

최 종
연구보고서

전통차 및 죽류용 식물소재로부터의 생리활성물질을 이용한 기능성 식품소재 개발

Utilization of Bioactives from Traditional
Tea and Rice Gruel Plants as Functional Foods

2001. 10

전통차 및 죽류용 식물소재 함유 Macrophage 활성물질의
기능성식품 소재화

Utilization of Macrophage Stimulators from Tea and Rice Gruel Plants

전통차 및 죽류용 식물소재 함유 장관면역 활성물질의
기능성식품 소재화

Utilization of Intestinal Immune Modulating Stimulators from Tea
and Rice Gruel Plants

고 려 대 학 교
((주) 지 엠 에프)

2001-21

농림부 자료실
등록번호: 71147
등록일: 2001년 10월 24일
기증:

농 립 부

최종보고서

1998 년도 농림특정연구개발사업에 의하여 완료한 전통차 및죽류용 식물소재로부터의 생리활성물질을 이용한 기능성 식품소재 개발에 관한 연구의 최종보고를 붙임과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001 년 10 월 일

주관연구기관 고 려 대 학 교

총괄연구책임자 홍 범 식 (인)

주관연구기관장 총 장

적 인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전통차 및 죽류용 식물소재로부터의 생리활성물질을 이용한
기능성 식품소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001. 10.

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 홍 범 식
세부연구책임자 : 홍 범 식
세부연구책임자 : 양 한 철
연 구 원 : 전 우 진
참 여 기 업 : (주) 지 엠 에프

요 약 문

I. 제 목

전통차 및 죽류용 식물소재로부터의 생리활성물질을 이용한 기능성 식품
소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 식품의 기능성이라는 측면에서의 계통적이고 조직적인 연구가 진행됨에 따라 식품유래의 특정 성분들이 생체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리 기능조절계에 작용하여 직·간접적으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 따라서 이들 특정 성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전 인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있을 것이다. 그러므로 이들 식품유래의 생체 조절 기능성 성분들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다 하겠으며 이러한 연구들은 하나같이 학술적인 영역의 연계속에서 가능한 것으로 식품을 통한 건강유지 및 질병예방의 새로운 학술체계의 수립을 의미한다 하겠다.

본 연구그룹은 식품유래의 생체조절 기능성 성분들에 대한 연구를 통하여 건강한 신체의 기본은 항상성유지에 있으며 질병은 항상성의 파괴로부터 기인하므로 이러한 질병을 예방하고 회복하는데는 식품유래의 특정성분들에 의한 생체조절기능이 크게 기여한다는 인식 하에 수년간 연구, 학술발표회, 토론회 등을 거치면서 다수의 식품들로부터 생체조절 기능에 관여하는 성분들의 탐색과 소재화에 몰두하였다. 특히 천연물 유래 다당 성분들의 항보체 활성을 비롯한 면역강화 측면의 각종 생리기능에 대한 연구는 단백질, 핵산 등에 비해 과거 크게 관심을 얻지 못하였지만 다당류의 새로운 생체 조절성 물질이라는 인식에서 점차 주목을 받아 오고 있다.

본 연구그룹이 선정한 전통 차 및 죽류용 식물은 식용작물 중에서도 특히 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 원예작물이지만 그동안 녹차,

올무차, 생강차 등 일부를 제외하고는 종합적인 연구가 수행된 바 없었다. 또한 이 작물들을 경쟁력을 갖는 하나의 산업작물로 육성하기 위해서는 이들로 부터 고 부가가치를 갖는 물질의 검출과 식품에의 소재화가 전제되어야 한다. 최근에 이르러 식품에 도입되고 있는 3차기능의 개념은 질병을 발병의 전 단계에서 식품 등을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다.

본 연구는 전통 차 및 죽류용 식물 함유의 성분으로부터 고령화병의 주요 원인이 되는 면역계에 약리, 생리활성을 갖는 주요 성분을 탐색하고 이 성분들을 기능성식품 및 의약품의 중간원료로 소재화 함으로써 국내 농림업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 농산물 시장개방 하에서 국내 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 농산물을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통발효식품을 비롯하여 식물성 식용·약용 자원의 수가 많고 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않으면서도 경쟁력 있는 식품용 및 의약품 신소재의 창출이 가능하기 때문이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

최종목표를 달성하기 위해 소재에 따라 다음과 같이 제 1, 2 세부과제로 구성하였다.

- 1) 제 1 세부과제 : 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 macrophage 활성화 물질의 기능성 식품 소재화
- 2) 제 2 세부과제 : 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 장관면역 활성물질의 기능성 식품 소재화

본 과제를 통하여 수행한 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

- 1) 생리활성 성분의 Assay계 확립 및 탐색과 대상시료의 선정
- 2) 활성물질의 분리, 정제 및 구조분석
- 3) *In vivo*에서의 활성 및 독성 검사
- 4) 소재의 시제품화 : 캡슐제 등

IV. 연구개발결과 및 활용방안

전통차 및 죽류용 식물소재 함유 생리활성물질을 소재화하고 소재의 실용화를 목적으로 본 과제를 수행한 결과 총 90여종의 용매별 추출획분 library를 구축하였으며 macrophage활성, 장관면역활성에 대하여 각 2건의 *in vitro* assay계 및 *in vivo* assay계를 확립하였다. 또한 한의여과 기술을 비롯한 약리, 생리활성 물질의 분리, 특성규명, 소재화 기술 등을 확보하였다. 각 세부과제별 연구개발결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 제 1 세부과제 : 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 macrophage 활성화 물질의 기능성 식품 소재화

본 연구는 전통차 및 죽류용 식물소재로부터 macrophage를 활성화시키는 성분을 분리, 정제한 후 그에 대한 구조분석을 규명하고 산업화하는 것을 목적으로 하였다. 약 90여종의 전통차 및 죽류용 식물소재 추출물을 대상으로 macrophage lysosomal enzyme activity assay에 의해 macrophage 활성을 검색한 결과 취, 잇꽃, 황기, 감초의 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이들에 대한 2차 검색을 실시하여 활성과 수율면에서 가장 우수한 수용계 획분 중에서 가장 높은 활성을 보인 잇꽃(홍화)을 macrophage 활성검색에 있어서의 시료로 선정하였다. 활성 물질의 정제를 위해 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 침전물(CT-3)을 얻었다. 이 획분의 macrophage 활성화 성분을 파악하기 위하여 pronase에 의한 단백질 분해와 periodate 처리를 실시함으로써 당부위를 선택적으로 분해하여 활성을 검토한 결과 pronase를 처리한 CT-3에서는 약 20% 정도의 활성 증가를 보인 반면 periodate 산화물에서는 활성이 20% 정도 감소되었다. 이러한 결과는 홍화로부터 macrophage 활성을 나타내는 냉수 추출물의 활성 본체는 다당일 가능성을 시사하고 있다. 활성 획분에 대해 anion exchange column chromatography, gel permeation column chromatography를 수행하여 균일한 활성 획분 CT-3IIa-1-2-1를 얻었다. 이 획분은 정제가 진행되면서 galactose와 arabinose 및 glucose가 주구성당을 이루고 있는 다당류의 획분임을 확실히 보여주고 있다. 이러한 활성획분에 대해 GPC column을 이용하여 HPLC로 분자량과 순도를 검정한 결과, CT-3IIa-1-2-1는 68 kDa의 분자량을 가진 단일물질임이 판명되었다. 활성획분의 전체구조 중 활성에 주요하게 관여하는 본체의 구조를 검토하기 위하여 CT-3IIa-1-2-1을 *exo- α -L-arabinofuranosidase*로 처리하여 소화시킨 후 분

해물을 Bio-gel P-10의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과, 효소에 분해되지 않은 column의 void 부근에서 용출되는 획분인 CT-3IIa-1-2-1/R1과 inner volume에서 얻은 효소에 분해된 획분 (CT-3IIa-1-2-1/R2)으로 나눌 수 있었다. 예비 구조수식에서 macrophage 활성화획분 CT-3IIa-1-2-1을 *exo- α -L-arabinofuranosidase*로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-10의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과 얻은 두 개의 획분, CT-3IIa-1-2-1/R1, CT-3IIa-1-2-1/R2의 구성요소를 알아보기 위해서 physicochemical properties를 측정하였다. 이 두 획분의 경우, 역시 분리되기 전의 획분인 CT-3IIa-1-2-1과 비슷하게 70%이상의 당을 함유하고 있으며 arabinose, galactose와 glucose가 주구성당을 형성하고 있음을 보여주었다. 이 두 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법의 의해 두 획분 각각을 메틸화하고 2 M TFA 가수분해한 후, 메틸 alditol acetate로 전환시켰다. 그 이후로 GC와 GC-MS로 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. CT-3IIa-1-2-1/R1의 경우 3,5-결합-arabinose, 6-결합-galactose와 3,6-결합-galactose 그리고 3-결합-glucose를 포함하고 있었다. 그리고 CT-3IIa-1-2-1/R2의 경우 역시 CT-3IIa-1-2-1/R1와 마찬가지로 3,5-결합-arabinose, 6-결합-galactose와 3,6-결합-galactose을 주로 포함하고 있었다. 이러한 결과로 삼아 이 두 획분의 경우는 arabinogalactan과 glucan의 다당류가 결합되어있는 구조를 갖고 있으며 이 구조가 macrophage 활성화에 중요하게 관여하는 것으로 해석되어진다. 그리고 마지막으로, 나뉘어진 두 획분에 관한 macrophage cellular lysosomal enzyme 활성화 test 결과 CT-3IIa-1-2-1/R1 획분의 경우는 relative activity 300에 가까운 매우 높은 활성을 나타내었다. 하지만 CT-3IIa-1-2-1/R2 획분의 경우 역시 relative activity 200을 넘는 높은 활성이지만 CT-3IIa-1-2-1/R1 획분의 활성에는 미치지 못하였다.

홍화의 crude-sample인 CT-1이 *in vitro* 상에서 높은 macrophage cellular lysosomal enzyme activity를 보인 반면에 그것이 *in vivo* 상에서 유사한 경향의 활성을 나타내는지 알아보기 위해서 ICR mice(male, 4-5주령)을 이용하여 경구투여를 시행하였다. 7일간 연속적으로 일정한 시간에 경구 투여하였고, 대조구의 경우는 증류수를 역시 경구 투여하였다. CT-1의 농도는 단일농도 (1.0 g/kg per day)로 우선 시행하였다. 단일농도의 경우, 결과는 *in vitro* 상의 수준인 높은 lysosomal enzyme activity를 나타내었다. 따라서 단일농도의 경구투여 재현성 확인과 다른 농도에서는 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 단일농도로 선정된 1.0 g/kg의 농도를 기준으로 하여 0.25

간격인 네 가지 (0.5, 0.75, 1.0, 1.25g/kg) 농도를 잡게 되었고 다양한 농도로 CT-1을 경구 투여하였다. 그 결과는 1.0 g/kg의 농도까지는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내지만, 그 이상의 농도인 1.25 g/kg에서는 오히려 1.0 g/kg의 농도에서의 결과보다 약간 낮은 활성을 나타내었다. 이렇게 시료 CT-1을 네 가지의 농도로 경구투여하고난 후 얻어낸 peritoneal macrophage 에서의 culture supernatants 즉, conditioned medium을 가지고 hematopoietic growth factor인 interleukin(IL)-6 또는 granulocyte-macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다. 그 결과, GM-CSF의 결과는 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 농도 의존적으로 생성능을 나타내었다. 그리고 IL-6의 경우는 1.0 g/kg과 1.25 g/kg의 농도에서 대조구와 2배 이상의 차이를 보이는 높은 생성능을 나타내었다.

이상의 결과로 본 시료는 *in vivo* 상에서 뿐만 아니라 *in vitro* 상에서도 잠재성있는 면역증강제로써 작용할 것으로 사료된 바 공업적 수준에서의 추출 조건 및 정제방법을 확립하였다. 이로부터 기능성 식품의 대표적 형태로 제품화한 후 각 적성을 검토하여 홍화 함유 기능성 경질캡슐을 제작하였다.

2) 제 2 세부과제 : 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 장관면역 활성화 물질의 기능성 식품 소재화

본 연구는 전통차 및 죽류용 식물소재로부터 장관면역을 활성화시키는 성분을 분리, 정제한 후 그에 대한 구조분석을 규명하고 산업화하는 것을 목적으로 하였다. 약 90여종의 전통차 및 죽류용 식물소재 추출물을 대상으로 intestinal immune modulating activity assay에 의해 장관면역 활성을 검색한 결과 굴피, 다시마, 두충, 잔대, 쑥의 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이들에 대한 2차 검색을 실시하여 활성과 수율면에서 가장 우수한 수용계 획분 중에서 가장 높은 활성을 보인 굴피를 장관면역 활성검색에 있어서의 시료로 선정하였다. 활성 물질의 정제를 위해 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 침전물(CUI-3)을 얻었다. 이 획분의 장관면역 활성화 성분을 파악하기 위하여 pronase에 의한 단백질 분해와 periodate 처리를 실시함으로써 당 부위를 선택적으로 분해하여 활성을 검토한 결과 periodate 산화물에서 활성이 현저히 감소되는 것으로 미루어 다당류가 장관면역 활성화에 관여되어 있음을 시사하고 있었다. 활성을 갖고있는 획분에 대해 anion exchange column chromatography, gel permeation column chromatography를 수행하여

CUI-3IIb-3-2를 얻었다. 이 획분은 정제가 진행되면서 galacturonic acid와 glucuronic acid 등의 산성당과 arabinose, galactose 및 rhamnose가 주구성당을 이루고 있는 다당류의 획분임을 확실히 보여주고 있다. 장관면역 활성획분인 CUI-3IIb-3-2에 대하여 Shodex OHpak KB-805 column을 이용하여 HPLC로 분자량과 순도를 검정한 결과, CUI-3IIb-3-2는 18 kDa의 분자량을 가진 단일물질임이 판명되었다. 활성획분의 전체구조 중 활성에 주요하게 관여하는 본체의 구조를 검토하기 위하여 CUI-3IIb-3-2을 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-30의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과, 효소에 분해되지 않은 column의 void 부근에서 용출되는 획분인 CUI-3IIb-3-2/PG1과 intermediate volume에서 얻어지는 CUI-3IIb-3-2/PG2 및 inner volume에서 얻은 효소에 분해된 획분 (CUI-3IIb-3-2/PG3)으로 나눌 수 있었다. 예비 구조수식에서 장관면역 활성획분 CUI-3IIb-3-2을 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-30의 gel filtration chromatography를 이용하여 분리한 결과 얻은 세 개의 획분, CUI-3IIb-3-2/PG1과 CUI-3IIb-3-2/PG2 및 CUI-3IIb-3-2/PG3으로 나눌 수 있었다. 이 세 개 획분의 구성요소를 알아보기 위해서 physicochemical properties를 측정하였다. 세 개의 획분이 모두 공통적으로 분리되기 전의 획분인 CUI-3IIb-3-2와 유사하게 높은 산성당을 함유하고 있으며 그에 따라 galacturonic acid, glucuronic acid 및 rhamnose, arabinose, galactose가 주구성당을 형성하고 있음을 보여주었다. 세 번째 획분인 CUI-3IIb-3-2/PG3는 특히 galacturonic acid 및 glucuronic acid의 함량이 높았다. 이 세 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 세 획분 각각을 메틸화하고 2 M TFA 가수분해한 후, 메틸 alditol acetate로 전환시켰다. 그 이후로 GC와 GC-MS로 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. CUI-3IIb-3-2/PG1 및 CUI-3IIb-3-2/PG3의 경우는 4-결합-galacturonic acid를 주로 포함하였고 5-결합-arabinose, 6-결합-glucose를 포함하고 있었다. 그리고 CUI-3IIb-3-2/PG2의 경우는 말단-결합-galactose와 2,4-결합-galactose을 주로 포함하고 있었다. 이러한 결과로 보아 arabinogalactan과 galacturonic acid가 주쇄를 형성하고 있는 pectin류의 다당류가 결합되어있는 구조를 갖고 있으며 이 구조가 장관면역 활성에 중요하게 관여하는 것으로 해석되어진다. 세 획분에 대한 intestinal immune modulating 활성 test 결과 CUI-3IIb-3-2/PG1과 CUI-3IIb-3-2/PG3획분의 경우는 fluorescence intensity 2000에 가까운 매우 높은 활성을 나타내었다. 하

지만 CUI-3IIIb-3-2/PG2 획분의 경우 fluorescence intensity 1500 정도의 활성을 나타냈다.

꿀피의 crude-sample인 CUI-3가 *in vitro* 상에서 높은 intestinal immune modulating activity를 보인 반면에 그것이 *in vivo* 상에서도 유사한 경향의 활성을 나타내는지 알아보기 위해서 C3H/HeJ mice(female, 4-5주령)을 이용하여 경구투여를 시행하였다. 시간별에 따른 변화를 보기 위해서 3일부터 21일까지 연속적으로 일정한 시간에 경구 투여하였고 대조구의 경우는 증류수를 경구 투여하였다. CUI-3의 농도는 단일농도(1.0 g/kg per day)로 우선 시행하였다. 이 단일농도의 경구투여 시간별 결과는 Peyer's patch cell을 통한 bone marrow cell의 증식도는 일주일까지는 시간 의존적으로 증가하다가 그 기간을 넘어서는 시기부터는 일정 수준을 유지하다가 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 단일농도의 경구투여 재현성 확인과 다른 농도에서는 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 단일농도로 선정한 1.0 g/kg의 농도를 기준으로 하여 세 가지(0.5, 1.0, 2.0 g/kg) 농도를 잡게 되었고 다양한 농도의 CUI-3를 7일간 경구 투여하였다. 그 결과는 대조구와 비교하여 유의적 차이를 보였으며 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이렇게 시료 CUI-3를 세 가지의 농도로 경구투여하고 난 후 얻어낸 Peyer's patch cell에서의 culture supernatants 즉, conditioned medium을 가지고 hematopoietic growth factor인 interleukin(IL)-6 또는 granulocyte-macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다. 그 결과, GM-CSF의 결과는 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 농도 의존적으로 높은 생성능을 나타내었다. IL-6의 경우, 1.0 g/kg과 2.0 g/kg의 농도에서는 대조구와 2배 이상의 차이를 보이는 높은 생성능을 나타내었다.

이상의 결과로 본 시료는 *in vivo* 상에서 뿐만 아니라 *in vitro* 상에서도 잠재성있는 면역증강제로써 작용할 것으로 사료된 바 공업적 수준에서의 추출 조건 및 정제방법을 확립하였다. 이로부터 기능성 식품의 대표적 형태로 제품화한 후 각 적성을 검토하여 꿀피 함유 기능성 경질캡슐을 제작하였다.

SUMMARY

Highly bioactive substances from traditional tea and rice gruel plants were screened, purified and industrialized as functional foods.

The study for purification, characterization, and industrialization of macrophage stimulating component was attempted. Screening of the macrophage lysosomal enzyme activity was performed with the extracts of about 90 edible traditional tea and rice gruel plants prepared by 95% methanol, cold water and hot water. The cold-water extract from *Carthamus tinctorious* L. was selected as the most potent candidate containing a macrophage stimulating component with the macrophage lysosomal enzyme activity assay. The crude polysaccharide portion of *Carthamus tinctorious* L. was prepared as follows; i) cold-water extraction, ii) decolorization with methanol, iii) ethanol precipitation, and iv) ethanol-precipitate (CT-3) was filtered and lyophilized. The CT-3 showed a high macrophage lysosomal acid phosphatase activity. For the purification of active substance, DEAE-Toyopearl 650M (Cl⁻ form), Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 and HPLC were subsequently performed. The apparent molecular mass of purified polysaccharide was approximately 68 kDa. The purified homogeneous macrophage stimulating fraction, CT-3IIa-1-2-1, obtained from CT-3 showed the potent macrophage lysosomal enzyme activity. Chemical constituents of CT and its subfractions were analyzed by GC. No lethal toxicity and cytotoxicity were observed but acid phosphatase in macrophage was activated by CT-3. Based upon these results, crude and purified polysaccharides from *Carthamus tinctorious* L. appear to be a immunopotentiator *in vivo* and *in vitro*. Therefore, the industrial-based extraction and purification procedure was established, and then the soft capsule containing the polysaccharide from *Carthamus tinctorious* L. was produced.

The intestinal immune modulating activities of 90 Korean traditional tea and rice gruel plants were compared. The cold-water extract from *Citrus unshiu* peel was selected as the most potent candidate containing a intestinal modulating component with the intestinal modulating activity assay. The crude polysaccharide portion of *Citrus unshiu* peel was prepared as follows; i) cold-water extraction, ii) decolorization with methanol, iii) ethanol precipitation, and iv) ethanol-precipitate (CUI-3) was filtered and lyophilized. The CUI-3 showed a relatively high intestinal modulating activity. To purify the active substance, DEAE-Sephacrose FF (Cl⁻ form), Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 and HPLC were subsequently performed. The apparent molecular mass of purified polysaccharide was approximately 18 kDa. The purified homogeneous intestinal modulating fraction, CUI-3IIb-3-2, obtained from CUI-3 showed the potent intestinal modulating activity. Chemical constituents of CUI and its subfractions were analyzed by GC. No acute toxicity of CUI-1 was detected in mice administered up to 2,000 mg/kg in oral, whereas 83% of survival rate in mice administered by the intravenous injection was found at the dose of 500 mg/kg. These results indicated that the purified polysaccharide appeared to be an immunopotentiator *in vivo*. Based upon those facts, the polysaccharide from *Citrus unshiu* peel were further utilized as the industrial point. The industrial-based extraction and purification procedure was established, and then the soft capsule containing the polysaccharide from *Citrus unshiu* peel was produced.

TABLE OF CONTENTS

Cover Letter	i
Summary (Korean)	ii
Summary(English)	ix
Table of Contents (English)	xi
Table of Contents (Korean)	xv
Part I. Introduction	1
Chapter 1. The Purpose for Research and Development	1
Chapter 2. The Need for Research and Development : Technical Aspect	2
Chapter 3. The Need for Research and Development : Economic and Industrial Aspect	5
Chapter 4. The Need for Research and Development : Social and Cultural Aspect	6
Part II. Utilization of Macrophage Stimulators from <i>Carthamus</i> <i>tinctorious</i> L.	7
Chapter 1. Introduction	7
Chapter 2. Materials and Methods	11
1. Samples and Reagents	11
2. Experimental Approach	11
A. Sample Preparation	11
B. Determination of Macrophage Stimulating Activity <i>in vitro</i>	12
C. General Analysis and Sugar Composition	13

D. Large-Scale Extraction of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus tinctorious</i> L. by Cold Water	13
E. Identification of Macrophage Stimulating Active Component	14
F. Extraction and Purification of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus tinctorious</i> L.	16
G. Analysis of Sugar Component	16
H. Structural Analysis of Macrophage Stimulator	16
I. Macrophage Activity and Toxicity <i>in vivo</i>	17
J. Extraction of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus</i> <i>tinctorious</i> L. in Industrial Scale	17
K. Isolation and Purification of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus tinctorious</i> L. in Industrial Scale	18
L. Production of Soft Capsule and Safty Test	18
 Chapter 3. Results	18
1. Screening of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus tinctorious</i> L. ..	19
2. Extraction of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus tinctorious</i> L. ..	24
3. Identification of Active Component	27
4. Purification of Macrophage Stimulating Polysaccharide	30
A. Purification by Ion Exchange Chromatography	30
B. Purification by Gel Permeation Chromatography (GPC)	32
C. Determination of Purity	35
5. Structural Analysis of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus</i> <i>tinctorious</i> L.	39
6. Macrophage Stimulating Activity and Toxicity of Cold-Water Extract from <i>Carthamus tinctorious</i> L. <i>in vivo</i>	45
A. Macrophage Stimulating Activity <i>in vivo</i>	45
B. Toxicity Test <i>in vivo</i>	48
C. Weight Changes of Each Organ in Mice Administered by Intravenous Injection	50
7. Development of Macrophage Stimulator from <i>Carthamus</i> <i>tinctorious</i> L. as Functional Food	51
8. Production of Soft Capsule and Safety Test	55
 Part III. Utilization of Intestinal Immune Stimulators from <i>Citrus</i> <i>unshiu</i> peel	56

Chapter 1. Introduction	56
Chapter 2. Materials and Methods	59
1. Samples and Reagents	59
2. Experimental Approach	59
A. Sample Preparation	59
B. Determination of Intestinal Immune Stimulating Activity <i>in vitro</i>	60
C. General Analysis and Sugar Composition	61
D. Large-Scale Extraction of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel by Cold Water	62
E. Identification of Intestinal Immune Stimulating Active Component	62
F. Extraction and Purification of intestinal immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel	64
G. Analysis of Sugar Component	64
H. Structural Analysis of Intestinal Immune Stimulator	65
I. Intestinal Immune Stimulating Activity and Toxicity <i>in vivo</i>	65
J. Extraction of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel in Industrial Scale	66
K. Isolation and Purification of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel in Industrial Scale	66
L. Production of Soft Capsule and Safety Test	66
Chapter 3. Results	67
1. Screening of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel ...	67
2. Extraction of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i> Peel ..	77
3. Intestinal Immune Activity and Chemical Composition of Cold-Water Extract from <i>Citrus unshiu</i> Peel	79
4. Purification of Intestinal Immune Stimulating Polysaccharide	81
A. Purification by Ion Exchange Chromatography	81
B. Purification by Sepharose CL-6B Gel Permeation Chromatography (GPC)	83
C. Determination of Purity	83
5. Structural Analysis of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus</i> <i>unshiu</i> Peel	92
6. Intestinal Immune Stimulating Activity and Toxicity of Cold-Water Extract from <i>Citrus unshiu</i> Peel <i>in vivo</i>	101

A. Intestinal Immune Stimulating Activity <i>in vivo</i>	101
B. Toxicity Test <i>in vivo</i>	103
7. Development of Intestinal Immune Stimulator from <i>Citrus unshiu</i>	
Peel as Functional Food	104
8. Production of Soft Capsule and Safety Test	108

APPENDIX

1. Publications	111
2. Patents	133

목 차

제출문	i
요약문(한글)	ii
요약문(영어)	ix
목 차(한글)	xi
목 차(영어)	xv
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	1
제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성	2
제 3 절 경제·산업적 측면에서의 필요성	5
제 4 절 사회·문화적 측면에서의 필요성	6
제 2 장 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 Macrophage 활성화 물질의 기능성식품 소재화	7
제 1 절 서 설	7
제 2 절 재료 및 방법	11
제 1 항 재 료	11
제 2 항 실험방법	11
가. Macrophage 활성화 물질의 검색 시료 제조	11
나. 활성측정 방법	12
다. 일반 성분 및 구성당 분석	13
라. 냉수추출에 의한 고분자 조획분의 대량조제 방법	14
마. 활성본체의 분석	16
바. 홍화로부터의 macrophage 활성 물질의 분리 및 정제	16
사. 활성물질 구성당의 결합양식 분석	16
아. Macrophage 활성화 물질의 구조해석 및 수식	17

자. <i>In vivo</i> 에서의 macrophage 활성화 및 독성실험	17
차. 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 추출방법	17
카. 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제	18
1) 탈색방법	18
2) 한의여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립	18
3) 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 순도에서의 조제	18
타. 산업적 순도수준의 정제 물질에 대한 소재화 적성 검토 및 시작품 제작	18
제 3 절 결 과	18
제 1 항 전통차 및 죽류용 식물소재로부터 macrophage 활성화 물질의 검색	18
가. 각종 시료의 용매추출물로부터 macrophage 활성화 검색	18
나. 파쇄한 각종 시료의 세포내 수용성 물질의 macrophage 활성화 검색	18
다. 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 macrophage 활성화 검색	24
라. Macrophage 활성화 시료의 선정	24
제 2 항 최대활성 시료의 선정 및 실험실적 추출조건의 최적화	24
제 3 항 Macrophage 활성화물질의 본체 분석	27
제 4 항 Macrophage 활성화 다당의 정제	30
가. Ion exchange chromatography에 의한 분획	30
나. Sepharose CL-6B에 의한 Gel permeation chromatography(GPC)에 의한 분획	32
다. Sephacryl S-200에 의한 Gel permeation chromatography(GPC)에 의한 분획과 정제 다당의 순도 확인	35
제 5 항 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 구조 분석 및 수식	39
가. 정제된 macrophage 활성화 물질의 결합양식을 통한 부분적 구조해석	39
나. Macrophage 활성화 물질의 구조해석 및 수식	41
제 6 항 <i>In vivo</i> 에서의 macrophage 활성화 및 독성실험	45
가. <i>In vivo</i> 에서의 macrophage 활성화	45
나. 독성실험	48
다. Macrophage 활성화 물질의 마우스 꼬리 정맥 주사시 장기무게변화	50
제 7 항 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 기능성 식품화	51
제 8 항 기능성 식품으로서의 시작품제작 및 안정성 검사	55

제 3 장 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 장관면역 활성물질의 기능성식품 소재화	56
제 1 절 서 설	56
제 2 절 재료 및 방법	59
제 1 항 재 료	59
제 2 항 실험방법	59
가. 장관면역 활성화 물질의 검색 시료 제조	59
나. 활성측정 방법	60
다. 일반 성분 및 구성당 분석	61
라. 냉수추출에 의한 고분자 조획분의 대량조제 방법	62
마. 활성본체의 분석	62
바. 굴피로부터의 장관면역 활성물질의 분리 및 정제	64
사. 활성물질 구성당의 결합양식 분석	64
아. 장관면역 활성화 물질의 구조해석 및 수식	65
자. <i>In vivo</i> 에서의 장관면역 활성 및 독성실험	65
차. 굴피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 추출방법	66
카. 굴피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제	66
1) 탈색방법	66
2) 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립	66
3) 굴피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 순도에서의 조제	66
타. 산업적 순도수준의 정제물질에 대한 소재화 적성 검토 및 시작품 제작	66
제 3 절 결 과	67
제 1 항 전통차 및 죽류용 식물소재로부터의 장관면역 활성화 물질의 검색	67
가. 각종 시료의 용매추출물로부터 장관면역 활성 검색	67
나. 파쇄한 각종 시료의 세포내 수용성 물질의 장관면역 활성 검색	67
다. 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 장관면역 활성 검색	72
라. 장관면역 활성 시료의 선정	73
제 2 항 최대활성 시료의 선정 및 실험실적 추출조건의 최적화	77
제 3 항 장관면역 활성물질의 본체 분석	77
제 4 항 장관면역 활성화 다당의 정제	79
가. Ion-exchange chromatography에 의한 분획	81
나. Sepharose CL-6B에 의한 Gel permeation chromatography(GPC)	

에 의한 분획	83
다. Sephacryl S-200에 의한 Gel permeation chromatography(GPC)에 의한 분획과 정제 다당의 순도 확인	86
제 5 항 글피 함유 장관면역 활성화 물질의 구조분석 및 수식	92
가. 정제된 장관면역 활성화 물질의 결합양식을 통한 부분적 구조해석	92
나. 장관면역 활성화 물질의 구조해석 및 수식	95
제 6 항 <i>In vivo</i> 에서의 장관면역 활성화 및 독성실험	101
가. <i>In vivo</i> 에서의 장관면역 활성화	101
나. 독성실험	103
제 7 항 글피 함유 장관면역 활성화 물질의 기능성 식품화	104
제 8 항 기능성 식품으로의 시제품 제작 및 안정성 검사	108

부 록

1. 발표논문	111
2. 특허출원	133

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

최근 식품의 기능성이라는 측면에서의 계통적이고 조직적인 연구가 진행됨에 따라 식품유래의 특정 성분들이 생체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체 방어계, 세포분화 등 각종 생리 기능조절계에 작용하여 직·간접적으로 생체 조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 따라서 이들 특정 성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전 인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있을 것이다. 그러므로 이들 식품유래의 생체 조절 기능성 성분들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다 하겠으며 이러한 연구들은 하나같이 학술적인 영역의 연계속에서 가능한 것으로 식품을 통한 건강유지 및 질병예방의 새로운 학술체계의 수립을 의미한다 하겠다.

본 연구그룹은 식품유래의 생체조절 기능성 성분들에 대한 연구를 통하여 건강한 신체의 기본은 항상성 유지에 있으며 질병은 항상성의 파괴로부터 기인하므로 이러한 질병을 예방하고 회복하는데는 식품유래의 특정성분들에 의한 생체조절기능이 크게 기여한다는 인식 하에 수년간 연구, 학술발표회, 토론회 등을 거치면서 다수의 식품들로부터 생체조절 기능에 관여하는 성분들의 탐색과 소재화에 몰두하였다. 특히 천연물 유래 다당 성분들의 항보체 활성을 비롯한 면역강화 측면의 각종 생리기능에 대한 연구는 단백질, 핵산 등에 비해 과거 크게 관심을 얻지 못하였지만 다당류의 새로운 생체 조절성 물질이라는 인식에서 점차 주목을 받아 오고 있다.

본 연구그룹이 선정한 전통차 및 즉류용 식물은 식용작물 중에서도 특히 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 원예작물이다. 하지만 녹차, 울무차, 생강차 등 일부를 제외하고는 종합적인 연구가 수행된 바 없었다. 또한 이 작물들을 경쟁력을 갖는 하나의 산업작물로 육성하기 위해서는 이들로부터 고 부가가치를 갖는 물질의 검출과 식품에의 소재화가 전제되어야 한다. 최근에 이르러 식품에 도입되고 있는 3차 기능의 개념은 질병을 발병의 전 단계에서 식품 등을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고

령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다.

우리나라는 전통발효식품을 비롯하여 식물성 식용·약용 자원의 수가 많고 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않으면서도 경쟁력 있는 식품용 및 의약품 신소재의 창출이 가능하다. 따라서 WTO 체제의 출범으로 인한 농산물 시장개방 하에서 국내 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 농산물을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 본 연구는 전통차 및 죽류용 식물 함유의 성분으로부터 고령화병의 주요 원인이 되는 면역계에 약리, 생리활성을 갖는 주요 성분을 탐색하고 이 성분들을 기능성식품 및 의약품의 중간원료로 소재화 함으로써 국내 농림업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다.

제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성

면역계는 크게 innate immunity와 adaptive immunity로 나뉘어 있는데 innate immunity는 macrophage에 의한 phagocytosis, complement activation의 alternative pathway, 그리고 피부와 epithelia에 의해 주도되는 선천적 면역반응이다. Adaptive immunity는 innate immune system을 통과한 pathogen에 대한 면역 반응으로 다시 humoral immunity와 cellular immunity로 나눌 수 있다. Humoral immunity는 B lymphocyte에서 생산되는 antibody에 의한 혈액 내 반응이며, cellular immunity는 T_c(cytotoxic T cell)와 T_H(helper T cell)에 macrophage 등의 항원제시세포가 antigen을 presentation하면서 일어나는 생체 내 조직에서의 면역반응이다. Macrophage는 innate와 adaptive immunity의 두 반응 모두에 관여하는 면역세포로 항미생물 작용, 항암작용 그리고 tissue damage의 effector function을 가지는 것으로 알려져 있다. Macrophage는 bone marrow의 immature pluripotent hematopoietic stem cell로부터 cytokine인 interleukin(IL)-3의 signal에 의해 granulocyte-macrophage(GM-CSF) progenitor로 분화한 후 IL-3, GM-CSF의 signal에 의해 promonocyte가 되며 다시 GM-CSF의 signal에 의해 circulating monocyte가 된다. 그후 M-CSF와 GM-CSF에 의해 tissue(liver, lung, spleen, thymus, lymph

node, peritoneal, nervous system, skin)에서 resident macrophage로 성숙된다. Macrophage는 여러 자극물질에 노출되거나 외부 자극 등에 의해 활성화되면 활성화도에 따라 염증 대식세포(inflammatory macrophage)와 활성화된 대식세포(activated macrophage)로 나뉜다. Inflammatory macrophage는 thioglycollate와 같은 염증유발 물질에 노출되었을 경우를 말하며 이때는 phagocytosis, adherence capacity, prostaglandin 분비의 증가, 효소들의 단백질 합성능 증가 그리고 임파구의 면역작용항진 등의 기능적 변화나 세포분비물들이 증가하게 된다. Interferon (IFN), 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 내독소(endotoxin)로 생체내에서는 발열, 저혈당증, 항LPS항체 및 급성기 반응물의 생성 유발, adjuvant 작용, 방사선 조사로부터의 보호 등 여러 면역반응과 독소현상을 유발시키는 lipopolysaccharide(LPS) 등의 면역조절물질에 의해 분비된 cytokine(TNF- α , IL-1, IL-8, IL-6, IL-12), hydrogen peroxide, nitric oxide(NO), cytolytic protease 등이 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로서 제시되어져 왔다. 활성화된 macrophage는 앞서와 같이 항미생물 작용, 항암작용 그리고 tissue damage의 effector function을 가지게 된다. 또한 macrophage는 이물질을 인식할 수 있는 서로 다른 receptor들을 지니고 있기 때문에 식품이나 천연물이 macrophage의 활성화에 대하여 직접적으로 관여할 수도 있지만 complement나 다른 lymphocyte의 활성을 통한 2차적 작용에 의한 것일 가능성도 있다. 최근 들어 gram 양성균의 세포벽성분인 peptidoglycan과 그 유도체들이 다양한 면역조절작용을 유도하고 cellular immunity와 humoral immunity의 adjuvant로서 역할을 할 수 있고 macrophage를 활성화한다고 보고되고 있다. 또한 *Streptococcus mutans*의 polysaccharide 중 monocyte를 활성화하여 TNF, IL-1의 분비를 유도하는 주된 성분은 rhamnose이고 이것의 receptor도 밝혀졌다. Mannose를 함유한 polysaccharide, β -1,4-linked D-mannuronic acid(D-ManA), β -1,3-glucan (β -1,3-linked D-glucose) 같은 polysaccharide 종류는 항암작용 및 monocyte와 macrophage의 cytokine 분비를 촉진한다고 보고도 있다. β -1,4-linked D-mannuronic acid의 다당류가 TNF의 분비를 유도하고 receptor에 결합하는 방식도 LPS와 유사하다고 알려졌다. 식물성 기원 다당류에 있어서는 antitumor 및 anticomplementary activity, 항진 이외에도 macrophage activation, antiviral activity, reticuloendothelial activation(RES activation), antiinflammatory activity, hypoglycemic activity를 나타낸다고 보고되어 있다. 실제로 표고버섯의 lentinan이 대표적이며 이 외에도 같은

담자균류의 항암효과, 항체활성, macrophage활성 등이 보고되어 있으며, 도꼬마리 추출물의 면역 억제 작용, 당귀추출물의 면역계 증강에 의한 B lymphocyte 증식 효과 등의 면역 증강 주성분이 단백질합 다당이거나 다당류로 알려져 있다. Shin 등은 영지 열수추출물이 마우스의 면역 세포수를 증가 시킴을 밝혔으며 Hyun 등은 영지 자실체의 항암성분을 분리, 정제하고 그 항암성분이 마우스의 macrophage 및 용혈반 형성 세포를 활성화함을 밝혔다. 본 연구과제는 고도산업화사회, 고령화사회에서 손상된 면역기능을 회복하고 숙주의 방어기능을 조절할 수 있는 macrophage 활성화 면역조절물질을 탐색하고 소재화 함으로써 고령화에 따른 질병들의 예방 및 장기 약물투여에 의한 면역저하 부작용을 최소화시키게 될 것이다.

장관의 점막부위에 존재하는 장관관련 림프상조직(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. Peyer's patch가 체액성 면역의 유도에 있어 실질적인 역할을 담당하고 있음은 Peyer's patch를 갖고 있는 토끼와 갖고 있지 않은 토끼들의 장 외측 dome 모양 돌기의 존재여부에 따라 밝혀지고 있다. 돌기를 가지고 있는 경우 즉 Peyer's patch가 존재할 때 장관내로의 항원의 도입에 의해 sIgA 항체들이 생성되고 Peyer's patch가 존재하지 않을 때는 면역반응이 나타나지 않음으로써 Peyer's patch가 장관으로부터 항원의 흡수에 중요한 역할을 담당하고 있음은 물론 antigen-specific IgA-committed B cell을 생성하는 부위임이 명백해졌다. 또한 Peyer's patch의 림프소절을 싸고 있는 상피는 소위 M-cell이라 부르는 pinocytic 세포를 포함하고 있는데 이러한 M-cell은 가용성인 항원, 세균, 바이러스 등 다양한 물질들을 섭취할 수 있으며 이들을 림프세포에 전달한다. 따라서 사람이 섭취한 물질들은 장에 도달된 후 M-cell의 섭취로 Peyer's patch내의 림프구들과 상호작용하기 때문에 면역활성을 증가시키는 물질이 있다면 이는 Peyer's patch 세포의 활성화에 영향을 주게 되는 것이다. 이러한 활성화된 면역세포는 다양한 cytokine류를 생산하게 되며 이와 같이 생산된 cytokine류와 활성화된 면역세포들은 mesenteric lymph node(장관막 림프절)를 거쳐 순환계로 이동, 생체내 전신면역계와 교류하여 면역활성화에 관여하게 되며 모든 면역세포의 전구세포가 존재하는 골수세포에도 영향을 미쳐 이들의 성숙과 증식에 영향을 주게 되므로써 결국 국소 면역기관이 전신면역계의 증진에 크게 영향을 끼치게 된다. 하나의 예로 생약으로 국내에서도

널리 알려진 십전대보탕이 Peyer's patch 세포 중의 T cell을 활성화시키고 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 것으로 밝혀져 있다. 본 연구과제는 차·죽류용 식물로부터 장관면역계의 증추적 기능을 담당하고 있는 Peyer's patch 세포의 기능 중에서 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 성분을 탐색하고 이 성분을 기능성식품 또는 의약품의 중간원료로 소재화 하는데 그 목적을 두고 있다. 또한 상대적으로 polysaccharide의 섭취량이 높은 우리국민의 식생활에 있어 면역계 증강과 관련된 학술적인 정보를 제공하는데도 기여하고자 한다.

제 3 절 경제·산업적 측면에서의 연구개발 필요성

농수산물로부터 고 부가가치성 물질의 창출은 WTO 체제 출범이후 국내 농수산업을 유지 발전시키는 대안 중의 하나임을 앞서 전제한 바 있다. 국내 농산물 중 차·죽류용 작물의 생산과 관련된 농업과 가공제조업을 연계시킴으로써, 생산능가의 영농의욕을 고취시키고 소득을 높이면서 농산물 가격의 안정화도 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 또한 1차 식품인 차·죽류용 작물을 고 부가가치성 물질로 소재화 함으로써 낮은 시장 경쟁성을 높일 수 있고 타 원예작물, 약용작물, 공예작물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 크게 도모할 수 있다.

한편, 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해 산업종으로 향후 국내산업의 재편성과정에서 증추적인 역할을 담당하게 될 것이다. 특히 제조공정 상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 분류할 수 있다.

우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고령화 사회에서 질병에

방용 식품과 의약품의 수요증가와 함께 거대 수출품목이 될 것으로 예측된다. 최근에 이르러 의약품의 판매량 감소와 식품산업의 플류비 증가로 수익악화에 처한 국내 제약과 식품업체들이 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 됨으로써 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내 생물산업 육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것이다.

제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발 필요성

현재 우리나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 아직 낮은 수준에 있지만 평균수명은 73세에 이르렀으며 2,000년에는 고령화인구 비율이 전 인구의 7%에 근접한 것으로 알려져 있다. 따라서 사망원인 또한 감염형 질환의 비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 순환기계 질환과 암에 의한 사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 “고령화병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다”는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다. 일본의 경우 정부의 의료비 부담이 1993년에는 전년도보다 6.4%가 증가되었고 증가요인의 대부분이 고령화 환자의 의료비에서 기인하였음을 밝힌 바 있다. 후생성이 특정보건용 식품제도를 도입하게 된 배경에는 식품소재를 통하여 고령화병을 예방함으로써 정부의료비 부담을 경감시키고 활동력을 갖는 고령화 노동인력을 확보하는데 두고 있음을 주목할 필요가 있다.

본 연구과제의 최종목표인 성인병 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 소재화는 미시적으로는 국민 개개인의 건강장수 욕구를, 거시적으로는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안임이 분명하다. 한편 차·축류용 작물의 가격 안정화를 통한 농가소득이 보장될 때 이농현상이 감소됨으로써 농촌의 공동화와 인구의 도시집중화로부터 기인하는 사회적 문제를 완화시킬 수 있을 뿐만 아니라 차·축류용 작물 불가식부의 폐기로 인해 발생하고 있는 농촌의 환경오염문제의 해결에도 일익을 담당하게 될 것으로 예상되고 있다.

제 2 장 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 Macrophage 활성화 물질의 기능성식품 소재화

제 1 절 서 설

식생활의 향상과 의학의 발달로 인간의 평균수명은 연장되고 있으나 성인 병, 만성 퇴행성 질환, 노인성 질환 등 산업화 및 고령화 사회에 따른 질병이 급격히 증가되고 있다. 이에따라 천연물 중 암예방 성분이나 생리활성 조절물질(biological response modifier: BRM) 및 식품 중 기능성 성분을 탐색하여 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 천연물로부터 면역활성 조절물질의 획득은 담자균류, 진균류, 고등식물 등을 대상으로 이루어지고 있는데 특히 천연물의 고분자 분획 성분으로부터 항암활성, 항보체활성 그리고 lymphocyte 유도분열 등의 면역조절 활성이 발견되고 있다.

면역이란 동물체내에 존재하는 자기방어 체계로서 외부로부터 침입하는 pathogen에 대해 자신과 구별하여 제거하는 생물학적 현상이다. 이러한 면역계는 선천성면역과 후천성면역으로 나뉘어진다. 선천성면역이란 macrophage의 phagocytosis와 complement에 의해 주도되는 면역반응이고 후천성면역은 선천성면역계를 통과한 pathogen에 대한 면역반응으로 다시 체액성면역과 세포성면역으로 세분화되며 이들은 서로 긴밀한 상호 협조 하에 생체의 항상성을 유지한다. 체액성 면역은 혈액의 혈장내에 존재하는 항체에 의해 이루어지는데 항체가 외부 물질과 결합하여 독소를 중화시켜 이물질을 제거하는 역할을 한다. 세포성 면역은 임파계(lymphoid system)에 속하는 세포들(T lymphocyte, polymorphonuclear leukocytes, natural killer cell, macrophage 등)이 외부로부터 침입한 pathogen과 변형된 자가세포를 직접 파괴하거나 이등 세포들이 B cell에 항원을 제시하면서 유도되는 면역반응을 말한다.

Macrophage는 골수의 immature pluripotent hematopoietic stem cell로부터 cytokine인 interleukin(IL)-3의 signal에 의해 granulocyte macrophage progenitor로 분화한 후 IL-3, granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)의 signal에 의해 조직에서의 성숙된 macrophage가 된다. 즉,

macrophage는 골수로부터 생산되는 탐식세포로서 체내로 들어온 이물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, 각종 세포독성물질(nitric oxide 등)을 분비하여 이종세포나 암세포를 파괴하는 세포이다. 또한 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며 염증반응, 조혈기구 등에도 관여하는 면역계의 주요 방어기구이다.

1976년 Hibbs 등이 활성화된 대식세포가 종양치사능을 갖는다고 보고한 이래 대식세포는 이물질에 대한 직접적인 탐식치사 뿐 아니라 면역조절 기능이 있음이 알려지고 있다. 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 등의 세포간 물질을 분비하여 세포성 면역반응 및 항체 매개성 면역반응을 조절한다. 또한 macrophage는 조직이나 간, 비장, 임파선, 혈액 등에 널리 분포하고 있어 혈액을 통해 전달되는 미생물 등의 외부물질을 파괴하는 phagocytic activity를 갖고 있으며 H_2O_2 나 $\cdot OH$ 등을 분비함으로써 종양세포를 제거하는 기능도 가지고 있다. Macrophage가 lymphokine(macrophage activation factor 등)이나 endotoxin, RNA와 같은 interferon 유도물질 등의 외부자극에 의해 활성화 되면 phagocytic activity와 종양세포 파괴기능이 항진되고, 여러 세포분비물이 증가하게 된다. Macrophage 활성화에 의해 증가되는 대표적 분비물질은 arginase, IL-1, acid hydrolase(lysosomal enzymes, acid glycosidase, cathepsin), transcobalamine II, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등이다. 면역세포가 활성화될 때 세포 내부, 표면 혹은 외부로의 분비되는 특정효소가 증가되는 경향을 보이는데 그 예로 B세포의 경우는 alkaline phosphatase의 분비가 B세포의 분화와 더불어 증가하는 것으로 알려져 있다.

한편 대식세포의 항종양 면역기능은 종양세포에 직접 작용하여 종양세포를 탐식, 치사케 하거나 용해성 치사인자를 분비함에 있다. 치사물질로는 β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, lysosomal hydrolase, arginase, tumor necrosis factor(TNF), cytotoxic factor 및 활성산소 중간체(reactive oxygen intermediates: ROI)와 활성질소 중간체(reactive nitrogen intermediates: RNI)등이 있다. 활성산소 중간체는 호흡(respiratory burst)을 통해 발생하는 O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ 등이 있으며 최근에는 대식세포에서 유래된 활성질소 중간체(reactive nitrogen intermediates: RNI)인 NO^- , NO_2^- , NO_3^- 등이 중요시되고 있다. 활성질소 중간체는 대식세포, 비만세포, 호중구 및 내피세포 등에서 분비된다. 대식세포에서 유래하는 반응질소

대사산물은 매우 정밀한 면역기능의 조절하에서 생성되는 물질로써 특히 체세포 특유의 효소생성을 매개하며 이물질의 침입 또는 종양의 발생시, 항종양 활성화와 항미생물 활성을 나타내어 생체방어기전의 매우 중요한 역할을 한다.

자연계에는 면역 조절물질의 분비능력을 증가시킬 수 있도록 하는 여러 물질들이 알려져 있다. 특히, macrophage의 항암 작용을 증가시킬 수 있는 물질로써 IFN- γ , TNF 등의 cytokine과 Gram 음성균의 lipopolysaccharide(LPS)가 알려져 있다. 최근들어 Gram 양성균의 세포벽 성분인 peptidoglycan과 그 유도체들이 다양한 면역조절작용을 유도하고, 체액성 면역과 세포성 면역의 adjuvant로서 역할을 할 수 있고 macrophage를 활성화한다고 보고되고 있다. 또한 β -1,4-linked D-mannuronic acid 등의 다당류가 TNF의 분비를 유도하고 receptor에 결합하는 방식도 LPS와 유사하다고 알려졌다.

동물의 결합조직이나 체액에 많이 존재하는 mucopolysaccharide는 생체내에서 단백질과 결합된 복합체로서 존재하는데 이들은 생체내 중요한 성분으로 많은 연구가 수행되어 왔다. 우리나라에서도 이들 다당류의 항암효과에 대한 연구가 많이 진행되어 왔으며 주로 고등균류의 열수 또는 알칼리성 추출물의 항암성에 대한 성분조사와 면역기능으로 대별되며 그 내용은 항암성 다당류의 다당류부분과 단백질부분의 함량과 그 구성단당류와 아미노산 조성 및 면역증강작용으로 실험동물의 복강등에 sarcoma 180 종양세포를 이식한 뒤 이에 대한 종양억제율과 복강세포 유도검사로서 대식세포수 측정과 대식세포 기능의 간접척도로서 자연성 과민반응 등을 실험하였다. 단당류의 결합양식도 주로 β -결합이 규칙적으로 반복된 경우가 많고 이들 다당류는 그 자체로 혹은 단백질과 결합하여 존재한다. Franz는 특히 항암효과를 갖는 다당류의 기원 및 화학구조 등을 보고하였으며 다당류의 면역작용은 종양세포 등에 대한 세포독성이 아닌 부분적인 macrophage 활성화에 기인한다고 하였다. 식물성 다당류는 수용성 다당류로서 진해제, 소염제, 피부병 치료제, 식사요법제, 완하제, 건위제, 면역부활제 등으로 다양하게 이용되어 왔다. 최근에는 효소에 비활성을 나타내고 종양이나 알러지를 유발하지 않으며 물리, 화학적으로 안정하고 순수한 다당류가 담자균류를 비롯하여 진균류, 효모류, 세균, 지의류, 해조류, 고등식물 등에서 분리, 정제되고 있다. 특히 버섯 중에 함유되어 있는 다당류들의 항암 및 면역조절 작용과 관련된 많은 연구들이 보고되었다.

한국의 전통차(tea)라고 하면 대부분 녹차류라 할 수 있겠지만 한약재로 쓰이는 많은 약용 식물을 재료로 사용하여 차(tea)라는 명칭으로 예로부터 생활 주변에서 널리 상용하고 있고 이들 차 원료들이 천연 생리활성 성분을 함

유하고 있다는 사실이 밝혀지고 있다. 따라서 본 실험에서는 전통적으로 사용되어 온 차 및 죽류 제조용 식물 90여종을 대상으로 macrophage를 활성화시키는 면역 증강물질을 검색하였고 검색 과정에서 홍화 냉수 추출물이 가장 높은 활성을 나타내어 본 연구의 시료로 결정하였다. 학명이 *Catrchamus tinctorius* L. 인 홍화는 일명 safflower라고도 하며 우리말로는 잇꽃이라 한다. 홍화는 국화과에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 이집트이며 한국, 중국, 일본 등지에서 약용을 목적으로 재배해 왔으며 20세기부터는 미국, 인도 등지에서 식용유 생산용으로 재배되고 있기도 하다. 국내에서는 오래 전부터 생약성분 함유 약용식물을 이용한 민간요법이 발달되어 왔는데, 홍화를 이용한 경험적인 한약처방들이 동의보감등에 수록되어 있다. 또한 홍화는 전통적으로 순환기장애에 혈액순환촉진제로 혹은 진통, 진경제의 약제로 널리 사용되어 왔다. 뿐만 아니라 홍역, 생리통, 산후 증풍, 산후 기침, 증풍, 심장 쇠약, 떨미 등의 증상에도 잇꽃 말린 것을 가루 내 차로 만들어 음용법대로 음용해 왔다. 홍화는 또한 염료로서 많이 사용되는데 염료로 사용되는 홍화의 알려진 성분으로는 polycyclic계인 carthamin이라는 홍색소와 safflor yellow A, B라는 황색소가 있으며 이 색소 성분들에 대한 추출방법 및 합성 등에 관한 연구가 일본을 중심으로 많이 이루어져 있다. 그러나 약품으로의 홍화는 그 약리효과에 관한 연구에 비하여 그 효과의 원인이 되는 유효성분에 대한 연구가 미약한 상태였다. 최근 홍화의 약리효과를 나타내는 화학성분으로 보이는 플라보노이드류에 대한 연구 결과 이때까지 알려져 있지 않았던 몇 개의 플라보노이드(flavonoid)가 새로이 발견되었으며 홍화의 약리효과도 증명되었다. 김 등은 HPLC를 사용하여 홍화종의 플라보노이드, 특히 약리효과를 나타내는 유효성분으로 여겨지는 kaempferol 3-glycoside, quercetin 3-glucoside, kaempferol 3-rutinoside, quercetin 3-rutinoside 등의 극성이 큰 플라보노이드를 정성분석하는 방법을 소개한 바 있다. 홍화종실에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다.

본 실험에서는 전통적으로 식용되어 온 전통차 및 죽류를 대상으로 macrophage를 활성화시키는 물질을 검색하였고 검색 과정에서 높은 활성을 나타낸 홍화잎으로부터 macrophage 활성화 물질을 분리, 정제하여 생리, 화학적 특성을 조사하여 산업화하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

제 1 항 재 료

본 실험에서 사용된 전통차 및 죽류 식물소재 약 90여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입 또는 제공받아 사용하였고 산지에서 직접 채취하기도 하였다. 최종 선별된 시료인 홍화 (*Carthamus tinctorious* L.)의 경우 경동시장에서 건조된 상태로 구입하여 자연건조 한 후 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로써 사용하였다. Macrophage 활성 측정에 사용되는 RPMI-1640 medium과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(Chargrin Falls, IL)로부터 구입하였고, penicillin, streptomycin과 amphotericin B는 Flow Laboratories(Irvine, Scotland)에서 lipopolysaccharide(from *E. coli* 026:B6)와 ρ -nitrophenyl phosphate disodium(PNPP)는 Sigma사(St. Louis, IL)로부터 구입하여 사용하였다. 또한 경구투여 활성 측정을 위한 rat anti-mouse IL-6와 GM-CSF mAb는 clone MP5-20F3과 MP1-22E9에서 각각 구입하였다. Resin으로 DEAE-Toyopearl 650M은 Tosho사(Japan) 제품을, Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200, Bio-gel P-30은 Pharmacia사 제품을 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 동물은 5-8 주령의 SPF, ICR 계 수컷 mouse로 국립 보건원 및 대한실험동물에서 분양 받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식 시키면서 사육하였다.

제 2 항 실험방법

가. Macrophage 활성화 물질의 검색 시료 제조

구입한 시료를 Fig. 2-1의 방법에 따라 100℃에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실행시키고 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer(IKA Labortechnik Co. Ultra-turrax T50)로 분쇄한 후, 5,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 Fr. I을 조제하였다. 침전물은 동결건조 후 연속적으로 hexan, 메탄올, 증류수의 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 각각의 상등액을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV를 얻었다.

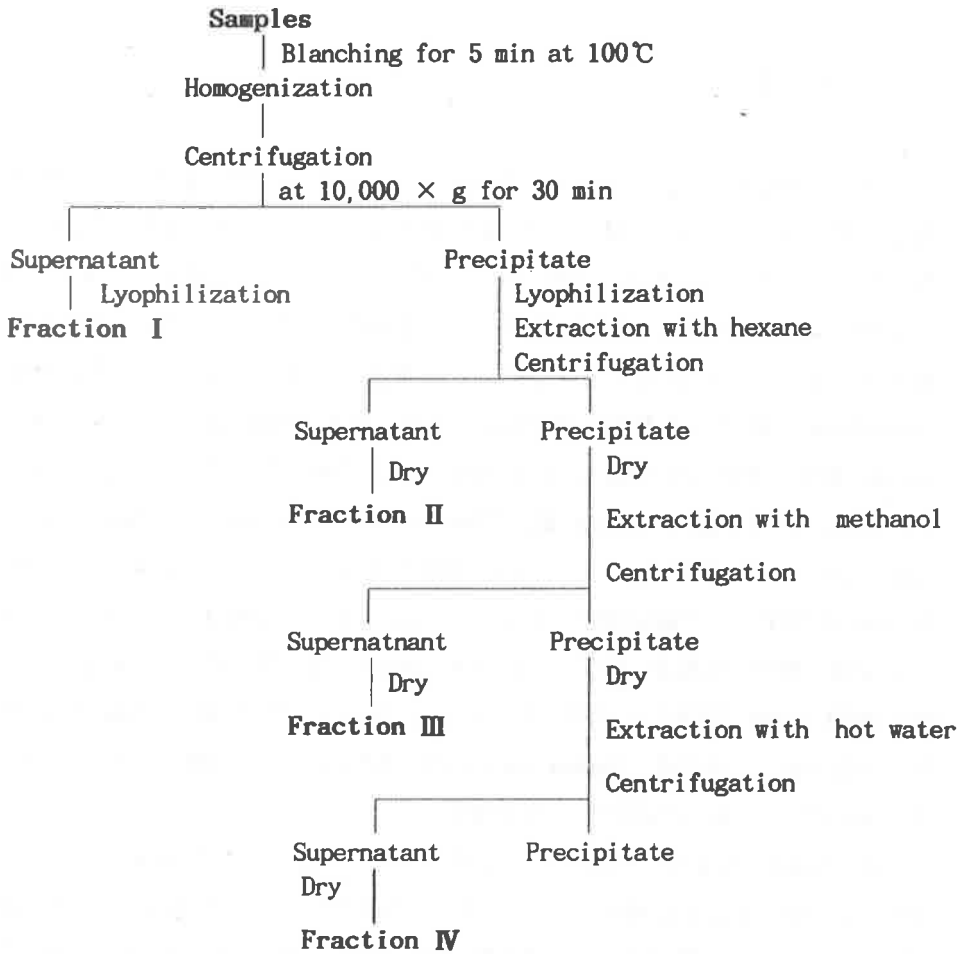


Fig. 2-1. Systematic extraction procedure for plants of tea and rice paste sources.

나. 활성측정 방법

Macrophage 활성도는 macrophage의 lysosomal phosphatase의 활성측정을 이용하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같이 진행되었다. 즉, 5-10 주령 웅성 ICR mouse의 복강에 1 ml의 thioglycollate medium을 주입한 뒤 48-72시간 후에 RPMI-1640 medium으로 mouse의 복강을 세척한 후 macrophage를 복강으로

부터 회수하였다. 회수된 macrophage를 RPMI-1640 medium으로 두 번 세척하고 세포수가 1×10^6 cells/ml이 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 형성하도록 하였다. 두 시간 후, non-adherent cell들은 세척하여 제거하고 10% FBS를 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)를 함께 넣어주어 1시간 동안 산성상태에서 반응시킨 후 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 macrophage의 활성화도로 표시하였다.

다. 일반 성분 및 구성당 분석

전당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법으로 정량하였다.

구성당 분석은 Jones 등의 방법으로 시료(1~3 mg)를 2 M TFA로 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해한 후 sodium boron hydride(NaBH₄)를 사용하여 중성당을 alditol로 환원시킨 후 acetic anhydride를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography를 사용하여 실시하였다. 산성당의 경우에 있어서는 2M TFA로 100°C에서 1시간 동안 가수분해시킨 후 sodium boron deutride(NaBD₄)를 이용하여 중성당의 경우와 유사한 조건으로 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography를 실시하였다 (table 2-1).

라. 냉수추출에 의한 고분자 조획분의 대량조제 방법

최대 활성시료로 선정된 식물시료를 homogenizer로 균질화하여 원심분리(5000 x *g*, 30분) 한 후 상등액을 농축, 동결건조한다. 동결건조된 시료를 100°C에서 2시간 동안 증류수로 환류추출한 후, 원심분리(5000 x *g*, 30분)하여 다시 농축, 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 메탄올로 다시 5회 환

류추출하여 메탄올 가용 획분을 분리하고 잔사는 증류수에 재용해시킨 후 에탄올을 가하여 침전분획을 실시하였다. 원심분리를 통하여 에탄올 가용 획분을 분리하고 침전물을 회수하여 증류수에 재용해시킨 후 투석, 농축 및 동결건조를 통하여 냉수추출의 고분자 조획분을 조제하였다(Fig. 2-2). 한 외여과에 의한 분획은 고분자 조획분을 증류수에 용해시킨 후 원심분리 (5000 x g, 20분)하여 얻어진 상등액을 Millipore사의 Masterflex와 prep/scale-TFF를 이용하여 분자량 3 KDa, 5 KDa, 10 KDa, 100 KDa 및 300 KDa의 여과막을 투과시켜 분획을 실시하였다.

Table 2-1. Analytical conditions of gas liquid chromatography for sugar composition

Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column type	: SP-2380
column size	: (30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m)
Column temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Detector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Injector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: N ₂ (1.0 mL/min)

마. 활성본체의 분석

활성에 관여하는 성분이 어떤 물질로 구성되어 있는지를 개략적으로 확인하기 위해 periodate 및 pronase 처리를 이용하였는데 periodate는 다당의 결합부위에 따라 -OH기가 인접되어져 있는 부위에 작용하여 당의 구조를 개열, 산화시킴으로서 다당의 구조를 파괴하는 한편, pronase는 protein의 아미노산을 무작위적으로 절단하는 효소로서 단백질을 파괴한다.

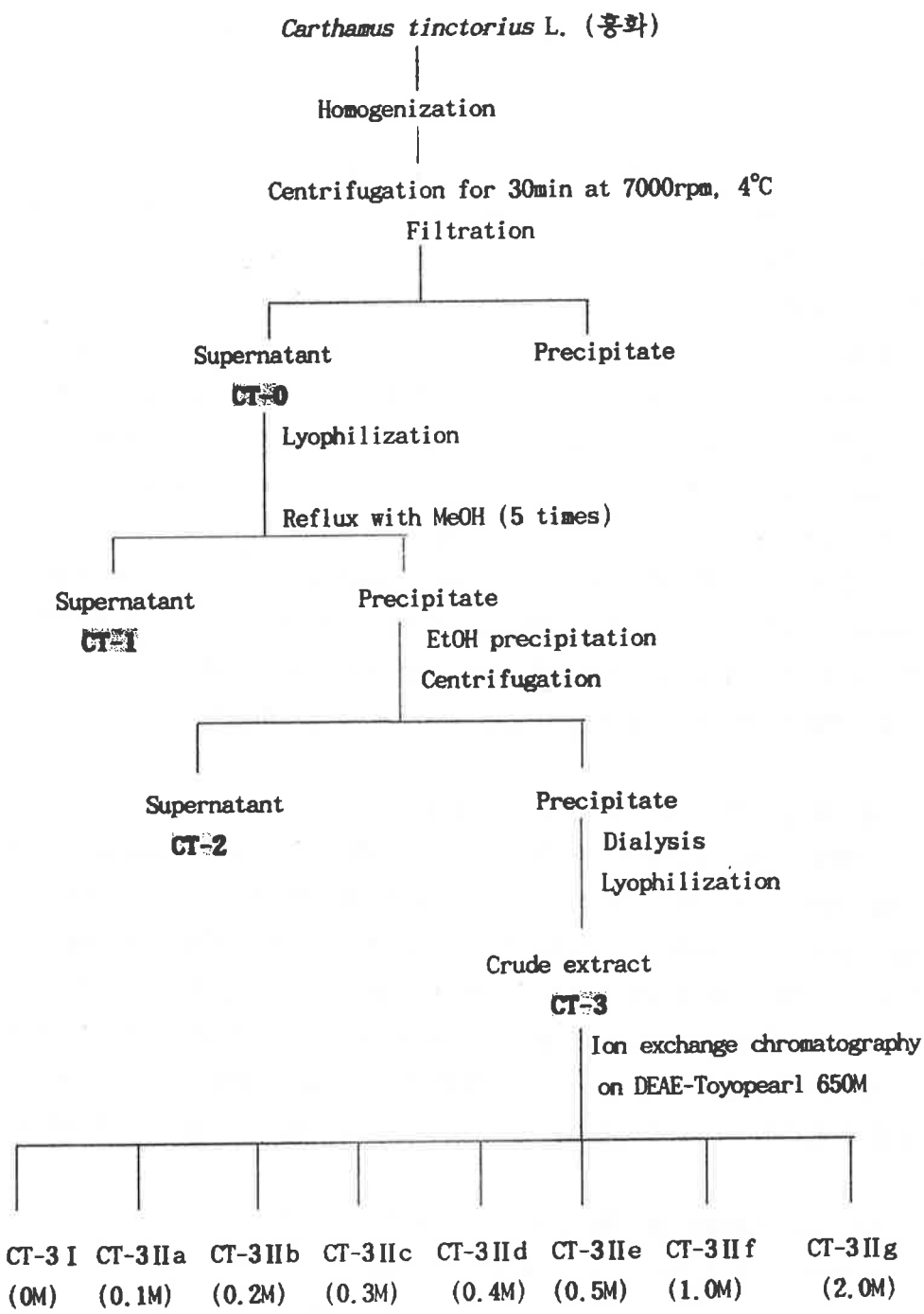


Fig. 2-2. Preparation of CT-3 from *Carthamus tinctorius* L. and fractionation on DEAE Toyopearl 650M (Cl⁻ form) column chromatography.

바. 홍화로부터의 Macrophage 활성 물질의 분리 및 정제

홍화의 냉수추출물에서 조제된 조다당 획분(CT-3)을 이온 교환크로마토그래피는 DEAE-Tyoparl 650M column(Cl⁻ form) 또는 DEAE-Sephrose FF column(Cl⁻ form)을 사용하여 조획분을 단계적으로 NaCl 농도를 증가시켜가며 용출·분획하였다. DEAE-Tyoparl 650M column(Cl⁻ form, 3.5 × 29 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 각 획분을 투석, 감압농축, 동결건조하여 9개의 획분(CT-3I, CT-3IIa-1 및 2, CT-3IIb ~ 3IIg)을 얻었다. 이와 같이 얻어진 획분 중에서 주요 활성획분인 CT-3IIa-1을 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column(1.7 × 82 cm)에서 0.2 ml/min의 유속으로 gel permeation chromatography를 행하여 CT-3IIa-1-1, 3IIa-1-2와 3IIa-1-3의 획분을 얻어 투석, 감압농축, 동결건조하였다. 이 중 활성획분인 CT-3IIa-1-2를 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharcryl S-200 column(1.5 × 44 cm)에서 0.2 ml/min의 유속으로 다시 gel permeation chromatography를 행하여 활성획분인 정제된 CT-3IIa-1-2-1을 얻었으며 이를 Superdex 75HR 10/30의 GPC column을 이용, HPLC를 실시하여 분자량 측정과 순도검정을 실시하였다.

사. 활성물질 구성당의 결합양식 분석

활성물질의 구조해석을 위한 구성당의 결합양식의 분석은 Hakomori법과 Waeghe법을 사용하였다. 즉, 시료(500 μg)의 메틸화 후 에탄올을 흡착시킨 Sep-pak C₁₈ cartridge로 메틸화 된 시료를 회수하였다. 메틸화 다당중에서 산성당은 THF에 용해되어 있는 LiB(C₂H₅)₃D(Super-deutride, 1 mL, 상온 1 시간)로 환원시킨 후 다시 Sep-pak C₁₈ cartridge로 회수하였다. 이를 1.0 M TFA로 121°C에서 2 시간 동안 가수분해한 후에 NaBD₄로 환원시켜 아세틸화 반응을 수행하였다. 메틸화 된 alditol acetate는 GLC와 GC-EIMS로 분석하였다.

아. Macrophage 활성화 물질의 구조해석 및 수식

예비 구조수식에서 macrophage 활성획분 CT-3IIa-1-2-1을 *exo-α-L*-arabinofuranosidase를 첨가하고 50°C에서 4일간 배양하였다. 이 후 배양액을 0.5% NaOH로 중화하고 Bio-gel P-10(1.5 × 40 cm)의 gel filtration chromatography를 이용하여 분리한 결과 얻은 두 개의 획분, CT-3IIa-1-2-1/R1, CT-3IIa-1-2-1/R2의 구성요소를 알아보기 위해서 physicochemical properties를 측정하였다. 그리고 이 두 획분의 구조를 분

석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 두 획분 각각을 메틸화하고 2 M TFA 가 수분해한 후, 메틸 alditol acetate로 전환시켰다. 그 후 GC와 GC-MS로 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다.

자. *In vivo*에서의 macrophage 활성화 및 독성실험

홍화의 crude-sample인 CT-1이 *in vitro*상에서 높은 macrophage cellular lysosomal enzyme activity를 보인 반면에 그것이 *in vivo*상에서 유사한 경향의 활성을 나타내는지 알아보기 위해서 ICR mice(male, 4-5주령)을 이용하여 경구투여를 시행하였다. 7일간 연속적으로 일정한 시간에 경구 투여하였고, 대조구의 경우는 증류수를 경구 투여하였다. CT-1의 농도는 단일농도(1.0 g/kg per day)로 우선 시행하였다. 그리고 단일농도의 경구투여 재현성 확인과 다른 농도에서는 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 단일농도로 선정된 1.0 g/kg의 농도를 기준으로 하여 0.25 간격인 네 가지(0.5 g/kg, 0.75 g/kg, 1.0 g/kg, 1.25g/kg) 농도를 잡게 되었고 다양한 농도로 CT-1을 경구 투여하였다. 이렇게 시료 CT-1을 네 가지의 농도로 경구투여하고 난 후 얻어낸 peritoneal macrophage에서의 culture supernatants 즉, conditioned medium을 가지고 hematopoietic growth factor인 IL-6 또는 GM-CSF 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다.

경구 및 꼬리정맥 투여 급성독성 실험에서 경구 투여의 경우는 ICR계 mouse(♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후 24마리를 각 군당 6마리씩 하여 시료(CT-1)를 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg 농도로 1회 경구 투여하였다. 대조군은 saline을 사용하여 경구투여 하였다. 꼬리정맥 투여시 독성검사를 위하여 ICR계 mouse(♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후 24마리를 각 군당 6마리씩 시료(CT-1)를 100 mg/Kg, 300 mg/Kg, 500 mg/Kg 농도로 1회 꼬리정맥에 주사하였고 대조군은 saline을 사용하였으며 48시간 동안 생존율을 관찰하였다.

차. 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 추출방법

홍화 5 kg에 대하여 5회 반복하여 메탄을 추출을 실시하고 메탄을 가용성분을 제거한 후 잔사를 감압증발기에 넣고 잔류 메탄올을 제거하였다. 이 잔사를 동일 추출기에서 증류수로 온도별, 추출횟수별로 추출한 후 macrophage 활성화에 미치는 추출조건을 검토한 후 실험실적 방법과 비교하였다.

카. 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제

1) 탈색방법

홍화의 대량추출물에 대한 탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 batch와 open column에서 검토하였다.

2) 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립

탈색시킨 시료를 대상으로 한외여과를 실시하였다. 한외여과장치는 Millipore masterflex를 사용하였고 여과막으로는 1만, 10만, 30만, 100만 등의 MW-cut off column형 막을 사용하여 실시하였다.

3) 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 공업적 순도에서의 조제

홍화를 상온에서 20 배 부피의 메탄올로 3회 교반하여 메탄올 가용 획분을 분리하고 비가용 획분을 100℃에서 2시간 동안 두차례 환류 추출한 후, 다시 원심분리(5000 rpm, 30분), 여과를 거친 뒤 상층액만을 동결건조하여 CT-0를 얻었다. 이 획분에 에탄올을 첨가한 후 4℃에서 12시간 침전 후 원심분리하여 에탄올 획분인 CT-E성분을 분리하였고 에탄올 비가용 성분은 감압건조하여 에탄올 비가용 획분을 제조하였다. 이 macrophage 활성화 획분을 증류수에 재용해시킨 후 100 kDa 및 300 kDa regenerated cellulose cartridge를 이용한 한외여과를 실시하여 분자량 > 300 kDa 이상인 CT-3 획분을 제조하였다.

타. 산업적 순도수준의 정제물질에 대한 소제화 적성 검토 및 시작품 제작

홍화 추출분말 100 mg에 부형제로서 유당 100 mg 및 옥수수 전분 40 mg, 산미제로서 구연산 10 mg을 혼합하여 합량 250 mg의 경질캡슐을 제작하였다. 본 제품은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속한다. 따라서 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 안정성 및 미생물 검사를 실시하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 전통차 및 죽류용 식물소재로부터 Macrophage 활성화 물질의 검색

가. 각종 시료의 용매추출물로부터 macrophage활성 검색

90여종의 전통차 및 죽류용 식물시료를 Fig. 2-1에서 표시한 것처럼 계통 추출하였다. 즉 시료를 먼저 균질기를 이용하여 냉수로 추출한 후 상등액은 동결건조하여 냉수추출획분(Fr. I)으로 하고 잔사는 핵산으로 환류추출하여 핵산추출획분(Fr. II)으로 하였다. 잔사는 다시 메탄올로 환류추출하고 상등액은 동결건조하여 메탄올추출획분(Fr. III)으로 조제하고 마지막으로 잔사를 다시 열수로 환류추출하여 이를 열수추출획분(Fr. IV)으로 하였다. 이와같이 조제된 시료를 이용하여 macrophage 활성물질을 검색한 결과, Table 2-2에서 나타낸바와 같이 냉수추출(Fr. I)에서는 잇꽃(홍화), 현미, 동과, 목단피, 살구와 차조기의 시료가, 열수추출(Fr. IV)에서는 감잎, 더덕, 쑥, 옥수수와 참깨가 대조군에 비해 약 2배정도의 높은 활성을 나타내었다. 그러나 유기용매획분인 메탄올추출(Fr. III)에서는 동과를 제외하고는 그다지 높은 활성을 보인 시료는 보이지 않았으며 가장 높은 활성을 보인 동과도(대조군 비교시 170%) 냉수나 열수로 추출한 시료와 비교할 때 다소 차이를 보였으며 핵산추출물(Fr. II)의 경우에는 세포독성이 심하였고 수율도 매우 낮아서 활성검색에 부적당하였다.

나. 파쇄한 각종 시료의 세포내 수용성 물질의 macrophage 활성 검색

Table 2-2에서 보여주는 것처럼 물로 추출한 경우(Fr. I 과 IV)에는 대부분의 획분이 대조군보다는 유의적으로 활성을 갖는 결과를 보였는데 전반적으로는 열수추출물이 냉수추출물보다 유의적으로 대조군보다 활성을 갖는 시료의 수가 많았으나 가장 활성이 높은 시료는 잇꽃(홍화)의 냉수추출물이었으며 (213%) 그 다음이 더덕, 목단피와 살구의 열수추출물이었다(약 200%). 이와같은 결과로부터 대부분의 시료에서 macrophage의 활성성분은 냉수나 열수로 추출하는 것이 적당하며 유기용매에 의한 추출은 바람직하지 않을 것으로 확인되었다. 또한 냉수나 열수의 추출조건이 다당이나 단백질 및 고분자류(Fr. I 과 IV)의 추출에 적합한 조건이기 때문에 macrophage의 활성을 자극하는 것은 주로 이러한 고분자일것으로 사료된다.

Table 2-2. Macrophage lysosomal phosphatase activities of fractions obtained from plants of tea and rice paste sources

Korean name	Scientific name	Relative activity (%) ¹⁾		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
감잎	<i>Diospyros kaki</i>	137.51	102.77	180.00
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	124.14	82.70	158.64
검정콩	<i>Glycine max</i>	127.62	108.99	128.09
결명자	<i>Cassia tora</i>	110.41	107.55	137.41
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	106.76	120.86	135.71
구기자	<i>Lycium chinense</i>	60.14	101.44	120.07
귤피	<i>Citrus unshiu</i>	99.52	110.43	133.75
냉이	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	114.05	91.37	140.35
녹차잎	<i>Cinamomum camphora</i>	171.75	124.82	153.21
다시마	<i>Laminaria japonica</i>	102.03	9.28	151.80
단더섬(황기)	<i>Astragalus membranaceus</i>	128.31	98.92	139.62
당귀	<i>Angelica gigas</i>	133.74	96.04	121.98
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	75.90	117.99	135.45
더덕	<i>Codonosis lanceolata</i>	132.67	121.22	207.87
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	113.26	87.74	125.68
두충(껍질)	<i>Eucommia ulmoides</i>	146.30	100.49	131.46
두충(잎)	<i>Eucommia ulmoides</i>	80.18	70.28	150.00
등글레(잎)	<i>Polygonatum japonicum</i>	108.70	105.19	138.82
등글레(줄기)	<i>Polygonatum japonicum</i>	112.40	107.80	124.75
들국화	<i>Chrysanthemum motifolium</i>	110.48	82.51	122.94
들깨	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	134.68	110.36	100.90

Korean name	Scientific name	Relative activity (※)		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
모과	<i>Pseudoctdonia sinensis</i>	110.10	86.32	106.34
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i>	119.26	82.55	124.35
박하	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	147.42	80.66	116.67
백년초	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. <i>saboten</i> Makino	140.67	100.94	154.64
보리	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexas tichon</i>	112.63	86.32	175.41
비파잎	<i>Eribotrya japonica</i>	138.61	100.47	121.83
뽕잎	<i>Morus alba</i>	118.46	95.28	131.97
산딸기	<i>Rubus coreanus</i>	171.19	91.98	141.90
산수유	<i>Comus officinalis</i>	9'8.30	73.11	63.92
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	111.78	56.60	130.67
창출	<i>Atractylodes japonica</i>	107.67	73.66	91.75
생강	<i>Zingiber officinale</i>	167.81	119.66	112.94
석류	<i>Punica granatum</i>	57.43	70.28	125.61
솔잎	<i>Pinus densiflora</i>	70.50	76.10	120.47
쑥	<i>Artemisia asiatica</i>	117.79	93.27	180.00
연	<i>Nelumbo nucifera</i>	116.19	94.34	116.33
오갈피	<i>Acanthopanax</i> <i>sessiliflorum</i>	128.42	91.55	134.26
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	75.23	82.93	104.71
옥수수	<i>Zea mays</i>	107.85	114.63	193.93
유자	<i>Citrus junos</i>	133.60	101.46	125.74
울무	<i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	131.15	72.20	133.45

Korean name	Scientific name	Relative activity (×)		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i>	115.13	99.02	145.57
은행	<i>Ginkgo biloba</i>	123.42	108.97	116.44
인삼	<i>Panax ginseng</i>	155.95	118.99	169.72
잇꽃(홍화)	<i>Carthamus tinctorius</i>	213.40	118.54	173.51
잔대	<i>Adenophora tryphilla</i> var. <i>japonica</i>	158.14	66.83	142.55
질경이	<i>Plantago asiatica</i>	139.18	112.20	156.04
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	107.86	89.34	119.60
치커리	<i>Cichorium intybus</i> L.	157.33	47.80	124.65
쑥	<i>Pueraria thunbergiana</i>	130.95	93.17	143.64
탱자	<i>Poncirus trifoliata</i>	162.91	84.56	15.49
하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	152.48	115.54	113.55
해당화	<i>Rosa rugosa</i>	128.31	116.19	147.30
해바리기	<i>Helianthus annus</i>	132.53	86.71	178.10
현미	<i>Oryzae sativa</i>	187.47	118.94	118.04
호도	<i>Juglans sinensis</i>	108.30	88.78	106.23
호박	<i>Cucurbita moschata</i>	115.57	100.21	112.46
우리밀	<i>Triticum aestivum</i>	96.65	81.23	152.82
쌍화차	-	119.38	99.64	101.35
가시연밥(검실)	<i>Euryale ferox</i>	155	90	94
고구마	<i>Ipomoea batatas</i> L.	80	80	105
꽃감	<i>Diospyros kaki</i>	130	86	110

Korean name	Scientific name	Relative activity (%)		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
금앵자	<i>Rosa laevigata</i> Michx.	133	93	154
당근	<i>Daucus carota</i>	116	96	81
동과	<i>Benincasa cerifera</i> Savi	187	174	150
땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	117	88	105
마늘	<i>Allium sativum</i> for. <i>Pekinense</i>	159	99	107
목단피	<i>Moutan radidis</i>	205	121	127
미나리	<i>Oenanthe siolonifera</i>	108	103	108
방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	123	102	166
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.	143	106	136
부추	<i>Allium tuberosum</i>	97	90	103
살구	<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	206	80	84
시금치	<i>Spinacia oleracea</i> L.	165	89	97
연근	<i>Nelumbo nucifera</i>	142	102	107
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	173	156	102
의이인	<i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. <i>frumentacea</i> Makino	164	130	184
잣	<i>Pinus koraiensis</i>	96	88	118
죽즙(대나무)	<i>Sasamorpha purpurascens</i> Nakai var. <i>borealis</i> Nakai	109	115	120
차조기	<i>Perilla sikokiana</i>	136	105	126
참깨	<i>Sesamum indicum</i>	192	122	196
녹두	<i>Dioscorea japonica</i>	91	80	81
토란	<i>Lecocasia esculenta</i> Schott.	128	99	152

1) Relative activity (%) = (absorbance of sample/absorbance of saline) × 100

Fr. I: Cold water extract

Fr. III: Methanol extract

Fr. IV: Hot water extract

다. 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 macrophage 활성 검색

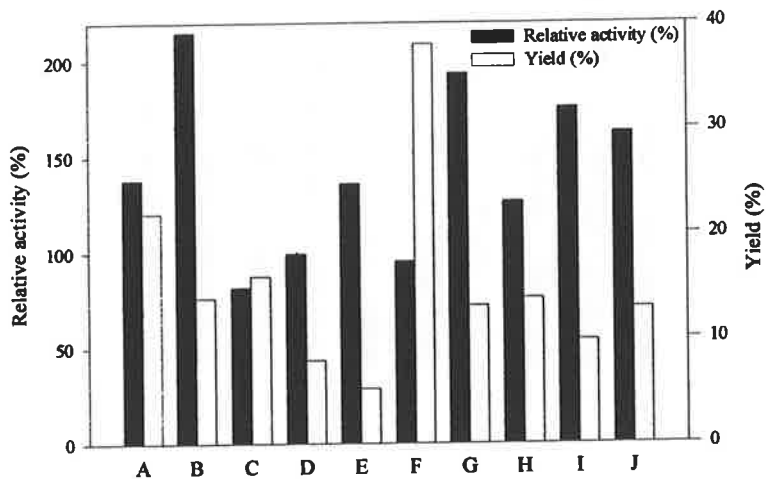
Table 2-2의 결과는 많은 시료에서 유기용매에 의한 추출물이 오히려 대조군보다 활성이 떨어지는 경향을 나타내었는데 메탄올추출물의 경우에는 100% 이상의 결과를 보이는 시료가 동과, 인삼, 잇꽃, 구기자등 27종류에 국한되어 냉수나 열수추출물의 대부분의 시료가 대조군보다 활성을 갖는 것과는 많은 차이를 보이고 있었으며 핵산추출물은 심한 세포독성현상을 보였다. 즉 유기용매의 추출물은 macrophage의 활성을 저해하거나 독성으로 작용하는 것으로 생각된다. 즉 유기용매에 의해서 주로 추출되는 저분자류(Fr. II와 III)는 오히려 활성을 저해하는 것으로 생각된다.

라. macrophage 활성 시료의 선정

전통 차 및 즉류용 식물시료의 1차 활성검색에서 나타난 결과로부터 (Table 2-2) 높은 활성을 나타내었던 시료(취, 잇꽃, 황기, 감초, 하늘타리, 당귀, 녹차, 봉잎, 현미와 잔대)에 대해 Fig. 2-3과 Fig. 2-4에서와 같이 2차로 냉수추출과 열수추출로 나누어 활성을 재검토하였다. 그 결과 1차 활성검색시와 마찬가지로 잇꽃(홍화)의 활성이 Fr. I (냉수추출)과 Fr. IV (열수추출) 모두에서 높게 나타났다. 이와같은 macrophage 활성검색의 결과에 따라서 수용계 획분 중에서 가장 높은 활성을 보인 잇꽃 (홍화)을 macrophage 활성검색에 있어서의 시료로 선정하였다.

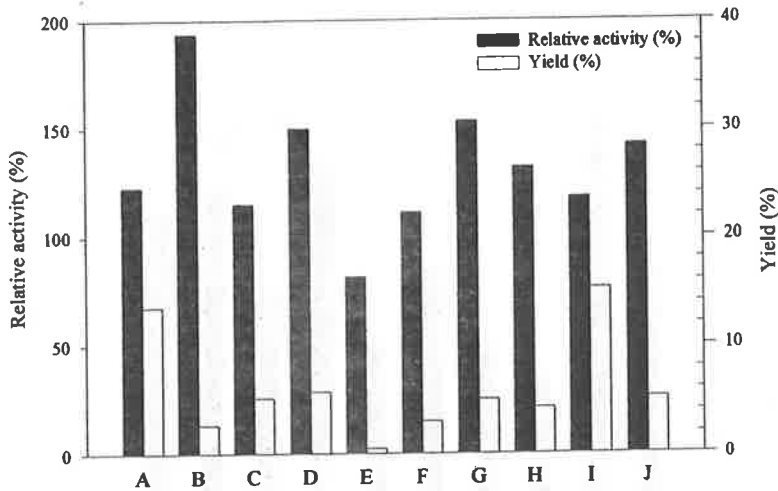
제 2 항 최대활성 시료의 선정 및 실험실적 추출조건의 최적화

Macrophage 활성촉진의 시료로 선정된 잇꽃을 Fig. 2-2에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 즉, 잇꽃을 냉수로부터 추출, 동결건조하여 냉수 추출물(CT-0)을 얻었다(수율 29.1%). 이 CT-0를 메탄올로 5회 환류하여 메탄올 가용부(CT-1)를 분리한 뒤 잔사는 재용해하고 4배의 에탄올을 가하여 에탄올침전을 행하였다. 12시간 후 원심분리를 통해 에탄올 가용부(CT-2)와 침전을 분리하고 침전은 재용해후에 투석, 농축 및 동결건조 과정을 거쳐 고분자조획분 CT-3을 얻었다(수율 0.8%). 위의 4개의 획분에 대한 macrophage 활성을 검토한 결과 Fig. 2-5와 같이 CT-0와 CT-3가 대조군보다 높은 활성을 갖었으나 CT-3의 경우가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 대조군에 비해 약 2배의 높은 활성을 갖고 있음을 나타내어 macrophage 활성검색의 시료에 대한 추출 최적조건은 냉수추출 후 에탄올침전을 거쳐 고분자조획분을 조제하는 것이 가



- A, *Pueraria thunbergiana* : 칩
 B, *Carthamus tinctorius* : 잇꽃 (홍화)
 C, *Astragalus membranaceus* : 단더섬 (황기)
 D, *Glycyrrhizia glabra* L. : 감초
 E, *Trichosanthes kirilowii* : 하늘타리
 F, *Angelica gigas* : 당귀
 G, *Cinamonum camphora* : 녹차잎
 H, *Morus alba* : 뽕잎
 I, *Oryzae sativa* : 현미
 J, *Adenophora tryphilla* var. *japonica* : 잔대

Fig. 2-3. Macrophage lysosomal phosphatase enzyme activities of cold water extracts obtained from plants of tea and rice paste sources (Sample, 100 $\mu\text{g/ml}$).

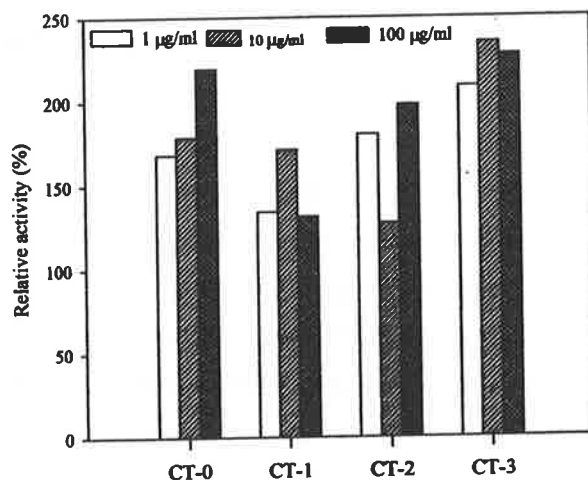


- A, *Pueraria thunbergiana* : 칩
- B, *Carthamus tinctorious* : 잇꽃 (홍화)
- C, *Astragalus membranaceus* : 단더섬 (황기)
- D, *Glycyrrhizia glabra* L. : 감초
- E, *Trichosanthes kirilowii* : 하늘타리
- F, *Angelica gigas* : 당귀
- G, *Cinamonum camphora* : 녹차잎
- H, *Morus alba* : 뽕잎
- I, *Oryzae sativa* : 현미
- J, *Adenophora tryphilla* var. *japonica* : 잔대

Fig. 2-4. Macrophage lysosomal phosphatase enzyme activity of hot water extracts obtained from plants of tea and rice paste sources (Sample, 100 $\mu\text{g/ml}$).

장 바람직하여 이러한 추출방법을 통해 대량추출을 실시하였다. 한편, CT-1은 역시 용매추출에 따른 시료의 각종 시료의 활성검색시와 마찬가지로 높은 활성을 갖지 않았고 CT-2도 CT-1보다는 높았으나 CT-0나 CT-3에 비해서는 떨어

지는 결과를 보이고 있었다. CT-3의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도에서는 농도의
존적으로 활성이 높았으나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 더 이상 활성이 증가하지 않았다.



CT-0, Cold-water extracts

CT-1, MeOH solubles

CT-2, EtOH solubles

CT-3, Crude fraction from cold water extracts

Fig. 2-5. Macrophage lysosomal enzyme activities of fractions obtained from *Carthamus tinctorius* L.

제 3 항. Macrophage 활성물질의 본체 분석

위의 용매추출조건에 의해 조제된 조획분들에 대한 함량 및 조성을 분석하기 위해 전당, 산성당 및 단백질 함량을 분석한 결과(Table 2-3), 4개의 획

분 모두 전당과 단백질이 주 성분이고 산성당은 10% 내외의 함량을 보였다. 그러나 유기용매분획인 CT-1과 CT-2의 경우에는 다당이나 단백질등의 고분자 보다는 단당이나 올리고당 또는 peptide등의 저분자로 이루어진 것으로 생각 된다. 가장 높은 활성을 보였던 고분자조획분 CT-3은 전당보다 단백질이 약 10%정도 더 많이 함유되어 있는 것으로 보이나, CT-3를 periodate 와 pronase 로 처리한 후 활성과 수율을 비교한 결과 (Fig. 2-6과 Table 2-4), periodate 산화처리에 의해 활성이 약 20% 감소하였으며 pronase 분해처리에 의해서는 약 20% 증가하였다. 또한 수율도 periodate 산화처리가 45.7%인 반면 pronase 분해처리가 74.0%인 것으로 상당한 양의 다당이 파괴되어 저분자화되었음을 시사한다. 이러한 결과로부터 활성에 관련되어 있던 다당이 결국 periodate에 의해 파괴되므로서 활성이 저하되는 것으로 예측할 수 있으며 예비적으로 활성에 관여하는 물질이 단백질이 아닌 다당일 가능성을 시사하고 있다. 이 획 분에 대해서 구성당(중성당)을 분석한 결과(Table 2-5), CT-3는 galactose, glucose 및 arabinose가 주요 구성당이었으며 rhamnose 및 mannose도 포함되어 어져 있는 것으로 보인다.

Table 2-3. Chemical compositions of subfractions extracted with cold water or organic solvent from *Carthamus tinctorius* L.

	CT-0	CT-1	CT-2	CT-3
Total sugar (%)	42.7	34.5	49.8	27.1
Uronic acid (%)	9.7	12.3	9.9	10.9
Protein (%)	26.9	42.8	18.6	36.9

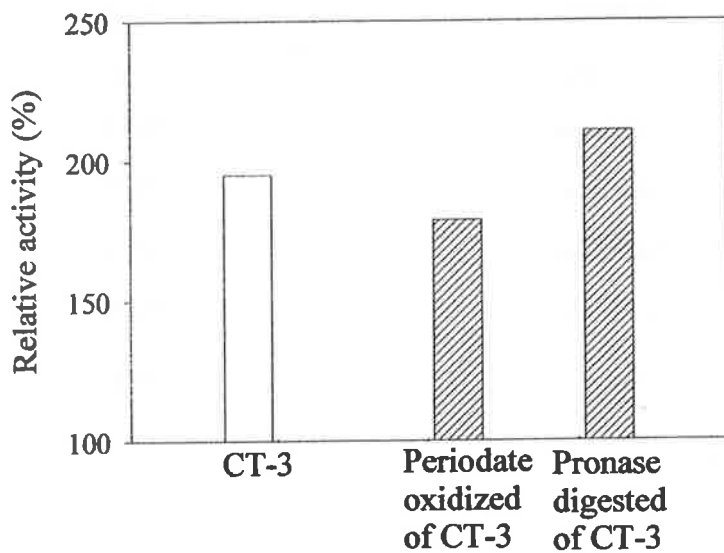


Fig. 2-6. Effects of chemical and enzymatic treatments on macrophage lysosomal phosphatase activity of CT-3 (sample, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table 2-4. Yields of CT-3 treated with chemical and enzyme

Treatment	Yields (%)
Periodate oxidized	45.7
Pronase digested	74.0

Table 2-5. Sugar components of CT-3 obtained from *Carthamus tinctorius* L.

Sugars	CT-3 (mol. %)
Rhamnose	14.4
Fucose	2.3
Arabinose	21.5
Mannose	10.7
Galactose	27.4
Glucose	23.8
Total	100

제 4 항 Macrophage 활성화 다당의 정제

가. Ion-exchange chromatography에 의한 분획

최대 활성 획분인 CT-3으로부터 DEAE-Toyopearl 650M(Cl⁻ form)을 이용한 음이온 교환크로마토그래피를 염농도를 단계별로 높이면서 실시하여 Fig. 2-7 과 같이 분획물을 제조하였다. 이들에 대해 활성을 조사한 결과(Fig. 2-8) 수율이 가장 높았던 0.1M NaCl 용출분획(CT-3IIa)이(Table 2-6, 수율 15.5%) 활성도 가장 높았으며 그 다음으로 0.5M NaCl 용출분획(CT-3IIe)에서도 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 CT-3IIa는 수율과 활성 모두가 가장 높았기 때문에 잇꽃으로부터 냉수추출과 에탄올침전을 거쳐 고분자 조획분을 조제한 후 DEAE-Toyopearl에서 0.1M NaCl로 용출한 획분을 대량으로 조제하여 이를 정제하면 macrophage의 활성화에 영향을 주는 구조를 분석하고 어떤부위가 macrophage의 활성화에 영향을 주는지를 밝힐 수 있다고 본다.

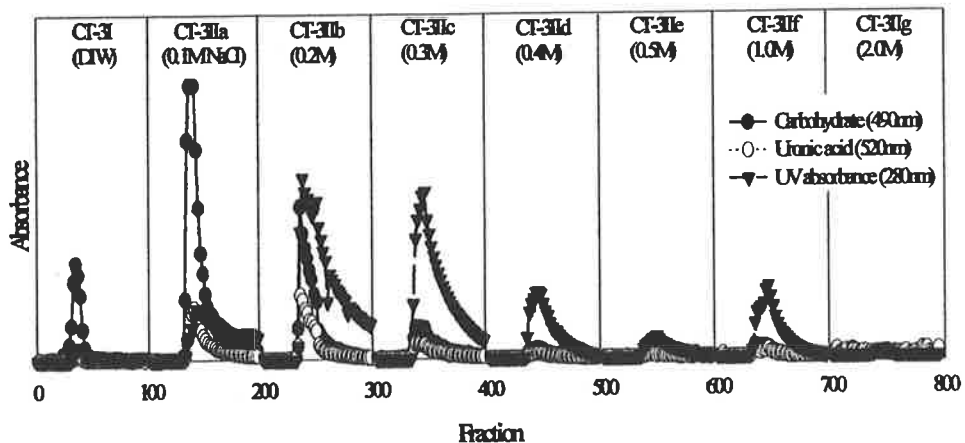


Fig. 2-7. Elution pattern of CT-3 on DEAE Toyopearl 650M (Cl⁻ form) column chromatography.

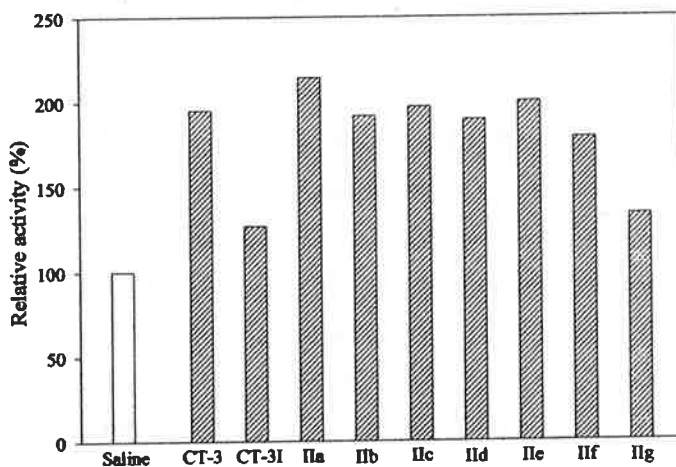


Fig. 2-8. Macrophage lysosomal enzyme activity of subfractions obtained from CT-3 on DEAE Toyopearl 650M column chromatography (Cl⁻ form) (sample, 100 μ g/ml).

Table 2-6. Yields of subfractions obtained from CT-3 on DEAE Toyopearl 650M (Cl⁻ form) column chromatography

Fraction	Yields (%)
CT-3 I	3.5
CT-3 IIa	15.5
CT-3 IIb	12.3
CT-3 IIc	8.0
CT-3 IId	3.5
CT-3 IIe	1.8
CT-3 II f	2.9
CT-3 IIg	1.7
Total	49.2

나. Sepharose CL-6B에 의한 Gel permeation chromatography(GPC)에 의한 분획

DEAE-Toyopearl 650M(Cl⁻ form)을 이용한 음이온교환크로마토그래피에서 가장 높은 macrophage 활성을 나타낸 0.1M NaCl 획분인 CT-3IIa-1을 Sepharose CL-6B에 의한 gel permeation chromatography를 실시하여 CT-3IIa-1-1, 3IIa-1-2와 3IIa-1-3으로 분리하였다(Fig. 2-9). 각 획분의 macrophage lysosomal enzyme activity를 측정한 결과 CT-3IIa-1-2 획분이 245%로 가장 높은 활성을 나타내었고(Fig. 2-10) 수율도 3개의 획분 중 가장 높았으며 58.8%의 당, 6.5%의 산성당 및 13.8%의 단백질로 구성되어 있는 당이 주성분인 획분임을 알 수 있었다(Table 2-7). 활성획분에서 가장 많은 함량을 차지하고 있는 당은 주로 중성당인 galactose(32.0%)와 arabinose (20.6%) 이외 glucose(15.4%)와 rhamnose(15.1%)를 포함하고 있었으며 산성당의 경우에는 glucuronic acid가 4.7%로 galacturonic acid는 3.8%의로 중성당이 주구성당을 형성하고 있었다(Table 2-7).

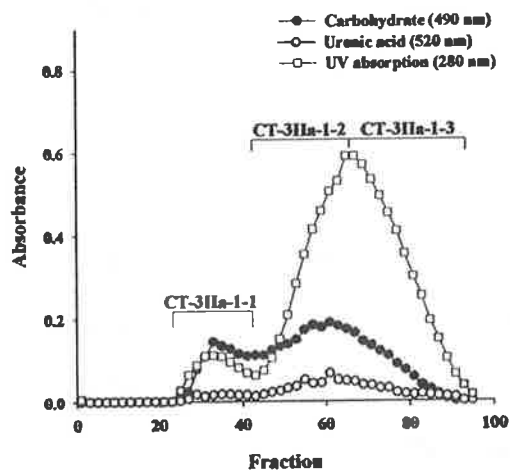


Fig. 2-9. Elution pattern of CT-3IIa-1 on Sepharose CL-6B. The column (1.7 x 82 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min.

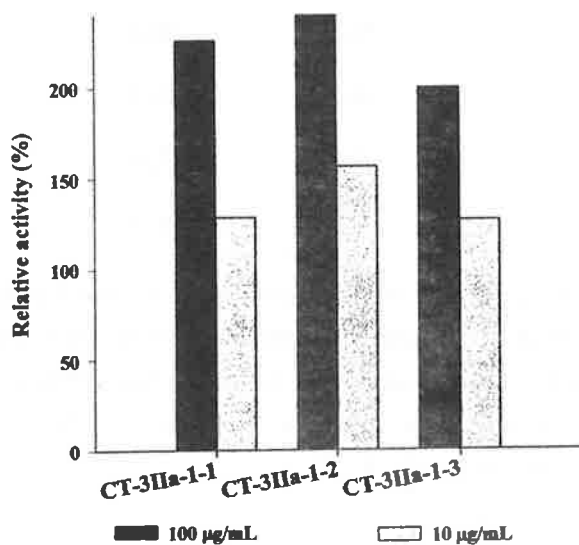


Fig. 2-10. Macrophage lysosomal enzyme activities of subfractions obtained from CT-3IIa-1 on Sepharose CL-6B

Table 2-7. Physicochemical properties of subfractions obtained from CT-3IIa-1 on Sepharose CL-6B column chromatography

	CT-3IIa-1-1	CT-3IIa-1-2	CT-3IIa-1-3
Yield (%)	6.4	6.5	4.8
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	47.2	58.8	47.6
Uronic acid ^{b)}	6.4	6.5	4.8
Protein ^{c)}	9.3	13.8	19.1
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	5.8	15.1	6.8
Fuc	1.0	2.2	2.8
Ara	12.6	20.6	31.2
Xyl	trace ^{e)}	2.5	4.7
Man	9.4	3.7	4.8
Gal	35.5	32.0	26.6
Glc	29.4	15.4	18.2
GalA	2.1	3.8	1.1
GlcA	4.2	4.7	3.8

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : α -hydroxylbiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

^{e)}Detected less than 0.1 mol. %

다. Sephacryl S-200에 의한 Gel permeation chromatography (GPC)에 의한 분획과 정제 다당의 순도 확인

Sepharose CL-6B에서 얻은 활성획분인 CT-3IIa-1-2의 정제를 위하여 분자량 1 kDa로부터 80 kDa 정도의 물질을 분리할 수 있는 Sephacryl S-200에 의한 gel permeation chromatography를 실시하여 CT-3IIa-1-2-1과 3IIa-1-2-2를 분리하였고(Fig. 2-11), CT-3IIa-1-2-1 획분이 3IIa-1-2-2 보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2-12). 이러한 활성획분은 Table 2에서와 같이 80.1%의 당이 주성분을 이루고 있으며 산성당 3.4%와 단백질 7.1%를 함유하고 있는 획분으로 주구성당은 galactose(30.6%), arabinose(23.8%)와 glucose(18.5%)이며 그 외 rhamnose(9.7%)를 함유하고 있으며 galacturonic acid와 glucuronic acid (각각 1.2와 3.0%)가 소량 함유되어 있는 중성다당류의 획분이었다. 이러한 활성획분에 대해 GPC column을 이용하여 HPLC로 분자량과 순도를 검정한 결과, CT-3IIa-1-2-1은 68 kDa의 분자량을 가진 단일물질임이 판명되었다(Fig. 2-13). 최종적으로 홍화의 냉수추출물에서 조제된 조다당획분으로부터 다양한 column chromatography를 이용하여 macrophage 활성을 가진 CT-3IIa-1-2-1를 분리, 정제하였는데 이 획분은 Table 2-8에서 보이는 것처럼 정제가 진행되면서 galactose와 arabinose 및 glucose가 주구성당을 이루고 있는 다당류의 획분임을 확실히 보여주고 있다.

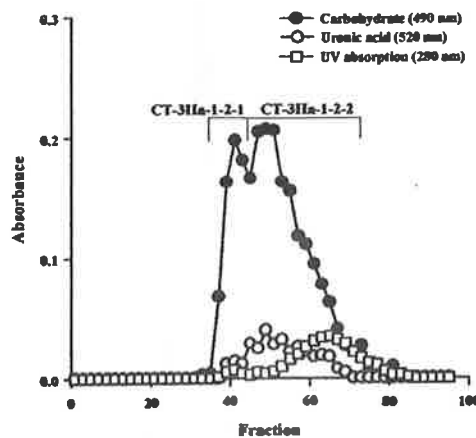


Fig. 2-11. Elution pattern of CT-3IIa-1-2 on Sephacryl S-200. The column (1.5 x 47.5 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.2 ml/min.

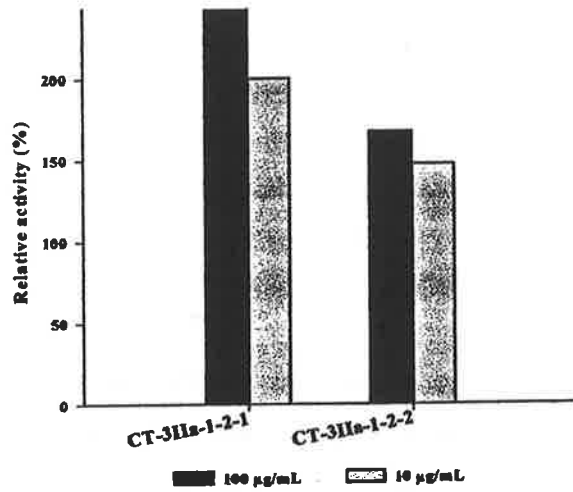


Fig. 2-12. Macrophage lysosomal enzyme activity of subfractions obtained from CT-3IIa-1-2 on Sephacryl S-200.

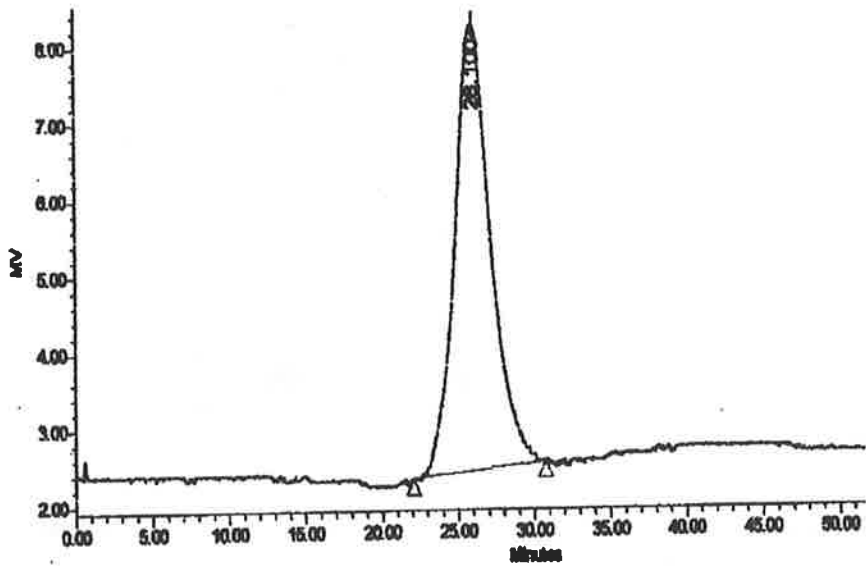


Fig. 2-13. HPLC profile of the purified CT-3IIa-1-2-1.

Table 2-8. Physicochemical properties of subfractions obtained from CT-3IIa-1-2 on Sephacryl S-200 column chromatography

	CT-3IIa-1-2-1	CT-3IIa-1-2-2
Yield (%)	28.0	46.0
Content (%)		
Carbohydrate ^{a)}	80.1	77.2
Uronic acid ^{b)}	3.4	3.9
Protein ^{c)}	7.1	9.4
Component sugar (mol. % ^{d)})		
Rha	9.7	5.9
Fuc	2.7	7.8
Ara	23.8	20.4
Xyl	6.7	9.7
Man	3.8	7.2
Gal	30.6	24.9
Glc	18.5	18.3
GalA	1.2	2.6
GlcA	3.0	3.2

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : α -hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

Table 2-9. Physicochemical properties of each subfraction during the purification step obtained from CT-3

	CT-3IIa-1	CT-3IIa-1-2	CT-3IIa-1-2-1
Yield (%)	13.9	6.5	1.8
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	56.8	58.8	80.1
Uronic acid ^{b)}	8.3	6.5	3.4
Protein ^{c)}	32.9	13.8	7.1
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	9.7	15.1	9.7
Fuc	5.1	2.2	2.7
Ara	19.3	20.6	23.8
Xyl	5.0	2.5	6.7
Man	7.1	3.7	3.8
Gal	32.3	32.0	30.6
Glc	15.4	15.4	18.5
GalA	2.0	3.8	1.2
GlcA	4.1	4.7	3.0

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : *m*-hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

제 5 항 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 구조분석 및 수식

가. 정제된 macrophage 활성화 물질의 결합양식을 통한 부분적 구조분석

정제된 활성획분인 CT-3IIa-1-2-1의 일반 성분분석과 구성당 분석결과는 CT-3IIa-1-2-1가 80%의 당을 함유하고 있으며 galactose, arabinose와 glucose가 주구성당을 형성하고 있는 획분임을 보여주었다. 이러한 활성 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 CT-3IIa-1-2-1를 메틸화하고 2 M TFA로 가수분해한 후, 부분 메틸화 alditol acetate로 전환시켜 GC와 GC-MS로 이를 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. 결합양식의 분석 결과, CT-3IIa-1-2-1는 주로 5-결합과 3,5-결합-arabinose, 6-결합-galactose와 3,6-결합-galactose 및 3-결합-glucose를 포함하고 있었다(Table 2-10). 이러한 주구성당의 결합양식의 결과는 CT-3IIa-1-2-1의 획분은 arabinogalactan과 glucan의 다당류가 결합되어 있는 구조를 갖고 있으며 이들이 macrophage 활성화에 중요하게 관여하는 것으로 추정된다. 활성획분의 전체구조 중 활성화에 주요하게 관여하는 본체의 구조를 검토하기 위하여 CT-3IIa-1-2-1을 *exo- α -L-arabinofuranosidase*로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-10의 gel filtration chromatography를 이용하여 분리한 결과, 효소에 분해되지 않은 column의 void 부근에서 용출되는 저항획분인 CT-3IIa-1-2-1/R1)과 inner volume에서 얻은 효소에 분해된 획분(CT-3IIa-1-2-1/R2)으로 나눌 수 있었다(Fig. 2-14).

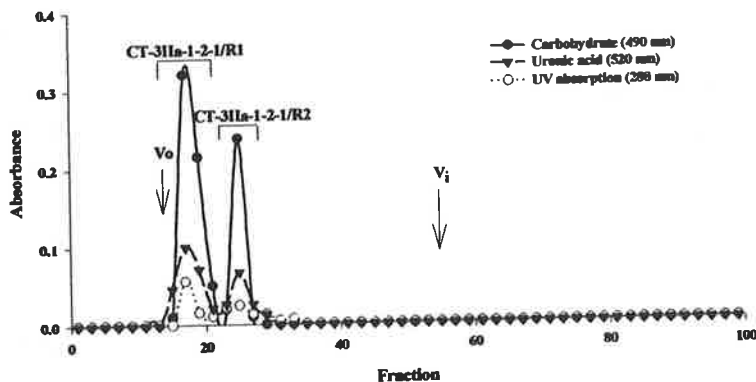


Fig. 2-14. Gel filtration pattern of products digested from CT-3IIa-1-2-1 with *exo- α -L-arabinofuranosidase* on Bio-gel P-10.

Table 2-10. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CT-3IIa-1-2

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	terminal (f)	6.1
	terminal (p)	0.6
	3	1.4
	5	21.0
	3, 5	19.1
Xylose	4	4.7
Rhamnose	terminal	1.6
	2	1.2
Mannose	terminal	0.8
	4, 6	1.2
Galactose	terminal	2.0
	3	2.7
	6	8.8
	3, 6	7.6
Glucose	terminal	1.6
	3	8.0
	2	2.0
	4	3.1
	4, 6	2.9
	3, 4, 6	3.5

나. Macrophage 활성화 물질의 구조분석 및 수식

예비 구조수식에서 macrophage 활성화분 CT-3IIa-1-2-1을 *exo- α* -L-arabinofuranosidase로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-10의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과 얻은 두 개의 획분, CT-3IIa-1-2-1/R1, CT-3IIa-1-2-1/R2의 구성요소를 알아보기 위해서 physico-chemical properties를 측정하였다(Table 2-11). 이 두 획분의 경우, 역시 분리되기 전의 획분인 CT-3IIa-1-2-1과 비슷하게 70%이상의 당을 함유하고 있으며 arabinose, galactose와 glucose가 주구성당을 형성하고 있음을 보여주었다. 이 두 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 두 획분 각각을 메틸화하고 2 M TFA 가수분해한후, 메틸 alditol acetate로 전환시켰다. 그 이후로 GC와 GC-MS로 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. CT-3IIa-1-2-1/R1의 경우 3,5-결합-arabinose, 6-결합-galactose와 3,6-결합-galactose 그리고 3-결합-glucose를 포함하고 있었다(Table 2-12). 그리고 CT-3IIa-1-2-1/R2의 경우 역시 CT-3IIa-1-2-1/R1와 마찬가지로 3,5-결합-arabinose, 6-결합-galactose와 3,6-결합-galactose을 주로 포함하고 있었다(Table 2-13). 이러한 결과로 보아 이 두 획분의 경우는 arabinogalactan과 glucan의 다당류가 결합되어있는 구조를 갖고 있으며 이 구조가 macrophage 활성화에 중요하게 관여하는 것으로 해석되어진다. 마지막으로, 두 획분에 관한 macrophage cellular lysosomal enzyme 활성화 test 결과 CT-3IIa-1-2-1/R1 획분의 경우는 relative activity 300에 가까운 매우 높은 활성을 나타내었다. 그러나 CT-3IIa-1-2-1/R2 획분의 경우 역시 relative activity 200을 넘는 높은 활성이지만 CT-3IIa-1-2-1/R1 획분의 활성화에는 미치지 못하였다(Fig. 2-15).

Table 2-11. Physicochemical properties of subfractions obtained from CT-3IIa-1-2-1 with *exo- α -L-arabinofuranosidase* on Bio-gel P-10 column chromatography

	CT-3IIa-1-2-1/R1	CT-3IIa-1-2-1/R2
Yield (%)	52.0	39.0
Content (%)		
Carbohydrate ^{a)}	80.1	77.2
Uronic acid ^{b)}	2.6	3.9
Protein ^{c)}	7.1	11.9
Component sugar (mol. % ^{d)})		
Rha	11.9	10.9
Fuc	2.7	7.8
Ara	41.9	36.9
Xyl	6.7	9.7
Man	3.8	7.2
Gal	45.9	39.7
Glc	23.9	28.1
GalA	1.2	2.6
GlcA	1.9	3.2

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : *m*-hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

Table 2-12. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CT-3IIa-1-2-1/R1

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	terminal (f)	6.1
	terminal (p)	0.6
	3	1.4
	5	31.2
	3, 5	19.1
Xylose	4	4.7
Rhamnose	terminal	1.6
	2	1.2
Mannose	terminal	0.8
	4, 6	1.2
Galactose	terminal	2.0
	3	2.7
	6	14.9
	3, 6	10.5
Glucose	terminal	1.6
	3	11.2
	2	2.0
	4	3.1
	4, 6	2.9
	3, 4, 6	3.5

Table 2-13. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CT-3IIa-1-2-1/R2

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	terminal (f)	6.1
	terminal (p)	0.6
	3	1.4
	5	21.0
	3, 5	26.4
Xylose	4	4.7
Rhamnose	terminal	1.6
	2	1.2
Mannose	terminal	0.8
	4, 6	1.2
Galactose	terminal	2.0
	3	2.7
	6	10.2
	3, 6	11.6
Glucose	terminal	1.6
	3	8.0
	2	2.0
	4	3.1
	4, 6	2.9
	3, 4, 6	3.5

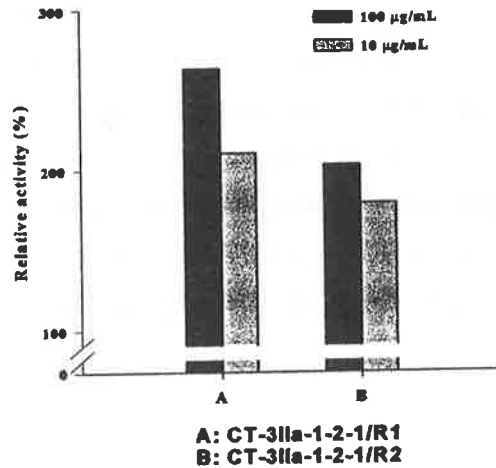


Fig. 2-15. Macrophage cellular lysosomal enzyme activity of subfractions obtained from CT-3IIa-1-2-1 with *exo- α -L-arabinofuranosidase* on Bio-gel P-10 column chromatography.

제 6 항 *In vivo*에서의 macrophage 활성 및 독성실험

가. *In vivo*에서의 macrophage 활성

홍화의 crude-sample인 CT-1이 *in vitro*상에서 높은 macrophage cellular lysosomal enzyme activity를 보인 반면에 그것이 *in vivo*상에서 유사한 경향의 활성을 나타내는지 알아보기 위해서 ICR mice(male, 4-5주령)을 이용하여 경구투여를 시행하였다. 7일간 연속적으로 일정한 시간에 경구 투여하였고, 대조구의 경우는 증류수를 경구 투여하였다. CT-1의 농도는 단일농도(1.0 g/kg per day)로 우선 시행하였다. 단일농도의 경우, 결과는 Fig. 2-16A에 나타난 것처럼 *in vitro*상의 수준인 높은 lysosomal enzyme activity를 나타내었다. 따라서 단일농도의 경구투여 재현성 확인과 다른 농도에서는 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 단일농도로 선정한 1.0 g/kg의 농도를 기준으로 하여 0.25 간격인 네 가지(0.5 g/kg, 0.75 g/kg, 1.0 g/kg, 1.25g/kg) 농도를 잡게 되었고 다양한 농도로 CT-1을 경구 투여하였다. 그 결과는 1.0

g/kg의 농도까지는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내지만, 그 이상의 농도인 1.25 g/kg에서는 오히려 1.0 g/kg의 농도에서의 결과보다 약간 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 2-16B). 이렇게 시료 CT-1을 네 가지의 농도로 경구 투여하고 난후 얻어낸 peritoneal macrophage에서의 culture supernatants 즉, conditioned medium을 가지고 hematopoietic growth factor인 IL-6 또는 GM-CSF 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다. 그 결과, GM-CSF의 결과는 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 농도 의존적으로 생성능을 나타내었다(Fig. 2-17). 그리고 IL-6의 경우는 1.0 g/kg과 1.25 g/kg의 농도에서 대조구와 2배 이상의 차이를 보이는 높은 생성능을 나타내었다(Fig. 2-18).

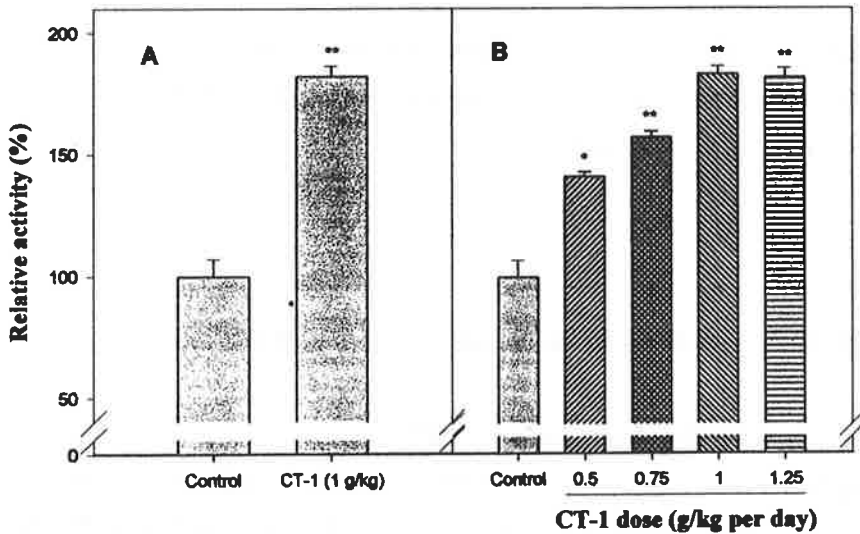


Fig. 2-16. Effects of ICR mice orally administering CT-1 a single dose (A) and different doses (B) on macrophage cellular lysosomal enzyme activity. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significance between control and sample.

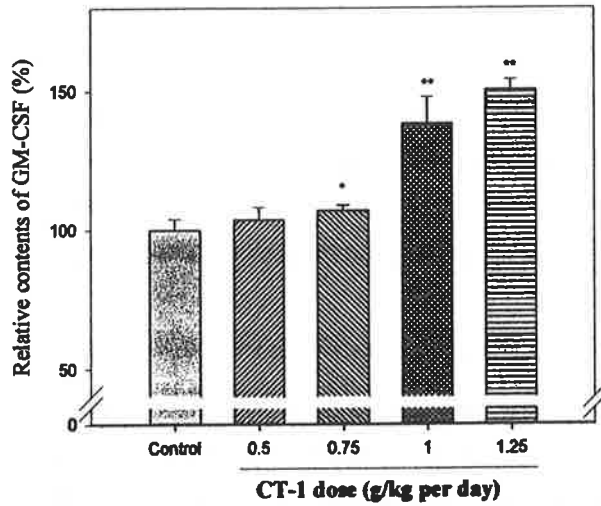


Fig. 2-17. Effects of orally administered CT-1 on GM-CSF production in the culture supernatants (conditioned medium) of murine peritoneal macrophages. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significance between control and sample.

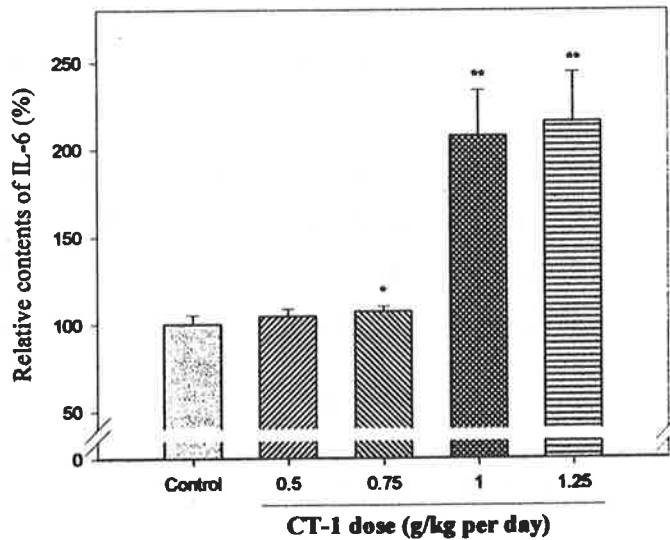


Fig. 2-18. Effects of orally administered CT-1 on IL-6 production in the culture supernatants (conditioned medium) of murine peritoneal macrophages. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significance between control and sample.

나. 독성실험

<경구투여 급성독성 검사>

홍화 추출물 중 CT-1으로 100, 500, 1000 mg/kg 농도로 경구 투여하고 모든 시험군의 1일 4일 7일 14일 재의 체중의 변화를 측정하였고 대조군은 saline을 사용하였다. 그 결과(Fig. 2-19) 각 군당 몸무게가 점차로 증가하고 생존율이 100%로써 경구투여에 의한 독성은 나타나지 않았다(Table 2-14).

<꼬리정맥투여 급성독성 검사>

홍화 추출물 중 CT-1으로 100, 300, 500 mg/kg 농도로 생리식염수에 녹여 꼬리정맥에 주사한 후 48시간 동안 관찰하였고 대조군은 saline을 사용하였다. 그 결과(Table 2-15) 100, 300 mg/kg에서는 100%의 생존률을 보였으며 500 mg/Kg농도에서만 83%의 생존율을 나타내었다. 따라서 본 시료의 LD₅₀은 500 mg/kg이상의 용량에서 나타날 것으로 추정되었으며 500 mg/Kg이하에서는 독성이 없는 것으로 판단되었다.

Table 2-14. Acute toxicity of the fraction CT-1 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	30.4±2.95	36.6±3.3	6	100
500 mg/Kg	6	28.7±1.43	35.5±1.35	6	100
1, 0 0 0 mg/Kg	6	30.2±2.75	37.0±5.95	6	100
2, 0 0 0 mg/Kg	6	30.3±2.31	37.7±1.75	6	100

Table 2-15. Acute toxicity of the fraction CT-1 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	30.3±1.8	31.1±2.3	0	0	100
100 mg/Kg	6	31.0±1.8	31.4±2.4	0	0	100
300 mg/Kg	6	31.0±1.5	32.8±3	0	0	100
500 mg/Kg	6	31.0±2.2	30.7±2.0	0	1	83

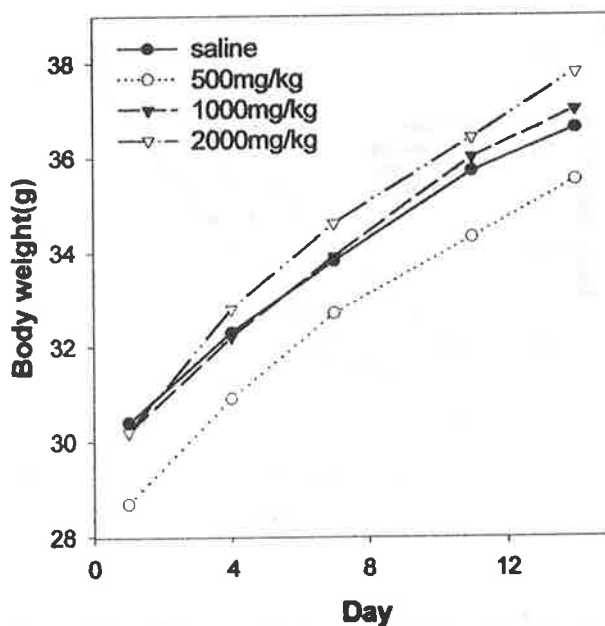


Fig. 2-19. Changes of body weight of mice orally administrated with various concentrations of CT-1.

다. Macrophage 활성 물질의 마우스 꼬리정맥 주사시 장기무게변화

홍화 추출물 중 CT-1을 100 mg/kg, 300 mg/kg, 500 mg/kg의 농도별로 꼬리정맥에 주사한 후 1, 3, 5, 7일째 각 군의 체중의 변화를 측정하고(Fig. 2-20) 비장, 흉선, 간, 신장의 무게를 측정한 결과(Table 2-16)장기무게의 변화가 없음이 기존의 보고와 일치하는 경향을 나타내었다. 100, 300 mg/kg을 투입하였을 때 대조군과 비슷한 몸무게의 증가를 보였고, 500 mg/kg 투입시 2 일째 되는 날 mouse에 몸무게가 일시적으로 감소하는 경향을 보이다가 모든 군이 대조군과 같은 경향으로 몸무게의 증가를 보였다. 장기 또한 대조군과의 비슷한 경향을 나타내어 홍화 추출물이 mouse에 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

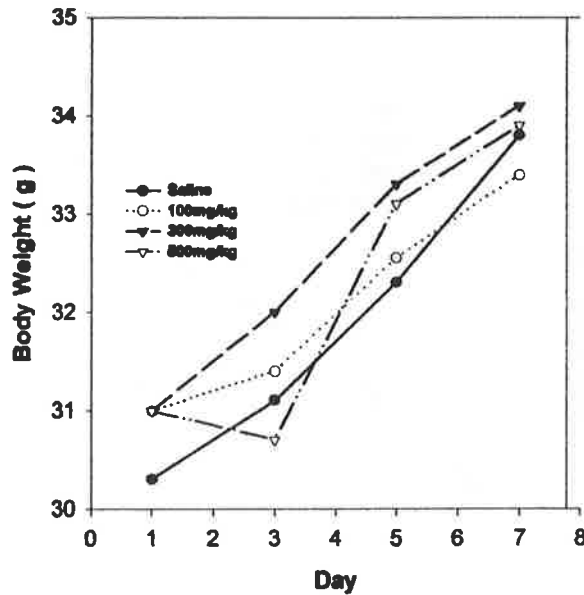


Fig. 2-20. Changes of body weight by intravenous injection of the fraction CT-1 in mice.

Table 2-16. Acute toxicity of the fraction CT-1 by intravenous injection in mice

Group	Final body weight(g)	Spleen weight(g)	Liver weight(g)	Thymus weight(g)
Saline	33.8±2.5	0.09±0.05	1.67±0.43	0.05±0.01
100 mg/Kg	33.4±1.9	0.09±0.03	1.57±0.15	0.05±0.01
300 mg/Kg	34.1±3.2	0.12±0.02	2.06±0.20	0.06±0.01
500 mg/Kg	33.9±1.9	0.18±0.01	2.20±0.22	0.06±0.01

제 7 항 홍화 함유 macrophage 활성화 물질의 기능성 식품화

대량 추출물을 증류수로 pH별, 추출횟수별로 추출한 후 macrophage활성에 미치는 추출조건을 검토한 후 실험실적 방법과 비교하였다. 그 결과 추출횟수의 영향은 관찰되지 않았으나 온도의 영향은 고온으로 갈수록 공업적 추출의 경우가 다소 낮은 활성을 나타내었다. 이는 추출기 내의 온도조절이 균일하지 않은 결과로 판단되었으며 타 세부과제에 있어서도 대량추출의 경우에는 추출기 내의 stirring 또는 agitating 용 장치의 부착이 요구됨을 알 수 있었다(Fig. 2-21, 22).

추출물에 대한 탈색방법을 검토한 결과 1,000 mg/l의 농도에서 Diaion HP-21 > Diaion HP-20 > 활성탄의 순서로 뚜렷한 탈색효과를 나타내었으며 이들 처리에 의한 활성감소는 보이지 않았다(Table 2-17, 18). 탈색시킨 시료를 대상으로 한외여과를 실시한 결과 300 kDa~1,000 kDa의 분획에서 높은 macrophage 활성을 나타내었다(Table 2-19). 이러한 결과를 토대로 공업적 순도의 정제 공정을 Fig. 2-23과 같이 확립하였다.

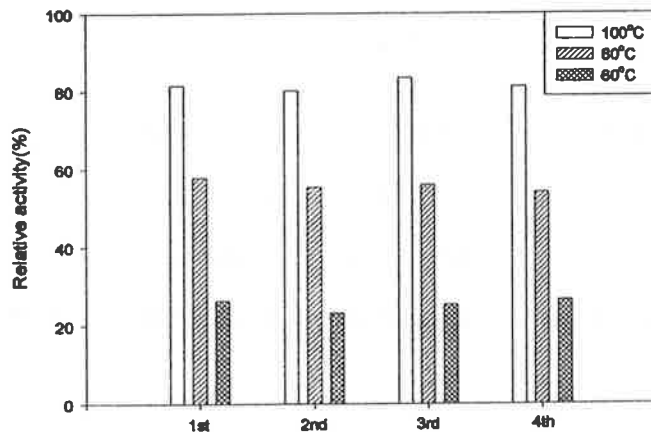


Fig.2-21. Effects of extraction temperature and serial extraction on macrophage activity using hot water in lab-scale.

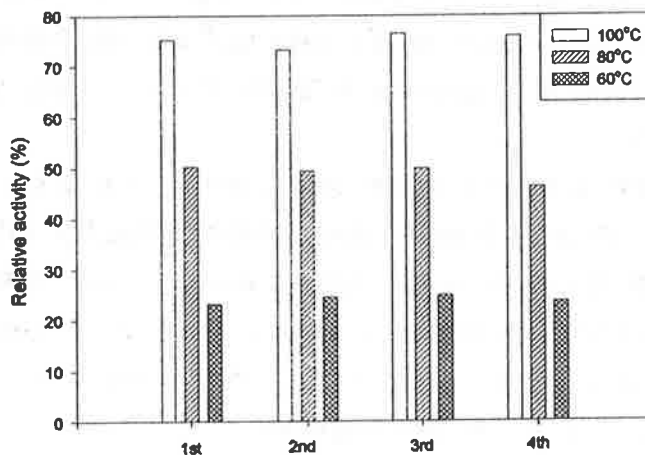


Fig. 2-22. Effects of extraction temperature and serial extraction on macrophage activity using hot water in bench-scale.

Table 2-17. Effects of resins on L-value of crude sample prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	69.45	78.89	57.19

Concentration of crude sample : 1,000 mg/ℓ

Table 2-18. Effects of resins on L-value of crude sample prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	79.51	89.62	67.15

Concentration of crude sample : 1,000 mg/ℓ

Table 2-19. Changes of physiological activity of crude sample treated with ultrafiltration

Physiological activities	MW cut-off				
	< 10,000	< 100,000	< 300,000	< 1,000,000	> 1,000,000
Macrophage activity (%)	0	70.9	91.4	46.8	32.9

Concentration of samples was 100 mg/ℓ

Carthamus tinctorius

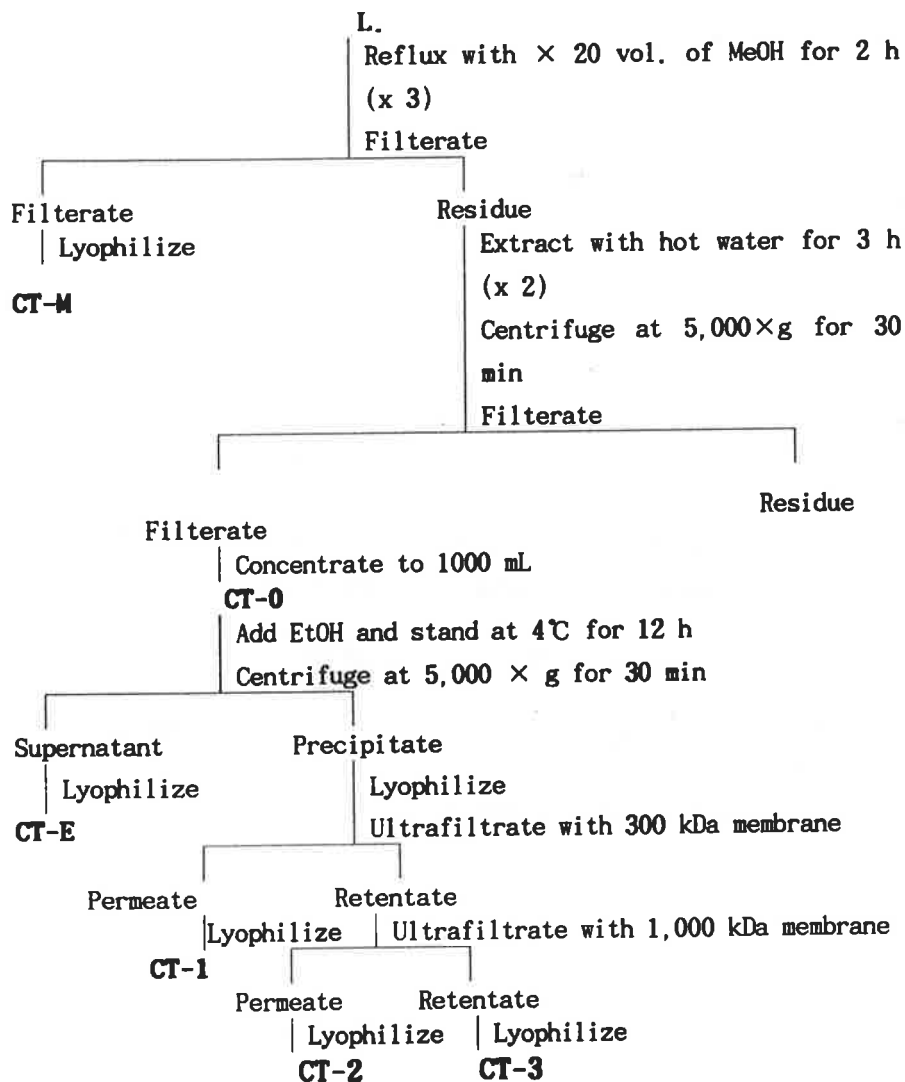


Fig. 2-23. Industrial-based purification procedure of macrophage actives from *Carthamus tinctorius* L.

제 8 항 기능성 식품으로의 시제품 제작 및 안정성 검사

Table 2-20와 같이 경질캡슐제를 제작하였다. 홍화 함유 기능성 경질캡슐에 대한 보관시 일반세균 및 대장균의 증식정도를 확인한 결과(Table 2-21) 유통시 미생물에 의한 변질의 우려는 없는 것으로 나타났다.

Table 2-20. 홍화 함유 기능성 경질캡슐의 배합에

단위: 1캡(250 mg)
제품유형: 건강보조식품(경질캡슐제)
성분:
· 홍화 추출 조시료(CT-2) : 100 mg
· 옥수수 전분(부형제) : 40 mg
· 유당(부형제) : 100 mg
· 구연산(산미제) : 10 mg
권장섭취량 및 섭취방법
· 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취
· 필요에 따라 증감 가능

Table 2-21. 제품의 미생물검사

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
37℃, 1개월	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
50℃, 1주일	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출

제 3 장 전통차 및 죽류용 식물소재 함유 장관 면역 활성화 물질의 기능성식품 소재화

제 1 절 서 설

인간은 주위에 존재하는 많은 종류의 바이러스, 세균, 진균, 기생충 등의 다양한 감염성 요인에 노출되어져 있는데, 이들은 모두가 질병을 일으킬 수 있으며, 특히 이들이 생체 내에 침입하여 무제한으로 증식하게 되면, 최종적으로는 생체를 파괴하는 위험성마저 내포하고 있다. 그럼에도 불구하고 정상적인 개체에서는 이러한 요인들에 의한 감염이 일어나도 대개는 단기간에 종식되며, 영속적인 장애를 남기는 경우가 드문데, 이는 감염성 요인들에 대항하는 개체의 면역계(immune system) 때문이다. 면역계라 함은 각종 이물 및 병원체의 침입에 대항하는 숙주의 기관, 조직, 세포, 각종인자를 통틀어 일컬으며, 기능적으로 선천성 면역계와 후천성 면역계로 분류된다. 감염원에 대하여 최초의 방어를 담당하는 선천성 면역계는 탐식세포, 자연살해세포로 구성되며, 감염원을 퇴치하는 작용을 지닌 후천성 면역계에는 림프구 등이 관여하는데, 이들은 모두 전신에 걸쳐 분포한다.

한편, 면역반응에 관여하는 세포들은 기능의 효과적인 수행을 위해 조직이나 기관을 구성하게 되는데, 이를 림프계통(lymphoid system)이라 한다. 림프계통은 실질적으로 림프구를 생산하는 1차 (혹은 중추) 림프 조직계 (골수, 가슴샘)와, 림프구와 항원과의 접촉 또는 림프구 간의 상호작용을 돕는 2차 (혹은 말초) 림프 조직계 (비장, 림프절 및 점막림프기관)로 분류된다. 2차 림프 조직계 중 생체림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막림프기관은 수많은 필수 영양소들의 소화와 흡수의 중추적인 장소이며, 해로운 다양한 원소들과 병원성 물질들에 대해 barrier의 역할을 담당하고, immune defense system에서의 immunological barrier로서의 생체 내 기능을 맡는다. 이러한 역할을 담당하는 점막림프기관의 종류에는 GALT, BALT, NALT의 세가지가 있는데, 먼저 호흡기관관련림프상조직(Bronchous Associated Lymphoid Tissue: BALT)은 기도에서의 폐조직과 폐포 cell의 호흡의 lymphoid tissue이며, 비강관련림프상조직(Nasal Associated Lymphoid Tissue: NALT)은 입 천정과 코가 연결되는 부

위의 lymphoid tissue이다. 특히 NALT은 sIgA response의 점막면역의 특징과 spleen에서 보이는 전신면역의 유사한 특징을 모두 보유하고 있다. 또 하나의 점막림프기관인 장관관련림프상조직(Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT)은 생체 내에서 가장 큰 lymphoid tissue로 장관의 점막부위에 존재하며 장관 면역계내 IgA response를 비롯하여 생체방어에 있어 대단히 중요한 역할을 담당한다. 특히 생체 중 외부환경과 접촉하는 가장 넓은 표면적을 갖는 소화관 점막은 외부로부터 다양한 많은 양의 미생물, 그리고 식물로부터의 이종단백질이나 화합물 등과 끊임없이 접촉하고 감작되는 것으로부터 면역조직으로서의 의의는 대단히 높다. 이러한 GALT는 Peyer's patch(소장과 회장 전반에 걸쳐 분포), IEL(Intraepithelial lymphocyte, 상피세포 내 림프구), MLN(Mesenteric Lymph Node, 장관막림프절), LP(Lamina Propria), Thoracic duct 등으로 구성되어 있다. 이러한 GALT의 여러 면역 기관 중 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프 기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 inductive site로 알려져 있다. 이러한 Peyer's patch는 T/B cell, macrophage, dendritic cell(항원 제시 세포)등으로 구성되어져 있으며, 특히 Peyer's patch의 lumen dome은 Ag의 uptake와 handling에 중요한 specialized M cell로 구성된 flattered epithelium으로 덮여있다. 이러한 M cell은 lumen으로부터 가용성 항원, 세균, 바이러스 등을 pinocytosis나 phagocytosis에 의해 섭취(engulfment)하여 림프세포에 이동시킴으로써 세포의 활성화에 기여한다. 이와 같이 활성화된 면역세포 및 이들이 생산하는 lymphokine 등은 MLN을 거치고 흉관을 통해 전신면역이나 조혈계 세포 등에 영향을 주게 된다. 다시 말하면 장관 내에 있는 Peyer's patch등의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원과 반응하여 활성화된 후에 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하고, MLN을 통하여 systemic circulation에 도달한다. 따라서 Peyer's patch를 포함한 장관면역체계는 장관의 defense system에 기여할 뿐만 아니라 systemic inflammation을 조절하여 결과적으로 allergic reaction, autoimmune diseases 등을 효과적으로 억제할 수 있는 것이다. Hong 등은 한약제로부터 추출한 면역활성성분에 의해 Peyer's patch에서의 면역 세포들, 특히 T-cell을 활성화시켜 interleukin(IL)-6 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)와 같은 조혈계 세포의 성숙 및 분화에 필요한 cytokine을 생산하게 함으로써 골수세포의 증식에 큰 영향을 미치게 하는 것으로 보고하고 있다. 특히 대부분의 의약품, 한약제 및 식품 등이 경구섭취에 의해 이루어지기 때문에 가장 최초로 생체

내에 흡수되는 부분인 장에서의 면역반응, 즉 Peyer's patch를 비롯한 장내 면역기관에 의한 장관면역의 의미는 상당한 의미와 중요성을 내포한다.

산업화와 더불어 과학의 발달로 식품은 단지 생명유지의 수단이 아닌 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 가진 기능성 물질로서 대두되고 있다. 특히 한약재가 대부분인 전통차 및 즉류용 식물에 대하여 성분들에 대한 효능과 기능성이 과학적인 입증에 의해 점차적으로 밝혀지고 있다. 이들 식물은 저분자 및 고분자 물질을 모두 함유하고 있으며, 영양적인 가치 이외에도 심장질환이나 뇌 질환에 대한 억제 작용, 항산화 작용, 항미생물작용 및 항암 작용 등의 면역작용 등 거의 모든 생리활성에 있어서 그 효과가 입증되었다. 차 또는 죽으로 섭취할 경우, 열수추출에 의한 섭취가 대부분이므로 고분자 및 저분자 모두의 약리효과는 매우 효과적인 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에 사용된 감귤 껍질, 즉 귤피는 기능성 물질을 많이 포함하고 있는 훌륭한 식품이면서 의학용 소재로서의 연구가치도 높은 것으로 알려져 있다. 이미 보고된 바와 같이 비타민 C 이외에 여러 기능성 물질들이 알려지면서 이의 이용에 대한 필요성 또한 증대되고 있다. 특히 귤피에 다량 분포하는 것으로 널리 보고된 펙틴은 그 구조적 특성으로 인해 인체 내에서 다이옥신 등의 유해물질의 제거, 대장암 예방효과, 전립선암 억제효과, 그리고 항콜레스테롤 등의 작용을 한다. 또한 tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-1 생성능 이외에도 항암 작용을 지닌 limonene, 항염증, 항콜레스테롤 및 항산화 등의 기능을 지닌 naringin, hesperidin 등의 flavonoid glycoside 등 저분자 물질 또한 감귤껍질에 다량 존재한다. 이처럼 높은 부가가치를 가진 제품의 원료 물질들에 대하여, 특히 과즙음료제조공정에서의 부산물이라는 이점을 이용한 제품의 개발을 위해서는 적극적인 연구와 기술 개발의 필요성이 더욱 증대된다.

본 연구에서는 전신 면역력의 조절에 큰 영향을 미치는 장관면역체계를, 특히 Peyer's patch를 이용하여 골수세포의 증식에 기여하는 물질에 대한 검색을 실시하고, 전통차 및 즉류용 식물중 가장 높은 활성을 보인 시료에 대해 분리, 정제하여 활성본체의 구성물질에 대한 구조적 특성을 동정하고 산업화 하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

제 1 항 재료

본 실험에 사용된 전통차 및 죽류용 재료식물은 경동시장에서 구입 또는 농협대학교에서 공급받아 사용하였다. 특히 굴피는 제주산 온주밀감의 껍질로서, (주)한국신과학기술센터에서 공급받아 사용하였다. DEAE-Sepharose FF, Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200, Sephadex LH-20은 Pharmacia (Uppsala, Sweden) 사로부터, 그리고 Sep-pak C18 cartridge는 Waters Associates (Milford, MA)로부터 구입하여 사용하였다. RPMI-1640 medium, Hanks balanced salt solution(HBSS), Folin-ciocalteu reagent, Lentinan, Pustrulan, Zymosan A, Pectin from citrus fruit, Arabic gum, Arabino-galactan from larch wood, Epigallocatechin gallate(EGCG), LPS(from *E. coli.*)는 Sigma (St. Louis, MO) 사로부터 구입하였다. 한편 streptomycin, amphotericin B, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Grand Island, NY)사로부터 구입하였고, Alamar Blue™은 Alamar Bio-Sciences Inc.(Sacramento, CA)로부터 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 동물은 5-8 주령의 SPF, C3H/HeN의 암컷 mouse로 국립 보건원, 대한실험동물에서 분양 받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식 시키면서 사육하였다.

제 2 항 실험방법

가. 장관면역 활성화 물질의 검색 시료 제조

구입한 시료 4 g을 Fig. 3-1의 방법에 따라 100°C 에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실행시키고 7,000 rpm에서 20 분간 homogenizer(IKA Labotecnik co. Ultra-turrax T50)로 분쇄한 후, 상등액을 취하여 whatman No. 41 여과지로 여과한 추출물을 농축, 동결건조하여 Fr. I을 얻었고, 침전물은 연속적으로 hexan, 메탄올, 증류수의 순으로 2 시간 동안 환류추출한 후 각각의 상등액을 농축, 동결건조 하여 Fr. II, III, IV를 얻어 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 장관면역 활성을 측정하였다.

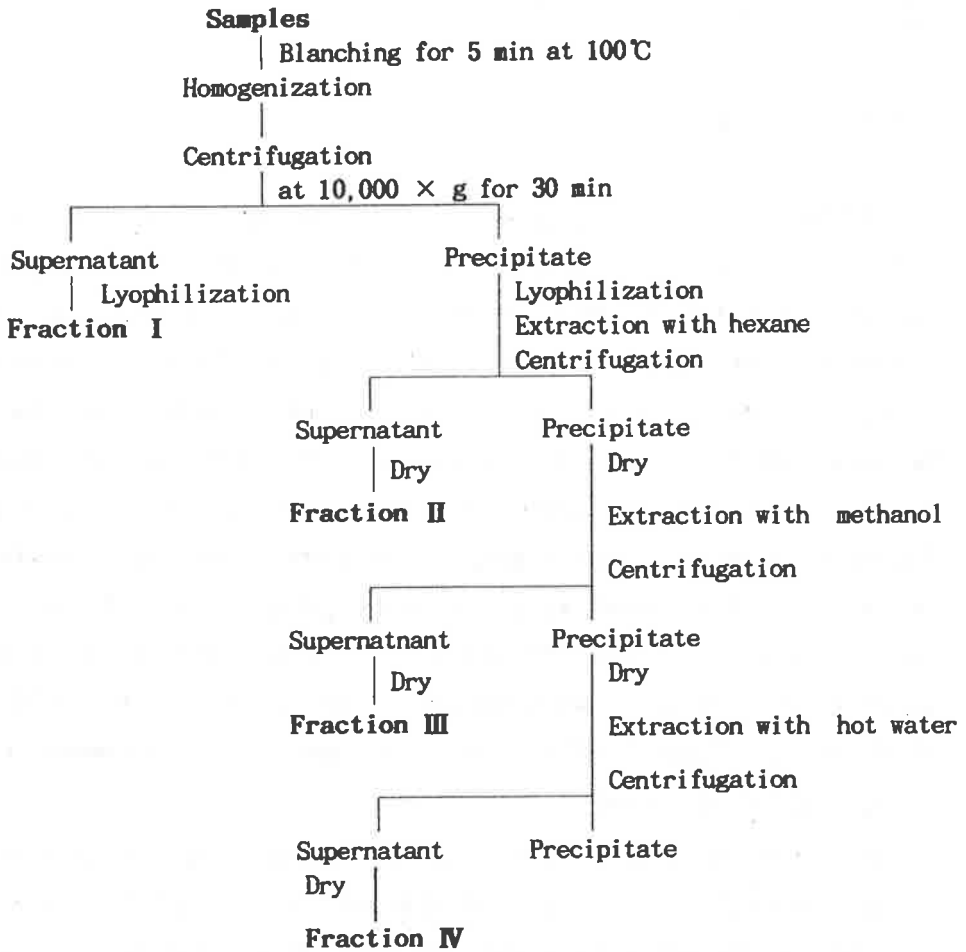


Fig. 3-1. Systematic extraction method from plants of tea and rice paste sources.

나. 활성측정 방법

장관면역 활성촉진 성분의 검색은 장관면역계를 구성하는 장관 Peyer's patch로부터 얻은 세포를 활성화하여 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 정도를 다음과 같은 방법에 따라 측정하였다. 장관면역 활성은 LPS 비의존성인 C3H/HeJ의 소장을 채취하여 소장벽상의 Peyer's patch를 잘라 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 2×10^6 cells/ml RPMI-1640으로 조정, 200 μ l 씩을 96 well plate에 분주한 다음 37°C, 5일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 얻은 상등액을 골수세포 증식활성측정용 세포배양 상등액으로 사용하였다. 동일 mouse의 정강이 뼈로부터 주사기로 RPMI-1640 medium을 뼈속으로 주입하면서 골수세포를 시험관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세정하고 2.5×10^5 cells/ml RPMI-1640으로 조정하였다. 골수세포의 증식도 측정은 Alamar Blue reduction assay를 사용하였다. 조정된 골수세포액 100 μ l, RPMI-1640 medium 50 μ l, 골수세포 증식활성 측정용 Peyer's patch 세포배양 상등액 50 μ l을 96 well plate에 각각 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양하였다. 배양 종료 5시간 전에 Alamar Blue 용액 20 μ l를 첨가한 다음 형광세기를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정, delta soft II(Ver 4. 13 FL, BioMetallics, Inc.)로 data화 하였다. 시료의 장관면역활성 촉진활성은 대조구와의 차이로부터 골수세포의 증식도를 정량함으로써 장관면역 활성화도를 측정하였다.

다. 일반 성분 및 구성당 분석

총당, 산성당 및 단백질 함량은 각각 galactose, galacturonic acid, bovine serum albumin을 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법, m-hydroxybiphenyl법, Lowry법으로 각각 정량하였다.

구성당 분석은 각각의 정제 단계에서 얻은 시료에 대하여 중성당의 경우 Jones 등의 방법으로 2.0 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간 동안 시료를 가수 분해시킨 후 NaBH₄를 이용하여 중성당을 alditol로 환원시키고, (CH₃CO)₂O를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 Gas-liquid chromatography(GLC)로 구성당을 분석하였다. 산성당의 경우에 있어서는 0.1 M TFA로 100°C에서 1시간 동안 부분가수분해 시킨 후 NaBD₄를 이용하여 중성당의 경우와 유사한 조건으로 alditol acetate 유도체로 전환시켜 GLC를 실시하였다. 분석 조건은 Table 3-1과 같고, 표준 단당의 retention time과 비교하여 시료종의 구성당을 분석하였으며, 구성당의 mol %는 각 peak 들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

Table 3-1. Analytical conditions of gas liquid chromatography for sugar composition

Apparatus	: Young Lin M600D
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Column type	: SP-2380
column size	: (30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m)
Column temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Detector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Injector temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: N ₂ (1.0 mL/min)

라. 냉수추출에 의한 고분자 조획분의 대량조제 방법

최대 활성시료로 선정된 식물시료인 귤피(*Citrus unshiu peel*) 1 kg에 대해 20배 부피의 증류수(20 l)를 첨가하고 분쇄, 교반한 후 7000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 상등액은 냉수추출획분(CUI-0)을 얻기 위해 동결 건조하였으며, 잔사에 대해서는 동결 건조한 후, decoction 처리를 실시하고, 원심분리 및 여과하여 얻은 상등액을 투석, 감압 농축 및 동결 건조하여 CUIV-0를 얻었다. CUIV-0는 다시 물에 용해된 후, 에탄올을 첨가하여 상등액(CUIV-2)과 침전으로 분리한 후, 침전은 증류수에 재용해하고 동결 건조하여 열수 조다당 획분(CUIV-3)으로 조제하였다. 한편 CUI-0는 메탄올로 1시간씩 3회 환류하고 원심 분리하여 메탄올 가용 획분(CUI-1)과 비가용 획분으로 분리한 후, 비가용 획분은 다시 증류수에 녹이고 4배 부피의 에탄올을 가하여 다시 상등액(CUI-2)과 침전으로 나누었고, 침전에 대하여 투석, 농축 및 동결 건조 과정을 거친 냉수 조다당 획분(CUI-3)을 조제하였다(Fig. 3-2).

마. 활성본체의 분석

활성본체의 확인을 위하여 시료에 pronase 및 periodate 처리 후 장관면역의 활성변화를 관찰하였다. 시료(20 mg)를 10 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer 20 ml에 용해 시킨 후 10 mg의 pronase를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서

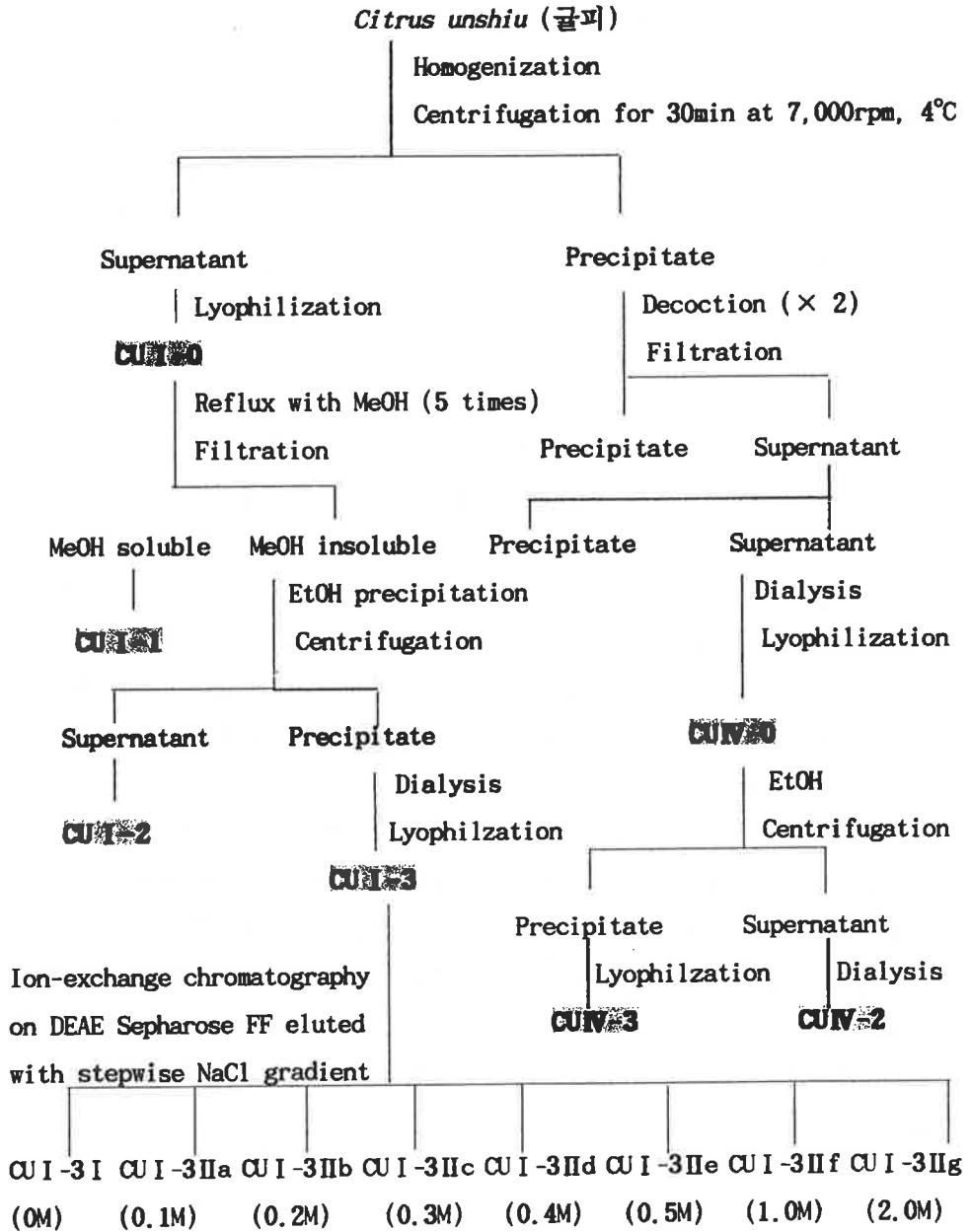


Fig. 3-2. Preparation of CUI-3 from *Citrus unshiu* and fractionation on DEAE Sepharose FF (Cl⁻ form) column chromatography.

48시간 동안 반응시켰다. 효소를 불활성화 시키기 위하여 반응액을 5분간 끓이고 원심 분리하여 불용성 침전을 제거한 후 상등액을 투석하고 비투석 획분을 동결 건조하여 CUI-3의 pronase 소화물을 얻었다. 시료로부터 periodate 산화물을 얻고자 시료(20 mg)를 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 20 ml에 녹인 후 50 mM sodium periodate(NaIO_4)를 가한 혼합물을 4°C 암소에서 3일간 교반, 방치하였다. 잔여 periodate를 제거하기 위해 반응액에 ethylene glycol 5 ml를 첨가한 후 1시간동안 실온에 방치한 다음 투석하고 비투석 획분은 약 10 ml 정도로 농축하였다. 이 농축액에 NaBH_4 를 20 mg가하여 실온에서 12시간 교반하여 환원시킨 후에 중화, 투석하고 비투석 획분을 동결 건조하여 CUI-3의 periodate 산화물을 얻었다.

바. 글피로부터의 장관면역 활성물질의 분리 및 정제

글피의 냉수추출물에서 조제된 조다당획분(CUI-3)을 증류수에 녹여 DIW로 평형화시킨 DEAE-Sephrose FF column(Cl^- form, 4.0×30 cm)에 흡착시킨 후 DIW, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 각 획분을 투석, 농축 및 동결건조하여 8개의 획분(CUI-3I, CUI-3IIa ~ 3IIg)을 얻었다(Fig. 3-2). 이 획분들 중 가장 활성이 높은 CUI-3IIb에 대하여 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column(2.5×94 cm)에서 gel filtration chromatography를 행하여 3개의 획분(CUI-3IIb-1 ~ 3IIb-3)을 얻었으며, CUI-3IIb-2와 3IIb-3에서 유의적인 활성을 나타내었다. 활성획분 중 수율과 저농도에서 활성이 우수하였던 CUI-3IIb-3에 대하여 다시 0.2 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephacryl S-200(1.7×82 cm)에서 gel filtration chromatography를 행하여 활성획분인 정제된 CUI-3IIb-3-2를 얻었으며 이를 Shodex OHpak KB-805 column을 이용, HPLC를 실시하여 분자량 측정과 순도검정을 실시하였다.

사. 활성물질 구성당의 결합양식 분석

메틸화 분석은 Hakamori법과 Waeghe법을 사용하였다. 즉 시료($500 \mu\text{g}$)의 메틸화 후, 에탄올을 흡착시킨 Sep-pak C_{18} cartridge로 메틸화된 시료를 회수하였다. 메틸화 다당 중에서 산성당은 THF에 용해되어 있는 $\text{LiB}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{D}$ (Super-Deutride, 1 ml, 상온, 1시간)로 환원시킨 후, 다시 Sep-pak C_{18} cartridge로 회수하였다. 이를 1.0 M TFA로 121°C에서 2시간동안 가수분해한 후에 NaBD_4 로 환원시켜 아세틸화 반응을 수행한다. 부분적으로 메틸화된

alditol acetate는 GLC와 GC-EIMS로 분석하였다. 메틸화된 alditol acetate들은 fragment ion와 relative retention time으로 확인하였고, peak는 peak areas와 flame ionization detector(FID)의 response factor로 측정하였다.

아. 장관면역 활성화 물질의 구조해석 및 수식

예비 구조수식에서 장관면역 활성화획분 CUI-3IIb-3-2을 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-30의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과 얻은 세 개의 획분, CUI-3IIb-3-2/PG1과 CUI-3IIb-3-2/PG2 및 CUI-3IIb-3-2/PG3으로 나눌 수 있었다. 이 세 개의 획분의 구성요소를 알아보기 위해서 physicochemical properties를 측정하였다. 또한 이 세 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 세 획분 각각 메틸화하고 2 M TFA 가수분해한 후, 메틸 alditol acetate로 전환시켜서 GC와 GC-MS를 이용하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다.

자. *In vivo*에서의 장관면역 활성화 및 독성실험

굴피의 조시료인 CUI-3의 *in vivo*상에서의 intestinal immune modulating activity를 확인하기 위하여 C3H/HeJ mouse(female, 4-5주령)를 이용하여 경구투여를 시행하였다. 시간별에 따른 변화를 보기 위해서 3일부터 21일까지 연속적으로 일정한 시간에 경구 투여하였고 대조군의 경우는 증류수를 급여하였다. CUI-3의 농도는 단일농도(1.0 g/kg per day)로 시행하였다. 단일농도의 경구투여 재현성 확인과 다른 농도에서는 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 세 가지 농도(0.5 g/kg, 1.0 g/kg, 2.0 g/kg)로 CUI-3를 7일간 경구 투여하였다. 경구투여 후 mice로부터 조제된 Peyer's patch cell에서의 culture medium에 대하여 hematopoietic growth factor인 IL-6 또는 GM-CSF 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다.

시료의 급성독성(acute toxicity) 여부를 확인하기 위하여 C3H계 mouse(5주령)를 1주간 적응시킨 후 6마리를 1군으로 하여 시료를 식염수에 용해시킨 후 각각의 농도별로 1회 경구투여 후 14일까지 관찰하고 생존한 마리 수를 측정하여 백분율로 표시하였다. 아만성 독성(subchronic toxicity) 여부의 경우는 각각의 시료를 식염수에 용해시킨 후 10마리를 1군으로 하여 농도별로 37일 동안 매일 오전 11시에 경구투입하였으며 1, 3, 8, 13, 18, 24, 29, 37일

되는 날 체중을 관찰하고 최종일까지의 생존한 마리 수를 측정 후 백분율로 표시하였다.

차. 글피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 추출방법

글피 5 kg으로부터 항보체활성 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 l 용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하여 20배의 메탄올로 2시간 동안 추출한 후 메탄올을 제거한 잔사를 동일 추출기를 사용하여 20배의 물로 온도 별, 추출횟수별로 추출하였다.

카. 글피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제

1) 탈색방법

글피의 대량추출물에 대한 탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 batch와 open column에서 검토하였다.

2) 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립

탈색시킨 시료를 대상으로 한외여과를 실시하였다. 한외여과장치는 Millipore masterflex를 사용하였고 여과막으로는 1만, 10만, 30만, 100만 등의 MW-cut off column형 막을 사용하여 실시하였다.

3) 글피 함유 장관면역 활성화 물질의 공업적 순도에서의 조제

동결건조하여 분쇄한 글피를 메탄올 20배 부피로 환류 추출하여 메탄올 가용 획분을 분리하고, methanol 비가용 획분인 침전물은 감압농축하여 100℃에서 3시간 동안 환류 추출한 후 원심분리(5,000 × g, 30분) 및 동결건조하여 얻은 CUI-0를 적당량의 증류수에 녹인 후 ethanol을 단계적으로 가하여 그 농도(% v/v)를 각각 30%, 75%가 되도록 하여 4℃에서 24시간 정치하였다. 원심분리(5,000 × g, 30분)하여 얻어진 75% ethanol 침전물을 소량의 물에 재용해시켜 투석한 후 비투석 획분을 농축, 동결건조하였다. 75% ethanol 침전물(CUI-75)을 증류수에 재용해하여 분자량이 100 kDa, 300 kDa의 여과막을 사용하여 단계적으로 여과하여 분자량이 300 kDa이상의 CUI-3를 제조하였다.

타. 산업적 순도수준의 정제물질에 대한 소제화 적성 검토 및 시제품 제작

굴피 추출분말 100 mg에 부형제로서 유당 100 mg 및 옥수수 전분 40 mg, 산미제로서 구연산 10 mg을 혼합하여 합량 250 mg의 경질캡슐을 제작하였다. 본 제품은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속한다. 따라서 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가속시험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 안정성 및 미생물 검사를 실시하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 전통차 및 죽류용 식물소재로부터 장관면역 활성화 물질의 검색

가. 각종 시료의 용매추출물로부터 장관면역 활성화 검색

국내자생 90여종의 전통차 및 죽류용 식물시료를 대상으로 추출을 실시하여 시료를 조제한 후 장관면역 활성화물질을 검색한 결과, Table 3-2에서 나타난바와 같이 냉수추출(Fr. I)에서는 굴피, 다시마, 두충, 잔대, 칩 및 탕자 등이, 열수추출 (Fr. IV)에서는 구기자, 다시마, 등글래, 뽕잎, 산수유, 치자 및 치커리가 대조군에 비해 10배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 또한 유기용매획분인 메탄올추출(Fr. III)에서도 감초, 결명자, 냉이, 등글래, 솔잎, 오갈피, 울무 및 탕자가 높은 활성을 보였다. 이러한 결과로부터 장관면역 활성화능은 macrophage 활성검색의 결과와 달리 메탄올 가용성분에 의해서도 활성화될 수 있는 것으로 유추된다. 그러나 핵산추출물(Fr. II)의 경우에는 장관면역의 활성검색에서도 세포독성이 심하였고 수율도 매우 낮아서 활성검색에 부적당하였다.

나. 파쇄한 각종 시료의 세포내 수용성 물질의 장관면역 활성화 검색

Table 3-2에서와 같이 수용성물질 중 가장 활성이 높은 시료는 등글래(줄기)의 열수추출물이었으며(18.9배) 그 다음이 다시마의 냉수추출물(18.3배)과 굴피의 냉수추출물순이었다(17.6배). 용매별 추출에 따른 장관면역 활성화에 대한 영향은 역시 냉수나 열수추출물이 메탄올추출물보다 높은 활성을 보이며 상당히 많은 시료들이 대조군에 비해 활성을 갖는 것으로 보아 역시 수용성 성분(고분자 다당이나 단백질등)들이 장관면역의 활성화에 관련된 것으로 사료된다.

Table 3-2. Intestinal immune system modulating activities of fractions obtained from plants of tea and rice paste sources

Korean name	Scientific name	Relative activity ¹⁾			
		Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
감잎	<i>Diospyros kaki</i>	0.74	0.77* ²⁾	0.81	0.93
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	6.56	-	10.68	0.86
검정콩	<i>Glycine max</i>	0.86	1.26*	0.65	0.89
결명자	<i>Cassia tora</i>	0.85	0.88*	11.60*	0.78**
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	1.08	-	1.12	0.81
구기자	<i>Lycium chinense</i>	0.91	0.66**	0.83	10.36
귤피	<i>Citrus unshiu</i>	17.56	-	0.81	0.71**
냉이	<i>Capsella bursa - Pastoris</i>	8.82	0.70*	13.88	0.94
녹차	<i>Cinamomum camphora</i>	0.76	0.67*	1.52	0.72
다시마	<i>Laminaria japonica</i>	18.32	-	1.15	13.23
단더섬(황기)	<i>Astragalus membranaceus</i>	0.71	-	1.27*	1.46
당귀	<i>Angelica gigas</i>	0.94	-	1.18	0.8
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inemis</i>	0.77	-	0.69**	0.77*
더덕	<i>Codonosis lanceolata</i>	0.75	1.17	0.74	0.9
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	0.52	-	0.54	1.23
두충(겉질)	<i>Eucommia ulmoides</i>	11.65	1.08	9.8	1.86
두충(잎)	<i>Eucommia ulmoides</i>	17.35	0.95	1.40*	0.70**
등글레(잎)	<i>Polygonatum japonicum</i>	1.16	-	0.70**	10.21
등글레(줄기)	<i>Polygonatum japonicum</i>	0.92*	-	10.78	18.85
들국화	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	0.93	-	1.06	0.97

Korean name	Scientific name	Relative activity			
		Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
모과	<i>Pseudocydonia sinensis</i>	0.51	0.72**	0.70**	0.58
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i>	0.54	0.77*	0.7	0.57
박하	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	1.13	0.73*	1.36	8.31
백년초	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. Saboten Makino	0.94	-	1.46	0.68**
보리	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	0.91	0.69**	0.89	0.94
비파잎	<i>Eriobotrya japonica</i>	0.54	0.71*	0.74*	0.58
뽕잎	<i>Morus alba</i>	1.21	0.72*	2.68	10.72
산딸기	<i>Rubus coreanus</i>	0.73	0.71*	9.9	1.05
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	0.77	-	1.47*	10.39
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	0.54	0.71*	9.68	1.08
창출	<i>Atractylodes japonica</i>	0.53	0.70*	0.76	0.76
생강	<i>Zingiber officinale</i>	0.8	-	0.89	0.7
석류	<i>Punica granatum</i>	7.87	0.76*	9.71	0.71**
솔잎	<i>Pinus densiflora</i>	0.96	0.71**	13.86	0.74**
쌍화	-	0.98	0.71*	0.70*	0.73**
쑥	<i>Artemisia asiatica</i>	0.81	0.73*	1.37	0.74**
연	<i>Nelumbo nucifera</i>	0.85*	-	1.35	0.76
오갈피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	8.9	0.87	11.37	1.25
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	0.81	0.65**	0.87	0.91
옥수수	<i>Zea mays</i>	0.75	-	0.63	0.75
우리밀	<i>Triticum aestivum</i>	1.32	0.69**	0.84	0.77

Korean name	Scientific name	Relative activity			
		Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
유자	<i>Citrus junos</i>	0.8	0.67*	0.93	0.82
울무	<i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	7.16	-	15.14	0.81
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i>	0.81	-	0.6	0.68
은행	<i>Ginkgo biloba</i>	1.07	-	0.66**	0.84*
인삼	<i>Panax ginseng</i>	1.23*	-	1.90**	1.41*
잇꽃(홍화)	<i>Carthamus tinctorius</i>	0.79	0.72*	0.91	1.12
잔대	<i>Adenophora tryphilla</i> var. <i>japonica</i>	15.77	0.64*	6.98	0.63
질경이	<i>Plantago asiatica</i>	0.85	0.70**	0.91	0.8
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	8.88	0.72*	1.74	15.13
치커리	<i>Cichorium intybus</i> L.	1.23*	-	0.92	10.73
쑥	<i>Pueraria thunbergiana</i>	9.32	-	0.96	5.67
탱자	<i>Poncirus trifoliata</i>	11.16	-	13.5	0.68
하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	1.23	0.87	1.61*	0.91
해당화	<i>Rosa rugosa</i>	1.25	-	0.92	9.84
해바라기	<i>Helianthus annus</i>	1.01	-	9.15	0.99
현미	<i>Oryzae sativa</i>	1.29**	-	1.87**	0.83**
호도	<i>Juglans sinensis</i>	0.97	0.70*	0.67**	1.04
호박	<i>Cucurbita moschata</i>	2.37	0.67*	1.21	1.62
가시연밥(검실)	<i>Euryale ferox</i>	1.06	-	0.77	0.82**
고구마	<i>Ipomoea batatas</i> L.	0.99	-	1.95**	0.71**
곶감	<i>Diospyros kaki</i>	1.32**	-	0.71**	0.75**

Korean name	Scientific name	Relative activity			
		Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
금앵자	<i>Rosa laevigata</i> Michx.	0.81	-	0.83	4.23
당근	<i>Daucus carota</i>	1.05*	-	0.70*	1.02
동과	<i>Benincasa cerifera</i> Savi	0.86	-	1.93	0.84
땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	1.03*	0.76**	0.65**	0.85*
마늘	<i>Allium sativum</i> for. <i>Pekinense</i>	1.11	-	0.68**	0.78**
목단피	<i>Moutan radidis</i>	1.03	0.70*	1.42	0.77*
미나리	<i>Oenanthe siolonifera</i>	1.59**	-	0.68*	0.77*
방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	0.83	-	0.86	9.43
백복령	<i>Poria cocos</i> Wolf.	0.8	-	0.64**	1.26
부추	<i>Allium tuberosum</i>	1.06	0.82*	0.67**	0.74**
살구	<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	1.09	0.69*	0.74*	0.71**
시금치	<i>Spinacia oleracea</i> L.	1.04	1.23*	0.70**	0.73**
연근	<i>Nelumbo nucifera</i>	0.94*	-	1.23	0.72**
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	1.1	-	1.03	0.72**
의이인	<i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. <i>frumentacea</i> Makino	0.79	-	0.74	0.83*
잣	<i>Pinus koraiensis</i>	1	-	0.64*	0.70**
죽즙(대나무)	<i>Sasamorpha purpurascens</i> Nakai var. <i>borealis</i> Nakai	1.02	0.69*	0.72**	0.77**
차조기	<i>Perilla sikokiana</i>	1.22	0.83*	0.65**	0.73**
참깨	<i>Sesamum indicum</i>	1	0.68**	1.31*	1.19
녹두	<i>Dioscorea japonica</i>	1.38*	-	2.00**	1.35
토란	<i>Lecocasia esculenta</i> Schott.	7.73	-	1.41*	0.87

Korean name	Scientific name	Relative activity			
		Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
토사자	<i>Cuscuta japonica</i>	1	0.74*	0.64**	0.73**
팥	<i>Phaseolus angularis</i>	1.2	-	1.22	0.78**
하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	0.94	0.73* *	1.27	0.73*
호박	<i>Cucurbita moschata</i>	0.85	-	0.9	0.76**
황정	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	1.33**	-	0.69**	0.72**
흰파	<i>Allium fistulosum</i>	1.06	-	1.03*	0.84**

1) Relative activity = fluorescence intensity of sample / fluorescence intensity of saline

2) * p<0.05, **p<0.01 (vs control)

Fr. I: Cold water extract

Fr. II: Hexane extract

Fr. III: Methanol extract

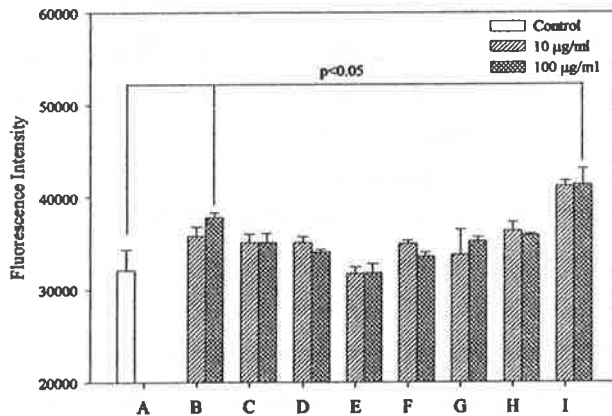
Fr. IV: Hot water extract

다. 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 장관면역 활성 검색

메탄올추출물의 경우 macrophage 활성검색과는 달리 높은 활성을 갖는 시료가 상당수 검색되었는데 감초, 결명자, 냉이, 등글레, 솔잎, 오갈피, 울무 및 탕자가 높은 활성을 나타내었으며 그 중에서도 울무가 가장 높았고(15.1 배), 솔잎과 냉이가 그 다음으로 높았다(13.9배). 그러나 핵산추출물이 세포에 독성현상을 나타내는 것으로 보아 유기용매에 의해서 추출되는 저분자류(Fr. II와 III)가 냉수나 열수추출물의 고분자류보다는 활성에 상대적으로 영향을 미치지 않는 것으로 추측된다.

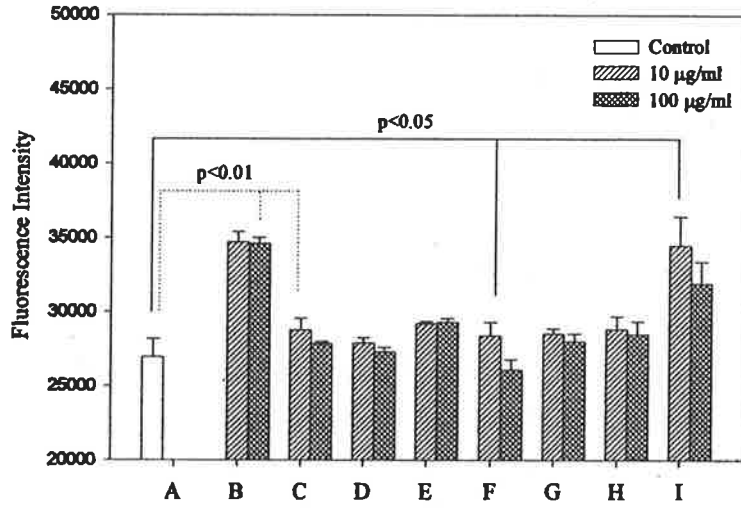
라. 장관면역 활성 시료의 선정

전통 차 및 죽류용 식물시료의 1차 활성검색시 각각의 용매추출 분획에서 높은 활성을 보인 시료들을 대상으로 용매별 희분에 대해 농도별로 2차 활성 검색을 실시한 결과, Fig. 3-3, Fig. 3-4와 Fig. 3-5에 나타난 것처럼 냉수 추출(Fr. I)에서는 탱자와 굴피가 가장 높았고, 열수추출(Fr. IV)에서는 치자와 구기자가 그리고 메탄올추출(Fr. III)에서는 솔잎이 가장 높은 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다. 위의 시료들을 대상으로 최종 활성검색을 실시한 결과 (Fig. 3-6), 굴피와 탱자의 냉수 및 열수추출물이 활성을 보였으나 폐자원 이용의 측면과 예전부터 굴피가 민간요법에서 이용되어 왔던 점등을 고려해 굴피를 활성시료로 선정하였으며 냉수와 열수추출의 활성의 차이가 보이지 않았으므로 냉수추출로 추출조건을 선정하였다. 또한 굴피 중에서도 건조유무에 따라 활성에 영향을 주지 않을까 우려하여 굴피의 건조유무에 따라 활성과 수율을 비교한 결과 Fig. 3-6과 Table 3-3에서 보이는 것처럼 건조굴피가 유의적으로 비건조굴피보다 높은 활성을 가지고 있었으며 수율면에서도 약 20%정도 건조굴피가 높았다. 이러한 장관면역 활성시료 검색의 결과에 따라서 수용계 희분 중에서 가장 높은 활성을 보인 건조굴피를 장관면역 활성검색에 있어서의 시료로 선정하였다.



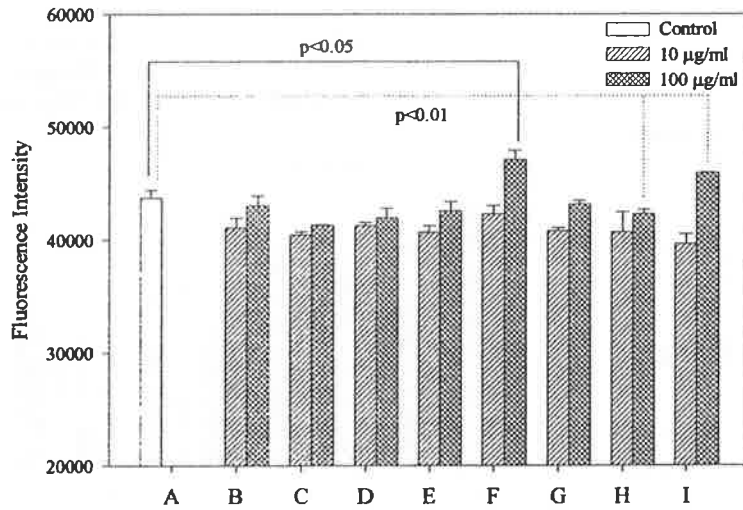
- A, 대조구 B, 굴피 C, 등글래 D, 다시마
 E, 두충(줄기) F, 잔대 G, 취 H, 두충(잎)
 I, 탱자

Fig. 3-3. Intestinal immune system modulating activities of cold water extracts obtained from plants of tea and rice paste sources.



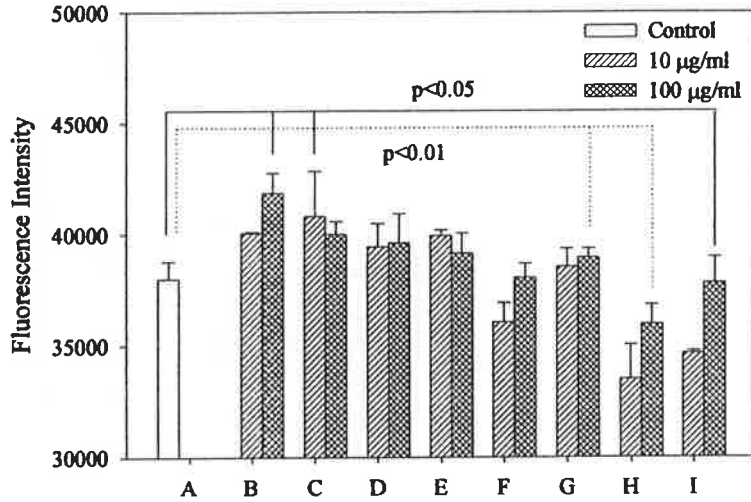
- A, 대조구
- B, *Lycium chinense* : 구기자
- C, *Laminaria japonica* : 다시마
- D, *Polygonatum japonicum* : 등골레 (잎)
- E, *Polygonatum japonicum* : 등골레 (줄기)
- F, *Morus alba* : 뽕잎
- G, *Cichorium intybus* L. : 치커리
- H, *Cornus officinalis* : 산수유
- I, *Gardenia jasminoides* : 치자

Fig. 3-4. Intestinal immune system modulating activities of hot water extracts obtained from plants of tea and rice paste sources.



- A, Control
- B, *Glycyrrhizia glabra* L. : 감초
- C, *Cassia tora* : 결명자
- D, *Capsella bursa-Pastoris* : 냉이
- E, *Polygonatum japonicum* : 동글레 (줄기)
- F, *Pinus densiflora* : 솔잎
- G, *Acanthapanax sessiliflorum* : 오갈피
- H, *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* : 울무
- I, *Poncirus trifoliata* : 탕자

Fig. 3-5. Intestinal immune system modulating activities of methanol extracts obtained from plants of tea and rice paste sources.



- A, Control
- B, Dried *Citrus unshiu* (건조귤피 - 열수)
- C, Dried *Citrus unshiu* (건조귤피 - 냉수)
- D, *Poncirus trifoliata* (탱자 - 열수)
- E, *Poncirus trifoliata* (탱자 - 냉수)
- F, Non-dried *Citrus unshiu* (귤피 - 열수)
- G, Non-dried *Citrus unshiu* (귤피 - 냉수)
- H, *Pinus densiflora* (솔잎 - 열수)
- I, *Pinus densiflora* (솔잎 - 냉수)

Fig. 3-6. Intestinal immune system modulating activities of cold and hot water extracts obtained from dried or non-dried *Citrus unshiu* (귤피), *Poncirus trifoliata* (탱자) and *Pinus densiflora* (솔잎).

Table 3-3. Yields of cold and hot water extracts obtained from dried or non-dried *Citrus unshiu*, *Poncirus trifoliata*, and *Pinus densiflora*

Fraction	Yields (%)
Dried <i>Citrus unshiu</i> ¹⁾ IV ²⁾	30.7
Dried <i>Citrus unshiu</i> I ³⁾	30.1
Non-dried <i>Citrus unshiu</i> IV	14.9
Non-dried <i>Citrus unshiu</i> I	10.9
<i>Pinus densiflora</i> ⁴⁾ IV	13.0
<i>Pinus densiflora</i> I	21.5
<i>Poncirus trifoliata</i> ⁵⁾ IV	17.0
<i>Poncirus trifoliata</i> I	25.0

- 1) *Citrus unshiu* : 귤피
- 2) IV : hot water extracts
- 3) I : cold water extracts
- 4) *Pinus densiflora* : 솔잎
- 5) *Poncirus trifoliata* : 탕자

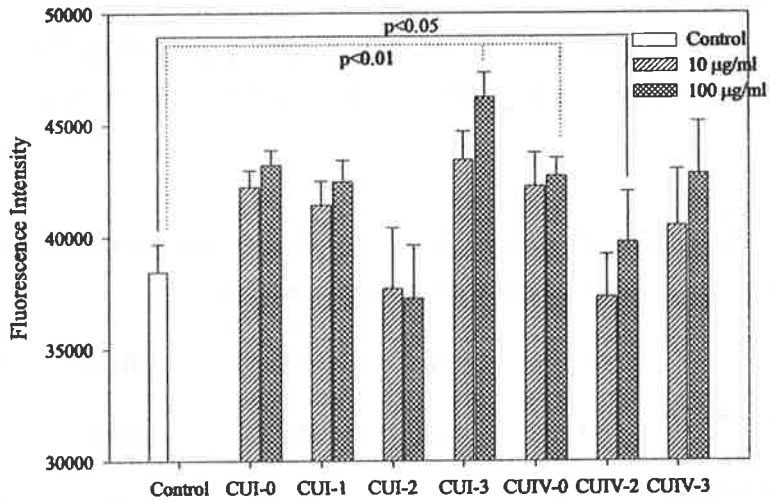
제 2 항 최대활성 시료의 선정 및 실험실적 추출조건의 최적화

장관면역 활성촉진의 시료로 선정된 귤피를 Fig. 3-2에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 냉수추출과 열수추출의 활성과 수율을 재비교하고자 두가지 추출을 모두 실행하였으며 열수추출시에는 환류추출법이 아닌 decoction을 통해 열수추출물을 조제하였다. 즉, 귤피를 냉수로부터 추출, 상등액과 잔사를 분리 후 상등액은 동결건조하여 냉수 추출물(CUI-0)을 얻었다 (Table 3-4, 수율 28.3%). 이 CUI-0를 메탄올로 5회 환류하여 메탄올 가용부 (CUI-1, 수율 19%.1)를 분리한 뒤 잔사는 재용해하고 4배의 에탄올을 가하여 에탄올침전을 행하였다. 12시간 후 원심분리를 통해 에탄올 가용부(CUI-2,

수율 1.0%)와 침전을 분리하고 침전은 재용해후에 투석, 농축 및 동결건조 과정을 거쳐 냉수추출의 고분자조획분 CUI-3을 얻었다(수율 2.9%). 한편, 열수추출분획은 냉수추출시 분리된 잔사를 가지고 조제하는데 먼저 증류수로 2회 decoction하고 상등액을 농축, 동결건조함으로써 CUIV-0(수율 5.0%)를 조제하였다. 이후 증류수에 재용해한 후 4배의 에탄올을 가하여 에탄올침전을 행하였다. 12시간 후 원심분리를 통해 에탄올 가용부(CUIV-2, 수율 1.0%)와 침전을 분리하고 침전은 재용해후에 투석, 농축 및 동결건조 과정을 거쳐 고분자조획분 CUIV-3을 얻었다(수율 3.4%). 위의 7개의 획분에 대한 장관면역 활성을 검토한 결과 Fig. 3-7과 같이 냉수추출 획분(CUI-0, CUI-3)과 열수추출 획분(CUIV-0, CUIV-3)을 비교시 활성이나 수율이 거의 유사하였으며 냉수추출물의 에탄올침전을 통한 고분자 조획분(CUI-3)이 가장 높은 활성을 가지고 있었다. 한편 CUI-1은 19% 정도의 높은 수율을 가지고 있으면서 활성도 열수추출획분과 유사하였다. 따라서 이러한 결과로부터 귤피를 냉수추출 후 에탄올침전을 거쳐 활성이 가장 높았던 고분자 조획분을 조제하는 추출조건을 최적조건으로 확립하고 대량추출을 실시하였다.

Table 3-4. Yields of subfractions obtained from *Citrus unshiu*

Plant	Subfraction	Yields (%)
<i>Citrus unshiu</i> (귤피)	CUI-0	28.3
	CUI-1	19.1
	CUI-2	1.0
	CUI-3	2.9
	CUIV-0	5.0
	CUIV-2	1.0
	CUIV-3	3.4
	Total	60.7



- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| CUI-0, Cold water extracts | CUIV-0, Hot water extracts |
| CUI-1, MeOH solubles | CUIV-2, EtOH solubles |
| CUI-2, EtOH solubles | CUIV-3, Crude fraction from |
| CUI-3, Crude fraction from | hot water extracts |
| cold water extracts | |

Fig. 3-7. Intestinal immune system modulating activities of fractions obtained from *Citrus unshiu*.

제 3 항. 장관면역 활성물질의 본체 분석

위의 용매추출조건에 의해 조제된 획분들에 대한 함량 및 조성을 분석하기 위해 전당, 산성당 및 단백질 함량을 분석한 결과(Table 3-5), CUI-3, CUIV-0와 CUIV-3의 경우에는 모두, 전당과 산성당이 주성분이고 단백질은 10% 내외의 함량을 보였다. 그 중 활성이 가장 높았던 CUI-3은 전당과 산성당이 거의 동일한 비율(45.6% : 40.7%)로 함유되어져 있었다. 한편, CUI-1의 경우에는 전체적으로 전당과 단백질의 함량도 적었으며 산성당은 확인되지 않은점으로 미루어 역시 폴리페놀류등의 저분자가 주 성분일 가능성을 시사하였다.

또한 고분자 조획분에 대한 구성당(중성당)의 분석결과(Table 3-6)는 CUI-3 이나 CUIV-3 모두 arabinose, galactose 및 glucose가 주요 구성당이었으며 rhamnose, 2-Me-fucose 및 2-Me-xylose도 구성당을 형성하고 있는 것으로 보인다. 이러한 구성당의 분석과 산성당의 함량이 높았던 결과로부터 CUI-3과 CUIV-3가 pectin을 상당량 포함하고 있을 가능성을 시사하고 있다.

Table 3-5. Chemical compositions of subfractions extracted with cold, hot water or organic solvent from *Citrus unshiu*

	CUI-0	CUI-1	CUI-3	CUIV-0	CUIV-3
Total sugar (%)	27.58	23.7	45.62	52.06	40.85
Uronic acid (%)	4.7	-	40.72	34.56	31.66
Protein (%)	17.85	16.9	9.43	13.18	11.77

Table 3-6. Sugar components of CUI-3 and CUIV-3 obtained from *Citrus unshiu*

Sugars	CUI-3 (mol. %)	CUIV-3 (mol. %)
2-Me-Fucose	0.7	0.5
Rhamnose	8.7	9.6
Fucose	2.8	1.9
2-Me-Xylose	0.3	0.3
Arabinose	46.4	55.2
Xylose	3.3	1.9
Apiose	1.0	0.9
Mannose	3.0	3.8
Galactose	20.7	12.4
Glucose	13.1	13.4
Total	100	100

제 4 항 장관면역 활성화 다당의 정제

가. Ion-exchange chromatography에 의한 분획

장관면역 최고 활성획분인 CUI-3을 DEAE-Sepharose FF(Cl⁻ form)를 이용한 음이온 교환크로마토그래피를 염농도를 단계별로 높이면서 실시하여 Fig. 3-8와 같이 분획물을 제조하였다. 이들에 대해 수율을 조사한 결과 (Table 3-7), 0.2M NaCl 용출획분(CUI-3IIb)이 48.3%로 가장 수율이 높았으며 그 다음으로 0.1M NaCl 용출획분(CUI-3IIa)가 9.3%이었으며 0.4M NaCl 용출획분부터는 거의 분획물이 검출되지 않았다. 한편 이 분획물들에 대한 활성을 검토한 결과 CUI-3IIb에서 가장 높은 활성을 나타내었고 이외의 획분들에서는 활성이 높지 않았다(Fig. 3-9).

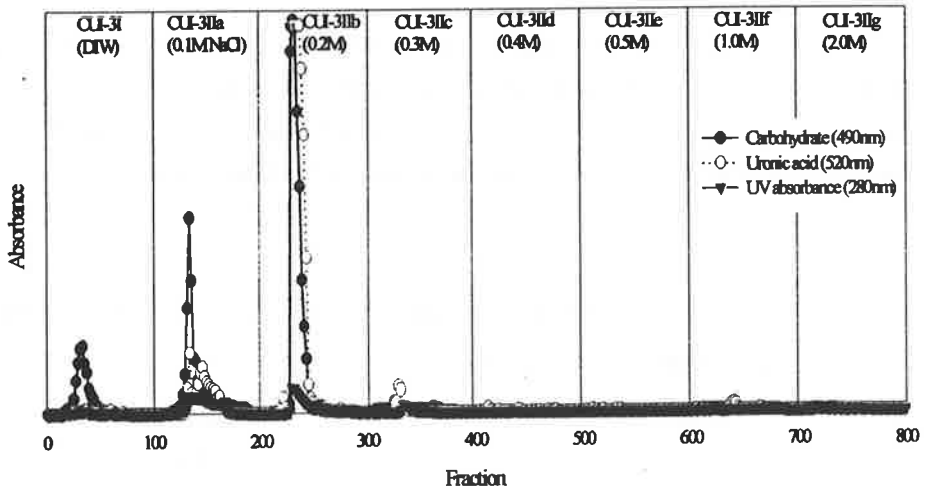


Fig. 3-8. Elution pattern of CUI-3 on DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form) column chromatography.

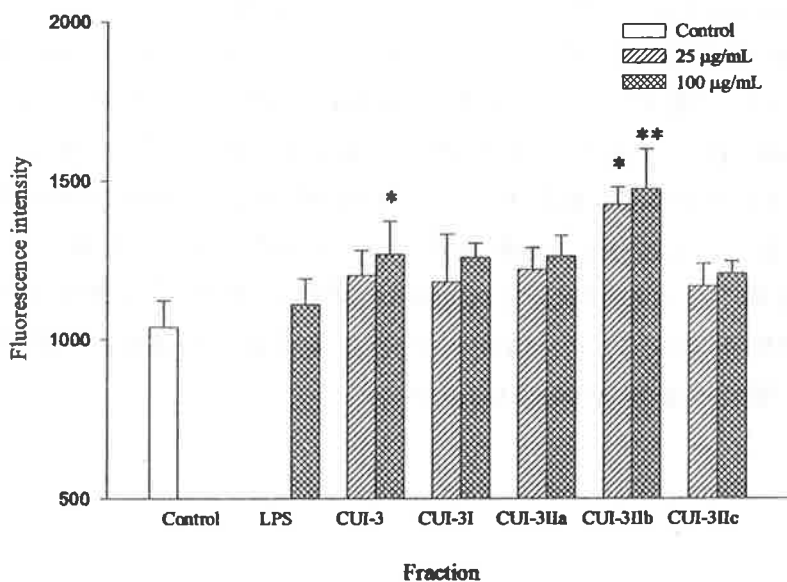


Fig. 3-9. Intestinal immune modulating activity of subfractions obtained from ion exchange chromatography on DEAE Sepharose FF (Cl⁻ form). Control : saline, LPS : Lipopolysaccharide from *E. coli*. *p<0.05 ; **p<0.01 :significance between control and sample.

Table 3-7. Yields of subfractions obtained from CUI-3 onDEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form) column chromatography

Fraction	Yields (%)
CUI-3 I	4.0
CUI-3IIa	9.3
CUI-3IIb	48.3
CUI-3IIc	1.8
CUI-3IId	-
CUI-3IIe	-
CUI-3II f	0.1
CUI-3IIg	-
total	63.5

나. Sepharose CL-6B에 의한 Gel permeation chromatography (GPC)에 의한 분획

DEAE Sepharose FF(Cl⁻ form, 4.0×30 cm)를 이용한 음이온교환크로마토그래피로 분리한 최대활성획분인 0.2M NaCl 용출 획분인 CUI-3IIb에 대해 Sepharose CL-6B를 이용하여 gel filtration chromatography를 행하여 3개의 획분(CUI-3IIb-1, CUI-3IIb-2, CUI-3IIb-3)을 얻었다(Fig. 3-10). 이들 획분에 대하여 장관면역 활성을 비교한 결과, CUI-3IIb-2, CUI-3IIb-3가 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3-11). 이들 활성획분은 각각 당 65.9%와 69.3%, 산성당 27.1%와 50.3%, 단백질 16.1%와 18.6%로 구성된 다당류가 주 구성물질인 획분들로, CUI-3IIb-2는 중성당으로는 arabinose(29.5%), xylose(13.3%)와 galactose(11.2%)를 포함하였고, glucuronic acid(20.4%)와 galacturonic acid(8.0%)의 산성당으로 구성된 반면, CUI-3IIb-3은 arabinose, galactose, rhamnose(각각 20.8%, 14.1%와 7.1%)와 galacturonic acid(31.1%)와 glucuronic acid(16.5%)로 구성되어 있다(Table 3-8). 이러한 결과로 미루어 CUI-3IIb-2는 중성당이 주구성물질인데 반해 CUI-3IIb-3은 산성당이 주구성분인 것으로 추정된다.

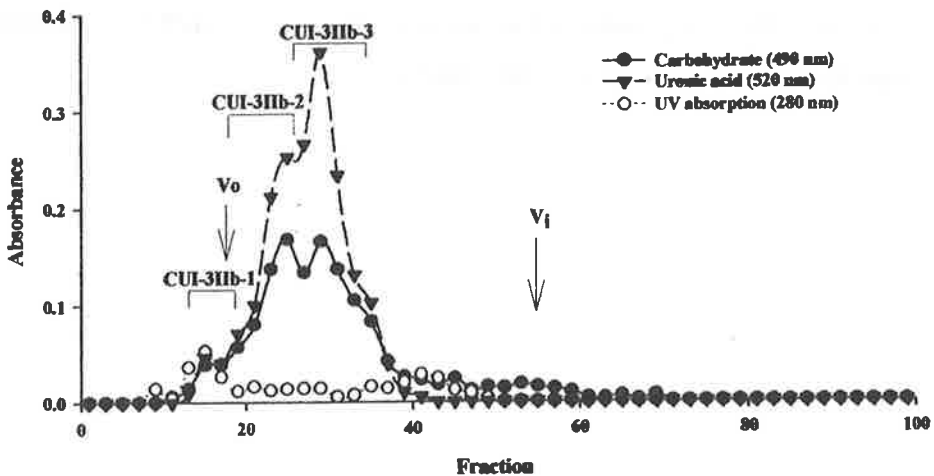


Fig. 3-10. Gel filtration pattern of CUI-3IIb on Sepharose CL-6B. The column of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl at flow rate of 0.2 ml/min and the fraction size was 3 ml/tube.

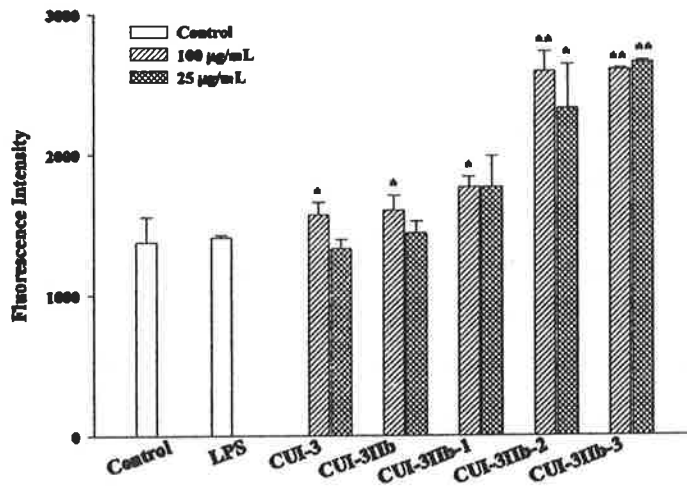


Fig. 3-11. Intestinal immune modulating activity of subfractions obtained from gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B. Control : saline, LPS : Lipopolysaccharide from *E. coli*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: significance between control and sample.

Table 3-8. Physicochemical properties of subfractions obtained from CUI-3IIb on Sepharose CL-6B column chromatography

	CUI-3IIb-1	CUI-3IIb-2	CUI-3IIb-3
Yield (%)	2.4	17.4	24.7
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	24.7	65.9	69.3
Uronic acid ^{b)}	19.9	27.1	50.3
Protein ^{c)}	12.3	16.1	18.6
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	9.6	5.3	7.1
Fuc	trace ^{e)}	2.4	trace
Ara	42.1	29.5	20.8
Xyl	4.2	13.3	4.8
Man	8.2	3.0	1.6
Gal	10.5	11.2	14.1
Glc	6.2	6.9	4.0
GalA	12.4	8.0	31.1
GlcA	6.7	20.4	16.5

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : *m*-hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

^{e)}Detected less than 0.1 mol. %.

다. Sephacryl S-200에 의한 Gel permeation chromatography
(GPC)에 의한 분획과 정제 다당의 순도 확인

Sephacryl S-200을 통하여 얻은 활성획분인 CUI-3IIb-2, 3IIb-3 중에서 저농도에서 높은 활성과 수율을 나타낸 CUI-3IIb-3에 대하여 Sephacryl S-200 column chromatography를 시행하여 또 다른 3개의 획분(CUI-3IIb-3-1, CUI-3IIb-3-2, CUI-3IIb-3-3)을 얻었으며(Fig. 3-12), 이들 획분에 대하여 장관면역 활성을 비교하였다(Fig. 3-13). 그 결과, CUI-3IIb-3-2에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 이는 직접적인 bone marrow cell로의 영향에 의한 것이 아닌, Peyer's patch를 통한 bone marrow cell의 증식임이 판명되었다(Fig. 3-14). 또한 CUI-3IIb-3-2는 CUI-3IIb-3에 비해 산성당 함량이 높게 나타나 총당 70.1%와 산성당 60.6%로 이루어져 있고, 단백질 함량은 매우 낮았으며 (3.2%), 주구성당으로는 산성당으로 galacturonic acid(24.4%)와 glucuronic acid(15.4%)를 중성당으로는 arabinose(23.0%), rhamnose(13.4%) 등이 포함되어 있다 (Table 3-9). 장관면역 활성획분인 CUI-3IIb-3-2에 대하여 Shodex OHpak KB-805 column을 이용하여 HPLC로 분자량과 순도를 검정한 결과, CUI-3IIb-3-2는 18 kDa의 분자량을 가진 단일물질임이 판명되었다(Fig. 3-15). 최종적으로 굴피의 냉수추출물에서 조제된 조다당 획분으로부터 다양한 column chromatography를 이용하여 장관면역 활성을 가진 CUI-3IIb-3-2를 분리, 정제하였는데 이 획분은 Table 3-10에서 보이는 것처럼 정제가 진행되면서 galacturonic acid와 glucuronic acid 등의 산성당과 arabinose, galactose 및 rhamnose가 주구성당을 이루고 있는 다당류의 획분임을 확실히 보여주고 있다.

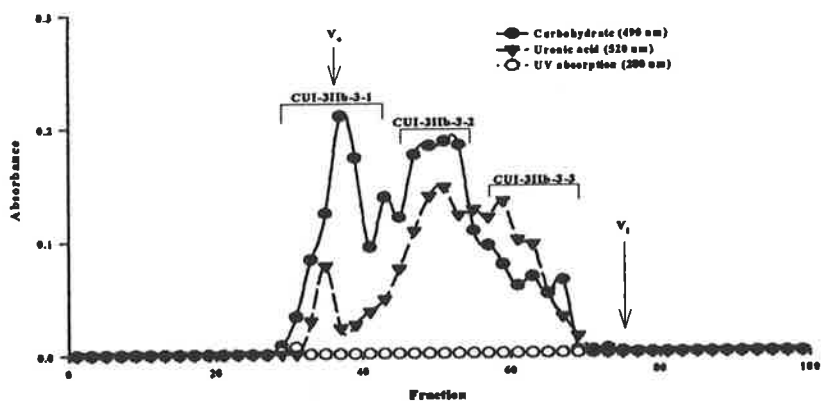


Fig. 3-12. Gel filtration pattern of CUI-3IIb-3 on Sephacryl S-200. The column of Sephacryl S-200 was eluted with 0.2M NaCl at flow rate of 0.2 ml/min and the fraction size was 3 ml/tube.

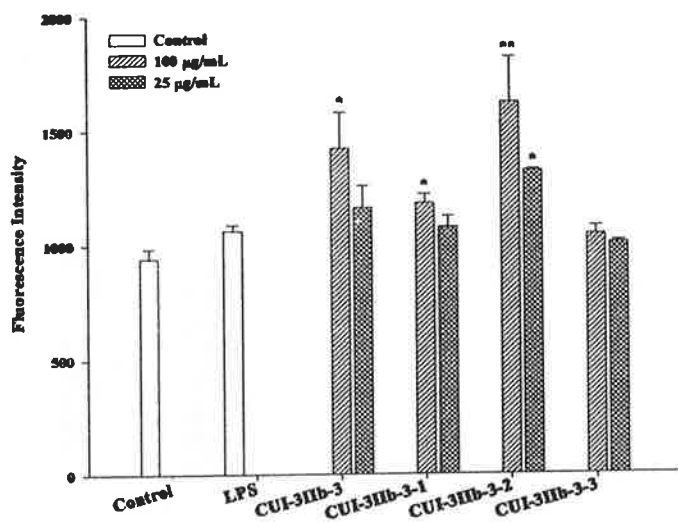
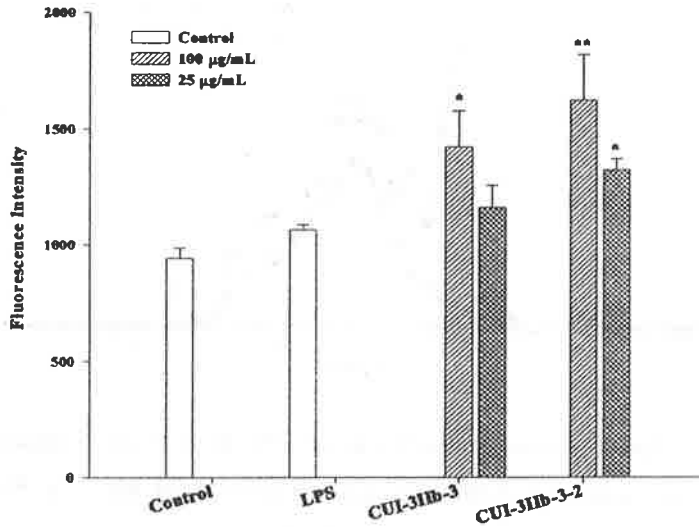


Fig. 3-13. Intestinal immune modulating activity of subfractions obtained from gel filtration chromatography on Sephacryl S-200. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significance between control and sample.

A) Intestinal immune modulating activity



B) Direct effect on bone marrow cell proliferation

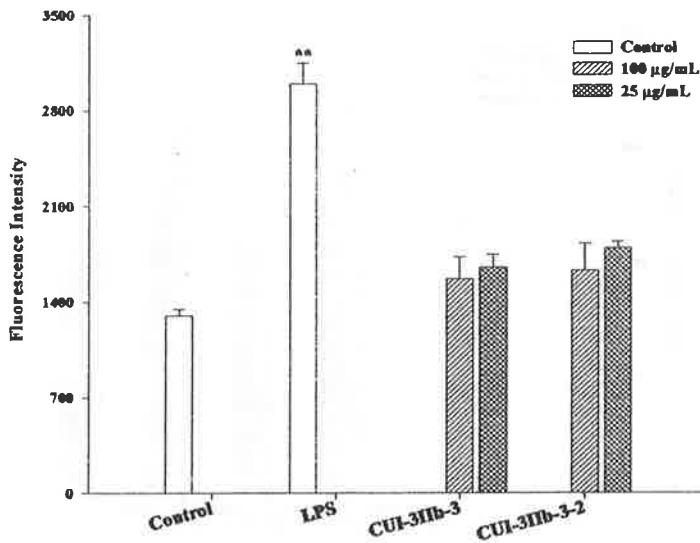


Fig. 3-14. Comparison of intestinal immune modulating activity of CUI-3Ib-3 and CUI-3Ib-3-2 with its direct effect on bone marrow cell proliferation. Control: saline, LPS: Lipopolysaccharide, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significance between control and sample.

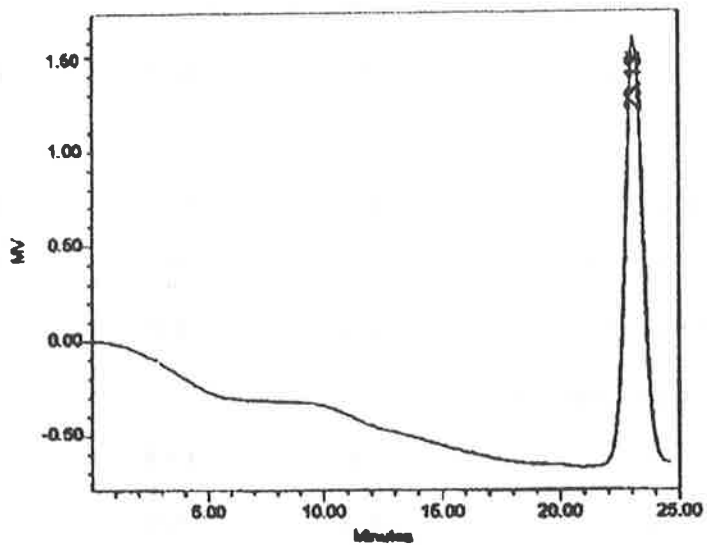


Fig. 3-15. HPLC profile of the purified CUI-3IIb-3-2

Table 3-9. Physicochemical properties of subfractions obtained from CUI-3IIb on Sephacyl S-200 column chromatography

	CUI-3IIb-3-1	CUI-3IIb-3-2	CUI-3IIb-3-3
Yield (%)	12.0	36.0	11.1
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	32.0	70.1	68.3
Uronic acid ^{b)}	42.0	60.6	58.8
Protein ^{c)}	5.6	3.2	1.2
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	7.6	13.4	3.5
Fuc	1.3	4.5	0.2
Ara	22.5	23.0	12.6
Xyl	1.7	1.8	5.9
Man	4.9	4.8	9.0
Gal	10.3	8.4	3.7
Glc	3.4	4.3	14.1
GalA	28.0	24.4	20.4
GlcA	20.3	15.4	30.6

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : α -hydroxylbiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

Table 3-10. Physicochemical properties of each subfraction during the purification step obtained from CUI-3

	CUI-3IIb	CUI-3IIb-3	CUI-3IIb-3-2
Yield (%)	35.3	24.7	36.0
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	60.7	69.3	70.1
Uronic acid ^{b)}	30.0	50.3	60.6
Protein ^{c)}	14.3	18.6	3.2
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	3.6	7.1	13.4
Fuc	0.4	trace	4.5
Ara	24.3	20.8	23.0
Xyl	11.2	4.8	1.8
Man	8.0	1.6	4.8
Gal	6.1	14.1	8.4
Glc	2.2	4.0	4.3
GalA	24.6	31.1	24.4
GlcA	19.6	16.5	15.4

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : *m*-hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

제 5 항 굴피 함유 장관면역 활성화 물질의 구조분석 및 수식

가. 정제된 장관면역 활성화 물질의 결합양식을 통한 부분적 구조분석

정제된 활성획분인 CUI-3IIb-3-2의 일반 성분분석과 구성당 분석결과는 CUI-3IIb-3-2가 70%의 당과 60%의 산성당을 함유하고 있으며 galacturonic acid, glucuronic acid 및 arabinose, galactose와 rhamnose가 주구성당을 형성하고 있는 획분임을 보여주었다. 이러한 활성획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 CUI-3IIb-3-2를 메틸화하고 2 M TFA로 가수분해한 후, 부분 메틸화 alditol acetate로 전환시켜 GC와 GC-MS로 이를 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. 결합양식의 분석 결과, CUI-3IIb-3-2는 주로 4 또는 5-결합-arabinose, 말단-결합-galactose와 6-결합-glucose 및 4-결합-galacturonic acid를 포함하고 있었다(Table 3-11). 이러한 주구성당의 결합양식의 결과는 CUI-3IIb-3-2의 획분은 arabinogalactan과 galacturonic acid가 주쇄를 형성하고 있는 펙틴류의 다당류가 결합되어 있는 구조를 갖고 있으며 이들이 장관면역 활성화에 중요하게 관여하는 것으로 추정된다.

굴피의 냉수추출물에서 조제된 조다당획분인 CUI-3에서 활성의 본체를 확인하기 위하여 periodate 산화와 pronase 분해처리를 하여 활성을 비교한 결과(Fig. 3-16), periodate 산화물에서 활성이 현저히 감소되는 것으로 미루어 다당류가 장관면역 활성화에 관여되어 있음을 시사하고 있었다.

활성획분의 전체구조 중 활성화에 주요하게 관여하는 본체의 구조를 검토하기 위하여 CUI-3IIb-3-2을 endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-30의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과, 효소에 분해되지 않은 column의 void 부근에서 용출되는 저항 획분인 CUI-3IIb-3-2/PG1과 intermediate volume에서 얻어지는 CUI-3IIb-3-2/PG2 및 inner volume에서 얻은 효소에 분해된 획분(CUI-3IIb-3-2/PG3)으로 나눌 수 있었다 (Fig. 3-17).

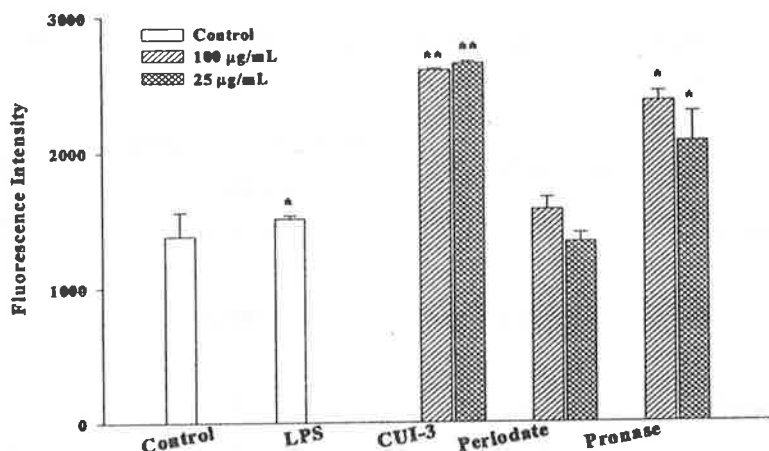


Fig. 3-16. Effect of periodate and pronase treatments of CUI-3 on intestinal immune modulating activity. Control; saline, LPS: Lipopolysaccharide. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significance between control and sample.

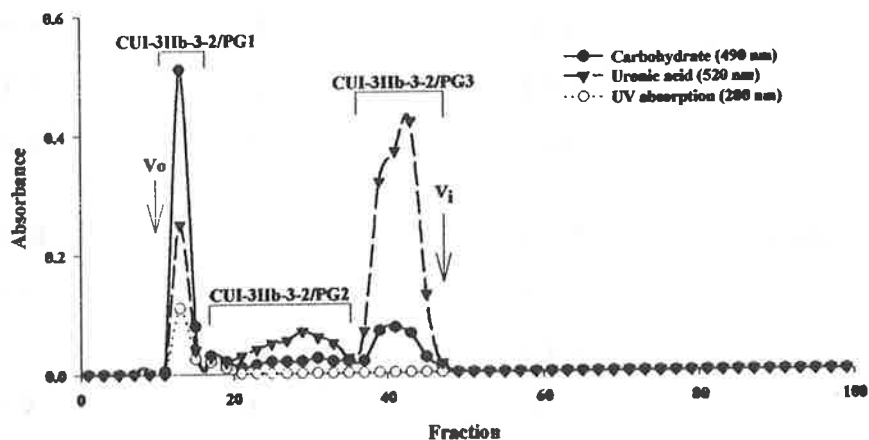


Fig. 3-17. Gel filtration pattern of digested product of CUI-3IIb-3-2 with endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase on Bio-gel P-30. The column of Bio-gel P-30 was eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2) at flow rate of 0.2 ml/min and the fraction size was 3 ml/tube.

Table 3-11. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CUI-3IIb-3-2

Glycosyl residue	Position of -CH ₃	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	2,3	4 or 5	10.42
Xylose	2,3,4	terminal	1.65
Rhamnose	2,3	4	2.38
	2,4	3	2.05
Fucose	2,4	3	1.57
Mannose	2,3,6	4	0.69
	3,4,6	2	3.02
Galactose	2,3,4,6	terminal	18.56
	3,4	2	4.75
	2,4,6	3	4.12
	3,6	2,4	2.27
Glucose	2,3,4	6	16.16
	2,3,6	4	1.6
	3,4,6	2	1.12
	3,4	2,6	0.9
GalA	2,3	4	22.29
	2	3,4	5.36
GlcA	3,4	2	1.09

나. 장관면역 활성화 물질의 구조해석 및 수식

예비 구조수식에서 장관면역 활성화획분 CUI-3IIb-3-2을 $\text{endo-}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{4)-polygalacturonase}$ 로 처리하여 소화시킨 후 분해물을 Bio-gel P-30의 gel filtration chromatography을 이용하여 분리한 결과 얻은 세 개의 획분, CUI-3IIb-3-2/PG1과 CUI-3IIb-3-2/PG2 및 CUI-3IIb-3-2/PG3으로 나눌 수 있었다. 이 세 개의 획분의 구성요소를 알아보기 위해서 physicochemical properties를 측정하였다(Table 3-17). 세 개의 획분이 모두 공통적으로 분리되기 전의 획분인 CUI-3IIb-3-2와 비슷하게 높은 산성당을 함유하고 있으며 그에 따라 galacturonic acid, glucuronic acid 및 rhamnose, arabinose, galactose가 주구성당을 형성하고 있음을 보여주었다. 세 번째 획분인 CUI-3IIb-3-2/PG3는 특히 galacturonic acid, glucuronic acid의 함량이 높았다. 이 세 획분의 구조를 분석하기 위하여 Hakomori 방법에 의해 세 획분 각각을 메틸화하고 2 M TFA 가수분해한 후, 메틸 alditol acetate로 전환시켰다. 그 이후로 GC와 GC-MS로 분석하여 주구성당들의 결합양식을 살펴보았다. CUI-3IIb-3-2/PG1의 경우와 CUI-3IIb-3-2/PG3의 경우는 4-결합-galacturonic acid를 주로 포함하였고 5-결합-arabinose, 6-결합-glucose를 포함하고 있었다(Table 3-13, -15). 그리고 CUI-3IIb-3-2/PG2의 경우는 말단-결합-galactose와 2,4-결합-galactose을 주로 포함하고 있었다(Table 3-14). 이러한 결과로 삼아 이 두 획분의 경우는 arabinogalactan과 galacturonic acid가 주쇄를 형성하고 있는 pectin류의 다당류가 결합되어있는 구조를 갖고 있으며 이 구조가 장관면역 활성화에 중요하게 관여하는 것으로 해석되어진다. 마지막으로, 나뉘어진 세 획분에 관한 intestinal immune modulating 활성화 test 결과 CUI-3IIb-3-2/PG1과 CUI-3IIb-3-2/PG3획분의 경우는 fluorescence intensity 2000에 가까운 매우 높은 활성을 나타내었다. 하지만 CUI-3IIb-3-2/PG2 획분의 경우 fluorescence intensity 1500 정도의 활성을 나타냈다(Fig. 3-18).

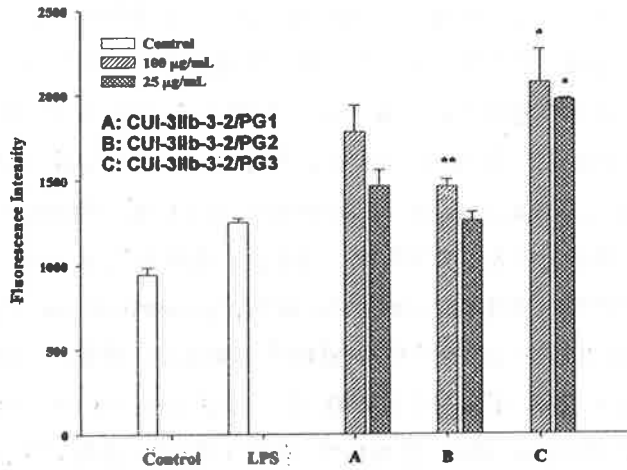


Fig. 3-18. Intestinal immune modulating activities of subfractions obtained from CUI-3IIb-3-2 with endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase on Bio-gel P-30 column chromatography. * p <0.05, ** p <0.01 ; significance between control and sample.

Table 3-12. Physicochemical properties of subfractions obtained from CUI-3IIb-3-2 with endo- α -(1 \rightarrow 4)-polygalacturonase on Bio-gel P-30 column chromatography

	CUI-3IIb-3-2/PG1	CUI-3IIb-3-2/PG2	CUI-3IIb-3-2/PG3
Yield (%)	39.0	12.0	35.2
Content (%)			
Carbohydrate ^{a)}	70.9	36.5	48.6
Uronic acid ^{b)}	45.3	41.6	68.9
Protein ^{c)}	5.6	3.2	1.2
Component sugar (mol. % ^{d)})			
Rha	15.6	13.4	14.8
Fuc	1.3	4.5	0.2
Ara	32.9	39.7	22.9
Xyl	1.7	1.8	5.9
Man	4.9	4.8	9.0
Gal	10.3	8.4	11.6
Glc	3.4	4.3	14.1
GalA	28.0	15.6	33.6
GlcA	20.3	17.2	35.9

^{a)}Carbohydrate content : Phenol-sulfuric acid method (as Gal)

^{b)}Uronic acid content : α -hydroxybiphenyl method (as GalA)

^{c)}Protein content : Lowry method (as Bovine serum albumin)

^{d)}mol. % was calculated from the total carbohydrate detected

Table 3-13. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CUI-3IIb-3-2/PGI

Glycosyl residue	Position of -CH ₃	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	2,3	4 or 5	15.36
Xylose	2,3,4	terminal	1.65
Rhamnose	2,3	4	2.38
	2,4	3	2.05
Fucose	2,4	3	1.57
Mannose	2,3,6	4	0.69
	3,4,6	2	3.02
Galactose	2,3,4,6	terminal	18.56
	3,4	2	4.75
	2,4,6	3	4.12
	3,6	2,4	2.27
Glucose	2,3,4	6	21.30
	2,3,6	4	1.6
	3,4,6	2	1.12
	3,4	2,6	0.9
GalA	2,3	4	25.63
	2	3,4	5.36
GlcA	3,4	2	1.09

Table 3-14. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CUI-3IIb-3-2/PG2

Glycosyl residue	Position of -CH ₃	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	2,3	4 or 5	9.63
Xylose	2,3,4	terminal	3.02
Rhamnose	2,3	4	4.20
	2,4	3	3.03
Fucose	2,4	3	2.32
Mannose	2,3,6	4	1.23
	3,4,6	2	2.36
Galactose	2,3,4,6	terminal	23.33
	3,4	2	5.36
	2,4,6	3	5.89
	3,6	2,4	17.36
Glucose	2,3,4	6	16.16
	2,3,6	4	1.6
	3,4,6	2	1.12
	3,4	2,6	0.9
GalA	2,3	4	22.29
	2	3,4	5.36
GlcA	3,4	2	7.41

Table 3-15. Methylation analysis for glycosidic linkage of the active fraction CUI-3IIb-3-2/PG3

Glycosyl residue	Position of -CH ₃	Deduced glycosidic linkage	mol. %
Arabinose	2,3	4 or 5	9.26
Xylose	2,3,4	terminal	1.23
Rhamnose	2,3	4	2.38
	2,4	3	20.9
Fucose	2,4	3	1.25
Mannose	2,3,6	4	0.69
	3,4,6	2	3.02
Galactose	2,3,4,6	terminal	18.56
	3,4	2	4.75
	2,4,6	3	3.62
	3,6	2,4	2.27
Glucose	2,3,4	6	28.02
	2,3,6	4	1.0
	3,4,6	2	1.12
	3,4	2,6	0.9
GalA	2,3	4	32.63
	2	3,4	5.36
GlcA	3,4	2	1.09

제 6 항 *In vivo*에서의 장관면역 활성화 및 독성실험

가. *In vivo*에서의 장관면역 활성화

글피의 조시료인 CUI-3가 *in vitro*상에서 높은 intestinal immune modulating activity를 보인 반면에 그것이 *in vivo*상에서도 유사한 경향의 활성을 나타내는지 알아보기 위하여 C3H/HeJ mouse(female, 4-5주령)를 이용하여 그 활성을 검토한 결과 Fig. 3-19에 나타난 것과 같이 Peyer's patch cell을 통한 bone marrow cell의 증식도는 일주일까지는 시간 의존적으로 증가하다가 그 기간을 넘어서는 시기부터는 그 수준을 일정하게 유지하다가 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 시료의 *in vivo*상에서의 농도별 장관면역 활성화 효과를 비교한 결과 0.5 g/kg에서는 대조군과 유의적 차이가 없었지만 1.0 g/kg 및 2.0 g/kg의 농도에서는 유의적 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 3-20). 시료 CUI-3를 경구투여한 mouse로부터의 Peyer's patch cell에서 culture supernatants 즉, conditioned medium을 가지고 hematopoietic growth factor인 IL-6 또는 GM-CSF 생성능을 two-site sandwich ELISA assay법으로 측정하였다. 그 결과, GM-CSF의 결과는 대조군과 유의적인 차이를 나타내며 농도의존적으로 높은 생성능을 나타내었다(Fig. 3-21). 또한 IL-6의 경우 1.0 g/kg과 2.0 g/kg의 농도에서는 대조군과 2배 이상의 차이를 보이는 높은 생성능을 나타내었다(Fig. 3-22).

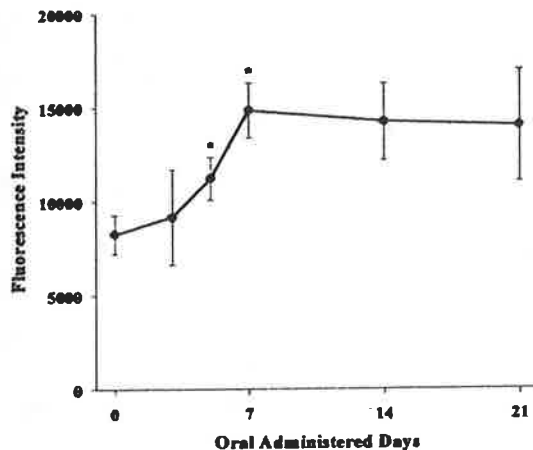


Fig. 3-19. Hematopoietic response of bone marrow cells through Peyer's patch cells of C3H/HeJ mice orally given at the concentration of 1.0 g/kg per day. * $p < 0.05$; significance between control and sample.

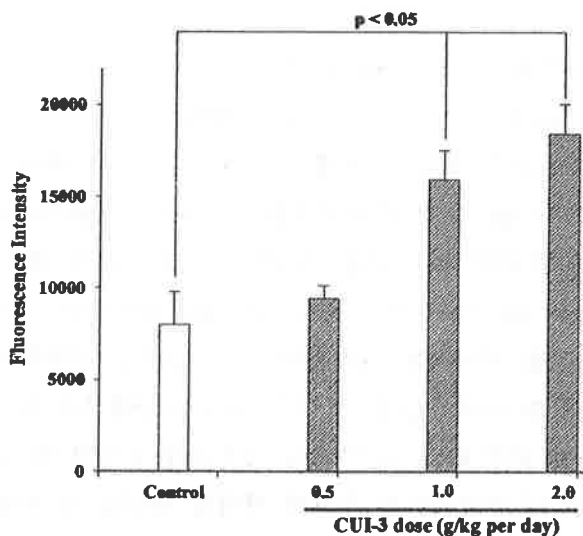


Fig. 3-20. Hematopoietic response of bone marrow cells through Peyer's patch cells of C3H/HeJ mice orally given at various concentrations of CUI-3. * $p < 0.05$; significance between control and sample.

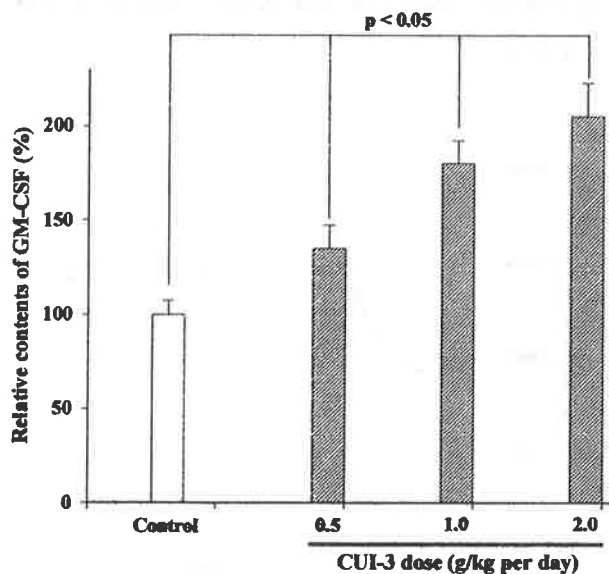


Fig. 3-21. Effect of orally administered CUI-3 from peels of *Citrus unshiu* on GM-CSF production in the culture supernatants of Peyer's patch cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significance between control and sample.

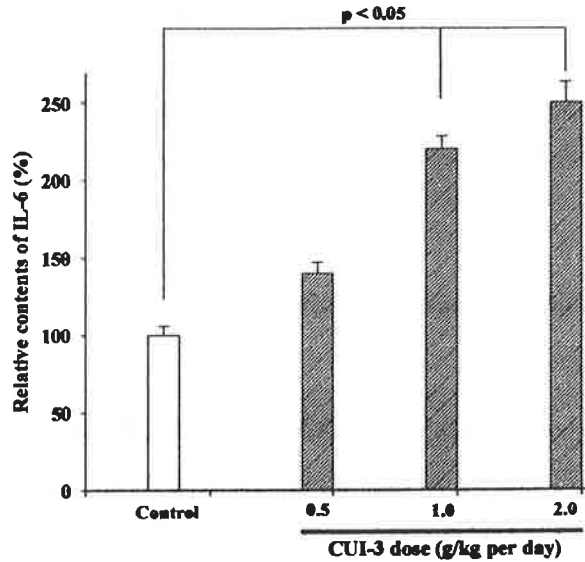


Fig. 3-22. Effect of orally administered CUI-3 from peels of *Citrus unshiu* on IL-6 production in the culture supernatants of Peyer's patch cells. * $p < 0.05$; significance between control and sample.

나. 독성실험

<경구투여 급성독성 검사 (Acute toxicity)>

귤피 추출물 중 CUI-1로 급성독성검사를 실시한 결과(Table 3-16) 6,000 mg/kg 까지의 농도에서도 아무런 영향을 보이지 않았다.

Table 3-16. Acute toxicity by oral administration of the fraction CUI-1 into mouse

Group (mg/kg)	No. of mouse	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	No. of mouse survived	Survival rate(%)
Saline	6	28.82±1.52	33.95±1.85	6	100
500	6	29.85±1.55	35.17±1.97	6	100
1,000	6	29.55±1.75	35.07±1.77	6	100
2,000	6	29.86±2.06	34.35±2.15	6	100
4,000	6	28.85±1.25	34.67±1.27	6	100
6,000	6	29.83±2.47	34.15±1.55	6	100

<경구에 의한 아만성 독성 검사 (subchronic toxicity)>

굴피 추출물 중 CUI-1으로 37일간 생리 식염수, 100 mg/kg, 300 mg/kg 그리고 500 mg/kg을 경구투여한 결과 생존율이 100%였다(Table 3-17). 이것으로 보아 굴피의 경구투여에 의한 아만성 독성은 없는 것으로 보인다.

Table 3-17. Subchronic toxicity by oral administration of CUI-1 fraction into mouse

Days	Control	100 mg/Kg	300 mg/Kg	500 mg/Kg
1	28.21 ± 1.76	28.45 ± 1.96	28.06 ± 1.76	28.44 ± 1.98
3	29.89 ± 1.81	30.50 ± 2.50	29.43 ± 1.77	29.94 ± 2.16
8	31.49 ± 1.01	32.03 ± 2.23	31.92 ± 1.42	30.83 ± 2.37
13	32.67 ± 1.43	34.53 ± 2.97	33.18 ± 2.97	32.57 ± 2.97
18	34.10 ± 1.50	35.60 ± 2.60	34.90 ± 1.60	34.40 ± 2.90
24	35.60 ± 1.70	37.90 ± 3.30	36.20 ± 1.10	35.80 ± 2.40
29	37.50 ± 1.60	39.60 ± 3.70	37.40 ± 1.50	37.70 ± 2.80
37	37.70 ± 1.90	40.10 ± 4.20	37.70 ± 1.20	37.90 ± 2.60
Survival Rate (%)	100	100	100	100

제 7 항 굴피 함유 장관면역 활성화 물질의 기능성 식품화

굴피로부터 5 kg을 상기 제 1세부과제와 동일하게 메탄올 추출을 5회 실시한 후, methanol을 제거한 잔사를 동일 추출기를 사용하여 20배의 물로 온도별로 추출하였다. 그 결과 끓는 물에서 가장 높은 추출율을 나타내었다 (Table 3-18). 한편 시간별로 추출된 획분의 장관면역활성을 실험실적 추출조건과 비교검토한 결과 추출 초기에는 공업적 추출 시가 다소 높은 반면 3 시간 이후에는 유사한 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Table 3-19).

굴피의 대량추출물에 대한 탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 bench와 open column에서 검토하였다. 그 결과 1,000 mg/l의 농도에서 Diaion HP-21 > Diaion HP-20 > 활

성탄의 순서로 뚜렷한 탈색효과를 나타내었으며 이들 처리에 의한 활성감소는 보이지 않았다(Table 3-20, -21). 또한 이들의 수율 및 정제도를 증가시키기 위해 분자량이 다른 column들을 조합시키면서 공업적 정제조건을 검토하였다 (Table 3-22). 이러한 결과를 토대로 공업적 순도의 정제 공정을 Fig. 3-23과 같이 확립하였다.

Table 3-18. Effects of water extraction temperature on intestinal immune modulating activity from *Citrus unshiu* peel.

	50℃	70℃	90℃	Hot water
Lab-scale ^{a)}	154.5	160.1	176.7	181.4
Bench scale ^{b)}	162.8	168.8	182.5	187.7

^{a)}Lab-scale: 100 g sample, ^{b)}Bench scale: 5 kg sample

Table 3-19. Effects of water extraction time on intestinal immune modulating activity from *Citrus unshiu* peel.

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Lab-scale ^{a)}	174.8	182.7	186.5	194.7	196.2
Bench scale ^{b)}	183.2	188.7	194.1	196.8	198.1

^{a)}Lab-scale : 100 g sample, ^{b)}Bench scale : 5 kg sample

Table 3-20. Effects of resins on L-value of crude sample prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Citrus unshiu</i>	66.38	81.56	57.74

Concentration of crude sample : 1,000 mg/ℓ

Table 3-21. Effects of resins on L-value of crude sample prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Citrus unshiu</i>	75.26	94.48	66.59

Concentration of crude sample : 1,000 mg/ℓ

Table 3-22. Changes of physiological activity of crude sample treated with ultrafiltration

Physiological activities	MW cut-off				
	< 10,000	< 100,000	< 300,000	< 1,000,000	> 1,000,000
Intestinal immune system modulating activity (%)	0	294.1	217.5	79.3	113.8

Concentration of samples was 100 mg/ℓ

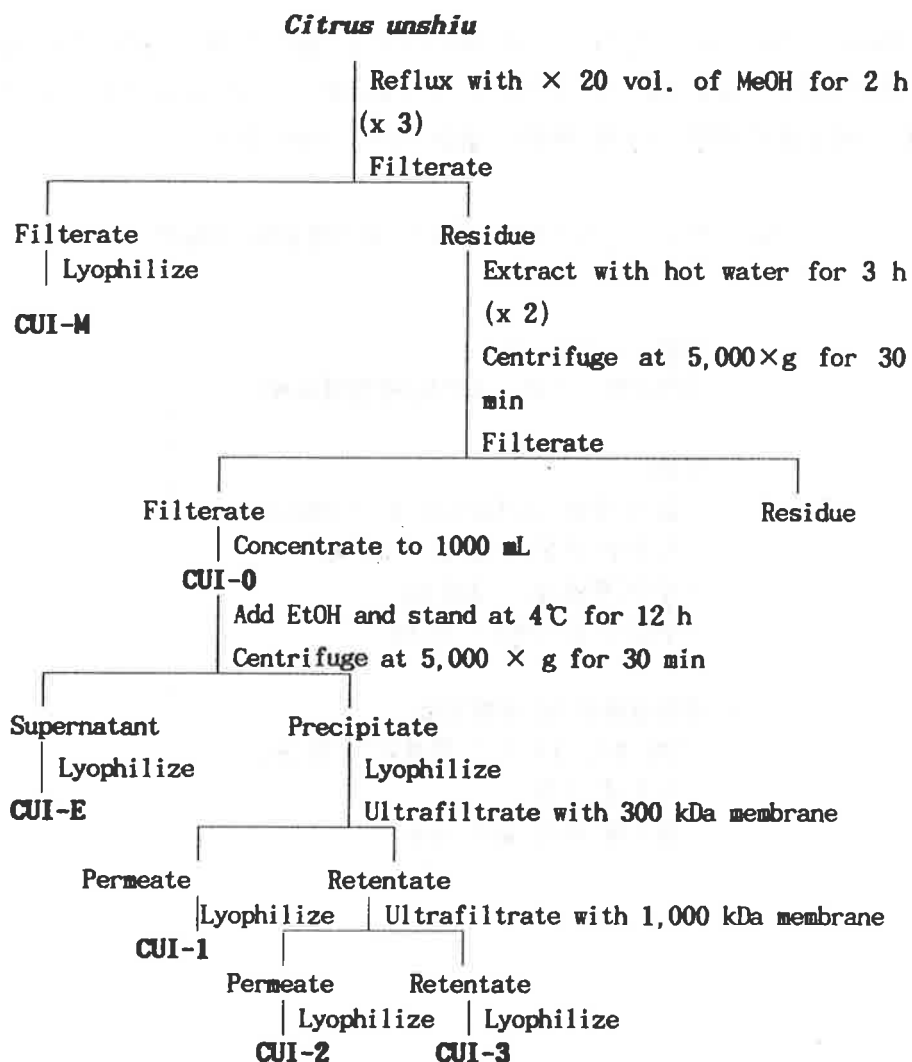


Fig. 3-23. Purification procedure of intestinal immune modulation-activating compounds for industrial purity from *Citrus unshiu* peel.

제 8 항 기능성 식품으로의 시작품 제작 및 안정성 검사

Table 3-23과 같이 경질캡슐제를 제작하였다. 들깃 함유 기능성 경질캡슐에 대한 보관시 일반세균 및 대장균의 증식정도를 확인한 결과(Table 3-24) 유통시 미생물에 의한 변질의 우려는 없는 것으로 나타났다.

Table 3-23. 들깃 함유 기능성 경질캡슐의 배합에

단위: 1캡(250 mg) 제품유형: 건강보조식품(경질캡슐제) 성분: · 들깃 추출 조시료(CUI-2) : 100 mg · 옥수수 전분(부형제) : 40 mg · 유당(부형제) : 100 mg · 구연산(산미제) : 10 mg 권장섭취량 및 섭취방법 · 1일 3회, 1회 1-2 캡슐씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

Table 3-24. 제품의 미생물검사

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
37℃, 1개월	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
50℃, 1주일	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

부 록

1. 발표논문


1999년도 식품관련학회

춘계 연합학술대회 논문초록집

1999년 6월 4일(금)~5일(토)

고려대학교 과학도서관 및 이공관

주최 : 한국산업식품공학회, 한국식품과학회
한국식품영양과학회, 한국식품위생·안전성학회
한국조리과학회

주관 :  한국식품과학회

후원 : 한국과학기술단체총연합회

P11-79n

전통차 제조용 식물로부터의 Macrophage 활성화 물질의 검색

곽지은*, 김경임¹, 홍범식¹, 조홍연¹, 양한철¹
고려대학교 자연자원대학원, ¹고려대학교 생명공학원

각종 이물질 및 병원체의 침입에 대항하는 숙주의 방어작용을 통틀어 면역계라 한다. 면역계는 그 기능에 따라 innate immune system과 adaptive immune system으로 나뉘는데, macrophage는 innate와 adaptive immunity 모두에 관여하는 면역작용의 중추적 세포이다. 본 연구에서는 60여종의 차 제조용 식물을 대상으로 mouse peritoneal macrophage 실험계를 이용하여 macrophage의 lysosomal 효소활성을 검색하였다. 각 재료를 용매의 극성도에 따라 계통추출한 후, 각 획분에 대한 활성을 검색한 결과 비교적 강한 활성을 나타낸 10여종(냉수 추출물에서는 홍화>현미>황기>당귀>한울타리, 열수 추출물에서는 감초>취>황기>홍화>능치의 순으로 활성이 나타났다)을 1차 선별한 후 다시 2차 검색을 실시하였다. 그 결과 가장 우수한 활성을 나타낸 홍화(*Carthamus tinctorius Linne*) 냉수 추출물을 최종 시료로 선정하여 에탄올 침전과 투석을 거쳐 조다당 획분 CT-1을 조제한 후 pronase 소화 및 periodate 산화를 실시하여 활성의 본체를 규명하고 Gas Chromatography를 이용하여 그 화학적 조성을 연구하였다.

P11-80n

*In vivo*에서 부재료 첨가 배추김치의 항암효과 및 면역활성 증강효과

김주연*, 이숙희, 박건영
부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

본 연구에서는 표준화 배추김치 양념비로 일반배추(I)김치, 유기배추(I)김치와 표준화 배추김치에 기능성을 증진시킨 양념비로 일반배추(II)김치, 유기배추(II)김치를 담그고 15℃에서 하루를 방치한 후 5℃에서 pH 4.3이 될 때까지 발효시켜 methanol 추출물을 만들었다. Balb/c 마우스에서 sarcoma-180 종양세포를 이용하여 고형암성장저지효과, 장기중량변화, 비장면역기능의 변화, 간의 glutathione-S-transferase(GST)활성변화, glutathione 함량변화를 살펴보았다. 시료는 *in vitro*에서 viability test 결과를 토대로 모두 0.75mg/kg을 주사하였다. 고형암 성장저지효과는 일반배추(I)김치, 유기배추(I)김치, 일반배추(II)김치, 유기배추(II)김치가 각각 12%, 34%, 30%, 39%로 나타났다. 비장의 중량비는 유기배추(I)김치가 다소 낮았고 간, 심장, 신장의 중량비는 거의 차이를 나타내지 않았다. 비장 자연살해세포(NK cell)의 Yac-1 세포파괴활성은 일반배추(I)김치, 유기배추(I)김치, 일반배추(II)김치, 유기배추(II)김치가 각각 35%, 47%, 44%, 79%로 활성이 나타났고 마우스 간의 glutathione 함량과 GST활성은 일반배추(II)김치와 유기배추(II)김치에서 높게 나타났다.

1999년 한국식품영양과학회
제46차 추계 학술발표회 및 정기총회

스포츠와 영양

K·F·N 사단 한국식품영양과학회
법인 한국식품영양과학회

P11-37

홍화로부터 분리한 다당류의 Macrophage 활성화 효과

곽지은*, 김경임¹, 홍범식¹, 조홍연¹, 양한철¹
고려대학교 자연자원대학원, ¹고려대학교 생명공학원

60여종의 차 제조용 식물용 용매별로 분획, 조제하여 mouse peritoneal의 macrophage를 이용하여 macrophage의 lysosomal 효소활성을 측정함으로써 macrophage를 활성화시키는 시료 및 획분을 검색하였다. 가장 우수한 활성을 나타낸 시료는 홍화(*Carthamus tinctorius* Linne) 냉수 추출물(CT-0)로서 대조군에 비해 macrophage를 2배 정도 활성화 시켰다. 이러한 홍화의 냉수 추출물은 메탄올 가용성 획분(CT-1), 에탄올 침전의 상등액 획분(CT-2) 및 조다당 획분(CT-3)으로 분획되었고 조다당 획분만이 활성을 보였다. 조다당 획분 CT-3를 column chromatography와 HPLC를 실시하여 정제하였다. 정제된 획분의 구성당 분석은 이러한 획분이 주로 glucuronic acid와 galacturonic acid, galactose, arabinose 등으로 이루어져 있음을 보여주고 있다.

P11-38

전통 차 및 죽류용 식물로부터 장관면역 활성화 물질의 검색

양현석*, 유광원, 신동훈, 홍범식, 조홍연, 양한철
고려대학교 생명공학원

차 및 죽류용 식물재료 90 여종을 극성도에 따라 용매별로 분획, 조제한 330여 획분에 대하여 장관면역활성을 검색한 결과, 굴피의 냉수 추출 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 냉수추출물은 메탄올 가용성 획분(CUI-2), 에탄올 침전의 상등액 획분(CUI-0) 및 조다당 획분(CUI-3)으로 분획되어졌고, CUI-3만이 높은 활성을 나타내었다. 이에 대해 DEAE Sepharose FF를 이용한 이온교환크로마토그래피를 실시한 결과, 0.2 M NaCl로 용출한 획분(CUI-3IIb)이 높은 활성을 보였으며 이 획분을 Sepharose CL-6B의 겔 여과크로마토그래피를 실시하였다. 이들로부터 활성이 높은 획분, CUI-3IIb-2와 CUI-3IIb-3은 탄수화물 함량이 매우 높고 단백질은 낮은 함량을 나타내는 것으로 미루어 다당이 활성의 본체임을 나타내었다. 활성획분(CUI-3IIb, CUI-3IIb-2, CUI-3IIb-3)에 대해 구성당의 조성 및 함량을 분석한 결과, Ara, Gal 그리고 GlcA, GalA 등이 주 구성당임이 판명되었다. 또한 HPLC를 이용하여 활성획분들에 대해 순도와 분자량을 확인하였다.

2001년도 춘계연합학술대회초록

생활양식의 변화에 따른
식생활과 건강

● 일 시 : 2001년 5월 26일 (토) 09 : 00

● 장 소 : 고려대학교 과학도서관 강당(5층)

주최: 한국영양학회(사)
한국식품영양과학회(사)
한국식생활문화학회
한국운동영양학회
후원: 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

P8-83

*In vivo*에서 광천수의 항암효과

김주연¹, 이경혜², 이숙희¹, 박건영¹.

¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, ²부산대학교 교육대학원 가정교육전공

본 연구에서는 게르마늄, 칼슘, 아연, 망간, 마그네슘 등이 다량 함유되어 있는 광천수의 항암효과를 알아 보고자 Balb/c 마우스에서 정상군과 sarcoma-180 종양세포를 투여한 군으로 나누고 각각 수돗물, 생수, 광천수를 섭취시켜 고형암 성장저지효과, 장기중량변화 및 혈청 간독성 지표인 aminotransferas(AST, ALT) 활성과 신장독성지표인 blood urea nitrogen, creatinine의 농도를 살펴보았다. 생수와 광천수의 성분 분석시 생수에 비해 광천수는 게르마늄 4배, 칼슘 40배, 아연 20배, 망간 5600배, 마그네슘 20배로 함유되어 있을 뿐 아니라 생수에는 함유되어 있지 않은 철분이 11.3ppb 함유되어 있었다. sarcoma-180 종양세포를 이용한 *in vivo* 고형암 성장저지효과에서 수돗물을 섭취시킨 군의 고형암이 8.0g인 반면 생수를 섭취시킨 군은 7.3g으로 9.8%의 고형암 성장저지 효과를 보였고 광천수를 섭취시킨 군은 6.5g으로 19.1%의 저해효과를 보였다. 정상군에서는 수돗물, 생수, 광천수를 섭취시킨 군에서 각 장기의 중량비가 유사하였지만 sarcoma-180 종양세포를 투여한 군에서는 광천수를 섭취시킨 군이 비장, 간, 심장, 신장의 중량비가 다소 낮게 나타났다. 간독성 지표인 AST(karman unit/ml of serum)가 sarcoma-180 종양세포를 투여한 군이 정상군에 비해 다소 높게 나타났고 전체적으로는 수돗물을 섭취시킨 군에서 높게 나타난 반면 ALT는 모든 군에서 유사한 경향을 보였다. 혈중요소농도(BUN)는 정상군에서는 수돗물을 섭취시킨 군이 10.8mg/dl로 다소 높게 나타났고 sarcoma-180 종양세포를 이식한 군에서는 광천수를 섭취시킨 군이 10.9mg/dl로 다소 높게 나타났지만 정상범위에 속했다. 혈중 creatinine량은 sarcoma-180 종양세포를 이식시킨 군에서 수돗물을 섭취시킨 군이 1.8mg/dl로 다소 독성을 보인 반면 광천수를 섭취시킨 군은 1.23mg/dl로 정상 범위에 속했다.

P8-84

Intestinal Immune System Modulating Activity in the Component of *Pinus densiflora*

Sun-Hyuck Shin*, Hyun-Suk Yang, Su-Kyung Kim, Kwang-Won Yu, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang. Graduate School of Biotechnology, Korea University

Pinus densiflora is a common plant in Korea. Recently, it has been reported that it has bone marrow proliferative activity by Peyer's patch cell stimulation. In this study, we investigated the intestinal immune modulating activity of extracts library from edible plants. The methanol extract of *Pinus densiflora* (PD-M) showed the high intestinal immune modulating activity. The production of hematopoietic growth factor through T cell activation was increased in Peyer's patches by oral administration of PD-M. The PD-M was further fractionated by organic solvent partitioning with chloroform, ethyl acetate and water. Of three fractions, the water solubles (PD-W) demonstrated the high intestinal immune modulating activity, and was purified by silica gel and sephadex LH-20 column chromatographies and HPLC. Based upon these results, PD-M and its subfractions might activate the T-cell in Peyer's patch cells, which in turn the production of GM-CSF and IL-6 was increased, resulting in the contribution of intestinal immune modulating activity.

P8-85

Isoflavones 보충식이 함암효소계, quinone reductase 발현에 미치는 영향
이정순¹, 권정숙², 이용우³, 권태원³, 김정상¹.

¹경북대학교 동물공학과, ²안동대학교 식품영양학과, ³인제대학교 의생명공과대학

콩에 존재하는 isoflavones은 이미 여러 논문에서 암예방지표효소인 quinone reductase의 발현을 조절한다는 것이 보고되었다. 본 연구에서는 숫컷 Sprague-Dawley rats 모델로 하여 isoflavones 보충식이 간의 quinone reductase(QR) 효소활성과 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 숫컷 Sprague-Dawley rats은 무작위로 대조군(기본식이(AIN-76)) 과 처리군(콩추출물(35g/kg diet), soy isoflavones(1g/kg diet))으로 나누어 사육하였다. 일주일 후 각 군으로부터 채취한 간의 quinone reductase 효소활성을 측정 한 결과, 처리군간 효소활성에서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)방법을 이용하여 QR mRNA 발현정도를 조사하였을 때 대조군과 처리군간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

P8-86

Isolation and Characterization of Macrophage-stimulating Polysaccharide from *Perilla frutescens* BRITTON var. *crispa*

Ki-Han Kwon, Kyung-Im Kim, Dong-Hoon Shin, Hong-Yon Cho, Bum-Shik Hong and Han-Chul Yang
Graduate School of Biotechnology, Korea University

The immune system has great importance because it protects our body from pathogens and keeps homeostasis by eliminating abnormalities in body. Especially, macrophage has anti-cancer activity by secreting physiologically active molecules for example, lymphokines, cytokines, H₂O₂, NO and cytolytic proteinase. This study is focused on screening, extraction and purification of macrophage-stimulating polysaccharide from traditional tea and rice gruel plants. These are known as anti-tumor, anti-viral, anti-coagulation and immune-enhancing activities. Among 90 kinds of traditional tea and rice gruel plant extracts, *Perilla frutescens* BRITTON var. *crispa*, *Sesamum indicum*, *Phaseolus angularis* and *Oryzae sativa* showed higher macrophage cellular lysosomal enzyme activity than others. They were more than 185% activity in 100 µg/ml concentration in comparison with control. Especially, the hot water extract from *Perilla frutescens* BRITTON var. *crispa* showed the most potent activity in a dose-dependent manner. Fraction PFB-1 showing 232% macrophage cellular lysosomal enzyme activity consisted of 50.8% carbohydrate, 4.9% protein and 2.4% uronic acid. Therefore, the isolation and purification procedures were carried out as follows: hot-water extraction, 75% ethanol precipitation, DEAE-Toyopearl 650M and Sephadex G-100 and HPLC. The purified polysaccharide was analyzed its composition fraction by GC and tested its macrophage activities and cytokine production *in vivo* by oral administration of ICR mouse.

2000년도 한국식품영양과학회
제 47차 학술발표회 및 임시총회

토종식품자원의 기능성

- 일 시 : 2000년 6월 3일 (토) 09:00~16:30
- 장 소 : 강원대학교 실사구시관
- 주 최 : 한국식품영양과학회
- 후 원 : 한국학술진흥재단, 강원대학교 한국영양과학연구소,
뉴그린소주, 농협 강원지역 본부
- 협 찬 : 강원대학교, 춘천제분, 푸라임텍 코퍼레이션
(주)키토라이프, 남양유업, 영진 S&F

KFSN 사단 법인 한국식품영양과학회
KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

P11-35

아마란스(*Amaranth spp. L*)로부터 추출한 식물성 스쿠알렌이 지질
배설량과 콜레스테롤 대사, 항산화능에 미치는 영향

장윤정*, 허호진, 홍승찬, 조홍연, 양한철, 김혜경¹, 신동훈
고려대학교 생명공학원 식품생명공학과, ¹한서대학교 식품생물공학과

아마란스(*Amaranth spp. L*)는 중남미와 유럽에서 가장 오랫동안 식용으로 이용되어온 곡류로써 tocotrienol과 스쿠알렌 함량이 높다. 따라서 본 연구에서는 고콜레스테롤 식이로 유도된 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐에서 아마란스(AG)와 아마란스유(AO) 및 아마란스에서 분리된 스쿠알렌(AS)의 체내 지질 감소 효과와 항산화능을 알아보았다. AG와 AO는 식이로 급여하였고 AS는 시판되고 있는 상어간에서 추출한 동물성 스쿠알렌(SS)과 비교하여, 복강주사로 희생전 1주일간 1일 1회 투여하였다. AG, AO, AS군은 혈중 지질과 간조직 지질 감소효과를 나타내었고 특히 AS의 효과는 SS 효과에 비하여 월등한 체내 지질 감소 효과를 보였다. 이러한 효과를 가지는 기전을 밝히기 위해 이들 실험군에서 콜레스테롤의 생합성, 지질 배설 경로를 살펴보고, 그 결과 변에서의 각 지질 함량은 혈청, 간에서의 지질이 저하한 군에서 증가 현상을 보이며 변중 담즙산 함량은 이들의 지질 저하와 관계 있었다. 콜레스테롤의 합성 효소인 HMG-CoA reductase의 저해 활성은 AG, AO 및 AS군에서 유의성은 없으나 저해 경향을 나타내었다. 또한 간조직중의 과산화지질과 glutathione peroxidase 함량은 AG, AO, AS군에서 감소되어 아마란스의 항산화능 효과를 나타내었다.

P11-36

Intestinal Immune Modulating Ingredients from *Citrus unshiu* Peel

Hyun-Seuk Yang*, Su-Kyung Kim, Kwang-Won Yu, Dong-Hoon Shin,
Bum-Shik Hong, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang
Graduate School of Biotechnology, Korea University

Cold water extract (CUI-0) prepared from *Citrus unshiu* peel has been found to show an enhancing activity on proliferation of bone marrow cells mediated by Peyer's patch cells (intestinal immune modulating activity). After MeOH-soluble (CUI-1) and insoluble fractions were separated from CUI-0 by MeOH reflux, the most active crude polysaccharide fraction (CUI-3) was obtained by EtOH precipitation of MeOH-insoluble fraction. In addition, the other active fraction (CUI-1C) was fractionated from CUI-1 by solvent partitioning with CHCl₃ / MeOH. Further Silica gel and Sephadex LH-20 chromatography of CUI-1C gave a potent intestinal immune modulating polyphenol (CUI-1C-2-2). Purity and properties of CUI-1C-2-2 was identified by HPLC on μ Bondapak C₁₈ column and colorimetric method and UV absorption range showed that CUI-1C-2-2 may be comprised of flavonoid glycoside. In order to analyze the structure of CUI-1C-2-2 for the expression of the activity, spectroscopic method using ¹H, ¹³C-NMR and FAB-MS were employed.

2000년도 한국식품과학회

임시총회 및 제 64차 학술발표회

2000년 5월 27일 (토)

대구대학교 공과대학관



후 원 : 한국과학기술단체총연합회

P7-43

In vivo Antigenotoxicity of Korean Mistletoe and its Mechanism

Jong-Heum Park*, Seung-Taek Ji, Chang-Kee Hyun¹ and Heuyn-Kil Shin¹
 Inst. Functional Food and Safety, Handong Univ., ¹Biosci. and Tech., Handong Univ.

From previous *in vitro* results, *in vivo* antigenotoxicity of dialysed mistletoe extract was examined on gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rat. Treatment of the extract for 1 week resulted in the decrease of DNA damage and especially, 150 and 250 mg/kg body wt reduced the damage significantly. 75 mg/kg body wt, though there was no significance, also showed a lower value than that of the control. Likewise, this reduced damage was observed from the ingestion of lower dose of the extract during a more extended period time. To elucidate this protecting mechanism, effect of dialysed mistletoe extract on the induction of glutathione-S transferase(GST) and the chemical inactivation of MNNG was investigated. Exactly, the extract resulted in the induction of GST level on the gastric cells in parallel to the antigenotoxic effect and the effect was significant at 250 mg/kg body wt. But lower dose treatment failed to induce the level. On the inactivation of MNNG, the extract decreased the amount of MNNG according to the incubating time and the decomposition rate, though there was some difference on pH, reached a maximum level at 1 hr. Therefore, it was found that Korean mistletoe could reduce DNA damage through the induction of GST and chemical decomposition of MNNG and plays a protecting role as a blocking agent on chemical carcinogenesis.

P7-44

Intestinal Immune Modulating Polysaccharides from *Citrus unshiu* peel

Yang Hyun-Seuk*, Yu Kwang-Won, Shin Dong-Hoon, Hong Bum-Shik,
 Cho Hong-Yeon, Yang Han-Chul
 Graduate School of Biotechnology at Korea University

From the 90 kinds of Korean traditional tea and rice gruel plants, 330 fractions were prepared by solvent extracts based on the polarity. When these fractions were compared on intestinal immune modulating activity, the cold water fraction of *Citrus unshiu* peel had the most potent activity. It was further fractionated by MeOH reflux and EtOH precipitation to obtain crude polysaccharide fraction. As results of pronase digestion and periodate oxidation, polysaccharides were important for potent intestinal immune modulating activity of CUI-3. The crude polysaccharide fraction, CUI-3 was purified by ion exchange chromatography on DEAE Sepharose FF, gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200. High performance liquid chromatography showed that CUI-3IIb-3-2 was single substance with the molecular weight of 18,000 Da. The purified polysaccharide, CUI-3IIb-3-2 was composed of Ara (23.0%), Rha (13.4%), Gal (8.4%), GalA (24.4%), GlcA (15.4%). Methylation analysis of CUI-3IIb-3-2 showed that glycosidic linkages appeared to be pectic polysaccharides.

2000년도 추계

연합심포지엄·학술발표회 논문발표집

2000년 11월 3일(금)~4일(토)

건국대학교 새천년관

주 최 : 한국식품영양과학회
한국산업식품공학회
한국식품과학회

후 원 : 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

4가지 한약 복합체의 조혈 기능 강화 효과

이성태*, 정영란, 하미혜¹, 김성호², 변명우³, 조성기³
 순천대학교 생물학과, ¹유용천연자원연구소, ²전남대학교 수의학과,
³원자력연구소 방사선 식품·생명공학팀

본 실험에서는 4가지 생약재를 조합한 추출물(Him-II)을 이용하여, 조혈기능에 중요한 역할을 하는 간질세포 및 골수세포의 증식, 대식세포와 적혈구 분화지능력과 방사선 조사에 대한 회복효과를 살펴보았다. 그 결과 4가지 종류의 생약재 모두 간질세포 및 골수세포의 증식을 촉진시켰고, 복합체 추출물의 각 분획 성분도 동일한 효과를 나타내었다. 그리고, 대식세포 및 적혈구로 분화·증식하는데 필요한 GM-CSF와 EPO 존재하에서 대식세포 및 적혈구로 각각 분화·증식하는 것을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한, 저선량(4Gray)의 방사선에 노출된 생쥐 골수세포의 증식반응을 증가시키는 것으로 나타나, 전체적으로 골수세포의 분화증식을 지지하며 방사선 장애에 대한 회복효과도 있는 것으로 생각된다.

P11-18

전통차 및 죽류용 식물소재로부터의 Macrophage 활성화 물질의 검색

권기한*, 김경임, 신동훈, 홍범식, 조홍연, 양한철
 고려대학교 생명공학원

Macrophage는 phagocytosis를 통하여 체내 항원침입에 대한 일차적 면역세포로 작용하고 lymphocytes의 증식 및 활성화에 필요한 여러 면역조절인자인 cytokines(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), H₂O₂, NO, cytolytic protease 등을 분비하는 effect cell로서의 기능을 수행한다. 본 연구에서는 안전성이 뛰어난 새로운 면역조절물질을 개발할 목적으로 식용 가능한 천연물 중 특히, 국내산 차 및 죽류를 대상으로 mouse peritoneal macrophage assay계를 이용하여 macrophage 활성화 물질을 검색하였다. 약 70여가지의 차 및 죽류를 용매의 극성도에 따라 계통 추출한 후, 각 획분에 대한 활성을 검색한 결과 차조기(*Perilla sikokiana*), 참깨(*Sesamum indicum*), 팥(*Phaseolus angularis*)의 각 열수 추출물과 현미(*Oryzae sativa*), 쑥(*Artemisia asiatica*)의 각 냉수 추출물이 1차 선별되었다. 이들에 대하여 종류 및 산지별 2차 검색을 시행한 결과, 홍천산 차조기가 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 230%의 relative activity로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 최종 선별된 시료를 극성도가 상이한 용매로 계통 추출하여 수율과 활성을 검토한 결과, 열수 추출물이 235%의 relative activity로 가장 우수한 활성을 가진 것으로 나타났다. 이 열수 추출물을 ethanol precipitation을 거쳐 crude-polysaccharide 획분으로 조제한 후 periodate oxidation과 pronase digestion을 실시하여 시료의 활성 본체를 규명하였다.

P11-29

Nutraceutical Function of Rice Components

Jae-Woon Kim*, Woo-Jin Jun, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong,
Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology at Korea University

The present study was undertaken to investigate the biochemical and functional properties of rice components. Normal, waxy, and three black rices (cultivated in Jin-Do, Hong-Sung and Ik-San) were used in this study. Their starches from 5 rice were isolated by the exhaustive procedures. The starch from black rice cultivated in Jin-Do was identified as waxy form, and two other black rices as normal forms. The results of swelling power, *in vitro* digestibility, and resistant starch content indicated that the significant differences in 5 starches might be derived from their biochemical forms. In addition to the comparison of major components (starch) in rices, their minor components (phenolic compounds) were compared in terms of the biologically active aspect. Of their phenolic extracts, water-solubles from black rice grown in Hong-Sung showed the most significant O₂^{·-} scavenging activity, anti-lipid peroxidation activities, and hydrogen donating capacity.

P11-30

Intestinal Immune System Modulating Activity in the Component of *Pinus densiflora*

Sun-Hyuck Shin*, Hyun-Suk Yang, Su-Kyung Kim, Kwang Won Yu, Dong-Hoon Shin,
Bum-Shik Hong, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang
Graduate School of Biotechnology, Korea University

Pinus densiflora is a common plant in Korea, and One of its several biological functions have been reported bone marrow poliferative activity by Peyer's patch cell stimulation. In this study, we investigated the intestinal immune modulating activity of *Pinus densiflora*. the methanol extract of *Pinus densiflora* (PD-M) showed the high activity. Also the production of hematopoietic growth factor through T cell activation was increased in Peyer's patches by oral administration of PD-M. PD-M was fractionated by organic solvent partitioning with chloroform, ethyl acetate and water. Of three fractions, water soluble (PD-W) was displayed the high intestinal immune modulating activity. The PD-W was further purified by silica gel and sephadex LH-20 column chromatography. In further study, this purified fraction will be identified and discussed by HPLC. Based on these results, PD-M and its subfractions may activate the T-cell in Peyer's patch cells, which in turn GM-CSF and IL-6 may partly contribute to this activity.



11th World Congress of Food Science and Technology

Paradigm Shift - Harmonization of Eastern and Western Food Systems

Organized by Korean Society of Food Science and Technology (KoSFoST)

Under the auspices of International Union of Food Science and Technology (IUFoST)

Supported by Ministry of Agriculture and Forestry, Korea / Korea Food and Drug Administration /
Seoul Metropolitan Government / Korea Trade - Investment Promotion Agency / Korea Foods Industry Association

April 22-27, 2001 COEX Convention Center Seoul, Korea
www.congress2001.or.kr

Abstracts



KoSFoST



IUFoST

Gold Sponsor



DAESANG

ing activities made it wide application in medicine, cosmetics and food industry. It is known that different geographic zones its biological activities varies due to botanical sources. In this study we decide to evaluate antibacterial and antioxidant activities of six local varieties Korean propolis. Crude propolis were hand gathered from nylon mesh placed over bee hive from six localities in south Korea and ethanol(20 % of 80% ethanol) extracts of propolis were prepared. A 2 ml aliquots of each of the extracts was spotted on the silica HPTLC plates and the plates were conducted to visualize antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activities of chemical constituents of propolis. The most potent antibacterial component of Korean propolis was quercetin. Bioautographic assays of HPTLC profiles from Yangsan, a locality in the province of Kyong-Nam had a different TLC pattern. However, qualitative antibacterial activity detection was similar. Potent delay in bleaching of β -carotene was observed in galagene band. However, there were no significant difference among local varieties in delay of bleaching after spraying the HPTLC plate with a solution of β -carotene and linoleic acid.

P14-44

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM PEANUT SHELL

JI-HYANG WEE and KEUN-HYUNG PARK
Chonnam National University, KOREA

The main roles of plant hull are chemical preservation of the seed and physical protection of the grain from the insects or microorganisms attack during storage. So peanut (*Arachis hypogaea*) shell has potentials to have self-defense compounds against microorganisms as well as oxidation. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial and antioxidative activity of peanut shell and to identify the active component from peanut shell. The shell was extracted with *n*-hexane and ethyl acetate and the residue was extracted with methanol. Each extract was tested to determine its antimicrobial activity against various microorganisms by paper disc methods and antioxidants activity by DPPH radical scavenger activity. The methanol extract was showed antioxidative and antimicrobial activity. So, it was fractionated with ethyl acetate and various buffers. The ethyl acetate-soluble neutral fraction and ethyl acetate-soluble acidic fraction showed antimicrobial and antioxidative activity. Each fraction was successively purified through silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and octadecylsilane column chromatography. Further purification was through high performance liquid chromatography. We obtained some active substances, which were, identified by LC-MS and GC-MS analyse.

P14-45

ISOLATION AND STRUCTURAL DETERMINATION OF A NOVEL ANTIMICROBIAL COMPOUND FROM THE ROOT OF *PULSATILLA KOREANA*

JEUNG YONG CHO^a, JAE-HAK MOON^b, SEUNG-JIN MA^c, and KEUN-HYUNG PARK^d

^aDepartment of Food Science and Technology, Chonnam National University, KOREA ^bDepartment of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, JAPAN, ^cInstitute for Chemical Research, Kyoto University, JAPAN

We have described the isolation and identification of cinnamic acid derivatives (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid and 3,4-dihydroxycinnamic acid) as antimicrobial compounds from methanol extract of *Pulsatilla koreana* roots. The active constituent has still remained unknown. This paper describes isolation and structure elucidation of a novel antimicrobial compound from methanol extract of *P. koreana* root. Antimicrobial activity was assayed by paper disc agar diffusion method. This methanol extract of *P. koreana* root showed growth inhibition against various microorganisms. Methanol extract was solvent fractionated and each fraction was assayed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. EtOAc-soluble acidic fraction showed strong antimicrobial activity. EtOAc-soluble acidic fraction was purified and isolated to silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, silica gel partition column chromatography, and HPLC successively. The isolated compound had stronger antimicrobial activity than benzoic acid, which is a positive control in the assay, against *S. aureus* on a paper disc method. The isolated compound were elucidated pulsaquinone, having a novel 7-6 bicyclic carbon skeleton, from the HREIMS, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, ¹H-¹H COSY, and HMBC spectral data.

P14-46

OPTIMIZATION IN EXTRACTION OF ISOFLAVONE GLYCOSIDES IN DEFATTED SOYBEAN MEAL

KI-SUK JEON and IN-KYEONG HWANG
Seoul National University, KOREA

Isoflavones have known to be wide-range of beneficial effects upon health, such as cancer preventing of breast, bowel, prostate and other cancers, cardiovascular disease, osteoporosis, and menopausal symptoms. Defatted soybean meal (DSM), a by-product from the soybean oil extraction, is estimated to be more than 600,000 MT per year. Therefore, this study was conducted to determine optimal conditions for isoflavone glycosides from DSM. Quantification of isoflavone glycosides was carried out with reversed-phase HPLC. A methanol/distilled water (4/1, v/v) solvent system was more effective than ethanol system at three concentration levels (60, 80 and 100% of alcohol, respectively). The optimum ratio of the 80% methanol solution to the DSM was 5:1 (v/w). Due to increase in efficiency of extraction by addition of acid to the solvent system, 0.1N acetic acid was found to be more efficient compared to 0.1N HCl (hydrochloric acid) at RT, but 80% methanol solution alone was effective at 50°C. When DSM was extracted at every 3 hr for 24 hr, at various temperature (20, 30, 40 and 50°C), the content of isoflavone glycosides extracted was increased with time and temperature. Under the optimal conditions, it has been established the levels of isoflavones in DSM were as follows; daidzin, 1433.6; glycitin, 283.5; genistin, 1916.1; daidzein, 17.1; glycitein, 186.6; genistein, 10.9 μ g/g.

P14-47

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MACROPHAGE ACTIVATING SUBSTANCE ISOLATED FROM *PERILLA SIKOKIANA*

KI-HAN KWON, KYUNG-IM KIM, DONG-HOON SHIN, BUM-SHIK HONG, HONG-YEON CHO, and HAN-CHUL YANG
Graduate School of Biotechnology, Korea University, KOREA

The immune system has great importance because it protects our body from pathogens and keeps homeostasis by eliminating abnormalities in body. Especially, macrophage has anti-cancer activity by secreting physiologically active molecules for example, lymphokines, cytokines, H_2O_2 , NO and cytolytic proteinase. This study is focused on the screening and extraction of a macrophage activating polysaccharides from traditional tea and paste source. These are known as anti-tumor, anti-viral, anti-coagulation and immune-enhancing activities. Among 70 kinds of edible plant extracts, *Perilla sikokiana*, *Sesamum indicum*, *Phaseolus angularis* and *Oryzae sativa* showed higher macrophage cellular lysosomal enzyme activity than others. They were more than 185% activity in 100 μ g/mL concentration in comparison with control. Especially, the hot water extract from *Perilla sikokiana* showed the most potent activity in dose-dependent fashion. Fraction PS-1 showing 232% macrophage cellular lysosomal enzyme activity consisted of 50.8% carbohydrate, 4.9% protein and 8.5% uronic acid. Therefore, the isolation and purification procedures were carried out as follows; hot-water extraction, 75% ethanol precipitation, DEAE-Toyopearl 650M and Sephadex G-100 and HPLC. The purified polysaccharide was analyzed its composition fraction by GC and tested its macrophage activities and cytokine production *in vivo* by oral administration of ICR mouse.

P14-48

ACE INHIBITORY AND ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF PEPTIDES DERIVED FROM ANCHOVY SAUCE

SANG-MOO KIM and WOO-JAE KIM

Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, KOREA

Various functional substances in food have recently emphasized for producing "functional foods". However, the study in functional substances is concentrated in agriculture products, but rare in fishery products. In order to investigate the functionalities of fish sauce, peptides were purified from anchovy sauces fermented naturally at 15-25°C for 1, 3, and 5 years, respectively. Ultrafiltration (cut-off 3,000 daltons) and Gel permeation chromatography were used to purify peptides. ACE inhibitory and antioxidant activities of peptides were investigated to evaluate their functionalities. Peptide from 1 year fermented anchovy sauce showed 5 peaks on gel permeation chromatography pattern, while those of 3 and 5 years had 4 peaks. Longer fermentation period lower molecular weight of peptides on gel permeation chromatography pattern. ACE inhibitory activity of peptide was the highest on the third peak of 1 year fermented anchovy sauce, while antioxidant activity was the highest on the first peak of 3 year fermented anchovy sauce.

P14-49

CHEMOPREVENTIVE EFFECTS OF BUCKWHEAT RUTIN ON INFLAMMATION AND TUMORIGENESIS

KI-WON LEE^a, DONG-YOUNG KIM^b, HYUNG-HWAN PARK^b, HAN-SOO KIM^b, IK-BOO KWON^b, and HYONG-JOO LEE^a

^aDepartment of Food Science and Technology, Seoul National University, KOREA, ^bLotte R & D Center, KOREA

Chemopreventive effects of buckwheat rutin on inflammation and tumorigenesis were examined. Rutin was separated by sol-

vent extraction, XAD-4 adsorption chromatography, and HPLC from dried buckwheat plants. Its antioxidative activities were assessed by scavenging activity with stable 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals and by inhibitory activity with a xanthine/xanthine oxidase assay system. Antiproliferative activities were assessed by ³H-thymidine uptake on cancer cell lines. Antiinflammatory activities were assessed by inhibition rate of lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in mouse macrophage RAW 264.7 cells. In addition, *in vivo* antiinflammatory and antitumor promoting activities were evaluated by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-induced ear edema assay. Rutin exerted strong antioxidative activities using two different assay method and antiproliferative activities on cancer cell lines. Rutin also reduced NO generation while it had no effects on TNF- α . Consequently, anti-inflammatory activities of rutin may be related to the inhibition of NO generation. Additionally, buckwheat rutin inhibited TPA-induced inflammation at a dose-dependent manner. This inhibition may result from its protective effects against reactive oxygen species. Since oxidative stress and inflammation are closely associated with tumor promotion, antioxidant and antiinflammatory substances are expected to exert chemopreventive effects on carcinogenesis, particularly in the promotion stage. These results suggest that buckwheat rutin should have potent chemopreventive effects on inflammation-associated tumorigenesis.

P14-50

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GAMAZUMI (*VIBURNUM DILATATUM*) ON OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY WATER IMMERSION RESTRAINT STRESS IN RATS

KUNIHISA IWAJ^a, AKIO ONODERA^b, and HAJIME MATSUE^a
^aAomori Advanced Industrial Technology Center, JAPAN,
^bOnodera Brewhouse Company, JAPAN

The antioxidant activity and antilcer effects of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* THUNB.) fruit squeezing solution (GSS) were investigated. GSS including no antioxidant additive showed strong antioxidant activity by the XYZ-dish method and the electron spin resonance (ESR) method. GSS showed to have no negative effect on growth of rats for 2 weeks of feeding with free access to GSS. After feeding, the GSS group showed a significant inhibitory effect on gastric ulcer formation by water immersion restraint stress for 6 hours compared with the Water group. Plasma, liver and stomach concentrations of lipid peroxide in the GSS group were reduced rather than the Water group. Furthermore, the activities of plasma lactic dehydrogenase, amylase and creatine phosphokinase are ordinarily increased by stress, however these activities in the GSS group decreased to the level in the Control group having no stress. The physiological effects of GSS were similar to, or higher than, those of 0.1% (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) solution. These effects of EGCg and GSS were similar to the order of antioxidant activity against hydroxyl radical found by both the XYZ-dish and the ESR methods. It was concluded that after ingestion of GSS, during the period of strong antioxidant activity in the body, it could prevent stress-induced oxidative damage.

P14-51

STUDIES ON THE PRODUCTION OF FUNCTIONAL SOYBEAN CURD

POSTER
FR1

HFD+5% RPP group. The plasma concentrations of triglyceride and cholesterol were decreased in HFD+5% RPP group and HFD+10% *kimchi* group compared to HFD ($p < 0.05$). HFD+5% RPP group and HFD+10% *kimchi* group were lower than HFD in the level of total lipid, triglyceride and cholesterol of liver and fat pad ($p < 0.05$). RPP improved the lipid metabolism by capsaicin which has the function of lipid decomposition and inhibition of lipid accumulation. HFD+10% *kimchi* group was more effectively decreased the levels of total lipid in liver and fat pad in the rat than HFD+5% RPP group. The levels were decreased almost to the normal group. It was considered that *kimchi* has the improvement of lipid metabolism by its dietary fiber, garlic etc besides RPP. These results indicated that RPP and *kimchi* stimulated the lipid metabolism of blood and adipose tissues.

P14-110*
**ANTICANCER EFFECTS OF GREEN TEA LEAVES
 ADDED KIMCHI ON THE SARCOMA-180 CELL
 TRANSPLANTED MICE**

WOON-YOUNG CHOI^a, SUK-HEE MOON^b, and KUN-YOUNG PARK^a

^aDepartment of Food Science and Nutrition, and *Kimchi* Research Institute, Pusan National University, KOREA. ^bDept. of Food & Nutrition, Kyungnam College of Information & Technology, KOREA

The antitumor activities of the green tea leaves (GTL) added Korean cabbage *kimchi* on Balb/c mice transplanted with the sarcoma-180 cell were investigated. The activities of liver enzyme, glutathione S-transferase (GST) and contents of lipid peroxide (LPO) and glutathione (GSH) were determined from the sarcoma-180 cell injected mice that were treated with methanol extracts from control *kimchi* (CK), cancer preventive *kimchi* (CPK), GTL added to CPK *kimchi* (functional *kimchi* I, FKI) and the GTL added *kimchi* using water extracts of mushroom and sea tangle (functional *kimchi* II, FKII). The tumor weight of CK, CPK, FKI and FKII were 4.5g, 3.9g, 3.4g, 3.0g and 2.8g, respectively. The activities of GST and the contents of GSH decreased by the transplantation of the sarcoma-180 were recovered considerably by the treatment of the methanol extract from CK, CPK, FKI and FKII in the order. The contents of LPO in liver of Balb/c mice which were increased by the transplantation of the sarcoma-180 cells were decreased by the treatment of the methanol extract from CK, CPK, FKI and FKII in the order. In conclusion, FKII exerted the most anticancer effect among the *kimchi* samples by increasing the inhibition the growth of the tumor cells and controlling the activity of GST and contents of glutathione which were associated with the detoxification mechanism.

P14-111
**QUALITY MANAGEMENT OF NUTRACEUTICALS'
 INTELLIGENT PRODUCT-DELIVERY SYSTEMS AND
 SAFETY THROUGH TRACEABILITY**

PAUL A. LACHANCE and RAYMOND G. SABA
 Department of Food Science, Rutgers, The State University of
 New Jersey, New Brunswick, NJ 08901, USA

Nutraceuticals are naturally derived, bioactive (usually phyto-

chemical) compounds that have health benefits. The nutraceutical consumer product may be delivered as a dietary supplement and/or as a functional food. Functional food products, either naturally occurring or fortified, containing nutraceuticals must be managed to assure quality from "farm gate to plate." Assurance of nutraceutical quality requires a systems approach, commencing with the optimization of the agricultural crop. Intelligent product-delivery systems philosophy requires identity of the crop botanically, with farm-site identification (via Global Positioning Systems), biodata records, agronomic practice records (Good Agricultural Practices). Phytochemical fingerprinting data requires analyses and tracking of the bioactive nutraceutical components and/or biomarkers. This knowledge requires the development of rapid assay methods and tools to assure real time compliance and standardization with documentation and monitoring for changes during handling, harvesting, processing and production (manufacture into product). Rapid assays can also be used to assure microbiological and chemical safety throughout the shelf-life of the product. Issues currently limiting full quality management need to be established and implemented before outdated approaches become policy by default. "A contribution of the The Nutraceuticals Institute, a joint program of the New Jersey Agricultural Experiment Station, Rutgers University, and the Center for Food Marketing, St. Joseph's University.

P14-112
**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-
 COMPLEMENTARY POLYSACCHARIDE FROM
 THYME (LEAVES)**

HYUG CHUN, DONG-HOON SHIN, BUM-SHIK HONG,
 HONG-YON CHO, and HAN-CHUL YANG
 Graduate School of Biotechnology, Korea University, KOREA

The complement system plays an important role in the primary defense mechanism against the environmental attacks. Particularly, the activity enhancing this system is defined as an anti-complementary activity. In previous study, the anti-complementary activities of 80 edible spices were investigated, resulting in thyme (*Thymus vulgaris* L.) as a potent anti-complementary activator (at 1000 g/mL, ITC₅₀ (%): 75%). Therefore, the isolation and purification procedures for the anti-complementary substance from thyme were carried out as follows; hot-water extraction, 75% ethanol precipitation, ultrafiltration by 300 kDa membrane (MWCO), DEAE-Toyoppearl 650C, Butyl-Toyoppearl 650M, and Sephadex G-100. The purified polysaccharide, TV-IIA-I (M.W.: 116 kDa), mainly activated the complement system with 92.1% inhibition of hemolysis at 100 g/mL. TV-IIA-I was composed of carbohydrate (92.2%), uronic acid (10.3%) and protein (5.4%). The main structural sugars of the purified anti-complementary polysaccharide from thyme were galactose (41.3%), arabinose (15.6%), mannose (13.6%), glucose (12.6%) and rhamnose (9.9%).

P14-113
**INTESTINAL IMMUNE SYSTEM MODULATING
 ACTIVITY OF INGREDIENT OBTAINED FROM *PINUS
 DENDIFLORA***

SHUN-HYUCK SHIN, HYUN-SEUK YANG, SU-KYUNG
 KIM, KWANG-WON YU, DONG-HOON SHIN, BUM-SHIK
 HONG, HONG-YON CHO, and HAN-CHUL YANG

POSTER
 FRI

Graduate School of Biotechnology, Korea University, KOREA

Pinus densiflora is a common plant in Korea, and its several biological functions have been reported bone marrow proliferative activity by Peyer's patch cell stimulation. In this study, we investigated the intestinal immune modulating activity of pine needle. The methanol extract of pine needle (PD-M) showed the high activity. Also the Production of hematopoietic growth factor through T cell activation was increased in Peyer's patches by oral administration of PD-M. Therefore, PD-M was fractionated by organic solvent partitioning with chloroform, ethyl acetate and water. Of three fractions, Water soluble (PD-W) was displayed the high intestinal immune modulating activity. The PD-W was further purified by silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. Finally this purified fraction was identified and discussed by HPLC. Based on these results, PD-M and its subfractions may activate the T-cell in Peyer's patch cells, which in turn GM-CSF and IL-6 may partly contribute to this activity.

P14-114

EFFECTS OF PLANT EXTRACTS AND VARIOUS ANTIOXIDANTS ON FUNCTIONAL ABILITY AND EMULSION STABILITY

SOO-MIN KIM^a, YOUNG-SUK CHO^b, WOO JOUNG CHO^c, SHIN-HO LEE^d, DAE-GON KIM^e, and SAM-KYUNG SUNG^f
^aFaculty of Life Resources Engineering, Kyung-san University, KOREA, ^bDepartment of Food Science and Technology, Yeungnam University, KOREA, ^cDepartment of Food Science and Technology, Catholic University of Taegu-hyosung, KOREA, ^dDepartment of Food Science and Nutrition, Taegu Polytechnic College, KOREA

This study was carried out to investigate effects on processing characteristics in case of addition of plant extracts and also reviewed synergic effects of plant extracts and various antioxidants on antioxidant and antimicrobial activities. The results are summarized as follows; The addition of plant extracts did not change the stability of emulsion, which means there were a little effects of plant extracts on processing characteristics, irrespective of concentration of plant extracts. The antioxidant ability of plant extracts and various antioxidants showed the most strong ability in ethanol extracts from green tea and *Schizandra chinensis*. These values were very similar to antioxidant of carnosine. Electron donating ability of ethanol extracts from *Pinus densiflora* and Green tea were tend to be showed 84.4%, 74.9%, respectively, in which showed more higher antioxidant ability than other antioxidants. And also, The complex treatment between plant extracts and various antioxidants were tended to be synergic effect in case of TBARS value, however there did not show synergic effects on antimicrobial activities on the basis of functional characteristics

P14-116

IMPROVEMENT EFFECT OF INTESTINAL MICROFLORA AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOY YOGHURT

SUNG-HO YANG^a, JEONG-HWA HONG^a, and SUNG-HO HUR^b
^aSchool of Food Science, Inje University, KOREA, ^bInstitute of Food Science, Donggeui Institute of Technology, KOREA

Soy yoghurt was prepared with combination of three different lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*). Soy yoghurt filtrate (SYF) showed strong antibacterial activity toward *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium; in particular growth of *B. cereus* and *B. subtilis* were considerably inhibited. In contrast, growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* and *Pichia membranaefaciens* were not significantly inhibited by SYF. Intestinal bacteria were also affected upon the addition of SYF. Growth of *Bifidobacterium* spp. was promoted in the order of *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum* and *B. breve*. On the contrary, *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* and *Bacteroides fragilis* were not notably inhibited by SYF.

P14-117

ANTIHEPATOTOXIC ACTIVITY OF THE LEAVES OF ZANTHOXYLUM PIPERITUM IN RATS WITH INTOXICATED BROMOBENZENE AND BIOACTIVE COMPONENT

JONG MOON HUR^a, JU GWON PARK^a, JONG CHEOL PARK^a, MYEONG RAK CHOI^b, SANG HO SONG^b, and JONG WON CHOI^c

^aDepartment of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, KOREA, ^bDepartment of Biotechnology, Yosu National University, KOREA, ^cDepartment of Pharmacy, Kyung-sung University, KOREA

Effects of methanol extract and protocatechuic acid from leaves of *Zanthoxylum piperitum* which have been used for an aromatic in Korea on the level of lipid peroxide and the enzyme activities were investigated in the liver of bromobenzene-treated rats. Bromobenzene is a xenobiotic liver toxin that is known to produce centrilobular hepatic necrosis through the formation of reactive epoxides as the toxic intermediates. In the metabolism of bromobenzene, the nontoxic 2,3-epoxide, which readily forms 2-bromophenol, or the toxic 3,4-epoxide are produced on oxidation by cytochrome P-450 monooxygenases. Several pathways exist that can detoxify the reactive 3,4-epoxide; rearrangement to the 4-bromophenol, hydration to the 3,4-dihydrodiol catalyzed by epoxide hydrolase, or conjugation with glutathione. When more 3,4-epoxide is produced than can readily be detoxified, cell injury increases. Lipid peroxide content in the liver was increased by bromobenzene, which was decreased when the methanol extract from the leaves of *Z. piperitum* and protocatechuic acid, isolated compound were treated to the rat. The methanol extract and protocatechuic acid reduced the activity of aniline hydroxylase that increased by bromobenzene, while did not affect the activities of aminopyrin N-demethylase and glutathione S-transferase. The extract and compound recovered significantly the activity of epoxide hydrolase activity decreased by bromobenzene. These results showed that the extract of *Z. piperitum* has antihepatotoxic activity in bromobenzene-intoxicated rats. We suggest that under our experimental conditions protocatechuic acid, one of the bioactive constituents might prevent the hepatotoxicity by reduction of the activity of aniline hydroxylase, an epoxide-producing enzyme along with enhancement of the activity of epoxide hydrolase, an epoxide-removing enzyme.

P14-118

DEVELOPMENT AND SAMPLING OF A NEW REFRESHING AND FUNCTIONAL DRINK

SHORT COMMUNICATION

**Effects of Crude Polysaccharide Frac
from Peels of *Citrus unshiu* on Intes
Immune System by Oral Administration**

**S. K. Kim, S. H. Shin, K. W. Yu, H. Y. Cho, B
Hong* and H. C. Yang**

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Running title: EFFECTS OF EXTRACTS FROM *CITRUS U
PEELS* ON INTESTINAL IMMUNE SYSTEM *IN VIVO***

* Correspondence to: Professor Bum-Shik Hong

Graduate School of Biotechnology,
Korea University, # 1, 5-ga, Anam-do
Sungbuk-gu
Seoul 136-701, Korea
E-mail: yukwon@hanmail.net

Manuscript Accepted in PHYTOTHERPY RESEARCH

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)잎으로부터 분리한 다당류의
Macrophage 활성화에 대한 연구

곽지은·김경임*·전우진*·홍범식*·신동훈*·조홍연*·양한철*
고려대학교 자연자원대학원, *고려대학교 생명공학원

Study on Macrophage-Stimulating Activity of the
Polysaccharide Isolated from Leaves of *Carthamus tinctorius* L.

Ji-Eun Kwak, Kyung-Im Kim*, Woo-jin Jun*, Bum-Shik Hong*,
Dong-Hoon Shin*, Hong-Yon Cho* and Han-Chul Yang*

Graduate School of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701,
Korea

*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

소제목 : 홍화의 Macrophage 활성화능

Corresponding author: Bum-Shik Hong,

Graduate School of Biotechnology, Korea University,
1,5-ka, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul, Korea

Phone: 82-2-3290-3926

Fax : 82-2-3290-3427

E-mail : bumshik@tiger.korea.ac.kr

* 한국식품과학회지 투고중.

2. 특허출원

관 인 생 략

출원번호통지서



1 3 5-5 1 3

받는사람 (대리인) 이덕록 (9-1998-000461-7)

주소 서울 강남구 역삼1동 700-19 에일빌딩 2층 (에일국제특허법률사무소)

출원일자 2001.09.27 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2001-0059993 접수번호 1-1-01-0249127-33

출원인 학교법인고려중앙학원 (2-1995-276862-2)

특 허 청 장

관 인 생 략

출원번호통지서



1 3 5-5 1 3

받는사람 (대리인) 이덕록 (9-1998-000461-7)

주소 서울 강남구 역삼1동 700-19 에일빌딩 2층 (에일국제특허법률사무소)

출원일자 2001.09.27 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2001-0059879 접수번호 1-1-01-0248488-21

출원인 학교법인고려중앙학원 (2-1995-276862-2)

특 허 청 장



919980004617



10111010000000000000

사 본
C O P Y

방식 심사 란	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2001.09.27

【발명의 국문명칭】 귤피로부터 분리한 장관면역 활성화능이 있는 다당류, 그
제조방법 및 그 용도

【발명의 영문명칭】 Polysaccharide from the citrus peel having gut immunity
activity, the process for preparation thereof and a
use thereof

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG, Bum-Shik

【주민등록번호】 541021-1004711

【우편번호】 110-530

【주소】 서울특별시 종로구 혜화동 15-162

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 양한철

【성명의 영문표기】 YANG,Han-Chul

【주민등록번호】 351230-1018412

【우편번호】 133-094

【주소】 서울특별시 성동구 금호동4가 180 삼산아파트 502호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CH0,Hong-Yon

【주민등록번호】 510921-1458517

【우편번호】 138-151

【주소】 서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 129동 404호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong-Hoon

【주민등록번호】 560227-1002521

【우편번호】 135-230

【주소】 서울특별시 강남구 일원동 716 목련아파트 106동 304호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 전우진

【성명의 영문표기】 JUN,Woo jin

【주민등록번호】 641215-1074419

【우편번호】 135-010

【주소】 서울특별시 강남구 논현동 9-7호 엘림빌라 501호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 유광원

【요약서】

【요약】

본 발명은 껍피 수추출물로부터 분리한 장관면역 활성화능이 있는 다당류, 그 제조방법 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명의 장관면역 활성화 다당류를 에탄올 30에서 75%의 분획화, 분자량 30만 이상의 한외여과, 음이온 교환수지 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 고속액체 크로마토그래피 등 일련의 정제공정을 실시함으로써 껍피 냉수추출물로부터 순수 분리한다. 이렇게 제조된 장관면역 활성화 다당류는 고분자의 다당류로서 장관면역 활성화능뿐만 아니라 항암효과도 가지고 있어 암환자나 면역저하 환자용의 기능성 식품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있다.



919980004617



10111010000000000000

사 본
C O P Y

방식 심사 사관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2001.09.27

【발명의 국문명칭】 홍화로부터 분리한 대식세포 활성화 다당류 및 그
제조방법 및 그 용도

【발명의 영문명칭】 Polysaccharide from the safflower having macrophage
activity, the process for preparation thereof and a
use thereof

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG, Bum-Shik

【주민등록번호】 541021-1004711

【우편번호】 110-530

【주소】 서울특별시 종로구 혜화동 15-162

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 양한철

【성명의 영문표기】 YANG,Han-Chul

【주민등록번호】 351230-1018412

【우편번호】 133-094

【주소】 서울특별시 성동구 금호동4가 180 삼산아파트 502호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CHO,Hong-Yon

【주민등록번호】 510921-1458517

【우편번호】 138-151

【주소】 서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 129동 404호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong-Hoon

【주민등록번호】 560227-1002521

【우편번호】 135-230

【주소】 서울특별시 강남구 일원동 716 목련아파트 106동 304호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 전우진

【성명의 영문표기】 JUN,Woo jin

【주민등록번호】 641215-1074419

【우편번호】 135-010

【주소】 서울특별시 강남구 논현동 9-7호 엘림빌라 501호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

이덕복



【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 3 항 205,000 원

【합계】 234,000 원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】 117,000 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 홍화 냉수추출물로부터 분리한 면역기능과 밀접한 관련이 있는 대식세포 활성화능을 갖는 다당류와 그의 정제방법에 관한 것이다. 본 발명의 대식세포 활성화 다당류는 에탄올 75%의 분획화, 분자량 30만 이상의 한외여과, 음이온 교환수지 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피 등 일련의 정제공정을 수행함으로써 홍화 냉수추출물로부터 순수 분리한다. 이렇게 제조된 대식세포 활성화 다당류는 고분자의 다당류로서 대식세포 활성화능 뿐만 아니라 항암효과도 가지고 있어 암환자나 면역저하 환자용의 기능성 식품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있다. 아울러 본 발명은 홍화를 농가 부수입원으로 재배할 수 있다는 측면에서 유용하다.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.