

## 시판양조 및 재래식 조선간장으로 부터 분리한 다당의 면역증강 활성 비교

박혜령 · 이문수 · 조선영 · 원혜진<sup>1</sup> · 이현순<sup>1,2</sup> · 이 호 · 신광순\*

경기대학교 식품생물공학과, <sup>1</sup>경기대학교 기초과학연구소, <sup>2</sup>고려대학교 식품영양학과

### Immuno-stimulating Activities of Polysaccharides Isolated from Commercial Soy Sauce and Traditional Korean Soy Sauce

Hye-Ryung Park, Moon-Su Lee, Sun Young Jo, Hye-Jin Won<sup>1</sup>, Hyun-Sun Lee<sup>1,2</sup>, Ho Lee, and Kwang-Soon Shin\*

Department of Food science and Biotechnology, Kyonggi University

<sup>1</sup>The Research Institute of Basic Science, Kyonggi University

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Korea University

**Abstract** The varying characteristics between traditional and commercial soy sauce may be initiated by raw materials and fermentation techniques for the production of *meju* and *koji*. We examined properties regarding polysaccharides isolated from commercial soy sauce made by the *koji* process (CSP-0) and Korean traditional soy sauce made by the *meju* process (KTSP-0) as well as their immuno-stimulating activities. KTSP-0 had rhamnogalacturonan II (RG-II) including 1.1% of unusual monosaccharides 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). Anti-complementary activities of CSP-0 and KTSP-0 were increased dose-dependently but KTSP-0 (64.7%) was higher than CSP-0 (56%) at 1,000 µg/mL. C3 activation products were identified by crossed immuno-electrophoresis. CSP-0 caused complementary activations *via* only classical pathway while KTSP-0 caused complementary activations *via* both alternative and classical pathways. KTSP-0 significantly increased the secretion of interleukin (IL)-6 at 8-1,000 µg/mL and IL-12 at 40 µg/mL on macrophages. The results suggest that the immuno-stimulating activity of KTSP-0 is greater than that of CSP-0 from anti-complementary activity.

**Keywords:** commercial soy sauce, Korean traditional soy sauce, polysaccharide, anti-complementary, macrophage

## 서 론

간장(soy sauce)은 우리나라의 가장 중요한 조미료 중 하나로 오랜 전통을 가진 한국의 발효식품으로 주로 아시아권에서 많이 이용되어 왔으나 건강에 대한 관심의 증대와 세계화와 더불어 점차 전세계적으로 사용범위가 넓어지고 있다(1). 우리나라에서 간장을 언제부터 만들기 시작했는지는 정확히 알 수 없으나 삼국사기에 638년 신문왕이 왕비를 맞을 때 폐백 품목으로 간장과 된장이 기록되어 있는 것으로 보아 삼국시대에 이미 장류가 사용되었음을 알 수 있다. 조선시대 대표적인 조리서인 요록, 주방문, 시의전서에는 대부분 간장 담그는 법이 기록되어 있다(2).

재래식 조선간장은 대두를 수침 자숙한 후 성형해 메주를 만들어 자연상태에서 발효시킨 후, 메주에 염수를 넣어 담금하고 메주 중에 생육하는 각종 균류의 효소작용을 이용하여 숙성 발효시켜 덧의 건데기와 액을 분리하여 얻은 액을 달인 후 숙성시켜 만들어 진다. 이런 재래식 조선간장은 주로 일부 가정이나 사찰에서 자연 접종된 미생물로 메주를 만들어 간장을 만들고 있

다. 그러나 시판되고 있는 대부분의 간장은 대두와 밀을 주원료로 사용하며 인위적으로 *Aspergillus oryzae*나 *A. sojae*와 같은 종균(3)을 접종배양한 *koji* 중의 효소를 이용하고 염수를 가한 후 발효시켜 제조하는 개량식이 대부분이다.

재래식 조선간장이나 양조간장 모두 재료에 들어 있는 단백질을 peptide로 거의 분해되어, 분해된 peptide는 발효과정 중 아미노산으로 전환되면서 간장 특유의 맛을 만들어낸다(4). 반면 탄수화물은 숙성과정에서 완전히 분해되지 않고 간장 내에 일부만 분해된 다당(polysaccharide)의 형태로 존재한다(5). 간장은 조미료의 기능 이외에도 간장에 함유된 향기성분의 항암활성(6,7), *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성(8), 혈전 생성 억제 활성(9), angiotensin I-converting enzyme(ACE) 억제활성(10) 등을 가지고 있다고 알려져 있으며, 최근 일본식 간장(shoyu)으로부터 얻어진 다당이 알레르기 억제 효과(anti-allergic effects)(5), macrophage 및 lymphocyte 기능 증진 효과(11), 장관면역 증진활성(12) 및 철분 흡수 증진 효과(13)등이 있다고 보고되고 있다. 그러나 현재까지 알려진 간장 유래 다당의 활성은 모두 일본식 간장인 shoyu에서 얻어진 다당에 대한 활성으로 아직까지 우리나라 재래식 간장의 생리활성에 대한 연구는 전무하다. 현재 시판되는 대부분의 양조간장은 일본의 shoyu처럼 밀과 콩을 원료로 하여 *koji* 방식으로 만들어지는 반면 우리나라의 재래식 조선간장은 대두만으로 만들어진 메주에 벗짚과 공기 중의 미생물이 자연적으로 접종하게 한 후 1-2개월 발효시키는 과정에서 대두의 단백질 및 당류 성분이 별도의 가공처리가 분해되는 과정을 통해 만들어 진다(14). 본 연구는 일본식으로 만들어진 양조

\*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 443-760, Korea  
Tel: 82-31-249-9655  
Fax: 82-31-249-9655  
E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr  
Received January 8, 2012; revised February 29, 2012; accepted February 29, 2012

간장과 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래식 조선간장으로부터 얻어진 다당의 면역증진활성을 비교하여 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래간장의 기능성을 알리기 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 양조간장은 생표식품(Gyeonggi, Korea) 제품 중 대두와 밀만을 사용하여 *koji* 방식으로 만들어진 100% 양조간장을 대형 유통마트에서 구입하여 사용하였으며, 우리나라 재래식 조선간장은 전북 순창에 소재한 농림부 지정 전통식품 제조업체(제 26호)인 이기남할머니고추장에서 전통방식으로 제조 및 숙성된 조선간장을 구입하여 사용하였다. 세포 배양시 사용한 Eagle's minimal essential medium(EMEM), RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL Co.(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 구성당 분석 시 사용한 표준당, trifluoroacetic acid(TFA), anti-human C3 serum, thioglycollate는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

### 간장으로부터 다당의 분리

각각의 간장 1 L에 4배의 에탄올을 첨가하여 최종농도가 80%가 되도록 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 원심분리(6,000 rpm, 30 min)하여 얻은 침전물을 재용해한 다음 Spectra/Por 2 투석막(MWCO: 12,000-14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 2-3일간 투석한 다음 동결건조하여 사용하였다.

### 일반분석방법

중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(15)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법(16)으로, 단백질 함량은 표준물질 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(17)으로, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)는 thiobarbituric acid(TBA) 비색정량법(18)을 사용하였다.

구성당 분석은 시료를 2 M TFA로 가수분해한 후, 각각 alditol acetate 유도체(19)로 전환시킨 후, SP-2380 capillary column(0.2  $\mu$ m film, 0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 GC ACME-6100(Young-Lin Co., Anyang, Korea)을 이용하여 분석하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector (FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

### 보체계 활성능 측정

항보체 활성(anti-complementary activity)은 Mayer법(20)을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca<sup>2+</sup>, 10 mM Mg<sup>2+</sup>이 함유된 GVB<sup>2+</sup> 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 혼합하여 1차 반응시킨 후, 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 넣어 2차 반응을 시킨 다음 4°C의 PBS(phosphate buffered saline)를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 총보체 용혈 저지율(ITCH<sub>50</sub>: Inhibition of 50% total comple-

ment hemolysis)로 나타난 후 양성대조군인 PSK의 활성을 사용하여 보정 후 나타내었다(21).

### 보체계 활성화 경로 검토

보체계의 활성화 경로 측정은 2차원 면역전기영동(Crossed immuno-electrophoresis)을 이용하여 측정하였다. GVB<sup>2+</sup> buffer, 10 mM EDTA가 함유된 EDTA-GVB<sup>2+</sup> buffer, Mg<sup>2+</sup>이온만이 함유된 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2+</sup> buffer에 정상인의 혈청과 시료를 각각 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후, 25 mM barbital buffer(pH 8.6)를 사용하여 조제한 1% agarose gel 상에서 1차원 전기영동을 행하였다. 이후 0.5% anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose gel 상에서 약 15시간 동안 2차 전기영동을 행하였다(1 mA/cm). 전개된 gel은 bromophenol blue로 염색시켜 항체와 반응하여 형성된 침강선을 관찰함으로써 C3의 분해산물을 확인하였다(22). 각각의 반응액은 총보체 용혈의 저지율을 측정함으로써 시료의 보체계 활성화 경로를 비교 검토하였다.

### 면역계 관련 세포에 대한 독성 측정

Mouse leukaemic monocyte macrophage 유래 세포주인 RAW 264.7(ATCC® TIB 71™) cell은 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 10% FBS를 함유한 EMEM에서 배양하여 실험에 사용하였다. Peritoneal macrophage 세포는 6-8주령 웅성 BALB/c mouse(G-Bio Co., Gwacheon, Korea)의 복강에 5% thioglycollate를 주입한 후 72-96 시간 내에 유도된 macrophage를 회수하여 사용하였다(23). 비장 세포는 6-8주령의 웅성 ICR mouse(G-Bio Co., Gwacheon, Korea)의 비장을 적출하여 적혈구를 제거하고, 7% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 각 세포에 대한 독성은 농도를 달리 하여 3일간 처리 후 WST-1을 이용하는 cell counting kit(CCK-8)(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다(24).

### Macrophage로부터 생산된 Cytokine의 측정

상기에 제시된 방법으로 회수된 macrophage에 시료를 처리하고 24시간 후 배지를 회수하여 IL-6, IL-12를 ELISA kit(Pharmin-gen, San Jose, CA, USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

### 통계처리

실험결과는 SPSS 12.0(SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 시료간 및 처리 농도간 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 양조간장 및 재래식 조선간장 유래 다당의 특성

양조간장 및 재래식 조선간장으로부터 80% 에탄올 침전법을 이용하여 침전물을 회수한 결과(Table 1), 양조간장으로부터 5.3 g/L의 고형물(Commercial soy sauce polysaccharide, CSP-0)을 얻었으며 그 성분을 분석한 결과 순수한 산성다당체임을 알 수 있었다. 양조간장으로부터 얻은 구성당을 분석한 결과 galactose (18.0%), xylose(15.6%), mannose(10.9%), 그리고 Uronic acid (35.5%)가 주 구성당임을 알 수 있었다. 재래식 조선간장으로부터

**Table 1. Yield and chemical properties of CSP-0 and KTSP-0 isolated from soy sauce**

	CSP-0 <sup>1)</sup>	KTSP-0 <sup>2)</sup>
Yield	5.3 g/L	10.7 g/L
Chemical composition		
Neutral sugar (%)	64.2±2.7	73.5±3.6
Uronic acid (%)	35.8±1.7	25.5±0.6
Protein (%)	0	0
KDO <sup>3)</sup> -linked material	0	1.1±0.6
Component of neutral sugar (Mole %)		
Rhamnose	6.6	9.2
Fucose	6.1	7.5
Arabinose	4.5	2.9
Xylose	15.6	12.7
Mannose	10.9	18.2
Galactose	18.0	15.9
Glucose	2.4	7.1

<sup>1)</sup>Polysaccharide isolated from commercial soy sauce made by *koji* process.

<sup>2)</sup>Polysaccharide isolated Korea traditional soy sauce made by *meju* process.

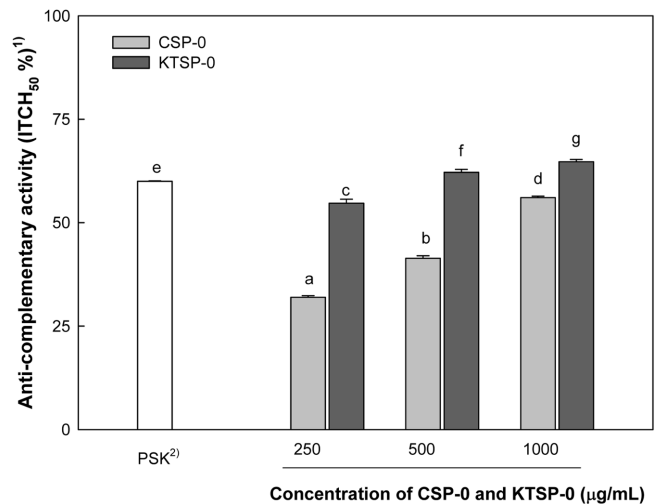
<sup>3)</sup>KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

터는 양조간장보다 2배 많은 10.7 g/L의 고형물(Korean traditional soy sauce polysaccharide, KTSP-0)을 회수할 수 있었으며 주로 mannose(18.2%), galactose(15.9%), xylose(12.7%), rhamnose(9.2%)로 구성된 다당체임을 알 수 있었다.

펙틴물질(pectic substance)들은 고등식물의 1차 세포벽과 중엽(middle lamella)에 주로 존재하는 다당류로서 매우 복잡한 구조를 가지고 있다고 보고되어 있다. 펙틴은 전체 분자의 많은 부분이 homogalacturonan으로 구성되어 있지만(25) 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide로 분지된 rhamnagalacturonan-I(RG-I) 및 rhamnagalacturonan-II(RG-II)가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 알려져 있다(23). 2-Keto-3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid(KDO), 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid(DHA), apiose와 3-C-carboxy-5-deoxyl-xylose(aceric acid)를 함유한 RG-II 구조의 다당이 많은 한 약재에서 발견되고 있다. 인삼잎에서도 이러한 구조를 가진 다당이 분리되었으며 이 물질은 IL-6와 nerve growth factor(NGF)를 증가시키는 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(26). KDO와 같은 특수당을 가진 RG-II 구조는 곰팡이류가 생산하는 효소에 의해 분해되지는 않지만 산 가수분해에 매우 민감하다고 알려져 있다(27). 양조간장과 재래식 조식간장에서 분리된 다당의 KDO 함량을 측정된 결과(Table 1), 양조간장에서는 KDO가 측정되지 않았지만 재래식 조식간장에서는 1.1±0.6% 측정되었다. 따라서 양조간장은 제조과정 중 생성된 산에 의해 KDO를 함유한 RG-II 구조가 파괴되지만 재래식 조식간장의 경우 남아있는 것으로 추정할 수 있었다.

#### 양조간장 및 조식간장 유래 다당의 보체계 활성화

보체계(complement)는 C1-C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성된 효소반응계로 적혈구, 백혈구, 망상내피계 세포나 다른 여러 조직의 세포들의 보체 수용체를 통해 보체계 단백질과 이러한 면역 세포간의 일련의 정보 전달이 가능하며 이로 말미암아 외부감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(25,28). 또한 감염원이나 항원을 인



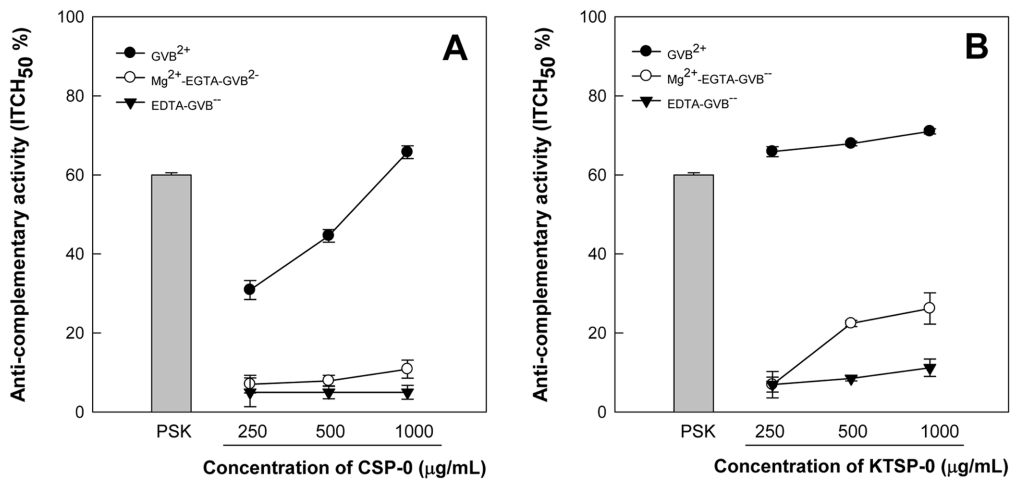
**Fig. 1. Complement activation of CSP-0 isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 isolated from Korea traditional soy sauce.** <sup>1)</sup>The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. <sup>2)</sup>PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control and its concentration is 1,000 µg/mL. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments. CSP-0 is the polysaccharide isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 is the polysaccharide isolated from Korea traditional soy sauce.

식하는 역할로 감염원을 직접 죽이거나 phagocytosis를 활성화시켜 외부감염 병원체 등과 같은 침입인자를 제거하기도 한다(29).

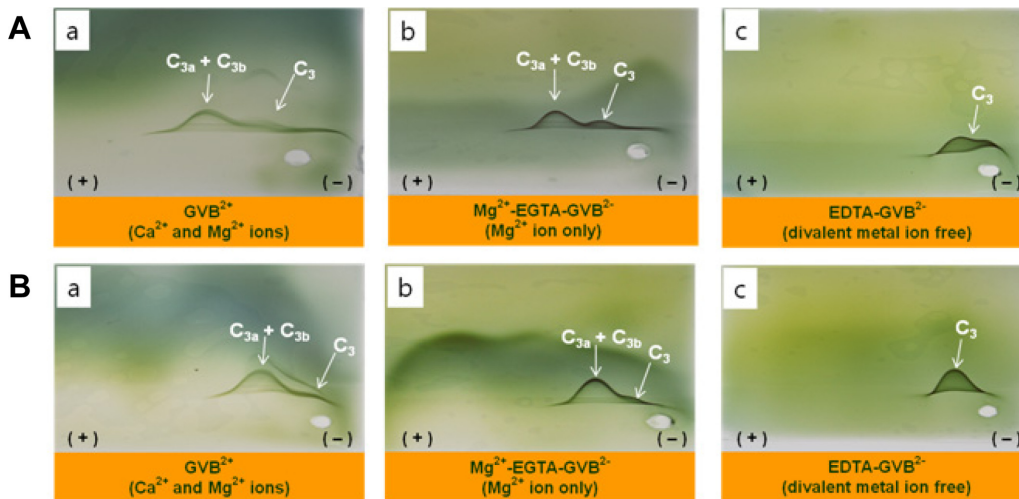
양조간장 및 조식간장 유래 다당에 대한 보체계 활성화능을 측정된 결과(Fig. 1), 양조간장으로부터 얻은 CSP-0는 1,000 µg/mL 농도에서 ITCH<sub>50</sub>값이 약 56.0%에 이르는 보체계 활성화능을 보였으며 조식간장으로부터 얻은 KTSP-0는 250 µg/mL에서 54.6%, 500 µg/mL에서는 62.2%, 1,000 µg/mL에서 64.7%의 높은 활성을 보였다. 따라서 양조간장이나 재래식 조식간장 유래 다당 모두 농도의존적 보체계 활성화능을 가지고 있으며 조식간장이 더 높은 활성화능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 조식간장 유래 다당은 보체계의 강력한 활성인자로 알려져 있으며 본 실험에서 양성대조군으로 사용한 구름버섯(*Coriolus versicolor*; 운지버섯) 기원의 PSK(polysaccharide-K)(23)보다도 높은 활성을 가지고 있었다.

#### 보체계 활성화 경로 검토

보체계가 활성화되면 연속적인 cascade반응에 의하여 보체 단백질이 활성 분자로 분해되고 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다(30). 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(30). 보체계 활성화 경로는 보체의 중요성분인 C3의 활성화 방법에 따라 크게 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)로 구성되어 있는데, 고전경로의 활성화에는 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 모두, 부경로에는 Mg<sup>2+</sup>만이 선택적으로 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(25). 따라서 활성화에 관여하는 금속이온의 존재여부에 따라 반응계를 조절하면 보체계 활성화 경로를 예측할 수 있게 된다.



**Fig. 2. Effect of calcium and magnesium ions on complement activation of CSP-0 (A) and KTSP-0 (B).** The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as the positive control and its concentration is 1,000 µg/mL. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments. CSP-0 is the polysaccharide isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 is the polysaccharide isolated from Korea traditional soy sauce.



**Fig. 3. Crossed immuno-electrophoretic patterns of CSP-0 (A) and KTSP-0 (B).** The pathways of anti-complementary activity were performed by crossed immuno-electrophoresis using anti-human C3. CSP-0 is the polysaccharide isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 is the polysaccharide isolated from Korea traditional soy sauce.

두 종의 간장유래 다당을 GVB<sup>2+</sup> 기본반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계 및 Ca<sup>2+</sup>이온만을 선택적으로 제거한 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계로 나누어 농도별로 항보체활성 (ITCH<sub>50</sub>)을 비교 측정하였다. 그 결과(Fig. 2) 양조간장 유래 다당인 CSP-0의 경우(Fig. 2A), Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>이 모두 존재하는 기본 반응계에서의 활성과 비교할 때 2가 금속이 모두 제거된 반응계에서는 대조군에 비해 거의 완전한 활성의 소실이 관찰되었으나 Mg<sup>2+</sup>이온만 존재하는 반응계에서는 매우 낮은 활성이 유지되는 반면, 조선간장 유래 다당인 KTSP-0의 경우(Fig. 2B), Mg<sup>2+</sup>이온만 존재하는 반응계에서도 활성이 유지되는 결과를 보였다. 이러한 결과 CSP-0는 고전경로를 통해서만 보체계를 활성화시킬 수 있는 반면, KTSP-0는 고전경로와 부경로 모두 활성화시킬 수 있음을 추론할 수 있었다.

**2차원 면역전기영동에 의한 C3산물의 동정**

Mayer법(20)에 의한 항보체 활성측정법은 1차 반응단계에서 시

료성분의 보체계 활성화에 의한 보체의 소모 정도를 측정하는 방법으로 만일 시료 중 보체의 활성화가 아닌 특정한 저해성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 보일 수 있는 문제점을 갖고 있다(31).

따라서 CSP-0 및 KTSP-0의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기인한 것인지, 혹은 시료의 보체 저해활성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 조사하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C<sub>3a</sub>와 C<sub>3b</sub>로 분해되므로(23) 시료와 정상인 혈청을 반응시킨 후 1차 전기영동을 실시하고 anti-human C3를 이용하여 2차 면역전기영동을 행함으로써 C3 분해산물을 동정하고자 하였다. 양조간장 유래 CSP-0와 혈청을 기본반응계(GVB<sup>2+</sup>)에서 반응시킨 경우는 C3의 활성화가 일어나 두 개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3Aa). 따라서 CSP-0의 항보체 활성은 보체계의 저해가 아닌 직접 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다. CSP-0를 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> 및 EDTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계에서 반

응시킨 후 그 분해산물을 관찰한 결과는 Fig. 3Ab 및 Fig. 3Ac 항에 나타난 바와 같다. 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선이 관찰된 반면, Ca<sup>2+</sup>이온을 선택적으로 제거한 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계에서는 2개의 침강선이 관찰되었으나 아직 활성화가 되지 않은 C3의 침강선도 확인 할 수 있었다(Fig. 3Ab). 조선간장유래 KTSP-0와 혈청을 기본반응계(GVB<sup>2-</sup>)에서 반응시킨 경우는 C3의 활성화가 일어나 두 개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3Ba) 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계(Fig. 3Bc)에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선만 관찰되었다. 그러나 Ca<sup>2+</sup>이온을 선택적으로 제거한 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> 반응계(Fig. 3Bb)에서는 C3의 침강선은 양조간장에 비해 확실히 줄어들었으며 C3a와 C3b로 분해된 침강선은 양조간장에 비해 높아진 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 두 간장 유래 다당 모두 뚜렷한 보체 활성능을 가지고 있음이 확인되었으며 CSP-0는 주로 고전경로로만 보체계를 활성화시키는 반면 KTSP-0는 고전경로와 부경로 모두 활성화시킬 수 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

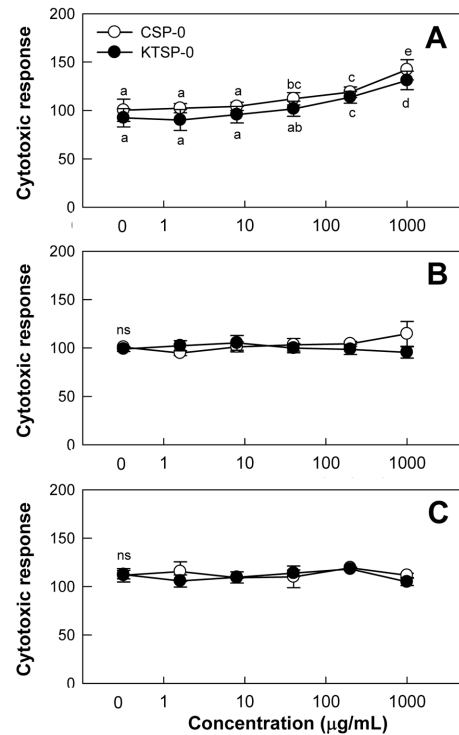
#### Macrophage 및 spleen cell에 대한 효능

Macrophage는 탐식세포라고도 하며, 체내에 모든 조직에 분포하여 면역계 중요한 역할을 담당하고 있는 대표적인 세포이다. 비활성화되어 있을 때보다 세균(bacteria), 바이러스(virus) 등의 의해 외부로부터 활성화된 대식세포는 잠재적 병원체를 제거하는데 더 효율적으로 활동하며, 대표적으로 식세포작용(phagocytosis)과 면역매개물질들(inflammatory mediators)의 분비, T-세포의 활성화 기능을 수행하고 있다. 이 외에도 활성화된 macrophage에 의해서 분비되는 세포독성 유발 단백질들은 암세포, 바이러스에 감염된 세포, 세포 내 세균 등을 제거하는 역할을 한다. 또한 이러한 인체면역기능을 수행함에 있어서 macrophage는 'Class II MHC protein'을 세포 표면에 발현함으로써, T-헬퍼 림프구와 상호활성화를 이루기도 한다(32). 즉 macrophage는 탐식기능뿐만 아니라 외부 항원을 자신의 표면에 점착시켜 후천성 면역계 세포가 항원을 인식할 수 있도록 도와주는 antigen-presenting cell (APC)로서의 역할도 수행한다.

비장(spleen)은 면역계에서 중추적인 역할을 하는 B 및 T lymphocyte의 성숙과 항원에 대한 자극을 받은 후 분열과 분화가 이루어지는 주요 임파기관이다. B세포는 항원의 자극에 의해 쉽게 분화된다고 알려져 있으며, T세포는 표면항원과 결합한 후 lymphokine을 분비함으로써 macrophage의 활성화에 관여한다고 알려져 있다(33).

두 종의 간장으로부터 유래한 다당의 면역관련 세포주인 mouse leukaemic monocyte macrophage 유래 RAW 264.7, primary cultured peritoneal macrophage 및 primary cultures spleen cell에 대한 독성을 측정하였다(Fig. 4). RAW 264.7에 시료 농도를 달리하여 cytotoxic response를 측정된 결과(Fig. 4A) 양조간장 및 조선간장 유래 다당 모두 처리농도(0.32-1000 µg/mL) 내에서는 세포독성이 없음이 확인되었으며 200 µg/mL 이상 처리시 세포독성 효과가 있는 것으로 확인되었다. 복강에서 분리된 primary cultured macrophage(Fig. 4B) 및 primary cultured spleen cell(Fig. 4C)에 처리한 결과 두 시료 모두 처리농도(0.32-1000 µg/mL) 내에서는 세포독성이나 증식효과가 없음이 확인되었다.

두 시료의 활성화된 peritoneal macrophage에서 IL-6와 IL-12 같은 cytokine 분비능을 측정해 본 결과, IL-6의 경우 CSP-0는 40 µg/mL 처리시 대조군보다 유의적으로 높아졌으나 그 이상의 농



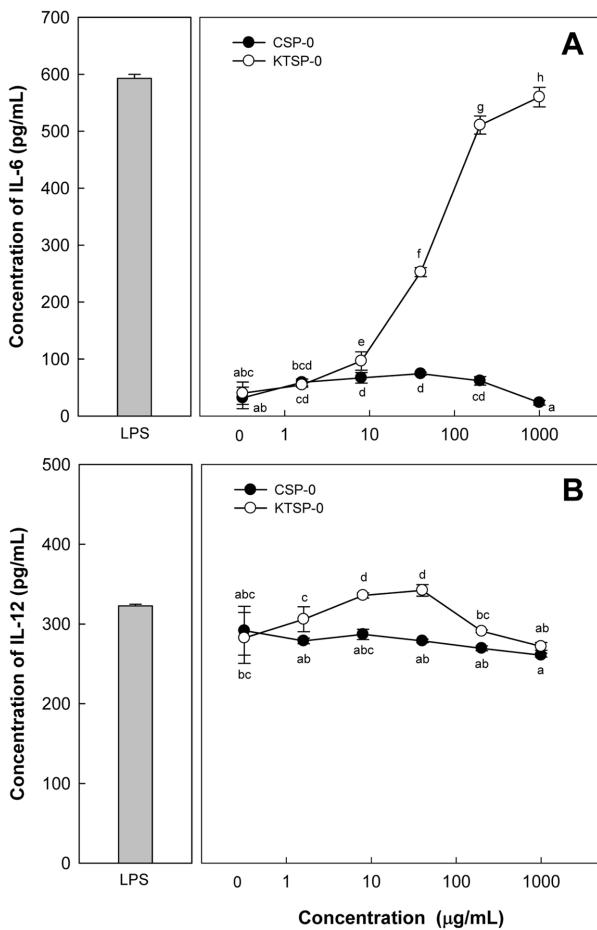
**Fig. 4.** Cytotoxic response on mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, RAW 264.7 (A), primary cultured peritoneal macrophage (B), and primary cultures spleen cell (C) of CSP-0 and KTSP-0. CSP-0 is the polysaccharide isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 is the polysaccharide isolated Korea traditional soy sauce. All cells were incubated with various concentrations of CSP-0 or KTSP-0 for 3 days. The cytotoxic response of these cells was measured by a cell counting kit described in *Materials and Methods*. Data are expressed as % control. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

도나 그 이하의 농도에서는 유의적 차이가 없었다. 반면 KTSP-0의 경우 8 µg/mL 이상부터 대조군보다 유의적 차이를 보이면서 농도 의존적으로 증가하였으며 1000 µg/mL 처리시 12.3배 증가하였다(Fig. 5A). IL-12에 대한 영향을 측정해 본 결과 8-200 µg/mL의 농도에서 KTSP-0가 더 높은 효과를 보였으나 그 이상의 농도에서는 두 시료간 차이는 없었다(Fig. 5B).

염증반응에서 IL-6의 기능이 pro-inflammatory cytokine인지 anti-inflammatory cytokine인지 연구자들마다 다르게 주장하고 있다(34). Tilg 등(35)은 IL-6는 염증반응에서 IL-1 receptor antagonist와 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 수용체의 분비를 증가시키는 anti-inflammatory cytokine에 속한다고 주장하였으며, Xing 등(36)과 Kaplanski 등(34)도 면역 초기반응이나 염증을 감소시키는 과정에서 IL-6는 anti-inflammatory cytokine이라고 주장하였다. 양조간장과 조선간장 유래 다당은 활성화된 peritoneal macrophage에서 IL-6의 생산에 대한 효과에서 현저한 차이를 보였다.

Inngjerdingen 등(26)의 연구에 의하면 KDO와 같은 특수당을 가진 RG-II 구조는 IL-6와 nerve growth factor(NGF)를 증가시키는 활성을 가지고 있다고 보고하였다. 두 시료간의 성분분석 결과에서도 양조간장 유래 다당에서는 KDO 구조가 없는 것으로 확인되었으나 조선간장 유래 다당은 KDO를 1.1% 가지고 있는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구진은 간장유래 다당의 활성화된 peritoneal macrophage에서 IL-6 생성능은 KDO 구조에 기인한 것으로 추정할



**Fig. 5. Effect on induction of cytokines from activated peritoneal macrophages of CSP-0 and KTSP-0.** CSP-0 is the polysaccharide isolated from commercial soy sauce and KTSP-0 is the polysaccharide isolated Korea traditional soy sauce. Peritoneal macrophages were treated with the indicated doses of samples in 24-well plate for 24 h. The level of each cytokine in the supernatants of the cultures was determined by ELISA kits. Lipopolysaccharide (LPS) was used as the positive control and its concentration is 5 µg/mL. The data were expressed as mean±SD of three separate experiments.

수 있었다.

일본의 Matsushita 등은 일본간장인 shoyu로부터 약 1% 정도의 다당을 얻었고 이 다당이 IgA의 생산을 증가시켜 장관면역 증강효과가 있음을 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통해 밝혔으며(12), 또한 Con A로 염증을 유도한 splenic lymphocytes에서 interferon-γ(IFN-γ)의 생산은 증가시키나, IL-4의 생산은 억제시키고 BALB/c mice에 2주간 경구투여시 세포매개성 면역을 담당하는 Th1 세포의 증가하는 것을 확인함으로써 이 다당이 면역증가 효과가 있음을 확인하였다(11).

간장은 우리나라에서 가장 대표적인 발효식품 중 하나이며 가장 중요한 조미료 중 하나이다. 현재 우리나라에서 시판되고 있는 대부분의 간장은 일본의 *koji* 방식으로 제조되고 있는 반면, 재래식 조선간장은 자연적으로 미생물이 접종 및 발효된 메주를 이용하여 제조되고 있다. 본 연구결과 양조간장 및 조선간장 모두 발효과정 중 간장의 재료에 들어있는 단백질은 모두 분해되었지만 대두의 세포벽에 있는 다당은 발효 후에도 남아 있는 것을 알 수 있었다.

양조간장으로부터는 약 0.5%의 다당을 얻었지만 조선간장으로부터는 1.1%의 다당을 얻을 수 있었다. 두 간장 유래 다당 모두 보체계 활성화능을 가지고 있으며 활성의 정도는 재래방식으로 제조된 조선간장이 더 높은 것을 확인하였다. 또한 양조간장 유래 다당은 주로 고전경로로만 보체계를 활성화시키는 반면 조선간장 유래 다당은 고전경로와 부경로 모두 활성화시킬 수 있음을 확인 할 수 있었다. 조선간장 유래 다당은 KDO를 가지고 있는 RG-II 구조를 가지고 있어 활성화된 peritoneal macrophage에서 IL-6의 생산능을 높이는 것을 확인하였다.

현재 메주는 자연접종방식으로 만들어져 어떠한 미생물이 대두의 발효에 관여하는지 정확히 규명되지는 못하고 있으며 표준화된 생산이 불가능한 실정이다. 따라서 조선간장의 발효에 어떠한 미생물이 관여하는지 체계적인 연구가 필요하며 이러한 연구를 통해 표준화된 우수한 품질의 조선간장의 제조가 가능하리라 생각한다. 우리는 본 연구를 통해 양조간장보다 조선간장이 보체계 활성화를 통해 높은 면역증강 효과를 가지고 있는 것을 확인 하였다. 본 연구는 조선간장의 우수성을 알리는데 기초자료로 활용될 것이라고 생각한다.

## 요 약

현재 우리나라에서 시판되고 있는 대부분의 양조간장은 일본의 *koji* 방식으로 제조되고 있는 반면, 재래식 조선간장은 자연적으로 미생물이 접종 및 발효된 메주를 이용하여 제조되고 있다. 본 연구는 일본식으로 만들어진 양조간장과 우리나라 전통방식으로 만들어진 재래식 조선간장으로부터 얻어진 다당의 특성과 면역증진활성을 비교하였다. 조선간장 유래 다당인 KTSP-0는 2-keto-3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid(KDO)(1.1%)의 구조를 가지는 rhamnagalacturonan II(RG-II)가 있음을 확인하였다. 양조간장 유래 다당 CSP-0와 KTSP-0의 보체계 활성화능을 측정할 결과 두 시료 모두 농도의존적으로 증가하는 보체계 활성을 가지고 있었으나, 1,000 µg/mL 농도에서 KTSP-0는 64.7%, CSP-0는 56%의 활성을 나타내었다. C3의 보체계 활성 경로를 확인하기 위해 2차원 면역전기영동을 행하였다. 그 결과, CSP-0는 고전경로로만 보체계를 활성화 시키는 반면, KTSP-0는 고전경로와 부경로 모두를 통해 보체계를 활성화 시키는 것으로 나타났다. CSP-0와 KTSP-0는 비장 유래세포와 macrophage에 대한 세포독성이 없음을 확인되었으며, KTSP-0는 활성화된 복강유래 macrophage에서 IL-6는 8-1,000 µg/mL의 비교적 넓은 범위에서, IL-12는 40 µg/mL의 농도에서 cytokine의 분비를 증가시켰다. 본 연구를 통해 양조간장보다 조선간장이 보체계 활성화를 통해 높은 면역증강 효과를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 논문은 농림수산식품부에서 시행한 2012년 한식세계화사업 용역연구사업의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Yokotsuka T. Soy sauce biochemistry. Adv. Food Res. 30: 195-329 (1986)
2. Lee WJ, Cho DH. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation. J. Korean Agric. Chem. Soc. 14: 137-148 (1971)
3. Choi C, Choi KS, Lee SH, Hong SP, Lee HD, Bae DK. Characteristics and action pattern of α-galactosidase from *Scopulariopsis*

- brevicaulis* in Korean traditional *meju*. *Agr. Chem. Biotechnol.* 41: 489-495 (1998)
4. Kobayashi M, Hashimoto Y, Taniuchi S, Tanabe S. Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce. *Int. J. Mol. Med.* 13: 821-827 (2004)
  5. Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama R, Sugimura T, Yamamoto K. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic activity of soy sauce. *Int. J. Mol. Med.* 14: 879-884 (2004)
  6. Benjamin H, Storkson J, Nagahara A, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.* 51: 2940-2942 (1991)
  7. Kataoka S, Liu W, Albright K, Storkson J, Pariza M. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy sauce. *Food Chem. Toxicol.* 35: 449-457 (1997)
  8. Masuda S, Hara-Kudo Y, Kumagai S. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce, a fermented seasoning. *J. Food Protect.* 61: 657-661 (1998)
  9. Tsuchiya H, Sato M, Watanabe I. Antiplatelet activity of soy sauce as functional seasoning. *J. Agr. Food Chem.* 47: 4167-4174 (1999)
  10. Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1107-1110 (1993)
  11. Matsushita H, Kobayashi M, Tsukiyama R, Yamamoto K. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating activities of shoyu polysaccharides from soy sauce. *Int. J. Mol. Med.* 17: 905-909 (2006)
  12. Matsushita HF, Kobayashi M, Tsukiyama R-I, Fujimoto M, Suzuki M, Tsuji K, Yamamoto K. Stimulatory effect of shoyu polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system. *Int. J. Mol. Med.* 22: 243-247 (2008)
  13. Kobayashi M, Nagatani Y, Magishi N, Tokuriki N, Nakata Y, Tsukiyama R, Imai H, Suzuki M, Saito M, Tsuji K. Promotive effect of shoyu polysaccharides from soy sauce on iron absorption in animals and humans. *Int. J. Mol. Med.* 18: 1159-1163 (2006)
  14. Lee JG, Kwon KI, Choung MG, Kwin O-J, Choi JY, Im MH. Quality analysis on the size and the preparation method of *meju* for the preparation of Korean traditional soy sauce (*ganjang*). *J. Appl. Biol. Chem.* 52: 205-211 (2009)
  15. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28: 350-356 (1956)
  16. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
  17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
  18. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595-601 (1978)
  19. Jones TM, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936 (1972)
  20. Kabat EA, Mayer MM. *Experimental Immunochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Thormas Publisher, Springfield, IL, USA. pp.133-240 (1965)
  21. Yamada H, Ra KS, Kiyohara H, Cyong JC, Otsuka Y. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr. Res.* 189: 209-226 (1989)
  22. Shimura K, Ito H, Hibasami H. Screening of host-mediated anti-tumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jpn. J. Pharmacol.* 33: 403-408 (1983)
  23. Hwang YC, Shin KS. Characterization of immuno-stimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 220-227 (2008)
  24. Kim JM, Lim BK, Ho SH, Yun SH, Shin JO, Park EM, Kim DK, Kim S, Jeon ES. TNFR-Fc fusion protein expressed by *in vivo* electroporation improves survival rates and myocardial injury in coxsackievirus induced murine myocarditis. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 344: 765-771 (2006)
  25. Kwon MH, Sung HJ. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci. Ind.* 30: 30-43 (1997)
  26. Inngjerdingen KT, Debes SC, Inngjerdingen M, Hokputsa S, Harding SE, Rolstad B, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J. Ethnopharmacol.* 101: 204-214 (2005)
  27. York WS, Darvill AG, McNeil M, Albersheim P. 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.* 138: 109-126 (1985)
  28. Holers VM. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin. Immunol.* 107: 140-151 (2003)
  29. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J. Immunol.* 176: 1305-1310 (2006)
  30. Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyros kaki* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 879-884 (2002)
  31. Kim JH, Shin KS, Lee H. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 290-295 (2002)
  32. Park W. Study on biological effect of multi-herbal drug KOCO-P1 on mouse macrophage raw 264.7 cells. *Korean J. Herbol.* 23: 151-157 (2008)
  33. Joyce S. Immune recognition, response, and regulation: How T lymphocytes do it. *Immunol. Res.* 23: 215-228 (2001)
  34. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24: 25-29 (2003)
  35. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83: 113-118 (1994)
  36. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101: 311-320 (1998)