

초음파 추출물을 이용한 치콘의 면역활성 증진

권민철* · 한재건* · Syed Abdul Qadir* · 안주희* · 이달호** · 이현용****†

*강원대학교 BT특성화학부(대학), **설악전통식품, ***강원대학교 생명공학연구소

Enhancement of Immuno-Potential of *Cichorium endivia* L. by Ultrasonification Extraction Process

Min Chul Kwon*, Jae Gun Han*, Syed Abdul Qadir*, Ju Hee Ahn*, Dal Ho Lee**, and Hyeon Yong Lee****†

*College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National Univ., ChunCheon 200-701, Korea.

**Sorak traditional foods Co., InJe 252-821, Korea.

***Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : Immuno-potential of *Chicorium endivia* L. were investigated on follows extracts associated with ultrasonification process at 60 kHz and showed the highest promotion of human B and T cell growth, about 10~20% compared to the control. The secretion of TNF- α and IL-6 was also enhanced by the addition (0.5 mg/ml) of the extracts. NK cell activation was improved up to 1.37 times higher than the control, through adding extracts. It was also found that extracts from *C. endivia* L. could yield higher nitric oxide production from macrophage than Lipopolysaccharides (LPS). It can be concluded that, in general, the extracts treated with ultrasonification has higher immune activity than others, possibly by higher yielding immuno-modulatory activity than conventional extraction process. The optimum condition for the extraction of *C. endivia* L. is ethanol extraction at 60~100 °C associated with ultrasonification.

Key Words : *Chicorium endivia* L., Immuno-Potential, Ultrasonification

서 론

식생활의 서구화에 기인한 영양 불균형과 환경오염 및 과도한 스트레스에 의한 면역력 저하는 성인병 및 암 등의 발생률을 증가시키는 원인으로 작용하고 있다 (Shim *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2004). 이를 해결하기 위해 최신 의약 연구와 더불어 면역력을 증진시켜 질병에 대한 방어력을 향상시키는 천연물질 및 생약재에 대한 관심이 높아지고 있으며, 천연산물로부터 생리활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kwon *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004). 천연물질 및 생약재는 항체의 생성을 촉진시켜 질병에 대한 방어력을 증진시키며, 면역력을 강화시킴으로써 암을 비롯한 만성질환을 예방 및 치료할 수 있을 뿐만 아니라 (Itoh *et al.*, 2004) 합성 의약품에 비해 독성 및 부작용이 적기 때문에 이를 이용한 기능성식품 및 신약개발에 대한 많은 노력이 이루어지고 있다 (Ha *et al.*, 1991; Chihara *et al.*, 1970).

치콘은 Belgium endive나 witloof chicory (*Cichorium intybus* L.)의 뿌리를 캐서 짙은 퇴운 썩채소이나 여러 잎 상

태에서 수확하므로 엽채류로 구분되어 진다. 또, 일반 채배 하우스가 아닌 냉장상이나 창고 등에서 재배가 가능하므로 농약의 이용 없이 재배가 가능하다 (Bae *et al.*, 2005). 결구시킨 치콘은 배추보다 영양가가 높은 것으로 알려져 있으며, 당분이 풍부하여 몸에 잘 흡수되므로 다이어트 채소로도 인기가 높다. 소화제와 이뇨제, 완화제로도 쓰이며, 효능으로는 류마티스와 관절염, 통풍 예방 효과 등이 알려져 있으나 그 생리활성에 대한 체계적인 연구는 전무한 실정이다. 특히 치콘과 같은 엽채류는 비타민이나 무기질 등 열에 의해 변성되기 쉬운 성분들로 이루어져 있어, 대부분의 엽채류가 기능성 가공소재로 이용되기 보다는 샐러드 등 신선채소로 생식되기 때문에 추출이나 가공을 통한 공정연구 역시 전무한 실정이다. 따라서 엽채류 및 유용성분의 열변성이 우려되는 천연물의 활용성 증대를 위해서 기존 열수추출의 문제점을 보완할 수 있는 추출 및 가공공정에 대한 연구가 요구된다.

초음파 에너지를 추출에 이용하면 초음파 진동에 의한 공동현상 (citation)에 의해 매우 큰 에너지를 발생하게 된다. 또한 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received August 13, 2007 / Accepted October 7, 2007

동에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격 효과로는 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 된다 (Chung *et al.*, 2000). 용매추출과 초음파 추출을 비교한 실험에서 초음파 에너지를 용매추출공정에 도입하여 추출한 결과 초음파 조사시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하였고, 이는 용매추출에 비해 매우 짧은 시간에 추출이 완료된 것으로 초음파의 공동효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이라는 결과를 보고한바 있다 (Kim *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004).

이런 까닭으로 본 연구에서는 점차 재배 및 수요가 증가하고 있는 치콘의 생리활성 및 가공적성을 알아보고자 열수추출 및 초음파 병행 추출공정을 통한 활성을 비교하고, 나아가 치콘을 기능성 소재로 개발하기 위한 다각적 연구의 선행 연구 자료로 이용하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용한 치콘 (*Cichorium endivia* L.)은 강원도 인제군 소재 설악전통식품에서 지원받아 사용하였다. 시료는 각각 10배수의 증류수와 에탄올을 용매로 하여 100°C와 60°C에서 24시간 동안 추출하였으며, 초음파 병행 추출물은 이에 초음파 추출기를 이용하여 각각의 추출온도인 100°C와 60°C에서 30분간 60 kHz의 초음파를 병행하는 공정을 추가로 시행하였다. 각 추출물들은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 세포주 및 세포 생육 배지

면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat, ATTC, USA)과 B cell (Raji, ATTC, USA)을 이용하여 검증하였다. 실험에 사용된 면역세포는 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK cell은 alpha minimum essential medium (α -MEM)배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)과 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 α -MEM은 Gibco (USA)사로부터 구입하였고, HEPES buffer는 Sigma (USA)사에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco사의 FBS와 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA와 세포염색을 위한 sulforhodamine B (SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

3. 면역세포 생육 증진 효과 분석

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell과 B cell을

이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 혈구계수기로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002).

4. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 정량 kit (Chemicon, USA)를 사용하여 각각의 IL-6와 TNF- α 를 정량하였다. 세포의 농도를 $1.0 \sim 2.0 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 다시 배양하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D.값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

5. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

사용된 세포주는 마우스 유래 J774.1 대식세포이며, 세포는 10% heat-inactivated bovine serum과 RPMI 1640 medium을 이용하여 24 well plate에 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO₂ incubator안에서 37°C에서 48시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. 대식세포에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 μ l를 취하여 동일부피의 Griess시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μ M에서부터 0.25 μ M까지 RPMI 1640 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO-생성능의 양 상대조구 물질로는 LPS를 사용하였다 (Ding *et al.*, 1998).

6. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 시료를 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3-4번의 계대 배양 후 세포

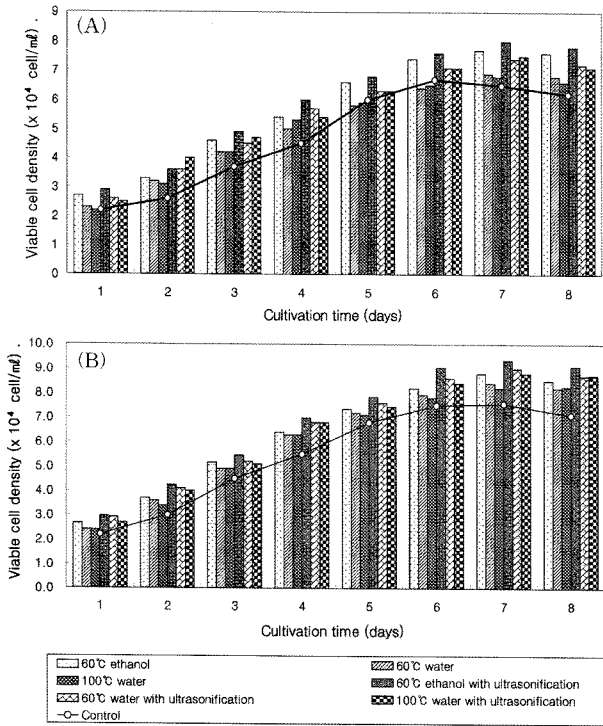


Fig. 1. The growth of human (A) B cell "Raji" and (B) T cell "Jurkat" in adding the extracts under several extract conditions and fermented extracts from *Chicorium endivia* L.

를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4~5 × 10⁴ cells/ml로 900 μl 씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μl 씩 투여하고 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 측정한 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정하였다 (Yueran *et al.*, 2003; Cedilia, 2002).

결과 및 고찰

1. 면역세포 생육 증진 효과

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B cell과 T cell에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과를 생육도를 통하여 측정하였다. Fig. 1의 (A)와 (B)는 각각 치콘 추출물의 첨가를 통한 B cell과 T cell의 생육도를 나타낸 것이다. B cell은 시료첨가 시점을 기준으로 하여 7일째 최고 생육도를 나타내는 생육곡선을 나타내었다. 시료를 첨가한 모든 조건에서 대조군과 비교하여 증가된 생육도를 확인할 수 있었다. 대부분의 측정에서 초음파를 병행한 추출물이 병행하지 않은 추출물에 비해 5~10% 높은 활성을 나타내었고, 그중 가장 높은 활성을 나타낸 것은 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물로 7일째 9.4 × 10⁴ cells/ml를 나타냄으로서 시료를 첨가하지 않은 대조군의

7.6 × 10⁴ cells/ml에 비하여 약 20%의 이상의 B cell 생육 증진을 나타내며 모든 측정기간에서 가장 높은 활성을 나타냈다.

T cell의 생육도 역시 B cell의 생육도와 유사한 결과를 나타내었다. 최대 생육도를 나타내는 7일째 60°C 초음파병행 에탄올 추출물의 생육도는 9.3 × 10⁴ cells/ml로 대조군의 6.5 × 10⁴ cells/ml과 비교하여 T cell의 생육을 약 43% 증가시키는 것으로 나타났다. 또 B cell의 생육과 마찬가지로 초음파를 병행한 추출물이 병행하지 않은 추출물에 비해 높은 활성을 나타내었다.

이는 면역 활성을 나타내는 것으로 알려진 족제비씨의 수피 추출물을 통한 면역 활성 연구 (Kim *et al.*, 2005)의 50% 생육 증진에 근접하는 수치로 B cell과 T cell의 생육도 측정을 통해 치콘에는 면역세포의 생육을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며, 초음파병행 추출 공정을 통해 활성을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 이는 초음파공정을 통한 공동 효과에 따른 활성 물질의 용출량 증가에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 B cell과 T cell을 통한 모두의 결과에서 용매별로는 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 대조군에 비해 5~25%의 활성 증진을 나타내며 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물 다음으로 높은 활성을 보였으나 초음파를 병행하지 않은 60°C와 100°C 물 추출물은 대조군과 비슷한 활성을 나타내며 다른 추출물에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 온도별로는 초음파병행 조건과 상관없이 100°C에서의 추출물이 60°C 추출물에 비해 높은 활성을 나타냈으나 큰 차이를 보이지는 않아 치콘의 면역증진 활성성분에 대한 열변성은 그다지 크지 않을 것으로 사료된다.

2. Cytokine 분비 증진 효과

Table 1은 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF-α)의 분비량을 B, T cell에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. 각 시료에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 유의적인 값을 나타내었다. 각 시료에 대한 세포 당 IL-6와 TNF-α의 분비량을 살펴보면, 초음파를 병행한 60°C 에탄올 추출물의 경우 6일째 T cell에서 각각 3.28 × 10⁻⁴ pg/cell, 2.39 × 10⁻⁴ pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다. 마찬가지로 B cell에서도 2.40 × 10⁻⁴ pg/cell, 2.21 × 10⁻⁴ pg/cell을 나타내며 다른 시료와 비교하여 많은 cytokine 분비량을 나타내었다. 또한 초음파를 병행하여 추출한 추출물들이 면역세포 생육증진 활성 측정에서의 마찬가지로 병행하지 않은 추출물들에 비해 많은 cytokine 분비를 나타내었다. 이는 해당화의 뿌리 추출물을 통한 연구 (Lee *et al.*, 2003) 등에서 보고된 면역세포 cytokine 분비와 유사한 수치로 치콘 추출물 첨가를 통한 면역세포의 생육 증진 및 cytokine 분비량 증가를 통하여 치콘이 면역 활성 증진과 관련하여 활용 가능성이 있으며 초음파병행

Table 1. Comparison of IL-6, TNF- α secretion through cell growth in adding the extracts from *Chicorium endivia* L. under several extract conditions¹⁾

Sample	Cultivation time (DAY)	Specific secretion from B cell (10^{-4} pg/cell)		Specific secretion from T cell (10^{-4} pg/cell)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
Control (no addition)	1	0.51±0.04	0.61±0.08	0.74±0.13	0.54±0.12
	2	0.90±0.08	0.85±0.04	1.30±0.18	0.81±0.13
	3	1.12±0.11	0.99±0.11	1.58±0.14	1.24±0.09
	4	1.36±0.10	1.49±0.13	1.82±0.16	1.30±0.08
	5	1.52±0.15	1.58±0.16	1.85±0.20	1.34±0.10
	6	1.68±0.16	1.50±0.18	1.80±0.19	1.28±0.12
60°C EtOH extracts	1	0.63±0.12	0.78±0.03	0.88±0.06	0.53±0.18
	2	1.17±0.14	0.99±0.06	1.47±0.13	1.39±0.16
	3	1.63±0.17	1.27±0.08	1.92±0.14	1.56±0.19
	4	1.84±0.21	1.85±0.08	2.01±0.16	1.62±0.22
	5	2.27±0.22	2.14±0.11	2.26±0.08	2.13±0.15
	6	2.31±0.14	2.08±0.12	2.52±0.05	2.14±0.16
60°C Water extracts	1	0.58±0.09	0.66±0.06	0.79±0.12	0.47±0.14
	2	1.09±0.12	1.00±0.07	1.35±0.14	1.21±0.11
	3	1.47±0.15	1.18±0.06	1.73±0.16	1.44±0.11
	4	2.06±0.16	1.58±0.09	2.01±0.16	1.59±0.12
	5	2.27±0.11	2.00±0.17	2.16±0.20	2.01±0.18
	6	2.25±0.20	2.01±0.16	2.15±0.19	2.09±0.16
100°C Water extracts	1	0.55±0.13	0.66±0.18	0.76±0.14	0.48±0.15
	2	1.00±0.06	0.91±0.20	1.27±0.18	1.23±0.19
	3	1.39±0.19	1.14±0.22	1.65±0.14	1.45±0.25
	4	1.88±0.20	1.46±0.26	2.02±0.13	1.71±0.16
	5	2.17±0.21	1.91±0.20	2.15±0.16	2.00±0.18
	6	2.10±0.18	2.00±0.15	2.20±0.18	2.07±0.19
60°C EtOH extracts †	1	0.65±0.08	0.75±0.08	0.91±0.15	0.71±0.09
	2	1.27±0.14	1.07±0.10	1.50±0.18	1.50±0.11
	3	1.99±0.13	1.32±0.13	2.03±0.16	1.96±0.13
	4	2.03±0.21	1.99±0.14	2.23±0.18	2.09±0.18
	5	2.47±0.20	2.27±0.15	2.39±0.16	2.39±0.12
	6	2.40±0.25	2.21±0.06	3.28±0.17	2.39±0.08
60°C Water extracts †	1	0.57±0.12	0.69±0.04	0.80±0.16	0.62±0.08
	2	1.15±0.16	1.00±0.03	1.46±0.14	1.41±0.16
	3	1.62±0.19	1.10±0.07	1.80±0.18	1.78±0.14
	4	2.12±0.21	1.92±0.19	2.10±0.15	2.04±0.18
	5	2.46±0.20	2.12±0.18	2.47±0.16	2.10±0.18
	6	2.50±0.25	2.15±0.08	2.50±0.10	2.03±0.09
100°C Water extracts †	1	0.64±0.11	0.67±0.06	0.57±0.15	0.60±0.06
	2	1.09±0.15	1.02±0.08	1.46±0.13	1.46±0.11
	3	1.68±0.16	1.12±0.09	1.78±0.16	1.81±0.21
	4	1.98±0.20	2.20±0.10	2.08±0.17	1.99±0.14
	5	2.30±0.21	2.13±0.11	3.21±0.16	2.05±0.09
	6	2.36±0.22	2.06±0.07	3.24±0.09	2.10±0.09

‡: with ultrasonification (60 kHz)

¹⁾ Data values are expressed as mean±SD of triplicate determinations. The data showed significant difference in the same row at the level of $p < 0.05$ by student t-test.

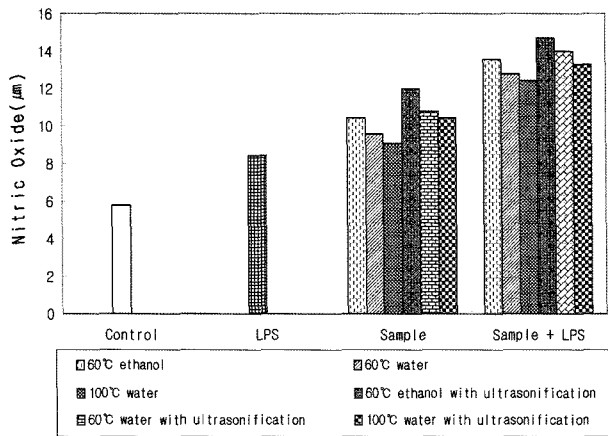


Fig. 2. Nitric oxide production from J774.1 cell lines in adding the extracts under several extract conditions and fermented extracts from *Chicorium endivia* L. (0.5 mg/ml).

추출 공정을 통해 면역 활성을 증진시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

3. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

대식세포를 이용하여 NO⁻ 생성능을 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대식세포의 NOS (nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS (대장균 유래 lipopolysaccharide)와 같은 세균내독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 (Miyagawa *et al.*, 1988; Dimond, 1995) 이번 실험에서는 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO⁻의 생성능을 확인하였다. 결과에서도 확인할 수 있는 것처럼 NOS 생성능에 있어서도 면역세포 및 cytokine 분비와 유의적인 결과를 나타내었다. 시료만을 첨가한 결과에서 60°C 초음파병행 에탄올 추출물이 12.0 μ M로 가장 높은 대식세포 생성능을 보였으며 100°C 물 추출물이 9.1 μ M로 가장 낮은 수치를 나타내었으나 양성대조군인 LPS의 8.4 μ M에 비해서는 높은 생성능을 나타낸 것이다. 이는 치콘의 면역활성을 확인할 수 있는 결과이나 높은 면역활성을 가진 것으로 알려진 마황, 복분자 및 당귀의 분획을 통한 연구 (Kim *et al.*, 2005)에서 같은 농도를 통해 나타난 20~30 μ M와 비교하였을 때는 현저히 낮은 결과이다. 한편 시료와 LPS를 혼합 처리한 결과에서 각각의 조건이 시료만을 첨가했을 때의 9.1~12.0 μ M보다 높은 12.4~14.7 μ M의 결과를 나타냄에 따라 치콘 선인장 추출물이 NO⁻ 생성능을 가지며 LPS 등 다른 물질과 상승작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

4. Natural Killer cell(NK cell)의 면역증진 효과

NK 세포의 활성 측정은 B cell과 T cell에 추출물을 첨가한 후 그의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의

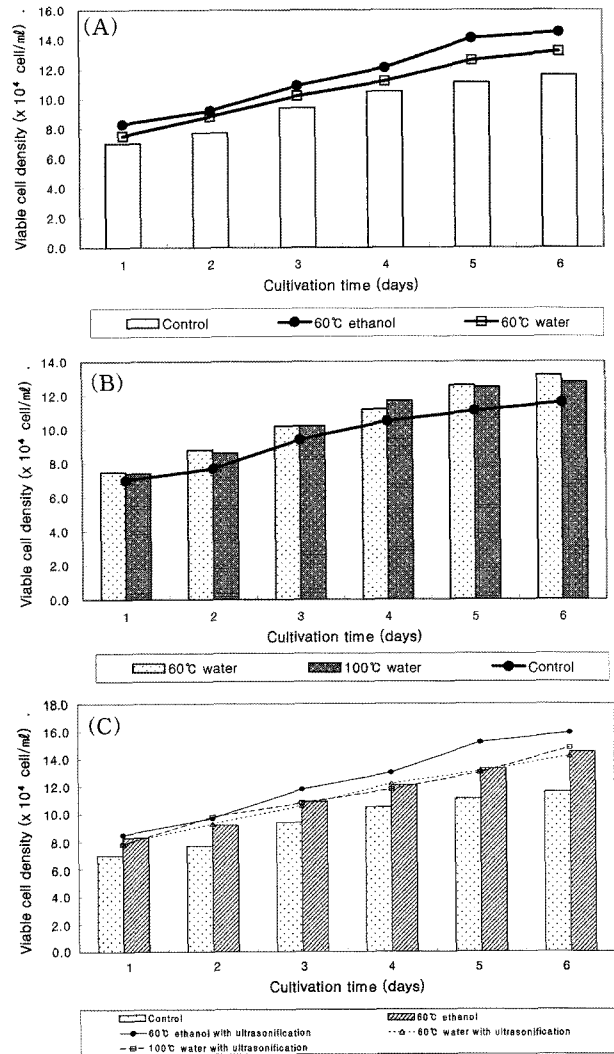


Fig. 3. Comparison of growth effect on the NK cells by added the secretions of B cell in adding the extracts were attended by different (A) solvent, (B) temperature and (C) ultrasonification process condition from *C. chicotium endivia* L.

변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 3은 B cell에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 NK 세포의 활성도를 추출조건 별로 비교하여 나타낸 그림이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 시료를 첨가한 모든 조건에서 대조군과 비교하여 생육도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. (A)는 용매에 따른 생육도를 나타낸 것으로 배양 6일간의 측정에서 모두 물 추출물에 비해 에탄올 추출물이 5~15% 이상 높은 활성을 나타내었다. (B)는 온도조건에 따른 생육도를 비교한 것으로 60°C 물 추출물과 100°C 물 추출물의 비교에서 온도조건에 따른 큰 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 치콘의 면역활성 성분은 열에 의한 영향을 크게 받지 않을 것으로 사료된다. 60°C 물 추출

Table 2. Comparison of growth effect through measure visible cell density on the NK cells by added the secretions of T cell in adding the extracts were attended by several conditions from *Chicorium endivia* L.¹⁾

Cultivation time (day)	1	2	3	4	5	6
Extraction condition of sample	Visible cell density ($\times 10^4$ cell/ml)					
Control	7.7 \pm 0.3	8.4 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2	11.2 \pm 0.2	13.4 \pm 0.4	14.3 \pm 0.3
60 $^{\circ}$ C EtOH	9.0 \pm 0.2	9.9 \pm 0.3	11.6 \pm 0.4	13.1 \pm 0.4	15.3 \pm 0.2	15.8 \pm 0.4
60 $^{\circ}$ C water	8.2 \pm 0.2	9.5 \pm 0.3	10.9 \pm 0.2	11.9 \pm 0.2	13.0 \pm 0.1	13.9 \pm 0.2
100 $^{\circ}$ C water	8.1 \pm 0.2	9.3 \pm 0.3	10.9 \pm 0.5	12.4 \pm 0.4	13.2 \pm 0.3	13.5 \pm 0.2
60 $^{\circ}$ C EtOH †	9.2 \pm 0.3	10.4 \pm 0.3	12.5 \pm 0.4	13.7 \pm 0.3	15.9 \pm 0.3	16.6 \pm 0.2
60 $^{\circ}$ C water †	8.6 \pm 0.2	10.0 \pm 0.3	11.3 \pm 0.2	12.9 \pm 0.2	13.8 \pm 0.5	14.9 \pm 0.2
100 $^{\circ}$ C water †	8.5 \pm 0.1	10.5 \pm 0.6	11.5 \pm 0.3	12.5 \pm 0.3	13.7 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5

†: with ultrasonification (60 kHz)

¹⁾ Data values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. The data showed significant difference in the same row at the level of $p < 0.05$ by student t-test.

물이 100 $^{\circ}$ C 물 추출물과 비교해 5% 이상의 높은 활성을 보였다. (C)는 (A)와 (C)를 통해 일반추출에서 가장 높은 활성을 나타낸 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물과 초음파를 병행한 추출물들을 비교한 것이다. 초음파를 병행한 모든 추출조건에서 대조군보다 높은 결과를 얻을 수 있었으며 일반추출에서 가장 높은 활성을 나타낸 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물과 비교하여서도 높거나 유사한 활성을 나타내었다. 가장 높은 활성을 나타낸 것은 초음파를 병행한 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물로 6일째 15.9 $\times 10^4$ cells/ml를 나타내어 11.6 $\times 10^4$ cells/ml를 나타낸 대조군에 비해 약 1.37배의 활성 증가를 확인할 수 있었다. 다음으로 초음파를 병행한 100 $^{\circ}$ C 물 추출물이 14.8 $\times 10^4$ cells/ml를 나타내며 모든 기간에서 높은 활성을 나타냈다.

Table 2는 T cell에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 NK 세포의 활성도를 표로 나타낸 것이다. B cell에서와 마찬가지로 6일 동안의 생육도 측정 결과, 시료를 첨가한 모든 조건에서 대조군에 비해 생육도가 증진되었음을 확인할 수 있다. 용매에 따른 비교를 통해 배양 6일간의 측정에서 모두 물 추출물에 비해 에탄올 추출물의 활성도가 5~20% 이상 높은 것을 확인하였다. 온도조건에 따른 비교에서는 60 $^{\circ}$ C 물 추출물이 100 $^{\circ}$ C 물 추출물과 비교해 높은 활성도를 나타내었으나 큰 차이를 나타내지는 못했다. B cell에서와 같이 초음파를 병행한 모든 추출조건에서 대조군 및 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물보다 높은 활성 증진 효과를 확인할 수 있었다. 그 중 6일째 가장 높은 활성을 나타낸 것은 초음파를 병행한 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물로 16.6 $\times 10^4$ cells/ml를 나타냄으로서 역시 대조군과 비교하여 약 1.15배의 활성 증가를 보여주었다. 이상의 결과를 통해 앞에서 살펴본 면역세포의 증식에서와 마찬가지로 초음파를 병행한 60 $^{\circ}$ C 에탄올 추출물이 높은 면역 활성 성분을 가질 것으로 사료된다. 또한 NK cell의 생육 증진 활성을 통해 치곤 추출물은 에탄올을 용매로 하여 60~100 $^{\circ}$ C에서 초음파 공정을 병행하였을 때 가장 높은 면

역활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해 치곤은 면역 활성을 나타내는 성분을 함유하고 있으며 초음파병행 추출공정을 통해 유효성분의 면역 활성 증진효과를 기대할 수 있음을 확인하였다. 이는 초음파병행 공정을 통한 공동현상에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문으로 사료된다 (Chung *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). 또한 용매 및 온도에 따른 결과를 통해 치곤의 면역 활성 물질은 물보다 에탄올을 통한 추출에 더욱 잘 용출되는 수용성 물질이며 열에 의한 변성 및 활성의 감소에 대한 영향은 적게 받을 것으로 사료된다. 따라서 치곤 유래 유용물질의 효과적인 추출을 위해서는 에탄올을 용매로 하여 60~100 $^{\circ}$ C 정도의 온도조건에서 초음파를 병행하여 추출하는 공정이 바람직할 것으로 사료되는 바이다.

감사의 글

본 연구논문은 2007년도 산업자원부가 지원하는 산학협력 중심대학사업의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Bae JH, Park KW, Kang HM (2005) Effects of packing materials, light condition and storage temperature on MAP storage of chicon. *Journal of Bio-Environment control* 14(2):69-75.
- Cecilia K, Limdbolum (2002) IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:929-936.
- Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Applied Chemistry* 4(2):149-152.

- Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ** (1998) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 141:2407-2412.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU** (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji* 42(3):296-301.
- Kang HI, Kim JY, Moon KD, Seo KI, Cho YS, Lee SD, Yee ST** (2004) Effect of the crude polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 33:1092-1097.
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY** (2005) Enhancement of immune activities of *Ephedrae* Herba and *Rubi* Fructus at low temperature extraction. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(3):81-86.
- Kim JH, Kim DH, You JH, Kwon MC, Lee HJ, Lee HJ, Lee HY** (2005) Anticancer and immune activities of the extracts from *Amorpha fruticosa* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(1):41-47
- Kim SW, Kim ES** (1997) Studies on the immunomodulating effect of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26:148-153.
- Kim WI, Shung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA** (2001) Ultrasound energy effects on solvent extraction of amaranth seed oil. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 12(3):307-311.
- Kwon OW, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Ahn JH, Lee HJ, Kang HY, Lee HY** (2007) Comparison of immuno modulatory and anticancer activities according to the parts of the *Stryax japonica* Sieb. et Zucc. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 15(3):170-176.
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY** (2004) Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12(1):36-42.
- Lee MK, Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH, Lee HY** (2003) Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(1):13-18.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY** (2002) Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10(2):109-115.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY** (2004) Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* stapf, *Rubus coreanus* miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 12(4):273-278.
- Shim MS, Choi SW, Bae SJ** (2001) Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30:80-85.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G, Zhigang T** (2003) Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:247-252.