

저온 추출 공정에 의한 마황과 복분자의 면역 활성 증진 효과

김대호* · 박진홍* · 김정화* · 김철희* · 유진현* · 권민철* · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부

Enhancement of Immune Activities of *Ephedrae* Herba and *Rubi* Fructus at Low Temperature Extraction

Dae Ho Kim*, Jin Hong Park*, Jung Hwa Kim*, Cheol Hee Kim*, Jin Hyun You*, Min Chul Kwon*, and Hyeon Yong Lee*†

*School of Biotechnology & Bioengineering, Kangwon Natl. Univ., Chunchon 200-701, Korea.

ABSTRACT : The immune activities of the extracts from *Ephedrae* Herba and *Rubi* Fructus extraction with ultrasonification at 60 °C were compared with the extracts though water extraction at 100 °C. The growth of human T cells was increased up to 13×10^4 viable cells/ml in adding 1.0 g/l of the ultrasonification extracts of *R. Fructus* at 60 °C, compared to adding the extracts at 100 °C. The secretion of TNF- α for human T cells were also increased up to 13.9×10^{-4} pg/cell by adding extracts at 60 °C, compared to extracts at 100 °C. The extracts of *R. Fructus* at 60 °C increased NK cell activities up to 50% and the secretion of NO⁻¹ from macrophage to 31 μ M for ultrasonification extracts at 60 °C.

Key words : ultrasonification, *Ephedrae* Herba, *Rubi* Fructus, human B and T cells, NK cell

서 언

초음파는 침투력이 우수하여 공업과 의학, 세척 분야에서 일찍부터 널리 활용되고 있으며, 동력적 활용 방법인 초음파 추출은 액체 내에 가하여 준 강력한 초음파로 인해 소밀과가 되어 압축력 (정압)과 팽창력 (부압)이 반복적으로 일어남으로서 추출의 효과를 가져오게 된다고 알려져 있다. 초음파 에너지를 이용한 추출은 초음파 진동에 의한 공동현상 (Cavitation)에 의해 매우 큰 에너지와 또한 높은 국부온도로 인한 주위 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하여 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 된다. 그리고 초음파 에너지의 충격효과는 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높이고 초음파 조사시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하고 일반적인 용매추출에 비해 매우 짧은 시간에 추출이 완료되는 것이 초음파의 공동 효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이라는 결과를 연구 보고한바 있다 (Chung *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). 또한 이러한 초음파의 특징을 이용하여 낮은 추출 온도를 유지함으로써 추출 시료의 열에 의한 손상을 억제하는 것은 물론 원하는 추출 수율을 유지할 수 있다고 보고되었다 (Park *et al.*, 2003).

마황 (*Ephedrae* Herba)은 마황과에 속하는 다년생 초본 혹은 초본성목으로 한방에서는 발한, 해열, 진해, 항염증의 목적으로 이용되었고, 한약재로서 발한·해열·진해·이노제 효능이 있어 열병과 천식치료에 사용되었으며 중국 북부, 몽골 등지에 분포한다. 마황의 메탄올 추출물을 petroleum ether 분획, ether 분획, ethylacetate 분획 그리고 water 분획으로 나누어 실험하여 ethyl acetate 분획과 water 분획에서 세포성 및 체액성 면역반응에 대해 억제적으로 작용한다고 알려져 있으며, 이는 마황의 알카로이드 성분인 ephedrine 및 pseudoephedrine의 약리작용과의 관계에 대해 연구 보고되어져 있다. 또한 이의 약리 작용으로 인해 세포성 및 체액성 면역반응에 대해 억제 작용을 하는 것으로 연구 보고 되어졌다 (Kim *et al.*, 1991).

장미과에 속하는 복분자 (*Rubi* Fructus)는 중국, 일본, 우리나라 제주도를 포함한 남부지방 및 중부지방의 해발 50~1000 m 지역 산기슭 양지에 자생하며 식용 및 약용 등의 용도로 사용되고 있다. 특히 열매는 식용, 청량 음료제 및 밀원 자원으로 이용되고 있으며, 한방과 민방에서는 열매를 명안, 태생, 지신, 음위, 강장, 양모 등에 약재로 많이 이용 (Jeong *et al.*, 1996) 되고, 인간면역계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 인간 B 세포와 T 세포주의 생육을 촉진한다고 알려져

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received January 14, 2005 / Accepted March 31, 2005

있다 (Lee *et al.*, 2003).

따라서 이들 약제들의 면역 활성 연구를 통하여 최근 다양한 추출방법에 대한 관심이 집중되고 있으며, 그의 한 방법으로서 이들 약제가 열에 의한 조직 손상에 의한 성분 변화를 막기 위해 저온 추출을 실시하였다. 또한 초음파의 특징인 공동현상을 이용한 병행 추출을 통해 본 논문에서는 면역 활성 증진 효과에 의한 마황과 복분자의 이용 범위를 넓히기 위한 중요한 자료로 활용하기 위한 것이 본 논문의 연구 목적이라 하겠다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 실험에 사용한 재료인 마황, 복분자는 서울경동시장에서 구입하였으며 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대하여 각각 10배의 증류수를 추출용매로 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출한 것을 다시 초음파 추출기 (Asia industry, Kor.)를 통하여 60°C에서 40 KHz의 초음파로 30분간 초음파 추출을 병행하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조 한 뒤에 각각의 수율을 계산하였다.

2. 면역세포 생육활성 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Michael *et al.*, 1988)를 이용하였다. 이는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포의 농도를 4.0~5.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100 μl 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100 μl의 MTT (50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 μl를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100 μl 씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하는 방법 (Philip *et al.*, 1990)과 24 well plate에 세포를 2.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 총 8일 동안 배양시켜 매일매일 각 well의 cell을 hemocytometer로 세포 수를 측정하여 생육 활성을 측정하는 두 가지 방법을 사용하였다 (Cho *et al.*, 1998).

3. 면역세포의 cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의

IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 4.0~5.0×10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 100 μl 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양매지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

4. Natural killer cell의 생육 측정

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)과 12.5% horse serum (Myelocult)에 2.0×10⁷ cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T 세포를 T-25 flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 34번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취한 후 NK-92MI cell을 24 well plate에 4.0~5.0×10⁴ cells/ml로 900 μl 씩 분주하였다. 24시간 후 인간 T 세포의 상층액을 각 plate에 100 μl 씩 투여하여 배양 6일간 Cell Counter를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정하였다.

5. Macrophage의 활성 측정

사용된 세포주는 J774.1 macrophage (mouse)이며, 세포는 10% FBS와 RPMI 1640 medium을 이용하여 24 well plate에 4.5×10⁴ cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 비첨가하여 humidified 5% CO₂ incubator안에서 37에서 48시간동안 배양하여 실험에 사용하였다. Macrophage에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 μl를 취하여 동일부피의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μM에서부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 medium으로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO⁻ 생성능의 양성대조구 물질로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 시료의 초음파 추출 수율

마황 (*Ephedrae Herba*)과 복분자 (*Rubi Fructus*)의 추출 수율

Table 1. The extraction yields of water extract from *Ephedra Herba* and *Rubi Fructus*.

Sample	Yields (% w/w)	
	I	II
<i>Ephedrae Herba</i>	5.35	10.14
<i>Rubi Fructus</i>	10.32	16.56

I: water extracts at 100°, II: water extract on ultrasonification at 60°.

은 Table 1과 같다. Table 1에서 확인 할 수 있듯이 초음파 병행 추출물이 물 추출물에 비해 약 1.6배 이상 증가한 것으로 나타났다. 기존의 물 추출에 비하여 초음파 병행추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사시 용존산소나 기포를 액외로 방출시키는 탈기현상을 일으켜 이들이 서로 액체와 상호작용하면서 상승작용을 일으키기 때문이다. 이런 상승작용으로 인하여 기존의 물 추출보다 더 효율적인 추출이 이루어져 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타났다.

2. 면역세포의 생육 측정 결과

세포의 성장 특성상 부유 상태로 성장하는 인간의 면역세포 중 B 세포의 각 samples에 대한 생육도를 측정된 결과, 마황과 복분자 초음파 병행 추출물이 1.0 g/l의 농도에서 각 1.56, 1.57배의 B 세포의 생육을 증진시키는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 마황과 복분자 60°C 물 추출물은 1.0 g/l의 농도에서 각 1.28, 1.22배로 초음파 병행 추출물들보다는 B 세포의 생육이 낮게 나타났다. 그리고 T 세포의 각 samples에 대한 생육도는 마황, 복분자 60°C 초음파 병행 추출물이 1.0 g/l의 농도에서 각 1.60, 1.54배로 T 세포의 생육이 증진되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 마황과 복분자 60°C 물 추출물이 1.0 g/l의 농도에서 각 1.38, 1.36으로 초음파 추출물 보다 낮은 생육 증진을 보이는 것으로 나타났다. 이 결과는 추출 온도로서는 낮은 온도인 60°C에서 초음파 병행 추출을 통해 면역 활성 효과를 높일 수 있는 가능성을 보이고 초음파 병행 추출을 통해 용매 내의 공동화 현상에 의해 기포의 액외 배출로 인한 액체 간 상호 작용으로 추출효율 및 활성 성분들의 효율적인 추출이 가능 했던 것으로 보이며 복분자 추출물이 Phenol성 화합물을 많이 함유하고 다른 추출물들에 비해 상대적으로 큰 분자량과 복합성분으로 구성되어 면역세포에 대한 생육증진을 관찰 할 수 있었던 것으로 사료되어진다.

3. 면역 세포의 활성화 측정 결과

Fig. 1과 Fig. 2는 각각 T 세포와 B 세포를 배양 시간별로 8일 동안 생세포수를 측정하여 생육활성을 나타낸 것이다. T 세포와 B 세포 모두 MTT로 측정하였을 때와 마찬가지로 20~25%의 활성 측진을 나타내었고, T 세포가 더 활성화됨을 보였다. 전체적으로 물 추출물보다는 초음파를 병행한 추출물

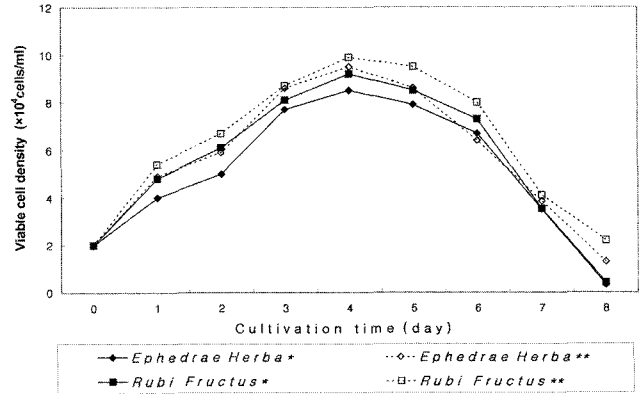


Fig. 1. The growth of viable cell density of human B cell (Raji) in adding *water extracts at 100°C and **water extracts with ultrasonification at 60°C according to cultivation time.

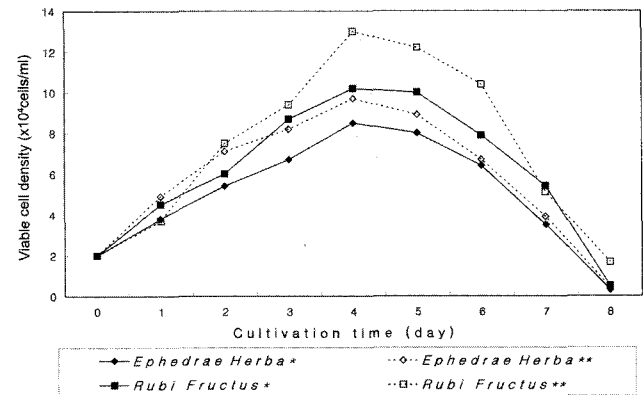


Fig. 2. The growth of viable cell density of human T cell (Jurkat) in adding *water extracts 100°C and **water extracts with ultrasonification at 60°C according to cultivation time.

Table. 2 The effect of the extracts according to extraction low temperature from *Ephedra Herba* and *Rubi Fructus* on the growth of human B cell (Raji) and T cell (Jurkat).

Cell line	Concentration (g/l)					
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
<i>Ephedrae Herba</i>	B cell	112.5 [†]	118.1	120.3	124.6	127.6
	T cell	144.5 [‡]	145.9	148.1	154.3	156.9
<i>Rubi Fructus</i>	B cell	115.7 [†]	120.3	125.7	127.5	138.1
	T cell	143.4 [‡]	146.3	146.7	155.3	160
<i>Rubi Fructus</i>	B cell	111.2	114.8	116.7	119.2	122.4
	T cell	137.4	140.8	149.6	154.3	157.5
<i>Rubi Fructus</i>	B cell	110.7	116.2	124.2	130.1	135.7
	T cell	131.5	140.6	143.8	151.3	154.1

[†]: water extracts at 100, [‡]: water extracts with ultrasonification at 60 ([†], [‡]: % activation compared to the control).

이 더욱 생육을 증진시키는 것으로 나타났다. 또한 T 세포와 B 세포 모두 4일째에서 복분자의 초음파 추출물들이 각각 13×10⁴ cells/ml와 10×10⁴ cells/ml을 나타내어 가장 좋은 면역세포의 활성도를 나타내고 있다.

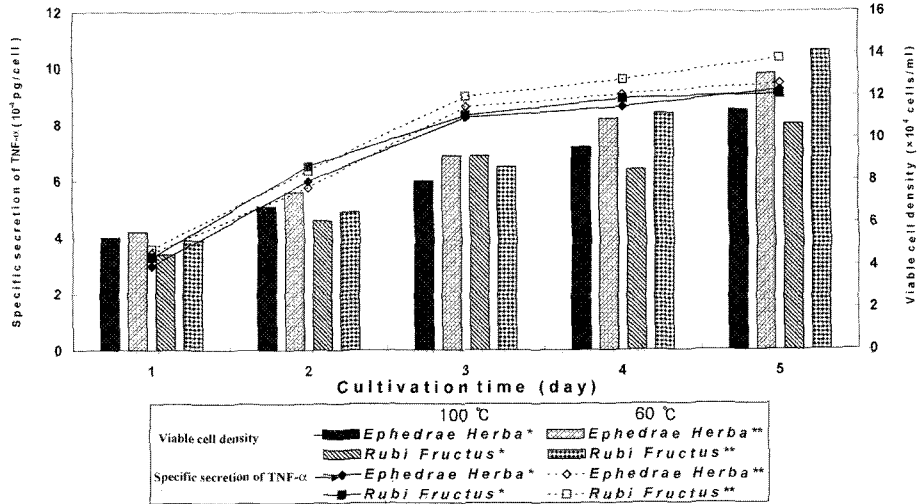


Fig. 3. The relationship between the growth of human Immune T cell (Jurkat) and the secretion of cytokines TNF- α by adding 1.0 mg/ml of the *water extracts at 100°C and **water extracts with ultrasonification at 60°C.

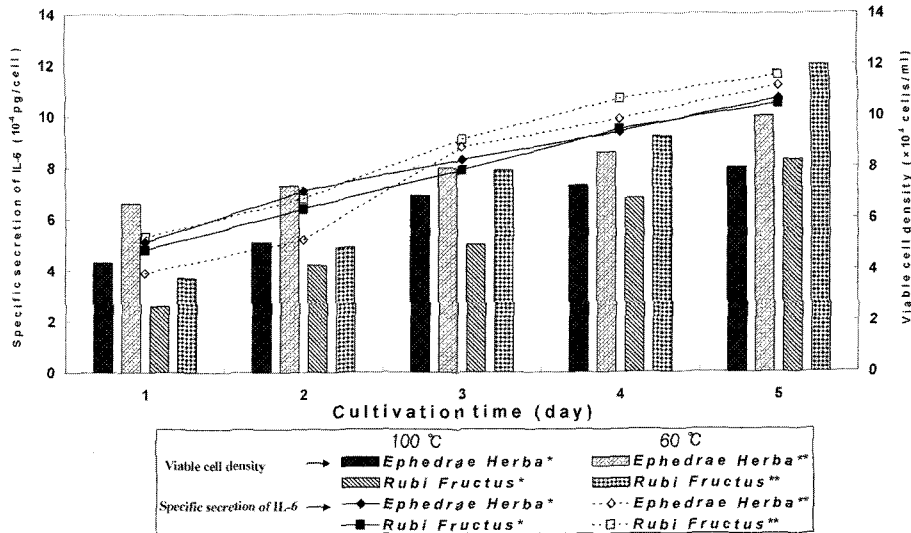


Fig. 4. The relationship between the growth of human Immune T cell (Jurkat) and the secretion of cytokines IL-6 by adding 1.0 mg/ml of the *water extracts at 100°C and **water extracts with ultrasonification 60°C.

4. 면역 세포의 cytokine 분비량 측정 결과

Fig. 3은 5일간의 T 세포의 생육활성과 TNF- α 의 분비량의 변화를 관찰한 것이다. 초음파를 병행 처리한 60°C의 마황과 복분자 추출물이 100°C의 일반 추출물보다 약 2×10^4 cell/ml의 생육활성이 증가하였고 이에 따라 TNF- α 의 분비량도 복분자 초음파 병행 추출물에서 10.0×10^{-4} (pg/cell)으로 가장 높은 증가 효과를 확인하였다.

Fig. 4는 T 세포의 생육활성과 IL-6의 분비량을 측정한 것이다. 복분자 초음파 병행 추출물이 13.9×10^{-4} (pg/cell)로 생육 활성 효과가 가장 크게 나타났으며 초음파 병행 추출물들 대부분이 12.0×10^{-4} (pg/cell) 대의 증진효과를 가져왔다. 그 반면에 초음파를 병행하지 않은 물 추출물은 8.0×10^{-4} (pg/cell)대의 비교적 낮은 증진 효과를 보였다.

5. NK cell의 생육 측정 결과

IL-2 비의존형 NK-92MI cell을 이용하여 인간 면역세포인 T 세포를 이용하여 이 세포들이 분비하는 IL-2를 비롯한 sample 투여로 인한 분비증가로 인해 NK-cell도 그 활성도가 증가하는 지를 관찰하였다. Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 열수 추출물보다는 초음파 병행을 거친 추출물에서 그 cell density와 더불어 그 활성도 또한 더 증가한 것으로 나타났다. 이는 열수 추출물들보다는 초음파를 병행한 추출물이 인간 면역세포인 T 세포의 IL-2를 비롯한 유용활성 물질의 분비를 촉진시켜, 이 같은 결과를 낳은 것으로 사료된다. 앞서 행했던 면역실험들에서도 마찬가지로 물 추출물이 아닌 초음파 병행 추출물이 T 세포의 활성을 증가시켰고, 이 T 세포를 이용한 cytokine 분비량 측정 실험에서도 더 좋은 활성

저온 추출 공정에 의한 마황과 복분자의 면역 활성 증진 효과

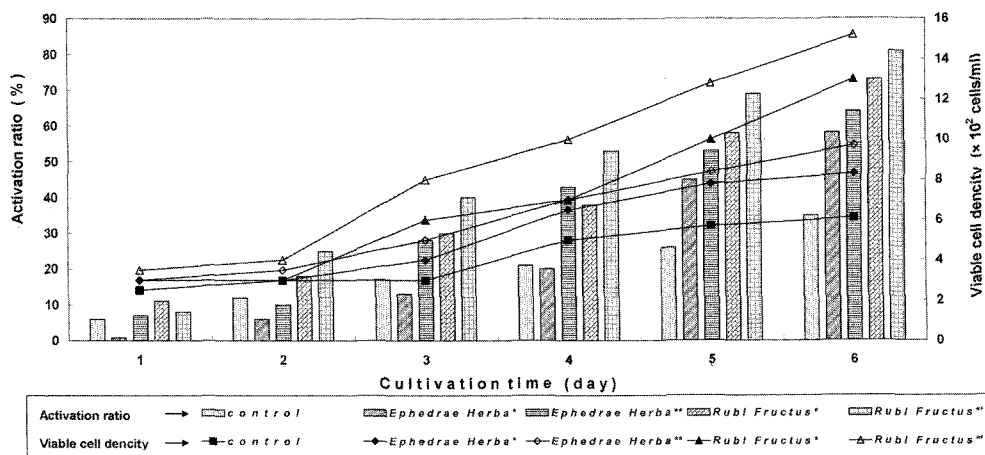


Fig. 5. The NK cell activity and growth of viable cell density of human T (Jurkat) in no adding or adding *water extracts at 100°C and **water extracts with ultrasonification at 60°C.

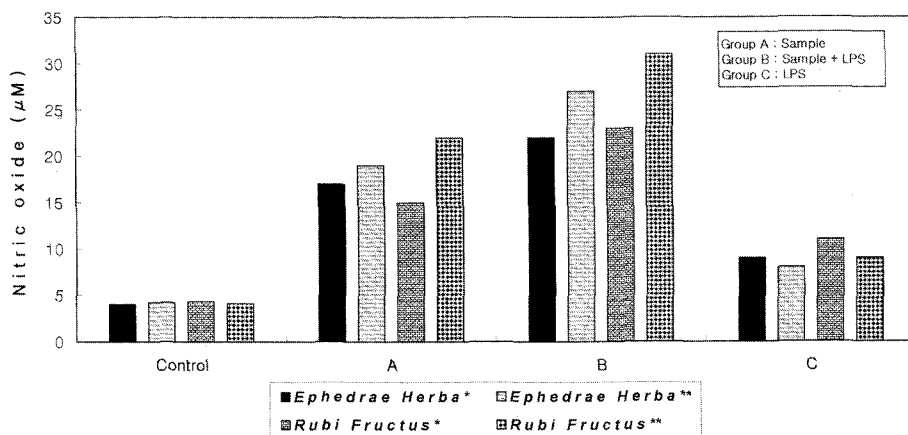


Fig. 6. Stimulation of nitric oxide production by adding 1.0 g/l on J774.1 cell lines (*water extracts at 100°C, **water extracts with ultrasonification at 60°C).

증가를 나타냈다. 우선 T 세포의 활성화 실험에서 T 세포를 8일간 배양한 결과 초음파 병행 추출물이 물 추출물보다 20% 이상의 활성화 증가를 보였고, 특히 T 세포에서 복분자의 초음파 병행 추출물이 물 추출물에 비해 40% 이상의 활성화 증가가 나타났다. 이는 초음파 병행 추출물이 세포에 빠르게 반응하여 세포내의 신호전달 체계에 영향을 미쳐 반응이 빠르게 일어나게 한 것으로 초음파에 의한 상승 효과로 생각되어진다.

이로 인해 주로 IL-2에 의해 그 활성의 변화를 추측하여 보면 IL-2 비의존형 NK-92MI 세포의 활성화 실험에서 인간 면역세포인 T 세포가 분비하는 IL-2와 관계있는 다양한 cytokine의 분비를 촉진하는 초음파 병행 추출물을 유용한 활성화 연구에 접목하여 다양한 형태의 실험을 통하여 초음파 병행 추출물이 기존의 열수 추출물보다 우수한 활성을 확인하고 기능성 식품이나 기능성 소재로서 한층 더 발전적인 기초자료로 사용될 수 있도록 하여야 할 것으로 사료된다.

6. Macrophage의 활성 측정 결과

대식세포를 이용하여 NO⁻ 생성능을 확인한 결과 Fig. 6에 나타내었다. 대식세포의 NOS (nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF-γ, TNF-α와 같은 여러가지 cytokine과 LPS (*E. coli* derived lipopoly-saccharide)와 같은 세균내독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO⁻의 생성능을 확인하였다. 결과에서도 보여지듯이 LPS와 J774.1 세포주에 시료를 처리하여 이틀간 배양한 후, 배양액 중에 NO⁻ 농도를 측정한 결과, 아무처리도 하지 않은 대조군과 비교했을 때 각 시료의 NO⁻ 생산량에는 큰 변화를 관찰할 수가 없었으나, 시료를 단독 처리 하였을 때 마황의 일반 물 추출물은 17 μM을 초음파 병행 추출물은 19 μM의 생산을 확인하였고, 복분자는 각각 15 μM와 22 μM을 나타내었다. 또한 시료와 LPS를 혼합 처리하였을 때 마황은 22 μM와 27 μM을 나타내었고, 복분자는 23 μM와 31 μM을 나타내어 마황과 복분자 모두 LPS와 혼합 처리를 하였을 시 NO⁻의 생성이 증가하는

것을 확인하였다. 또한 물 추출물 보다 초음파 병행 추출물이 NO⁻의 생산을 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 초음파 처리 시 발생한 물리적 타공 현상에 의해 macrophage의 면역 활성화 성분이 다량 추출되어진 것으로 보이며 macrophage는 면역세포로서 타 세포의 활성화와 성장을 방해하는 성분인 NO⁻을 다량 생산하는 것은 면역 활성을 증가시키는 활성이며, macrophage의 NO⁻ 생산을 활성화 시킨 초음파 병행 추출물의 특이 성분에 대한 검색이 추후 진행되어야 할 것으로 생각되어진다.

적 요

마황 (*Ephedrae Herba*)과 복분자 (*Rubus Fructus*)의 추출 수율은 60°C 초음파 병행 추출물이 100°C 물 추출물에 비해 1.6배 이상 높게 추출되었으며, 이는 추출 시 초음파 처리에 의해 액체간의 상호 탈기 작용에 의한 것으로 보이는 작용으로 인하여 기존의 고온 물 추출보다 효율적인 추출이 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 인간 면역 세포는 마황, 복분자 60°C 초음파 병행 추출물이 1.0 g/l의 농도에서 각 1.64, 1.68 배 이상의 생육을 증진시키는 것이 관찰되었고, 단순 100°C 물 추출물 보다 평균 30% 이상의 생육 증진을 확인하였다. 면역 세포의 생육도는 복분자의 60°C 초음파 추출물들이 각각 T, B 세포에서 13×10⁴ cells/ml와 10×10⁴ cells/ml을 나타내어 단순 100°C 물 추출물의 경우와 비교하여 4일째에 높은 면역 세포의 활성도를 나타내었다. cytokine의 분비 실험에서는 T 세포의 IL-6는 복분자 60°C 초음파 병행 추출물이 13.9×10⁻⁴ (pg/cell)로 가장 높은 분비 효과를 나타내었고 물 추출물에 비해 70%의 증진 효과를 확인하였다. 100°C 열수 추출물들보다는 60°C에서 초음파를 병행한 추출물이 인간 면역세포인 T 세포의 IL-2를 비롯한 유용활성 물질의 분비를 촉진시켜, 물 추출물보다 20% 이상의 활성 증가를 보였다. Macrophage의 NO⁻ 활성화 실험에서 복분자는 물추출물은 15 μM와 초음파 추출물은 22 μM을 나타내었고, 복분자와 LPS의 혼합처리 시 23 μM와 31 μM을 나타내어 복분자가 가장 높은 활성을 그리고 초음파 병행 추출에 의한 시료가 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과에 따라 초음파 병행 추

출을 통한 생리활성 효과를 확인하였고, 이외의 새로운 공정의 개발을 위한 추출방법을 확립하여 이를 이용한 다양한 기능성 소재 및 기능성 식품의 제조를 위한 연구가 지속되어야 할 것으로 보인다.

사 사

본 연구논문은 2005년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대 실버생물산업기술연구센터(R12-2001-047-03005-0)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU, Park MH, Han BH (1998) Effect of Ginsenosides from panax gineng on TNF-α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji* 42:296-301
- Chung KW, Kim WI, Hong IK, Park KA (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Applied Chemistry*. 4:149-152.
- Jeong JS, Sin MK (1996) Encyclopedia of oriental medical. *Young Rim Republished*. Seoul. 461.
- Kim MH (2001) Studies on screening biological activities of the essential oils from *Ligusticum temuissimum*. The thesis for the degree of master of agriculture. Kangwon National University. Chunchon.
- Kim TH, Yang KS, Hwang EZ, Park SB (1991) Effect of *Ephedrae Herb* on the Immune Response in Mice. *Korean J. Pharmacogn*. 22:183-191.
- Kim WI, Chung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA (2001) Ultrasound energy effects on solvent extraction of amaranth seed oil. *J. Korean Ind. Eng. Chem*. 12:307-311.
- Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY (2003) Screening of biological activities of extracts from *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Medicinal Crop. Sci*. 11:5-12.
- Michael CA, Domnic AS, Ahne M (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 48:589-601.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, KIM DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY (2003) Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Strapf and *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. 19:113-117.