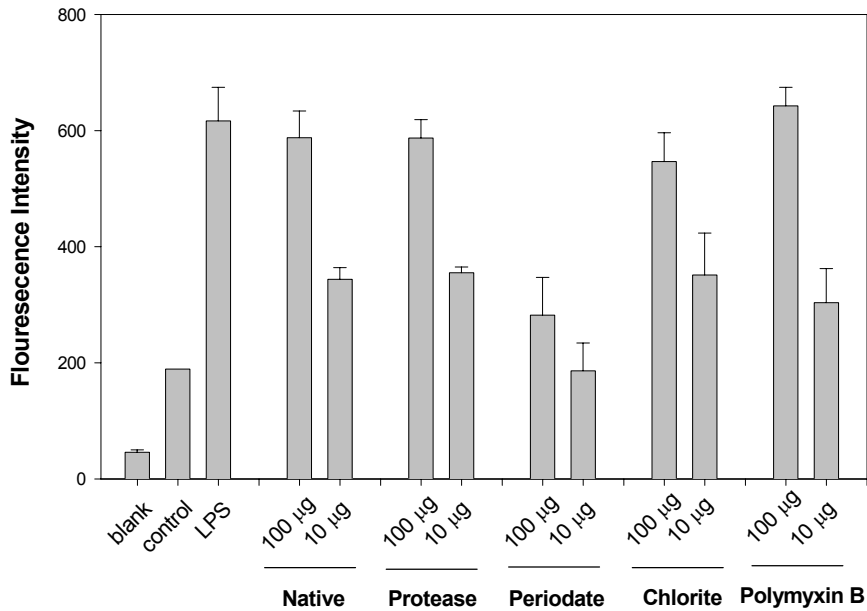


Fig 3-3-20. Changes in intestinal immune system modulating activity of FRB by treatments of protease, periodate, chlorite and polymyxin B.

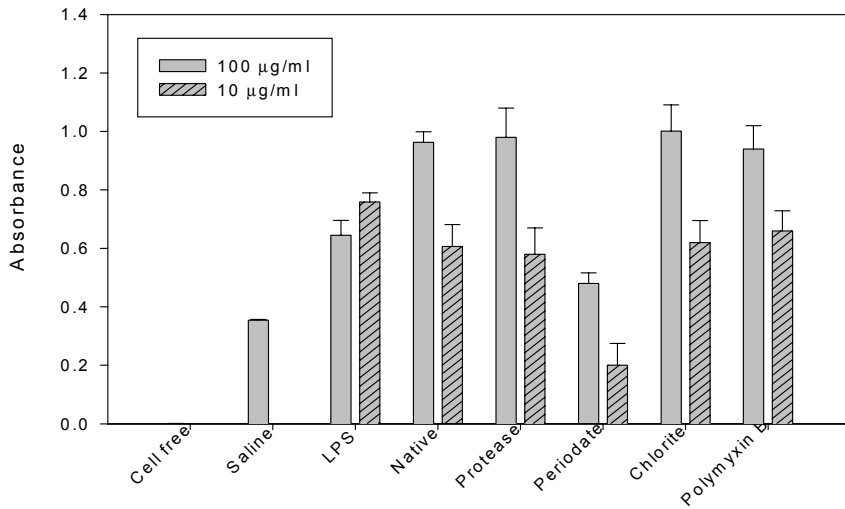


Fig 3-3-21. Changes in macrophage activation of FRB by treatment of protease, periodate and chlorite.

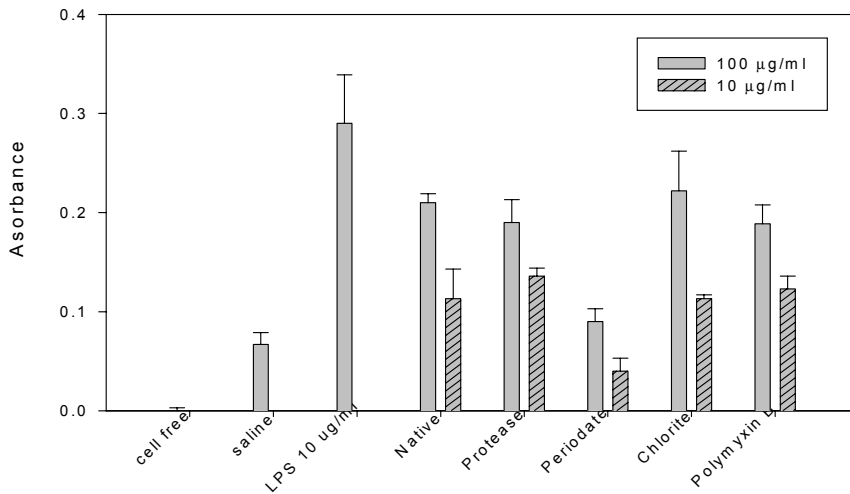


Fig 3-3-22. Changes in mitogenic activity of FRB by treatment of protease, periodate and chlorite.

바. FRB획분이 면역세포의 cytokine 생산에 미치는 영향

1) 활성화된 FRB의 자극에 의한 splenocyte의 cytokine 생산

면역계에 관련된 세포에서는 개개 세포의 활성화도 중요한 의미를 갖지만 각 면역세포들 상호간에 긴밀한 협조하에 숙주방어라는 목표를 수행하는데, 이들 사이에는 각 면역세포들이 분비하는 cytokine류들이 자신의 세포나 타 면역세포의 활성화, 성장 및 분화를 촉진하는 mediator로서의 기능을 담당하고 있다고 알려져 있다. 따라서 높은 lymphocyte mitogen 활성을 보였던 *Monascus pilosus* 의해 얻어진 미강발효액에서 조제한 FRB 획분을 이용, lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 측정하였다. Anti-cytokine과 peroxidase conjugated anti-cytokine을 이용한 sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)를 이용하여 활성화에 의해 유도된 IL-2, IL-6, IL-12, GM-CSF(granulocyte-monocyte-stimulating factor) 및 IFN- γ (interferon- γ)의 생산량을 측정된 결과, FRB 획분은 모든 cytokine류에 대해 대조군에 비해 월등히 높은 생산량을 보여주었다. (Fig 3-3-23 - 3-3-25) 특히 IL-12의 경우에는 양성 대조군인 LPS 및 ConA 보다 우수한 생산능 유도효과를 보였다. B cell 분화의 후기단계에서 활성화된 B cell의 성장인자로 작용하는 IL-6의 경우, 농도 의존적인 생산 유도능을 보였으며 NK cell을 활성화시킨다고 알려진 IL-12의 경우, LPS보다 양호한 생산능을 보였으며, conA와 유사한 정도의 생산유도효과를 나타냈다. (Fig 3-3-23 참조) 이러한 사실은 NK-cell이 체내에서 암세포를 직접 공격할 수 있는 면역 세포임을 고려할 때 FRB가 NK-cell을 활성화시켜 항암활성을 나타낼 가능성이 제시되었다. 한편 T-cell growth factor로 알려진 IL-2도 무침가 대조군에 비해 높은 생산 증가를 보였으며, 골수에 작용하여 각종 granulocyte와 macrophage의 성장을 자극한다고 알려져 있어 담암환자의 화학요법 이후 감소된 면역세포의 증가 목적으로 이용되는 GM-CSF의

생산에 있어서는 양성대조군에 비해 생산량은 낮았지만 농도 의존적으로 생산의 증가 경향을 나타냈다. (Fig 3-3-24) Natural killer cell과 lymphocyte와 macrophage 등의 면역세포를 활성화시키는 IFN- γ 역시 활성화획분에 의해 생산량의 증가는 인정되었다. (Fig 3-3-25) 따라서 미강 발효액 유래 활성화획분 FRB가 면역세포를 자극하여 다양한 cytokine의 생산 증가를 유도한다는 사실은 복잡한 네트워크를 구성하고 있는 생물체의 면역계에 적용시에도 유효한 효과를 기대할 수 있다고 사료된다.

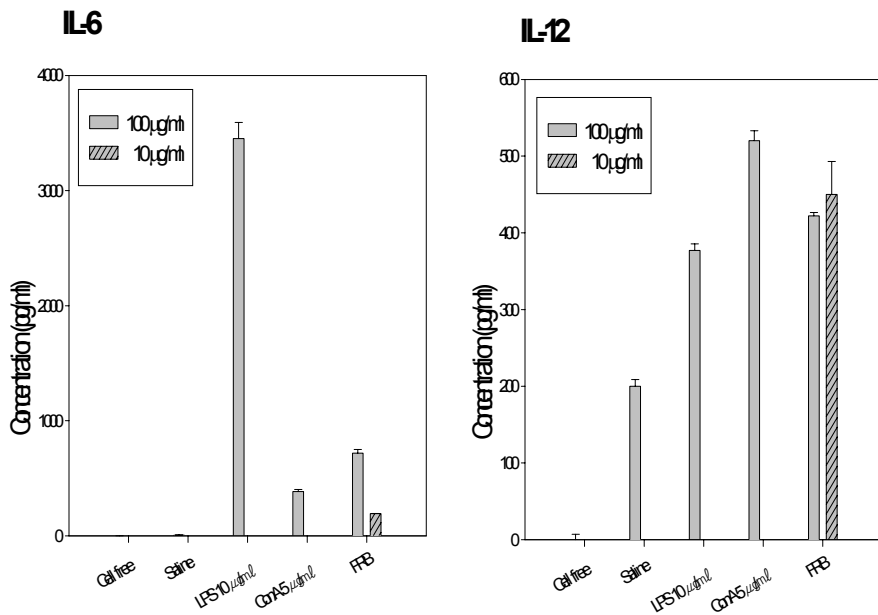


Fig 3-3-23. IL-6 and IL-12 production of splenocytes stimulated by FRB fraction from the fermented rice bran product.

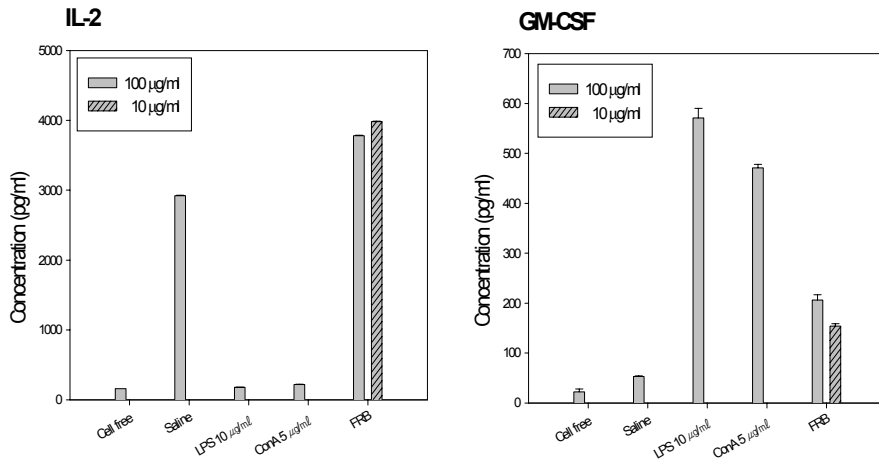


Fig 3-3-24. IL-2 and GM-CSF production of splenocytes stimulated by FRB fraction from the fermented rice bran product.

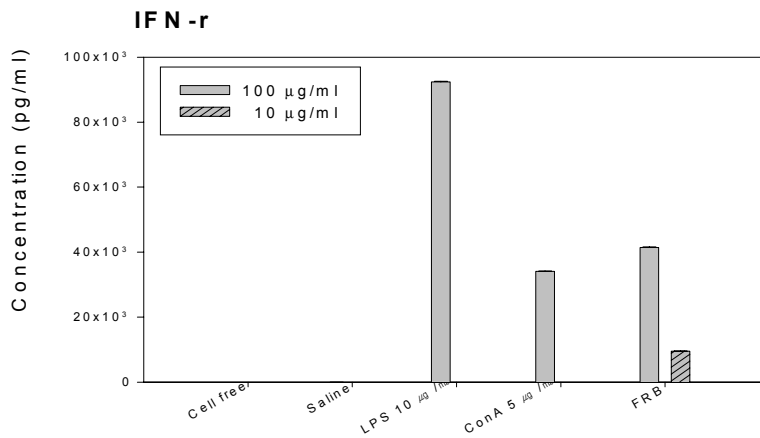


Fig 3-3-25. IFN-γ production of splenocytes stimulated by FRB fraction from the fermented rice bran product.

2) 활성획분 FRB의 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산

활성획분 FRB 획분을 macrophage의 배양 시 첨가하여 생산되는 각종 cytokine류를 측정하였다. Fig 3-3-26, 3-3-27에 나타난 바와 같이 ELISA 법에 의해 IL-1, IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생산량을 측정한 결과, 100 μ g/ml 농도에서 무첨가 대조군에 비해 모든 cytokine의 생산을 증가시키는 결과를 보여주었다. 그러나 10 μ g/ml의 저농도에서는 IL-1, IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생산은 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 한편 NK-cell을 활성화 시킨다고 알려져 있는 IL-12의 경우, LPS로 자극 시 보다 훨씬 우수한 생산 유도 효과를 보였으며, TNF- α 의 생산 자극 활성이 관찰되었는데 이는 종양세포의 세포괴사를 유발하며, 단핵구나 혈관내피 세포에 작용하며 혈관내 IL-1과 IL-6의 분비를 자극한다고 알려져 있다. 또한 cytokine의 생산량은 macrophage 증식 활성도와 유사한 양상을 나타냈다.

대식세포는 항원을 탐식, 처리하여 T 및 B 임파구에 전달하므로써 T 임파구에 의한 일련의 세포성 면역반응과 B 임파구에 의한 항체 매개성 면역반응을 유도함과 동시에 IL-1, IL-6, TNF 등의 세포간 물질을 분비하여 세포성 면역반응 및 항체 매개성 면역반응을 조절한다고 알려져 있으므로 이상의 결과는 미강 발효액에서 분리한 면역활성 획분 FRB가 macrophage의 활성화를 통한 전체 면역계의 증강에도 기여할 수 있음을 시사하는 내용이다.

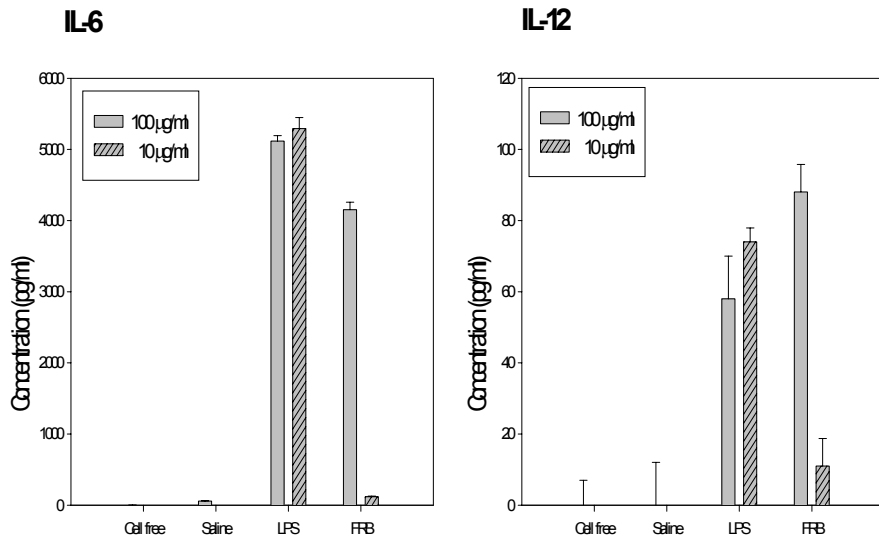


Fig 3-3-26. IL-6 and IL-12 production of macrophages stimulated by FRB fraction from the fermented rice bran product.

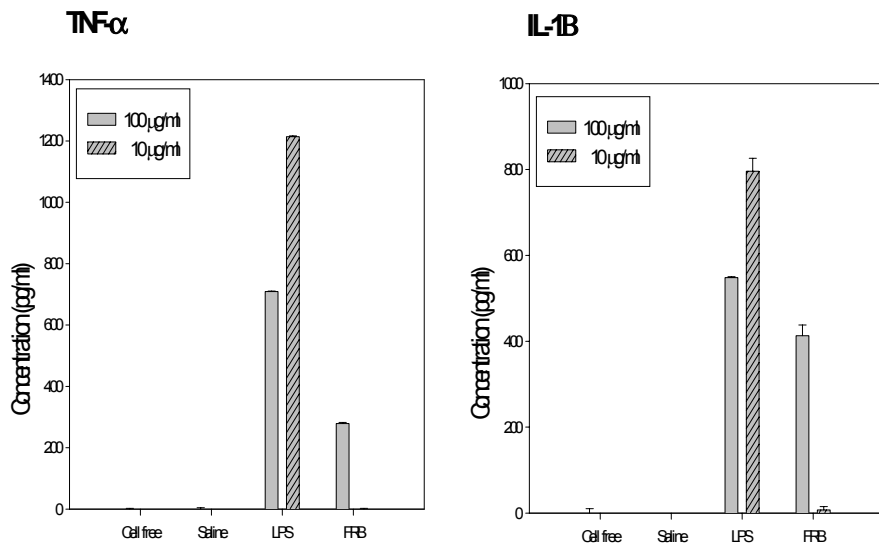


Fig 3-3-27. TNF-α and IL-1 production of macrophages stimulated by FRB fraction from the fermented rice bran product.

바. FRB 획분으로부터 면역활성 다당의 분리 및 정제

1) Anion exchange chromatography (AEC)

활성획분 FRB는 DEAE-Sephacrose FF (Cl⁻ form)로 AEC를 행한 결과, 비흡착 1개 획분(FRB-a)과 11개의 흡착획분(FRB-b~FRB-i)을 얻을 수 있었다. (Fig 3-3-28 참조) 특히 0.4 M의 NaCl로 용출시에는 4개 획분 (FRB-f-I, f-II, f-III, f-IV)이 얻어졌으며 나머지 용출 획분은 모두 1개 획분으로 얻어졌다. 이 획분들의 화학 조성 분석을 해본 결과, 용출 용액인 NaCl의 농도가 높아질수록 중성당과 산성당의 함량은 감소하고 단백질의 함량이 증가됨을 알 수 있었다. (Fig 3-3-28 참조) 그러나 고 NaCl 용액에서 용출된 획분의 단백질의 chromatogram을 조사한 결과 280 nm에서 측정된 protein peak는 실제 protein이 아니라 시료가 갈색으로 착색되어 있어 자외 영역에서 검출된 색소물질이 대부분이었다.

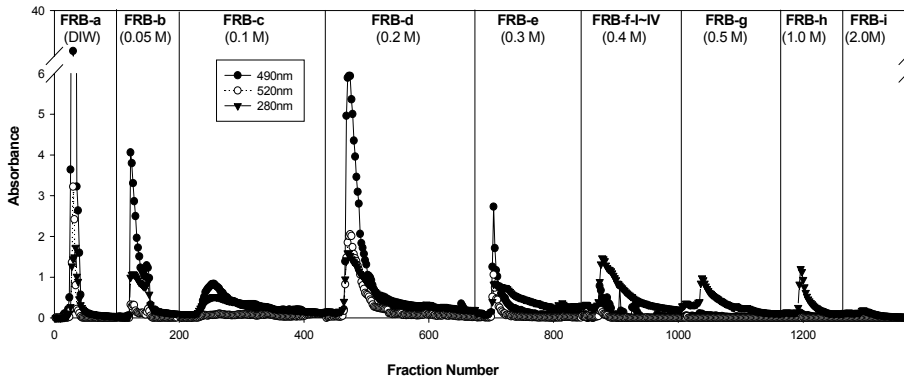


Fig 3-3-28. Anion-exchange chromatography of FRB on the column of DEAE-Sephacrose FF (Cl⁻ form)

The column was eluted with DIW until sugar was no longer detected and then eluted with 0.1 M ~ 2.0 M NaCl solution by stepwise gradient.

이온 교환수지에 의해 정제된 각 획분을 대상으로 면역활성을 측정된 결과는 Fig 3-3-29과 3-3-31에 나타난 바와 같다. 장관면역 활성의 경우, 0.1 M NaCl 용출분획 FRB-c와 0.2 M 용출획분 FRB-d가 공히 가장 우수한 활성을 나타내었다. (Fig 3-3-29) 또한 macrophage 활성의 경우(Fig 3-3-30), FRB-c가 LPS보다도 우수한 활성을 나타내었으며 그다음으로는 0.2 M NaCl 용출분획 FRB-d의 순이었다. 비록 FRB-c의 macrophage의 활성이 FRB-d의 활성보다 약간 높은 활성을 보였으나, 전체적으로 유사한 정도의 활성을 보였고, FRB-d의 경우 수유편에서 훨씬 유리하였으므로 이후의 정제과정은 FRB-d로 진행하는 것이 좋을 것으로 사료되었다. 한편 mitogenic activity의 경우(Fig 3-3-31 참조), 분리된 각 획분에서 모두 비슷한 정도의 활성이 인정 되었으며 활성의 공유 경향을 보였다. 이러한 현상은 활성 다당의 정제 과정에서 흔히 접하게 되는 사항으로 다당의 경우, 비슷한 당잔기를 공유하는 다양한 분자의 혼합물로 존재하는데 따른 현상이다. 이상의 결과를 종합할 때 0.1 M 및 0.2 M 용출획분인 FRB-c와 FRB-d가 상대적으로 높은 장관면역 활성 및 macrophage 활성을 보였으므로 이들 획분을 대상으로 지속적인 정제 과정을 수행하였다.

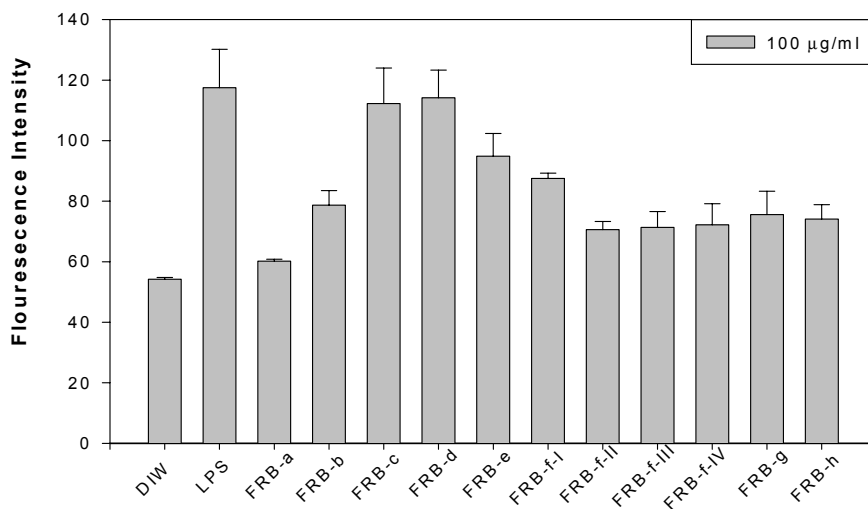


Fig 3-3-29. Intestinal immune system modulating activities of FRB subfractions obtained by anion exchange chromatography.

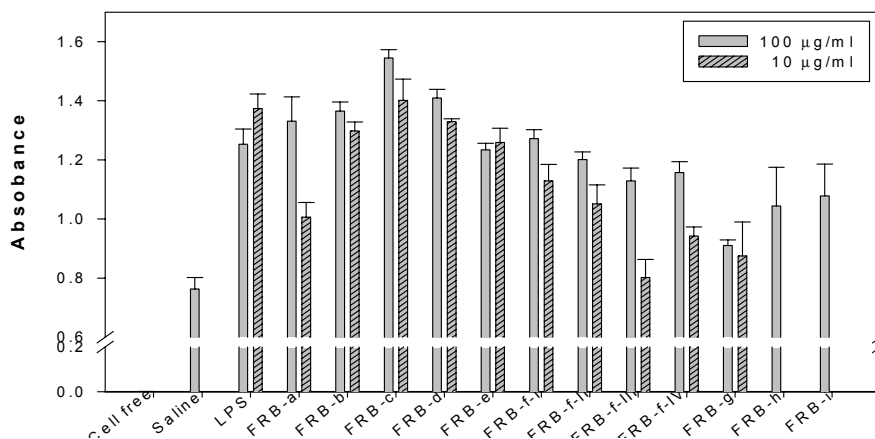


Fig 3-3-30. Macrophage lysosomal enzyme activities of FRB subfractions obtained by anion exchange chromatography.

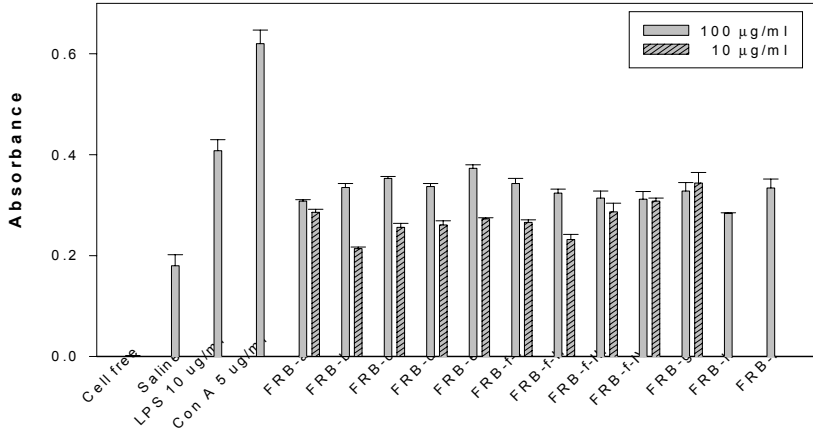


Fig 3-3-31. Lymphocyte mitogenic activities of FRB subfractions obtained by anion exchange chromatography.

2) Gel permeation chromatography (GPC)

AEC 정제과정중 높은 활성을 보였던 FRB-c 및 FRB-d는 HPLC로써 대략적인 분자량을 검측한 후, Bio gel P-30 및 Bio gel A-0.5m 중 분자량에 합당한 resin을 선택하여 GPC를 수행하였다. FRB-c 획분의 경우 Biogel P-30 resin을 이용하여 겔 여과한 결과, FRG-c-I과 FRG-c-II의 2개 획분으로 분획되었다. (Fig 3-3-32) 그러나 고분자 획분인 FRG-c-I은 void volume 영역에서 용출되어 나왔으므로 정제가 불충분할 것으로 판단되어, Biogel A-0.5m을 이용하여 재차 GPC를 행한 결과, FRB-c-Ia, FRB-c-Ib 및 FRB-c-Ic의 3개 획분을 얻을 수 있었다. (Fig 3-3-33) AEC 과정에서 0.2 M NaCl로 용출된 FRB-d 획분을 Biogel A-0.5m column을 이용 정제한 결과 분자량이 상이한 FRB-d-I, FRB-d-II, FRB-d-III의 3개 획분이 얻어졌다. (Fig 3-3-34)

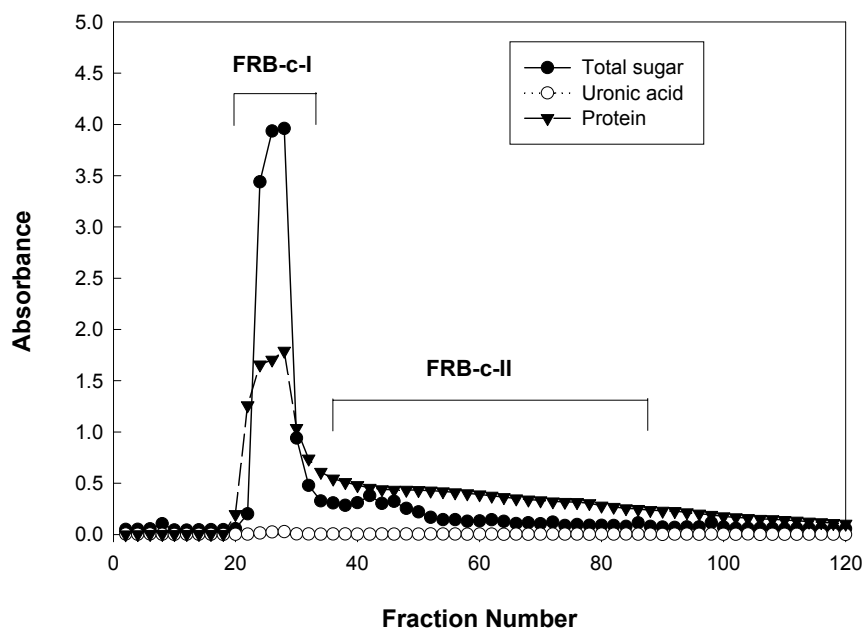


Fig 3-3-32. Gel permeation chromatography of FRB-c on the column of Biogel P-30.

The column (2.2 × 70 cm) was eluted with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

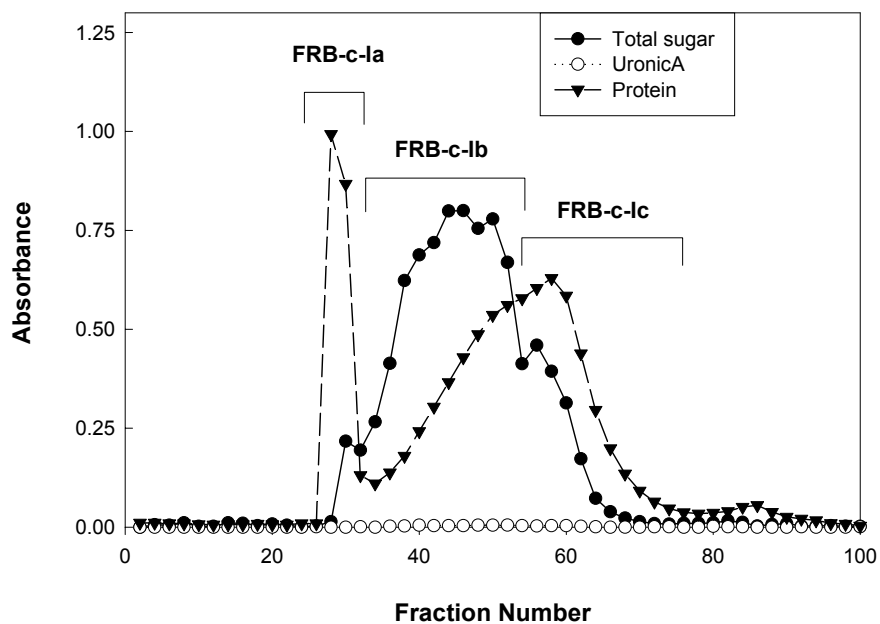


Fig 3-3-33. Gel permeation chromatography of FRB-c-I on the column of Biogel A-0.5m.

The column (2.2×70 cm) was eluted with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

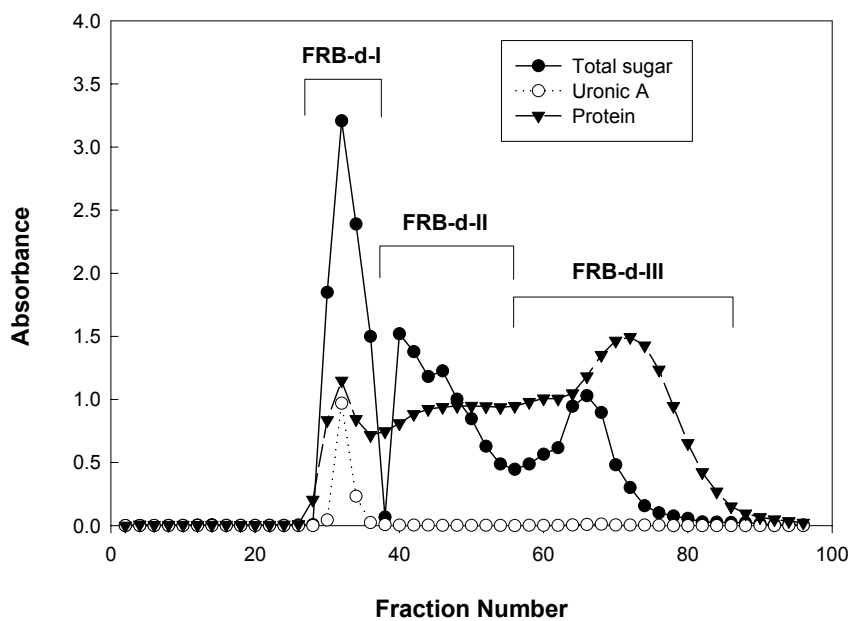


Fig 3-3-34. Gel permeation chromatography of FRB-d on the column of Biogel A-0.5m.

The column (2.2 × 70 cm) was eluted with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

3) 정제획분의 면역활성 측정

가) 정제 획분에 의한 면역 활성화

FRB-c 및 FRB-d 계열의 정제획분들을 대상으로 면역 활성을 측정한 결과는 Fig 3-3-35와 3-3-36에 제시된 바와 같다. Macrophage의 활성화의 경우, FRB-c에서 정제된 획분에서는 모두 농도 의존적 활성을 보였으며 FRB-c-Ia, FRB-c-Ib 및 FRB-c-II의 활성이 비슷하게 높게 나타났으며 FRB-c-Ic는 상대적으로 낮은 결과를 보였다. 그러나 수율을 고려할 때 FRB-c-Ib가 주요 활성 정제 획분으로 판단되었다. FRB-d에서 정제된 3개 획분은 분자량이 큰 획분일수록 활성이 높은 경향을 보였으며 FRB-d-I이 가장 양호한 활성을 보였다. (Fig 3-3-35)

Lymphocyte mitogen 활성화의 경우, FRB-c-Ia와 FRB-c-Ib가 타 정제 획분에 비해 높은 활성을 보였으며 FRB-d에서 정제된 3개 획분은 FRB-d-I, FRB-d-II, FRB-d-III의 순으로 활성이 높게 나타났다. 이러한 경향은 macrophage의 활성화과도 일치하는 경향이다. (Fig 3-3-36)

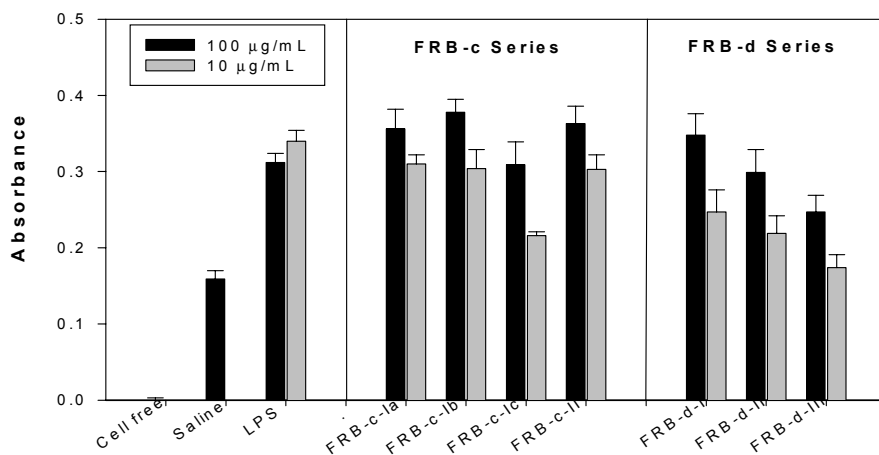


Fig. 3-3-35. Macrophage lysosomal enzyme activities of FRB-c and FRB-d subfractions obtained by gel filtration.

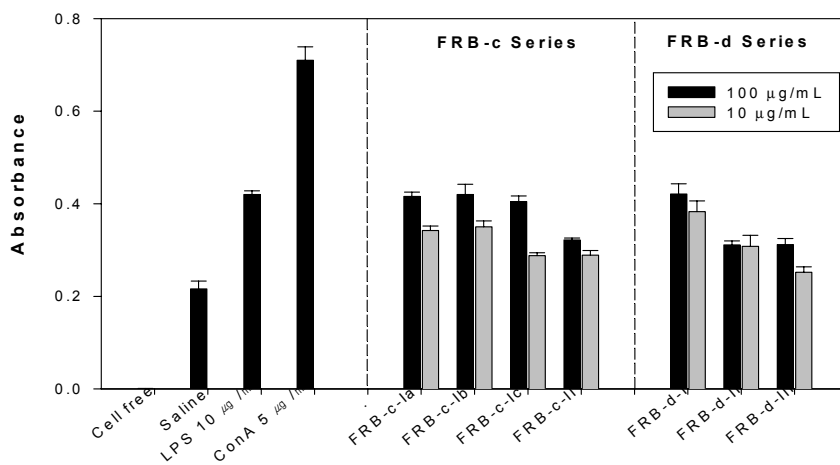


Fig 3-3-36. Lymphocyte mitogenic activities of FRB-c and FRB-d subfractions obtained by gel filtration.

나) 정제 획분의 자극에 의한 면역관련 세포의 cytokine 생산

정제과정에서 얻어진 각 획분을 이용, macrophage와 lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 측정된 결과는 Table 3-3-8 및 3-3-9에 제시된 바와 같다. 활성 정제 다당으로 macrophage를 자극하고 IL-6, IL-12, TNF- α 및 IL-1의 생산량을 조사한 결과, 무첨가 대조군이 혼적 수준의 생산량을 보인 반면, FRB-c에서 정제된 FRB-c-Ia, Ib 및 II의 경우 유사한 정도로 높은 생산량을 보였으며, FRB-d군에서는 고분자 획분인 FRB-d-I 획분이 가장 높은 생산량을 나타냈다. (Table 3-3-8) 한편 활성 다당으로 lymphocyte를 자극한 경우, IFN- γ , GM-CSF, IL-6, IL-12의 경우 대체적으로 농도의존적으로 높은 생산량의 증가를 보였으나 IL-2의 경우는 저 농도에서 대체로 높은 생산량을 보였다. FRB-c군에서는 FRB-c-Ic의 경우를 제외하고 높은 생산 자극능을 나타냈으며, FRB-d군에서는 IL-2와 IL-6는 고분자 획분인 FRB-d-I에서 최대 생산이 유도된 반면, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생산량은 intermmEDIATE fraction인 FRB-d-II에서 최대의 결과를 얻었다. (Table 3-3-9) 따라서 미강 발효액 유래 활성 획분 FRB가 면역세포를 자극하여 다양한 cytokine의 생산 증가를 유도한다는 사실은 복잡한 네트워크를 구성하고 있는 생물체의 면역계에 적용시에도 유효한 효과를 기대할 수 있다고 사료된다.

Table 3-3-8. Cytokine production of macrophages stimulated by immuno-active polysaccharide from the fermented rice bran product

Immuno-active polysaccharides	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cytokine production (pg/mL)			
		IL-6	IL-12	TNF- α	IL-1B
Control	0	57 \pm 5.5	0 \pm 12	0 \pm 4.5	0 \pm 0
LPS	100	5117 \pm 76	58 \pm 12	709 \pm 1.1	548 \pm 2.7
	10	5292 \pm 156	74 \pm 3.9	1214 \pm 2.3	796 \pm 30
FRB-c-Ia	100	4888 \pm 9.9	91 \pm 3.9	635 \pm 7	699 \pm 41
	10	2681 \pm 69	80 \pm 3.9	39 \pm 2.3	509 \pm 63
FRB-c-Ib	100	3197 \pm 135	61 \pm 16	0 \pm 2	324 \pm 8.2
	10	423 \pm 23	44 \pm 7.8	0 \pm 0	78 \pm 5.5
FRB-c-Ic	100	356 \pm 19	36 \pm 3.9	0 \pm 0	57 \pm 8.2
	10	53 \pm 3.3	0.5 \pm 7.7	0 \pm 1.2	0 \pm 8.2
FRB-c-II	100	4003 \pm 5.5	55 \pm 16	177 \pm 4.7	366 \pm 8.2
	10	2178 \pm 80	66 \pm 0	0 \pm 1.2	289 \pm 14
FRB-d-I	100	4227 \pm 30	121 \pm 0	220 \pm 0	678 \pm 0
	10	793 \pm 20	61 \pm 0	0 \pm 1.2	198 \pm 0
FRB-d-II	100	1960 \pm 3.3	69 \pm 3.9	0 \pm 1.2	332 \pm 8.2
	10	50 \pm 9.9	8.7 \pm 3.9	0 \pm 1	8.7 \pm 33
FRB-d-III	100	527 \pm 22	39 \pm 7.8	0 \pm 2.3	161 \pm 8.2
	10	44 \pm 1	0 \pm 7.7	0 \pm 1.2	0 \pm 2.7

Table 3-3-9. Cytokine production of splenocytes stimulated by immuno-active polysaccharide from the fermented rice bran product

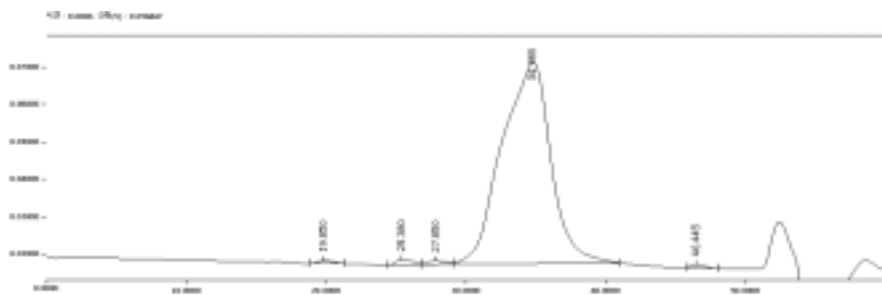
Immuno-active polysaccharides	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cytokine production (pg/mL)				
		IFN- γ	IL-2	GM-CSF	IL-6	IL-12
Control	0	20 \pm 8	2920 \pm 9	52.8 \pm 1.19	4.5 \pm 3	200 \pm 8.6
LPS	10	92420 \pm 141	180 \pm 0.9	571 \pm 19.065	3452 \pm 140	377 \pm 8.6
FRB-c-Ia	100	49200 \pm 149	2080 \pm 0.98	301 \pm 29	2018 \pm 39	383 \pm 52
	10	21280 \pm 8	5400 \pm 8.35	310 \pm 25	739 \pm 10	361 \pm 13
FRB-c-Ib	100	32580 \pm 124	2520 \pm 1.96	340 \pm 26	1300 \pm 44	401 \pm 17
	10	11500 \pm 83	4020 \pm 2.45	274 \pm 64	302 \pm 3	529 \pm 8.6
FRB-c-Ic	100	11500 \pm 66	2840 \pm 4.9	309 \pm 11	452 \pm 39	414 \pm 8.6
	10	0 \pm 8.3	3060 \pm 12.22	69 \pm 8.3	23 \pm 2	307 \pm 13
FRB-c-II	100	85360 \pm 907	1200 \pm 0.98	498 \pm 14	3084 \pm 7	352 \pm 8.6
	10	30240 \pm 74	4180 \pm 8.34	274 \pm 2.4	1531 \pm 69	654 \pm 21
FRB-d-I	100	14680 \pm 24	6120 \pm 2.94	214 \pm 11	616 \pm 60	328 \pm 26
	10	7500 \pm 49	4060 \pm 6.381	170 \pm 3.5	143 \pm 2	352 \pm 8.6
FRB-d-II	100	22340 \pm 16	3900 \pm 6.38	307 \pm 32	290 \pm 22	383 \pm 17
	10	1260 \pm 8.3	4900 \pm 12.76	90 \pm 12	26 \pm 5	358 \pm 17
FRB-d-III	100	6200 \pm 24	3860 \pm 2.45	153 \pm 3.6	180 \pm 0	407 \pm 26
	10	0 \pm 8.3	2900 \pm 4.9	48 \pm 4.8	13 \pm 0	258 \pm 4.3

4) 정제 다당의 순도 및 분자량 확인

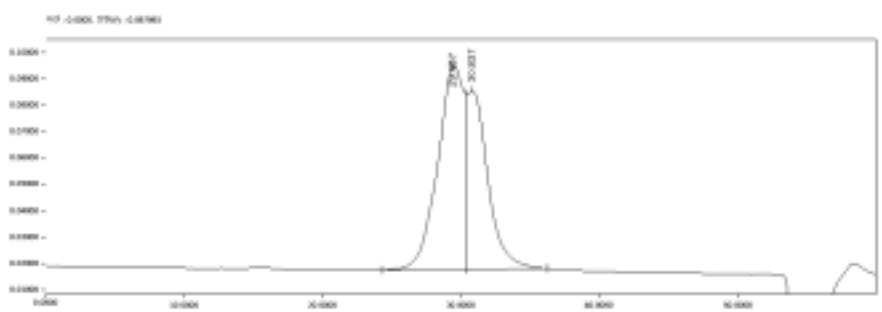
FRB-c 및 FRB-d로부터 정제된 각 획분의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 Asahipak GS-520, GS-320과 GS-220 column을 차례대로 연결하여 HPLC를 수행하였다.(Fig 3-3-37) 수율과 활성이 양호하였던 FRB-c-Ib의 경우 retention time 34.7분대에서 main peak를 나타냈으나 고분자 영역에서 shoulder를 갖는 peak양상을 보였다. 그외 FRB-c 유래 정제 획분은 모두 단일 peak로 나타났다. FRB-d 유래의 획분 중, 수율면에서 가장 좋았고 중간 정도이 활성을 보였던 FRB-d-II는 좌우 대칭의 단일 peak로 나타나 순수하게 정제된 것을 확인할 수 있었지만, 활성이 가장 양호하였던 FRB-d-I의 경우 2개의 peak가 겹쳐져 나타난 것으로 보아 부분 정제됨을 확인할 수 있었다.

이들의 분자량을 측정하기 위하여 표준 물질로서 pullulan series를 사용하여 표준곡선을 작성하고(Fig. 3-3-38) 그 분자량을 추정된 결과, 면역 활성과 수율이 우수하게 정제되었던 FRB-c-Ib는 298,000 Da, FRB-d-I은 172,000 Da, FRB-d-II는 44,000 Da의 다당체임을 확인할 수 있었다. (Table 3-3-10)

FRB-c-Ib



FRB-d-I



FRB-d-II

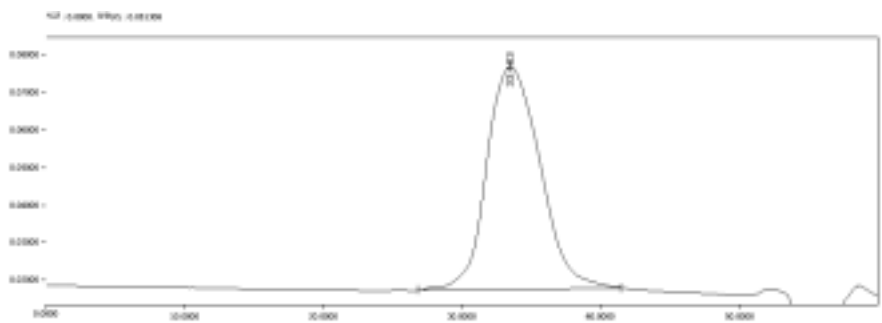


Fig. 3-3-37. HPLC chromatographs of the immuno-stimulating polysaccharides, FRB-c-Ia, FRB-d-I and FRB-d-II purified from fermented rice bran products.

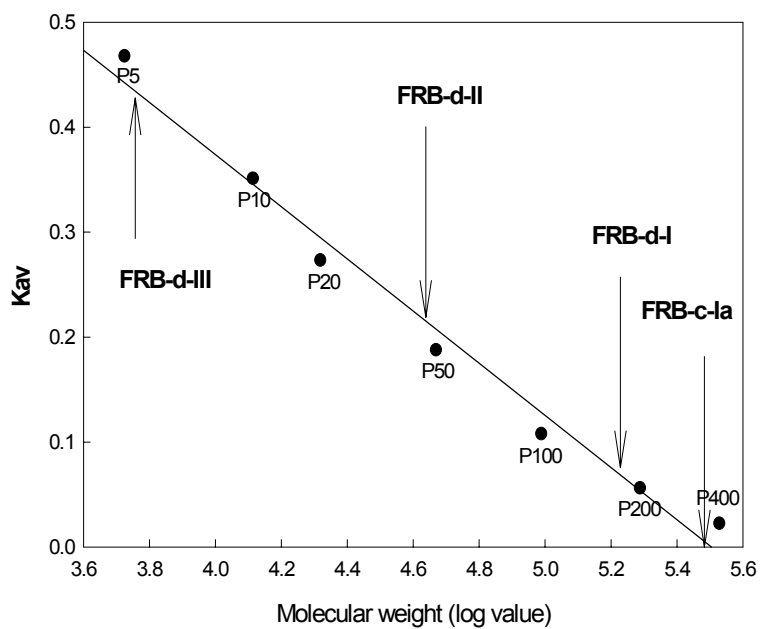


Fig 3-3-38. Standard curve for molecular weight determination of the purified polysaccharides. $[K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)]$

Table 3-3-10. Molecular weights of the immuno-stimulating polysaccharides purified from fermented rice bran products

Sample	Molecular weight (Da)
FRB-c-Ib	298,000
FRB-d-I	172,000
	107,000
FRB-d-II	44,000
FRB-d-III	5,700

사. 미강발효액에서 정제한 면역활성 다당의 구조 특성

1) 정제다당의 일반 구조 특성

이들 고활성획분에 화학 조성을 분석한 결과, Table 3-3-11에 나타난 바와 같이 FRB-c-Ib는 중성당 함량이 약 92.4%, 산성당 함량이 약 7.6%이고 단백질은 검출되지 않았다. 구성당 분석을 한 결과 이들은 주로 galactose (29.7%)와 arabinose (27.0%), xylose (18.1%)로 구성되어 있었으며 그 외 mannose, glucose, rhamnose 및 산성당이 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다. (Table 3-3-11) 한편 FRB-d 유래 정제 다당들은 중성당 (50.1 - 82.2%) 및 산성당 (16.0 - 44.9%)이 다양한 비율로 함유되어 있었으며 FRB-d-II 및 d-III의 경우 단백질을 소량씩 함유하고 있었다. 또한 이들은 공통적으로 arabinose, galactose, xylose를 높은 비율로 함유하고 있었다.

Table 3-3-11. Chemical compositions of the purified immuno-stimulating polysaccharides, FRB-c-Ia, FRB-d-I, FRB-d-II and FRB-d-III

(%)

Chemical composition	FRB-c-Ib	FRB-d-I	FRB-d-II	FRB-d-III
Neutral sugar	92.42	79.00	82.25	50.13
Uronic acid	7.58	21.00	16.04	44.88
Protein	0.00	0.00	1.71	4.99
Component sugar	(mol%)			
Ramnose	2.37	0.91	5.15	8.73
Fucose	1.38	0.87	0.00	2.81
Arabinose	27.04	33.06	29.02	13.94
Xylose	18.11	10.30	15.20	5.84
Mannose	9.23	1.10	4.13	1.47
Glucose	4.56	4.17	4.07	6.65
Galactose	29.74	28.58	24.68	10.70
Glucuronic acid +Galacturonic acid	7.58	21.00	16.04	44.88

정제 획분 FRB-c-Ib, FRB-d-I, FRB-d-II의 분자량은 arabinose, galactose, xylose를 고 비유로 함유한 공통적 특성을 가지고 있었지만 분자량은 각각 상이하여 298,000 Da, 172,000 Da, 및 44,000 Da을 나타냈으며 단백질은 거의 함유되어 있지 않았다. 이들 활성 획분은 특히 arabinose와 galactose가 높은 비율로 함유되어 있으므로 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 시사되었으므로 β -Glucosyl Yariv antigen을 이용 반응성 실

험을 행하였다. β -Glucosyl Yariv antigen은 arabinogalactan 중의 arabino-3.6-galactan과 특이적으로 반응하여 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는 바 이들과의 반응성을 나타낼 경우 적어도 전체 구조안에 주쇄가 3-linked Gal로 구성되고 C6위치에서 분지쇄를 갖는 arabinogalactan을 함유하고 있음을 알 수 있다. 이를 정제 획분들과 single radial gel diffusion을 행한 결과, 각 다당들은 전혀 halo를 형성하지 않으므로써(자료는 제시하지 않았음) arabino-3.6-galactan 구조를 소유하지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 이들 다당들이 arabinogalactan 보다는 arabinoxylan으로 존재할 가능성을 높음을 추정할 수 있었다.

2) 활성 다당의 결합양식

활성다당 정제가 비교적 양호하다고 판단된 FRB-c-Ib와 FRB-d-II는 구조분석의 일환으로 methylation에 의한 결합양식의 해석을 행하였다. Methylation법은 전체 다당을 DMSO에 녹인 후, 결합에 참여하지 않은 OH group을 methyl화시키고, 가수분해하고 환원한 후, 결합에 참여한 나머지 OH group을 acetylation하여 유도체화한 후, GC-MS로 분석하였다. Table 3-3-12에 보는 바와 같이 GS-4a-I는 arabinose 결합 및 galactose 결합이 많았으며 terminal-Ara, 4-linked 및 5-linked Ara 잔기와 4-linked Gal, 6-linked Gal 및 4,6-branched Gal 잔기가 우세하였다. xylose 잔기로는 4-linked Xylp와 terminal-Xyl가 우세하였다. 이러한 사실은 본 다당이 arabino-4-galactan와 arabinoxylan으로 존재할 가능성을 강력히 시사하였으며, terminal-Ara 잔기가 많은 결과로부터 본 다당이 고도로 분지된 다당으로 존재함을 알 수 있었다. 그러나 상세한 구조의 규명을 위해선 구조분석에 대한 더 많은 실험이 요청된다고 판단된다.

Table 3-3-12. Methylation analysis of FRB-c-Ia and FRB-d-II purified from fermented rice bran products

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	FRB-c-Ia	FRB-d-II
Ara	terminal(f)	21.08	21.99
	4 or 5	10.87	14.79
Xyl	terminal(p)	5.65	4.93
	4 or 5	13.39	15.35
Rha	terminal(p)	3.24	4.28
	2,4 or 2,5	-	1.27
Man	3	6.71	4.32
Gal	terminal	7.75	9.73
	4	9.34	8.67
	6	12.95	8.56
	4,6	4.39	4.06
Glc	terminal	2.55	2.04
	3	2.06	-

아. 미강 발효액 유래 FRB획분의 in vivo 면역 증강 활성

1) 활성획분의 in vivo 투여에 의한 대식세포 활성화

생체에 이물질(nonsel, 감염성 미생물 등)이 침입하였을 때 가장 먼저 일어나는 면역반응은 대식세포(macrophage)에 의한 탐식작용(phagocytosis)이다. 또한 대식세포는 항원을 processing하여 일부를 자신의 표면에 부착(presentation), 제시함으로써 T 림프구를 유도하고 후천성 면역계를 작동할 수 있도록 해주는 effector cell로서의 수행하게 한다. 미강 발효액 활성획분의 in vivo 투여에 의한 대식세포의 활성화 여부를 검토하기 위해 FRB 획분을 0, 2.5, 5.0, 25 mg/kg (50, 100, 500 μ g/head) 농도로 5일간 정맥 및 복강 내 투여하고 ex vivo 활성화 여부를 lysosomal phosphatase 법으로 측정하였다. FRB를 정맥투여하고 macrophage의 활성화를 측정한 결과, 5.0 mg/kg 투여한 군 투여한 군에서 대조군에 비해 높은 대식세포 활성화 경향을 나타낸 반면, 2.5 mg/kg 처리군에서는 대조군과 유사한 경향을 보여 주었다. 시료 25 mg/kg 투여군에서는 5.0 mg/kg 투여군 보다 낮은 활성을 보임으로써 활성시료라도 체내 과다 투여 시에는 작용하지 못할 가능성을 시사하였다.(Fig. 3-3-39). 그러나 복강에 투여하였을 경우, 투여농도에 따라 활성의 증가의 경향과 함께 양호한 활성을 보였다. 이는 FRB가 투여경로에 따라서도 상이한 반응을 보임을 알 수 있었다. (Fig. 3-3-39)

2) 활성획분의 in vivo 투여에 의한 비장 림프구 증식활성

비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하며, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극을 받은 후 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 지닌다. 미강발효액 유래 FRB획분을 정맥 및 복강 내 투여하고 비장을 분리 림프

구 증식정도를 MTT 법으로 측정한 결과, 정맥 주사한 경우는 25 mg/kg 투여한 군에서 대조군과 유의있는 차이를 두고 활성이 증가하는 경향을 보였으며 복강 투여의 경우 2.5 mg/kg에서는 별다른 변화가 없었으나, 5 mg/kg 투여군과 25 mg/kg 투여군에서는 비슷한 정도의 활성 증가 경향을 보였다. (Fig 3-3-40)

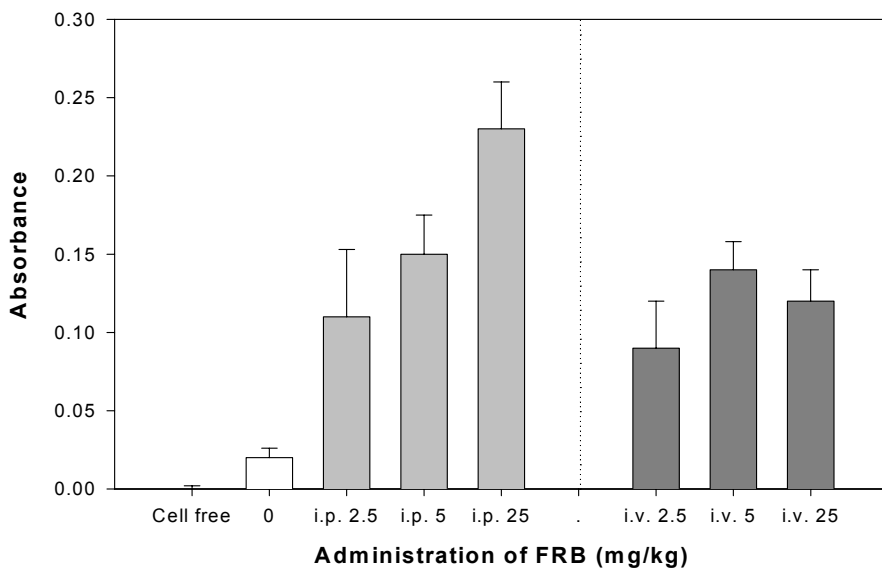


Fig 3-3-39. Macrophage activation by intravenous and intraperitoneal administration of FRB prepared from fermented rice bran products.

FRB fraction was intravenously or intraperitoneally administered for 5 days into Balb/c mice(n=6) by 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg and 25.0 mg/kg. Control was saline only.

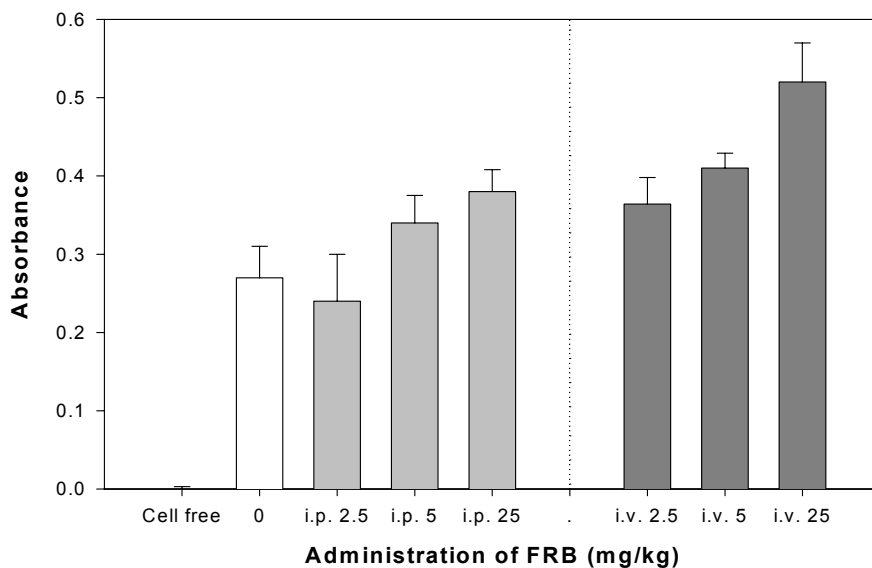


Fig 3-3-40. Lymphocyte mitogenic activity after intravenous and intraperitoneal administration of FRB prepared from fermented rice bran products.

FRB fraction was intravenously or intraperitoneally administered for 5 days into Balb/c mice(n=6) by 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg and 25.0 mg/kg. Control was saline only.

3) 미강 발효액 유래 활성획분의 시판 활성다당의 항전이 활성 비교

이상의 결과로부터 미강 발효액 유래 활성획분 FRB는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 각종 면역활성이 우수한 것으로 판명되었으며 따라서 이들 활성 물질이 *in vivo*에서 면역 활성화에 의한 항종양 활성을 보일 가능성이 제시되었다. FRB 획분(25 mg/kg, 10 mg/kg 및 5 mg/kg)과 양성 대조군으로 면역 활성소재로 시판되고 있는 미강 유래 다당체인 Biobran™ (일본 Daiwa Co. arabinoxylan으로 추정) 및 구름 버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 단백다당체 PSP (Canada 산)를 종양 접종 2일 전 및 1일 후에 10 mg/kg 씩 각각 1회 꼬리정맥에 투여하고 Colon29-M3.1 세포주의 폐암전이의 억제율을 측정된 결과, Fig 3-3-41에 나타난 바와 같이 FRB의 경우 10 mg/kg 투여군에서 85% 이상의 높은 전이 억제율을 보였으며 저해활성도 농도의존적이었다. 였다. 그러나 면역 소재로 시판되고 있는 arbinoxylan인 Biobran™ 및 PSP 의 경우에는 활성의 편차가 심하여 정확한 판단은 어려우나 적어도 그 활성은 크지 않은 것으로 판단되었다. 따라서 FRB는 담암 환자의 전이 억제나 암제거 수술 후의 전이 억제에도 유효하게 작용할 가능성이 추정되었다.

자. 미강 발효액 유래 면역활성 다당체 FRB의 독성실험

1) FRB의 경구투여 급성독성 실험

미강 발효액 유래 획분 중 가장 산업화가 가능할 것으로 판단된 FRB 획분을 대상으로 급성독성 검사를 행하였다. 면역활성 다당체 FRB를 500, 1000, 2,500 및 5,000 mg/kg 농도로 경구 투여하고, 14일간 관찰하며 체중의 변화와 생존율을 측정하였다. 그 결과 Table 3-3-13에 나타난 바와 같이 각 처리군에서 체중은 점차로 증가하였으며 모든군에서 생존율이 100%로 확인되었다. 따라서 FRB는 경구투여에 의한 독성이 없는 것으로 판단되었다.

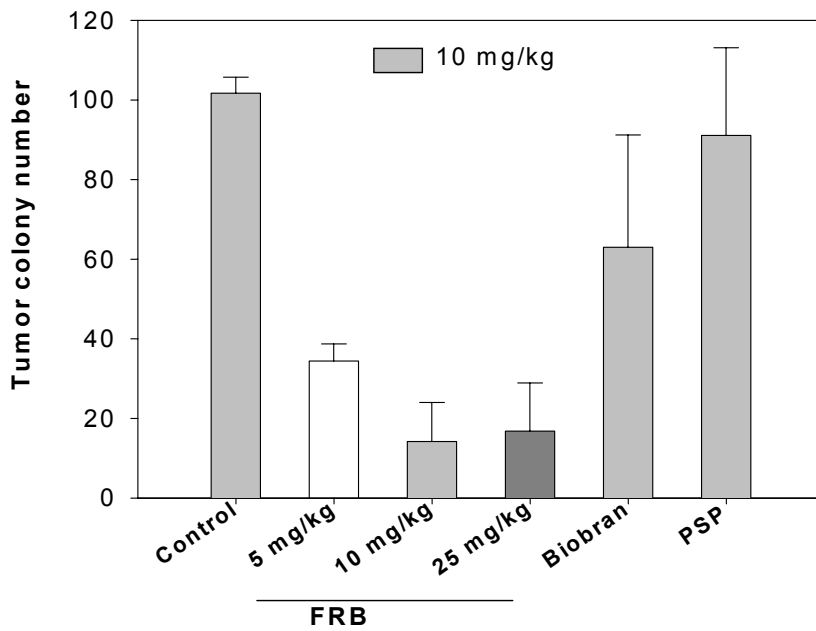


Fig 3-3-41. Inhibitory effect of FRB fraction and commercially developed products on lung metastasis of colon 26-M3.1 carcinoma.

Table 3-3-13. Acute toxicity of FRB fraction administered by oral into mice

Group	No. of mouse	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	No. of mouse survived	Survival rate(%)
Saline	6	29.4±2.51	36.8±3.01	6	100
500 mg/kg	6	29.8±2.73	37.5±4.84	6	100
1,000 mg/kg	6	30.8±2.91	36.9±4.91	6	100
2,500 mg/kg	6	30.4±3.14	37.4±3.65	6	100
5,000 mg/kg	6	29.9±2.45	37.7±4.11	6	100

2) FRB의 꼬리정맥투여 급성독성 실험

FRB의 정맥 투여에 대한 급성독성을 조사하기 위하여 FRB를 100, 250, 500 mg/kg 농도로 생리식염수에 녹여 꼬리정맥에 주사한 후, 48시간 동안 관찰하였다. 그 결과 Table 3-3-14에 나타난 바와 같이 100, 250, 500 mg/kg 모든 처리군에서 100% 생존율을 보였다. 따라서 FRB의 LD₅₀은 500 mg/kg을 훨씬 초과하는 용량에서 나타날 것으로 추정되었으며 500 mg/kg이하에서는 정맥 주사하여도 독성이 거의 없는 것으로 판단되었다.

Table 3-3-14. Acute toxicity of FRB fraction by intravenous injection in mice

Group	No. of mouse	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Time (hr)		Survival rate (%)
				Death		
				1	48	
saline	6	31.8±1.9	31.5±2.0	0	0	100
100 mg/kg	6	31.4±2.2	31.8±2.4	0	0	100
250 mg/kg	6	32.1±2.0	32.8±2.8	0	0	100
500 mg/kg	6	31.9±1.9	30.9±3.1	0	0	100

3) FRB의 마우스 꼬리정맥 주사시 장기무게변화

FRB 획분을 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg의 농도별로 꼬리정맥에 주사한 후 7일간 각 처리군의 체중의 변화를 측정하였으며, 7일째 치사하여 독성 관련장기인 비장, 흉선, 간, 신장을 적출하고 그 무게를 측정하였다. Table 3-3-15에서 나타난 바와 같이 장기무게는 대조군에 비하여 100, 250, 500 mg/kg 농도에서 거의 변화가 없었다. 따라서 면역 활성 다당체 FRB는 별다른 독성이 없음이 확인되었다.

Table 3-3-15. Changes of internal organs' weights of mice by intravenous injection of FRB fraction

Group	Final body weight(g)	Spleen weight(g)	Liver weight(g)	Thymus weight(g)
Saline	34.3±2.7	0.12±0.04	1.70±0.28	0.06±0.01
100 mg/Kg	33.8±3.1	0.11±0.06	1.68±0.24	0.06±0.01
300 mg/Kg	34.4±2.9	0.10±0.03	1.83±0.26	0.05±0.01
500 mg/Kg	34.4±3.2	0.13±0.04	1.92±0.22	0.05±0.01

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 수행결과 얻어진 성과는 면역활성성분의 소재화와 이들의 제품화로 활용방안은 다음과 같다.

- 소재산업에 응용하는 방안으로 식품생산에 관여하는 소재가 지금까지는 영양, 기호성을 중심으로 개발되어왔으나 최근 들어 여러 생리활성을 지니는 소재가 각광을 받고 있는 것을 고려할 때 본 연구과제의 수행의 결과로 면역활성에 관여하는 생리활성 물질의 대량 생산이 가능케 됨에 따라 식품에 응용할 수 있는 소재를 확충할 수 있어 본 연구과제에서 수행한 제품화이외에 많은 제품에 응용할 계획임
- 미강 발효물 생산 기술중 특히 부산물을 활용하는 기술의 특허를 출원하였으며 원천기술을 확보함으로써 기업의 적극 활용을 유도하여 제품화 함
- 부산물 활용기술은 생리활성 생산뿐만 아니라 다른 대상물질 생산에도 적용이 가능할 것으로 추후 기술 적용 대상 물질을 확대 선정하여 부산물 활용 기술을 확대할 수 있음.
- 발효산물의 단순 기능을 생리활성 생산에까지 확대함에 따라 지금까지 원료로부터 용매등을 이용한 단순 유용물질 추출에만 국한되었던 유용물질 획득 방식에 발효생산법을 추가하여 대량생산할 수 있는 방법으로 활용할 수 있음

제 5 장 참고문헌

- Benjamini, E., Immunology a short course. WILEYLISS (1996)
- Bienenstock, J. and Befus, A.D. Review of mucosal immunology. *Immunol.* 41: 249-270 (1980)
- Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54 : 484~489 (1973)
- Cebra, J.J. and Shroff, K.E. Peyer's patches as inductive sites for IgA commitment. In Handbook of Mucosal Immunology, eds. Orga, P.L., Mestecky, J., Elamm, M., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, Academic press, San Diego. 151-158 (1994)
- Chihara, G. : Potentiation of host resistance against cancer and immunostimulants, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU.*, 16: 44 (1983)
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity especially *Lentinus edodes*(Berk) sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, 30: 2,776 (1970)
- Dekker Inc., New York and Basel. 7-10 (1981)
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 : 350~356 (1956)
- Gregory, R.L. The biological role and clinical implications of IgA. *Laboratory Medicine* 25: 724-728 (1994)
- Hamuro, J. and Chihara, G. : Effect of anti-tumor polysaccharides on the higher structure of serum protein. *Nature.*, 7: 245 (1973)

- Hara, C., Kumazawa, Y., Inagaki, K., Kaneko, M., Kiho, T., Ukai, S. Mitogenic and colony-stimulating factor-inducing activities of polysaccharide fractions from the fruitbodies of *Dictyophora indusiata* FISCH. Chem. Pharm Bull. 39: 1615-1616 (1991)
- Herscowitz, B.H., Holden, H.T., Bellanti, J.A. and Ghaffar, H. Manual of macrophage methodology. In: Induction and Collection of Peritoneal Exudates Macrophages, Marcel
- Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin I. and Rachlin E. M. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87 (1988)
- Hirase, S. : Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Doriols versicolor*(Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. 藥學雜紙., 96: 419 (1976)
- Hiroshi, H. and Chohachi, K. : Anti-complementary principle of Ephedra herbs. *Chem. harm. Bull.*, 28: 2900 (1980)
- Hong, T., Matsumoto, T., Kiyohara, H. and 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)
- Hugihara, M. and Nagumo, T. : An influence of the structure of alginate on the chemotatic activity of macrophage and the anti-tumor activity. *Carbohydr. Res.*, 243: 211 (1993)
- humectants-recent progress and prospective problem. Fragrance-Journal Company. Tokyo. 8-12 (1988)
- James, S.P. and Zeitz, M. Human gastrointestinal Mucosal T cells. In

- Handbook of Mucosal Immunology, eds. Orga, P.L., Mestecky, J., Elamm, M., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, Academic press. San Diego 275-285 (1994)
- Jones T. M. and Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49 : 926~936 (1972)
- Juliano, B.O. Rice bran. In Rice chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists. Inc., St. Paul. Minnesota. 647-687 (1985)
- K. S Shin. Studies on selection, purification and action modes of anti-complementary polysaccharides from *Arecae pericarpium*. Ph.D. thesis, Korea Univ. of Seoul, Korea (1992)
- K. W. Yu. Structural and functional studies of polysaccharides with intestinal immune modulating activity of *Atractylodes lancea* DC.
- Kanayama, H., Adachi, N., Togami, M. A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. Chem. Pharm. Bull. 31: 1115-1118 (1983)
- Kim, B.H., Kweon, M.H., Lim, W.J., Song, H.C. and Yang, H.C. : Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bispororus*. *Korea J. Food Sci. Technol.*, 30: 709 (1998)
- Kiyohara, H. and Yamada, H. : Characterization of vitro IL-2 production enhancing and anti-complementary pectic polysaccharides from Kampo(Japanese herbal) medicine 'Zuzen-Taiho-To'. *Phytochem. Res.*, 7: 367 (1993)
- Kiyohara, H., and Yamada, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. : Studies on

- polysaccharide from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of abinogalactan from *angelica acutiloba*. *J. Pharmacobio. Dyn.*, 9: 339 (1986)
- Kiyohara, H., Zhang, Y.W. and Yamada, H. : Effect of exo- β -D-(1-3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Polymers.*, 32 (1997)
- Lowry O. H., rosebrough N. J., Farr A. L and Randoll R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275 (1951)
- Miyazaki, Y. and Nishijima, M. : Studies on fungal polyanions. X XVII. Structural examination of a water-soluble anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 29: 3611
- Miyazaki, Y., Yamada, T., Tamada, H. and Yamada, Y. : Relationship between the chemical structure and anti-tumor activity of glucans prepared from *Grifolra umbelleta*. *Carbohydr. Res.*, 69: 165 (1979)
- Mowat, A.M. and Viney, J.L. Anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. Rev.* 156: 145-166 (1997)
- Nakayama, Y., Horii, I. Skin moisturization and NMF. In Science of Ohmori, T., Tamura, K., Wakaiki, A., Kawanishi, G., Tsuru, S., adomae, T., Nomoto, K. Dissociation of a glucan fraction (CO-1) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and analysis of its antitumor effect. *Chem. Pharm. Bull.* 36:4512-4518 (1988)
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and

- exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. Letters Appl. Microbiol. 33: 76-81 (2001)
- Playfair J. H. L. Immunology at a glance 5th ed. Blackwell scientific publications. (1992)
- Roesler, J., Emmendorffer, A., Steinmuller, C., Luetting, B., Wagner, H., Matthes, M.I.I. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system. Int. J. Immunopharmac. 13: 931-941 (1991)
- Roitt L., Brostoff J. and Male D. Immunology. 3rd ed. Mosby (1993)
- Saito, K., Nishijima, M., Ohino, N., Nagi, N., Yadomae, T., Miyazaki, T. activation of complement and *Limulus* coagulation systems by an alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescens* and its less-branched derivatives. Chem. Pharm. Bull. 40:1227-1230 (1992)
- Sakurai, M.H., Matsumoto, T., Kiyohara, H. and Yamada, H. : B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. *Immunol.*, 97: 540 (1999)
- Sanderson, I.R. and Walker, W.A. Mucosal Barrier. In Handbook of Mucosal Immunology, eds. Orga, P.L., Mestecky, J., Elamm, M., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, Academic press, San Diego. 41-49 (1994)
- Sendl, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F. and Wanger, H. : Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharide of *Sedum telephium*. *Phytochem.*, 34: 135 (1993)
- Shin, K.S., Ra, K.S., Sung, H.C. and Yang, H.C.: Screening of

- complement system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Food Sci. technol.*, 25: 197 (1993)
- Sminia, T. Wilders, M.M., Janse, E.M. and Hoefsmit, E.C
Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiology* 164: 136-143 (1997)
- Song, K.S., Cho, S.M., Lee, T.H., Kim, H.M. Han, S.B. Ko, K.S. and Yoo, I.D. : B-lymphocytestimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43 : 2105 (1995)
- Suzuki, I., Tanaka, H., Kinoshita, A., Oikawa, S., Osawa, M., and Yadomae, T. Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int. J. Immunopharmac* 12: 675-684 (1990)
- Swift, M.J. The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biol. Biochem.* 5: 321-326 (1968)
- Takahashi K., Yamazaki M. and Abe S. local induction of a tumor necrosis factor (TNF) like cytotoxic factor in murin tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systemic administration of antitumor polysaccharides. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11 : 472~478 (1988)
- Takemoto, N., Maruyama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M., and Hosoya, E. Mitogenic activity of Juzen-taiho-to (TJ-48) on murine lymphoid cells. *Jap. J. Inflammation.* 9: 137-140 (1988)
- Wang, H.X. and Liu, W.K. : Immunomodulatory and antitumor activities of polysaccharides complex from a mycelial culture of *Tricholoma* S.P.A local edible mushroom. *Life Science.*, 57: 269 (1995)
- Yamada, H. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble

- polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. Carbohydr. Res. 125:107-115 (1984)
- Yamada, H., Kiyohara, H. Bioactive polysaccharides from chinese herbal medicines. Abstracts of Chinese Medicines. 3: 104-124 (1989)
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGAWA. *Chrbohydr., Res.* 159: 275 (1987)
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojina, Y.J. Kumazawa. Y. and Ofsuka, Y. : Studies on polysaccharides from *angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharide. *Planta Med.*, 50: 163 (1984)
- Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. : Characterization of anti-complementary acidic heteroglycan from the seed of *Coix lacrymajobi var. Ma-Yuen*. *Pytochem.*, 26: 3269 (1987)
- 강경진 : 미숙 과실의 보체계 활성화능 검토 및 화학적 특성. 석사학위논문, 경기대학교. (1999)
- 권미향, 성하진 : 보체계 활성화 다당에 의한 면역기능 조절. 식품과학과 산업. 30: 30 (1997)
- 권미향, 안현정, 신광순, 나경수, 성하진, 양한철 : 계지(桂枝) 열수추출물로 부터 보체계 활성화 다당의 정제. 한국식품과학회지. 29: 1 (1997)
- 김영수, 하태열, 이상효, 이현유: 미강 식이섬유 추출물이 밀가루의 호화 및 노화에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 29(3), 464-469 (1997)
- 김영수, 하태열, 이상효, 이현유: 미강에서 추출한 식이섬유 추출물의 특성 및 제빵에의 응용. 한국식품과학회지, 29(3), 502-508 (1997)
- 미강을 활용한 건강 편의식품의 개발 연구. 이현유, 하태열, 이상효, 금준

- 석. 한국식품개발연구원.
- 미곡부산물물의 혈압강하 및 혈당강하 기능소재 개발. 이현유, 류미라, 김혜영. 한국식품개발연구원.
- 손경현, 성용분, 윤종수, 김성기, 이강표, 이재홍, 미강 발효 엑기스의 제조법 및 이를 함유하는 조성물, 특1991-0011822 (1991)
- 송치현, 김재홍, 양병근, 김길용, 느타리버섯 균사체 액체배양으로부터 보체 다당 생산에 대한 연구, 한국미생물학회지, 24: 104-110 (1996)
- 신선혁. 솔잎 (*Pinus densiflora*)으로부터 장관면역 조절 물질의 분리 및 특성. 고려대학교 석사학위논문. (2001)
- 양현석. 귤피 (*Citrus unshiu peel*)로부터 정제한 장관면역 활성화 다당류와 플라보노이드류의 특성. 고려대학교 석사학위논문. (2000)
- 유광원, 신광순. 창출 성분의 장관면역 자극을 통한 골수세포 증식활성. 한국식품과학회 33: 135-141 (2001)
- 이영현, 문태화: 미강 식이섬유의 조성과 보수력 및 전분노화에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 26(3), 288-294 (1994)
- 이준우, 정훈, 이권행 : 영지 균사체의 알칼리 추출물의 보체계와 망내계 미치는 영향. 한국균학회지. 18 : 137 (1990)
- 이현경, 신광순, 송치현, 성하진, 양한철. *Flammulina velutipes* 항보체성 다당의 생산에 미치는 영양원의 영향, 한국산업미생물학회지, 22:360-367 (1994)
- 한덕용 : 現代 生藥學. 學院社, 서울, 214 (1989)
- 한방과 건강 2001. 10 (128)
- 황재관, 박보선, 최운정, 이덕록, 곡류로부터 분리한 생리활성물질 및 그 제조 방법, 공개특허보 10-2000-0067244 (2001)of *Atractylodes lancea* DC.