

유산균에 의해 변화된 황기-포스트바이오틱스 다당류가 대식세포에 미치는 영향

김연숙 · 신현영* · 정원비** · 하은지** · 구자평** · 신지영*** · †유광원****

한국교통대학교 식품영양학전공 대학원생, *고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, * (주)코시스바이오 연구소장, ****한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Effect of *Astragalus membranaceus*-postbiotics Polysaccharide Changed by Lactic Acid Bacteria on Macrophage

Yeon Suk Kim, Hyun Young Shin*, Won Bi Jeong**, Eun Ji Ha**,
Ja Pyeong Koo**, Ji-Young Shin*** and †Kwang-Won Yu****

Graduate School Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical & Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

**Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

***R&D Director, Cosis-Bio Co., Ltd., Jincheon 27867, Korea

****Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

To increase industrial applicability of *Astragalus membranaceus* (AM) as immunostimulating materials, hot-water extract (AME) was prepared from AM and fermented with Kimchi-lactic acid bacteria (*Lactobacillus sakei* & *Leuconostoc mesenteroides*) to prepare fermented AM-postbiotics (FAME). Although FAME prepared from AM-postbiotics did not show a significant enhancement in macrophage stimulating activity compared to non-fermented AME, crude polysaccharide (FAME-CP) fractionated by EtOH precipitation from FAME showed significantly higher macrophage stimulating activity than AME-CP. Compared to AME-CP, FAME-CP showed dramatic changes in component sugar and molecular weight distribution. FAME-CP was a polysaccharide with a major molecular weight distribution of 113.4 kDa containing Man (44.2%), Glc (19.3%), Gal (10.2%), GalA (10.2%), and Ara (7.4%) as sugar components. FAME-CP with enhanced macrophage stimulatory activity not only increased expression levels of mRNA genes encoding macrophage-activated factors (iNOS, TNF- α , MCP-1, IL-6, and COX-2), but also led the nuclear translocation of activated p65 and c-Jun. In conclusion, crude polysaccharide from AM-postbiotics fermented with lactic acid bacteria could increase industrial applicability as a functional material with enhanced immunostimulating activity than AME-CP.

Key words: *Astragalus membranaceus*, lactic acid bacteria, postbiotics, macrophage, crude polysaccharide

서 론

코로나 19, Mpox(엡폭스)와 같은 감염병의 확산으로 인해 건강을 스스로 진단하고 관리하는 셀프 메디케이션(self-medication) 트렌드가 확산하고 있으며, 이에 따라 면역 관련

건강기능식품에 대한 관심이 증가하고 있다(Kim 등 2021; Kim 등 2023a). 지금까지 면역 기능을 증진시키는 원료로는 생약(Lee 등 2004), 천연물(Shin 등 2021) 및 프로바이오틱스(Seo & Lee 2007) 등이 보고되고 있는데, 특히 생약은 자연으로부터 동물, 광물, 미생물 등에서 얻은 자원을 건조 및 정제

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

등의 가공을 통해 의약품으로 사용하거나 의약품의 원료로 쓰는 것을 말하며, 이는 낮은 부작용과 적은 독성을 가지고 있어 한국을 포함한 동양권에서 민간요법 및 한방 등의 약제로 사용되어 왔다(Lee & Rhee 2015; Shin 등 2021). 이러한 생약 중 하나인 황기(*Astragalus membranaceus*)는 대한민국 약전에 수록되어 있는 콩과(Leguminosae)에 속하는 여러해살이 다년생 초본식물로, 단너삼으로도 불리고 있으며, 한국, 중국 등 아시아 지역과 유럽 및 아프리카 일부 지역에서 자생하고 있는 것으로 알려져 있다(Kim 등 2007; Tran 등 2017). 황기는 사포닌, 폴리페놀 및 플라보노이드 계열의 저분자 물질과 고분자의 다당류 등 약리적인 활성을 갖는 성분을 다량 함유하고 있는데(Bae HK 2021), 특히, 황기 다당류(*Astragalus polysaccharide*; APS)에는 글루칸 및 이형 다당류(heteropolysaccharide) 등을 함유하고 있어 면역 촉진제 또는 조절제로 활용될 뿐만 아니라, 항종양, 항노화, 혈당 조절 및 항바이러스 등의 약리적인 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Zheng 등 2020).

최근, 생약 및 천연물의 생리활성 증대를 위한 목적으로 발효를 통한 생물학적 전환기법을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있으며(Sung 등 2013; Jeong 등 2017; Kim 등 2019), 이를 기능성 소재로 산업화하고 제품을 개발하기 위한 노력이 끊이지 않고 있다. 특히, 프로바이오틱스(probiotics)와 같은 유산균 발효를 통한 postbiotics 제조는 생리활성의 증진에 크게 기여하는 장점이 있어, 이를 개발하여 기능성 식품의 소재로 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있는 것으로 알려져 있다(Ha 등 2010; Shin 등 2022). 한편, 프로바이오틱스는 적정량을 섭취하였을 때 몸에서 유익한 효과를 내는 균을 의미하는 반면, 포스트바이오틱스(postbiotics)는 미생물 자체의 균체 성분과 함께 그들이 생산하는 대사산물을 포함하여 인체에 유익한 영향을 미치는 기능성 대사산물을 가리킨다(Kim & Park 2021). 현재, 대부분의 프로바이오틱스는 산에 취약하여 위산 및 담즙산에 의해 쉽게 사멸된다고 알려져 있으나(Chang 등 2015), 포스트바이오틱스는 비교적 프로바이오틱스에 비해 안정하다고 보고되고 있으며, 천연물에 발효를 접목하여 제조한 포스트바이오틱스의 기능성 소재화에 대한 연구가 관심을 받고 있다(Kim 등 2022a; Shin 등 2022; Kim 등 2023b). 현재, 유산균에 의해 조제된 포스트바이오틱스는 염증 및 면역조절, 유해균 억제, 정장작용, 항암 및 항균작용 등의 약리적인 효능이 보고되고 있다(Cuevas-González 등 2020; Kim 등 2022a). 한편, 다양한 유산균이 분포하는 김치에는 주로 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Weissella* 속 등의 유산균들이 발효에 관여하고 있는데(Kang 등 2019), 이들 균체는 면역증강, 종양 억제, 항돌연변이, 항비만 등의 다양한 효능을 가지는 것으로 알려져 있다(Lee 등

2016).

본 연구는 코로나 19와 같은 감염병 유행에 따라 면역 관련 식품 및 기능성 식품의 소비 추세가 증가하면서 면역 활성이 증진된 생약재-환을 제조/판매하고 있는 산업체로부터 면역 활성이 증진된 새로운 환 제품을 출시하기 위한 소재를 개발하기 위해 진행되었다. 따라서, 생약재 환 원료로서 많이 사용되고 있는 황기(*A. membranaceus*)의 열수추출물을 이용하여 시판 김치로부터 분리한 *Lactobacillus sakei* 및 *Leuconostoc mesenteroides*(Kim 등 2022a)를 접종하고 발효시켜 황기-포스트바이오틱스를 제조하고, 비발효 황기와 *in vitro* 상에서 대식세포 활성을 비교하여 면역활성이 증진된 생약-포스트바이오틱스 소재를 이용하여 산업적으로 활용 가능한 면역활성 소재의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 황기 열수추출물과 황기-포스트바이오틱스 조제 및 조다당 획분의 분획

본 연구에서는 2022년 경기도에서 재배된 황기(*A. membranaceus*; AM)를 (주)에이치푸드(Pocheon, Korea)에서 구매하여 -70°C (Ilshin Biobase, Seoul, Korea)에서 보관하면서 사용하였다. 황기 열수추출물(AME)은 건조물 중량의 20배(w/v) 물을 가하여 decoction 방법으로 추출 및 원심분리(8,000 rpm, 4°C , 20 min, Gyrogen Co., Ltd., Daejeon, Korea) 후 상등액을 회수하고 여과하여(Advantec, Tokyo, Japan) 불용성 침전물을 제거하고, 여과액을 감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축 후 동결건조(Ilshin Biobase, Seoul, Korea)하여 조제하였다. 다음으로 황기-포스트바이오틱스(FAME)는 (주)코시스바이오(Jincheon, Korea)에서 Kim 등(2022a)이 시판 김치에서 분리·동정한 유산균(*Lactobacillus sakei*와 *Leuconostoc mesenteroides*)을 AME에 1×10^7 CFU/mL 접종하여(5% 비율) 35°C 에서 24시간 배양하고 121°C 에서 15분간 멸균한 후 원심분리(8,000 rpm, 4°C , 20 min)로 상등액을 회수하여 농축 및 동결건조로 조제하였다. 다음으로 AME와 FAME는 소량 증류수로 용해시키고 95% 주정을 5배(w/v) 첨가하여 충분히 교반한 후 원심분리를 통해 침전물을 회수하고 투석(MWCO 12-14 kDa, Spectrum Lab. Inc., Rancho Dominguez, CA, USA), 농축 및 동결건조로 황기 열수추출물 조다당 획분(AME-CP)과 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분(FAME-CP)으로 각각 분획하였다(Fig. 1).

2. 세포주 배양 조건 및 대식세포 자극활성

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Korea)에서 RAW 264.7 대식세포주를 입수하여 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX,

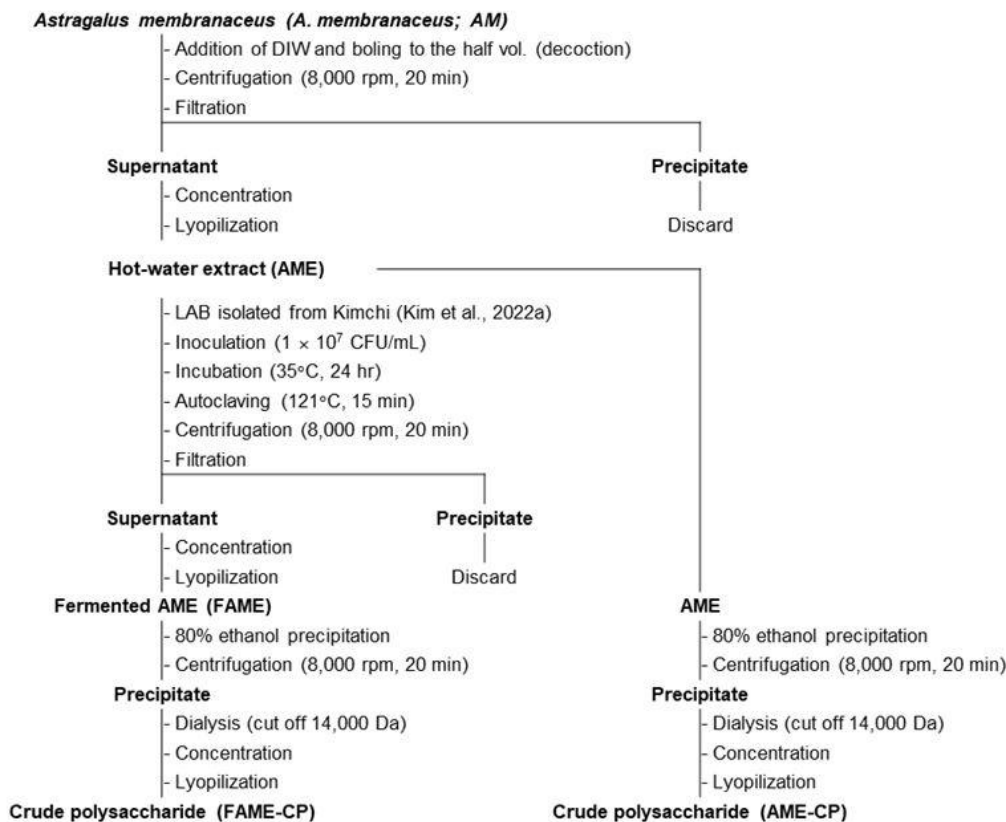


Fig. 1. Fractionation scheme of crude polysaccharide isolated from AME and FAME.

USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양을 진행하였다. 대식세포 활성화를 확인하기 위해 RAW 264.7을 2×10⁶ cells/mL로 96-well plate에 200 μL씩 각각 분주하여 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 안정화시켰다. 이후, 부착된 세포를 제외하고 상등액을 모두 제거하고 serum-free DMEM(SFM)과 적절한 농도로 희석한 시료를 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 이후 산화질소(nitric oxide; NO)는 griess assay(Tursun 등 2016)로, tumor necrosis factor (TNF)-α(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), monocyte chemoattractant protein(MCP)-1(BD biosciences, San Diego, CA, USA) 및 interleukin(IL)-6(BD biosciences) 등은 sandwich ELISA 방법을 이용하여 분석을 진행하였으며, 각각 sodium nitrate 및 reference standard로 표준 곡선을 그려 함량을 계산하였다. 또한 시료처리에 따른 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Invitrogen) 시약을 이용하여 측정하였으며, 무처리군(negative control; NC) 대비 세포 생존율(viability; %)로 나타냈다.

3. 구성분 및 구성당 분석

비발효 황기 및 황기-포스트바이오틱스 조다당획분의 구성분 분석은 DuBois 등(1956)의 phenol-sulfuric acid법으로 증성당을, Blumenkrantz & Asboe-Hansen(1973)의 *m*-hydroxybiphenyl 법을 이용해 산성당 함량을 분석하였으며, 표준물질로 glucose (Glc; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 glucuronic acid (Glc A; Sigma Aldrich)를 이용하여 w/w(%)으로 나타냈다. 단백질 함량은 Bradford MM(1976)의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA; Invitrogen)을 표준물질로서 사용하여 분석하였으며, 총 폴리페놀 함량 분석은 표준물질로 gallic acid(Sigma Aldrich)를 사용하여 Kim 등(2016)의 방법을 이용하여 분석하였다. 또한, 조다당획분의 구성당 분석은 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법을 참고하여 먼저, 시료에 2 M trifluoroacetic acid(TFA; Sigma Aldrich)를 처리하여 aldose 단위로 분해하고 0.3 M NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline (PMP; Sigma Aldrich)을 가하여 단당류와 PMP를 결합시킨 유도체로 전환시켰다. 이후 0.3 M HCl를 가하여 유도체를 중화시키고 물 및 chloroform(2상 용매계)으로 분리 및 추출한 후 물 층만을 분리하여 PVDF membrane filter(0.45 μm, Jaema Trade Inc., Gwangwon, Korea)로 여과하여 HPLC로 분석을 진

행하였다. HPLC 분석에 사용된 조건은 Table 1에 나타냈으며, 분석 결과는 peak area와 response factor를 이용하여 mole %로 계산하였다.

4. 분자량 분포

비발효 황기와 황기-포스트바이오틱스 조다당획분의 분자량 분포는 high performance size exclusion chromatography (HPSEC)로 평가하였다. 즉, 적당한 농도로 희석한 시료를 PVDF membrane filter로 여과하고 Table 1의 조건으로 분석하였는데, 표준물질은 galactose(Gal; Sigma Aldrich) 및 다양한 분자량의 pullulan(Shodex, Tokyo, Japan)을 이용하였고, retention time(RT)를 통해 표준곡선을 작성한 후 시료의 RT와 비교하여 kDa으로 계산하였다.

5. qRT-PCR을 이용한 대식세포 활성화 인자의 mRNA 유전자 발현량 분석

RAW 264.7 세포를 8×10^5 cells/mL로 60 mm dish에 5 mL씩 각각 분주하고 배양기에서 monolayer를 형성할 때까지 세포를 안정화하였다. 이후 배양 상등액을 모두 제거하고 SFM과 일정한 농도로 희석한 시료를 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양 완료 후 상등액을 완전히 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)을 이용하여 세척하고 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며, 분리된 RNA는 260 및 280 nm의 범위에서 Nanoquant Infinite M200 Pro(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 흡

광도를 측정하여 정량하였다. 한편, cDNA 합성은 ReverTraAce qPCR RT Master Mix kit(Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하였다. mRNA 발현은 SYBR green PCR kit(Toyobo)를 제조사의 방법에 따라 사용하여 real-time PCR분석을 진행하였으며, Quant Studio 3 real-time PCR system(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)으로 분석하였다. 각각의 유전자 발현은 동일한 시료를 처리한 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 발현량을 이용하여 보정하였으며, 자세한 primer sequence는 Table 2에 나타냈다.

6. 면역 형광법을 이용한 대식세포 활성화 관련 전사인자의 관찰

대식세포 내 대표적인 신호전달 전사인자인 NF- κ B(p65)와 AP-1의 전사인자 중 하나인 cJun의 핵 내로의 이동 여부는 면역형광법을 이용해 육안으로 확인하였다. 즉, 24-well plate 안에 12 mm cover slip을 각각 넣고 0.1% gelatin을 500 μ L씩 분주하여 30분간 방치하고, 여분의 상등액은 제거하였다. 이후 RAW 264.7 세포주를 2.2×10^5 cells/mL로 조정하여 각각 900 μ L를 분주하고 배양기에서 3시간 동안 안정화를 진행하였으며 시료를 100 μ L 처리한 후 다시 배양기에서 3시간 동안 재배양하였다. 배양 후 4% formaldehyde(Sigma Aldrich)를 500 μ L씩 가하고 15분간 방치하여 고정하였으며, 이후 각 well 안에 300 μ L의 5% BSA(in 0.1% Trion X-100; Sigma Aldrich/1 \times PBS)를 처리하여 암소에서 1시간 동안 반응시켰다. 다음으로 PBS를 이용하여 세척한 뒤 1차 항체(p65 및

Table 1. HPLC analytical condition for component sugar and molecular weight distribution of crude polysaccharide isolated from AME and FAME

Analysis	Component sugar (A)	Molecular weight (B)
HPLC system	Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Germany)	Agilent 1260 Infinity series (Agilent Technologies Co., Ltd., Palo Alto, CA, USA)
Column	YMC-Triart C18 (YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)	Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, MA)
Column size	250 \times 4.6 mm, 5 μ m	300 \times 10 mm, 8.6 μ m
Column temperature	30 $^{\circ}$ C	Room temperature (RT)
Flow rate	1.0 mL/min	0.5 mL/min
Eluent	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7):Acetonitrile 82:18	50 mM ammonium formate
Injection volume	20 μ L	20 μ L
Detector	UV/Vis Detector (Dionex, Idstein, Germany)	Refractive Index Detector (RID) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
Integrator	Chromleon 7	Agilent Chemstation

Table 2. The primer sequence of the mouse for qRT-PCR

Genes	Primer	Primer sequence (5'→3')	Accession number
<i>iNOS</i>	Forward	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	NM_010927.4
	Reverse	ACGTTCTCCGTTCTCTTGACAG	
<i>TNF-α</i>	Forward	CCCACGTCGTAGCAAACCA	NM_013693.3
	Reverse	CTTTGAGATCCATGCCGTTGG	
<i>MCP-1</i>	Forward	CTGCATCTGCCCTAAGGTCT	NM_011333.3
	Reverse	AGTGCTTGAGGTGGTTGTGG	
<i>IL-6</i>	Forward	TCACAGAGGATAACCACTCCC	NM_031168.2
	Reverse	GAATTGCCATTGCACAACCTCTT	
<i>COX-2</i>	Forward	TGAGTACCGCAAACGCTTCT	NM_011198.4
	Reverse	CAGCCATTTCTTCTCTCTCTGT	
<i>GAPDH</i>	Forward	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	NM_001289726.1
	Reverse	CCAATACGGCCAAATCCGTTTC	

cJun; Cell signaling, Denvers, MA, USA)를 처리하여 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2차 항체(Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG; Cell signaling)를 처리하여 암실에서 70분 동안 반응시키고 cover slip을 분리하여 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 slide glass에 함께 처리한 다음 광학현미경(IX73; Olympus, Waltham, MA, USA)를 이용하여 세포의 형태를 육안으로 관찰하였다.

7. 통계처리

모든 시험은 3회 반복하여 분석하였으며, 결과는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. RAW264.7의 대식세포 자극 활성화 및 유전자 발현량은 SPSS V26(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's *t*-test로 계산하여 각각 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 또한, 시료의 화학적 특성 중 구성분 분석의 경우, 성분간 유의성 평가를 위해 ANOVA를 실시하여 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 황기-포스트바이오틱스의 대식세포 자극 활성화 비교평가

본 연구에서 이용된 마우스 유래 RAW 264.7 대식세포주는 선천면역계에서 중추적인 역할을 수행하며, 외부물질의 침입에 대한 방어막 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Yu 등 2012). 또한, 활성화된 대식세포는 탐식작용과 함께 다양한 사이토카인과 케모카인의 분비작용을 통해 외부의

물질로부터 숙주를 보호하고 면역체계를 조절한다(Son 등 2022). 본 연구에서는 대식세포 자극 활성을 검토하기 위하여 먼저, RAW 264.7 세포주에 대한 황기 열수추출물(AME) 및 황기-포스트바이오틱스(FAME)의 대식세포 활성을 비교 평가하였다. 먼저, Fig. 2A에 시료 처리에 따른 RAW 264.7 세포주의 세포독성 평가를 나타냈다. 황기 열수추출물 및 황기-포스트바이오틱스는 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 NC 대조군 대비 80% 이상의 세포 생존율을 나타냄으로써, 시료 처리에 따른 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다 (López-García 등 2014). 이후 대식세포 활성화 관련 인자인 NO, TNF- α , MCP-1 및 IL-6의 생성능을 평가하였다. 먼저, 면역계에서 외부물질에 대한 체내 방어 물질로 알려진 NO의 생성능을 평가한 결과(Fig. 2B), 양성 대조군으로 이용된 LPS 처리군은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NC 대조군(5.6 μM) 대비 74.6 μM (약 13.3배 증가)의 생성능을 나타내었고, AME는 50과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 14.7과 33.7 μM (2.6과 6.0배 증가)의 농도-의존적인 생성능을 나타내었으나, FAME는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서만 8.5 μM (1.5배 증가)의 생성능을 나타내었다. 또한, TNF- α , MCP-1 및 IL-6 생성능에서도(Fig. 2C~Fig. 2E), AME는 50과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 FAME에 비해 통계적으로 우수한 TNF- α 및 MCP-1 생성능을 나타냈을 뿐만 아니라, IL-6의 경우에도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 FAME보다 통계적으로 유의한 생성능이 확인되었다. AME 및 FAME간 대식세포 자극 활성을 비교한 결과, AME가 FAME에 비해 통계적으로 우수한 면역자극 활성을 보였는데 이는 열수추출물에는 폴리페놀, 플라보노이드 및 유리당 등의 저분자 물질과 고분자 물질이 혼재되어 있어, 고분자 계열의 물질이 대식세포 활성화에 활성물질로 작용한다는 여러 연구의 보고

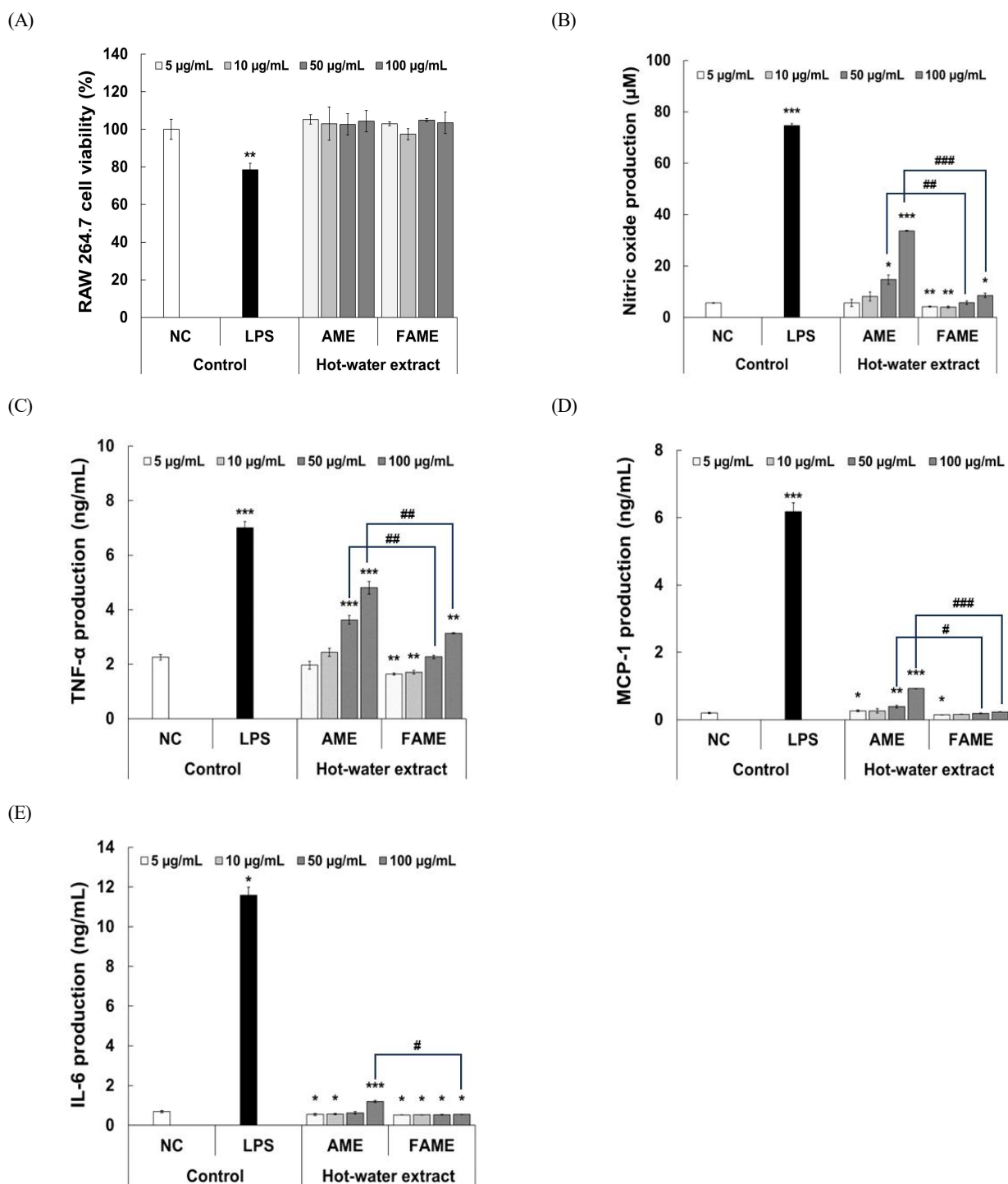


Fig. 2. Macrophage stimulating activity of AME and FAME. RAW 264.7 cells were treated with AME and FAME for 24 hr, and evaluated cytotoxicity effect (A), and production of nitric oxide (B), TNF- α (C), MCP-1 (D), and IL-6 (E). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent tests in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant differences between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. The crosshatch patterns expressed significant differences between samples within the same concentrations. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; negative control, LPS; lipopolysaccharide (1 μ g/mL); positive control, AME; hot-water extracts from AM, FAME; AM-postbiotics.

(Hwang & Shin 2008; Lee H 2012)로부터, 저분자 물질의 존재가 면역활성화에 방해를 가져오는 것으로 추정할 수 있었다. 따라서, 비발효 황기 AME와 FAME의 저분자 물질을 제거하고 고분자 물질을 증가시키기 위하여, 가장 빠르고 간단하게 선택적으로 고분자 물질만을 분리할 수 있는 것으로 보고된 주정 침전법(Shin 등 2021)으로 조다당획분을 분획한 후 대식세포 자극 활성을 재평가하였다.

2. 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분의 대식세포 자극 활성 비교평가

일반적으로 열수추출물에 주정을 첨가하여 얻은 침전물은 주로 고분자인 다당류 또는 단백질다당을 포함하고 있는데, 이러한 고분자물질은 대식세포 활성화에 관여한다고 보고되고 있다(Kim 등 2010). 따라서, 본 연구에서는 비발효 황기 열수추출물(AME)과 AME에 김치 유산균을 발효시켜 조제한 황기-포스트바이오틱스(FAME)에 고분자 물질만을 선택적으로 분리하기 위해 주정 침전법을 이용하여 조다당 획분(AME-CP와 FAME-CP)을 분획한 후 대식세포 활성화를 평가하였다. 먼저 시료처리에 대한 세포독성 평가를 분석한 결과(Fig. 3A), 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NC 대조군 대비 세포 생존율이 80% 이상인 것은 물론이고, 모든 시료의 대부분 농도에서 오히려 NC 대조군 대비 통계적으로 유의한 대식세포주의 증식능을 확인할 수 있었다. 이러한 대식세포 증식능은 탐식작용 증가, NO 및 다양한 cytokine 분비와 함께 면역작용을 증진에 크게 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있어(Yu 등 2012), 황기 열수추출물과 황기-포스트바이오틱스로부터 분리된 조다당 획분은 면역 작용을 증진시키는 대식세포 활성화에 기여할 수 있을 것으로 판단되었다. 대식세포 활성화와 관련되어 있는 인자 중 먼저, NO의 생성능을 확인한 결과(Fig. 3B), AME-CP는 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NC 대조군 대비 32.9~39.5 μM (1.1~1.3배 증가)의 생성능을 보였고 FAME-CP는 35.2~43.5 μM (약 1.2~1.5배 증가)로 유의적으로 AME-CP와 유사한 NO 생성능을 나타냈다. 그러나 TNF- α 와 MCP-1의 생성능(Fig. 3C, Fig. 3D)에서는 NO 결과와 달리, FAME-CP가 AME-CP에 비해 각각 NC 대조군 대비 478.4~1,412.0 pg/mL (4.7~14배) 및 677.4~1,988.9 pg/mL (1.4~4.0배)의 유의적으로 우수한 생성능을 나타냈다. 또한, 감염이나 조직손상에 의해 항상성이 파괴되면서 면역반응 활성화를 통해 숙주 방어에 기여하는 IL-6의 생성능 결과(Fig. 3E)에서는, AME-CP가 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 모든 농도에서 NC 대조군(90.2 pg/mL) 대비 100.0 pg/mL (1.11배 증가) 수준의 생성능을 나타낸 반면, FAME-CP는 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 AME-CP와 유사한 생성능을 나타내었으나, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 NC 대조군 대비 284.1 pg/mL (3.15배 증가)로 AME-CP보다 통계적으로 우수한 IL-6 생성

능을 나타냈다. Kim 등(2018)의 연구에서 보리에 효모 및 유산균 등의 접종을 통해 발효되어 얻어진 조다당 획분이 우수한 대식세포 자극 활성을 나타냈다는 보고는 본 연구결과와 유사하였는데, 이는 발효를 통한 활성 성분의 변화가 대식세포 활성화에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 결론적으로, 주정 침전을 통해 얻은 FAME-CP는 AME-CP에 비해 모든 바이오 마커에서 통계적으로 우수한 대식세포 자극 활성을 나타내었는데, 발효가 대식세포 활성화 물질의 변화를 초래하여 면역활성을 증진시킨 것으로 추정되어 포스트바이오틱스의 조제 및 조다당 획분 소재의 산업적 활용이 가능할 것으로 판단되어, 조다당 획분에 대한 구성분 및 구성당 분석을 진행하였다.

3. 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분의 구성분 및 구성당 분석

AME-CP와 FAME-CP에 함유되어 있는 구성분 분석 결과는 Table 3에 나타내었다. AME-CP의 경우에는 중성당이 87.8%로 주성분이고 산성당은 11.4% 함유되었으며, 단백질(0.5%)과 총 폴리페놀(0.3%)은 소량 함유되어 있었다. 한편, FAME-CP의 경우에는 중성당 74.4%와 산성당 18.6%로 AME-CP와 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았으나 중성당은 감소하면서 산성당이 증가하였고, 단백질과 총 폴리페놀은 4.7% 및 2.3%로 증가되어 이러한 구성분의 변화는 발효에 따른 고분자 변화 및 유산균 대사물로부터 기인하는 것으로 확인할 수 있었다. 한편, HPLC를 이용한 구성당 분석(Table 3)의 결과에서, 먼저 AME-CP는 glucose(Glc)가 83.1%로 주 구성당임을 확인하였고, 그 외 galacturonic acid(GalA, 7.1%), galactose(Gal, 3.2%) 및 arabinose(Ara, 3.0%) 소량 함유되어 glucan-type의 다당류가 주로 분포하는 것으로 확인되었다. 그러나 면역활성이 증진된 FAME-CP는 mannose(Man)가 44.0%로 주 구성당임을 보였고 그 외에도 Glc(19.3%), Gal(11.6%), GalA(10.2%) 및 Ara(7.4%)가 함유되어 비발효 황기 조다당과는 다른 다당류 분포를 나타내어 유산균이 발효 중 다당류의 변화를 초래한 것으로 확인되었다. Shahrajabian 등(2019)의 연구에서는 황기 다당류에는 starch, inulin 및 cellulose 등 다양한 다당류가 분포한다고 알려져 있는데, 본 연구결과와 빗대어 볼 때, AME-CP의 높은 Glc의 함량은 starch 및 cellulose 등의 알파 혹은 베타 글루칸 타입의 다당류가 분포하는 것으로 추정되었다. 한편, FAME-CP는 Glc 현저한 감소와 Man의 증가를 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 김치 유래 유산균 *Lactobacillus sakei* 및 *Leuconostoc mesenteroides*이 글루칸 타입의 다당류를 분해하여 새로운 대사산물의 생성을 유도하는 것으로 보인다. Kim 등(2022b)의 연구에 따르면, 유산균 중 *Lactobacillus* spp. 및 *Leuconostoc*

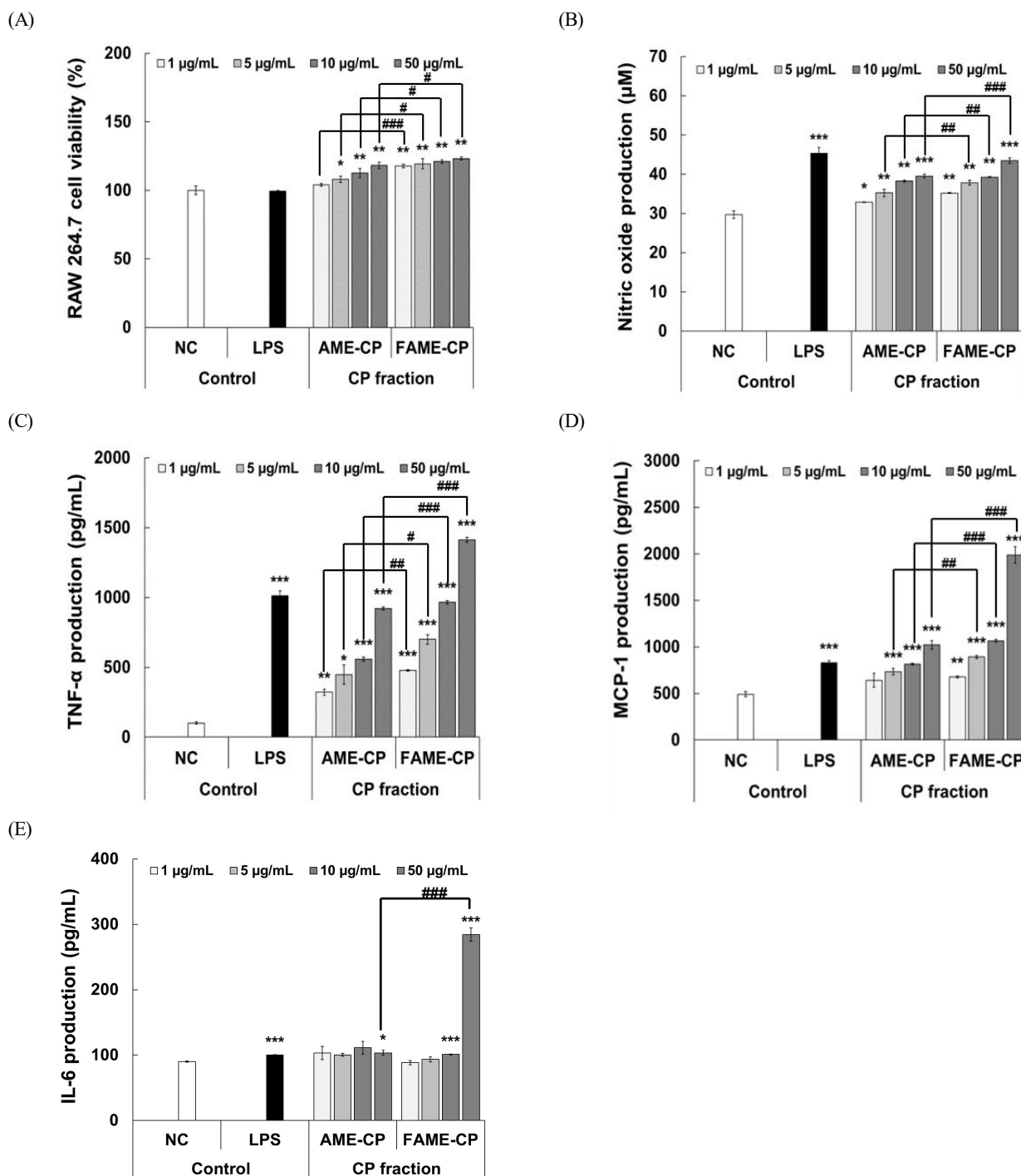


Fig. 3. Macrophage stimulating activity of crude polysaccharide isolated from AME and FAME. RAW 264.7 cells were treated with crude polysaccharide isolated from AME and FAME for 24 hr, and evaluated cytotoxicity effect (A), and production of nitric oxide (B), TNF- α (C), MCP-1 (D), and IL-6 (E). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent tests in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant differences between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. The crosshatch patterns expressed significant differences between samples within the same concentrations. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; negative control, LPS; lipopolysaccharide (1 µg/mL); positive control, AME; hot-water extracts from AM, FAME; AM-postbiotics, CP; Crude polysaccharide.

Table 3. Chemical property and component sugar of crude polysaccharide isolated from AME and FAME

Chemical property	Crude polysaccharide	
	AME-CP	FAME-CP
Neutral sugar (%)	87.8±1.3 ^{a1)}	74.4±0.6 ^a
Uronic acid (%)	11.4±0.3 ^b	18.6±0.3 ^b
Protein (%)	0.5±0.1 ^c	4.7±0.4 ^c
Polyphenol (%)	0.3±0.1 ^c	2.3±0.3 ^d
Monosaccharide	Component sugar (mol %)	
Mannose	0.8±0.0	44.2±0.1
Rhamnose	1.2±0.0	2.3±0.0
Glucuronic acid	1.4±0.0	2.5±0.1
Galacturonic acid	7.1±0.0	10.2±0.3
Glucose	83.1±0.0	19.3±0.1
Galactose	3.2±0.0	11.6±0.1
Xylose	0.2±0.0	1.1±0.1
Arabinose	3.0±0.0	7.4±0.0
Fucose	0.1±0.0	1.5±0.0

¹⁾ Means with different small letters in the same column are significantly different between groups at $p < 0.05$ level through one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

spp. 등의 균주가 발효 과정에서 Glc를 분해하여 새로운 대사산물을 생성한다고 보고하여 이를 뒷받침하고 있으며, 분해하여 새롭게 생성된 mannan 타입의 대사산물이 대식세포 활성화를 효과적으로 유도하는 것으로 추정되었다. 한편, 김치 유산균이 발효를 통해 직접적으로 다당류의 변화를 관여하는지의 여부는 추후 FAME-CP의 대식세포 활성 다당획분을 다양한 open chromatography 등의 방법을 통해 정제하여 동정한 후 김치 유산균 대사과정에서의 상관성을 밝혀 규명하고자 한다.

4. 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분의 분자량 분포

AME-CP와 FAME-CP의 분자량 분포를 확인하기 위해 HPSEC를 이용하여 분석한 결과, AME-CP의 분자량 분포는 0.2, 0.4, 106.6 kDa의 물질이 혼재되어 있는 것이 확인된 반면, FAME-CP는 0.2, 0.4, 113.4 kDa의 물질이 혼재되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4). AME-CP와 비교하여 FAME-CP는 0.2~0.4 kDa의 물질이 크게 감소된 것을 확인할 수 있었는데 이는 유산균의 발효를 통해 0.2~0.4 kDa의 물질이 분해되어 새로운 대사산물의 생성을 유도하는 것으로 추정되었다. 이러한 분자량 분포결과를 구성당 결과와 함께 종합해보면, 유산균 발효는 주로 저분자를 구성하고 있는 Glc가 Man를 주

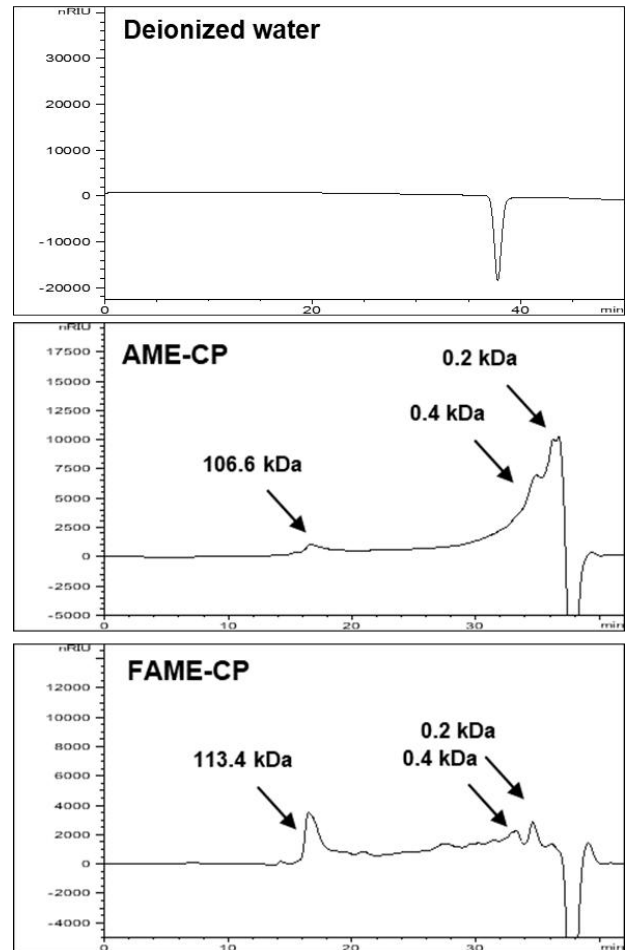


Fig. 4. Molecular weight distribution chromatogram of crude polysaccharide isolated from AME and FAME.

요 구성당으로 함유하는 대사산물의 생성을 유도하고, 이러한 Man의 주 구성당 다당류가 대식세포 활성화에 기여하는 것으로 추정되었다. 향후 이러한 발효 중의 다당 생성 및 변화 등 및 이들이 대식세포 활성화에 기여하는 기전에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 판단되나, FAME-CP가 면역 자극 활성을 나타내는 생약-포스트바이오틱스 소재로의 활용될 가능성은 제시할 수 있음이 확인되었다.

5. 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분에 의한 대식세포 활성화 인자의 유전자 발현량 분석

황기-포스트바이오틱스 조다당 획분은 대식세포 활성화 인자인 NO, TNF- α , MCP-1 및 IL-6의 생성능을 비발효 황기 조다당 획분에 비해 효과적으로 자극하는 것을 확인하였다. FAME-CP의 대식세포 활성 측정의 또 다른 방법으로 FAME-CP 처리에 따른 활성화 인자의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다(Fig. 5). 먼저, NO 생성에

관여하는 중요한 효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 mRNA 유전자 발현량에서 FAME-CP는 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 119.4-1,209.5배의 농도-의존적인 mRNA 발현의 증가를 확인할 수 있었다. TNF- α 의 mRNA 발현량도 FAME-CP 처리 시 동일 농도 범위에서 NC 대조군 대비 7.9-45.1배의 농도-의존적으로 mRNA 발현량을 증가시켰다. 또한, MCP-1 및 IL-6의 mRNA 발현량도 NC 대조군 대비 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서는 농도-의존적으로 1.3-33.5 배 및 602.2-1,787.2배의 mRNA 발현량의 증가를 유도했다. 한편, prostaglandin E2와 같은 면역 매개체를 생산하여 면역 활성을 유도하는 cyclooxygenase-2(COX-2)도 NC 대조군 대비 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 645.7-1,046.3배의 농도-의존적인 mRNA 발현량의 증가를 나타냈다. 이러한 결과로부터, FAME-CP는 대식세포 활성화 관련 인자들의 mRNA의 유전자 발현량 증가를 유도하여 세포 외로 분비되는 대식세포

활성화 인자의 생성을 촉진하는 것으로 확인되어 이러한 기작에 관련되어 있는 핵심 신호전달 경로를 확인하고자 하였다.

6. 황기-포스트바이오틱스 조다당 획분에 의한 p65 및 cJun의 핵 내로의 전이

FAME-CP의 처리에 따른 대식세포 활성화 기작을 확인하기 위하여 대표적인 대식세포 활성화 기작인 NF- κB 및 mitogen activated protein kinase(MAPK)의 활성화를 면역형광법을 이용하여 육안으로 분석하였다(Kim 등 2018). NF- κB 신호전달 경로는 NF- κB subunit인 p65의 인산화를 유도하여 I $\kappa\text{B}\alpha$ 의 인산화와 분해를 유도하고 인산화된 p65는 핵 내로 이동하는 것으로 알려져 있다(Janssen-Heininger 등 2000). 또한, MAPK의 전사인자인 activator protein-1(AP-1) 중 cJun은 대식세포가 자극되어 활성화가 유도되면 자극에 의해 인산화가 유도되고 핵 내로 이동하여 대식세포를 활성화에 관여

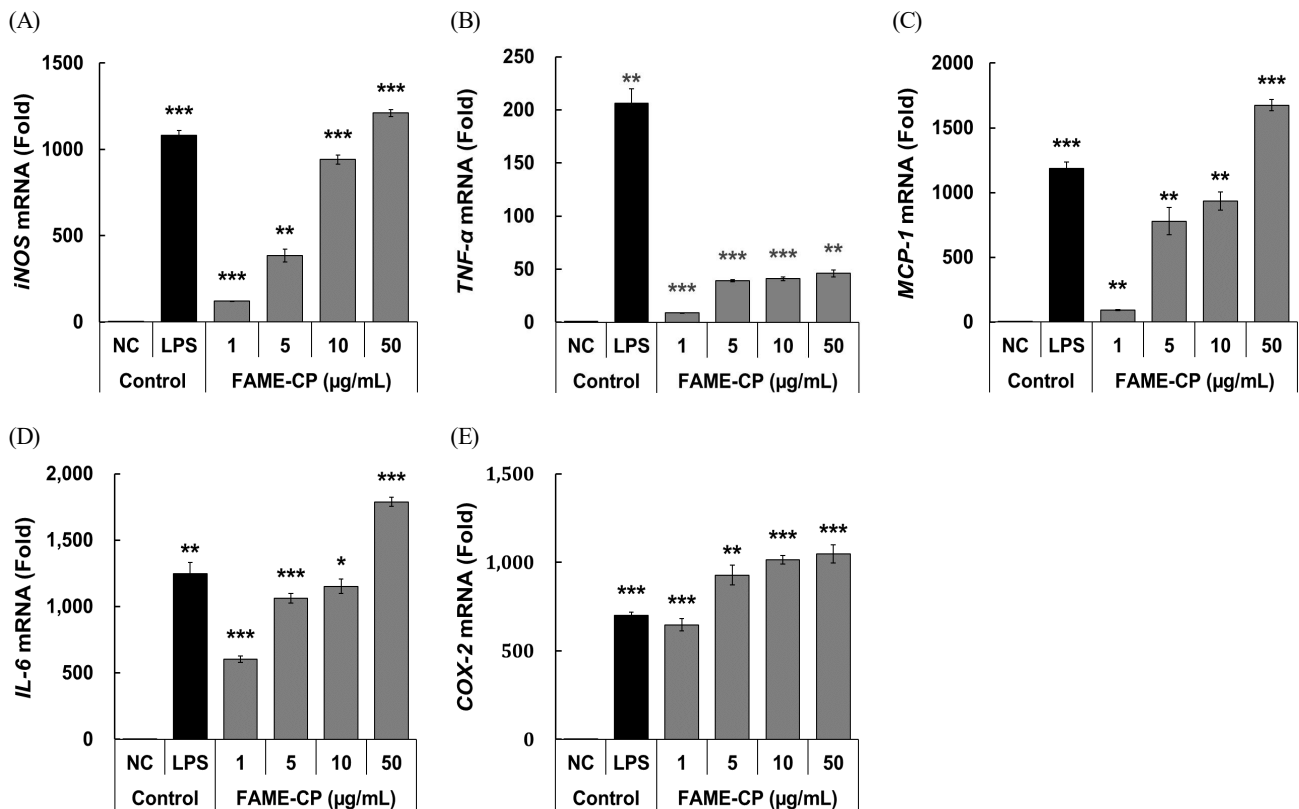


Fig. 5. Effect of FAME-CP on macrophage stimulating factors-mRNA gene expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with FAME-CP for 24 hr and evaluated mRNA gene expression of iNOS (A), TNF- α (B), MCP-1 (C), IL-6 (D), and COX-2 (E). Results are expressed as mean \pm S.D. of three independent tests in triplicate. Different asterisks on the column indicate significant differences between negative control (NC) and each group by Student's *t*-test. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. NC; negative control, LPS; lipopolysaccharide (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); positive control, FAME; AM-postbiotics, CP; crude polysaccharide.

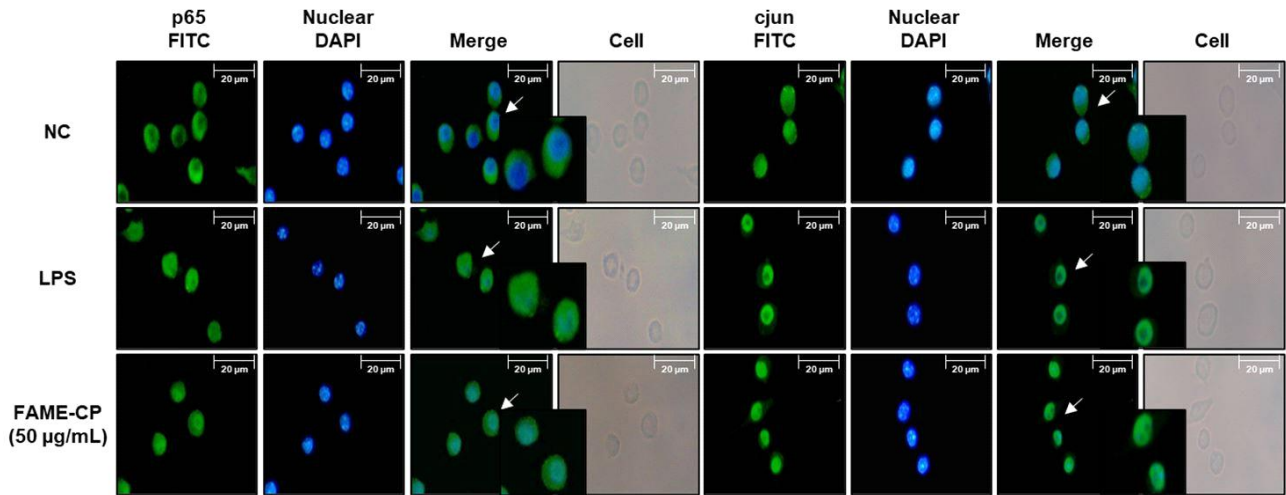


Fig. 6. Effect of FAME-CP on nuclear translocation of activated p65 and cJun in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were seeded into 0.1% gelatin-coated coverslip and then treated with FAME-CP for 3 hr. RAW 264.7 cells were fixed and immunostained with FITC conjugated anti-p65 and anti-cJun antibody and the nucleus was counterstained with DAPI. NC; negative control, LPS; lipopolysaccharide (1 $\mu\text{g/mL}$); positive control, FAME; AM-postbiotics, CP; crude polysaccharide.

하는 것으로 알려져 있다(Choo 등 2017). 따라서, 이러한 기작의 관여 여부를 육안으로 관찰하고자, RAW 264.7 세포주에 FAME-CP를 처리한 후 p65 및 cJun의 핵 내로의 이동 여부를 확인하였다. 먼저, 음성대조군 NC에서는 FITC-표시된 p65 및 cJun(merge; 녹색)이 세포질에 다량 존재하여 핵(merge; 푸른색)과 세포질의 경계가 뚜렷한 것을 확인할 수 있었으나, 양성대조군인 LPS 처리군에서는 p65 및 cJun이 세포질에만 존재하던 NC에 비해 p65 및 cJun이 핵 내(merge; 초록색)로 이동하여 핵과 세포질의 경계가 불분명해지는 것을 보여주었다(Fig. 6). 한편, FAME-CP의 처리는 LPS 처리군과 유사하게 FITC-표시된 p65 및 cJun이 핵 내(merge; 초록색)로 전이됨에 따라 NC 대조군에 비해 핵과 세포질의 경계가 불분명해진 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Son 등(2022)의 연구에서 시료 처리에 의해 활성화되었을 때 RAW 264.7 세포주는 세포질에서 핵 내로 전사인자가 전이되는 것을 확인할 수 있었으며, 이와 유사하게 FAME-CP의 처리에 의해 핵 내로 전사인자가 이동하는 것을 확인할 수 있었다. RAW 264.7 세포주는 활성화되지 않은 상태에서 p65는 세포질에 존재하고 시료 처리에 의해 활성화된 세포는 I κ B α 의 분해를 유도하고 p65를 핵 내로 전이시키는 것으로 확인되어(Park 등 2019), 대식세포에서 FAME-CP 처리에 의해 세포질에서 p65 및 cJun의 상위경로, 즉 NF- κ B 및 MAPK의 인산화 과정을 거쳐 최종적으로 전사인자 p65 및 cJun이 핵 내로 이동하는 것으로 추정되었다. 앞서 본 논문에서 제시한 결과와 같이 핵 내에서 mRNA의 발현을 유도(Fig. 5)하고 이를 세

포 외로 분비하는 것으로 확인되었으며(Fig. 3), 향후, immunoblotting을 이용하여 p65 및 cJun의 translocation에 대한 결과를 입증하고자 NF- κ B 및 MAPK 경로의 인산화를 분석하고자 하며 추가적으로, 대식세포 표면에 있는 패턴인식 수용체(pattern recognition receptor)의 종류에 따라 미치는 영향을 검토하여 대식세포 활성화에 기여하는 세포내 메커니즘을 추가로 확인하고자 한다.

요약 및 결론

면역자극 물질로서 황기(*Astragalus membranaceus*; AM)의 산업적 적용 가능성을 높이고자, AM으로부터 열수추출물(AME)을 제조하고 김치-유산균(*Lactobacillus sakei* 및 *Leuconostoc mesenteroides*)을 접종하고 발효시켜 황기-포스트바이오틱스(FAME)를 조제하였다. 황기 포스트바이오틱스로 조제된 FAME는 비발효-황기에 비해 대식세포 자극 활성이 향상되지 않았으나, 주정 침전으로부터 분리된 조다당류(crude polysaccharide; CP) FAME-CP는 AME-CP에 비해 활성이 크게 향상되었다. 또한, FAME-CP는 AME-CP와 비교해볼 때, 구성당 및 분자량 분포에서 극적인 변화를 보였으며, FAME-CP는 Man(44.2%), Glc(19.3%), Gal(10.2%), GalA(10.2%) 및 Ara(7.4%)를 구성당으로 함유하는 113.4 kDa의 주요 분자량을 갖는 다당류였다. 대식세포 자극활성이 강화된 FAME-CP는 대식세포 자극 활성화 인자(iNOS, TNF- α , MCP-1, IL-6 및 COX-2)의 mRNA 발현량을 증가시켰을 뿐만 아니라, 활성

화된 p65와 cJun의 핵 내로의 전위를 유도하였다. 결론적으로, 유산균으로 발효된 황기-포스트바이오틱스로부터 조제된 조다당 획분은 비발효-황기 조다당 획분에 비해 면역자극 활성이 강화된 기능성 물질로서 산업적 적용 가능성을 높일 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001; 프로젝트랩).

References

- Bae HK. 2021. Bioactive characteristics of the *Astragalus membranaceus* ethanol & bioconversion extracts as functional cosmetic materials. *J Korean Appl Sci Technol* 38: 1265-1272
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Chang BY, Han JH, Cha BS, Ann SH, Kim SY. 2015. Optimization of culture condition for enhancing the probiotics functions. *J Food Hyg Saf* 30:295-301
- Choo SB, Yang H, Jeong DY, Jeong SY, Ryu MS, Oh KH, Yoo YC. 2017. Immunomodulating effect of extract of *cheonggukjang* fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* (SRCM100730) on RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:1300-1307
- Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res Int* 136:109502
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Ha JH, Jeong MH, Seo YC, Choi WY, Kim JS, Kim HH, Ahn JH, Lee HY. 2010. Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis koreana* Palibin by lactic acid fermentation. *Korean J Med Crop Sci* 18:421-428
- Honda S, Akao E, Suzuki S, Okuda M, Kakehi K, Nakamura J. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357
- Hwang YC, Shin KS. 2008. Characterization of immunostimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 40:220-227
- Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* 28:1317-1327
- Jeong BS, Kim SH, Kim HP. 2017. Effect of fermented *Cirsium japonicum* extract on testosterone deficiency syndrome. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:790-800
- Kang SE, Kim MJ, Kim TW. 2019. Diversity and role of yeast on kimchi fermentation. *J Korean Soc Food Cult* 34: 201-207
- Kim BH, Jeong SJ, Jang JO, Lee JH, Park YE, Kim JG, Kwon GS, Hwang HS, Lee JB. 2019. Increased antioxidative activity of fermented *Ligusticum striatum* Makino ethanol extract by bioconversion using *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 129. *J Life Sci* 29:846-853
- Kim BY, Park SS. 2021. The concepts and applications of postbiotics for the development of health functional food product. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics* 7:14-22
- Kim DH, Kwon SK, Han KD, Ji IB. 2021. Analysis of consumers' characteristic factors affecting the intake of health functional food. *Korean J Food Mark Econ* 38:23-42
- Kim G, Shin HY, Jeong SB, Ha EJ, Jeong EJ, Shin JY, Yu KW. 2022a. Enhanced macrophage stimulatory activities of extracts from kimchi lactic acid bacteria-fermented mixed herbal medicines. *Korean J Food Nutr* 35:399-410
- Kim GS, Yang KH, Kim HK, Kim JE, Yun HN, Yu JW, Kim BS. 2022b. Antioxidant and immunomodulatory effect of lactic acid bacteria fermented barley sprout hot water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:1027-1035
- Kim H, Suh HJ, Shin JY, Hwang JH, Yu KW. 2016. Physiological activity of roasted coffee prepared from fermented green coffee bean with *Monascus ruber* mycelium. *Korean J Food Nutr* 29:1-11
- Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. 2010. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented ginseng with *Phellinus linteus* mycelium in solid culture. *Korean J Food Sci Technol* 42:223-232

- Kim H, Kim D, Lee S, Choi J, Lim B. 2023a. Curation service strategy for health functional food: Focusing on case studies of customized health functional food in Korea. *Serv Mark J* 16:63-78
- Kim HW, Jee HS, Shin KS. 2018. Polysaccharide isolated from fermented barley extract activates macrophages via the MAPK and NF- κ B pathways. *Korean J Food Sci Technol* 50:555-563
- Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. 2007. Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Sci Korea* 33:33-40
- Kim Y, Shin H, Kim H, Jeong E, Kim H, Seo M. 2023b. Anti-inflammatory active polysaccharide from postbiotics of *Cordyceps militaris* mycelium-liquid culture. *Korean J Food Nutr* 36:6-16
- Lee H. 2012. Immuno-stimulating activities of mannose-rich polysaccharides isolated from Korean black raspberry wine. *Korean J Food Sci Technol* 44:343-349
- Lee KH, Bong YJ, Lee HA, Kim HY, Park KY. 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:12-19
- Lee KH, Rhee KH. 2015. Screening of anti-inflammatory herbs having the activation of MAPK family proteins. *Korean J Food Nutr* 28:343-350
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY. 2004. Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean J Med Crop Sci* 12:36-42
- López-García J, Lehocný M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *J Funct Biomater* 5:43-57
- Park HR, Lee SJ, Im SB, Shin MS, Choi HJ, Park HY, Shin KS. 2019. Signaling pathway and structural features of macrophage-activating pectic polysaccharide from Korean citrus, *cheongkyool* peels. *Int J Biol Macromol* 137:657-665
- Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 39:681-687
- Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q. 2019. A review of astragalus species as foodstuffs, dietary supplements, a traditional Chinese medicine and a part of modern pharmaceutical science. *Appl Ecol Environ Res* 17: 13371-13382
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Shin JC, Choi SY, Suh HJ, Moon SK, Yu KW. 2022. Immunostimulatory polysaccharide fractionated from a liquid culture by *Phellinus linteus* Mycelium. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51:19-27
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Son SU, Lee SJ, Shin KS. 2022. Immunostimulating and intracellular signaling pathways mechanism on macrophage of rhamnogalacturonan-I type polysaccharide purified from radish leaves. *Int J Biol Macromol* 217:506-514
- Sung SK, Rhee YK, Cho CW, Kim YC, Lee OH, Hong HD. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachalinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food Nutr* 26:358-365
- Tran HNK, Nguyen VT, Han KH, Moon KS, Kim JA, Min BS. 2017. Analysis and stability test of the extracts from astragali radix, paeoniae radix, and corni fructus for toxicity study. *Korean J Pharmacogn* 48:248-254
- Tursun X, Zhao Y, Talat Z, Xin X, Tursun A, Abdulla R, AkberAisa H. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rosa rugosa* flower extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190
- Yu AR, Park HY, Choi IW, Park YK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immune enhancing effect of medicinal herb extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1521-1527
- Zheng Y, Ren W, Zhang L, Zhang Y, Liu D, Liu Y. 2020. A review of the pharmacological action of *Astragalus* polysaccharide. *Front Pharmacol* 11:349

Received 13 December, 2023

Revised 18 January, 2024

Accepted 23 January, 2024