J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 1, pp. 49~56 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

β-glucan이 Sparague-Dawley 랫드의 성장, 식이효율 및 혈액성상에 미치는 효과

김소정 · 이진석 · 권중기 · 안인정 · 이성호 · 박영석 · 박병권 · 김병수 · 김상기 · 송성기[2] 이종대[2] · 조성대[3] · 최창순[4] · 정지윤[1]*

공주대학교 특수동물학과, [1]공주대학교 두과녹비자원센터, [2]큐젠바이오텍,
[3]전북대학교 구강병리학교실, [4]중앙대학교 식품공학부

Effect of β-glucan on Growth, Feed Efficiency and Hematologic Index in Sparague-Dawley Rats

So-Jung kim, Jin-Seok Lee, Jung-Ki Kwon, In-Jung An, Seung-Ho Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim, Sung-Ki Song[2], Jong-Dae Lee[2], Sung-Dae Cho[3], Changsun Choi[4], and Ji-Youn Jung[1]*

Dept. of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea
[1]Legume Bio-Resource Center of Green Manure (LBRCGM), Kongju National University, Yesan 340-702, Korea
[2]QueGen Biotech, Jeongwang 1-dong, Siheung-si 429-931, Korea
[3]School of dentistry, Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[4]School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
(Received January 8, 2011/Revised February 10, 2011/Accepted March 9, 2011)

ABSTRACT - To investigate the toxicological effects of β-glucan, we performed basic studying on β-glucan in Sprague-Dawley (SD) rats. Standard endpoints in this study included mortality, clinical observations, changes of body weights, analysis on food consumption, ophthalmoscopic examination, hematologic examination, serum biochemistry, analysis of organ weights, gross anatomic pathology and histopathology. No clinical signs and mortality were observed in animals treated with beta-glucan throughout the experimental period. The average body weight of each treatment groups showed similar levels at end of experiment. There were no treatment-related changes in mortality, body weights changes, food consumption, ophthalmoscopic examination. Although there were statistically significant differences between the control and treated groups in some relative and absolute organ weights, and hematological and biochemical analysis, the data were in biologically normal ranges and did not show a dose-dependent manner. In the morphological change, hepatic tissue were not showed ballooning degeneration and irregular arrangement of hepatic cell in β-glucan treatment groups with control group. Also, organs weights (liver, heart, kidney and stomach) and hematological indices (WBC, RBC, Hb, Hct and Platelet) did not show statistically significant differences among the experimental groups. In summary of these results, there were no changes in mortality, mean body weight, clinical signs, food consumption. There were no changes in ophthalmological examination, hematology, blood chemistry, necropsy and histopathology. In conclusion, although further investigation of glucan should be performed in the functions registered in many ancient literatures, β-glucan is physiologically safe and may have potential as candidate food for human health.

Key words : β-glucan, toxicological effect, FER

현재까지 제약 및 의학적인 방법이 질병의 주된 치료방법으로 이용되어왔지만 최근에 특정식품의 섭취가 만성질환의 발생을 억제 또는 지연시킨다는 연구보고가 나오면서부터 만성질환의 치료방법으로서 식이요법을 중요하게 생각하게 되었다. 이에 따라 식품산업에서는 질적으로 우수한 식품 개발을 위해 기능성 식품들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그 중에서도 독특한 맛과 향기를 지니고 있는 버섯은 지구상에 수천종이 자생하고 있어 유전자원으로서의 중요성이 지대할 뿐만 아니라 기능성 식품소

*Correspondence to: Ji-Youn Jung. Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan Chungnam, 340-702, Korea
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@Kongju.ac.kr

재 및 각종 약리 활성을 나타내는 신약개발 소재로도 크게 주목을 받고 있다.

담자균류에 속하는 버섯은 균사체의 영양대사로 얻어지는 대사산물이 축적된 자실체의 형태로 나타나는데, 최근에 와서는 자실체 및 균사체의 추출물이나 균사체의 배양물이 성인병이나 각종 병의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀져서 기능성 건강식품이나 의약품으로의 연구 개발이 활성화되고 이용이 크게 증가하고 있는 실정이다[1,2]. 특히, 버섯 유래의 특정 구조를 갖는 다당체는 종래의 화학요법제와는 달리 숙주내의 면역기능을 활성화시켜 효과를 나타내고, 인체에 부작용이 적고 안전하여 다량으로 장기간 연속 복용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 지금까지의 연구에 의하면, 버섯 유래의 다당체는 marcrophage를 자극하여 활성화하거나, accessory marcrophage에 작용하여 임파구 활성인자인 interleukin-1(IL-1)의 생산을 촉진한다. 비특이적으로 natural killer를 강화함과 동시에 interleukin-2(IL-2)를 생산하여 세포위해성 T-임파구의 유도 및 생산을 촉진함으로써 항종양 효과를 나타낸다고 보고되어 있다[3-5].

버섯에서 알려진 항암활성은 주로 β-glucan의 면역기능 향상 효과에 기인하는 것으로 알려져 있다. β-glucan은 미국 식품의약국안전청(FDA)의 GRAS(General Recognized as Safe)로 승인을 얻어 식품첨가물로 널리 사용중이며, 미국, 일본 등 전세계적으로 기능성 식품 및 화장품 등으로 널리 사용되어지고 있다. 일반적으로 β-glucan은 β-1,3-결합, β-1,4-결합, β-1,6-결합 등 β-form의 포도당 결합을 구별없이 사용하고 있으나, 실제 이러한 결합의 유형이 다양할 뿐 아니라 버섯류들에서 알 수 있는 바와 같이, 기원에 따라 구성당의 균일성, 결합형태, 분자량 등 많은 차이가 있어 그 물리화학적 특성 및 생체 기능도 다른 경우가 많다[6]. 일반적으로 β-(1,3) 결합을 갖는 glucan은 다른 결합 유형보다 좀 더 강력한 대식세포 촉진 활성을 갖는 것으로 알려져 있으나[7] β-(1,6)-분지된 β-(1,3)-glucan이 구조적으로 균일하여 안정성이 있으며, 이러한 β-(1,6)-분지된 β-(1,3)-glucan의 형태가 β-(1,3)-glucan보다 기능성이 높다고 보고된 바 있다[8].

β-Glucan을 생성하는 대표적인 버섯과 그 다당체 성분은 운지버섯(Coriolus versicolor)의 PSK(polysaccharide K: krestin)과 PSP(polysaccharide peptide)[9], 영지버섯(Ganoderma lucidum)의 β-glucan[10], 표고버섯(Lentinus edoes)의 lentinan[11,12], 잎새버섯(Grifola frondosa)의 grifolan[13], 아가리쿠스버섯(Agaricus blazei)의 β-1,3-1,6-glucan[14], 치마버섯(Schizophyllum commune)의 schizophllan 등으로 각종 화장품, 의약품이나 건강식품으로 개발되어 이미 상용화된 것도 있다. 본 연구의 치마버섯(schizophllum commne)의 β-glucan은 균일한 β-1,6-분지의 β-1,3-glucan[15]으로 당조성과 구조가 균일하고 균사체 액체 배양시 세포외로 분비되는 안정한 중성 다당류 특성을 가진다.

치마버섯은 담자균류의 치마버섯과에 고목이나 나무말뚝 또는 건축용 목재 등에 기생하며 연중 발생한다. 치마버섯은 거친 식감으로 인해 중국에서만 일부 식용하는 것으로 알려져 있었으나, β-1,6 분지를 갖는 β-1,3-glucan 구조의 'schizophyllan'이라는 다당체의 생리활성이 알려지면서 의약품, 화장품 등의 유효기능성분으로서 다양하게 활용되고 있다[16]. 치마버섯 β-glucan은 면역세포의 기능을 활성화하여 NK-cell, interferon, IL등의 생성을 증가시키고, 항균 및 항암작용이 있으며[17-19], 주로 백혈구 세포상에 존재하는 lectin-binding site(CD11b/18)에 결합함으로써 작용하는 것으로 알려져 있다[20-22]. 이외에도 치마버섯 균사체에서 생성한 β-glucan(Schizophyllan)은 고점도 다당체로서의 보습효과[8], wound healing[23], anti-biotic activity[24] 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 목적은 면역기능강화용 사료첨가제 개발을 위한, 치마버섯(*Schizophyllan commune*)의 균사체를 기반으로 하는 베타글루칸(schizophyllan)의 안전성평가이다.

본 연구에서 개발하고자 하는 사료첨가제는 치마버섯(*Schizophyllan commune*)의 균사체를 기반으로 하는 베타글루칸(schizophyllan)의 생산공정 중 세포/베타글루칸 분리공정 시 완전히 분리되지 않은 schizphylla으로, 화장품용 schizophyllan(GlucanREAL, ㈜큐젠바이오텍)는 배양액 자체의 고점도로 인해 세포 이외에 분리되지 못한 베타글루칸이 0.4% 포함되어있는 배양 부산물이 전체 배양의 20~30%에 해당하는데 현재 폐기물로 처리되고 있다. 본 배양 부산물을 이용하여 면역강화용 사료첨가제로 개발할 경우, 그 효과는 매우 클 것으로 판단되며, 또한 유기 폐기물의 처리 관점에서도, 폐기되는 고영양의 배양부산물을 재활용할 경우, 환경오염원을 감소시킬 수 있으며, 추가적인 부가가치를 창출하게 될 것이라고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 치마버섯(*Schizophyllan commune*) 유래 베타글루칸(schizophyllan)의 배양부산물 비율에서 그 안전성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용된 β-glucan은 치마버섯(*Schizophyllan commune*)의 균사체를 기반으로 하는 0.4% Schizophyllan로써, ㈜큐젠바이오텍에서 제조한 액상형태의 제품을 공급받아 D.W에 희석하여 경구 투여하였으며, 시험물질은 냉동보관하였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물로는 4주령(131.40 ± 8.61 g)의 Sprague-Dawley계통의 암컷 랫드 25마리를 (오리엔트바이오, Seong Nam, Gyeong gido, Korea) 2주간에 걸쳐 환경적응을 위한 예비사육을 실시하였으며, 예비사육기간동안 모든 동물의 일반

건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하여 20마리를 선별하였다. 선별된 동물은 난괴법(randomized block design)에 의해 각 군별로 5마리씩 구성하였으며, 군분리시 군평균체중 및 군표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다. 실험기간 중 사육실 환경조건은 실내온도 25±5°C, 상대습도 40±10%, 조명시간 12시간(08:00 점등, 20:00 소등), 조도는 150~200Lux로 유지하였다. 사육상자에는 시험유형, 시험번호, 시험물질, 군번호, 개체번호, 성별, 투여용량, 실험기간 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하였으며, 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다. 모든 실험동물은 매일 일정한 시간(17:00)에 실험동물용 고형사료(Samtako. Co)와 음수를 급여하여 자유 섭취토록 하였다.

동물실험은 공주대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회규정에 따라 수행 되었다.

시험설계

치마버섯(*Schizophyllan commune*)의 균사체를 기반으로 하는 0.4% β-glucan(Schizophyllan, ㈜큐젠바이오텍)을 실험재료로 사용하였다.

시험군의 구성은 β-glucan을 D.W-(distilled water)에 용해시켜 저용량 (하루 사료섭취량의 0.2%의 β-glucan), 중간용량 (하루 사료섭취량의 1%의 β-glucan), 고용량 (하루 사료섭취량의 5%의 β-glucan) 의 용량으로 암컷 SD rat에 경구투여하였고, 용매 대조군에서는 D.W를 동일하게 투여하였다. 시험물질의 제조는 랫드의 하루 사료섭취량을 기초로 계산하여 체중칙량 직전에 제조하여 투여하였다. 시험물질의 투여는 주 5회(월~금) 일정한 시간에(15:00) 경구투여하였다.

검사항목

일반증상 관찰 및 안과학적 검사

일반증상관찰은 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 일정시간에 관찰하였고, 일반 임상증상 항목으로서 anorexia, salivation, diarrhea, vomiting, polyuria, anuria, fecal change의 정도를 기록하였다. 또한 안과학적 검사는 실험시작전과 실험시작 후 할로겐 검안경을 이용하여 각막, 홍채, 수정체 및 망막등을 검사하였다.

체중, 사료섭취량 및 식이효율

사료 섭취량은 각 사육상자별로 3일 혹은 4일간 공급한 사료량을 합산하고 남은 잔량을 감하여 그 값을 하루당 섭취한 양으로 환산한 다음 동물수로 나누어 개체별 일일 사료섭취량으로 환산하였으며(g/day/aminal), 식이섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 절식시켰다. 실험기간 동안의 체중증가량으로 같은 기간에 섭취한 사료 섭취량을 나누어 식이효율(food efficiency ratio, FER)을 산출하였으며, 그 식은 다음과 같다.

$$FER(\%) = [(\text{Body weight gain} / \text{food intake (g)}] \times 100$$

혈액학적 및 혈청생화학적 검사

혈액학적 검사

모든 실험동물에 대하여 부검일에 12시간 이상 절식시킨 후 에테르로 마취하여 복대정맥으로부터 전채혈해서 얻은 혈액 중 약 3 ml의 혈액을 7.5% 0.072 ml의 EDTA가 함유된 BD Vacutainer (BECKTON-DICKSON, UK)에 분주하여 백혈구(White blood cell ; WBC), 호중구(neutrophil), 임파구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호염구(basophil), 적혈구(Red blood cell ; RBC), 헤모글로빈(hemoglobin), HCT (hematocrit), 평균적혈구용적(Mean corpuscular volume ; MCV), 평균 적혈구 혈색소량(Mean corpuscular hemoglobin ; MCH), 평균적혈구혈색소농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration ; MCHC), 적혈구 크기분포(red cell distribution with ; RDW), PLT (platelet), 평균혈소판 용적(mean plasma volume ; MPV)수를 혈액자동분석기(Hemavet 850Fs, CDC tech, USA)를 이용하여 측정하였다.

혈청생화학적 검사

전 채혈한 혈액 중 혈액학적 검사에 사용한 3 ml을 제외한 나머지의 혈액을 실온에 30분 이상 방치하여 응고시킨 다음 원심분리(3,000rpm, 30min)하여 얻은 혈청으로부터 총단백(total protein), 총 빌리루빈(Total bilirubin), GLU(glucose), 혈액뇨소질소(Blood urea nitrogen ; BUN), CRE(creatinine), 아스파르테이트 아미노전이효소(aspartate aminotransferase ; AST), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase ; ALT), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase ; ALP), 총 콜레스테롤(Total cholesterol)을 혈청자동분석기(BS-400, MINDRAY, China)를 이용하여 측정하였으며, 또한 혈청의 sodium (Na+), potassium(K+), chloride(Cl–)농도를 전해질자동분석장치(EAE electrolyres, Medica, USA)를 이용하여 측정하였다.

혈액학적 및 혈청생화학적 검사는 ㈜ 네오딘벳랩에 의뢰하여 측정하였다.

장기 중량 측정

장기 무게를 조사하기 위하여 실험 종료시 모든 시험동물을 해부하여 간, 신장(좌・우), 폐, 비장, 심장, 부신(좌・우)을 적출하여 ice-cold physiological saline(0.9% NaCl)에서 혈액과 체액을 거즈로 제거한 후 실물 증량을 측정하였다.

병리조직검사

실험 종료 시 부검을 시행하여 간의 색조, 경도, 지방침

착 등과 같은 소견을 육안으로 관찰하고 복강 내 장기들에 대한 특이소견 유무를 조사하였다. 육안 관찰이 끝난 후 곧바로 간을 절취하여 10% formaldehyde 용액에 24시간 고정한 후 수세를 거쳐 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올로 단계적으로 탈수한 다음 paraffin에 포매하여 microtome으로 4 μm 내외의 파라핀조직절편을 제작하여 HE-(Hematoxylin & Eosin) 염색을 하고 광학현미경으로 관찰하였다.

통계학적 방법

랫드의 체중변화는 대조군과 투여군과의 차이를 one-way ANOVA에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 대조군과 각 용량군과 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 하였으며, 발생병변의 빈도는 $\chi 2$(Chi-square)검정을 하였다. 6주간 반복투여시험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p < 0.05$로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다. 또한, 병리조직학적으로 관찰된 병변의 발생빈도는 $\chi 2$(Chi-square)검정을 하였다.

결과 및 고찰

임상증상 및 안과학적 검사

식품의약품안전청의 독성시험기준을 참고하여 랫드에서의 반복 투여 독성시험에서 전 시험기간 동안 매일 일회씩 임상증상을 관찰한 결과 모든 투여군에서 대조군과 차이를 유발하지 않았으며(data not shown), 모든 실험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 투여기간 중 각 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용한 안과학적 검사를 실시하였을 때 대조군과 시험물질투여군에서 시험물질투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

체중, 사료섭취량 및 식이효율

6주간 반복 투여 독성시험을 진행하는 동안 대조군 및 투여군 모두에서 시험물질에 의한 유의할 만한 체중 변화는 관찰되지 않았으나, 경향에 있어서 4주차 이후에 고용량군의 체중이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 1)

시험기간 중 랫드의 대조군, 저용량군, 중간용량군, 고용량군의 군당 하루 평균 사료섭취량은 74.67 ± 4.67, 71.62 ± 3.93, 70.76 ± 3.33, 76.17 ± 3.79(g)으로(Table 4), 시험 종료시, 투여군당 하루 사료섭취량은 시험물질 투여군에서 대조군에 비하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

사료섭취량과 체중증가량을 이용하여 각 군의 6주간 식이효율을 구해보았을 때, 군간에 통계학적으로 유의적인 차이는 없었으며, 대조군에 비하여 투여 용량에 비례하는 경향 또한 관찰되지 않았다.

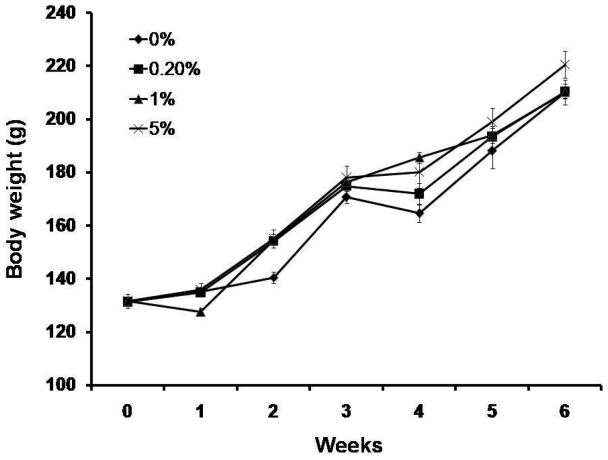

Fig. 1. Body weight changes of rats orally treated with β-glucan 0%(Control; D.W-treated, non β-glucan group); 0.2%(Low; 0.2 % β-glucan-supplemented group); 1% (Middle; 1% β-glucan-supplemented group) ; 5%(High; 5% β-glucan-supplemented group). Each values was expressed as Mean ± SE of 5 SD rats.

혈액학적 변화

Rat의 혈액 형상에 미치는 β-glucan의 영향을 조사하기 위하여 백혈구(WBC), 호중구(neutrophil), 임파구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호염구(basophil), 적혈구(RBC), 헤모글로빈(hemoglobin), hematocrit, 평균적혈구용적(MCV), 평균 적혈구 혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 적혈구 크기 분포(RDW), platelet, 평균 혈소판 용적(MPV)수의 지수를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

NE, MO, RBC, Hb는 모든 시험물질투여군에서 유의적인 차이를 나타내었으나, 모두 정상 범위 내에서의 변화이며 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다. NE와 MO 수치에서 나타나는 경향은 바이러스감염이나 결핵, 호르몬 질환 등으로 의심해 볼 수 있지만, 혈액중의 LY 수치가 증가하는 경향과, 혈소판 수치의 감소, 조직병리학적 결과와 비교해봤을 때 물질에 의한 면역활동의 활성에 의한 결과인 것으로 추측된다.

또한 MCH, RDW, PLT, MPV는 모든 시험물질투여군에서 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지는 않지만 대조군에 비하여 모든 투여군에서 상승하는 경향을 나타내었다.

각 항목의 수치들이 대조군과 시험물질간에 유의적인 차이는 있었으나 그 수치가 정상범위 수준에서의 차이로서[25,26] 독성을 일으키지 않는 범위내에서의 차이로 사료된다

혈청생화학적 변화

혈청생화학적 검사에 있어서 일부의 항목에서 유의적인 차이를 보였다(Table 2). Na는 중간용량군에서는 대조군에 비하여 유의적인 차이를 보였지만 다른 시험물질투여군에서 용량의존성이 인정되지 않아 시험물질 투여로 인한 현

Table 1. Hematological values of rats treated orally with β-glucan for 6 weeks

Items	GroupDose(%)	0%	0.2%	1%	5%
WBC(K/uL)		8.24 ± 0.86	8.00 ± 1.17	9.81 ± 2.25	9.85 ± 0.91
NE(K/uL)		1.73 ± 1.00	0.51 ± 0.06*	0.44 ± 0.08*	0.52 ± 0.06*
LY(K/uL)		5.89 ± 0.88	6.70 ± 1.09	8.43 ± 2.11	8.59 ± 0.85*
MO(K/uL)		0.14 ± 0.05	0.26 ± 0.05*	0.36 ± 0.13*	0.26 ± 0.04*
EO(K/uL)		0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.03
BA(K/uL)		0.36 ± 0.12	0.42 ± 0.05	0.41 ± 0.08	0.40 ± 0.07
RBC(M/uL)		6.22 ± 0.13	7.00 ± 0.06*	7.27 ± 0.13*	6.99 ± 0.15*
Hb(g/dL)		13.48 ± 0.42	14.70 ± 0.10*	15.18 ± 0.12*	14.84 ± 0.34*
HCT(%)		56.10 ± 4.46	60.70 ± 3.55	63.08 ± 3.63	58.04 ± 3.61
MCV(fL)		89.80 ± 5.45	86.54 ± 4.34	86.58 ± 3.60	82.76 ± 3.87
MCH(pg)		21.63 ± 0.27	21.00 ± 0.18	20.92 ± 0.27*	21.26 ± 0.17
MCHC(g/dL)		24.38 ± 1.51	24.54 ± 1.42	24.38 ± 1.36	25.28 ± 1.26
RDW(%)		16.20 ± 0.07	15.46 ± 0.44*	15.16 ± 0.43*	16.26 ± 0.44
PLT(K/uL)		1126.5 ± 141.34	1033.80 ± 97.57	851.60 ± 138.65	729.60 ± 74.54*
MPV(fL)		10.10 ± 0.53	9.62 ± 0.21	9.33 ± 0.23*	9.89 ± 0.47

WBC : white blood cell count, RBC : red blood cell count, HGB : hemoglobin, HCT : hematocrit, MCV : mean corpuscular volume, MCH : mean corpuscular hemoglobin, MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT : Platelet, NEU : neutrophil, LYM : lymphocyte, MONO : monocyte, EOS : eosinophile. Each values was expressed as Mean ± SE of 5 SD rats. Statistically significant from control (*P < 0.05)

Table 2. Serum biochemical values of rats treated orally with β-glucan for 6 weeks

Items	Group Dose(%)	0%	0.20%	1%	5%
T-p(g/dL)		6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.1
TBIL(mg/dL)		0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
GLU(mg/dL)		144.6 ± 4.2	129.4 ± 28.5	146.4 ± 3.5	155.2 ± 3.3*
BUN(mg/dL)		15.4 ± 1.4	14.3. ± 1.6	11.4 ± 0.8*	12.8 ± 0.5*
CRE(mg/dL)		0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0*
AST(U/L)		108.9 ± 13.8	85.9 ± 3.6*	87.4 ± 5.4*	88.2 ± 6.6*
ALT(U/L)		41.6 ± 6.7	23.5 ± 0.8*	23.0 ± 1.0*	29.8 ± 3.6*
ALP(U/L)		144.8 ± 26.6	102.6 ± 5.6*	86.8 ± 7.5*	97.2 ± 9.7*
T.Chol(mg/dL)		98.2 ± 5.0	66.6 ± 2.6*	72.0 ± 5.7*	69.6 ± 9.3*
Na(mmol/dL)		140.8 ± 0.8	140.0 ± 0.5	138.5 ± 0.4*	140.2 ± 0.6
K(mmol/dL)		4.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1*	4.3 ± 0.1*	4.2 ± 0.2*
Cl(mmol/dL)		102.0 ± 1.1	102.7 ± 0.5	101.3 ± 0.6	101.3 ± 0.4

ALT : alanine transaminase, AST : aspartate transaminase, ALP : alkaline phosphatase, T-protein : total protein, BUN : blood urea nitrogen. Each values was expressed as Mean ± SE of 5 SD rats. Statistically significant from control (*P < 0.01)

상으로는 여겨지지 않는다.

CRE, GLU는 고용량군에서 유의적인 차이를 보였고, BUN은 중간용량군과 고용량군에서 유의적인 차이를 보였으며, AST, ALT, ALP, T.Chol, K 은 대조군에 비하여 모든 용량의 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내었다.

혈청 CRE 농도는 신장 기능 저하의 선별 검사에 이용되며, 신장의 혈류량 감소와 신장사구체 여과치의 감소 및 울혈성 심부전 등에서 증가되는 것으로 알려져 있다[27,28].

또한 BUN은 혈중에 존재하는 urea 중의 질소(N) 를 표현하는 것으로 생리적으로 urea와 동의어로 취급하는 신장질환과 관계가 깊은 N 대사산물이다. 따라서 β-glucan이 혈청 내 BUN과 CRE를 감소시키는 경향을 볼 때, 급성 신부전증 등의 신장질환에 효과가 있을 것으로 사료된다.

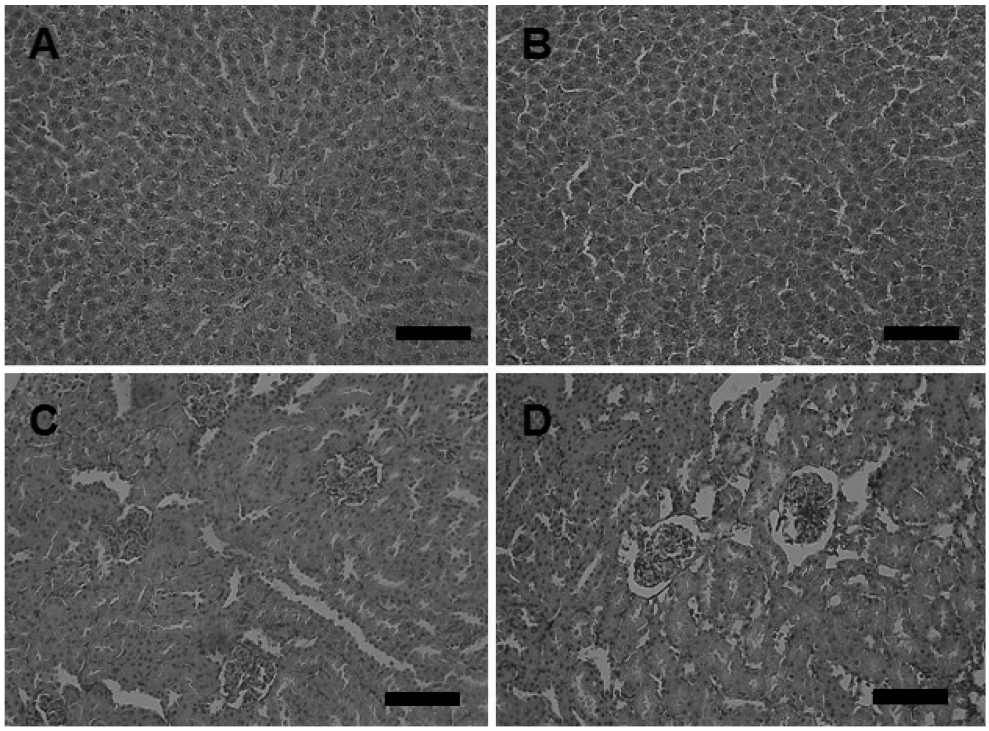

Fig. 2. Histological observation of rats treated orally with β-glucan for 6 weeks. (A): Liver (Control; D.W-treated, non β-glucan group), (B): Liver (High; 5% β-glucan-supplemented group), (C): Kidney (Control; D.W-treated, non β-glucan group), (D): Kidney (High; 5% β-glucan-supplemented group). Scale Bar = 50 um.

Table 3. Relative organ weights(%) of female rats orally administered with β-glucan for 6 weeks

Organs(%)	Group Dose(%)	0%	0.20%	1%	5%
Heart		0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.00	0.28 ± 0.01*	0.28 ± 0.01*
Lung		0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.38 ± 0.01*	0.38 ± 0.01*
Liver		4.06 ± 0.15	3.70 ± 0.14*	3.49 ± 0.05*	3.49 ± 0.24*
Spleen		0.30 ± 0.08	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.09
Kidney	L	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01*	0.33 ± 0.01*	0.33 ± 0.01*
	R	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01*	0.34 ± 0.02*	0.34 ± 0.01*
AG	L	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	R	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00

Each values was expressed as Mean ± SE of 5 SD rats.

간기능 검사를 하기 위해 간세포에서 생산되는 효소를 포함, 다양한 종류의 단백질과 이와 관련된 물질들을 측정했다. ALP는 담즙 배설장애를 반영하는 지표이며 AST, ALT의 경우 간세포의 손상을 반영하는 지표로서 β-glucan의 투여가 간 기능의 증진을 유도하는 것으로 판단된다.

또한 시험물질 투여군의 T.Chol 수치가 대조군에 비하여 감소한 것은 모두 정상 범위 내에서의 변화이며[29], 동맹경화증이나 간경화에 개선기능이 있는 것으로 추측할 수 있다. K는 당을 에너지로 전환하며 세포 삼투성과 전기적 중성유지에 도움을 주는 요소로서 시험물질 투여군의 K 수치가 대조군에 비하여 감소했지만 모두 정상 범위 내에서의 변화이며 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다.

체중에 따른 각 장기의 상대장기중량

시험종료 후 부검하여 모든 생존동물의 장기를 육안 검사한 결과 모든 시험군에서 시험물질 투여에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 3).

부검시 적출한 랫드의 내부장기의 중량을 측정한 결과, 상대장기중량비에 있어서 투여군과 대조군을 비교하였을때 일부 장기에서 유의적인 차이를 보였다. 중간용량과 고용량에서 heart, lung의 상대장기중량에 유의적인 차이를 보

Table 4. Food intake, body weight gain and food efficiency ratio recorded in the 6 weeks of the experiment

Items	Group Dose(%)	0%	0.20%	1%	5%
Initial body weight(g)		131.2 ± 1.16	131.2 ± 0.86	131.6 ± 1.44	131.6 ± 2.71
Final body weight(g)		214.6 ± 6.03	213.0 ± 4.00	210.8 ± 3.65	225.2 ± 7.19
Average daily gains(g)		11.27	11.05	10.70	12.65
Average daily feed intake(g)		74.67 ± 4.67	71.62 ± 3.93	70.76 ± 3.33	76.17 ± 3.79
Feed efficiency ratio(g)		6.63	6.48	6.61	6.02

0%(Control; D.W-treated, non b-glucan group); 0.2%(Low; 0.2% b-glucan-supplemented group); 1% (Middle; 1% b-glucan-supplemented group) ; 5%(High; 5% b-glucan-supplemented group). Each values was expressed as Mean ± SE of 5 SD rats.

였으며, liver, kidney(L,R)에서는 모든 시험물질투여군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의적인 차이를 보였으나, 심장[30], 폐장[31], 간장, 비장, 신장[32] 모두 정상 범위 내에서의 변화이며 용량의존성을 보이지 않았으므로 시험물질에 기인된 변화는 아닌 것으로 사료된다.

병리조직검사 소견

랫드의 6주 반복 투여 독성시험에서 시험물질투여로 인한 특이할만한 조직병리학적인 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 시험결과에 있어서 모든 시험군 및 대조군에서 특이할만한 임상증상은 관찰되지 않았으며, 폐사 및 빈사 동물은 시험 전기간을 통하여 관찰되지 않았다.

대조군 및 시험물질 투여군의 간에 대한 조직학적 관찰에서 자연발생적인 소견으로 판단되는 경미한 소견들이 산발적으로 관찰되었는데, 간의 소정맥주위 염증세포침윤(perivenular inflammatory cell infiltration), 골수의 조혈작용(extramedullary hematopoeisis), 신장의 호염기성 세뇨관(basophilic (regenerative) tubules) 소견이 다수 관찰되었으며, 하데리안선 및 심근에 미미한 염증세포소(inflammatory cell foci) 등이 드물게 관찰되었다. 그 외 다른 조직에서 특기할 만한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 β-glucan은 0.2, 1, 5% 수준으로 6주간 경구투여 시 유의할만한 독성이 유발되지 않았으므로 안전한 사료첨가제로 인정된다.

요 약

전통적으로 사용되어온 β-glucan에 대한 기초적 연구로서 본 실험은 β-glucan의 영양학적 성분을 분석하고 이를 투여했을 때 흰쥐의 발육에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다. SD종 5주령의 어린 쥐를 각각 5마리씩 배치하였고, β-glucan을 급여하지않은 대조군, β-glucan을 D.W-(distilled water)에 용해시켜 저용량 (하루 사료섭취량의 0.2%의 β-glucan), 중간용량 (하루 사료섭취량의 1%의 β-glucan), 고용량 (하루 사료섭취량의 5%의 β-glucan) 으로 구분하여 6주간 사육하였으며, 실험쥐의 체중, 식이섭취량, 식이효율, 장기발육 및 혈액 형상에 대하여 조사하였다. 실험군 모두에서 실험쥐의 시험 종료시 평균체중과 식이섭취량의 통계적 유의차는 발견되지않았다. 그리고 간, 심장, 신장, 및 위장 등의 장기무게와 백혈구, 적혈구, 혈색소, 헤마토크릿 및 혈소판 등의 혈액학적 지수에 있어서도 통계적 유의차가 발견되지 않았다. 즉 β-glucan식이로 이상적으로 장기가 비대해지거나 억제됨 없이 정상적 발육이 이루어졌으며, 이상현상없이 정상적 혈액학적 지수를 나타내었다. 따라서 본 연구의 결과는 β-glucan이 생리대사에 무해하고 안전하며, 면역력증진 효능에 대한 세부적 및 과학적 규명과 함께 면역력증강 사료첨가제로 개발 필요성 및 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2010년 정부(중소기업청)의 재원으로 중소기업기술혁신개발사업의 지원을 받아 수행된 연구(S1072730)이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Jong, S.C., Birmingham, J.M. and Pai, S.H.: Immunomodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol Immunopharmacol*, **11**, 115-122 (1991).
2. Wasser, S.P.: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **60**, 258-274 (2002).
3. Ikegawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukuoka, F.: Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res*, **29**, 734-745 (1969).
4. Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G.: Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by Schizophyllum commune. *Gann*, **60**, 137-144 (1969).
5. Yamamoto, T., Yamashita, T. and Tsubura, E.: Inhibition of pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma by a glucan, Schizophyllan. *Invasion Metastasis*, **1**, 71-84 (1981).
6. Ohno, N., Emori, Y., Yadomae, T., Saito, K., Masuda, A. and Oikawa, S.: Reactivity of Limulus amoebocyte lysate towards (1→3)-beta-D-glucans. *Carbohydr Res*, **25**, 311-318 (1990).
7. Shimizu, Y., Hasumi, K. and Masubuchi, K.: Augmenting effect of sizofiran on the immunofunction of regional lymph

nodes in cervical cancer. *Cancer,* **69**, 1184-1194 (1992).
8. Kim, M.S.: beta-(1,6)-Branched beta-(1,3)-Glucan in Skin Care beta-(1,3)-Glucan, produced in a new way from the Schizophyllum commune mushroom, has measurable benefits. *Cosmet Toil*, **115**, 79-86 (2000).
9. Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T. and Takeya, K.: Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor-bearing mice. *Gann*, **66**, 365-374 (1975).
10. Bao, X.F., Wang, X.S., Dong, Q., Fang, J.N. and Li, X.Y.: Structural features of immunologically active polysaccharides from Ganoderma lucidum. *Phytochemistry*, **59**, 175-181 (2002).
11. Oka, M., Hazama, S., Suzuki, M., Wang, F., Wadamori, K., Iizuka, N., Takeda, S., Akitomi, Y., Ohba, Y., Kajiwara, K., Suga, T. and Suzuki, T.: In vitro and in vivo analysis of human leukocyte binding by the antitumor polysaccharide, lentinan. *Int J Immunopharmacol*, **18,** 211-216 (1996).
12. Takuma, S. and Nobuo, T.: Further study of the structure of lentinan, antitumor polysacchrides from Lentinus edodes. *Carbohydr Res*, **47**, 99-104 (1976).
13. Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T.: Antitumor activity and structural characterization of glucan extracted from cultured fruit bodies of Grifola frondosa. *Chem Pharm Bull*, **32**, 1142-1151 (1984).
14. Takaku, T., Kiumra, Y. and Okuda, H.: Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action, *J Nutr*, **131**, 1409-1413 (2001).
15. Ken'ichi, T. and Saimei, T.: Synthesis of the repeating units of Schizophyllan. *Carbohydr Res*, **145**, 293-306 (1986).
16. Lee, S.G., Kim, T.H., Park, B.H., Lee, S.R., Park, K.M. and Kim, M.S.: Production and cosmetic activities of β-1,3/ β-1.6-glucan by the liquid culture of Schizophyllum commune. *Kor J Mycol*, **11**, 29-37(1999).
17. Falch, B.H., Espevik, T., Ryan, L. and Stokke, B.T.: The cytokine stimulating activity of (1-->3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydr Res*, **329**, 587-596 (2000).
18. Miyazaki, K., Mizutani, H., Katabuchi, H., Fukuma, K., Fujisaki, S. and Okamura, H.: Activated(HLA-DR+) T-lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with Sizofiran on cell-mediated immunity and survival. *Gynecol Oncol,* **56**, 412-420 (1995).
19. Nakano, T., Oka, K., Hanba, K. and Morita, S.: Intratumoral administration of sizofiran activates Langerhans cell and T-cell infiltration in cervical cancer. *Clin Immunol Immunopathol,* **79**, 79-86 (1996).
20. Yan, J., Vetvicka, V., Xia, Y., Coxon, A., Carroll, M.C., Mayadas, T.N. and Ross, G.D.: Beta-glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol,* **163**, 3045-3052 (1999).
21. Elstad, M.R., Parker, C.J., Cowley, F.S., Wilcox, L.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A.: CD11b/CD18 Inatergrin and β-glucan Receptor Act in Concert to Induce the Synthesis of Platelet-Activating Factor by Monocytes. *J Immunol,* **152**, 220-230 (1994).
22. Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikýrová, M., Mayadas, T. and Ross, G.D.: The β-Glucan-binding lectin site of mouse CR3(CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol,* **162**, 2281-2290 (1999).
23. Browder, W., Williams, D., Lucore, P., Pretus, H., Jones, E. and McNamee, R.: Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*, **104**, 224-230 (1988).
24. Furue, H.: Biological Characteristics and Clinical Effect of Sizofilan(SPG). *Drugs of today*, **23**, 335-346 (1987).
25. Kim, Y.S., Nam, C.J., Kim, S.K., Lee, K.W. and Lee, H.S.: Observations on the blood pictures in the pregnant rat. *Korean J animal Sci,* **12**, 172-175 (1970).
26. Cronkite, E.P., Bond, V.P., Fliedner, T.M., Paglia, D.A. and E.R. Adamik.: Studies on the Origin, Production and Destruction of Platelets. In: S.A. Johnson et al. (Edit.): Blood Platalets. Little Brown and Co, Boston, pp. 595-609 (1961).
27. Kim, J.I., Cho, S.J., Lee, Y.I., Bae, D.S., Lee, S.J. and Kim, J.S.: The Serum NPN , BUN and Creatinine Values in the Patient with Congestive Heart Failure. *Korean J Med,* **27**, 145-149 (1984).
28. Lee, J.W., Kim, J.E., Park, I.W., Lim, S.G., Song, K.E., Cho, H.K., Shin, G.T., Kim, H.S. and Kim, K.M.: A study on the appropriate normal range of serum creatinine level for Koreans. *J Kor Nephrol,* **23**, 721-728 (2004).
29. Berg, B.N.: Spontaneous nephrosis, with proteinuria, hyperglobulinemia, and hypercholesterolemia in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med,* **119**, 417-420 (1965).
30. Fregly, M.J., Baker, M.I. and Gennaro, Jr.: Comparison of effects of thyroidectomy with propylthiouracil treatment on renal hypertension in rats. *Am J Physiol,* **198**, 4-12 (1960).
31. Faridy, E.E.: Effect of food and water deprivation an surface activity of lungs of rats. *J Appl Physiol,* **29**, 493-498 (1970).
32. Webster, S.H., Liljegren, E.J. and Zimmer, D.J.: Organ; body weight ratios for liver, kidneys and spleen of laboratory animals; albino rat. *Am J Anat,* **81**, 477-513 (1947).