

우리밀 Ethanol-Acetic Acid 추출물에 함유된 대식세포의 식작용 활성 증강 물질의 분리·정제

최 면[†] · 김선률 · 김종대* · 이상영* · 김현숙**

강원대학교 축산가공학과

*강원대학교 식품생명공학부

**강원대학교 한국영양과학연구소

Purification of Macrophage Phagocytic Activity-Enhancing Component from Ethanol-Acetic Acid Extract of Korean Wheat

Myeon Choe[†], Sun-Lyul Kim, Jong-Dai Kim*, Sang-Young Lee* and Hyun-Sook Kim**

Dept. of Animal Products Science, *Division of Food & Biotechnology, and

**Institute of Korea Nutritional Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

To purify the macrophage phagocytic activity-enhancing component, ethanol-acetic acid (100 : 1, EA) extract of Korean wheat (Gobun wheat) and imported one (Australian Standard White, ASW) were fractionated with ethylacetate : methanol : H₂O (65 : 25 : 4, v/v/v), and identified by TLC and column chromatography. At least five fractions were separated from the EA extract of the wheats but amounts of fraction B, C and D were more in Gobun wheat than in ASW. The effects of all fractions on phagocytic activity were tested in macrophage J774 cells. Among the fractions, only fraction b of Gobun wheat showed significant increase of phagocytic activity against yeast.

Key words: Korean wheat, macrophage, phagocytic activity, purification

서 론

최근 식품내 각종 성분들의 영양적 역할 외에 체내 생리작용에 다양하게 작용할 수 있다는 연구들이 많이 보고되고 있어(1), 건강 기능성 측면에서 관심을 끌고 있다. 이에 우리 전통식품에 대한 연구가 심도있게 진행되고 있는데, 된장, 감잎, 파래와 곤피, 씀바귀 등이 항암성이 우수한 것으로 입증되었으며(2-5), 항당뇨 기능성이 입증된 것은 참마, 동글레, 도라지, 메밀, 녹차 등이었다(6-10). 또한 식이섬유, 아미노산과 해바라기 종자유, 대두, 버섯류의 보충급여는 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증 흰쥐에서 혈중 지질 개선효과가 우수하였으며, 콜레스테롤 농도를 감소시켰다고 하였다(11-13).

'동의보감'에 의하면(14) 우리밀의 질병 치료에 대한 유용성으로 파상풍의 치료는 밀과 볶은 소금을 각각 한줌씩 섞어 가루를 낸 다음 물로 개어서 바르면 매우 좋은 효과를 얻을 수 있었으며, 그 밖에도 밀은 식중독, 황달병, 발의 물집, 부스럼, 임질, 종기의 치료에 매우 효과적이라고 기술하고 있다. 이러한 민간 요법들은 밀이 생체의 면역기능을 조절하는 물질들을 포함하고 있을 가능성을 시사

하고 있으나 이에 대해서는 과학적으로 연구되어져 있지 않다.

한편, 최 등(15)은 한국산 밀(은파밀, 그루밀, 우리밀)의 PBS 추출물은 수입밀보다 높은 항산화성을 가지고 있음을 확인하였으며, 또한 우리밀 ethanol-acetic acid(EA) 추출물이 대식세포의 식작용 활성을 증강시킴을 측정하여 이를 수입밀과 비교함으로써 우리밀의 우수성을 보고한 바 있다(16).

본 연구에서는 우리밀(*Triticum aestivum L.*) EA 추출물에 함유된 식작용을 활성화시키는 성분에 대해 체계적으로 규명하기 위하여 우리밀 EA 추출물로부터 분획물을 정성하고, 순수 분리하여 각 성분에 대한 phagocytic activity를 검증함으로써 면역 증강 기능성 성분을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 밀은 우리밀 품종중에서도 대식세포의 식작용 활성 증강 효과가 가장 강한 것으로 밝혀진 고

[†]To whom all correspondence should be addressed

분밀(*Triticum aestivum* L.)이었으며(16), 비교대상으로 수입밀인 Australian standard white(ASW)를 선정하였고 농촌진흥청 작물시험장에서 분양받아 직접 세분하여 사용하였다. 각각의 밀 ethanol-acetic acid 혼합액(100:1) 추출물은 밀가루 200 g에 ethanol-acetic acid 용액 400 mL를 가한 후 4°C shaking incubator에서 12시간 동안 교반한 후 30,000×g로 원심분리하여 상등액을 취하였고, 상등액은 다시 초고속원심분리기로 4°C에서 200,000 ×g의 속도로 원심분리한 후 상등액을 0.45 μm membrane filter로 여과하였다. 추출물은 용매에 의한 세포독성을 제거하기 위하여 질소 가스를 주입하면서 감압농축기로 건조시킨 후 냉동 보관하면서 식작용 활성 증강 효과 측정 실험에 사용하였다.

Column chromatography에 의한 분리 및 확인

추출물로부터 대식세포의 식작용 활성 증강 효과가 우수하다고 판단되는 생리활성 물질을 분리, 확인하기 위하여 column chromatography 방법을 이용하였다. 분획에 사용된 column의 크기는 15×400 mm이었고, 충전제로는 silicic acid(mesh 100~200)를 사용하였다. Column에 활성화된 silicic acid를 충전시킨 후 ethylacetate: methanol:H₂O(65:25:4, v/v/v) 용출 용액을 이용하여 전개시켰고, 용출 속도를 1 mL/min로 조절하면서 fraction collector를 사용하여 분획하였다. 분획된 용액의 정성은 thin layer chromatography(TLC) plate를 이용하여 동일한 용매로 전개한 후 10% 황산으로 발색시켜 확인하였고, 확인된 물질은 다시 모아서 농축시킨 후 식작용 활성 증강 효과를 측정하는데 사용하였다.

각 분획분의 대식세포 식작용 활성 증강효과 검증

각 분획분의 대식세포 식작용 활성 증강 효과를 확인하기 위하여 macrophage 세포주인 J774 cell이 yeast를 탐식하는 정도를 측정하였다. J774 cell line을 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지에서 1×10⁴ cells/mL이 되도록 배양한 후 각 분획분을 0.05 mg/10 μL씩 주입하고 2시간 동안 반응시킨 후, fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugated yeast를 5 μL 첨가하여 탐식작용이 일어나도록 1시간 동안 배양하였다. 탐식되지 않은 yeast를 PBS로 3번 세척한 후 형광 현미경을 이용하여 세포 수를 세었고, 대식세포속에 탐식된 yeast의 수를 세어 yeast/macrophage로 대식세포의 식작용 활성을 비교하였다(17,18).

결과 및 고찰

고분밀과 ASW의 EA 추출물 정성

TLC 방법을 이용하여 EA 추출물을 정성한 결과, Fig.

1에서와 같이 고분밀과 ASW의 EA 추출물에서 5개 정도의 band를 확인할 수 있었다. 동량의 고분밀과 ASW를 전개하였을 때 고분밀의 B, C, D band는 ASW보다 더 진하고 두꺼운 것으로 보아 그 함량이 고분밀에서 더 많고, A, E band는 그 함량이 비슷함을 알 수 있었다.

EA 추출물의 상층과 침전물의 대식세포 식작용 활성 증강효과 비교

추출후 시간이 경과함에 따라서 EA 추출물에서 침전물이 생성되는 것을 보고 상층과 침전물의 대식세포 식작용 활성 증강효과를 우선 검증하였는데, Fig. 2와 같이 고분밀의 상층만이 강한 식작용 활성 증강 효과를 나타냈고, 고분밀의 침전물이나 ASW의 상층 및 침전물 첨가군의 식작용 활성은 대조군이나 ethanol 첨가군과 유사하게 나타났다. 그러므로 고분밀의 EA 추출물 중 대식세

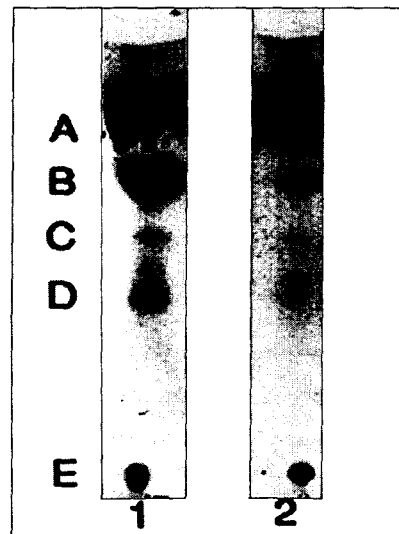


Fig. 1. Thin layer chromatography pattern of EA extracts of two wheats.

1. Gobun wheat, 2. ASW(Australian standard white)

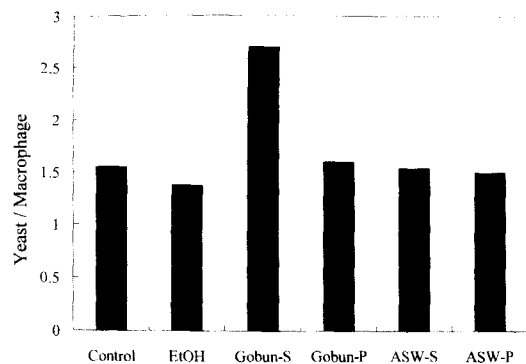


Fig. 2. Phagocytic activity stimulated by either supernatant (S) or precipitate (P) of wheat EA extracts.

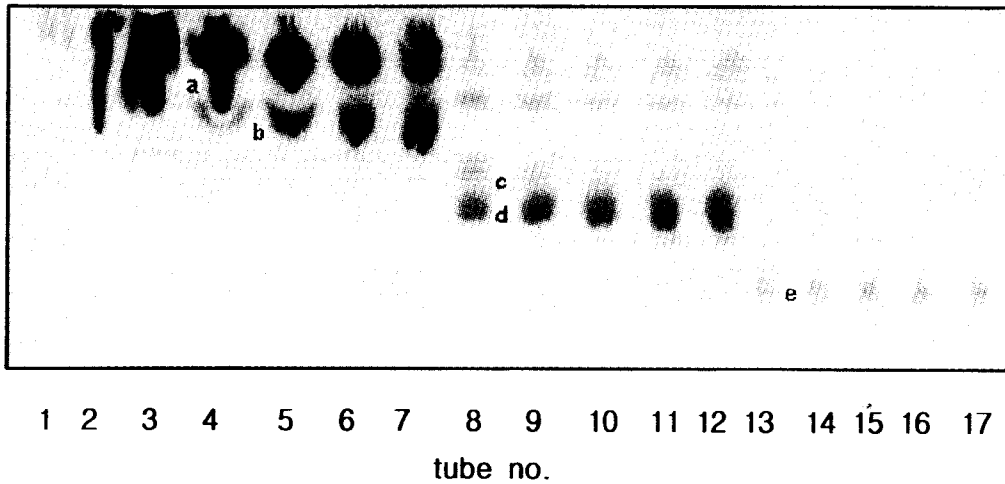


Fig. 3. Fraction pattern of wheat EA extract from Gobun wheat by column chromatography.

포의 식작용을 활성화하는 물질은 상층에 존재함을 확인하였다.

대식세포 식작용 활성 증강 물질의 분리 및 확인

고분밀의 EA 추출물 중 대식세포 식작용 활성 증강효과가 입증된 상층액으로부터 대식세포를 활성화하는 물질을 column chromatography를 이용하여 분리하였다. Fig. 3에서 a, b, c, d, e 다섯개의 band를 확인하였지만, 그림에서 보는 바와 같이 각각의 band로 명확하게 분리되지 않았기 때문에 fraction A(tube no. 1-4), fraction B(tube no. 5-7), fraction C(tube no. 8-12), fraction D(tube no. 13-17)로 크게 구분하여 고분밀과 ASW의 대식세포의 식작용 활성증강효과를 비교, 측정하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 고분밀의 fraction B만이 높은 대식세포의 식작용 활성 증가효과를 보였고, 고분밀의 나머지 fraction(A, C, D)과 ASW의 모든 fraction에서는 대조군과 비교할 때 식작용 활성 증강효과가 없었다. 특히 고분밀의 fraction B의 식작용 활성 증강효과는

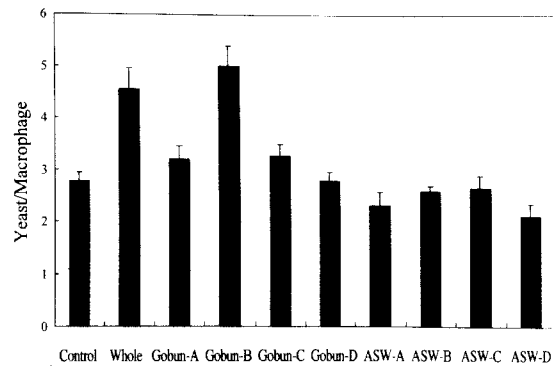


Fig. 4. Phagocytic activity of macrophage stimulated by each fraction of Gobun and ASW EA extract.

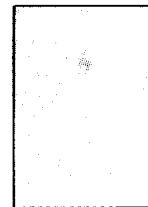


Fig. 5. TLC pattern of fraction b purified from secondary column chromatography of fraction B.

유의성은 없었으나 분획하기 이전의 고분밀 EA 추출물 (fraction A부터 D 전체)보다도 높은 활성을 나타냈다.

Fraction B에는 fraction a, b가 혼재되어 있으므로 용매를 ethylacetate : hexane(1 : 20, v/v/v) 비율로 달리하여 2차 column chromatography를 실시하였다. 이를 통해 fraction b만을 분리하였으며(Fig. 5), 고분밀 10 kg에서 약 4 g 정도를 얻을 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 고분밀은 ASW에는 없는 대식세포 활성을 증가시키는 물질이 존재함을 알 수 있었으며, 이 작용을 나타내는 물질은 고분밀의 EA 추출물중 fraction b라고 사료되었다.

현재 fraction b는 구조를 결정하는 실험과 이 물질을 이용한 동물실험이 진행중에 있으며 추후 인체 실험을 계획중에 있다.

요 약

본 연구에서는 우리밀로부터 대식세포 식작용을 활성화시키는 물질을 탐색하는 과정에서 고분밀의 EA 추출물이 가장 높은 식작용 활성 증강효과를 보임을 알았고, EA 추출물을 정성한 후 순수 분리 정제하여 대식세포 활성 증강효과를 나타내는 단일 물질을 찾고자 하였다. TLC 방법을 이용하여 ASW와 고분밀의 EA 추출물을 정성한

결과 약 5개 정도의 band를 확인한 후, column chromatography를 이용하여 EA 추출물을 분획하였다. 1차 column chromatography만으로는 single fraction이 어려워 분획물을 fraction A, B, C, D로 분류하여 식작용 활성 증강효과를 측정하였다. 대분류된 각 fraction의 식작용 활성 증강효과를 측정한 결과 고분밀의 fraction b가 대부분의 활성을 가진 분획으로 사료되었다. 2차 column chromatography를 통해 fraction b만을 분리하였으며, 구조결정 실험과 동물실험을 추가로 시행하여 fraction b의 효과를 입증할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 농림부 지원 농림수산특정연구 사업의 연구비에 의하여 연구되었음.

문헌

- Goldberg, I. : *Functional foods, designer foods, pharma-food nutraceuticals*. Chapman & New york (1994)
- Choi, S.Y., Cheigh, M.J., Lee, J.J., Kim, H.J., Hong, S.S., Chung, K.S. and Lee, B.K. : Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (*doenjang*) on the various tumor cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 458-463 (1999)
- Kim, B.G., Rhew, T.H., Choe, E.S., Chung, H.Y., Park, K.Y. and Rhee, S.H. : Effect of selected persimmon leaf components against sarcoma 180 induced tumor in mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **22**, 334-339 (1993)
- Lee, Y.S., Kim, D.S., Ryu, B.H. and Lee, S.H. : Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **21**, 544-550 (1992)
- Kim, S.H. : Inhibitory effects of *Ixeris dentata* on the mutagenicity of aflatoxin B₁, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **24**, 305-312 (1995)
- Kim, M.W. and Lim, S.J. : Effects of fractions of *Dioscorea japonica* thunb on blood glucose level and energy metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.*, **31**, 1093-1099 (1998)
- Sung, N.J., Lee, S.J., Shin, J.H., Lee, I.S. and Chung, Y.C. : Effects of *Platycodon grandiflorum* extract on blood glucose and lipid composition in alloxan induced hyperglycemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 986-992 (1996)
- Lim, S.J. and Kim, Y.S. : The effect of butanol fraction of *Polygonatum odoratum* with vitamin E on blood glucose levels and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.*, **31**, 1385-1393 (1998)
- Lee, J.S., Lee, M.H., Son, H.S. and Mang, Y.S. : Effects of buckwheat on the activities of pancreatic digestive enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 831-838 (1996)
- Park, G.Y., Lee, S.J. and Im, J.G. : Effects of green tea catechin on cytochrome P₄₅₀, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 901-907 (1997)
- Jang, J.Y., Lee, M.K., Kim, M.J. and Cho, S.Y. : Effect of fiber on serum lipid metabolism in rats with diet-induced cholesterolemia. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1211-1216 (1998)
- Choi, W.J., Kim, H.S., Kang, J.O., Kim, S.H., Su, I.S. and Chung, S.Y. : Effects of feeding the mixture of linseed and sunflower seed oil on the lipid components of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **23**, 23-30 (1994)
- Kim, G.J., Kim, H.S. and Chung, S.Y. : Effects of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholesterolemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **21**, 131-135 (1992)
- 허준지음. 박인규, 김봉제 감수 : 가정 한방 동의보감. 국일문화사, p.216-217 (1990)
- 최면, 김선률, 신건재 : 우리밀에 함유된 항산화 기능성에 관한 연구. 한국식품영양과학회 제42차 추계학술대회, 편역과 식품, 영양, p.78-79 (1997)
- 김선률, 신건재, 김종대, 박재봉, 최면 : 우리밀에 함유된 면역 증강 기능성 물질의 확인. 한국식품영양과학회 제44차 추계학술발표회, 당뇨와 영양, p.145 (1998)
- Choi, M.W., Kim, K.H. and Park, K.Y. : Effects of *kimchi* extracts on the growth of sarcoma-180 cells and phagocytic activity of mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 254-260 (1997)
- Smith, D.L. and Rommel, F. : A rapid method for the simultaneous determination of phagocytic microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro*. *J. Immunol. Methods*, **17**, 241-247 (1977)

(1999년 12월 16일 접수)