J Korean Soc Food Sci Nutr
46(9), 1061~1070(2017)

한국식품영양과학회지
https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.9.1061

가압증숙공정에 의한 산수유의 이화학적 특성 및 과산화수소에 의해 유도된 산화적 L132 세포 사멸에 대한 보호 효과

박혜미 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Physicochemical Properties and Protective Effects of *Corni fructus* Treated with Pressurized-Steam against H_2O_2-Induced Cytotoxicity on L132 Cells

Hye-Mi Park and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT This study examined the physicochemical properties and protective effects of *Corni fructus* treated with pressurized-steam (through 121°C, 1.2 kgf/cm^2, 0.5 h, 1 h, 2 h, and 3 h) against H_2O_2-induced cytotoxicity on L132 cells. The color values of the untreated *Corni fructus* powder were higher than those of *Corni fructus* after the pressurized-steam treatment (PSC), and those of PSC improved with a decrease in treatment time. At the observation by pressurized-steam treatment for more than 2 h, the color was changed to black, and its gloss was lost. The major constituents in PSC (2 hours) were the total sugar (468.53 mg/g), reducing sugar (385.55 mg/g), and total phenol (37.32 mg/g), respectively. The main components in the free sugars of PSC (2 h) were fructose, glucose, and sucrose, at 207.72 mg/g, 219.40 mg/g, and 4.31 mg/g, respectively. The gallic acid in the phenol compounds and 5-(hydroxymethyl) furfural in the furan compounds of PSC (2 h) improved with increasing treatment time. The main components in iridoid glycoside of PSC (2 h) were morroniside, loganin, and lognic acid, which improved with decreasing treatment time. The L132 cell growth inhibition activities of all the extracts were significantly higher than that of the control. The protective effects against the H_2O_2-induced cytotoxicity on L132 cells of PSC (2 h) was 102.82% (at 1,000 μg/mL) higher than those of the other extracts. This suggests that *Corni fructus* by PSC is useful for functional food materials in the food industry.

Key words: *Corni fructus*, 5-(hydroxymethyl)furfural, iridoid glycoside, physicochemical property, protective effect

서 론

산화적 세포 사멸은 생체 내 항산화 및 산화 시스템의 불균형으로 정의되는 현상으로 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적이 증가하여 발생하게 된다고 알려져 있다(1,2). 활성산소는 인체 내 산화방지제에 의해 유리기가 제거되어 산화-산화방지의 균형을 유지함으로써 DNA 손상, 단백질 변형 및 지방질과산화를 예방한다(3,4). 하지만 과도한 활성산소종의 생성은 정상적인 세포의 손상, 세포 사멸, 세포 괴사의 원인이 되고, 암, 관절염, 만성염증, 당뇨병, 폐질환, 뇌졸중 등과 같은 노화의 다양한 질환에 관여한다(1,5). 특히 산화적 세포 손상은 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)를 포함한 비자유 라디칼뿐만 아니라 초과산화 음이온(superoxide anion, O_2^-)과 같은 자유라디칼을 포함하는 활성산소종에 의해 매개되는데(2), 인체 내 DNA, 단백질 및 지질과 같은 다양한 생물학적 고분자를 공격하여 세포 기능을 파괴하여 세포 사멸을 초래한다(6,7). 이러한 산화적 세포 사멸은 산화방지제를 섭취함으로써 감소할 수 있으며, 산화방지제 중에서도 천연물의 미량 원소 중 폴리페놀성 화합물 유래 항산화제가 질환의 예방 및 치료 개선에 도움을 주는 소재로 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(8).

산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis*)의 과육으로, 열매의 씨를 제거하여 건조한 과육을 산수유라 한다(9). 예로부터 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 등에서 중요한 한약재로 많이 사용되어 왔으며(10), 보고된 산수유의 주요성분으로는 gallic acid, malic acid, ursolic acid와 morroniside, loganin, sweroside와 같은 iridoid 배당체 등이 있다(11). 일반적으로 식품에 있어 열처리 가공은 식품 또는 생약재의 독성 및 부작용 경감, 저장수명 연장, 성분 변화 및 약효의 증강과 맛, 향, 색과 같은 식품의 관능적 품질 개선을 목적으로 이루어졌으나(12), 영양소 파괴 및 활성 물질의 손실 등이 열처리 가공

Received 26 May 2017; Accepted 10 August 2017
Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 38430, Korea
E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

의 문제점으로 지적되고 있다(13). 그러나 최근 표고버섯, 감초, 마늘, 귤피 등을 고온에서 가압 처리 시 페놀화합물 및 항산화 활성이 증가되었다는 연구결과가 보고되고 있으며(13), 이는 식품에 열처리 시 다양한 화학적 변화가 발생한다고 판단된다. 최근 소비자들은 식품을 단순히 영양만을 고려하는 1차적 기능의 식품 소비보다는 새로운 가공기술을 접목한 기능성을 함유하는 식품을 구입하는 것으로 식품 소비 트렌드가 바뀌고 있는데(14), 그로 인해 열처리, 증숙, 초고압, 저온고압 공정 등의 새로운 가공기술에 대한 연구가 지속해서 진행되고 있다. 일반적으로 가열, 데치기와 같은 열처리 공정은 조직성분을 연소시키며 활성성분이 파괴되어 수율 및 생리활성을 함께 감소하게 하는 단점이 있으며, 이러한 단점을 극복하기 위해 직접적 열처리가 아닌 증기를 이용한 간접적 열처리로 유용성분의 용출을 증진시킬 수 있는 증숙공정이 이용되고 있다(14). 증숙공정은 증기를 이용하여 구성성분의 변화를 야기해 새로운 화합물을 만들어 내거나 고분자 화합물을 분해해 저분자물질을 생성하며, 조직을 파괴하여 유용성분 용출을 극대화하는 공정으로 알려져 있는데(15), 반복적인 증숙공정으로 처리 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다(16). 초고압 및 저온고압 공정은 단시간에 최소 처리하여 식품을 생산하는 방법으로 식품의 영양성분, 맛, 향기, 비타민 함량 등의 손실을 줄일 수 있는 장점이 있으나(17), 과한 처리 시 탄화가 일어나 활성성분이 파괴되는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 가압상의 증숙공정을 이용하여 전통적인 기존 증숙공정과 비교함으로써 가압증숙공정에 따른 산수유의 이화학적 품질특성 변화를 모니터링 하였고, 폐 표피세포 보호 효과에 대해 알아보기 위하여 인간유래 L132 세포주를 이용하여 과산화수소로 유도된 산화 스트레스 모델에서 가압증숙 산수유 추출물의 세포 사멸 억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 산수유(*Corni fructus*)는 경상북도 의성군에서 2016년도에 생산하여 씨를 제거한 뒤 건조한 것을 의성농산영농조합법인에서 구입하여 50°C에서 24시간 동안 열풍 건조하여 수분 함량을 10%로 조정한 후 증숙 처리에 사용하였다.

가압증숙 산수유의 제조

가압증숙 산수유의 제조는 산수유 열매 100 g을 증류수 200 mL에 1시간 동안 수침하여 물기를 제거하고 121°C, 1.2기압에서 각각 30분, 1시간, 2시간 및 3시간 동안 증숙하였다. 대조군인 일반증숙 산수유의 제조는 산수유 열매 100 g을 증류수 200 mL에 1시간 동안 수침하여 물기를 제거하고 가정용 스팀 솥을 이용하여 100°C에서 3시간 동안 증숙하여 비교하였다. 일반증숙 및 가압증숙한 산수유를 50°C에서 12시간 동안 열풍 건조하여 수분 함량을 10% 이하로 조정한 후, 폴리에틸렌 백에 밀봉 포장하여 4°C에서 냉장 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

추출물의 제조는 무처리 산수유, 일반증숙 산수유 및 가압증숙 산수유를 분쇄속도 25,000 rpm의 고속분쇄기(Lab use grinder RT-04, Mill Powder Tech Co., Ltd., Tainan City, Taiwan)로 분쇄한 다음 분말시료 15 g에 80% 에탄올을 20배 첨가하여 80°C에서 3시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 각각의 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 여과지(No. 1, Whatman International Ltd., Leicestershire, UK)를 이용하여 여과시킨 후, 감압농축기(N-1N, Eyela Co.)로 농축한 다음 동결건조기(Free Zone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)로 건조하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

분말의 색도 측정

가압증숙 산수유 분말의 색도는 색도계(Chromameter CR-400, Minolta Co., Osaka, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 색도는 Hunter's value인 L값(lightness, 명도), a값(redness, 적색도) 및 b값(yellowness, 황색도)으로 하였고, 색차(ΔE)는 초기 색도를 대조구로 하여 아래의 계산식에 의하여 산출하였다. 사용한 표준색도는 Y=86.6, x=0.3160, y=0.3214였으며 3회 반복하여 얻은 평균값과 표준편차로 나타내었다.

$$\triangle E = \sqrt{(L_i - L_t)^2 + (a_i - a_t)^2 + (b_i - b_t)^2}$$

i = initial, t = test

수율, 총 당, 환원당 및 총 페놀 함량 측정

가압증숙 산수유 추출물의 수율은 동결건조 한 다음 건물중량을 구하였고 추출물 제조에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다. 총 당 함량 측정은 phenol-sulfuric acid 법(18)에 따라 100 μg/mL 농도로 희석한 시료 1 mL에 5% phenol 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응시킨 후 94% H_2SO_4 5 mL를 첨가하고 실온에서 20분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 당 함량은 glucose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다. 환원당 함량 측정은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma-Aldrich Co.) 법(19)에 따라 제조된 DNS 용액 1.5 mL에 시료 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 실온에서 냉각한 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 glucose(Sigma-

Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다. 총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(20)에 따라 100 μg/mL 농도로 희석한 시료 1 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응시킨 후 20% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co.)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

유리당 분석

가압증숙 산수유 추출물의 유리당 조성은 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 다음과 같이 분석하였다. 분석에는 Alliance HPLC system(Waters 2695, Waters Co., Milford, MA, USA)에 Hypersil GOLD Amino column(5 μm, 4.6 mm×150 mm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 35°C로 조절하여 사용하였고, 검출기는 Refractive index detector (Waters 2414, Waters Co.)로 검출하였다. 이동상은 80% acetonitrile 조건으로 유속은 0.6 mL/min, 시료주입량은 10 μL로 분석하였다. 유리당의 표준물질은 fructose, glucose 및 sucrose 3종을 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하여 사용하였고, 시료에 함유된 유리당의 정성과 정량은 standard chemicals의 retention time을 비교하여 분석하였다.

생리활성 화합물 분석

가압증숙 산수유 추출물의 생리활성 화합물(페놀화합물, furan계 화합물 및 iridoid 배당체) 조성은 HPLC를 이용하여 다음과 같이 분석하였다. 분석에는 Alliance HPLC system(Waters 2695, Waters Co.)에 XBridge™ C18 column(5 μm, 4.6 mm×250 mm, Waters Co.)을 25°C로 조절하여 사용하였고, 검출기는 photo diode detector(Waters 996, Waters Co.)로 240 nm에서 검출하였다. 이동상은 0.1% acetic acid : acetonitrile : methanol(85:10:5, v/v) 조건으로 유속은 0.5 mL/min, 시료주입량은 10 μL로 분석하였다. 생리활성 화합물의 표준물질은 페놀화합물 gallic acid 1종, furan계 화합물 5-(hydroxymethyl)furfural(5-HMF) 1종, iridoid 배당체 loganic acid, morroniside 및 loganin 3종으로 총 5종을 Sigma-Aldrich Co. 및 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(Chengdu, China)로부터 구입하여 사용하였고, 시료에 함유된 생리활성 화합물의 정성과 정량은 standard chemicals의 retention time과 고유의 스펙트럼을 비교하여 분석하였다.

세포 배양

Human lung alveolar epithelial cell인 L132(KCLB No. 10005) 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 세포배양은 DMEM 배지(Welgene, Daegu, Korea)를 이용하여 각각 10% fetal bovine serum(Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA), 2% penicillin-streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 37°C, 5% CO_2 incubator(MCO-18AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 2~3일마다 배지를 교체하면서 실험에 사용하였다.

세포 독성

가압증숙 산수유 추출물의 L132 세포의 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay 방법(21)을 사용하여 측정하였다. 배양된 세포주를 1×10^5 cell/mL로 96-well plate에 첨가하여 24시간 배양하고 10~1,000 μg/mL 농도로 제조한 시료를 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 10 μL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 생성된 formazan 결정이 흐트러지지 않게 배양액을 완전히 제거한 다음 각각의 well에 100 μL씩 dimethyl sulfoxide(DMSO, Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)를 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하여 상대적인 백분율로 나타내었다.

과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 세포 보호 효과

가압증숙 산수유 추출물의 L132 세포 보호 효과는 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 Hwang(22)의 방법에 따라 다음과 같이 MTT assay를 사용하여 측정하였다. 배양된 세포주를 1×10^5 cell/mL로 96-well plate에 첨가하여 24시간 배양하고 세포 내에 활성산소를 형성시키기 위해 1 mM H_2O_2와 10~100 μg/mL 농도로 제조한 시료를 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 10 μL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 생성된 formazan 결정이 흐트러지지 않게 배양액을 완전히 제거한 다음, 각각의 well에 100 μL씩 DMSO를 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 후 microplate reader(UVM-340, ASYS Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하여 상대적인 백분율로 나타내었다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복실험의 평균±표준편차로 나타내었고 SPSS(version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를

이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 각 측정 평균값의 유의성(P<0.05)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

가압증숙 산수유의 외형 및 색도 변화

가압증숙 처리조건에 따른 산수유의 색도를 나타낸 결과는 Table 1과 같다. 색도에서 명도를 나타내는 L값은 무처리 산수유 분말에서 42.75로 가장 높게 나타났으며, 대조군에 비해 가압증숙 시간이 증가할수록 L값은 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 가압증숙 과정 중 L값의 경우 초기 37.41에서 1시간에서 34.87, 2시간에서 34.36으로 변화가 나타났으며, 특히 3시간 동안 가압증숙한 산수유 분말에서 32.68로 가장 낮게 나타났다. 적색도(a값) 및 황색도(b값) 역시 이와 유사한 경향을 나타내었는데, a값은 1.99~7.53으로 특히 3시간 동안 가압증숙 시 무처리군(11.74)보다 5.9배 감소하였으며, 황색도인 b값은 7.98에서 1.50으로 5.3배 감소하였다. 이때의 외형을 살펴보면(Fig. 1) 전반적으로 가압증숙 시간이 길어짐에 따라 외관적으로 터짐이나 갈라짐 현상은 나타나지 않았으나, 2시간 이상 처리 시에는 색이 검게 변하고 광택이 없어지는 경향을 나타내었다. 이는 Kim 등(13)의 연구결과에서 홍삼의 고온고압 처리 시간이 길어질수록 L값이 감소하고, 30분 이상 증자처리 시 지속해서 a값 및 b값이 낮아지는 것과 일치하는 결과였다. 산수유의 가압증숙 시 낮은 적색도 및 낮은 황색도를 나타내어, 열에 의해 시료 자체 내에 당 성분과 기타 성분과의 화학적 반응으로 산수유의 색상에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이러한 반응은 Maillard 반응에 의한 갈색물질인 멜라노이딘을 형성하였기 때문이라고 판단되며(23), 이는 식품의 갈색화와 향기 성분 생성에 영향을 줄 뿐만 아니라 지질의 산화율을 낮추고 라디칼 소거 활성이 높아 항산화 능력이 높은 것으로 알려져 있다(24).

가압증숙 산수유 추출물의 이화학적 특성 변화

일반적으로 식품에 있어 고온고압의 열처리 가공은 영양소 파괴 및 활성 물질 손실 등의 문제점들이 발생되어 제한적으로 사용되고 있다. 그러나 최근 연구에서는 과일 및 채

Table 1. Color of *Corni fructus* powders treated with pressurized-steam

Treatment[1)]		Color			
		L value	a value	b value	ΔE
UC		42.75±0.24[a2)]	11.74±0.12[a]	7.98±0.06[a]	−
SC		37.50±0.14[b]	6.14±0.10[c]	5.60±0.15[c]	8.03±0.18[d]
PSC	0.5 h	37.41±0.37[b]	7.53±0.37[b]	6.62±0.36[b]	6.94±0.54[e]
	1 h	34.87±0.36[c]	4.64±0.24[d]	3.85±0.29[d]	11.38±0.50[c]
	2 h	34.36±0.14[c]	3.52±0.02[e]	3.13±0.07[e]	12.71±0.12[b]
	3 h	32.68±0.04[d]	1.99±0.10[f]	1.50±0.11[f]	15.44±0.10[a]

[1)]UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C.
[2)]Mean±SD (n=3). Means with different letters (a-f) within each column are significantly different (P<0.05).

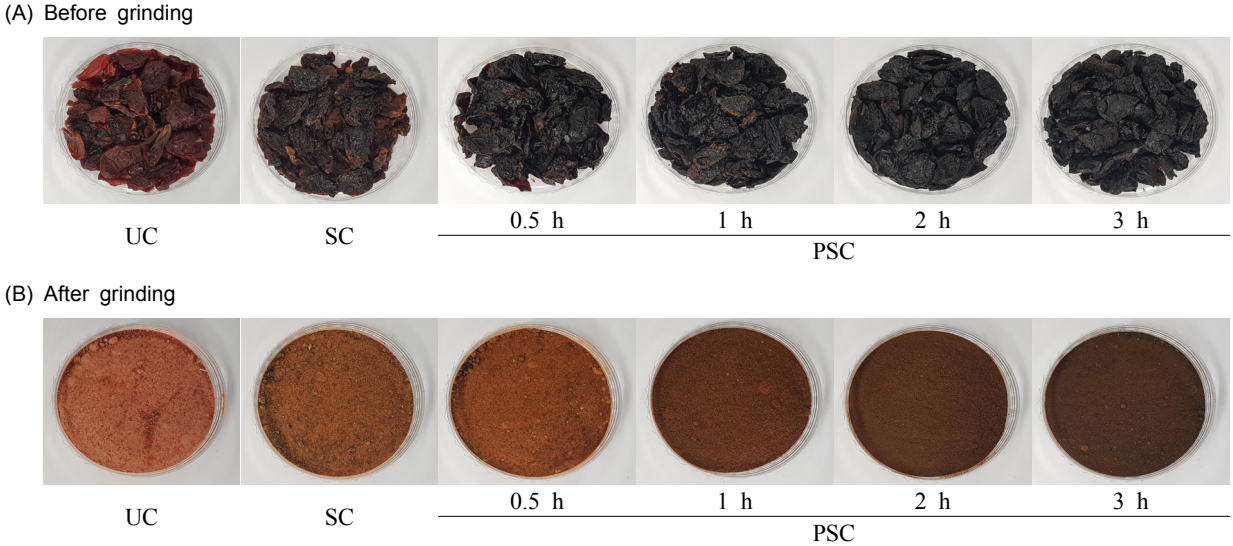


Fig. 1. Observation of *Corni fructus* powders by pressurized-steam treatment. UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C.

Table 2. Yield, total sugar, reducing sugar, and total phenol contents of *Corni fructus* extracts treated with pressurized-steam

Treatment[1)]		Yield (dry basis, %)	Total sugar (glucose, mg/g)	Reducing sugar (glucose, mg/g)	Total phenol (gallic acid, mg/g)
UC		55.09	462.97±9.09[a2)]	458.20±3.47[a]	31.84±0.12[d]
SC		48.82	439.02±8.31[c]	414.32±7.29[c]	38.69±0.25[a]
PSC	0.5 h	54.22	446.04±11.99[bc]	442.10±3.57[b]	35.88±0.11[c]
	1 h	53.09	457.07±5.09[ab]	431.26±7.98[b]	35.97±0.18[c]
	2 h	51.36	468.53±6.38[a]	385.55±11.56[d]	37.32±0.46[b]
	3 h	50.89	468.89±6.46[a]	340.71±2.55[e]	35.52±0.27[c]

[1)]UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C.
[2)]Mean±SD (n=3). Means with different letters (a-e) within each column are significantly different (P<0.05).

소류 등을 고온에서 건열 또는 습열처리하는 경우 체내 성분들의 화학적 변환이 일어나면서 생리활성 물질의 증가 및 새로운 물질이 생성된다고 보고되고 있다(25,26). 가압증숙 처리조건에 따른 산수유 추출물의 이화학적 특성 변화를 나타낸 결과는 Table 2와 같다. 총 당 함량은 일반증숙(439.02 mg/g) 및 30분 동안 가압증숙(446.04 mg/g) 시 낮아지는 경향을 나타내었으나, 가압증숙 시간이 1시간에서 3시간으로 증가할수록 총 당 함량이 각각 457.07 mg/g, 468.53 mg/g 및 468.89 mg/g으로 무처리군(462.97 mg/g)과 유사한 함량까지 높아짐을 확인하였다. 환원당 함량은 무처리군(458.20 mg/g)에 비하여 가압증숙 산수유 추출물이 340.71~442.10 mg/g으로 유의적으로 낮은 함량을 나타내었으며(P<0.05), 가압증숙 시간이 증가할수록 환원당 함량이 낮아지는 것을 확인하였다. 이와 같이 가압증숙 시간이 증가할수록 총 당은 증가하였으나 환원당 함량이 낮아지는 결과는 가압증숙공정에 의해 생성된 환원당이 Maillard 반응에 의해 중간생성물인 5-HMF를 생성하고, 반응에 소모된 만큼의 환원당이 감소하였기 때문이라 판단된다(23). 총 페놀 함량은 무처리 산수유의 31.84 mg/g에서 30분 가압증숙 시 35.88 mg/g, 1시간에서 35.97 mg/g, 2시간에서 37.32 mg/g으로 전반적으로 가압증숙 시간이 증가함에 따라 증가하다가 3시간 증숙 시에는 35.52 mg/g으로 총 페놀 함량이 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 고온고압 처리한 과일, 채소류 및 지황 등을 이용한 연구결과에서 처리 온도가 증가할수록 총 페놀 함량이 증가한 결과와 유사하였으며(27-29), 이는 결합형 폴리페놀이 고온고압의 열처리로 인해 유리형으로 전환되고, 고분자에서 저분자 페놀화합물로 전환되어 총 페놀 함량이 증가하기 때문인 것으로 생각된다(30).

가압증숙 산수유 추출물의 유리당 및 생리활성 화합물 함량 변화

가압증숙 처리조건에 따른 산수유 추출물의 유리당 및 생리활성 화합물 함량 변화를 나타낸 결과는 Table 3 및 Table 4와 같다. 유리당 함량은 무처리 산수유에서 fructose, glucose 및 sucrose가 각각 346.17 mg/g, 265.97 mg/g 및 8.06 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었다. 일반증숙 및 가압증숙 산수유 추출물 모두 무처리군보다 낮은 유리당 함량을 나타내었으며, 가압증숙 시간이 증가할수록 유리당 함량이 낮아지는 것을 확인하였다. 특히 3시간 동안 가압증숙 시 fructose 및 glucose가 각각 175.05 mg/g 및 206.92 mg/g으로 무처리군보다 각각 0.5배 및 0.8배 감소하였으며, 총 유리당 함량 또한 무처리군(620.20 mg/g)보다 0.6배인 386.07 mg/g으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 이당류인 sucrose가 단당류인 fructose로 분해되고 분해된 fructose가 지속적인 열분해로 인하여 HMF, furfural 및 5-methyl furfural 등으로 분해되기 때문이라 생각되는데(31), 본 연구에서도 fructose 및 glucose가 급격히 감소하는 가압증숙 2시간 처리군에서 5-HMF의 함량이 20.52 mg/g으로 무처리 산수유(0.99 mg/g)에 비하여 20.7배 높아짐을 확인하였다. 반면에 3시간 동안 일반증숙 시에는 1.73 mg/g으로 생성량이 적었으며, 가압증숙 시 시간이 30분에서 3시간으로 증가할수록 5-HMF 생성량이 2.53~26.17

Table 3. Free sugar compositions of *Corni fructus* extracts treated with pressurized-steam

Treatment[1)]		Free sugar (mg/g)			
		Fructose	Glucose	Sucrose	Total
UC		346.17±1.84[a2)]	265.97±3.04[a]	8.06±0.90[a]	620.20±2.69[a]
SC		322.59±4.90[b]	258.29±0.32[b]	5.38±0.40[b]	586.26±4.38[b]
PSC	0.5 h	285.11±0.83[c]	232.89±2.17[d]	5.40±0.31[b]	523.40±1.88[d]
	1 h	287.19±1.82[c]	239.96±2.05[c]	4.79±0.52[bc]	531.94±1.09[c]
	2 h	207.72±3.60[d]	219.40±1.80[e]	4.31±0.14[c]	431.43±1.95[e]
	3 h	175.05±3.11[e]	206.92±1.61[f]	4.10±0.20[c]	386.07±1.31[f]

[1)]UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C.
[2)]Mean±SD (n=3). Means with different letters (a-f) within each column are significantly different (P<0.05).

Table 4. Bioactive compounds compositions of *Corni fructus* extracts treated with pressurized-steam

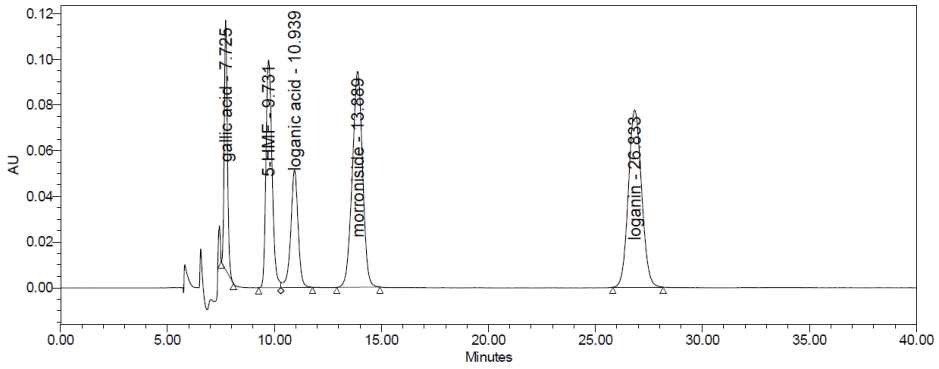
Treatment[1)]		Bioactive compounds (mg/g)				
		Gallic acid	5-HMF[2)]	Loganic acid	Morroniside	Loganin
UC		0.54±0.01[f3)]	0.99±0.02[f]	7.34±0.04[a]	26.60±0.04[b]	12.80±0.01[c]
SC		2.41±0.07[e]	1.73±0.02[e]	6.97±0.05[b]	28.70±0.01[a]	15.57±0.03[a]
PSC	0.5 h	2.92±0.02[d]	2.53±0.00[d]	6.71±0.04[c]	24.20±0.04[c]	13.09±0.01[b]
	1 h	3.12±0.01[c]	2.64±0.01[c]	6.70±0.02[c]	23.94±0.03[d]	12.63±0.02[d]
	2 h	6.18±0.02[b]	20.52±0.01[b]	5.11±0.01[d]	23.39±0.05[e]	12.62±0.01[d]
	3 h	6.52±0.00[a]	26.17±0.00[a]	4.78±0.02[e]	22.77±0.00[f]	12.22±0.01[e]

[1)]UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C.
[2)]HMF: 5-(hydroxymethyl)furfural.
[3)]Mean±SD (n=3). Means with different letters (a-f) within each column are significantly different (P<0.05).

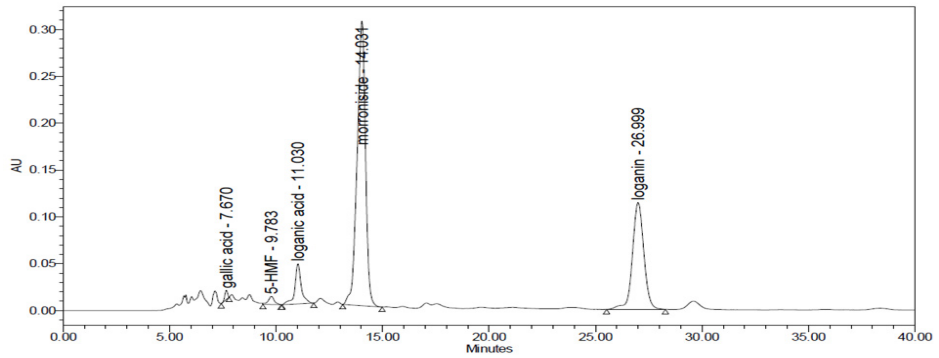
mg/g으로 유의적으로 높아짐을 확인하였다(Fig. 2). HMF는 환원당과 아미노산을 함유하는 식품을 가공하거나 살균하는 과정에서 열처리에 의해 일어나는 비효소적 갈색화 반응인 Maillard 반응의 중간 산물로 알려져 있는데(32), 과일즙, 벌꿀, 우유, 커피 등 단당류를 함유한 식품에서 furan계 화합물의 생성이 증가한다고 알려져 있다(33,34). Sharma 등(35)의 연구 결과에서 HMF는 anti-tyrosinase activity를 억제하는 특성이 있어 미백 효능으로 알려져 있으며, 혈구성 빈혈(sickle cell anemia)을 유발시키는 적혈구 세포의 겸상화를 억제하는 효능으로도 알려져 있다(36). 또한, Chun 등(37)은 참깨 뿌리 등 바이오촉매를 이용한 HMF 생산 가능성을 보고한 바 있는데, 이에 가압증숙 산수유 유래 HMF를 이용한 다양한 응용이 가능하다고 생각된다. 페놀화합물인 gallic acid 함량은 무처리 산수유(0.54 mg/g)에 비하여 3시간 동안 일반증숙 시 4.5배인 2.41 mg/g으로 높아짐을 확인하였으며, 3시간 동안 가압증숙 시에는 12.1배인 6.52 mg/g으로 높아져 높은 생리활성을 나타낼 것으로 생각된다. Iridoid 배당체 함량은 가압증숙 시 무처리군보다 낮은 함량을 나타내었으며, 가압증숙 시간이 증가할수록 loganic acid, morroniside 및 loganin 함량이 낮아지는 것을 확인하였다. 하지만 3시간 동안 가압증숙 시 morroniside 및 loganin이 각각 22.77 mg/g 및 12.22 mg/g으로 유의적인 감소는 나타났지만 무처리군보다 각각 0.9배 및 0.9배 감소하여 전반적으로 큰 차이는 아닌 것으로 판단된다. 이와 같이 가압증숙 시 증숙 시간에 따른 유리당 및 생리활성 화합물 함량 변화를 살펴본 결과, 가압증숙 시간이 증가할수록 유리당 함량은 낮아지고, furan 화합물인 5-HMF 및 페놀화합물인 gallic acid는 증가하였으며, iridoid 배당체 함량은 유사한 경향을 나타냄을 확인하였다. 따라서 이러한 조건은 산수유를 이용한 가공품 개발 시 공정이 신속하고, 품질은 뛰어난 고기능성 산수유제품 개발 시 응용 가능한 공정으로 판단된다.

과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 세포 보호 효과

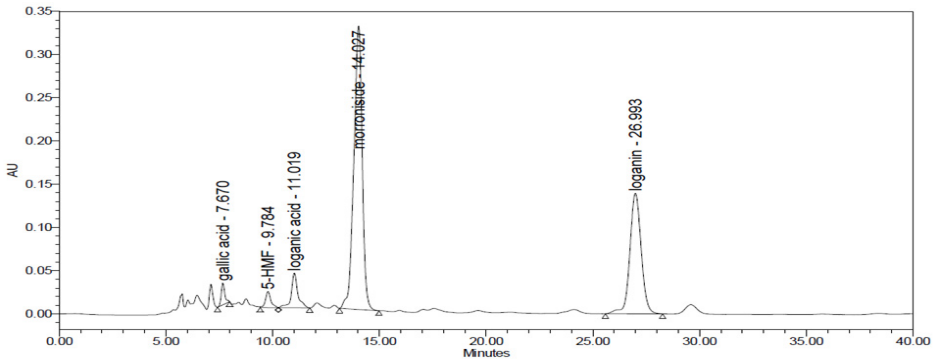
인체 내에서도 특히 뇌와 폐는 높은 산소 환경에 존재하는데 이로 인해 대기에 의한 활성산소종의 영향을 받기 쉬우며, 이는 인체 내 활성산소종의 과도한 생성을 초래한다(38). 특히 폐는 호흡과 같은 대사 반응 또는 담배 연기 및 기타 대기 오염 물질과 같은 외적 요소에 의해서 인체 내 생성된 산화제에 지속해서 노출되는데(39,40), 산화 스트레스에 의해 생성되는 주요 활성산소종은 세포독성을 나타낸다(41). 따라서 본 연구에서는 활성산소종 생산을 예방하거나 제거하기 위한 효과를 확인하기 위해서 Human lung alveolar epithelial cell인 L132 세포를 이용하여 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 추출물의 보호 효과를 확인하고자 하였다. 가압증숙 처리조건에 따른 산수유 추출물의 농도별 처리에 따른 L132 세포의 보호 효과는 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였으며, 가압증숙 산수유 추출물의 L132 세포 독성 및 L132 세포 사멸에 대한 보호 효과를 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. L132 세포에 가압증숙 산수유 추출물을 10~1,000 μg/mL 농도로 제조하여 첨가하였을 때, 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 특히 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 1,000 μg/mL 농도에서는 116.04~125.97%의 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 이후 본 연구에서는 무처리 산수유, 일반증숙 산수유 및 가압증숙 산수유를 10~1,000 μg/mL로 제조하여 L132 세포 사멸에 대한 세포 보호 효과를 조사하였다. 인체 내 산화방지 균형이 무너지게 되면 지방질 및 단백질이 산화되고 DNA가 손상됨으로써 다양한 질병을 유발할 수 있다(6). 특히 과산화수소와 같은 활성산소로 인해 발생되는 산화 스트레스로 인한 세포 손상을 통해 동맥경화, 당뇨병, 암, 치매와 같은 각종 질병에 노출될 수 있다(5). 이러한 산화 스트레스를 감소시키고 천연 산화방지제로의 활용 가능성을 확인하기 위해 가압증숙 처리조건에 따른 산수유 추출물의 세포 보호 효과를 확인한 결과, 모든 시료에서 1 mM H_2O_2를 첨가한 군과 비교하여 활성이 유의적으로 증가함을 확인하였다(P<0.05). 1,000 μg/mL 농도에서 무처리 산수유는 94.30%, 3시간 동안 일반증숙 시에는 93.19%의 높은 활성을 나타내었으며, 가압증숙 시간이 30분에서 2시간으로 증가할수록 세포 보호 효과가 각각 99.85%, 100.18% 및 102.82%로 1 mM H_2O_2 무첨가 군(100.00



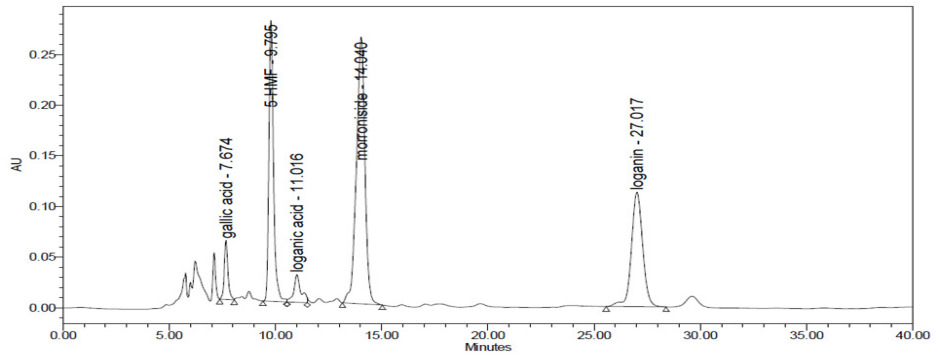
(A) Standard



(B) UC



(C) SC



(D) PSC

Fig. 2. HPLC chromatogram recorded of *Corni fructus* extracts treated with pressurized-steam. The HPLC chromatogram recorded at 240 nm enabled the identification and quantification of five compounds: (1) gallic acid (7.725 min), (2) 5-(hydroxymethyl)furfural (9.731 min), (3) loganic acid (10.939 min) (4) morroniside (13.889 min), and (5) loganin (26.833 min). A, standard of bioactive compounds; B, untreated *Corni fructus*; C, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; D, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C for 2 h.

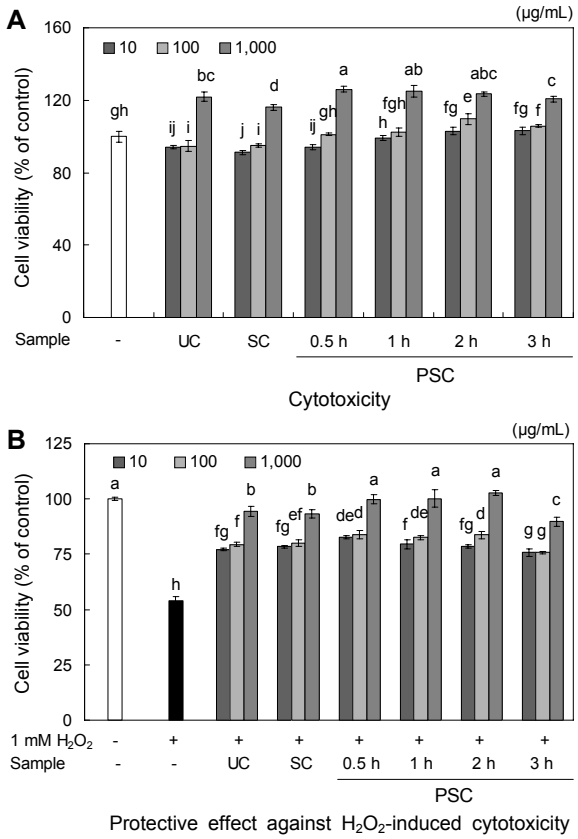


Fig. 3. Protective effect against H_2O_2-induced cytotoxicity on L132 cell of *Corni fructus* extracts treated with pressurized-steam. UC, untreated *Corni fructus*; SC, *Corni fructus* powder treated with steam at 100°C for 3 h; PSC, *Corni fructus* treated with pressurized-steam at 1.2 kgf/cm^2 and 121°C. Mean±SD (n= 3) followed by the same letter are not significantly different (P<0.05).

%)과 유사한 활성까지 높아짐을 확인하였다. 특히 2시간 동안 가압증숙한 산수유 추출물을 1,000 μg/mL 농도로 첨가하였을 때 102.82%로 활성이 가장 크게 증가하여 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 높은 세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다. Ha 등(42)의 연구결과에서 과산화수소로 유도된 산화 스트레스에 대한 뉴그린 추출물의 신경세포 보호 효과를 확인한 결과, 산화 스트레스의 생성을 억제하고 세포 생존율을 향상시킬 뿐만 아니라 신경 세포막 손상을 보호하는 것으로 나타났다. 또한, Kim 등(43)은 증숙 및 초고압 증숙공정을 통해 활성성분의 추출 수율을 극대화시킨 결과, 자외선으로 인해 발생하는 활성산소의 생성을 예방함을 확인하였는데 이는 항산화 활성 물질의 용출로 인하여 활성산소의 생성을 차단한 결과에 의한 것으로 판단된다. 따라서 가압증숙 산수유는 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸을 보호 효과를 나타냄에 따라 항산화제 분야에서 천연물 유래의 건강기능성 식품소재로 개발될 가능성이 있음을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 가압증숙 산수유의 이화학적 품질특성 변화를 모니터링 하였고, 폐 표피세포 보호 효과에 대해 알아보기 위하여 인간유래 L132 세포주를 이용하여 과산화수소로 유도된 산화 스트레스 모델에서 가압증숙 산수유 추출물의 세포 사멸 억제 효과를 확인하였다. 색도에서 명도를 나타내는 L값은 무처리 산수유 분말에서 42.75로 가장 높게 나타났으며, 대조군에 비해 가압증숙 시간이 증가할수록 L값은 유의적으로 감소하였다. 적색도(a값) 및 황색도(b값) 역시 이와 유사한 경향을 나타내었는데, 외형을 살펴보면 2시간 이상 가압증숙 시 색이 검게 변하고 광택이 없어지는 경향을 나타내었다. 2시간 동안 가압증숙 시 총 당, 환원당 및 총 페놀 함량변화를 측정한 결과, 각각 468.53 mg/g, 385.55 mg/g 및 37.32 mg/g으로 나타났다. 유리당 조성은 fructose, glucose 및 sucrose 순이었으며, 2시간 동안 가압증숙 시 각각 207.72 mg/g, 219.40 mg/g 및 4.31 mg/g으로 낮은 함량을 나타내었다. 페놀화합물인 gallic acid 및 furan 화합물인 5-HMF는 대조군에 비해 가압증숙 시간이 증가할수록 함량이 유의적으로 높아짐을 확인하였으며(P<0.05), iridoid 배당체 조성은 morroniside, loganin 및 loganic acid 순으로 함유하고 있었고 2시간 동안 가압증숙 시 다소 낮아지는 경향을 나타내었다. 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 추출물의 보호 효과를 확인하기 위해 가압증숙 산수유 추출물의 L132 세포 독성을 확인한 결과 1,000 μg/ mL 농도까지 유의적으로 세포 사멸이 나타나지 않아 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. L132 세포 사멸에 대한 보호 효과는 모든 시료에서 1 mM H_2O_2를 첨가한 군과 비교하여 활성이 유의적으로 증가하였으며, 특히 2시간 동안 가압증숙한 산수유 추출물을 1,000 μg/mL 농도로 첨가하였을 때 102.82%로 활성이 가장 크게 증가하여 과산화수소에 의해 유도된 산화적 세포 사멸에 대한 높은 세포 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

REFERENCES

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. 16th ed. Oxford University Press, Oxford, UK. p 1-705.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
3. Comporti M. 2010. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *J Siena Acad Sci* 2: 13-26.
4. Kim AK, Kim JH. 2001. Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants. *J Appl Pharmacol* 9: 249-257.
5. Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
6. Deng G, Su JH, Ivins KJ, Van Houten B, Cotman CW. 1999. Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol* 159: 309-318.

7. Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tua Y, Lichtenstein A. 1997. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Biol Med* 22: 73-83.
8. Piao XL, Kim HY, Yokozawa T, Lee YA, Piao XS, Cho EJ. 2005. Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) and its active components against radical-induced oxidative damage. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 142-147.
9. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. 1993. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. *Korean J Pharmacogn* 24: 177-182.
10. Choi JY, Song SY, Lee HH. 2015. Antibacterial and anti-inflammatory activity of *Corni fructus* ethanol extract in *Propionibacterium acnes*. *Kor J Aesthet Cosmetol* 13: 623-630.
11. Guilian T, Zhang T, Yang F, Ito Y. 2000. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 886: 309-312.
12. Lee JH, Shen GN, Kim EK, Shin HJ, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Roh SS, Cho W, Seo YB, Park YJ, Kang CW, Song GY. 2006. Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Korean J Orient Physiol Pathol* 20: 951-956.
13. Kim E, Jin Y, Kim KT, Lim TG, Jang M, Cho CW, Rhee YK, Hong HD. 2016. Effect of high temperature and high pressure on physicochemical properties and antioxidant activity of Korean red ginseng. *Korean J Food Nutr* 29: 438-447.
14. Kang MK, Kim JS, Kim GC, Choi SY, Kim KM. 2015. Evaluation of physicochemical properties and enhancement of antioxidant activities of *Dioscorea batatas* by stepwise steaming process. *J East Asian Soc Diet Life* 25: 1049-1057.
15. Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ, Lee HY. 2012. Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Korean J Med Crop Sci* 20: 238-244.
16. Jin L, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH, Lee HY. 2009. Enhancement of the antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark by using a low temperature and high-pressure extraction process. *Korean J Food Sci Technol* 41: 284-291.
17. Hong HD, Kim YC, Rho J, Kim KT, Lee YC. 2007. Changes on physicochemical properties of *Panax ginseng* C.A. Meyer during repeated steaming process. *J Ginseng Res* 31: 222-229.
18. Saha AK, Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res* 254: 157-167.
19. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
20. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
21. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, USA. Vol 731, p 237-245.
22. Hwang EG. 2003. Protective effects of α-tocopherol and captopril against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human lung epithelial cell line L-132. *PhD Dissertation*. Kyung Hee University, Seoul, Korea. p 1-32.
23. Kim MY, Lee SH, Jang GY, Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee J, Jeong HS. 2013. Effects of heat treatment on antioxidant activity of hydrolyzed mung beans. *Korean J Food Sci Technol* 45: 34-39.
24. Maillard MN, Billaud C, Chow YN, Ordonaud C, Nicolas J. 2007. Free radical scavenging, inhibition of polyphenol-oxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. *LWT－Food Sci Technol* 40: 1434-1444.
25. Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS, Jeong HS. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of Deoduk (*Codonopsis lanceolata*) and Doragi (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 798-803.
26. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
27. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 40: 166-170.
28. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol* 38: 331-336.
29. Song DS, Woo KS, Seong NS, Kim KY, Jeong HS, Lee HB. 2007. Changes in quality of *Rehmanniae radix* Preparata with heating conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 773-778.
30. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
31. Aida TM, Tajima K, Watanabe M, Saito Y, Kuroda K, Nonaka T, Hattori H, Smith Jr RL, Arai K. 2007. Reactions of D-fructose in water at temperatures up to 400°C and pressures up to 100 MPa. *J Supercrit Fluids* 42: 110-119.
32. Chen SL, Yang DJ, Chen HY, Liu SC. 2009. Effect of hot acidic fructose solution on caramelisation intermediates including colour, hydroxymethylfurfural and antioxidative activity changes. *Food Chem* 114: 582-588.
33. LeBlanc BW, Eggleston G, Sammataro D, Cornett C, Dufault R, Deeby T, St Cyr E. 2009. Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *J Agric Food Chem* 57: 7369-7376.
34. Fan X. 2005. Formation of furan from carbohydrates and ascorbic acid following exposure to ionizing radiation and thermal processing. *J Agric Food Chem* 53: 7826-7831.
35. Sharma VK, Choi J, Sharma N, Choi M, Seo SY. 2004. *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. *Phytother Res* 18: 841-844.
36. Abdulmalik O, Safo MK, Chen Q, Yang J, Brugnara C, Ohene-Frempong K, Abraham DJ, Asakura T. 2005. 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *Br J Haematol* 128: 552-561.
37. Chun JA, Lee JW, Yi YB, Hong SS, Cho KJ, Chung CH. 2009. Production of hydroxymethylfurfural by *Sesamum indicum* L. root cultures. *J Life Sci* 19: 1836-1840.
38. Pandareesh MD, Anand T, Bhat PV. 2016. Cytoprotective propensity of *Bacopa monniera* against hydrogen peroxide induced oxidative damage in neuronal and lung epithelial cells. *Cytotechnology* 68: 157-172.
39. Rahman I, MacNee W. 1999. Lung glutathione and oxida-

tive stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 277: L1067-L1088.
40. Rahman I, MacNee W. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione synthesis in lung inflammation. *Eur Respir J* 16: 534-554.
41. Maxwell SR. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.
42. Ha JS, Park SK, Park CH, Seung TW, Guo TJ, Kang JY, Lee DS, Kim JM, Lee U, Heo HJ. 2015. Neuronal cell protective effect of new green extract against H_2O_2-induced oxidative stress and analysis of bioactive compounds. *Korean J Food Sci Technol* 47: 673-679.
43. Kim JS, Choi WS, Chung JY, Chung HC, Lee HY. 2013. Enhancement of cosmeceutical activity from *Codonopsis lanceolata* extracts by stepwise steaming process. *Korean J Med Crop Sci* 21: 204-212.