

증숙 및 초고압 증숙 공정을 통한 더덕의 면역활성 증진

김남영* · 정재윤** · 이현용***†

*강원대학교 생물소재공학과, **(주)뉴트리, ***서원대학교 식품공학과

Enhancement of Immune Activity of the Extracts from *Codonopsis lanceolata* by Stepwise Steaming Process and High Pressure Process

Nam Young Kim*, Jae Youn Chung** and Hyeon Yong Lee***†

*Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Newtree Co., Ltd, 11F Tech center, SK n Techno Park, Sungnam 462-120, Korea.

***Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea.

ABSTRACT : This study was to investigate the improvement of immune activities of the extracts from *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process and high pressure process. The phenol contents was 8.742 $\mu\text{g}/\text{mg}$ which was higher than that from conventional extraction using 70% ethyl alcohol at 80°C for 24 hours. All of extracts at a concentration of 1.0 mg/mL showed relatively low cytotoxicity on human normal kidney cell (HEK293) in range of 16-19%. The immune B and T cell growth was improved by extracts using the steamed and high pressure process of *C. lanceolata* up to 180×10^4 cells/mL and 96×10^4 cells/mL, respectively. The extract prepared also greatly increased the secretion of both IL-6 and TNF- α from the stepwise steamed and high pressure process. This results can conclude that stepwise steamed and high pressure process effectively released active biomaterials which could important role in enhancing immune activity in the body.

Key Words : *Codonopsis lanceolata*, Immune Activity, Stepwise Steaming Process, High Pressure Process

서 언

인류는 고령화 사회에 접어들면서 최첨단 과학과 의료기술로도 해결하지 못하는 질병들에 시달리고 있으며, 가속화된 산업화 및 무분별한 경제 성장으로 인한 환경 문제, 식습관 변화, 성인병, 스트레스성 질환 등이 많이 유발되고 있다 (Park *et al.*, 2010). 또한, 현대인들의 높아진 경제 소득과 고도화된 삶의 질을 추구함에 따라, 건강하고 아름답게 살아가기 위한 건강기능식품에 대한 관심이 높아지고 있으며, 높아진 관심에 따라 항산화 (Kim *et al.*, 2004), 항염, 면역 (Park *et al.*, 2005) 등에 뛰어난 건강기능식품들이 연구되고 있는 추세이다. 특히 천연물의 유용성분으로부터 유래한 건강기능식품은 합성 화합물에 비해 적은 부작용과 사람들의 건강에 대한 긍정적인 인식이 깊어, 기호도가 높아지고 있으며 차세대 고부가가치상

품으로 떠오르고 있다.

기능성식품 및 약용으로 사용되는 작물은 20세기 초부터 발전된 화학 약물요법 및 백신 등의 개발에 따라 대체 치료 요법에서 질병의 예방과 완화를 위해 널리 사용되어지고 있으며, 특히 우리나라에서 많이 이용되고 있다. 또한 천연물질 및 생약은 인체 내에서 식균 작용 및 항균작용을 활성화하여, 항체의 생성을 촉진시키는 동시에, 체내 생화학적 수치들을 정상화시킴으로써 질병에 대한 방어력을 증가시키고 만성질환을 예방하며, 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역기능을 정상화시킴으로 치료에 사용된다 (Ji *et al.*, 1997).

면역반응이란 동물 체내에 존재하는 자기 방어체계로서 외부로부터 침입해오는 각종물질이나 생명체를 자기 자신과 구별해 내어 침입자를 제거하는 복잡한 생물학적 현상이다. 면역능력이 파괴되면 미생물에 의한 감염이 증가하고, 더욱이 암

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2013 December 4 / 1st Revised 2014 January 3 / 2nd Revised 2014 January 27 / 3rd Revised 2014 February 25 / 4th Revised March 20 / Accepted 2014 March 21

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

세포와 같은 개체 내에서 생기는 이상세포를 제거하는 능력이 약화된다. 면역능력의 감소는 흉선의 퇴화, T세포 및 분획 세포의 절대적인 수나 상대적 비율의 변화, T세포 표면의 인자 변화, 면역세포 수용체의 변화 등으로 설명하고 있다. 면역능력에는 많은 영양소가 작용하지만 면역능력에 관여하는 세포들의 세포막에는 특별히 불포화지방산을 많이 함유하고 있고, 작용과정에서 활성화된 중간물질에 많이 노출되므로 적절한 농도의 항산화 영양소는 면역능력에 필수적이다. 즉 체내 산화-항산화 균형은 세포막, 세포내 단백질, 핵산의 구조적, 기능적으로 유지, 신호전달, 유전자표현등에 영향을 주어 면역능력을 유지하는데 중요한 역할을 한다 (Merluzzi *et al.*, 1982; Parent *et al.*, 1978).

천연물 중에서도 염증, 면역 등에 좋다고 알려진 더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 사삼, 양유 산해 혹은 백삼이라 불리며, 독특한 향과 맛을 지닌 도라지 과에 속하는 덩굴성 다년초이다. 주로 봄, 가을에 뿌리를 채취하여 사용하며 전통 의학에서는 강장, 해열, 거담, 폐결핵, 해독용, 인후염, 종기 등의 치료에 사용되어져 왔다 (Hong *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007). 이러한 더덕은 최근 항산화, 항암, 면역력 증가 등의 활성이 보고되어지며 인삼의 대체품으로 활용되고 있다. 하지만 단단한 껍질로 이루어진 구근류 식물인 더덕은 껍질 속의 활성성분의 추출을 위해서는 증숙 공정 및 초고압 공정과 같은 물리적인 충격을 극대화 할 수 있는 추출 공정의 사용이 불가피하다. 따라서 단단한 천연물에 추출에 사용되는 추출공정으로 인삼, 수삼, 더덕 및 다양한 구근류 천연물의 전처리 공정으로 많이 이용되고 있다 (Kim *et al.*, 2013).

본 연구에서는 증숙 공정과 초고압 공정을 거친 더덕의 면역 활성 증진을 연구하였으며, 공정을 통하여 얻어질 수 있는 면역 유용생리활성을 탐색하고, 향후 기능성 식품 및 화장품 소재로서의 사용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 증숙더덕 및 초고압 더덕의 제조

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 2012년 8월에 강원도 횡성에서 채취한 것을 사용하였다. 채취한 더덕을 깨끗이 세정한 후 마하스팀기 (Daechang stainless, Korea)를 사용하여 증숙 가공을 하였으며, 50, 60, 90°C로 2시간씩 단계적으로 온도를 증가시켜 가열하였고, 추가로 100°C에서 3시간 증숙 가공하였다. 1차적으로 증숙 가공을 거친 더덕은 다시 12시간 음건시킨 후 위와 같은 증숙 가공 공정을 5번 반복 실시하였다. 증숙 가공 더덕의 유효기간 및 사용가능 기간을 늘리기 위해 20~30°C로 조절하여 음건한 뒤 시료로 사용하였다. 초고압 공정은 더덕 100g을 비닐 팩에 10배수 70% 에탄올 용매와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추

출장치 (Ilshin Autoclave, Korea)를 이용하여 3,000 bar 압력으로 25°C에서 30분간 초고압 추출을 실행하였다.

2. 추출물 제조

환류 냉각기와 온도 조절 장치가 부착된 열수추출기 (TL200-6Point(K), Misung Scientific Co., Korea)에 일반 생더덕 (FC; Fresh *C. lanceolata* extract)과 초고압 공정 처리 더덕 (HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract), 증숙 더덕 (SC; Steamed *C. lanceolata* extract), 초고압 처리 증숙 더덕 (SHC; Steamed and High Pressure Process *C. lanceolata* extract.)을 각각 100g 씩 10배수 70% 에탄올 용매를 사용하여 80°C에서 24시간 추출하였으며, 감압여과펌프 (KNF Laboport Pressure Pump, Cole-Parmer, USA)와 Whatman 사의 20~25 μm 여과지를 이용하여 여과하였다. 불순물이 제거된 여액을 감압회전농축기 (Rotary Vacuum Evaporator N-N series, Eyela, Germany)를 이용하여 농축한 후 동결건조기 (PVTF 10AT, Ilshin, Korea)를 사용하여 3일간 동결건조시킨 후 분말 상태로 준비하여 실험에 사용하였다 (Kim *et al.*, 2008).

3. 총 페놀 함량 측정

Folin-Denis법에 따라 각 공정별 추출물 샘플 1ml에 Folin-Ciocalteu 시약과 10% Na₂OH₃ 용액을 각각 1ml 씩 차례대로 가한 다음 상온에서 1시간 방치한다. 이후 표준 검량선 측정을 위해 caffeic acid를 0100 μg/ml의 농도로 제조한 뒤 상온에서 1시간 동안 방치되었던 각 샘플들을 UV-vis spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준 검량선으로부터 공정별 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다 (Singleton and Rossi, 1966).

4. 세포주 및 세포 생육 배지

면역세포의 생육 증진 효과를 검증하기 위해 인간 면역세포인 T cell (H₉, ATTC, USA)과 B cell (Raji, ATTC, USA)를 RPMI 1640 배지에 10%의 FBS (Heating-Inactivated)를 첨가하여 배양시켜 사용하였으며, NO 생성량 측정을 위한 마우스 J774.1 macrophage (ATTC, USA)도 같은 방식으로 배양하여 실험하였다.

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640 (31800022, Gibco, USA)과 α-MEM (12000-022, Gibco, USA)을 사용하였고, 추가로 필요한 HEPES buffer (90909C, Sigma, USA), Fetal Bovine Serum (10437028, Gibco, USA), Gentamycin sulfate (G1914, Sigma, USA), Trypsin-EDTA (T6689, Sigma, USA)를 구입하여 사용하였다. 또한 cytokine 측정을 위해 IL-6와 TNF-α Kit는 Chemicon (USA)사의 것을 구입

하여 실험에 사용하였다.

5. 정상세포에 대한 세포독성 측정

인간 정상 신장 세포인 HEK293을 이용하여 세포독성을 측정하였다. 실험은 HEK293 세포의 농도를 4.0×10^4 cells/ml로 맞춘 후 96 well plate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 CO₂ incubator (CB150, Binder, Germany) 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 이후 각각 공정별 시료를 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 조절하여 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였고, 48시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차갑게 보관하였던 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic Acid) $100 \mu\text{l}$ 를 가하여 4°C에서 1시간 동안 보관한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%의 농도로 조절한 acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조 시킨 후에 10 mM Tris buffer $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 microplate reader (Molecular Devices, Thermo max, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다 (Kim *et al.*, 2007).

6. 면역세포 생육 증진 효과 분석

면역기능의 증강 효과는 인간 유래 면역 세포인 T cell (H₉, ATCC, USA)과 B cell (Raji, ATCC, USA)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, MTT assay를 이용하여 면역세포의 증식율을 측정하였다. 생육 증진 효과 실험은 6-well plate에 세포를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 각 공정별 시료를 주입하여 7일 동안 배양하면서 각 well의 cell을 Hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Park *et al.*, 2004).

7. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 24-well plate에 $900 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 각 공정별 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 다시 5일 동안 배양 (37°C, 5% CO₂) 하였다. 원심분리기(Combi-514R, Hanil, Korea)를 이용하여 배양배지의 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, Thermo max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D. 값을 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Cho *et al.*, 1998).

8. 대식세포에서의 Nitric Oxide (NO) 생성능 측정

각 공정별 시료에 대식세포에 의한 Nitric Oxide (NO) 생성능을 확인하기 위해 사용된 세포주는 J774.1 macrophage (ATCC, USA)이며, 세포는 10% heat-inactivated bovin serum과 RPMI 1640 medium을 이용하여 24-well plate에 4.0×10^4 cell/ml의 농도로 넣은 다음 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 48시간 동안 배양 (37°C 5% CO₂)하여 실험에 사용하였다. 먼저 각 공정별로 얻은 샘플을 처리하고 48시간 동안 세포를 배양한 뒤 상등액 $50 \mu\text{l}$ 를 취하여 동일 부피의 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄) $50 \mu\text{l}$ 을 첨가하여 실온에서 10분간 배양시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 $32 \mu\text{M}$ 에서부터 $0.25 \mu\text{M}$ 까지 RPMI 1640 medium으로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO 생성능의 양성 대조군 물질로는 *E. coli* 유래 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)를 사용하였다. macrophage에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다 (Choi *et al.*, 2013).

9. 통계처리

모든 데이터의 통계처리는 3회 반복 실험으로 이루어졌으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램의 student *t*-test를 통해 평균 값을 구한 뒤, 처리구간의 최소유의수준의 차 ($p < 0.05$)로 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

1. 총 페놀 함량 측정

각 공정별 더덕 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 각 공정별 더덕 추출물들 중 총 페놀 함량은 증숙 더덕 추출물에서 $8.736 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높은 함량을 나타내었고, 뒤이어 초고압 처리 증숙 더덕 추출물에서 $8.597 \mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량을 나타내었다. 이는 더덕의 페놀성 물질이 증숙 공정을 통해 용출이 증진된 것으로 보이며, 이러한 페놀성 화합물은 가용성 식물류에 널리 분포하는 것으로 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타내고, 이들의 효능은 주로 산화 환원력에 의한 것이라고 밝혀짐을 알 수 있다 (Osawa, 1994; Ling *et al.*, 2011). 위의 결과가 이전 연구를 바탕으로 페놀성 화합물을 함유하고 있는 더덕 추출물은 항산화 효능을 가진다고 사료되며, 더 나아가 증숙 가공 공정을 거친 더덕은 높은 폴리페놀의 함량을 가짐으로써 활성 증진에 큰 영향을 미친다고 사료된다.

Table 1. Total polyphenol contents of extracts of *Codonopsis lanceolata* according to different extraction processes.

Extraction condition	Total polyphenol contents [†] (μg/mg)
FC	3.121 ± 0.32 A*
HC	3.169 ± 0.29 A
SC	8.736 ± 0.49 B
SHC	8.597 ± 0.27 B

[†]Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Mean with difference letter (A-B) within column is significantly different at $p < 0.05$. FC; Fresh *C. lanceolata* extract, HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract, SC; Steamed *C. lanceolata* extract, SHC; Steamed and high pressure process *C. lanceolata* extract.

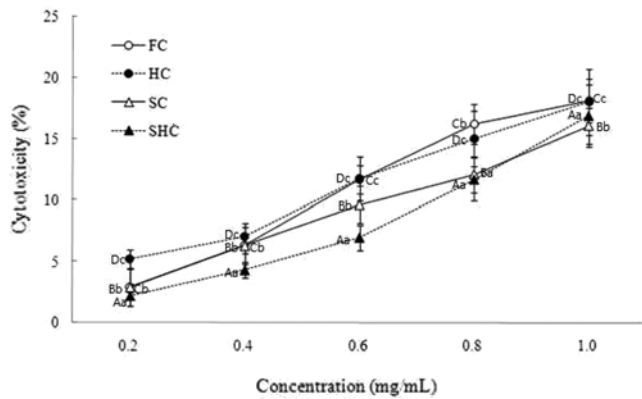


Fig. 1. Cytotoxicity of *Codonopsis lanceolata* extracts according to different extraction processes. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$. FC; Fresh *C. lanceolata* extract, HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract, SC; Steamed *C. lanceolata* extract, SHC; Steamed and high pressure process *C. lanceolata* extract.

2. 정상세포에 대한 세포독성 측정

정상세포 HEK293 세포에 각 공정 처리한 더덕 추출물을 0.2~1.0 mg/mL 까지 다섯 가지 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후, MTT assay로 측정된 세포 독성을 Fig. 1에 나타내었다. 그림과 같이 각 추출 조건에 따른 추출물 모두 농도의 의존적으로 세포 독성이 증가하는 모습을 확인할 수 있으며, 특히 일반 더덕 추출물의 경우 최대 농도인 1.0 mg/mL에서 18.12%의 가장 높은 세포 독성을 나타냈으며, 초고압 및 증숙 가공 처리 더덕 추출물의 경우 최대 농도인 1.0 mg/mL에서 각각 16.89%, 16.04%로써 낮은 세포독성을 보였다. 이와 같이 공정별 더덕 시료 모두 최고 농도에서 19% 이하로, 세포수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않아, 기능성 식품 및 향장 원료로써 이용 가능성을 확인하였다.

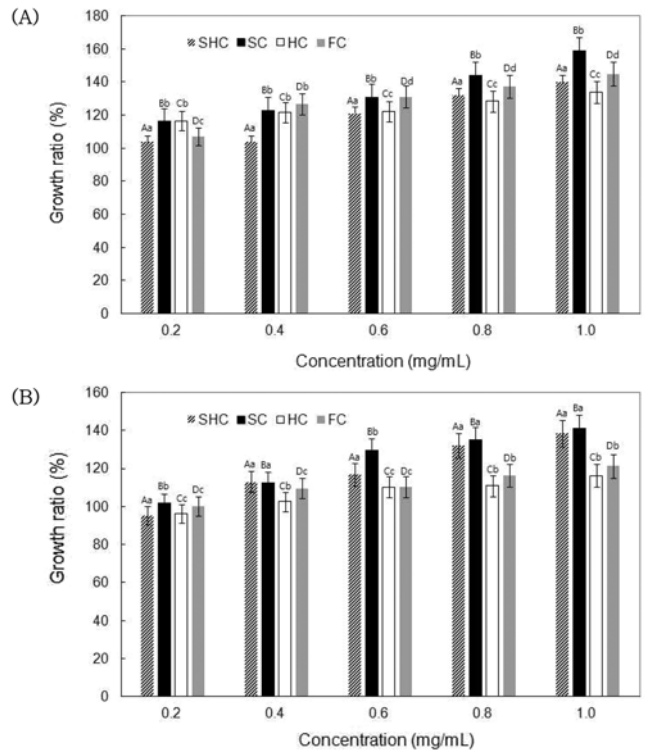


Fig. 2. Growth of human immune T cell (A) and B cell (B) in adding the extracts of *Codonopsis lanceolata* from several processes for 7 days. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$. FC; Fresh *C. lanceolata* extract, HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract, SC; Steamed *C. lanceolata* extract, SHC; Steamed and high pressure process *C. lanceolata* extract.

3. 면역세포 생육 증진 효과 분석

이전의 선행 연구에서 더덕의 항산화활성 탐색 연구결과 더덕 추출물에 다량의 항산화물질이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 이것으로 본 연구에서는 더덕 내의 항산화 물질과 면역 활성간의 관계를 검증하기 위해 본 실험을 진행하였다.

각 공정별 더덕 추출물의 면역증진 효과의 확인을 위해 인간 면역체계에 중요한 역할을 하는 T cell과 B cell을 이용하였다. 생육증진 효과를 측정하기 위해 SRB assay를 이용하여 각 공정별 추출물 시료의 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 조절하여 첨가한 후 생육 증진 효과를 측정하여 각각 Fig. 2에 나타내었다. 모든 추출물에서 생육이 농도의 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 증숙 공정 추출을 통한 추출물이 최고 농도인 1.0 mg/mL에서 T cell과 B cell 각각 151.12%와 134.35%로 가장 높은 생육 증진 효과를 보여주었다.

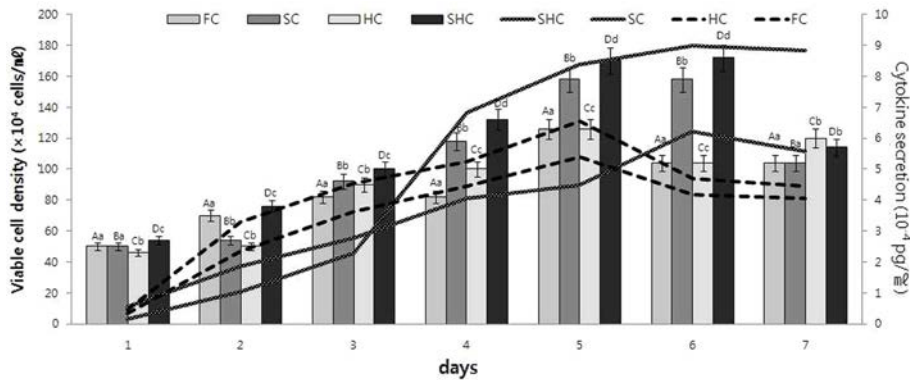


Fig. 3. Comparison of IL-6, TNF- α secretion on T cell growth in adding the extracts of *Codonopsis lanceolata* from several processes. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$. FC; Fresh *C. lanceolata* extract, HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract, SC; Steamed *C. lanceolata* extract, SHC; Steamed and high pressure process *C. lanceolata* extract.

Fig. 3은 위의 농도별 시료 첨가에 의한 면역세포 생육 실험의 유의성을 감안하여 0.5 mg/ml의 농도의 시료를 첨가 후 T cell과 B cell의 생육을 7일 동안 배양 날짜별로 측정된 결과이다. 시간경과에 따른 T cell과 B cell의 생육곡선을 보면 시료첨가 시점을 기준으로 5일 내지 6일째 최고 생육도를 나타내었다. 증숙 가공 추출물은 최고 생육도를 나타낸 6일째에 180×10^4 cells/ml, 일반 더덕 추출을 시행한 추출물에 비교하였을 때 각각 1.89배, 1.21배의 생육증진을 보인 것을 확인하였다. 이는 배양시간에 따른 T세포의 cytokine (IL-6, TNF- α) 분비 경향과 유사한 결과로 증숙 공정을 통한 더덕의 추출물 첨가를 통해 인간 면역세포의 생육이 증진되고 이를 통해 면역세포로부터 분비되는 cytokine의 분비량도 증가된 것으로 사료된다.

4. Cytokine 분비량 측정

Fig. 3는 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 T cell에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. 각 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 유의적인 값을 나타내었다. 각 시료에 대한 T cell에서 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, 일반 더덕 추출물과 초고압 더덕 추출물이 5일째 각각 6.3×10^{-4} pg/cell과 6.8×10^{-4} pg/cell을 나타내었고, 증숙 더덕과 초고압 증숙 더덕은 5일 혹은 6일째 각각 8.6×10^{-4} pg/cell과 8.9×10^{-4} pg/cell을 나타내며 일반 더덕 추출물과 비교하여 많은 cytokine 분비량을 나타내었다. 생육도와 cytokine 분비량 측정을 통한 대부분의 조건에서 증숙 더덕 추출물 첨가를 통해 높은 활성을 나타내었으며, 증숙 공정을 통한 추출물의 높은 활성을 확인 할 수 있었다. 이것은 더덕의 일반적 추출 공정으로는 용출이 힘들었던 성분들이 증

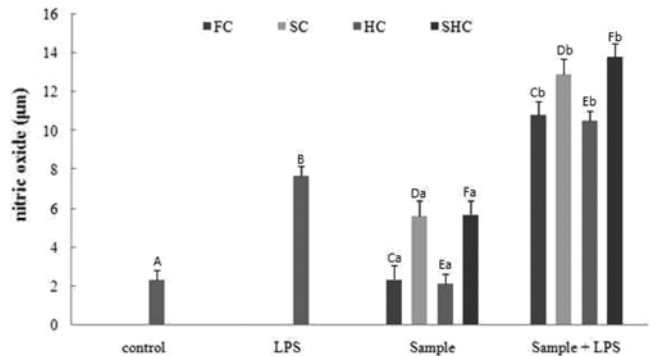


Fig. 4. Stimulation of nitric oxide production in adding *Codonopsis lanceolata* extracts (1 mg/ml) according to different extraction processes (LPS; Lipopoly-saccharide). Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-F) within same sample are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within sample (sample + LPS) are significantly different at $p < 0.05$. FC; Fresh *C. lanceolata* extract, HC; High pressure processed *C. lanceolata* extract, SC; Steamed *C. lanceolata* extract, SHC; Steamed and high pressure process *C. lanceolata* extract.

숙 가공 공정을 통해 용출이 가능해지거나 또는 용출이 증가됨으로써 면역 활성화에 영향을 준 것이라 사료되며, 이를 통해 더덕이 면역 활성화와 관련하여 기능성 식품으로써 활용에 가능성이 있다고 사료된다.

5. 대식세포에서의 Nitric Oxide (NO) 생성능 측정

대식세포를 이용하여 NO 생성능을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 대식세포의 NOS (Nitric Oxide Synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- γ , TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS (*E. coli* derived lipopoly-saccharide)와 같은

세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO의 생성능을 확인하였다. 결과를 통해 대식세포의 NO 생성은 LPS 첨가를 통해 촉진됨을 알 수 있다.

더덕 시료와 LPS를 동시에 처리한 결과를 통해 더덕 추출물 첨가를 통해 LPS 투여시 NO의 생성량이 증가한 것은 더덕 추출물이 NO 생성을 통한 면역체계에 활성 증진 효과를 나타냄을 확인할 수 있는 결과이다. (Kim *et al.*, 2012) 이는 세포독성이 거의 없는 적정량의 더덕 추출물의 투여가 대식세포를 활성화하는데 기여하며, 그 활성 정도가 LPS의 병적인 염증 자극에 의해 적으므로, 더덕이 면역력과 염증반응을 항상성을 유지하는 범위에서 NO를 상승적으로 조절할 수 있는 것으로 사료된다. 결과를 통해 더덕의 모든 추출물이 이러한 면역 활성 증진 효과를 나타내었음을 확인할 수 있었으며, 그 중 증숙 초고압 더덕 추출물의 NO 생성량이 13.8 M로 가장 높은 값을 보였다. 실험에서 보여준 NO 증가량을 보면, 이는 더덕에 의한 면역 및 염증반응 조절에서 보여준 더덕추출물의 투여에 의해 10.6%에서 11.4%까지 증가된 NO 생성량에 비교하였을 때 높은 증가량을 보여 주는 것으로 증숙 더덕이 높은 면역증강 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009001)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU, Park MH and Han BH. (1998). Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji*. 42:296-301.
- Choi WS, Kwon HS, No RH, Choi GP and Lee HY. (2013). Enhancement of anti-inflammatory activities of fermented *Scutellaria baicalensis* extracts using *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of The Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 39:303-311.
- Hong WS, Lee JS, Ko SY and Choi YS. (2006). A study on the perception of *Codonopsis lanceolata* dishes and the development of *Codonopsis lanceolata* dishes. *The Korean Journal of Food and Cookery Science*. 22:181-192.
- Ji WD, Jeong HC, Lee SJ and Chun YG. (1997). Antimicrobial activity and distilled components of garlic and ginger. *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 40:514-518.
- 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 JP, Chon IJ, Cho HK, Han IH and Whang WK. (2004). The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 35:98-103.
- Kim JS, Choi WS, Chung JY, Chung HC and Lee HY. (2013). Enhancement of cosmeceutical activity from *Codonopsis lanceolata* extracts by stepwise steaming process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:204-212.
- Kim HT, Kim JW, Lim MK, Jin TW, Yeo SG, Jang KH, Oh TH and Lee KW. (2007). Cytotoxic effect of *Artemisia capillaris* extracts on the cancer cells on *in vitro*. *Journal of Veterinary Clinics*. 24:367-371.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ and Jeong JH. (2012). Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41:1205-1210.
- Lim SD, Seong KS, Kim KS and Han DU. (2007). Effects of fermented milk containing herb extract from *Acanthopanax divaricatus* var. *Albeofructus* and *Codonopsis lanceolata* on the immune status of mouse. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 27:95-101.
- Ling J, Ha JH, Choi WY, Seo YC, Kim JS, Kim YO, Cha SW, Kim JC and Lee HY. (2011). Enhancement of cosmeceutical activities of *Berberis koreana* bark by high pressure and ultrasonification extraction processes. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:54-65.
- Merluzzi VJ, Walker MM, Williams N, Susskind B, Hadden JW and Faanes RB. (1982). Immunoenhancing activity of NPT 15392: A potential immune response modifier. *International Journal of Immunopharmacology* 4:219-24.
- Osawa T. (1994). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Uritani I. *et al.* (eds.). *Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan. p.241-251.
- Parent M, Parent F and Chedid L. (1978). Enhancement of the neonate's nonspecific immunity to klebsiella infection by muramyl dipeptide, a synthetic immunoadjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75:3395-3399.
- 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 Society for Biotechnology and Bioengineering*. 19:113-117.
- Park KU, Wee JJ, Kim JY, Jeong CH, Kang KS, Cho YS and Seo KI. (2005). Anticancer and immuno-activities of edible crude saponin from soybean cake. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 34:1509-1513.
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB and Lee HY. (2010). Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 39:1898-1902.
- Singleton VL and Rossi JA. (1966). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.