pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 37. No. 5, 282~291 (2024)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2024.37.5.282

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

황기 조다당 획분 유래 효소 가수분해물의 면역 자극 활성

정원비 · 신현영[*] · 김효원 · 김다은 · 신지영[**] · 신광순[***] · [†]유광원[****]
국립한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, [*]고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
[**]㈜코시스바이오 연구소장, [***]경기대학교 식품생물공학과 교수, [****]국립한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Immunostimulatory Activity of Enzymatic Hydrolysates Derived from Crude Polysaccharides of *Astragalus membranaceus*

Won Bi Jeong, Hyun Young Shin[*], Hyo Won Kim, Da Eun Kim,
Ji-Young Shin[**], Kwang-Soon Shin[***] and [†]Kwang-Won Yu[****]

Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
[*]Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health Systems, Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea
[**]R&D Director, Cosis-Bio Co., Ltd., Jincheon 27867, Korea
[***]Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea
[****]Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

In a previous study, we fractionated crude polysaccharide (AME-CP) with macrophage-stimulating activity from a hot-water extract (AME) of *Astragalus membranaceus*. AME-CP contained glucose (Glc) as a main component sugar, suggesting that it might be rich in starch-like compounds (SLC). To enhance the immunostimulating activity of AME-CP by pruning SLC rarely known to contribute to activity, hydrolysate (AME-SH) was prepared by digesting with starch-related enzymes, including α-amylase and amyloglucosidase. AME-SH was found to contain substances with molecular weights ranging from 3.9 to 84.4 kDa. These substances were primarily composed of galactose, galacturonic acid, Glc, arabinose, rhamnose, and mannose. AME-SH significantly enhanced the production of macrophage-stimulating factors, including nitric oxide (NO), interleukin (IL)-6, and IL-12, in RAW 264.7 cells compared to AME-CP. Treatment of splenocytes isolated from C3H/HeN mice with AME-SH not only promoted IL-6 secretion, but also induced mitogenic activity. In addition, AME-SH promoted the secretion of hematopoietic growth factors including IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in Peyer's patch (PP) cells and stimulated bone marrow cell proliferation through these PP cells. In conclusion, hydrolysate (AME-SH) digested from AME-CP with starch-related enzymes could be used as a potential immunostimulant.

Key words: *Astragalus membranaceus*, crude polysaccharide, enzymatic hydrolysate, immunostimulation

서 론

면역계는 외부에서 침입하는 항원이나 조직의 손상을 일으키는 물질들로부터 신체를 보호하는 수단이다. 면역계는 일반적으로 선천 면역계와 적응 면역계로 구분되어 지는데, 선천 면역계는 신체에 침입하는 병원체와 스트레스를 감지하여 면역 반응을 통해 제거함으로써 인간의 생명 유지에 이바지한다(Hirayama 등 2018). 대식세포는 대표적인 선천 면역계 세포로 신체에 들어오는 이물질을 삼키는 식세포 작용을 하는 면역 및 조직 항상성에 필수적인 세포로 자극에 노출되면 다양한 사이

[†] 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

토카인을 방출한다(Arango Duque & Descoteaux 2014). 사이토카인은 interleukin(IL), interferon(IFN), chemokine 및 lymphokine 계열을 포함하며 세포 간 의사소통을 매개하는 단백질로서 세포의 성장과 분화뿐만 아니라 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다(Opdal SH 2018; Zhang 등 2018).

한편, 황기(*Astragalus membranaceus*; AM)는 콩과(Legumiosae)에 속하는 다년생 초본 식물의 뿌리로 아시아 지역과 유럽 및 아프리카의 일부 지역에 분포하며 예로부터 생약으로서 많이 사용된 것으로 알려져 있다(Kim 등 2007a). 황기의 주요 성분은 flavonoid, saponin 및 polysaccharide 등으로(Zhang 등 2009), 항염증(Bae & You 2017), 항고지혈증(Kim & Kim 2008), 항산화(Shahzad 등 2016), 항바이러스(Ghabeshi 등 2023) 및 면역 증진(Song 등 1998) 등의 효능이 있다고 보고되고 있다. 황기의 주요 성분 중 하나인 황기 다당류(*Astragalus* polysaccharide; APS)는 수용성 heteropolysaccharide의 일종으로 독성과 부작용이 적고 항종양, 항노화 및 혈당조절과 같은 약리학적인 효능이 있다고 알려져 있다(Zheng 등 2020). 또한, Li 등(2022)에 따르면 APS는 면역세포가 다양한 사이토카인과 케모카인의 생성을 유도하여 면역 반응을 향상할 수 있다고 보고되었다. 이러한 APS는 펙틴 다당류 영역의 rhamnogalacturonan과 α-1,4 결합으로 구성된 glucan으로 주로 구성되어 있다고 보고되고 있다(Sheng 등 2021). 식물체 유래 다당류는 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 전분(starch) 및 펙틴(pectin) 등으로 구성되어 있는데 이 중 전분은 대사적으로 불활성인 저장성 다당류 중 하나로 알려져 있다(Smirnova 등 2015; Cho 등 2018).

생물전환기법은 인체에 유익한 미생물이나 효소와 같은 친환경적인 요소들로 생리활성 물질을 증진하는 방법으로 화학적인 처리 방법에 비해 친환경적이고 경제적이어서 최근 산업적으로 많이 사용되고 있다(Lee 등 2010; Sung 등 2013). 탄수화물 가수분해 효소는 탄수화물을 가수분해하여 단순당으로 분해할 수 있는 효소들로 amylase, cellulase, β-glucanase 및 hemicellulase 등이 알려져 있으며, 이를 이용하여 생물 전환을 유도한 옥수수(Cho 등 2018), 인삼(Kim 등 2007b) 및 차가버섯(Kim 등 2022) 등 생물 전환 추출물의 생리활성의 증진과 관련한 연구가 지속적으로 보고되고 있다. 대사적 비활성 다당류인 전분을 단순당으로 전환할 때 전분 분자의 내부 α-1,4-결합을 절단하는 endo-type의 가수분해효소인 α-amylase를 이용하여 덱스트린을 생성하고 덱스트린의 비환원 말단에서 단일 포도당 잔류물을 제거하는 exo-type의 효소인 amyloglucosidase를 이용하여 전분 분해 반응이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Li 등 2019).

한편, Kim 등(2024)은 이전 연구에서 황기로부터 면역 자극 활성을 나타내는 황기 조다당 획분과 황기-포스트바이오틱스를 개발하였다. 본 연구에서는 황기 관련 다양한 소재 개발의 일환으로써, 증진된 면역 자극 활성 소재 탐색을 목적으로 황기 조다당 획분에 다량으로 함유되어 있으나 활성에는 크게 기여하지 않는 것으로 알려진 전분 유사 화합물(starch-like compound; SLC)를 제거하기 위하여, α-amylase와 amyloglucosidase와 같은 전분 관련 효소를 처리한 황기 조다당 획분의 효소처리물(AME-SH)을 제조하여 다양한 면역 자극 활성과 화학적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 황기 효소 가수분해물의 제조

본 연구에서 이용된 황기(*A. membranceus*, AM)는 2023년 한국에서 재배된 것을 이용하였으며, ㈜에이치푸드(Pochen, Republic of Korea)에서 구매하였다. 황기 추출물 및 조다당 획분은 Kim 등(2024)의 방법에 따라 조제하였다. 요약하면, 건조된 황기 중량의 20배(w/v) 물을 가한 후 열수추출을 진행하였으며, 이후 불용성 침전물을 제거하기 위해 원심분리(9,588 g, 4℃, 20 min, Daejeon, Republic of Korea)를 진행하고 농축(Eyela, Tokyo, Japan) 및 동결건조(Ilshin Biobase, Seoul, Republic of Korea)하여 황기 열수추출물(AM extract, AME)을 조제하였다. 이후 AME에 95% 주정을 5배 첨가하여 교반한 뒤 원심분리(9,588 g, 4℃, 20 min)하여 침전물을 투석(MW cut off: 12-14 kDa, Spectra/PorTM, Sectrum Lab, Rancho Domiguez, CA, USA), 농축 및 동결건조하여 조다당 획분(crude polysaccharide, AME-CP)으로 분획하였다. 다음으로 조다당 획분에 α-amylase(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1,000 unit 및 amyloglucosidase(Sigma Aldrich) 100 unit을 넣어, 제조사에서 제공한 최적 조건하에 4일간 반응하였다. 마지막으로, 효소를 불활성화시키기 위해 15분간 가열을 진행하고 원심분리(9,588 g, 4℃, 20 min), 투석, 농축 및 동결건조하여 황기 조다당 획분의 전분 관련 효소 가수분해물(AME-SH)을 조제하였다(Fig. 1).

2. 분자량 분포

분자량 분포는 적절한 농도로 조제한 시료를 polyvinylidene fluoride membrane filter(0.45 μm, Jaema Trade, Gangwon, Republic of Korea)로 여과하여 Table 1과 같은 조건으로 high performance size exclusion chromatography(HPSEC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 시스템을 이용하여 분석하였다. 표준물질은 galactose(Gal; Sigma Aldrich) 및 다양한 분자량의 pullulan (Shodex, Tokyo, Japan)을 이용하였고, retention time(RT)을 통해 표준 곡선을 작성한 후 시료 간의 RT를 비교하여 kDa으로 계산하였다.

3. 구성분 및 구성당 분포

황기 효소 가수분해물의 구성분 분포를 분석하기 위해 중성당, 산성당, 단백질, 폴리페놀 및 keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)-유사물질의 함량을 측정하였다. 중성당은 glucose(Glc; Sigma Aldrich)를 표준물질로 이용해 phenol-sulfuric acid 법(DuBois 등 1956)으로 분석하였고, 산성당은 galacturonic

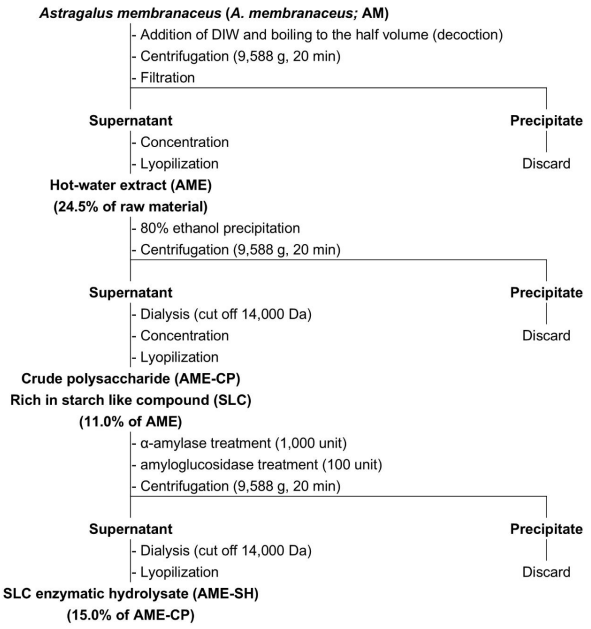

Fig. 1. Preparation scheme for enzymatic hydrolysates (AME-SH) derived from crude polysaccharides (AME-CP) of *Astragalus membranaceus*.

acid(Gal A; Sigma Aldrich)를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl 법(Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973)으로 분석하였다. 단백질은 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 Bradford MM(1976)의 방법으로 분석하였으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 Kim 등(2021)의 방법을 변형하여 분석하였다. 또한, KDO-유사물질 함량은 KDO를 표준물질로 이용하여 thiobarbituric acid법(Karkhanis 등 1978)으로 분석하였으며, 각 구성분 함량은 %(w/w)로 나타내었다. 구성당은 Honda 등(1989) 및 Shin 등(2021)의 방법을 참고하여 분석하였다. 시료에 2 M trifluoroacetic acid(TFA; Sigma Aldrich)를 처리해 aldose 단위로 분해한 후 0.3 M NaOH와 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazoline(PMP; Sigma Aldrich)를 첨가하여 단당류와 PMP를 결합한 유도체로 전환시켰다. 이후 0.3 M HCl을 가해 중화시키고 증류수 및 chloroform(2상 용매계)으로 분리 및 추출하여 물 층만 분리한 뒤 PVDF membrane filter로 여과하였다. 여과한 시료는 HPLC를 이용하여 Table 1의 조건으로 분석하였으며, 분석 결과는 Glc를 기준으로 molar ratio로 나타냈다.

4. 마우스 유래 대식세포 자극 활성

실험에서 사용된 마우스 유래 RAW 264.7 세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, Seoul, Republic of Korea)에서 입수하였으며 배양에 사용된 배지는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Hyclone, San Angelo, TX, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Waltman, MA, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, Katy, TX, USA)을 첨가하여 37℃ 및 5%의 CO_2 조건에서 배양하였다. 대식세포 자극 활성을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포주를 2.0×10^6 cells/mL로 96 well plate의 각 well에 180 μL씩 분주하여 일정 시간 배양한 후 일정 농도로 희석한 시료를 각각 20 μL씩 처리한 뒤 24시간 재배양하였다. 시료 처리 후 생성된 산화질소(nitric oxide; NO)의 함량은 sodium nitrate를 표준물질로 하여 griess assay(Tursun 등 2016)를 통해 표준 곡선을 작성한 뒤 μM로 나타냈다. 대식세포 자극 인자인 interleukin(IL)-6 및 IL-12는 BD Bioscience(San Diego, CA, USA)에서 구입한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit로 분석하였고, 각 제조사에서 제공된 recombinant protein을 통해 표준곡선을 작성한 후 함량을 나타냈다.

Table 1. HPLC analysis conditions for average molecular weight and component sugar analysis

Analysis	Molecular weight distribution	Component sugar
HPLC system	Agilent 1260 Infinity series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)	Dionet Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Germany)
Column	Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, MA, USA)	YMC-Triart C18 (YMC, Kyoto, Japan)
	300×10 mm, 8.6 μm	250×4.6 mm, 5 μm
Column temperature	Ambient	30℃
Flow rate	0.5 mL/min	1.0 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.7) : Acetonitrile 83:17
Injection volume	20 μL	20 μL
Detector	Refractive Index Detector (RID) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)	UV detector at 254 nm (Dionex, Idstein, Germany)
Integrator	Agilent chemstation	Chromeleon 7

5. 실험동물

동물실험은 국립한국교통대 동물실험윤리위원회 심의(KNUT IACUC 2024-01)를 거쳐 진행했으며, 생후 6주령 C3H/HeN 마우스(female)를 두열바이오텍(Seoul, Republic of Korea)으로부터 구입하였다. 실험동물의 사료 및 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였고 항온 및 항습 조건(온도 22±1℃, 40~50%)을 유지했으며 인공조명에서 명암교대를 1일 12시간으로 유지하였다. 실험동물은 1주일간 적응 기간을 거친 후 실험에 이용되었다.

6. 비장세포에서의 마이토젠 및 사이토카인 생성능

1주일간의 적응 기간을 거친 C3H/HeN 마우스를 CO_2 gas로 마취시켜 무균적으로 비장을 적출한 후 적출한 비장은 금속망(100 mesh)에 여과해 세포를 분리시켰다. 이후 0.2% NaCl을 처리하여 적혈구를 제거한 뒤 회수한 세포를 2.5×10^6 cells/mL로 96 well plate에 160 μL씩 분주한 뒤 무처리군 및 mitogen 처리 그룹으로 나누어 무처리군에는 증류수를 처리하고 mitogen 처리군에는 concanavalin A(Con A) 또는 lipopolysaccharide(LPS)를 20 μL씩 처리하였다. 이후 희석한 시료를 각 well에 20 μL씩 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액을 취하고, Ez-cytox(DoGenBio, Seoul, Republic of Korea)를 30 μL씩 처리하여 시료 무처리군 대비 마이토젠 활성(mitogenic activity; %)을 분석했다. 또한, 비장세포 배양액 내의 IL-6는 BD Bioscience에서 구입한 ELISA kit로 분석하였으며, recombinant protein을 통해 작성한 표준곡선을 통해 pg/mL로 함량을 표현하였다.

7. Peyer's patch 경유 사이토카인 생성 및 골수세포 증식

Peyer's patch를 경유한 장관면역 활성은 Yang 등(2004)의 방법에 따라 측정하였다. 1주일간 적응 기간을 거친 C3H/HeN 마우스를 CO_2 gas를 이용하여 마취시킨 후 소장에 존재하는 Peyer's patch를 잘라내어 조직을 금속망에 여과하여 세포를 채취하였다. 채취한 세포는 2.0×10^6 cells/mL로 96 well plate에 180 μL씩 각 well에 분주하고 희석한 시료를 처리하여 5일간 배양한 후 배양 상등액을 회수하였다. 한편, 골수세포 증식능을 분석하기 위해 동일한 종의 마우스의 대퇴부 뼈에 주사기를 이용해 serum free-RPMI를 주입하여 골수세포를 채취 후 여과한 골수세포에 0.2% NaCl을 처리하여 적혈구를 제거하였다. 골수 세포액은 2.0×10^5 cells/mL로 96 well plate에 분주한 뒤 Peyer's patch 배양액을 접종하여 6일간 배양한 뒤 Ez-cytox를 처리하여 시료 무처리군 대비 골수세포 증식능(bone marrow cell proliferation; %)을 분석하였다. 회수한 배양 상등액의 IL-6 및 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)는 BD Bioscience에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 제공된 recombinant protein에 따라 표준곡선을 작성한 후 pg/mL로 함량을 나타냈다.

8. 통계처리

모든 시험은 3번 반복하였고 분석한 결과는 평균±표준편차(standard deviation; SD)로 나타냈다. 분석 결과는 SPSS V26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student's *t*-test로 계산해 각 $p<0.05$, $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 또한, 성분 간 유의성을 평가하기 위해 분산분석(analysis of variance; ANOVA)을 실시해 각 측정값 간의 유의성을 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준으로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 황기 효소 가수분해물의 분자량 분포

AME-SH의 분자량 분포를 확인하기 위해 HPSEC를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2에 나타냈다. 이전 Kim 등(2024)의 연구에서 황기 조다당 획분(AME-CP)의 분자량은 소량의 106.6 kDa의 물질과 다량의 0.4 kDa의 물질이 혼재되어 있었으나(Fig. 2), 전분 관련 효소로 SLC를 가수분해한 AME-SH의 분자량 분포는 3.9~84.4 kDa의 물질이 혼재되어 있었다. 이러한 결과는 황기 조다당 획분에 함유된 SLC가 효소 처리를 통해 분해되고 제거되었을 뿐만 아니라, SLC 고분자의 구조적인 특성 때문에 내부에 함입되어 있던 저분자량 물질이 SLC 분해와 함께 외부로 배출되어 분자량에 변동이 유발된 것으로 추정할 수 있었다. 이후,

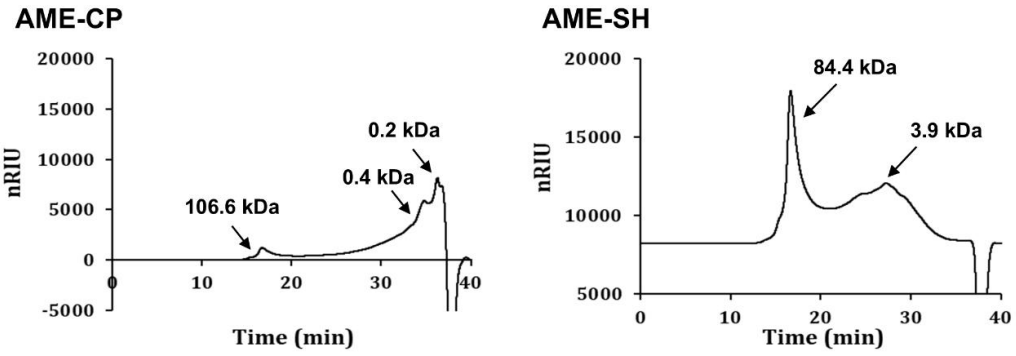

Fig. 2. Average molecular weight distribution of AME-CP and AME-SH.

본 연구에서는 AME-SH의 화학적 특성을 확인하기 위해 구성분 및 구성당 분석을 수행하였다.

2. 황기 효소 가수분해물의 구성분 및 구성당 분포

AME-SH의 구성분 및 구성당 결과는 Table 2에 나타냈다. AME-SH는 주로 중성당(55.4%) 및 산성당(42.8%)으로 구성되어 있었고, 단백질(0.4%), 폴리페놀(1.0%) 및 KDO-유사물질(0.4%)은 소량 함유되어 있었다. 중성당과 산성당의 높은 구성분 함량으로부터 AME-SH는 다당류가 풍부한 것을 나타내므로, 이후 구성당 분석을 진행하였다. 구성당 분포 결과, glucose(Glc; 1.00)와 비교했을 때 galactose(Gal; 1.76)가 가장 많은 비중을 차지하였고, 이외에도 galacturonic acid(GalA; 1.10), arabinose(Ara; 0.78), rhamnose(Rha; 0.65), mannose(Man; 0.62) 및 glucuronic acid(GlcA; 0.34)로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 이전 Kim 등(2024)의 연구에서 황기 조다당 획분은 Glc가 83.1%와 Gal 및 GalA는 각각 3.2 및 7.1%를 보였던 것에 반해 AME-SH는 주요 구성당으로 Gal 및 GalA를 주로 함유하는 것을 보여 glucan-type이었던 주요 다당류가 효소 처리에 의해 제거되며 구성당의 분포 비율이 변화되었음을 알 수 있었다. 또한, Li 등(2009)에 따르면, 황기 다당류는 다량의 전분 유사 화합물 α-1,4-glucan의 연속적인 구조를 가진다고 보고하였는데, 본 연구에서 효소 처리에 의해 높은 Glc 함량이 감소된 점을 보아, α-amylase 및 amyloglucosidase의 복합 처리를 통해 SLC의 분해가 효과적으로 진행된 것으로 보인다. 또한, GalA, Ara, Rha 및 GlcA의 증가는 펙틴 계열의 rhamnogalacturonan(RG)-I, RG-II 혹은 homogalacturonan의 존재를 추정할 수 있으며(Sheng 등 2021; Shin 등 2024), 여분의 Glc와 Man는 hemicellulose의 존재를 추정할 수 있었다(Wang 등 2024). 추후 연구에서는 ion-exchange 및 size-exclusion chromatography를 통해 AME-SH로부터 활성 본체를 분리하고 다양한 분석기법을 통해 구조적 특성을 규명하고자 한다.

Table 2. Chemical properties and component sugar of AME-SH

Chemical properties	AME-SH
Neutral sugar (%)	55.4±3.5[a1)]
Uronic acid (%)	42.8±1.8[b]
Protein (%)	0.4±0.1[c]
Polyphenol (%)	1.0±0.0[c]
KDO-like materials (%)	0.4±0.1[c]
Monosaccharide	**Molar ratio**
Mannose	0.62
Rhamnose	0.65
Glucuronic acid	0.34
Galacturonic acid	1.10
Glucose	1.00
Galactose	1.76
Xylose	0.12
Arabinose	0.78
Fucose	0.17

The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests.

[1)] A superscript of the content value means a significant difference at $p<0.05$.

3. 황기 효소 가수분해물의 증진된 대식세포 자극 활성

AME-SH의 면역 기능성 소재로서의 가능성을 확인하고자 이전에 개발한 황기 조다당 획분 AME-CP와 AME-SH의 대식세포 자극 활성을 비교함으로써 활성의 증진 여부를 확인하였다. 첫 번째로, 숙주 면역세포의 조절을 유도하여 면역 반응을 조절할 수 있다고 알려진 NO 생성능을 평가한 결과(Fig. 3A)(Tripathi 등 2007), 양성대조군으로 이용된 LPS는 1 μg/mL의 농도에서 NC 대조군(10.8 μM) 대비 90.0 μM(약 8.3배 증가)의 NO 생성능을 나타냈으며, AME-CP가 0.5~5 μg/mL의 농도 범위에서 57.3~77.6 μM(약 5.3~7.2배 증가)의 생성능을 보인 반면, AME-SH는 74.2~95.5 μM(약 6.9~8.8배 증가)의 AME-CP보다 유의적으로 증진된 NO 생성능을 나타냈다. 또한, B 세포에 작용하여 면역글로불린 생성을 유도하는 것으로 알려진 IL-6의 경우(Fig. 3B)(Hirano T 2021), AME-SH는 0.5~5 μg/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 24.9~28.4 ng/mL(약 8.1~9.2배 증가)의 IL-6 생성능을 나타냈으며, 이러한 결과는 AME-CP에 비해 우수한 IL-6 생성능을 보이는 것으로 나타났다. 마지막으로, natural killer 세포의 기능과 T 세포 발달에 영향을 미치는 IL-12 생성능의 경우(Fig. 3C)(Watford 등 2003), NC 대조군(7.0 pg/mL) 대비 0.5~5 μg/mL의 농도 범위에서 262.9~1,184.3 pg/mL(약 20.1~90.7배 증가)로 AME-CP에 비해 우수한 IL-12 생성능을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하면, AME-CP에 함유량이 높은 SLC를 전분 관련 효소로 처낸 AME-SH의 대식세포 자극 활성 촉진은, 대식세포 활성화에 크게 기여하고 있지 않는 SLC를 전분 관련 효소 처리로 감소시킴으로써 AME-CP 활성을 효과적으로 증진시킬 수 있음을 확인하였다. Lee & Jeon(2005)에 따르면 황기 유래 APS가 NF-κB/Rel을 활성화하여 대식세포에서 NO 생성능을 유도한다고 보고되었는데, 이전에 개발한 황기 조다당 획분 AME-CP 뿐만 아니라, 이를 효소 처리한 AME-SH 또한 효과적인 면역 자극 기능성 소재로 활용 가능할 것으로 판단된다.

4. 황기 효소 가수분해물의 마이토젠 및 사이토카인 생성능

다음으로, 본 연구에서는 동물로부터 분리된 세포를 이용하여 AME-CP에서 유래된 효소 가수분해물의 추가적인 면역 활성화 여부를 판단하고자 하였다. 비장은 혈액으로부터 항원을 수집하고 T 및 B 세포의 성숙과 분열 그리고 분화가 이루어지는 주요 기관으로 비장 세포는 T 및 B 세포 혹은 대식세포와 같은

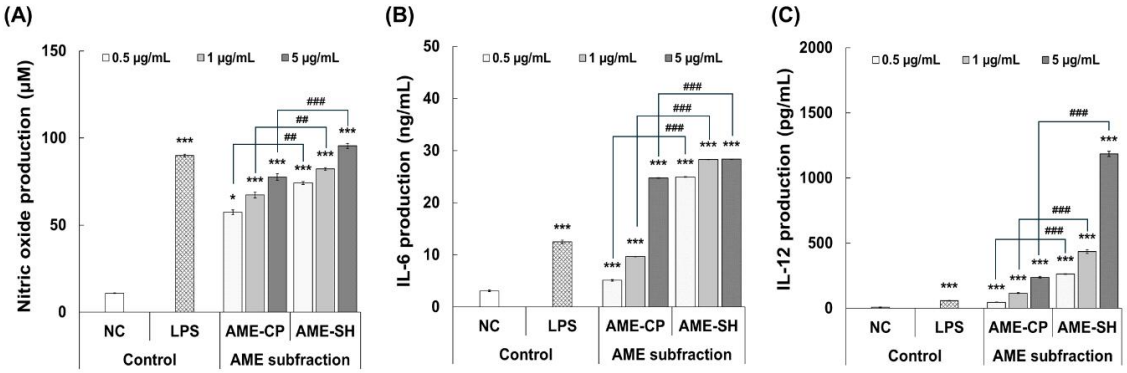

Fig. 3. Effects of AME-CP and AME-SH on macrophage-stimulating factors production. RAW 264.7 cells were treated with AME-SH for 24 h, and then the production of nitric oxide (A), IL-6 (B), and IL-12 (C) was assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. Crosshatch patterns indicate significant differences between samples at the same concentration. $^{*,\#}p<0.05$, $^{**,\#\#}p<0.01$, $^{***,\#\#\#}p<0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μg/mL); AME-CP, crude polysaccharide; AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6; IL-12, interleukin-12.

다양한 면역세포가 존재해 면역 활성을 관찰하기 위한 지표로 주로 사용된다(Kang 등 2014). 그러므로 AME-SH의 면역 활성을 확인하기 위해 비장 세포의 마이토젠 및 IL-6 생성능을 분석하였다. 세포 배양 시 T 세포를 자극하는 Con A와 B 세포를 자극하는 LPS를 각각 처리하여 세포의 민감성을 증가시켜 세포 활성 여부를 분명하게 판단하고자 하였다. 먼저, mitogen을 처리하지 않은 경우(Fig. 4A), NC 대조군과 비교하여 5~10 μg/mL의 농도 범위에서 236.4~253.2%로 유의적인 mitogen 활성을 보였다. Mitogen으로 Con A를 처리한 경우(Fig. 4B), NC 대조군 대비 유의적인 mitogen 활성이 보이지 않았지만, mitogen으로 LPS를 처리했을 때(Fig. 4C) 10 μg/mL의 농도에서 155.7%로 유의적인 mitogen 활성을 보였다. 다음으로 IL-6의 생성능을 확인했을 때 mitogen을 자극하지 않은 경우(Fig. 4D), NC 대조군(27.5 pg/mL) 대비 0.5~10 μg/mL의 농도 범위에서 501.5~1,287.6 pg/mL(약 18.2~46.8배 증가)의 농도-의존적인 생성능을 보였고 Con A로 자극한 경우(Fig. 4E), NC 대조군(541.4 pg/mL) 대비 1,904.9~2,594.5 pg/mL(약 3.5~4.8배 증가)의 IL-6 생성능을 확인할 수 있었다. 한편, LPS로 자극했을 때 IL-6의 생성능은 NC 대조군(1,135.2 pg/mL) 대비 5~10 μg/mL의 농도 범위에서 1,121.8~2,025.4 pg/mL(약 1~1.8배 증가)의 생성량을 보였다(Fig. 4F). Shao 등(2004)에 의하면 APS가 B 세포와 대식세포를 활성화하지만 T 세포는 활성화하지 않는다고 보고되었는데, AME-SH 또한, 대식세포와 비장 내 B 세포의 활성화를 유도하는 것으로 확인되었다. 또한, AME-SH는 말단 B 세포 분화를 유도하는 B 세포 분화 인자 IL-6(Maeda 등 2010)의 유의적인 생성능을 보여, AME-SH가 B 세포의 mitogen으로서 작용하는 것으로 확인되었다.

5. 황기 효소 가수분해물의 Peyer's patch 경유 사이토카인 생성 및 골수세포 증식

생체 내에서 가장 큰 림프조직인 GALT(gut-associated lymphoid tissues)의 구성요소 중 하나인 Peyer's patch(PP)는 수많은 B 세포와 모낭 수지상 세포 및 T 세포를 포함하는 고도로 특수화된 모낭 세포로서 immunoglobulin A 생산을 위한 inductive site로 알려져 있다(Yoon 등 2010; Suh 등 2013). 한편, 골수는 뼈의 중심과 골단을 구성하는 조직으로 상당한 양의 면역세포가 들어있어 면역에서 핵심적인 역할을 수행하는 림프기관이라고 보고된 바 있다(Zhao 등 2012). 따라서, AME-SH의 장관면역 활성화를 확인하기 위해 PP 세포로부터 골수세포 증식 인자를 측정하고 PP 세포를 경유한 골수세포 증식능을 분석하였다. PP 세포배양액으로부터 골수세포 증식인자라고 알려져 있는 IL-6와 GM-CSF를 분석한 결과, IL-6의 결과에서는(Fig. 5A) 양성대조군인 LPS가 10 μg/mL의 농도에서 71.9 pg/mL로 NC 대조군(60.3 pg/mL) 대비 약 1.2배 증가하였고, AME-SH는 100~100 μg/mL의 농도 범위에서 NC 대조군 대비 74.9~259.5 pg/mL(약 2.9~20.6배 증가)의 IL-6 생성능을 보였다. 또한, 골수세포의 발달과 성숙에 관여하는 사이토카인인 GM-CSF 생성능 또한 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 5B)(Egea 등 2010). 한편, 골수세포 증식능의 경우(Fig. 5C), NC 대조군과 비교했을 때 AME-SH는 100~1,000 μg/mL의 농도 범위에서 108.4~295.6%의 농도-의존적인 골수세포 증식능을 확인할 수 있었다. Zhao 등(2011)에 의하면 황기 유래 APS는 골수세포 증식성 사이토카인의 생성을 유도한다고 보고하였는데, AME-SH를 처리한 PP 세포배양액에서 골수세포 증식인자 IL-6 및 GM-CSF의 생성뿐만 아니라, 이를 통해 골수세포 증식까지 활성화시켜, 체내 면역 기

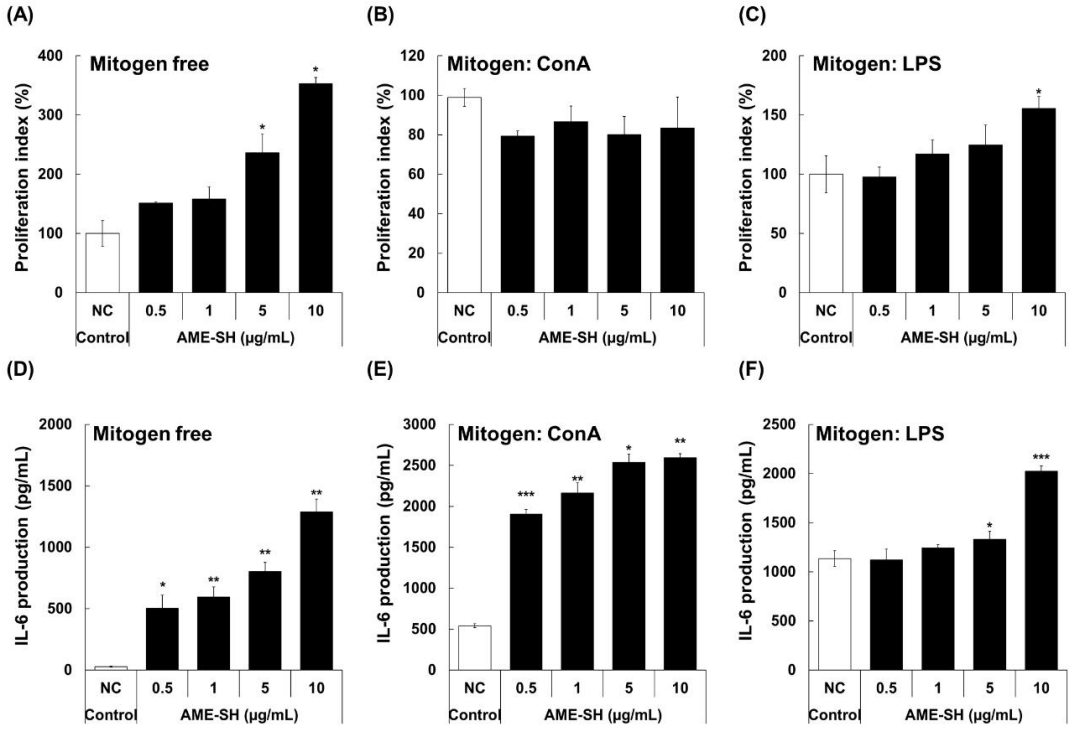

Fig. 4. Immunostimulatory effects of AME-SH on splenocytes isolated from C3H/HeN mice. Splenocytes were treated with AME-SH for 3 days, and mitogenic activity (A-C) and IL-6 production (D-F) were assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (1 μg/mL); Con A, concanavalin A (1 μg/mL); AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6.

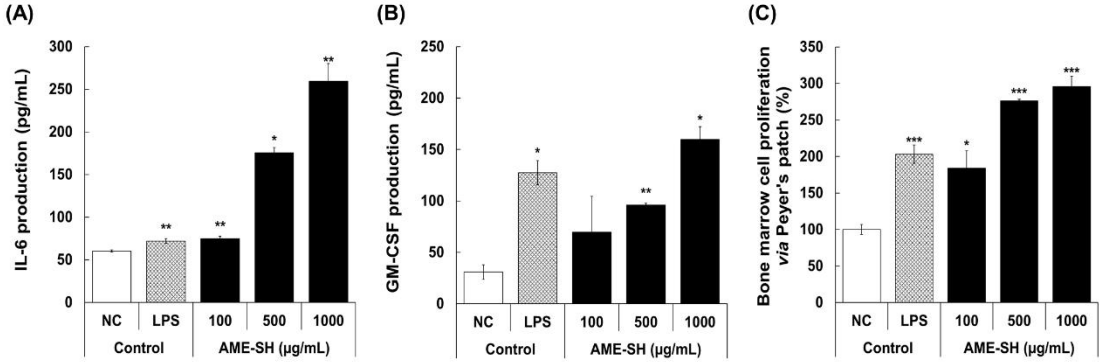

Fig. 5. Effects of AME-SH on intestinal immune system-stimulation *via* Peyer's patch. Peyer's patch (PP) cells were treated with AME-SH for 6 days. IL-6 (A) and GM-CSF (B) production from PP cells, as well as bone marrow cell proliferation *via* PP (C), were assessed. The results are presented as the mean±standard deviation (S.D.) from three independent tests. Asterisks on the bars indicate significant differences between the negative controls (NC) and each group, as determined by the Student's *t*-test. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. NC, negative control; LPS, lipopolysaccharide (10 μg/mL); AME-SH, enzymatic hydrolysate derived from AME-CP; IL-6, interleukin-6; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

능에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단되었다.

요약 및 결론

이전 연구에서 황기(*Astragalus membranaceus*; AM)의 열수 추출물(AME)로부터 대식세포 자극 활성을 가지는 조다당(AME-CP)을 분획하였다. AME-CP의 주요 구성당은 glucose (Glc)를 함유하고 있어, 전분 유사 화합물(starch-like compounds; SLC)이 풍부한 것으로 확인되었다. 따라서, 생물학적으로 비활성물질인 SLC를 제거하여 AME-CP의 면역 자극 활성을 향상시키기 위해 α-amylase 및 amyloglucosidase를 포함한 전분 관련 효소를 처리하여 효소 가수분해물(AME-SH)을 조제하였다. AME- SH의 분자량 분포는 3.9~84.4 kDa였으며 주로 galactose, galacturonic acid, Glc, arabinose, rhamnose 및 mannose로 구성되어 있었다. AME-SH는 AME-CP에 비해 RAW 264.7 세포에서 NO, IL-6 및 IL-12를 포함한 대식세포 자극 인자의 생성을 크게 향상시켰다. 또한, C3H/HeN 마우스로부터 분리한 비장세포에 AME-SH를 처리하였을 때 IL-6의 분비가 촉진될 뿐만 아니라, 마이토겐 활성도 유도하였다. AME-SH는 Peyer's patch(PP) 세포에서 IL-6 및 GM-CSF를 포함한 조혈 성장 인자의 분비를 촉진하고 PP 세포를 통한 골수세포 증식을 자극하였다. 결론적으로, 전분 관련 효소로 AME-CP를 가수분해한 효소 가수분해물인 AME-SH는 잠재적인 면역 자극제로 제안되었다.

감사의 글

본 논문은 2024년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001; 프로젝트랩).

References

Arango Duque G, Descoteaux A. 2014. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491-502

Bae HK, You SH. 2017. Biological activity study on anti-oxidant, whitening, and anti-inflammatory effects of *Astragalus membranaceus* ethanol extracts and bioconversion extracts. *Asian J Beauty Cosmetol* 15:489-499

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

Cho DH, Kim MJ, Sim EY, Jeon YH, Lee CK, Woo KS. 2018. Effect of carbohydrase treatments on phenolics content and antioxidant activity of maize flour. *Korean J Food Sci Technol* 50:132-137

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

Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. 2010. GM-CSF: A role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4:723-731

Ghabeshi S, Mousavizadeh L, Ghasemi S. 2023. Enhancing the antiviral potential and anti-inflammatory properties of *Astragalus membranaceus*: A comprehensive review. *Anti-Inflamm Anti-Allergy Agents Med Chem* 22:211-219

Hirano T. 2021. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 33:127-148

Hirayama D, Iida T, Nakase H. 2018. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int J Mol Sci* 19:92

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-methyl5-pyrazolone derivatives. *Anal Biochem* 180:351-357

Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Park JH, Bae NY, Ahn DH. 2014. Immuno-stimulating activities of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* cooking juice concentrates on mouse macrophages and spleen cells. *Korean J Fish Aquat Sci* 47:776-784

Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 85:595-601

Kim HJ, Kim JB. 2008. Effects of Astragali Radix on the diet-induced hyperlipidemia in rats. *Korean J Orient Physiol Pathol* 22:575-579

Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. 2007a. Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *J Soc Cosmet Sci Korea* 33:33-40

Kim SB, Gam DH, Hong JW, Kim JW. 2022. Enhancement of production of bioactive compound and antioxidant activity in *Inonotus obliquus* by bioconversion process using commercial enzymes. *Korean J Med Crop Sci* 30:12-18

Kim SZ, Lee SG, Son NY, Lee JU, Baek GG, Kim JE, Han SH, Yuk HG. 2021. Effect of fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* on antioxidant and nutritional characteristics of jujube hot water extract. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*

7:37-44

Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho J. 2007b. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1482-1485

Kim YS, Shin HY, Jeong WB, Ha EJ, Koo JP, Shin JY, Yu KW. 2024. Effect of *Astragalus membranaceus*-postbiotics polysaccharide changed by lactic acid bacteria on macrophage. *Korean J Food Nutr* 37:17-29

Lee KH, Senevirathne M, Ahn CB, Je JY. 2010. Biological compounds extracted from *Codium fragile* by enzymatic hydrolysis and their biological activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:953-959

Lee KY, Jeon YJ. 2005. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *Int Immunopharmacol* 5:1225-1233

Li CX, Liu Y, Zhang YZ, Li JC, Lai J. 2022. Astragalus polysaccharide: A review of its immunomodulatory effect. *Arch Pharm Res* 45:367-389

Li R, Chen WC, Wang WP, Tian WY, Zhang XG. 2009. Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. *Carbohydr Polym* 78:738-742

Li Z, Wang D, Shi YC. 2019. High-solids bio-conversion of maize starch to sugars and ethanol. *Starch* 71:1800142

Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. 2010. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* 115:4699-4706

Opdal SH. 2018. Cytokines, infection, and immunity. In Duncan JR, Byard RW (Eds), SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future: The Past, the Present and the Future. pp.689-710. University of Adelaide Press

Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, Wohlmuth H, Gobe GC. 2016. The antioxidant effects of *Radix Astragali* (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease. *Curr Drug Targets* 17:1331-1340

Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. 2004. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun* 320:1103-1111

Sheng Z, Liu J, Yang B. 2021. Structure differences of water soluble polysaccharides in *Astragalus membranaceus* induced by origin and Their bioactivity. *Foods* 10:1755-1771

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

Shin HY, Kim YS, Shin KS, Han SH, Suh HJ, Yu KW. 2024. Effect of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharides isolated from crabapple hydrolysates on IL-1β-induced inflammation in intestinal epithelial cells. *Int J Biol Macromol* 277:134240

Smirnova J, Fernie AR, Steup M. 2015. Starch degradation. In Nakamura Y (Ed.), Starch. pp.239-290. Springer

Song Bk, Lee EJ, Kim HK, Jin SD, Kim SC, Kim DH. 1998. Effects of *Astrgali Radix* on the function of murine immunocytes *in vivo* and *in vitro*. *Koren J Herbol* 13:115-128

Suh HJ, Yang HS, Ra KS, Noh DO, Kwon KH, Hwang JH, Yu KW. 2013. Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. *Food Chem* 138:1079-1086

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

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:443-452

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 RAW264.7 macrophages. *Biomol Ther* 24:184-190

Wang K, Zhou Y, Li M, Chen Z, Wu Z, Ji W, Wang J, Zhang Y. 2024. Structural elucidation and immunomodulatory activities in vitro of type I and II arabinogalactans from different origins of *Astragalus membranaceus*. *Carbohydr Polym* 333:121974

Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. 2003. The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:361-368

Yang HS, Yu KW, Choi YM. 2004. Isolation of polysaccharides modulating mouse's intestinal immune system from peels of *Citrus unshiu*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:1476-1485

Yoon JA, Yu KW, Shin SH, Cho HY. 2010. Activation of intestinal immune system by an orally administered methanol extract from pine needles. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:356-362

Zhang J, Xie X, Li C, Fu P. 2009. Systematic review of the renal protective effect of *Astragalus membranaceus* (root) on diabetic nephropathy in animal models. *J Ethnopharmacol* 126:189-196

Zhang K, Shi S, Han W. 2018. Research progress in cytokines with chemokine-like function. *Cell Mol Immunol* 15:660-662

Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W. 2012. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol*

Immunol 9:11-19

Zhao LH, Ma ZX, Zhu J, Yu XH, Weng DP. 2011. Characterization of polysaccharide from *Astragalus radix* as the macrophage stimulator. *Cell Immunol* 271:329-334

Zheng Y, Ren W, Zhang L, Zhang Y, Liu D, Liu Y. 2020. A review of the pharmacological action of *Astragalus* polysaccharide. *Front Pharmacol* 11:349-363

Received 25 September, 2024
Revised 10 October, 2024
Accepted 16 October, 2024