

사람 면역세포를 활용한 생식 원료 및 제품의 체질 맞춤형 면역 활성 탐색

오성윤¹ · 정미자² · 최재호¹ · 오덕환¹

¹강원대학교 식품생명공학과

²광주대학교 식품영양학과

Screening of Personalized Immunostimulatory Activities of Saengsik Materials and Products Using Human Primary Immune Cell

Seong-Yoon Oh¹, Mi Ja Chung², Jae-Ho Choi¹, and Deog-Hwan Oh¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

²Department of Food Science & Nutrition, Gwangju University

ABSTRACT Sasang constitutional medicine is a Korean traditional medicine in which individuals are classified into four constitutional types, Taeyangin, Taeumin, Soyangin, and Soeumin. To develop new functional Saengsik products, we investigated the immunostimulatory activities of raw materials of Saengsik (milled rice, barley, Job's tears, soybean, adzuki bean, millet, eggplants, radish, carrot, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, and *Auricularia auricula-judae*) and Saengsik products (Mix 1~6) in primary immune cells (lymphocytes and macrophages) isolated from blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin types. Increased cell proliferation as well as NO and TNF- α protein production by immune cells treated with extracts of materials of Saengsik and Saengsik products were measured as immunostimulatory parameters. We chose milled rice, adzuki bean, radish, and *Lentinus edodes* to study the immunostimulatory activity of Taeumin, barley, soybean, eggplants, and *Agaricus bisporus* to study the immunostimulatory activity of Soyangin, as well as Job's tears, adzuki bean, carrot, and *Auricularia auricula-judae* to study the immunostimulatory activity of Soeumin. The mixtures (Mix 1~6) were made with different kinds and ratios of Saengsik materials based on the immunostimulatory activities of Saengsik materials. The immunostimulatory activity of Taeumin was highest in Mix 2 (rice 60%, adzuki bean 20%, radish 10%, and *Lentinus edodes* 10%) extract-treated immune cells among all six mixtures. The immunostimulatory activity of Soyangin responded best to Mix 4 (barley 60%, soybean 20%, eggplants 10%, and *Agaricus bisporus* 10%) among the six extracts (Mix 1~6). The increased immunostimulatory activity of Mix 6 (Job's tears 60%, adzuki bean 20%, carrot 10%, and *Auricularia auricula-judae* 10%) treated immune cells was higher than the other five extracts (Mix 1~5). Accordingly, Mix 2, Mix 4, and Mix 6 may be useful as mixtures for Saengsik products having personalized immunostimulatory activities.

Key words: immunostimulatory activity, immune cells, oriental medicine, primary cells, Saengsik

서 론

생식(Saengsik)은 곡류, 두류, 과채류, 버섯류, 해조류 등의 원료를 사용하여 가열처리하지 않은 상태에서 저온 건조해 분말화하여 일정한 비율로 혼합한 제품이다. 생식은 식품에 열을 직접 가하지 않아 식품이 가지고 있는 영양소 및 건강기능성을 그대로 보존 가능한 장점을 가지고 있고 물 등과 혼합하여 쉽게 섭취할 수 있는 간편성을 가지고 있다(1). 따라서 생식은 바쁜 현대인들의 건강을 지키기 위한 건강기능성을 가진 식사대용식으로 개발되고 있다(1).

쌀(*Oryza sativa* L.) 중에 거층을 완전히 도정한 백미(white rice)는 총 폴리페놀 화합물의 함량이 높고 이들 폴리페놀 화합물은 항산화 물질로 free radical을 안정화시킬 수 있는 phenolic ring이 존재함으로써 뛰어난 항산화력을 나타내었으며(2,3), DPPH radical 소거 작용이 있었다(3). 보리(*Hordeum vulgare* L.)는 우리 식생활에서 쌀 다음으로 중요한 기본 식량으로써 식이섬유가 풍부하여 혈중 콜레스테롤 수치 저하, 비만에 의한 성인병 예방 등의 효과 및 보리 추출물의 항산화 효과가 알려져 있다(4,5). 울무(*Coix lachryma-jobi* L.)는 다른 곡류에 비해 다양한 영양소가 풍부하고 지질대사를 개선하는 효과가 있으며(6) 자양강장제, 이뇨제, 건위제, 진통제, 소염제 및 폐결핵, 관절통 등에도 효력이 있는 것으로 알려져 있다(7).

대두(*Glycine max* Merr.)는 항암 작용, 항고혈압 활성, 혈중 콜레스테롤 저하, 항산화 작용 등 여러 생리활성을 갖

Received 14 May 2014; Accepted 13 June 2014

Corresponding author: Deog-Hwan Oh, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6457

는 성분들을 다양하게 함유하여 기능성식품의 좋은 소재로 활용될 수 있다(8-10). 팥(*Vigna angularis* var. *nipponensis*)은 우리나라에서 콩 다음으로 중요한 두류작물이다. 팥은 비타민 B₁이 풍부하고 쌀의 제한아미노산인 라이신 함량이 높아 쌀에 혼반할 경우 단백질의 질을 향상시키고 각기병 예방 및 피로회복 효과가 있다(11). 조(millet)의 품종 중 하나인 차조(waxy foxtail millet)는 쌀과 함께 밥으로 이용하거나 선식, 생식 등의 원료로 일부 소비되고 있다(12).

가지(*Solanum melongena* Linne)는 우리나라 식단의 부식으로 이용되고 있고 비타민과 무기질이 풍부하고 식이섬유가 풍부하다(13). 장운동 촉진, 변비 예방, 항균, 항종양, 항돌연변이, 피부 보호 효과 및 항암 작용을 가지는 것으로 보고되고 있다(14-17). 무(*Raphanus sativus* L.)는 우리나라에서 김치의 재료로 사용하고 있으며 기담, 혈담, 천식 및 늑간 신경통 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(18). 당근(*Daucus carota* var. *sativa*)은 β -carotene과 α -carotene, lutein과 같은 carotenoid 성분을 다량 보유하고 있는 중요한 채소이다(19).

국내에서 식용 및 약용되고 있는 버섯들에 대한 약리 효과를 알아보면, 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 항산화력, 항균 및 항암, 혈당 강하, 고혈압, 콜레스테롤 저하, 항비만 효과가 알려져 있고(20-25), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 항돌연변이 효과(26), 장내 유산균 증식 효과 등이 알려져 있다(27). 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)은 지질과산화 및 간 손상 억제 효과(28), 항돌연변이 효과(29) 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 환자들을 사상체질로 분류하여 체질에 맞게 질병을 치료해야 한다는 사상의학에 근거하여 지원자들을 태음인, 소양인 그리고 소음인으로 분류하였다. 그들의 혈액에서 분리한 사상체질 면역세포 모델을 이용하여 먼저 생식 원료(쌀, 보리, 울무, 가지, 무, 당근, 표고, 양송이, 목이)의 면역 활성을 알아보았고, 생식 원료의 면역 활성 결과를 활용하여 최상의 면역 활성을 가진 체질 맞춤형 생식제품을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 생식 원료인 쌀(백미), 보리, 울무, (노란)콩, 팥, 차조, 가지, 무, 당근, 표고버섯, 양송이버섯, 목이

버섯은 춘천 시내 대형마트(Chuncheon, Korea)에서 구입하였거나 체질식 전문 업체 (주)쓰리엔포바이오(Wonju, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

체질 맞춤형 생식의 최적 배합비 개발

본 실험에 사용한 배합비는 Table 1과 같다. 즉 배합비 1(Mix 1)은 쌀 70%, 팥 20%, 무 5% 그리고 표고 5%, 배합비 2(Mix 2)는 쌀 60%, 팥 20%, 무 10% 그리고 표고 10%, 배합비 3(Mix 3)은 보리 70%, 콩 20%, 가지 5% 그리고 양송이 5%, 배합비 4(Mix 4)는 보리 60%, 콩 20%, 가지 10% 그리고 양송이 10%, 배합비 5(Mix 5)는 울무 70%, 팥 20%, 당근 5% 그리고 목이 5%, 배합비 6(Mix 6)은 울무 60%, 팥 20%, 당근 10% 그리고 목이 10%였다.

생식 원료 및 생식제품 추출물의 조제

생식 원료 및 생식제품 200 g을 70% 에탄올 2 L에 넣고 25°C 수욕조상에서 24시간 동안 진탕추출을 2회 반복한 후 추출액을 감압여과장치로 여과하였다. 여액을 회전식진공농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 후 동결 건조하여 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 위의 방법으로 제조된 생식 원료 추출물을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 후 RPMI 1640(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 첨가하여 500 μ g/mL 농도로 제조한 후 0.45 μ m Millipore membrane filters(Sartorius, Goettingen, Germany)로 여과하여 실험에 사용하였다.

체질 분류 및 혈액 채취

본 연구의 연구대상은 강원대학교 식품생명공학 전공 재학생들 중 질병이 없고 건강한 지원자들 중 Choi 등(30)이 개발한 체질 감별법을 통해 정확한 체질이 판별된 태음인(Taeumin), 소양인(Soyangin) 그리고 소음인(Soemin) 각각 6명씩 선발하였다. 선발된 지원자들(나이: 20~25세)에게 실험 전 본 연구 목적에 대하여 설명한 후 개별적으로 서면동의를 받았다.

각 지원자들로부터 혈액 채취는 강원대학교 부속 병원 임상병리과 전문가의 지원을 받아 혈액 50 mL씩 2회 채취한 후 신속히 아이스박스에 넣어서 20분 이내 실험실로 운반하여 본 실험에 사용하였다.

Table 1. The composition of mixtures

Mixtures	Composition (%)
Mixture 1 (Mix 1)	Milled rice 70, adzuki bean 20, radish 5, <i>Lentinus edodes</i> 5
Mixture 2 (Mix 2)	Milled rice 60, adzuki bean 20, radish 10, <i>Lentinus edodes</i> 10
Mixture 3 (Mix 3)	Barley 70, soybean 20, eggplants 5, <i>Agaricus bisporus</i> 5
Mixture 4 (Mix 4)	Barley 60, soybean 20, eggplants 10, <i>Agaricus bisporus</i> 10
Mixture 5 (Mix 5)	Job's tears 70, adzuki bean 20, carrot 5, <i>Auricularia auricula-judae</i> 5
Mixture 6 (Mix 6)	Job's tears 60, adzuki bean 20, carrot 10, <i>Auricularia auricula-judae</i> 10

면역세포(lymphocyte, monocyte) 분리

Choi 등(30)의 방법에 따라 혈액 50 mL를 두 개의 50 mL conical tube에 나누어 후 동량의 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; Cambrex Bio Science Verviers Sprl, Verviers, Belgium)을 25 mL씩 넣어 잘 섞이도록 혼합하였다. 이 혼합액을 다시 4개의 50 mL-conical tube에 나누어 나누어 후 혈액과 DPBS 혼합층이 ficoll 층 위로 뜰 수 있도록 ficoll-paque(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 conical tube 아래로 조심스럽게 넣어준 후 원심분리(53×g, 15 min) 하였다. 원심분리 후 혈액에서 ficoll 층 위쪽의 면역세포층을 얻어 DPBS로 3회 세척과 원심분리를 반복하여 순수한 면역세포를 얻었다. RPMI 1640 배지로 두 번 더 세척하여 남아있는 DPBS를 완전히 제거하였다. 10% fetal bovine serum(FBS; Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 RPMI 1640 배지로 부유시켜 cell culture dish에 분주한 다음 37°C와 5% CO₂ 조건 하에서 약 1시간 동안 배양하였다. 1시간 배양 후 부유된 림프구(lymphocyte)를 분리하여 RPMI 1640 배지로 3회 세척하여 모아 배양하였다. 부착된 monocyte는 대식세포(macrophage)로 활성화시키는 Granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF; Sigma-Aldrich Co.) 10 µL를 첨가하여 배양하였다.

림프구는 시료의 세포 증식능 변화를 보기 위해 사용하였고, 부착된 monocyte를 대식세포로 활성화시켜 시료 처리 후 NO 생성능과 TNF-α 분비능 변화를 알아보기 위해 사용하였다.

림프구의 세포 증식능 측정

림프구 세포 증식능을 측정하기 위해 1×10⁵ cell/mL 농도의 세포를 96-well plate에 100 µL씩 분주한 후 시료(500 µg/mL) 20 µL와 LPS(2 µg/mL)를 첨가하여 다시 44 시간 배양하였다. 대조군은 B세포 mitogen인 LPS만 처리하였다.

Choi 등(30)의 방법에 따라 배양 후 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co.] 용액을 DPBS에 5 mg/mL의 농도로 희석하여 20 µL씩 각 well에 첨가하여 4시간 동안 재배양하였다. 재배양 후 0.1 N HCl에 용해시킨 10% SDS를 100 µL 넣어주고 암실에서 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 96-well plate를 ELISA reader(ELx808 BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대식세포의 nitric oxide(NO) 활성화 및 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 생성능 측정

대식세포로부터 생성되는 NO의 양을 측정하기 위해서 96-well plate에 대식세포를 1×10⁶ cells/mL를 100 µL씩 각 well에 분주하고 2시간 동안 전 배양을 하여 비부착 세포를 완전히 제거하였다. 500 µg/mL의 농도의 시료(500 µg/

mL)를 각 well에 20 µL씩 더하였고, 동시에 대식세포를 활성화시키는 LPS를 2 µg/mL 넣고 37°C, 5.0% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군은 대식세포를 활성화시키는 LPS만 처리하였다.

시료의 NO 생성 저해 활성은 Nitrite Assay(30)를 사용하여 측정하였다. 즉 배양된 세포에 배지 100 µL와 Griess reagent 시약 100 µL를 혼합하여 570 nm에서 ELISA reader(BioTek Instruments)를 사용하여 측정하였다. 배양한 후에 생성된 NO는 Griess법으로 측정하였다.

TNF-α는 상업적 human TNF-α ELISA kit(Amersham Biosciences, Glattbrugg, Switzerland)을 사용하여 Amersham Biosciences사에서 제공한 제품 사용설명서에 따라 측정하였다. 즉 TNF-α ELISA kit에서 제공하는 희석용액 50 µL를 96-well plate에 분주한 후 배양액 시료 또는 제공된 표준용액을 각각 50 µL씩 첨가하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응액을 제거한 후 washing buffer로 세척하였다. 측정하고자 하는 항체를 plate에 각각 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 세척한 다음 enzyme working reagent를 넣어 30분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 substrate solution으로 실온에서 발색시킨 다음 stop solution을 넣어 발색반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

실험 결과의 통계처리는 SPSS ver 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균값을 분산분석(one-way ANOVA test) 후 Duncan의 다중검정법으로 P<0.05 수준에서 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

쌀, 보리 및 울무 추출물의 면역 활성화

태음인(Taeumin), 소양인(Soyangin) 그리고 소음인(Soemin) 혈액에서 분리한 면역세포에 쌀(백미; milled rice), 보리(barley) 및 울무(Job's tears) 추출물을 처리하였을 때 면역 활성화에 미치는 영향력은 Fig. 1과 같다.

태음인과 소음인 혈액에서 분리한 림프구에 쌀, 보리 그리고 울무 추출물을 처리했을 때 보리와 울무 추출물보다 쌀 추출물 처리에 의해 더 효과적으로 림프구 증식율이 증가하였으나, 소양인에서 분리한 림프구에서는 보리 추출물이 쌀과 울무 추출물 처리군보다 더 높은 림프구 증식율을 나타내었다(Fig. 1A). NO 생성과 TNF-α의 단백질 생성량도 세포 생존율과 유사한 경향을 나타냈으나 소음인에서 분리한 대식세포의 경우 쌀과 울무 추출물 처리군은 NO 생성량이 비슷한 수준으로 증가하였고 보리 추출물보다 높았다. 그리고 TNF-α의 단백질 생성량은 태음인에서 분리한 대식세포에 쌀과 울무 추출물을 처리한 군은 비슷하게 증가하였으나 보리 추출물 처리군보다 높았다. 소음인의 혈액으로부터 분리한 대식세포는 3가지 추출물들 중 울무 추출물 처리에 의

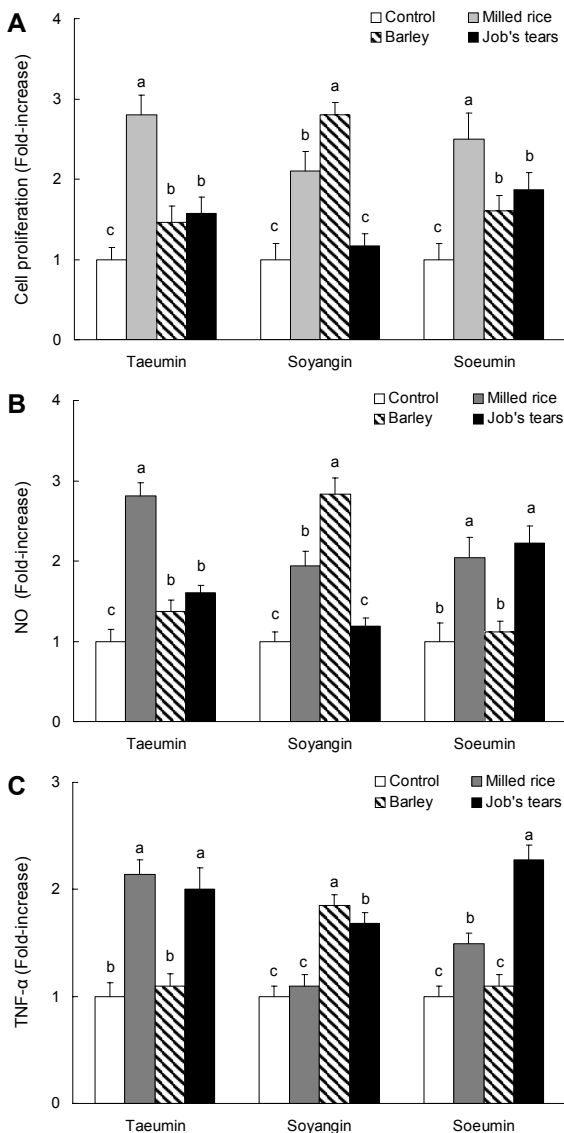


Fig. 1. Effects of 70% ethanol extracts from milled rice, barley, and Job's tears on cell proliferation, NO and TNF- α protein of lymphocytes or macrophages isolated from the blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin volunteers. The increase of immunostimulatory activities in the treated cells was calculated as the ratio of the corresponding mean value of the control cells. Values are mean \pm standard deviation (n=6~9). Mean values with different letters (a-c) on the bars in the same constitution are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

해 가장 높은 TNF- α 의 단백질 생성량을 나타내었다.

태음인은 세 가지 곡류 추출물들과 비교하여 쌀 추출물 처리에 의해 면역 활성이 가장 높게 증가하였고, 소음인은 세포 생존율 결과를 제외하고 울무 추출물에 의해 면역 활성이 가장 높게 증가하였으며, 소양인은 보리 추출물 처리에 의해 면역 활성이 가장 높게 증가하였다. 따라서 쌀은 태음인의 면역 활성에 좋은 곡류이고 울무는 소음인 그리고 보리는 소양인에게 좋은 곡류인 것으로 생각된다.

면역 활성의 개인적 차이가 고려되어야 한다는 최근 연구

보고(30)는 1984년 동무 이제마 선생이 도입한 사상의학과 비슷한 맥락에 있다. 사상의학은 한국 고유의 전통체질의학으로 사람의 체질은 어떤 약물이나 외부자극에 의하여 개개인마다 차이가 있으므로 질병의 치료는 각 개인의 특성에 맞추어 해석해야 한다는 개념을 지니고 있다(31). 사상의학에서는 사람들은 각 개인의 체격, 얼굴형태, 성격, 정서 및 약물에 대한 반응성 등의 차이에 의해 4가지 체질 즉 태양인, 태음인, 소음인, 소양인으로 분류하며 이들 각 체질마다 약에 대한 효과가 다르기 때문에 체질마다 처방하는 약을 다르게 하였고(32), 체질에 맞는 약을 섭취하였을 때 체질이 맞지 않는 사람이 섭취했을 때보다 면역 활성이 증가하여 질병이 예방되거나 치료가 되는 것으로 알려져 있다(30). 따라서 체질에 따른 체질 맞춤형 건강기능성식품 개발은 최상의 건강기능성 효과를 얻을 수 있는 식품 개발 형태가 될 수 있을 것으로 판단되어 본 연구에서는 사상의학 개념을 도입하였다. 그리고 태음인, 소양인 및 소음인 지원자의 혈액에서 얻은 면역세포 모델이 체질 특이성을 그대로 가지고 있다는 연구보고들(30,33)에 의해 본 연구에서도 태음인, 소양인 및 소음인 지원자의 혈액에서 얻은 세포 모델을 사용하였다. 본 연구에서 사상체질 중에서 태양인을 제외한 태음인, 소양인 그리고 소음인 그룹뿐인 것은 태양인은 한국인의 전체 인구의 0.03~0.10%로 낮은 분포를 보여주고 있고(30), 본 연구 지원자들 중 정확한 태양인 체질을 가진 지원자는 없었으므로 본 연구에서 태양인은 제외되었다.

면역세포가 자극되면 자신을 방어하기 위하여 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines; IL-6, TNF- α 등) 및 전염증성 매개체(pro-inflammatory mediators; iNOS, NO 등) 등을 분비하고 이들 물질들은 면역반응 과정 동안 활성화된 림프구와 대식세포 사이의 신호전달에 대한 중요한 역할을 한다(30). 따라서 천연소재의 면역 활성을 알아보기 위해 면역세포(림프구, 대식세포 등)의 세포 생존율 증가, TNF- α 단백질 분비 증가, NO 생성량 증가 등의 지표를 사용하고 있다(30).

Choi와 Oh(34)의 보고에 의하면 쌀(백미)은 태음인과 소음인의 면역세포 증식율을 다른 곡류와 비교하여 유의적으로 증가시켰고 보리는 소양인의 면역세포 증식율을 다른 곡류와 비교하여 더 높게 증가시켰는데 이와 같은 결과들은 본 연구 결과와 일치하였다.

콩, 팥 및 차조 추출물의 면역 활성

태음인, 소양인 그리고 소음인 혈액에서 분리한 면역세포에 콩(노란콩; soybean), 팥(adzuki bean) 및 차조(millet) 추출물 처리에 의한 면역 활성에 미치는 영향력을 알아 본 결과, 태음인과 소음인의 혈액에서 분리한 림프구에서 팥과 차조 추출물 처리가 콩 추출물보다 세포 생존율이 더 증가하였으나 콩과 팥 추출물은 통계학적 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 2A). 콩 추출물 처리는 소양인의 세포 생존율이 태음인과 소음인보다 높았다(Fig. 2A). 태음인, 소양인 그리

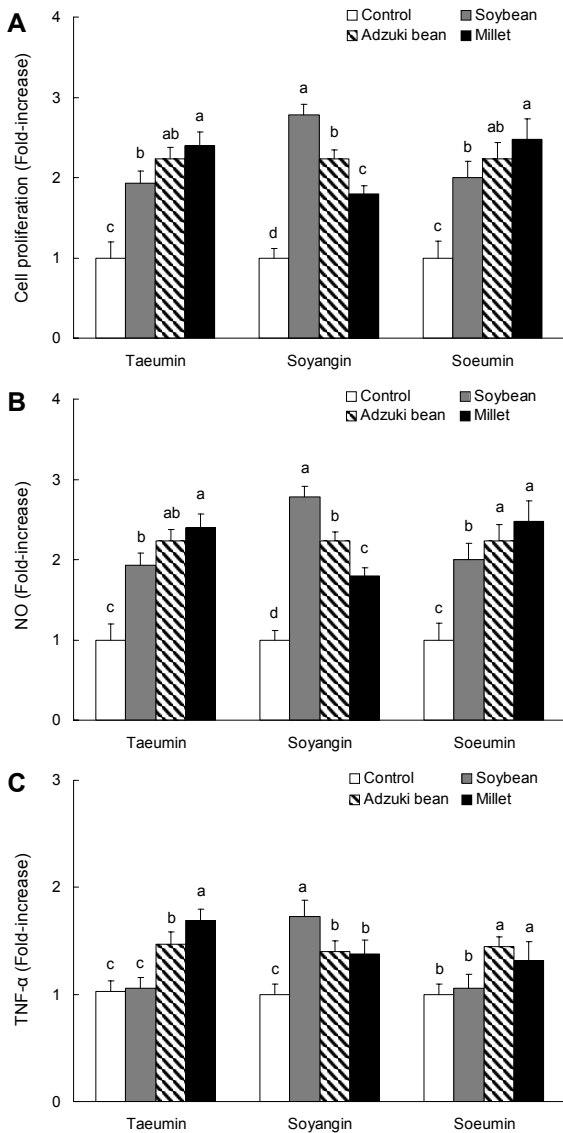


Fig. 2. Effects of 70% ethanol extracts from soybean, adzuki bean, and millet on cell proliferation, NO and TNF- α protein of lymphocytes or macrophages isolated from the blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin volunteers. The increase of immunostimulatory activities in the treated cells was calculated as the ratio of the corresponding mean value of the control cells. Values are mean \pm standard deviation (n=6~9). Mean values with different letters (a-d) on the bars in the same constitution are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

고 소음인의 혈액에서 분리된 대식세포에 콩, 팥 그리고 차조 추출물 처리에 의한 NO 생성량과 TNF- α 단백질 생성량 변화는 세포 생존율의 변화와 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 2B, 2C).

태음인과 소음인의 혈액에서 분리한 면역세포는 팥 추출물과 차조 추출물 그리고 소양인의 혈액에서 분리한 면역세포는 콩 추출물이 다른 추출물보다 세포 생존율, NO 생성량 그리고 TNF- α 단백질 생성량이 높았다. 세포 증식율, NO 생성을 증가 및 TNF- α 단백질 수준 증가를 결과를 종합하

여 보면, 태음인과 소음인의 면역 활성을 위해서는 3가지 추출물들 중 팥과 차조 섭취가 좋고, 소양인에게 좋은 음식은 콩이라는 것을 알 수 있었다.

Purev 등(33)과 Choi와 Oh(34)의 연구보고에 의하면 식품의 종류에 따라 개인적 면역 활성화의 차이와 체질별 면역 활성화의 차이가 있다고 하였는데 본 연구 결과와 유사하였다. 콩을 주원료로 한 발효식품인 간장에서 분리한 다당은 IgA 함량과 IL-6 증가에 의해 장관면역증진 효과가 있는 것으로 보고되었고(35), Lee 등(36)은 된장의 면역반응으로 위장관도에서 T-림프구의 강한 면역반응과 공장과 결장에서 NO 생성에 관련하는 NOS의 변화를 알아보았다.

가지, 무 및 당근 추출물의 면역 활성화

Fig. 3은 태음인, 소양인 그리고 소음인 혈액에서 분리한 면역세포(림프구, 대식세포)에 가지(eggplants), 무(radish) 및 당근(carrot) 추출물 처리에 의한 면역 활성화에 미치는 영향력을 나타낸 것이다. 태음인과 소음인의 혈액에서 분리된 림프구에 무와 당근 추출물을 처리하면 가지 추출물 처리보다 더 높은 세포 증식율을 나타내었고, 소양인은 가지와 무 추출물이 당근 추출물보다 림프구 증식율을 더 증가시켰다(Fig. 3A). 가지, 무 그리고 당근 추출물을 태음인, 소양인 그리고 소음인의 혈액에서 분리된 대식세포에 처리하여 NO 생성량과 TNF- α 단백질 생성량을 알아본 결과 세포 증식율과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 3B, 3C). 즉 태음인과 소음인은 무와 당근 추출물을 처리한 군이 가지 추출물 처리군보다 더 효과적으로 NO와 TNF- α 단백질 생성량을 증가시켰고, 소양인의 혈액에서 분리된 대식세포에 가지와 무 추출물을 각각 처리한 군은 당근 추출물 처리군보다 NO와 TNF- α 단백질 생성량이 높았다. 따라서 가지는 태음인과 소음인보다는 소양인에게 좋은 음식이고 당근은 태음인과 소음인 같은 음인에게 좋은 음식이며, 무는 체질과 상관없이 모든 사람들에게 좋은 음식인 것으로 생각된다.

마늘과 흑마늘 연구에서 마늘과 흑마늘은 림프구의 세포 증식율 증가 및 대식세포의 NO와 TNF- α 단백질 생성량을 증가에 의해 면역 활성을 증가시켰다(33). 또한 마늘은 체질에 영향을 나타내지만 흑마늘은 체질과 관계없이 모든 사람들에게 유익한 음식이라 보고한 연구 결과(33)는 본 연구에서 체질에 영향을 주는 음식과 체질에 상관없이 모든 체질에 유익한 음식이 있다는 결과와 유사하였다.

표고, 양송이 및 목이버섯 추출물의 면역 활성화

태음인, 소양인 그리고 소음인 혈액에서 분리한 면역세포(림프구, 대식세포)에 표고버섯(*Lentinus edodes*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 및 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*) 추출물 처리에 의한 면역 활성화에 미치는 영향력을 알아본 결과(Fig. 4), 표고버섯과 목이버섯 추출물은 태음인과 소음인의 혈액에서 분리한 림프구의 세포 증식율을 소양인의 그것보다 높게 증가시켰으나, 소양인의 림프구의

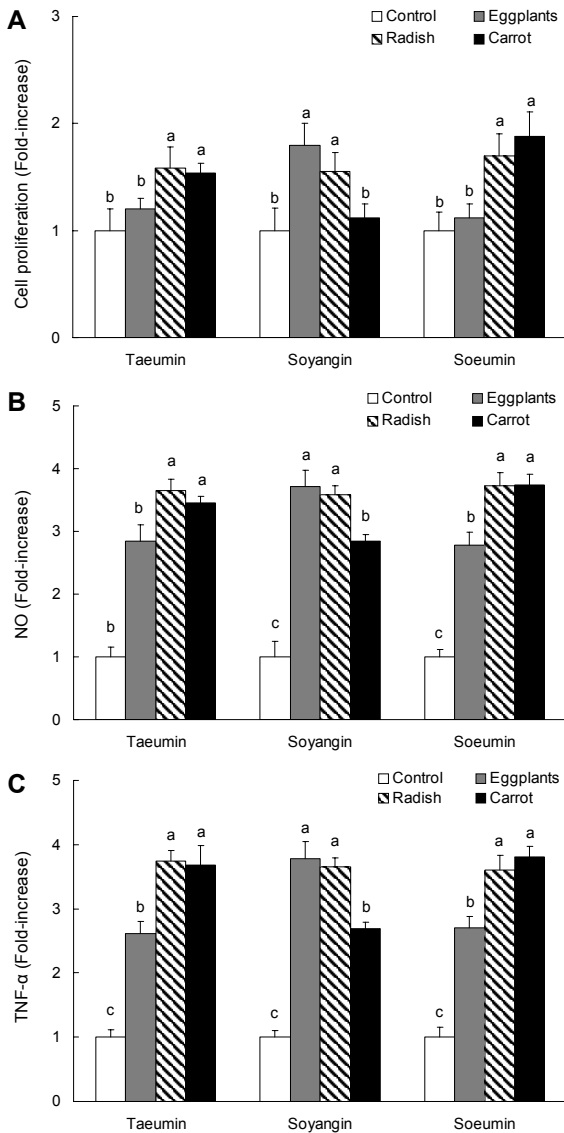


Fig. 3. Effects of 70% ethanol extracts from eggplants, radish, and carrot on cell proliferation, NO and TNF- α protein of lymphocytes or macrophages isolated from the blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin volunteers. The increase of immunostimulatory activities in the treated cells was calculated as the ratio of the corresponding mean value of the control cells. Values are mean \pm standard deviation (n=6~9). Mean values with different letters (a-c) on the bars in the same constitution are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

세포 증식율은 양송이버섯 추출물 처리에 의해 가장 높게 증가하였다(Fig. 4A). NO 생성량 및 TNF- α 단백질 생성량 증가를 알아보기 위해서는 이들 추출물을 태음인, 소양인 그리고 소음인의 혈액에서 분리된 대식세포에 처리한 결과 세포 생존율과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 4B, 4C).

표고버섯과 목이버섯 추출물 처리군은 세포 증식율, NO 생성량 및 TNF- α 단백질 생성량이 소양인에서 분리된 면역세포에서보다 태음인과 소음인에서 분리한 면역세포에서 더 높이 증가되었고, 소양인의 면역세포에 양송이버섯 추출

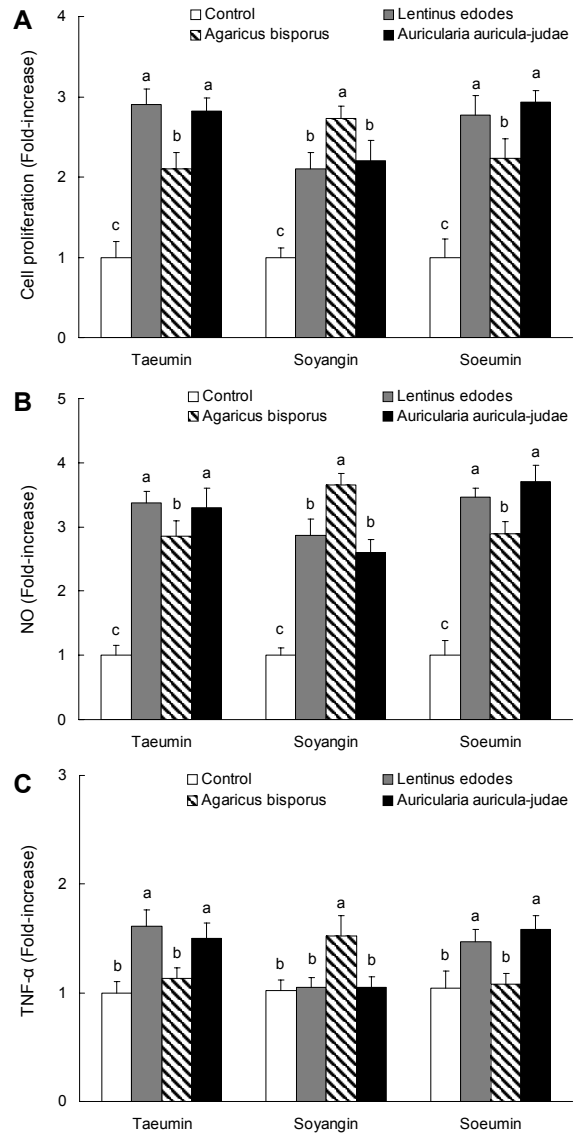


Fig. 4. Effects of 70% ethanol extracts from *Lentinus edodes*, *Agaricus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae* on cell proliferation, NO and TNF- α protein of lymphocytes or macrophages isolated from the blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin volunteers. The increase of immunostimulatory activities in the treated cells was calculated as the ratio of the corresponding mean value of the control cells. Values are mean \pm standard deviation (n=6~9). Mean values with different letters (a-c) on the bars in the same constitution are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

물을 처리했을 때 다른 체질에서 분리된 면역세포에 처리한 것보다 더 높았다(Fig. 4). 따라서 표고버섯과 목이버섯은 태음인과 소음인에게 좋은 음식이고 양송이버섯은 소양인에게 좋은 음식인 것으로 생각된다.

차가버섯으로부터 분리된 분획물의 장관면역 활성화 및 대식세포 활성을 알아본 결과 중성당과 소량의 산성당을 포함한 다당류가 면역 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(37). 따라서 표고, 양송이 및 목이버섯 추출물에 함유된 다당류의 종류들이 체질의 면역 차이에 관여할 수 있을 것이라 추정된다.

생식제품 개발을 위한 혼합 원료의 면역 활성

생식 원료의 연구 결과를 바탕으로 생식제품 개발을 위한 혼합 원료를 제조하였고 이들 혼합 원료의 면역 활성을 알아보았다. 즉 태음인, 소양인 그리고 소음인 혈액에서 분리한 면역세포(림프구, 대식세포)에 배합비 1~6(Mix 1~6) 추출물을 처리하여 세포 증식율, NO 생성량 및 TNF- α 단백질 생성량을 알아본 결과는 Fig. 5와 같다.

태음인의 혈액에서 분리된 림프구와 대식세포에 배합비 1~6의 추출물을 각각 처리한 결과 배합비 1과 2의 추출물이 다른 추출물보다 더 높은 림프구 증식율을 나타내었다.

대식세포에서 분리된 NO 생성량과 TNF- α 생성량도 배합비 1과 2의 추출물 처리군이 다른 처리군보다 높았다.

배합비 3과 4를 처리한 소양인의 혈액에서 분리된 림프구와 대식세포는 다른 처리군보다 림프구 증식율이 높았고, 대식세포의 NO 생성량과 TNF- α 단백질 생성량도 다른 처리군보다 배합비 3과 4 추출물 처리군에서 높았다.

소음인의 혈액에서 분리한 림프구와 대식세포에 배합비 1~6의 추출물을 각각 처리한 결과 배합비 5와 6이 다른 처리군보다 림프구 증식율, 대식세포의 NO 생성량과 TNF- α 단백질 생성량이 증가하였고, 특히 배합비 6 추출물 처리는 세포 증식율, NO 생성량과 TNF- α 단백질 생성량 모두 다른 처리군보다 유의적으로 증가하였다.

따라서 태음인의 면역력 증진을 위해서는 배합비 1(Mix 1: 쌀 70%, 팥 20%, 무 5%, 표고 5%)과 배합비 2(Mix 2: 쌀 60%, 팥 20%, 무 10%, 표고 10%)가 적당하고 특히 무와 표고버섯의 비율이 높은 배합비 2가 배합비 1보다 태음인의 면역 증진에 더 좋은 배합비로 판단된다. 소양인의 면역력 증진을 위해서는 배합비 3(Mix 3: 보리 70%, 콩 20%, 가지 5%, 양송이 5%)과 배합비 4(Mix 4: 보리 60%, 콩 20%, 가지 10%, 양송이 10%)가 적당하고 특히 가지와 양송이버섯 비율이 높은 배합비 4가 배합비 3보다 소양인의 면역 증진에 더 좋은 배합비로 판단된다. 소음인의 면역력 증진을 위해서는 배합비 5(Mix 5: 울무 70%, 팥 20%, 당근 5%, 목이 5%)와 배합비 6(Mix 6: 울무 60%, 팥 20%, 당근 10%, 목이 10%)이 적당하고 특히 당근과 목이버섯 비율이 높은 배합비 6이 배합비 5보다 소음인의 면역 증진에 더 좋은 배합비로 판단된다.

Seo 등(38)의 연구에서 고지방식이로 유도된 비만 마우스에게 옥수수수염, 팔삭, 표고버섯 및 청고추 혼합물을 섭취시켰을 때 몸무게 감소와 지방세포 크기가 감소되었으므로 이들 혼합물 섭취가 항비만 효과를 나타낸다고 보고하였다. Seo 등(38) 연구 결과와 본 연구 결과에서 최적 배합비에 의한 혼합물 섭취가 다양한 영양소 제공, 건강기능성 효과 상승, 맛의 상승 효과 등 다양한 장점을 제공할 수 있으므로 생식 개발을 위한 혼합비 연구는 생식의 상업화를 위해 반드시 필요한 연구라는 것을 알 수 있었다.

요 약

사상의학은 한국 고유의 전통 한의학으로 4가지 체질 즉 태양인, 태음인, 소음인, 소양인으로 분류한다. 새로운 기능성 생식제품을 개발하기 위하여 태음인(Taeumin), 소양인(Soyangin) 그리고 소음인(Soeumin)의 혈액으로부터 분리한 면역세포(림프구와 대식세포)를 이용하여 생식 원료(쌀, 보리, 울무, 콩, 팥, 차조, 가지, 무, 당근, 표고버섯, 양송이버섯, 목이버섯)와 생식제품의 면역 활성을 연구하였다. 생식 원료와 생식제품 추출물들을 처리한 면역세포에서 세포 증식율, NO와 TNF- α 의 증가를 면역 활성의 지표로 사용하여

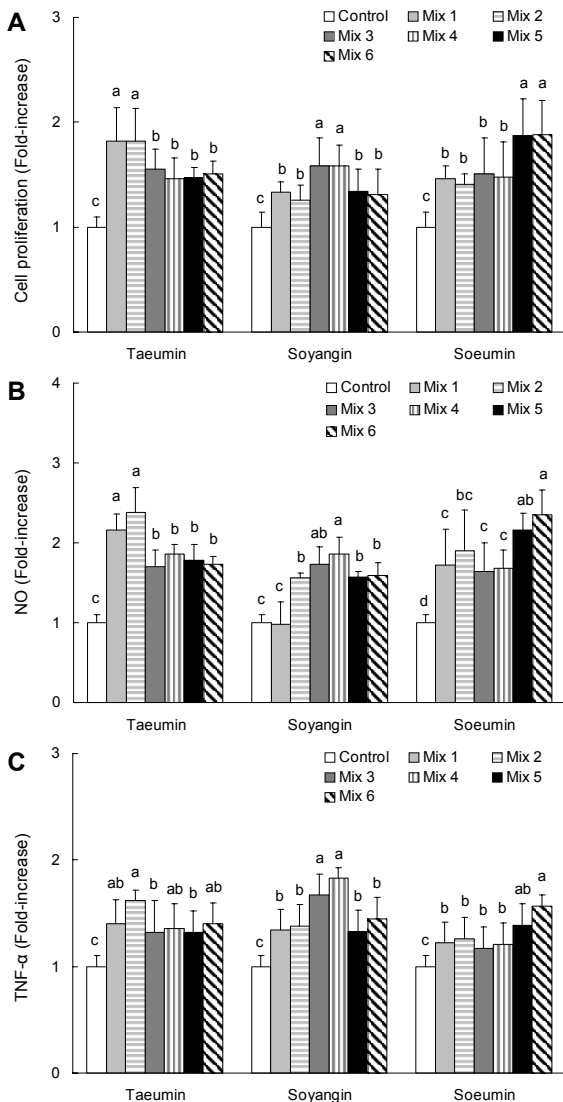


Fig. 5. Effects of 70% ethanol extracts from Mixture 1~6 (Mix 1~6) on cell proliferation, NO and TNF- α protein of lymphocytes or macrophages isolated from the blood of Taeumin, Soyangin, and Soeumin volunteers. The increase of immunostimulatory activities in the treated cells was calculated as the ratio of the corresponding mean value of the control cells. Values are mean \pm standard deviation (n=6~9). Mean values with different letters (a-c) on the bars in the same constitution are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test. Mix 1~6: See the Table 1.

다. 쌀(milled rice), 팥(adzuki bean), 무(radish) 그리고 표고버섯(*Lentinus edodes*)을 태음인을 위한 생식 원료로 선택하였고, 보리(barley), 콩(soybean), 가지(eggplants) 그리고 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 소양인을 위한 생식 원료로 선택하였으며, 울무(Job's tears), 팥(adzuki bean), 당근(carrot) 그리고 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)을 소음인을 위한 생식 원료로 선택하였다. 이러한 결과를 근거하여 생식제품 개발을 위하여 생식 원료의 종류와 배합비율을 달리하여 배합비 1~6(Mix 1~6)을 개발하였다. 태음인의 면역 활성은 배합비 1, 배합비 2, 배합비 3, 배합비 4, 배합비 5 또는 배합비 6 추출물을 처리한 면역세포 중에서 배합비 2(Mix 2; 쌀 60%, 팥 20%, 무 10%, 표고 10%) 추출물을 처리한 면역세포에서 가장 높았다. 소양인의 면역 활성은 6개의 배합비(Mix 1~6) 추출물 중에서 배합비 4(Mix 4: 보리 60%, 콩 20%, 가지 10%, 양송이 10%) 처리에 의해 최고로 높았다. 배합비 6(Mix 6: 울무 60%, 팥 20%, 당근 10%, 목이 10%)를 처리한 면역세포의 면역 활성 증가는 다른 5개의 추출물들(Mix 1~5)보다 높았다. 따라서 배합비 2, 4 그리고 6은 체질 맞춤형 면역 활성 생식제품을 위한 혼합물로 사용할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Kim GH, Park BG, Kim HN, Park JH, Park MS, Park JY, Song KB, Oh DH. 2012. Effect of microbial inhibition and change of chromaticity on the raw materials of Saengsik treated with slightly acidic electrolyzed water during storage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1830-1841.
- Kim DJ, Oh SK, Yoon MR, Chun AR, Choi IS, Lee DH, Lee JS, Yu KW, Kim YK. 2011. The change in biological activities of brown rice and germinated brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 781-789.
- Kim SY, Seo BY, Park EJ. 2013. The impact of cooking on the antioxidative and antigenotoxic effects of rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1370-1377.
- Kalra S, Jood S. 2000. Effect of dietary barley β -glucan on cholesterol and lipoprotein fractions in rats. *J Cereal Sci* 31: 141-145.
- Lee YH, Lee J, Im EJ, Jun W, Cho HY. 2009. Modulation of ethanol-induced P450 enzyme activity and antioxidant in mice by *Hordeum vulgare* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1347-1352.
- Park YJ, Lee YS. 1988. Effect of coix on plasma cholesterol and lipid metabolism in rats. *Korean J Nutr* 21: 88-98.
- Lee JE, Suh MH, Lee HG, Yang CB. 2002. Characteristics of Job's tear gruel by various mixing ratio, particle size and soaking time of Job's tear and rice flour. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 18: 193-199.
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. 2002. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132: 3577-3584.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* 21: 113-131.
- Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* 26: 63-70.
- Song SB, Ko JY, Kim JI, Lee JS, Jung TW, Kim KY, Kwak DY, Oh IS, Woo KS. 2013. Changes in physicochemical characteristics and antioxidant activity of adzuki bean and adzuki bean tea depending on the variety and roasting time. *Korean J Food Sci Technol* 45: 317-324.
- Chung KM. 2010. Physicochemical properties of millet starch varieties. *Korean J Food Sci Technol* 42: 115-118.
- Yoo TJ. 1976. *Food carte*. Pakmyusa, Seoul, Korea. p 124-126.
- Yoshikawa K, Inagaki K, Terashita T, Shishyama J, Kuo S, Shankel DM. 1996. Antimutagenic activity of extracts from Japanese eggplant. *Mutation Res* 371: 65-71.
- Samaru Y. 1989. Anticarcinogenic effects of green or yellow vegetable. *Japan Food Sci* 3: 76-81.
- Jo YN, Jeong HR, Jeong JH, Heo HJ. 2012. The skin protecting effects of ethanolic extracts of eggplant peels. *Korean J Food Sci Technol* 44: 94-99.
- Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T. 1991. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Res* 259: 399-410.
- Lee SH, Hwang IG, Lee YR, Joung EM, Jeong HS, Lee HB. 2009. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of heated radish (*Raphanus sativus* L.) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 490-495.
- Yoo JK, Lee JH, Cho HY, Kim JG. 2013. Change of antioxidant activities in carrots (*Daucus carota* var. *sativa*) with enzyme treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 262-267.
- Surenjav U, Zhang L, Xu X, Zhang X, Zeng F. 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans from different *Lentinus edodes*. *Carbohydr Polym* 63: 97-104.
- Yang BK, Kim DH, Jeong SC, Das S, Choi YS, Shin JS, Lee SC, Song CH. 2002. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 937-942.
- Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S. 1987. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 33: 341-346.
- Ng ML, Yap AT. 2002. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med* 8: 581-589.
- Kim H, You J, Jo Y, Lee Y, Park I, Park J, Jung MA, Kim YS, Kim S. 2013. Inhibitory effects of *Lentinus edodes* and rice with *Lentinus edodes* mycelium on diabetes and obesity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 175-181.
- Lee MR, Oh DS, Wee AJ, Yun BS, Jang SA, Sung CK. 2014. Anti-obesity effects of *Lentinus esodes* on obese mice induced by high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 194-199.
- Oh HS, Ham SS. 1992. Antimutagenic effects of enzymatic browning reaction products of polyphenol compounds by polyphenoloxidase derived from mushroom (*Agaricus bisporus*). *Korean J Food Sci Technol* 24: 341-346.
- Han MJ, Bae EA, Rhee YK, Kim DH. 1996. Effect of mushrooms on the growth of intestinal lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 28: 947-952.
- Chang JS, Kim HJ, Bae JT, Park SH, Lee SE, Kim OM, Lee KR. 1998. Inhibition effects of *Auricularia auricula-judae* methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo(a)pyrene-treated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 712-717.
- Ham SS, Kim DH, Choi KP, Lee DS. 1997. Antigenotoxic effects of methyl alcohol extracts from *Auricularia mesen-*

- terica* and *Gyrophora esculenta*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 57-62.
30. Choi JH, Chung MJ, Oh DH. 2012. Classification of Sasang constitutional body types using immunostimulatory activities of constitution-specific herbal extracts in human primary immune cells. *J Med Food* 15: 824-834.
 31. Cooper EL. 2009. Contribution of Sasang constitutional medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 1-3.
 32. Um JY, Joo JC, Kim KY, An NH, Lee KM, Kim HM. 2003. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and traditional Sasang classification in Koreans with cerebral infarction. *Hereditas* 138: 166-171.
 33. Purev U, Chung MJ, Oh DH. 2012. Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 651-660.
 34. Choi JH, Oh DH. 2009. Immunological effects of cereal extracts in four different constitutional types. *Korean J Food Sci Technol* 41: 572-577.
 35. Lee MS, Shin KS. 2014. Intestinal immune-modulating activities of polysaccharides isolated from commercial and traditional Korean soy sauces. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 9-15.
 36. Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS. 2011. Immunostimulatory effects of traditional Doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1227-1234.
 37. Baek GH, Jeong HS, Kim H, Yoon TJ, Suh HJ, Yu KW. 2012. Pharmacological activity of Chaga mushroom on extraction conditions and immunostimulating polysaccharide. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1378-1387.
 38. Seo DJ, Chung MJ, Kim DJ, Choe M. 2009. Antiobese effects of diet containing medicinal plant water extracts in high fat diet-induced obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1522-1527.