

## 초고압 공정에 의한 복분자의 면역조절효능 비교

권민철\* · 김철희\* · 나천수\*\*\* · 곽형근\*\*\*\* · 김진철\* · 이현용\* \*\*†

\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*강원대학교 생명공학연구소, \*\*\*생명의나무, \*\*\*\*SKY007

# Comparison of Immuno-Modulatory Regulatory Activities of *Rubus coreanus* Miquel by Ultra High Pressure Extracts Process

Min Chul Kwon\*, Cheol Hee Kim\*, Chun Soo Na\*\*\*, Hyeong Geun Kwak\*\*\*\*  
Jin Chul Kim\*, and Hyeon Yong Lee\* \*\*†

\*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

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

\*\*\*Tree of life, Seodun-dong, Suwon-si, Kwonsun-gu, Gyeonggi-do, 441-853, Korea.

\*\*\*\*SKY007, Daejeon-dong, Kangneung-si, Kangwon-do, 210-340, Korea.

**ABSTRACT :** This study was performed to investigate the enhancement of anticancer activities and immuno modulatory activities from *R. coreanus*. by ultra high pressure extracts process. The cytotoxicity on human kidney cell (HEK293) was showed below 19.5% in adding 1.0 mg/ml concentration. The anticancer activity was increased over 10% by high pressure processing in AGS and A549 cells. The immune cell growth using human immune B and T cells was improved by the high pressure extracts of *Rubus coreanus* in adding 1.0 mg/ml concentration. The secretion of two kinds of cytokine, the IL-6 and TNF- $\alpha$  from human immune B and T cells were also enhanced in adding extracts by high pressure process of *R. coreanus*. The ultra high pressure extraction technique showed high efficiency in extracting of bioactive compound. The ultra high pressure technique could be used combined with other technique to improve the extracting rate and extracting efficiency.

**Key Words :** *Rubus coreanus* Miquel, Ultra high pressure, anticancer activities, immune activities, cytokine, NK cell

## 서 론

복분자 (*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과에 속하고 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에 자라는 식물로 높이가 2~3 m 정도이며, 줄기는 흰 분이 덮여 있고 갈고리 모양의 가시가 있는 것이 특징이다. 5~6월에 꽃이 피며 7~8월에 열매가 성숙되어 둥글고 붉은색으로 익다가 나중에 흑색으로 완숙된다 (Bae, 2000).

한방에서는 복분자의 털 익은 열매인 미성숙 과실을 사용하는데, 일반적으로 피로로 인한 간 손상을 보호하여 눈을 밝게 할 뿐만 아니라 이뇨제의 효능이 있다. 이외에 양기, 신기 부족으로 인한 유정, 정액부족, 발기부전에 효과가 있어 성기능을 높이고 속을 덥게 하며, 기운을 증대 시키고 발모를 촉진함과 동시에 머리가 희게 세는 것을 방지한다고 알려져 있다 (Kim & Lee, 1991; Shin *et al.*, 2003). 복분자 추출물은 인간면역체계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 인간 면역

B 세포와 T 세포주의 생육을 촉진한다고 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2003). 성분 연구로는 복분자 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin이 분리된 바 있으며 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids를 분리하여 그 구조를 밝힌 보고가 있다 (Lee *et al.*, 1995; Lee & Lee, 1995).

초고압 처리는 최근 식품에서 영양소와 비영양성의 식물성 화학물질 섭취에 있어 가장 효율적으로 활용될 수 있는 추출 기술이다 (Deliza *et al.*, 2005). 초고압 처리는 식품에서 열처리가 없거나 최소 처리하여 식품을 생산할 수 있는 방법이다. 산성이 높은 식품은 초고압 처리에 의해 살균되는데, 그 식품들은 향, 맛, 영양가, 색을 기존의 물리적 처리와 비교하였을 때 초고압 처리된 식품이 보다 더 좋은 것으로 보고되었다 (Zhang *et al.*, 2004).

기존의 전통적인 추출 방법은 추출 효율이 낮고 에너지 소비가 많으며 열로 인해 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변성, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출과 열에 대하여 불안정한

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received August 13, 2007 / Accepted October 13, 2007

것 등의 단점을 드러내고 있다 (Park, 2004). 이러한 단점을 초고압 추출을 이용하면 개선할 수 있을 것으로 보인다.

초고압 기술을 약용식물의 유용 성분을 추출하는데 적용할 수 있는데, 그에 목적을 두고 사용하는 것을 초고압 추출이라고 한다. 초고압 기술은 약용식물의 중요 구성 성분의 추출이 단시간 내에 가능하며, 불순물이 거의 없고, 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있다. 그것은 초고압 하에서 단백질이 변성 (Kinetics of Microbial Inactivation)되고, 세포막이 파괴 (Bennett, 1998)되어 세포 안으로 용매가 들어가 보다 많은 성분이 세포 밖으로 쉽게 용출되어 나오는 것으로 추정하고 있다.

또한 초고압 추출을 통하여 에너지 수준이 제한된 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스결합, 수소결합과 같은 약한 결합들에 의한 결합은 분리(Kinetics of Microbial Inactivation)되어 신물질 용출이 가능한 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 최근 국내 식·의약품 산업에서 이용하고 있는 초고압 추출 기술을 이용하여 추출한 추출물의 면역활성을 탐색하고 기존의 일반 추출을 통한 추출물과의 활성 비교를 통하여 활성 증진의 정도를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 복분자는 2006년 7월에 황성 발교산 부근에서 채취한 것을 구입하였으며, 재료를 실온에서 음건 시킨 후 사용하였다.

### 2. 추출조건

초고압 추출은 복분자 100g을 비닐 팩에 물과 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출 장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 500 Mpa의 압력으로 각각 5, 15분간 초고압 추출을 시행하였다. 초고압 추출이 끝난 복분자를 수직환류냉각기가 부착된 추출 flask에 각각 10배의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 2회 반복 추출한 후 초음파 추출공정을 30분 동안 병행 추출 하였다.

대조군으로 사용된 일반적인 추출 방법은 100g의 복분자를 수직환류냉각기가 부착된 추출 flask에 각각 10배의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압여과장치로 여과하여 농축·동결건조 한 후 실험에 사용하였다.

### 3. 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)은 GIBCO (USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 SIGMA (USA)에서 구입하였다. 혈청은 GIBCO (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이

용하였고 gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다.

### 4. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 폐암세포인 A549 (lung adenocarcinoma, human, ATTC, USA), 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, ATTC, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간의 정상 신장세포인 HEK293 (Human Embryonic kidney, ATTC, USA)를 사용하였다. 면역세포 생육 증진 효과에 이용된 면역세포로는 T cell (Jurkat, ATTC, USA)와 B cell (Raji, ATTC, USA)을 실험에 사용하였고, NK cell 활성 측정에 이용된 세포는 NK-cell (NK-92MI cell, ATTC, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 암세포와 정상세포, 면역세포는 RPMI 1640 배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은  $\alpha$ -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

### 5. 정상세포 독성 및 항암활성 측정

인간 신장 세포 HEK293을 SRB (sulforhodamine B) assay (Doll & Peto, 1983)는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용된 세포주로는 인간 정상 신장 세포인 HEK293을 이용하여 세포독성을 측정하였고, 폐암 세포 (A549), 위암세포 (AGS)를 이용하여 항암활성을 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를  $4 \sim 5 \times 10^4$  cells/ml으로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C 5% CO<sub>2</sub>)한 후, 각각의 시료를 최종 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 100  $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100  $\mu$ l를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100  $\mu$ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조 시킨 후에 10 mM Tris buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Selectivity 측정은 SRB assay를 이용하여 정상세포 (HEK293)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정 한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포 생육 억제 활성}}{\text{정상세포의 세포 독성}}$$

### 6. 면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0 × 10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Lee *et al.*, 2002).

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1~2 × 10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μl씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

### 7. NK 세포의 생육증진 효과

NK-92MI cell을 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptomethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4~5 × 10<sup>4</sup> cell/ml로 900 μl씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μl씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다 (Yueran *et al.*, 2003).

### 8. Scanning Electron Microscope 관찰

초고압 처리 후 세포조직의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 저진공주사현미경 (Low Vacuum-Scanning Electron, × 400)은 일본의 Hitachi Science systems의 S-3500N으로 촬영하여 복분자의 표면을 관찰하였다.

### 9. 통계처리

복분자 추출물에 대한 항암 및 면역활성의 실험결과

**Table 1.** The extraction yields of *R. coreanus* according to extraction process.

Sample	Yields (% w/w)
WE	8.39
UE	12.47
HPE5	15.36
HPE15	16.13

WE: water extract at 60°C, control

UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent

triplicate determinations에 의한 Mean ± SD로 표시했으며 각 평균치 간의 차이는 anova test에 의해 p = 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 추출 수율

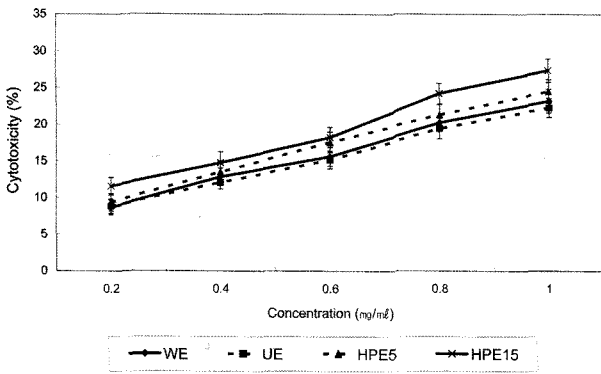
복분자의 추출 수율은 Table 1과 같다. 모든 조건 중 초고압 추출을 15분간 실시하였을 때 가장 높은 추출량을 보였다.

추출 수율은 초고압을 15분간 실시한 것이 일반 60°C에서 추출한 것에 비해 약 1.9배까지 증가한 것으로 나타났다. 또한 초고압을 5분 실시한 것도 1.8배까지 활성이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이것은 기존의 추출 방법으로는 용출되어지지 않았던 것들이 초고압 처리를 통해 조직과 세포막의 변형으로 인해 용매들이 세포 안으로 쉽게 들어감으로서 기존 물질들의 용출량 증가하고 새로운 물질이 용출되어 수율이 높게 나타난 것으로 보인다.

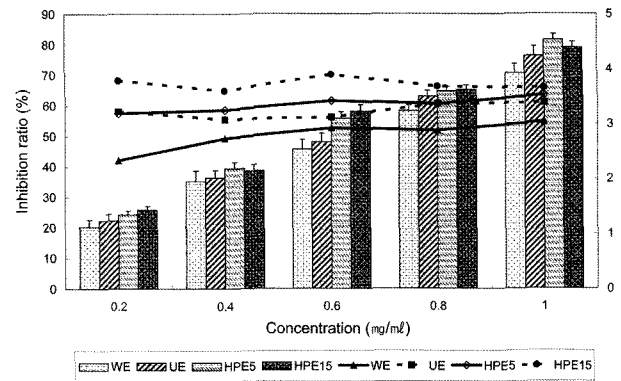
### 2. 정상세포 독성 및 항암활성

실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성과 각 암세포에 대한 성장 효과를 검토하였다. Fig. 1은 인간 신장 세포 HEK293에 대한 세포 독성을 나타낸 것으로 sample과 표준물질 모두 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 HPE15가 23.8%로 가장 높은 세포 독성을 나타냈으며, UE는 21.6%의 가장 낮은 세포독성을 나타내었다.

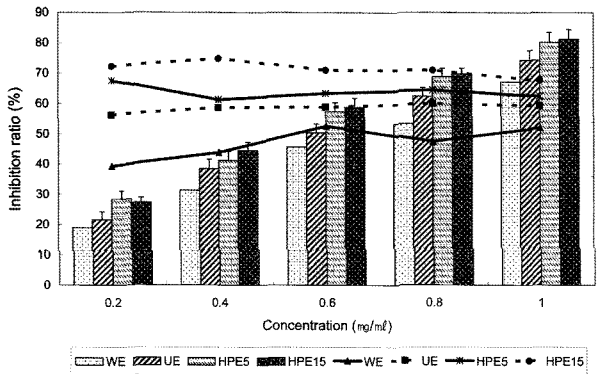
Fig. 2는 인간폐암세포인 A549에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였는데, HPE15이 82.4%로 가장 높은 억제활성을 보였다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5사이의 범위 중, 1.0 mg/ml의 농도에서 4.21로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 보였다.



**Fig. 1.** Cytotoxicity of the crude extracts from *R. coreanus* on normal cell line, HEK293 (WE: water extract at 60°C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent).



**Fig. 3.** Inhibition ratio of growth AGS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the crude extracts of *R. coreanus* (WE: water extract at 60°C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent).



**Fig. 2.** Inhibition ratio of growth A549 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the crude extracts of *R. coreanus* (WE: water extract at 60°C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent).

Fig. 3은 위암세포인 AGS에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였으며 HPE15에서 가장 높은 억제 활성을 보였다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5 사이의 범위 중, 0.6 mg/ml에서 3.98로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타냈다.

초고압과 초음파 처리의 항암 활성을 기존의 일반 추출 실험결과와 비교했을 때 초고압과 초음파 처리가 10% 이상 항암활성의 증가를 보였다. 이는 초고압 처리 시 유용물질의 용출량 증가와 신물질의 용출을 통한 암세포의 생육 억제 효과를 가져 온 것으로 사료되었다.

HPE15가 가장 높은 생육억제 활성을 보이긴 하였지만, HPE5와 비교하면 큰 차이가 나지 않았는데 이는 초고압 추출 시간이 5분 이상이면 열매 활용 작물인 복분자의 경우 고압으로 인해 대부분 유용활성 물질이 용출되어진 것으로 판단되어 5분 이상의 추출 시간은 큰 의미가 없을 것으로 추정되었다.

### 3. 면역세포 생육 증진 효과

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과를 생육도를 통하여 측정하였다. B-cell 생육도의 경우 시료 투여 후 전체적으로 6일째 최고로 증가하였다. 그 중 가장 높은 활성을 나타낸 HPE5의 경우 6일째에  $13.5 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 생육활성도를 나타냈다 (Fig. 4).

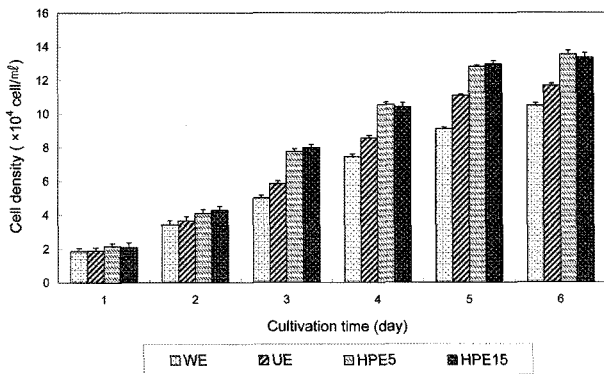
T-cell 생육도의 경우 B-cell 생육도와 유사한 모습을 보여 HPE15의 생육도는 6일째  $14.6 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 생육도를 나타냈다 (Fig. 5).

### 4. Cytokine 분비 증진 효과

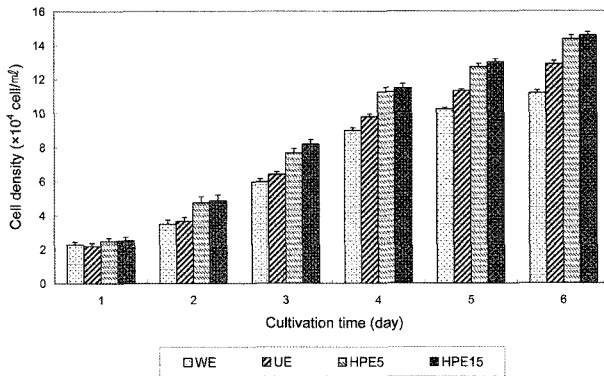
Table 2는 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침하는 cytokine (IL-6와 TNF- $\alpha$ )의 분비량을 B, T 세포에서 측정된 결과를 나타낸 것이다.

각 시료에 대한 세포 당 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, HPE15는 B cell에서 각각 6일째  $1.31 \times 10^{-4}$  pg/cell,  $1.4210^{-4}$  pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타냈다.

각 시료에 대한 세포당 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, B cell과 마찬가지로 HPE15에서 가장 많은 분비량을 보



**Fig. 4.** The cell growth of B cells from *R. coreanus* extracts in adding 0.5 mg/ml concentration (WE: water extract at 60 °C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60 °C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent).



**Fig. 5.** The cell growth of T cells from *R. coreanus* extracts in adding 0.5 mg/ml concentration (WE: water extract at 60 °C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60 °C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent).

였다. IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 각각 6일째  $1.39 \times 10^{-4}$  pg/cell,  $1.43 \times 10^{-4}$  pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타냈다.

### 5. NK-cell의 면역증진 효과

NK cell의 활성 측정은 B cell과 T cell 추출물을 첨가한 후 그의 배양액을 NK cell에 첨가함에 따른 생육도의 변화를 첨가하지 않은 control과 비교하였다. Fig. 6은 B cell에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하였을 때 NK cell의 활성도를 타나낸 것으로 6일간 생육도를 관찰한 결과 모든 처리조건에서 생육도가 증가하였으며, 가장 좋은 활성은 HPE15로 6일째  $15.8 \times 10^4$  cells/ml를 보여 가장

**Table 2.** The secretion of IL-6, TNF- $\alpha$  from human BT cells in adding the extracts of *R. coreanus* extracts (0.5 mg/ml) from various extracts process.

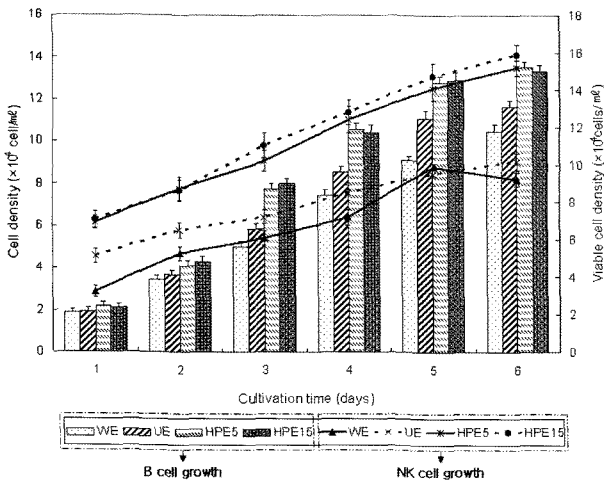
Sample treatment (days)	After (days)	Cell line			
		B cell ( $10^{-4}$ pg/ml)		T cell ( $10^{-4}$ pg/ml)	
		IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
WE	1	0.38	0.42	0.37	0.40
	2	0.51	0.67	0.50	0.61
	3	0.63	0.84	0.72	0.66
	4	0.82	0.91	0.88	0.87
	5	0.97	1.10	0.98	0.94
	6	1.05	1.18	1.14	1.12
UE	1	0.45	0.48	0.48	0.48
	2	0.70	0.75	0.66	0.77
	3	0.78	0.85	0.82	0.85
	4	0.90	1.08	0.93	0.97
	5	1.12	1.22	1.13	1.19
	6	1.19	1.26	1.20	1.23
HPE5	1	0.49	0.55	0.51	0.55
	2	0.75	0.77	0.78	0.81
	3	0.83	0.94	0.85	0.91
	4	0.95	1.08	1.02	1.10
	5	1.25	1.34	1.28	1.38
	6	1.28	1.38	1.32	1.40
HPE15	1	0.52	0.58	0.53	0.57
	2	0.8	0.80	0.79	0.82
	3	1.16	0.95	0.95	0.97
	4	1.23	1.09	1.07	1.15
	5	1.30	1.39	1.35	1.41
	6	1.31	1.42	1.39	1.43

WE: water extract at 60 °C, control  
 UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60 °C with water solvent  
 HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent  
 HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60 °C with water solvent

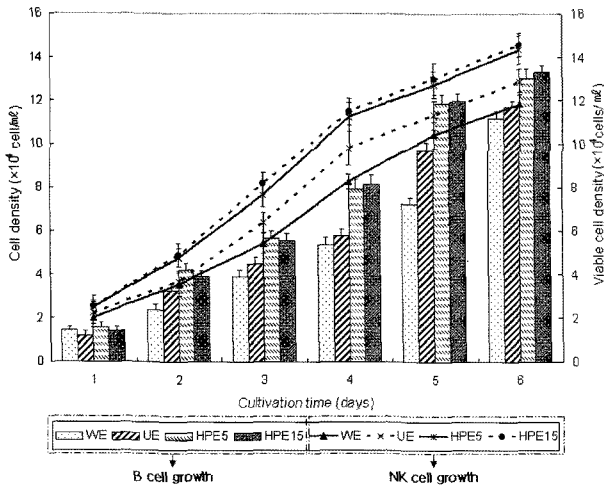
높은 생육도를 나타냈다.

Fig. 7은 T cell에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하였을 때 NK cell의 활성도를 타나낸 것인데, 이것도 B cell과 같이 6일까지 모든 처리구에서 NK cell의 생육도가 증가하는 것을 확인하였다. 그 중 HPE15는  $1.8 \times 10^4$  cells/ml로 가장 좋은 활성을 보였다.

항암과 면역활성 실험 시 초고압으로 추출한 것이 초고압으로 추출하지 않은 것에 비해 높은 활성을 보였는데, 이는 기존의 추출 방법으로는 나오지 않았던 유용생리활성 물질들이 초고압 처리를 통해 조직과 세포막 파괴로 인해 새로운 물질의 용출로 인한 것으로 판단되었다.



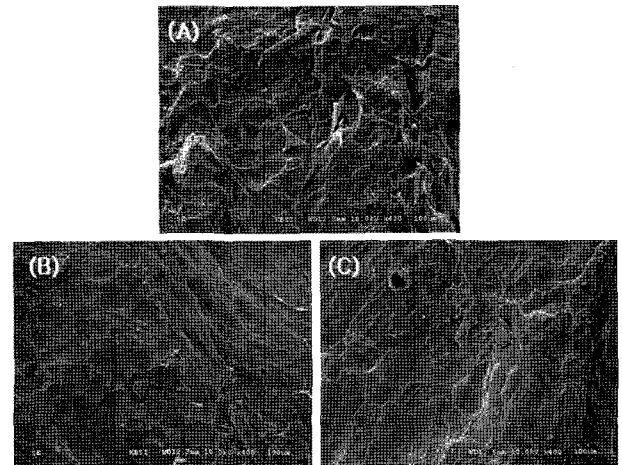
**Fig. 6.** The NK cell growth (line chart) added the secretion of B cells in adding the extracts from *R. coreanus* extracts (WE: water extract at 60°C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent).



**Fig. 7.** The NK cell growth (line chart) added the secretion of B cells in adding the extracts from *R. coreanus* extracts (WE: water extract at 60°C, control, UE: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE5: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent, HPE15: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent).

### 6. Scanning Electron Microscope 관찰

초고압 추출 후 조직 파괴의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 저진공주사현미경을 이용하여 복분자 표면을 400배로 확대하여 관찰하였다 (Fig. 8) (A)는 60°C 물에서 추출 후 초음파 처리한 것으로 조직과 조직사이가 치밀하게 되어 있는 것



**Fig. 8.** Scanning electron microphotographs of the surface of *R. coreanus* after treating high process for 5 and 15 minutes. A: ultrasonification treated for 30 minutes at 60°C with water solvent. B: holding high pressure for 5 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent. C: holding high pressure for 30 minutes after ultrasonification process for 30 minutes at 60°C with water solvent.

을 확인할 수 있는 반면 초고압으로 5분, 15분 처리한 (B)와 (C)는 조직과 조직사이가 벌어져 간격이 넓어진 것을 확인할 수 있었다. 기존의 초음파를 이용한 추출 방법은 탈기현상을 통해 용출량이 많아지기는 했지만 조직에는 영향을 주지 못한 것으로 보인다. 반면에 초고압 추출을 실시한 (B), (C)에서는 조직 사이가 벌어져, 앞선 수율에서 볼 수 있듯이 성분의 많은 용출이 이루어진 것으로 보였다. 또한 기존의 추출 방법으로는 용출되어지지 않았던 물질이나 고압으로 인해 기존 성분들의 변화 등으로 새로운 물질의 용출이 있었던 것으로 보였다. 따라서 본 연구를 통해 초고압 추출을 통해 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 앞으로 활성 증진의 원인을 찾기 위해 성분분석 등의 연구가 진행되어야 할 것이다.

### 적 요

본고에서는 초고압 추출 공정의 활성 증진 효과를 알아보기 위해 복분자의 면역활성 실험을 실시하였는데 그 결과는 아래와 같다.

인간의 정상 신장세포인 HEK293을 이용한 세포 독성은 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 최고 19.5%의 세포독성을 나타냈다. 항암활성은 AGS와 A549 암세포를 이용하였는데, 초고압을 실시할 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 80%이상의 높은 억제활성을 보였으며, 암세포의 생육활성에 대한 정상 세포의 세포독성의 비로 나타낸 선택적 사멸도는 모든 고농도에서 모두 3 이상으로 나타났다. 모든 처리구 중 15분간 초고압 추출한

것이 가장 높은 활성을 보였으나 5분간 초고압 추출한 것과 큰 차이가 나지 않아 5분간 초고압 추출을 실시하는 것이 효율적인 것으로 보인다.

B cell과 T cell을 이용한 면역세포의 생육은 배양 6일째에 15분간 초고압으로 추출한 처리구에서 각각  $13.5 \times 10^4$  cells/ml,  $14.6 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 세포농도를 나타냈다.

면역세포를 이용한 cytokine의 분비량 측정실험에서는 HPE15 추출물이 배양 시간에 따른 cytokine의 분비가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 각 세포의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비량은 6일째 최고의 분비량을 나타내었다. 또한 NK cell의 면역활성은 모든 추출물에서 배양 시간에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그 중 HPE15 추출물에서 B cell의 경우  $15.8 \times 10^4$  cells/ml, T cell의 경우  $14.8 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 생육 활성을 나타내었다.

본 실험 결과를 통하여 초고압으로 인해 기존의 추출 방법으로는 추출되지 않았던 유용생리활성 물질들이 초고압으로 조직과 세포막 파괴로 인해 유용성분의 용출량이 증가하고 새로운 물질의 용출로 인해 높은 활성을 나타낸 것으로 판단되었다.

### 감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업(과제번호: 20070401034013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

### LITERATURE CITED

Bae GH (2000) The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Co., Seoul., p. 231.  
 Bennett P.B, Marquis RE, Demchenko I (1998) High pressure biology and medicine. University of Rochester Press., New York.

Deliza R, Rosenthal A, Abadio FBD, Silva CHO, Castillo C (2005) Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. Journal of Food Engineering 67:241-246.  
 Dool R, Peto R (1983) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Food and Chemical Toxicology 21(4):512-513.  
 Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation. Yakhak Hoeji 42(3):296-301.  
 Kim HC, Lee SL (1991) A comparative study on the health effect of *Rubus coreanum*. J. herbol. 6:3-11.  
 Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies, high pressure processing. <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>.  
 Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY (2003) Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 11(1):5-12.  
 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. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 10:109-115.  
 Lee YA, Lee MW (1995) Tannins from *Rubus coreanum*. Kor. J. Pharmacog. 6:27-30.  
 Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY (2004) Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Koeran J. Biotechnol. Bioeng. 19(2):113-117.  
 Shin KS, Park PJ, Boo HO, Ko JY, Han SS (2003) Chemical components and comparison of biological activities on the fruit of natural Bogbunja. Korean J. Plan Res. 16:109-117.  
 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.