

## 초고압 저온처리에 의한 매자나무의 면역 활성

김 영\* · 한재건\* · 하지혜\* · 정향숙\* · 권민철\* · 안주희\* · 김진철\* · 최근표\*\* · 정을권\*\*\* · 이현용\*\*\*\*†

\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*강원도립대학 식품가공제과제빵과, \*\*\*명진농장, \*\*\*\*강원대학교 생명공학연구소

### Effect of Immune Activity on *Berberis koreana* Palibin by Ultra High Pressure Low Temperature Process

Ling Jin\*, Jae Gun Han\*, Ji Hye Ha\*, Hyang Suk Jeong\*, Min Chul Kwon\*, Juhee Ahn\*, Jin Chul Kim\*, Geun Pyo Choi\*\*, Eul Kwon Chung\*\*\*, and Hyeon Yong Lee\*\*\*\*†

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

\*\*Department of Food Processing and Bakery, Gangwon Provincial College, Gangneung 210-804, Korea.

\*\*\*Myung Jin Farm Co., Inje, Kangwon-do 282-840, Korea.

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

**ABSTRACT :** This study was performed to investigate a methodology of improving immune activities of *Berberis koreana* Palibin by ultra high pressure on low temperature extraction process. Extraction yield was enhanced up to more than 35% by above process, compare to the control and extraction average. The cytotoxicity on human kidney cell (HEK293) was showed below 20.4%, 21.6% in adding 1.0 mg/ml of the highest concentration. Generally, the extracts by ultra high pressure extraction process showed less toxicity about 5% than the other processes. It could tell that toxic materials that existing in the plant could be reduced or broken by ultra high pressure process due to can be broken bond such the hydrogen bond, the electrostatic bond, the van der Waals bond, and the hydrophobic bond, can be broken by high pressure. The result could be employed to develop a new type of functional food from *B. koreana* Palibin by low temperature high pressure process.

**Key Words :** *Berberis koreana* Palibin, Ultra High Pressure, Low Temperture, Immune Activities, Cytokine, Natural Killer (NK) Cell

## 서 언

매자나무는 미나리아재비목 매자나무과의 낙엽관목으로 한국 특산종이며, 경기도 이북에 분포한다. 잎에는 독성이 있으나 줄기와 뿌리를 건위제로 사용하고 진통제, 호흡기질환, 항암, 항결핵, 항균, 유아설사 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 한방에서는 이노제, 소염제, 간염, 화상치료, 혈압강하 등에 사용된다. 하지만 매자나무는 목질계 자원으로 기존의 추출방법으로는 유용성분 추출에 한계가 있어, 이의 개선이 가능한 새로운 추출공정이 요구된다.

초고압 처리는 최근 다양한 분야에서 각광받고 있는 기술로 식품에 적용하여 영양소 및 비영양성 식물 화학성분 추출에 가장 효율적으로 활용될 수 있는 기술로 주목받고 있다. 특히 초고압 공정을 이용하면 열처리를 하지 않거나 최소의 열처리만으로 식품의 가공 및 처리가 가능함에 따라 산성 식품의 살균 등에 이용되는데, 그 식품들의 향, 맛, 영양가, 색을 기존의

물리적 처리와 비교하였을 때 기존 공정에 비해 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 (Zhang *et al.*, 2004). 기존의 전통적인 추출 방법은 추출 효율이 낮고 에너지 소비가 많으며 발생하는 열로 인해 유용성분의 파괴 및 단백질 변성이 일어나며 따라 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출은 물론 열에 대하여 불안정한 단점을 가지고 있다 (Park *et al.*, 2004). 반면 초고압 추출을 이용하면 이러한 단점들을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

초고압 기술은 약용식물로부터 단시간에 목적 성분을 추출하는 것이 가능하며, 불순물의 생성이 적어 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있다는 장점을 가진다. 이는 초고압 하에서 일어나는 단백질 변형 및 세포막 파괴 (Kim *et al.*, 2007)에 기인하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 최근 국내 식·의약품 산업에서 활발하게 적용되고 있는 초고압 추출 기술을 이용하여 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려진 매자나무로부터 유용성분을 추출하고 이들의 면역활성

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

Received July 14, 2008 / Revised October 1, 2008 / Accepted October 27, 2008

을 탐색함으로써, 기존 일반 추출물과의 비교를 통한 초고압 추출 기술의 천연유래 성분 활성 증진 효과를 알아보고자 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 매자나무는 경기도 이북에 분포하는 한국 특산종인 *Berberis koreana* Palibin으로써 국립산림과학원 광릉시험림으로부터 묘목을 지원받아 사용하였다. 시료는 부위 별로 분리한 후에 음건한 뒤 분쇄하여 사용하였다.

### 2. 추출조건

초고압 추출은 매자나무 시료 100 g을 비닐 팩에 증류수와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출 장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 5,000 bar의 압력으로 각각 5분, 15분간 초고압 추출을 실행하였다. 초고압 추출이 끝난 매자나무 시료는 수직환류냉각기가 부착된 추출 플라스크에 10배수의 증류수를 용매로 하여 60°C에서 12시간 2회 반복 추출하였다 (Kim *et al.*, 2008). 대조군으로 사용된 일반 추출 방법은 100 g의 매자나무를 수직환류냉각기가 부착된 추출 플라스크에 10배수의 증류수를 용매로 하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하여 사용하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압여과장치로 여과하고 농축·동결건조를 통해 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

### 3. 세포주 및 세포 생육 배지

면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat, ATTC, USA)와 B세포 (Raji, ATTC, USA)를 이용하여 검증하였으며, 대식세포의 nitric oxide 생성능은 마우스 유래 macrophage (J774.1, ATTC, USA)를 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 면역세포와 대식세포는 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, Natural Killer (NK) 세포는  $\alpha$ -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid,  $10^{-4}$ M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)은 Gibco (USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 세포염색을 위한 sulforhodamine B (SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 4. 정상세포 독성 측정

정상세포에 대한 세포독성은 인간 신장 세포인 HEK293을 이용하여 세포 단백질 염색을 통해 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법인 SRB (sulforhodamine B) assay (Doll and Peto, 1981)로 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를  $4\sim5 \times 10^4$  cells/ml으로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C 5% CO<sub>2</sub>)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 100  $\mu$ l 씩 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  $\mu$ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 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.

### 5. 면역세포 생육 증진 효과 측정

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat)와 B세포 (Raji)를 이용하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 측정하였다. 면역세포를 RPMI 1640배지에서 72시간 배양하고 세포수를 각각  $1 \times 10^5$  cells/ml로 희석하여 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l 씩 접종한 뒤 매자나무 추출물을 농도별로 100  $\mu$ l 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 동안 배양한 후, 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료 시 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 세포 생존율을 계산하였다.

### 6. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- $\alpha$  정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를  $1.0\sim2.0 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900  $\mu$ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시키고, 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 원심분리기를 이용하여 배양배지의 상등액을 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. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

사용된 세포주는 마우스 유래 J774.1 대식세포이며, 세포는 10% heat-inactivated bovine serum과 RPMI 1640 배지를 이용하여 24well plate에 4~5 × 10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO<sub>2</sub> incubator 안에서 37°C에서 48시간동안 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 배양한 뒤 상등액 50 μl를 취하여 동일부피의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μM에서부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO<sup>-</sup> 생성능의 양성대조구 물질로는 LPS (Lipopolysaccharide)를 사용하였다 (Lee and Cho, 2007).

8. Natural Killer (NK) 세포의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI 세포를 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10<sup>-4</sup>M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum에 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포를 T-25 Flask에 배양하면서 시료를 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI 세포를 24well plate에 4~5 × 10<sup>4</sup> cells/ml로 900 μl씩 분주하고 24시간 후 T세포의 상층액을 각 plate에 100 μl씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI 세포의 활성도를 cell counter를 이용한 생세포수 측정을 통해 확인하였다 (Yueran et al., 2003).

9. 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 매자나무 시료의 표면을 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 수율

매자나무 수피의 추출 수율은 Table 1에 나타내었다. 초고압 공정을 통한 추출물들이 모두 일반 추출에 비해 35% 이상 수율이 증진된 것을 확인할 수 있다. 이는 초고압 처리를 통

Table 1. The extraction yields of the stem bark from *B. koreana* Palibin according to several extraction processes.

Sample	Condition of Extraction		Yield (% w/w)
	High Pressure	Solvent/Temp.	
WE*	-	Water/60°C	8.39 ± 0.21
HPE5 <sup>†</sup>	5 min	Water/60°C	11.41 ± 0.42
HPE15 <sup>‡</sup>	15 min	Water/60°C	11.04 ± 0.18

\*WE : Water extract at 60°C, control.

<sup>†</sup>HPE5 : Water extracts at 60°C after high pressure process for 5 min.

<sup>‡</sup>HPE15 : Water extracts at 60°C after high pressure process for 15 min.

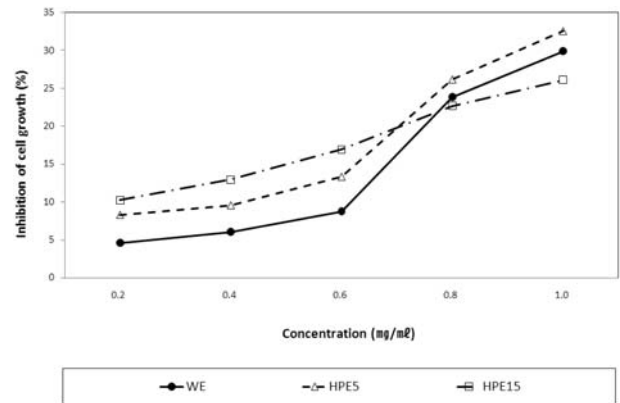


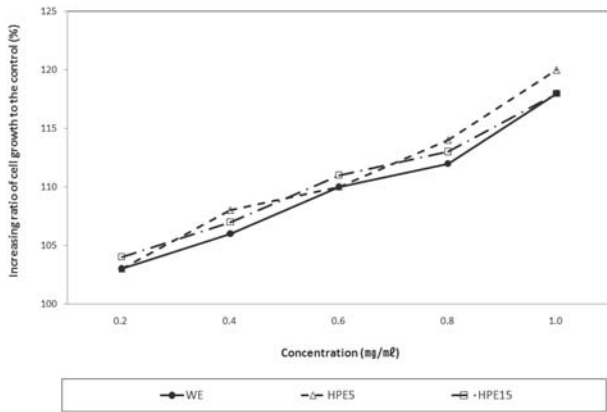
Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts of stem barks from *B. koreana* Palibin on human normal cell line (HEK293).

※ See Table 1 for abbreviations.

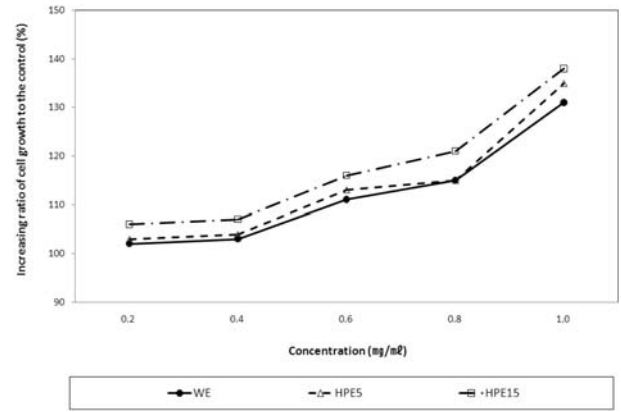
해 식물세포벽 및 세포막 등 구조가 변형 또는 파괴되면서 물질의 이동을 용이하게 함에 따라 기존 물질의 용출량 증진은 물론 기존의 추출 방법으로는 용출되지 않았던 성분들이 용출된 것으로 사료된다. 초고압 처리 시간별로는 5분 처리한 추출이 11.4%, 15분 처리한 추출이 11.0%로 큰 차이를 나타내지 않아 매자나무 시료 추출 수율에 있어 초고압 공정은 5분을 유지하는 것이 가장 경제적인 공정으로 사료된다.

2. 정상세포 독성

인간 신장 세포인 HEK293을 이용한 매자나무의 세포독성 실험결과는 Fig. 1에 나타내었다. 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 5분 초고압 처리한 60°C 추출물이 32.6%로 가장 높은 세포독성을 나타내었고, 15분 초고압 처리한 추출물이 26.1%로 가장 낮은 세포독성을 나타내었다. 모든 조건에서 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 초고압 15분 처리 시료를 제외한 모든 조건에서 0.6 mg/ml 농도를 기점으로 세포독성이 급격히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 결과를 통해 세포독성의 증가율이 일반 열수 추출 시료, 초고압을 5분 처리한 시료, 15분 처리한 시료의 순으로 높게 나타남에 따라 초고압 처리 시간에 비례하여 독성저감이 효과를 가질 것으로 사료된다. 특히 매자나무가 독성을 나타내는 시료임을 감안했을 때 초고압 추출 공정은 매자나무의 독성저감을 통한 활용



**Fig. 2.** Growth of human immune B cell (Raji) in adding the extracts of stem bark from *B. koreana* Palibin.  
 ※ See Table 1 for abbreviations.



**Fig. 3.** Growth of human immune T cell (Jurkat) in adding the extracts of stem bark from *B. koreana* Palibin.  
 ※ See Table 1 for abbreviations.

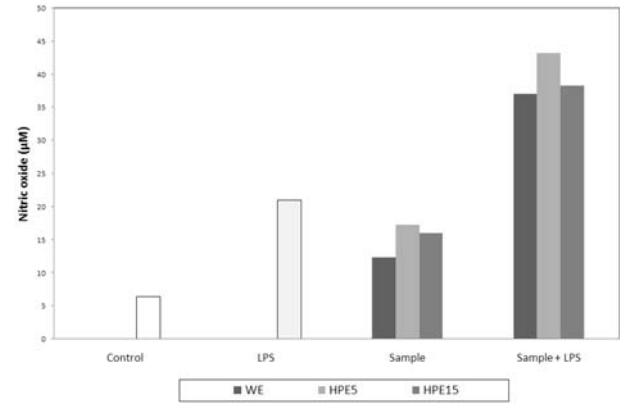
성 증진에 효율적으로 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 3. 면역세포 생육 증진 효과

MTT assay를 통한 면역세포의 생존률 측정을 통해 생육 증진 효과를 확인하였다. Yellow tetrazolium salt MTT는 살아있는 세포에서 물에 녹지 않는 formazan crystal로 환원되는데 이 크리스탈을 DMSO로 녹여서 생성된 크리스탈의 양을 분광학적인 방법 (Spectroscopic method)으로 측정하여 세포의 생존율을 확인하는 것이다. 살아있는 세포의 수가 많을수록 크리스탈의 생성도 많아지므로 이러한 방법을 통해 세포의 성장을 쉽게 측정할 수 있다. 인간 면역 B세포를 이용해 시료첨가에 따른 생존율을 측정 한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 추출물을 첨가한 모든 조건에서 대조군에 비해 높은 생존율을 나타내며 유사한 활성을 나타내었으며, 5분간 초고압 추출물이 1.0 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 120%의 생존율을 보이며 가장 높은 수치를 나타내었다. 인간 면역 T세포를 이용한 실험에서도 B세포에서와 유사한 결과를 나타내었으나 B세포에서보다 확실한 차이를 확인할 수 있었다. Fig. 3에 나타낸 결과를 통해 초고압 처리를 통해 활성이 증진된 것을 확인하였으며, 초고압을 15분간 처리한 시료가 1.0 mg/mL의 농도에서 136%의 생존율을 나타내며 가장 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 세포독성 실험을 통해 측정된 매자나무의 독성이 면역세포에는 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 사료되는 결과이다.

### 4. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- $\alpha$ )의 분비량을 B, T세포에서 측정 한 결과를 나타낸 것이다. 각 시료에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 유의적인 값을 나타내었다. 각 시료에 대한 B세포의 IL-6와 TNF- $\alpha$



**Fig. 4.** Nitric oxide production from J774.1 cell lines in adding the extracts of stem bark from *B. koreana* Palibin. (1.0 mg/mL).  
 ※ See Table 1 for abbreviations.

의 분비량을 살펴보면, 초고압을 15분간 처리한 추출물이 6일째 각각  $4.2 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $5.1 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타내어 가장 많은 분비량을 나타내었고, 다음으로 초고압 5분 처리 추출물이 각각  $4.0 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $4.7 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타낸 것을 확인할 수 있다. 마찬가지로 T세포의 cytokine 분비에서도 초고압 15분 추출물이 6일째 각각  $5.4 \times 10^{-4}$  pg/cell과  $6.0 \times 10^{-4}$  pg/cell을 나타내며 일반 열수 추출물 및 초고압 15분 추출 시료와 비교하여 많은 cytokine 분비량을 나타내었다.

### 5. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능

대식세포를 이용하여 NO<sup>-</sup> 생성능을 측정 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS(E. coli derived lipopoly-saccharide)와 같은 세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기

**Table 2.** Comparison of IL-6, TNF- $\alpha$  secretion on immune cell growth in adding the extracts of stem bark from *B. koreana* Palibin according to several extraction processes.

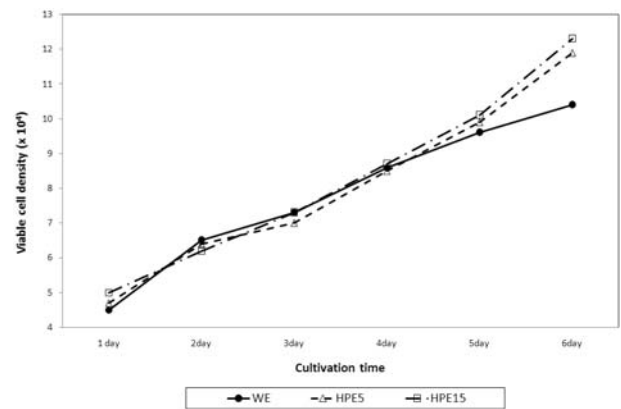
Extraction Condition of Sample	Cultivation time (DAY)	Specific secretion from B cell ( $10^{-4}$ pg/cell)		Specific secretion from T cell ( $10^{-4}$ pg/cell)	
		IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
WE	1	0.26	0.55	0.96	1.15
	2	0.53	0.85	1.23	1.45
	3	1.33	1.76	2.03	2.36
	4	1.86	2.42	2.56	3.02
	5	2.44	3.26	3.14	3.86
	6	3.56	4.48	4.26	5.08
HPE5	1	0.30	0.63	0.82	1.25
	2	0.59	0.87	1.25	1.56
	3	1.59	1.94	2.15	2.79
	4	2.07	2.80	2.78	3.59
	5	2.89	3.47	3.55	4.28
	6	4.01	4.69	4.65	5.73
HPE15	1	0.25	0.65	1.12	1.47
	2	0.67	0.96	1.64	1.77
	3	1.82	2.19	2.63	2.94
	4	2.13	2.99	3.53	4.12
	5	2.94	3.68	3.87	4.67
	6	4.24	5.13	5.43	5.97

※ See Table 1 for abbreviations.

때문에 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO의 생성능을 확인하였다. 결과를 통해 대식세포의 NO<sup>-</sup> 생성은 LPS 첨가를 통해 촉진됨을 알 수 있다. 매자나무 추출물 시료 첨가를 통해서도 LPS만큼은 아니지만 일정량 이상의 NO가 생성되었다. 이는 매자나무 추출물의 세포독성 성분에 기인한 것으로 추측해 볼 수 있으며, 초고압 15분의 NO<sup>-</sup> 생성이 초고압 5분에 비해 낮게 나타난 것은 초고압 공정을 통한 독성저감 효과로 사료된다. 하지만 매자나무 추출물 시료와 LPS를 동시에 처리한 결과를 통해 매자나무 추출물 첨가를 통해 LPS 투여시 NO의 생성량이 증가한 것은 매자나무 추출물이 NO<sup>-</sup> 생성을 통한 면역체계에 활성 증진 효과를 나타냄을 확인할 수 있는 결과이다. 결과를 통해 매자나무의 모든 추출물이 이러한 면역활성 증진 효과를 나타내었음을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 5분 초고압 처리 후 추출한 시료의 NO<sup>-</sup> 생성량이 43.2  $\mu$ M로 가장 높은 값을 보였다. 이상의 결과를 통해 매자나무 수용성 추출물에는 대식세포의 NO<sup>-</sup> 생성능을 증진시킴으로써 면역활성을 증진하는 활성이 있으며 이는 LPS 등 세균 내 독소와 함께 상승작용을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

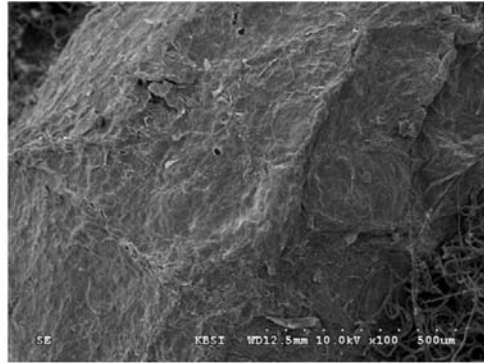
**6. Natural Killer (NK) 세포의 면역증진 효과**

NK 세포의 활성 측정은 시료를 첨가한 면역 B세포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 5는 B세

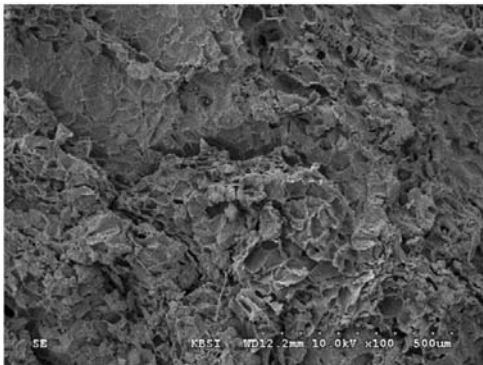


**Fig. 5.** Growth of NK cells in adding the supernatant of B cell by adding the extracts of stem bark from *B. koreana* Palibin.  
 ※ See Table 1 for abbreviations.

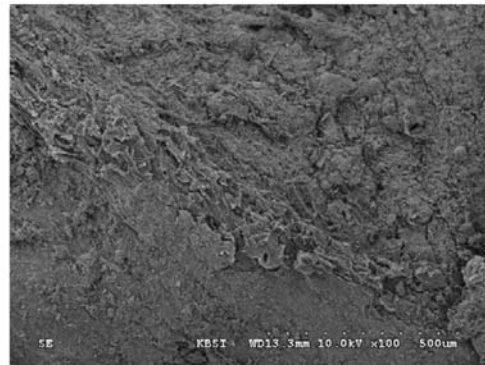
포에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 나타나는 NK 세포의 활성도를 시료별로 나타낸 것이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 6일째에 5분 초고압 처리한 추출물이 12.4  $\times 10^4$  cells/ml의 생육을 나타내며 가장 높은 생육 증진을 나타내었으며, 다음으로 15분의 초고압처리 추출물이 11.9  $\times 10^4$  cells/ml를 나타내었다. 각각의 추출물이 큰 차이를 보이지는 않았으나 대체적으로 초고압 처리한 추출물들의 활성이 높게 나타났으며 이는 시간 경과에 따라 뚜렷해지는 양상을 보였다.



(A) After WE



(B) After HPE5



(C) After HPE15

**Fig. 6.** Scanning electron microphotographs of the surface of *B. koreana* Palibin after treating high pressure process for 5 (HPE5) and 15 (HPE15) minutes and only water extracts (WE).

※ See Table 1 for abbreviations.

### 7. Scanning Electron Microscope 관찰

초고압 공정 후 조직의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 저진공주사현미경을 이용하여 매자나무 수피 시료의 표면을 400 배로 확대 관찰하였다. (A)는 60°C에서 일반 열수 추출 후 촬영한 것으로 매자나무 수피의 조직 표면이 손상 없이 비교적 매끈한 형태를 유지하고 있음을 확인할 수 있다. 반면 초고압으로 각각 5분과 15분을 처리한 (B)와 (C)는 매자나무 수피 조직의 표면이 손상 및 변형, 또는 파괴되어 (A)와 비교하면 확연한 차이를 확인할 수 있었다. 기존의 초음파를 이용한 추출 방법은 탈기현상을 통해 용출량을 효율적으로 증진시키기는 했지만 조직에는 큰 영향을 주지 못한 반면 초고압 추출을 실시한 (B)와 (C)에서는 겉으로 보이는 표면 조직뿐만 아니라 내부 조직까지 모두 영향을 받아 유용물질의 용출량 증가 및 신물질 용출을 통해 수율이 증가한 것으로 보인다. 또한 매자나무 독성 물질의 파괴나 변성을 통해 독성 저감에도 영향을 미치는 것으로 보이며 독성실험의 결과를 통해 초고압을 15분 유지하였을 때 독성저감 효과가 큰 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통해 초고압 추출이 활성 증진 및 독성저감에 효과가 있음을 확인하였으며, 앞으로 이상의 구체적인 기작에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 말

본 연구는 산림청에서 시행한 산림특정연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### LITERATURE CITED

- Doll R and Peto R.** (1981). The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*. 66:1191-1308.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES and Baik KU.** (1998). Effect of Ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji*. 42:296-301.
- Hermans K.** (2003). Pressure and temperature induced phenomena in proteins. 3-8. In Winter R. (ed.) *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2008). Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:255-260.
- Kim CH, Kwon MC, Qadir SA, Hwang B, Nam JH and Lee**

- HY.** (2007). Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:411-416.
- Lee YG and Cho JY.** (2007). Inhibition effect of curcumin on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells and its suppressive mechanism. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:451-456.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK and Lee HY.** (2004). Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 19:113-117.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G and 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.
- Zhang S, Zhu J and Wang C.** (2004). Novel high pressure extraction technology. International Journal of Pharmaceutics. 278:471-474.