

발간등록번호

11-1543000-000390-01

화학분류연구기법을 통한 농산자원 유래
향장미백/식이 소재 대량생산 및 제품화

(Large scale production and industrialization of valuable agricultural resources and its application to develop an effective cosmetics)

건국대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “화학분류연구기법을 통한 농산자원 유래 향장미백/식이 소재 대량생산 및 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 1 월 29 일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 이 충 환

연 구 원 : 허 도 연

연 구 원 : 박 혜 민

연 구 원 : 이 선 민

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 이 중 구

협동연구기관명 : (주)액티브온

협동연구책임자 : 조 윤 기

요 약 문

I. 제 목

화학분류연구기법을 통한 농산자원 유래 향장미백/식이소재 대량생산 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 국내 천연 농산자원을 이용한 기능성 향장 및 미백 식이 소재 발굴을 수행하여 고부가가치 농산 자원을 확보하고 이를 통한 천연소재를 상용화·제품화함으로써 친환경, 저자극의 기능성 미용 및 식이제품을 개발하고자 한다. 이를 위해 종자별, 채취 지역별·시기별 함유 성분에 차이가 나는 자원을 첨단 대사체학 연구 기법을 통해 비교·표준화하여 활성 물질을 대량으로 안전하게 공급하고 이를 산업화하는 방법을 모색하고자한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 참싸리 및 근연종의 소재 확보
- 참싸리 및 근연종의 형태분류, 분자분류를 이용한 분류학적 재검증을 통해 소재의 분류학적 정통성 조사 및 계통분류를 통한 소재의 예견적 가치 (Predictive value) 검색
- 조록싸리 종에서 분리한 타이로시네이즈 저해 활성 물질의 구조 확인 및 생리활성 측정
- 산업화 소재의 지속적 공급을 위한 대량 생산체계 기반 구축
- 농산자원으로부터 미백 활성 물질 탐색 및 소재 발굴
- 최적 미백 활성 고부가가치 농산 소재 발굴 및 표준화

IV. 연구개발결과

- 참싸리 및 근연종을 대사체 프로파일링을 통해 데이터베이스 확보
- 참싸리 및 근연종에서의 미백 물질 분리 및 활성 정량
- 대사체 구조분석 및 프로파일링을 통한 표준화 시스템 구축
- 대사체 프로파일링 및 표준화 시스템을 통한 신규물질 규명
- 참싸리 및 근연종의 시기별, 지역별 소재정보 데이터베이스 구축
- 참싸리 및 근연종의 분류학적 검증 및 종자특성 연구
- 최적 발아 온도 선정 및 대량생산 기반의 산업화 기반 마련
- 효능 및 피부안전도 최적화 유지를 위한 소재제형 안정화 시스템 구축
- 향장소재로 개발된 Cho.R.Lipo 및 Cho.R.GTE 제품의 대량생산을 하기 위한 Scale up

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내 서식 다양한 참싸리 자원의 대사체 데이터베이스 구축
- 참싸리 및 근연종의 분류학적 계통연구를 통한 식물소재의 분류학적 재검증 및 연구소재의 정통성 확보
- 참싸리의 종자확보 및 발아특성 연구를 통해 자생식물자원 보존과 이용체계를 확보하고 산업화 소재의 지속적 공급기반 마련
- 농산자원의 새로운 부가가치 창출을 위한 과학적 근거자료의 확보
- 연구결과의 특허화를 통한 산업화 기반권리 확보
- 조록싸리를 이용한 시제품 개발.
- (주)엑티브온의 판매경로를 이용한 제품의 사업화
- 농가의 소득 증진 및, (주)엑티브온의 소득 증가기대

SUMMARY

I. Title

Large scale production and industrialization of valuable agricultural resources and its application to develop an effective cosmetics

II. The Purpose of a R & D

This study aims to carry out excavations for dietary materials and functional cosmetics including skin whitening agents and commercialize eco-friendly, hypoallergenic cosmetics by standardization of bioactive natural agricultural resources using metabolomic technique. Together, we attempt to produce in large quantities of active substances and industrialize them.

III. Content and scope of R & D

- Securement of materials of *Lespedeza* species
- Predicted value search of *Lespedeza* species *via* morphological classification- and molecular taxonomic classification-based taxonomic re-verification
- Structure elucidation of bioactive compounds isolated from *L. maximowiczii* with tyrosinase inhibitory activity
- Construction of large scale process for constant supply of industrial materials
- Excavation of skin whitening agents from agricultural resources
- Excavation and standardization of the high value-added agricultural resources for optimized skin whitening activity

IV. R & D results

- Securement of database for *Lespedeza* species using metabolite profiling
- Isolation of bioactive compounds from *Lespedeza* species with skin whitening activities
- Construction of standardized system using metabolite profiling and identification
- Structure elucidation of novel active compounds using standardized system
- Construction of database for time- and regional-dependent material informations from *Lespedeza* species
- Taxonomic re-verification and the study on seeds characteristics of *Lespedeza* species
- Optimum germination temperature selection and scale-up for the industrialization
- Optimized efficacy and safety for the maintenance to stabilize the formulation system
- Development of scale-up process for cosmetic products such as Cho.R.Lipo and Cho.R.GTE

V. Research Achievements and Utilizing Plan

- Commercialization of metabolites database for *Lespedeza* species in Korea
- Classification re-verification through metabolomic-based on chemotaxonomy and securement of the legitimacy from *Lespedeza* species
- The conservation of native plants and the securement of use management system as well as the arrangement of continuous supply of industrial materials through seed securement and the study on seed germination characterization of *Lespedeza*
- Securement of scientific data for creation of new value-added agricultural resources
- Guarantee of the industrialization rights through the patent
- Product development using *Lespedeza maximowiczii*
- Commercialization of products using the sales route of Activon Co., Ltd.
- Expectation to improve the profit of farms and Activon Co., Ltd

CONTENTS

Chapter 1 Overview of research and development projects

Section 1 Needs for research & development

Section 2 Aim of research & development

Section 3 Contents and scope of research & development

Chapter 2 Status of domestic and international technology development

1. Global level

2. National level

3. Status of national and global research

Chapter 3 Results of research

Section 1 Konkuk University

1. Antioxidant and whitening activity of the methanol extracts of *Lespedeza cyrtobotrya*

2. Aspect of chemotaxonomy

3. Construction of database for *Lespedeza* species using metabolite profiling

4. Morphological classification of the *Lespedeza* species extracts

5. Measurement and comparison of whitening activity materials in *Lespedeza* species

6. Browsing the compounds that contributes to tyrosinase inhibitory activity in *Lespedeza maximowiczii*

7. Measurement of melanin synthesis inhibition rate in ethyl acetate fraction from *Lespedeza maximowiczii*

8. Structure elucidation and activity measurement for active compounds from *Lespedeza maximowiczii*

9. Metabolite profiling in *Lespedeza cyrtobotrya*'s leaves and stems, and database construction

Section 2 Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

1. Verification of *Lespedeza* species based on taxonomic sight

2. Study on the characteristics of seeds in *Lespedeza* species

3. Study on the characteristics for germination of *Lespedeza maximowiczii* seeds

4. Construction of seed cultivation technology foundation for continuous supply

Section 3 Activon Co.,LTD

1. Formulation Development

2. Scale up for producing stabilized materials containing *Lespedeza maximowiczii* extracts

Chapter 4 Goal achievement and contribution of related fields

Chapter 5 Accomplishment and utilization plan of research and development

1. Utilization of research & development results

2. Achievement expectation

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 제 1절 연구개발의 필요성
- 제 2절 연구개발의 목적
- 제 3절 연구개발의 내용 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1. 세계적 수준
- 2. 국내수준
- 3. 국내·외의 연구현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 건국대학교

- 1. 참싸리 메탄올 추출물의 향산화 및 미백효과 확인
- 2. Chemotaxonomy 관점
- 3. 싸리 속 식물의 종별, 채취 지역별·시기별 대사체 프로파일링 및 대사체 데이터베이스 구축
- 4. 싸리 속 식물 줄기 추출물의 표현형 분류
- 5. 싸리 속 식물의 미백 활성물질 함량 비교
- 6. 조록싸리 종에서 타이로시네이즈 저해 활성에 기여하는 컴파운드의 탐색
- 7. 조록싸리 종 잎 부위 ethyl acatate 추출물의 cell line에서 멜라닌 합성 저해율 측정
- 8. 조록싸리 종에서 분리한 생리활성 컴파운드의 구조확인 및 정량적 수준에서의 활성 규명
- 9. 참싸리 식물의 잎과 줄기별 대사체 프로파일링 및 대사체 데이터베이스 구축

제 2절 한국생명공학연구원

- 1. 참싸리 및 근연종의 분류학적 검증
- 2. 참싸리 및 근연종의 종자특성 연구
- 3. 조록싸리 종자의 발아특성 연구
- 4. 종자를 이용한 지속적 공급을 위한 재배기술 기반마련

제 3절 (주) 액티브온

- 1. 개발제형

2. 조록싸리 추출물을 함유하는 안정화 원료의 생산 Scale up

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

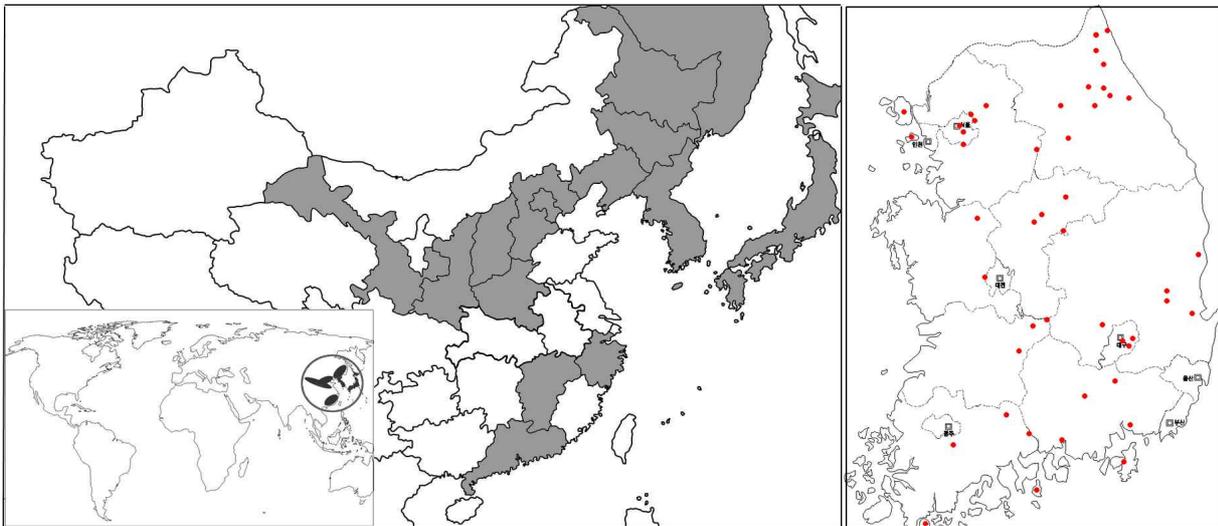
1. 연구개발결과의 활용방안
2. 기대성과

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발의 필요성

○ 원산지 및 기원확인을 통한 시료의 정통성 확보

- 참싸리 (*Lespedeza cyrtobotrya* Miq.)는 콩과에 속하는 관목으로 우리나라와 중국의 동북부, 남동지역, 일본전역 및 러시아 우수리 지역에 분포 (그림참고)하며 표고 100-1,400M 사이의 양지에 자라는 식물로 일상생활과 관련된 소도구의 제작에 널리 활용되어 왔으며 구황 식품 및 약용으로 민간에서 사용되어 왔으나 과학적인 기전의 연구는 미흡한 실정임



[국외분포]

[국내분포]

- 산림자원으로서 참싸리를 비롯한 싸리속 (*Lespedeza*)의 분류학적 연구는 ribosomal DNA의 ITS 구간 염기서열에 기초한 계통연구가 있으나 국내산 싸리속 식물의 전반적인 분류학적 연구는 수행된바 없어 참싸리를 포함한 근연종의 분류학적 연구를 통한 계통학적 위치 연구가 필요함
- 종자를 이용한 원재료의 대량생산체계 구축
 - 생물다양성협약 등 생물자원에 대한 국제적 규제가 강화되는 현실에 비추어볼 때, 국내에 분포하는 자생식물 종자의 확보와 대량증식 개발연구는 기초원자재로서의 중요성이 크며 대량생산체계를 구축하여 천연물의약 산업의 발전을 꾀함
 - 지표물질의 화학합성이 불가능한 천연물의 경우 종자를 이용한 대량 생산을 통한 원재료의 확보를 통해 개발된 기술의 고부가가치 지속적 창출이 필요
- 천연물 의약 산업 경쟁력 확보를 위한 종자의 규격화 및 표준화
 - 자생지의 기후, 토양, 수집시기 등에 따라 천연물의 지표성분 함량이 다르므로 표준화를 위한 참싸리의 품질관리 및 표준화 방안 마련

제 2절. 연구개발의 목적

- 싸리속 (*Lespedeza*) 식물 중 참싸리 및 싸리, 조록싸리의 지역별, 시기별 채집을 통하여 자생지의 기후, 토양, 산지, 채취 장소에 따른 성분의 차이를 분석하여 시료의 표준화
- 싸리속 주요 식물의 분자생물학적 및 분류학적 연구로 기원파악 및 분자계통학적 유연관계 수립
- 참싸리, 싸리, 조록싸리 종자의 대량 확보 및 종자특성 (형태, 미세구조, 발아특성) 연구를 통한 대량생산 기반 구축
- 다운도 종자발아기를 통한 최적 발아온도 조건 탐색 및 대량발아
- 식물생태학적 조건을 고려한 적합지에서 대량생산체계 기반조성
- 국내 농산자원 소재를 이용한 미백 향장 제품 개발

제 3절. 연구개발의 내용 및 범위

- 참싸리 및 근연종의 소재 확보
 - 지표성분 함량의 검증을 위한 참싸리 및 근연종의 국내외 지역별, 시기별 소재 확보
 - 소재의 검증을 위한 증거표본 수집 및 표본을 제작하여 분류학적 재현성을 검증하며 관련된 정보의 D/B 구축
- 참싸리 및 근연종의 분류학적 검증
 - 참싸리 및 근연종의 형태분류, 분자분류를 이용한 분류학적 재검증을 통해 소재의 분류학적 정통성 조사 및 계통분류를 통한 소재의 예견적 가치 (Predictive value) 검색
- 참싸리의 대량 생산체계 확보를 통한 산업화 소재의 지속적 공급체계 구축
 - 참싸리 및 근연종의 종자확보 및 종자발아 최적조건 탐색을 통한 대량재배 방안마련
 - 참싸리 종자의 특성연구 (광학 및 주사전자현미경을 이용한 미세형태, 해부를 통한 종피의 구조)를 통한 물리학적 구조 탐색
 - 종자를 이용한 대량번식 - 지역별 재배조건을 달리하여 지표물질의 최적화 함량조사 및 최적지역 선정을 통한 대량재배로 산업화 기반구축
- 농산자원으로부터 미백 활성 물질 탐색 및 소재 발굴
 - 최적 미백 활성 고부가가치 농산 소재 발굴 및 표준화
 - 참싸리 대량 확보의 최적화 방안 마련 및 신규고기능성 향장품의 산업화 시스템 구축
 - 참싸리 유래 미백활성물질을 이용한 향장 식이제품 소재 개발 시스템 구축 및 산업화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준

○ 식물자원 및 분류학적 연구

- 오랜 진화의 결과체인 식물의 분류학적 연구는 식물의 진화 연구와 더불어 식물종간의 유연관계를 파악하고 근연관계를 규명하는 연구로서 형태학적, 화학적, 화분학적 분류연구와 더불어 최근 유전자의 염기서열을 이용한 분자분류학적 연구를 통한 식물의 기원 및 계통연구가 활발히 이루어지고 있음

○ 식물자원으로서 종자확보 및 종자특성 연구

- 미국, 영국 및 일본 등의 선진국들은 오래전부터 종자은행을 구축하여 자국의 종자뿐만 아니라 세계 여러 나라의 식물종자를 확보하여 다양한 종자의 유전적 다양성을 이용한 작물개량을 통한 식량증산, 화훼 육종 등을 통한 고부가가치 상품을 개발해 왔으며 오랜 기간 동안 축적된 종자관련 연구 (종자형태 및 발아, 현지외 보존) 기초지식의 활용과 기초지식 이용체계가 잘 갖추어져 있음

※ 영국 Millennium seed bank (25,000종), 미국국립종자은행(500,000만점) 종자확보 및 종자특성 연구에 대한 정보 제공

2. 국내수준

○ 식물자원 및 분류학적 연구

- 국토면적에 비해 비교적 다양한 식물자원을 보유하며 식물자원의 이용측면에서 오랜 역사를 보유하고 있으나 식물자원이 제한적 분포와 지속적 채취로 인한 식물자원의 고갈이 심각한 문제로 대두되고 있으며 자연자원의 대체를 위한 대량생산을 기반구축의 활성화를 통한 지속적 이용과 식물자원 보존이 시급함
- 식물분류학적 연구현황은 세계적인 연구 추세에 따른 분자 분류학 등의 방법을 이용한 분류학적인 연구가 수행되고 있어 방법론적인 면에서는 뒤지지 않지만 국내 자생식물의 기원연구와 식물자원의 분포, 특산식물의 범위, 멸종 및 희귀식물의 파악과 보존에 대한 연구현황은 미흡함

○ 식물자원으로서 종자확보 및 종자특성 연구

- 한국은 곡물류의 종자은행의 경우, 구미 및 일본의 종자은행 대비 약 25%에 해당하는 종자를 소유하고 있음
- 야생식물의 종자은행의 경우 한국은 구미 및 일본 등과 같은 선진국에 비해 약 10% 미만의 종자만을 확보하고 있는 실정임
- 종자의 장기저장, 발아생리 등과 같은 특성에 대한 연구는 선진국의 경우 이미 많은 기술력을 확보하여 인터넷을 경유하여 연구자 혹은 일반인에게 노하우를 서비스하고 있으나 국내의 경우 농진청 종자은행을 제외한 타 종자은행은 최근에 구축되어 이러한 연구

가 매우 미진한 상태임

- 국내약용 식물의 재배 및 대량생산 기술은 생산 경제성 면에서 중국과 비교가 되지 않아 위축 되고 있으며 종자를 이용한 유용식물의 대량 생산체계 구축을 통한 지속적 산업화 소재 확보 및 식물자원 보존 노력이 필요함

3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Millennium Seed Bank, UK.	자국 및 전세계 식물 종자 10% 확보	종자특성 연구를 통한 기초연구지식 축적, 기후변화 및 활용연구
Mie University, Japan	melanin합성에 관여하는 효소인 tyrosinase를 저해하는 karamatsu, acacia Morishima 추출물의 활성 보고	천연물질 유래 tyrosinase활성효과 입증
University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa	<i>Sideroxylon inerme</i> 에서 추출한 epigallocatechin gallate, procyanidin B1.의 tyrosinase 활성억제 보고	천연물질 유래 tyrosinase활성효과 입증
Monash University, Malaysia	생강추출물의 tyrosinase 활성억제	천연물질 유래 tyrosinase활성효과 입증
중부대학교 화장품과학과	상백피 추출물의 항산화 활성 및 미백효과	상백피를 이용한 미백활성 화장품개발
제주대학교, 코스맥스(주)	제주도 자생식물들에 대한 미백 및 항산화 효능 탐색	기능성 제품으로 생산 중

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 건국대학교

1. 참싸리 메탄올 추출물의 항산화 및 미백효과 확인

실험에 사용한 참싸리 샘플은 표 1.과 같으며 채집 장소 및 지역이 각기 다른 23개로 잎 부위, 줄기 부위를 각각 따로 메탄올로 추출하여 사용하였다.

(1) 샘플 추출 방법 및 실험 설계

- 샘플 2g을 코니칼 튜브에 칭량하여 메탄올 30ml을 넣고 28℃, 150rpm에서 하루 동안 교반하여 추출함.
- 코니칼 튜브를 4℃, 5000rpm에서 5분간 원심분리 하여 부유물은 침전시키고, 상등액 15ml씩을 유리 용기에 옮겨 진공 하에서 농축시킴.
- 건조된 메탄올 추출물을 다시 메탄올로 희석하여 500ppm의 동일 농도로 맞추어 LC/MS profiling 수행함.
- LC-MS 이용하여 얻은 metabolome 데이터들을 Principal component Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis(PLS-DA) 등의 다변량 통계기법을 통해 채집 시기 및 지역에 따른 metabolite의 차이를 확인. 본 연구에서는 XCMS, Metalign 등 소프트웨어를 통해 데이터의 표준화 작업을 수행, 기기분석을 통해 얻어진 피크정보를 excel sheet로 모든 데이터를 수치화함으로써 통계적인 분석 수행함.

① 항산화 활성 (Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium Salt, ABTS)

- ABTS stock 용액을 OD값 0.7로 희석하여 ABTS 용액 제조.
- 125ppm의 동일 농도로 맞춘 참싸리 샘플 20μL와 ABTS용액 180μL를 섞어 암실에서 20분 반응시킴.
- Microplate reader를 이용하여 750nm에서 흡광도 측정.

항산화 활성 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 시약을 에탄올로 희석하여 OD값 1로 희석하여 DPPH 용액 제조.
- 500ppm의 동일 농도로 맞춘 참싸리 샘플 20μl와 DPPH용액 180μl를 섞어 암실에서 20분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도 측정.

② 미백 활성 (Tyrosinase 효소 저해 활성)

- 2500ppm의 동일 농도로 맞춘 참싸리 샘플을 96 well plate에 주입.
- 기질로 작용하는 1.5mM의 L-Tyrosine 36μl를 0.1M sodium phosphate buffer 153μl로 pH를 6.5로 맞춰 줌.
- 2500unit/ml Tyrosinase enzyme을 6μl씩 넣어 암실에서 20분 간 반응시킴.
- Microplate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도 측정.

표 1. 참싸리 채집 리스트

No.	Korea Name	Scientific name	Date	Collection Site	Collector	부위
1	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-09	충청남도 공주시 반포면	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
2	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
3	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
4	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 고성군 대가면 대곡산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
5	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 통영시	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
6	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-21	경상남도 거제시	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
7	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-30	충청북도 영동군 용화면 민주지산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
8	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-07-30	전라북도 무주군 적상면 적상산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
9	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-01	경상북도 포항시 남구 오천읍 운제산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
10	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-05	전라남도 광양시 옥용면 백운산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
11	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-05	광주 광산구 왕동저수지	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
12	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-06	전라남도 장성군 북하면 대각산 팔당사 근처	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
13	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-06	전라북도 정읍시 용동면 수암지	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
14	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-12	충청북도 단양군 단양읍	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
15	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 영주시 가흥2동	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
16	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 봉곡군 춘양면	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
17	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-21	제주도 제주시 봉개동 명도암교차로-버드내교차로 중간	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
18	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-08-27	강원도 동해시	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
19	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-09-08	경기도 남양주시 화도읍 약수암	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
20	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-09-08	강원도 춘천시 서면 삼악산	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
21	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-09-09	강원도 춘천시 동면 평촌리	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
22	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-09-09	강원도 원주시 신림면 성남리	Joongku Lee et al.	잎, 줄기
23	참싸리	<i>Lespedeza crytobotrya</i>	2010-09-10	경기도 안성시 죽산면 칠장리	Joongku Lee et al.	잎, 줄기

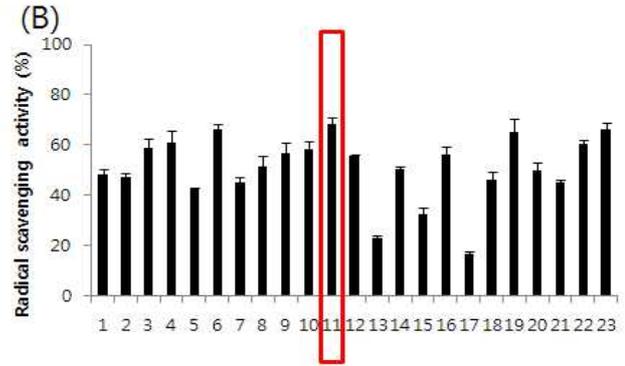
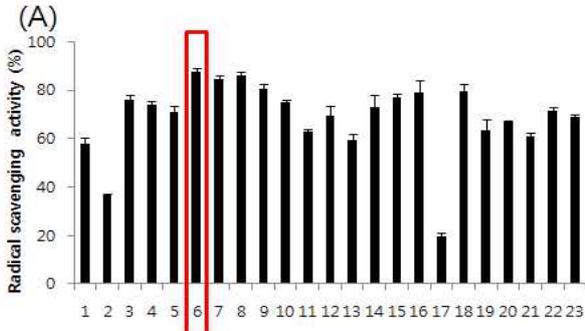


그림 1. 참싸리 추출물 50 µg/ml의 DPPH 실험. (A) 잎, (B) 줄기.

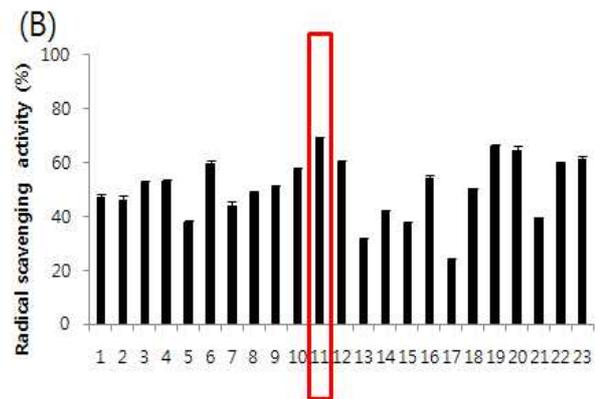
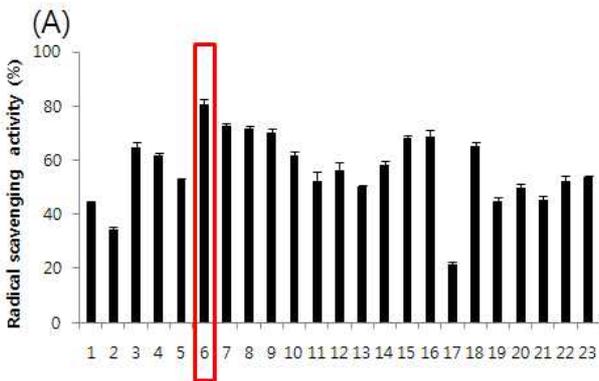


그림 2. 참싸리 추출물 12.5 µg/ml의 ABTS 실험. (A) 잎, (B) 줄기.

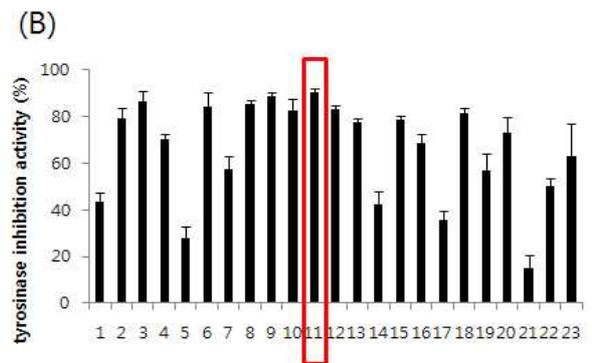
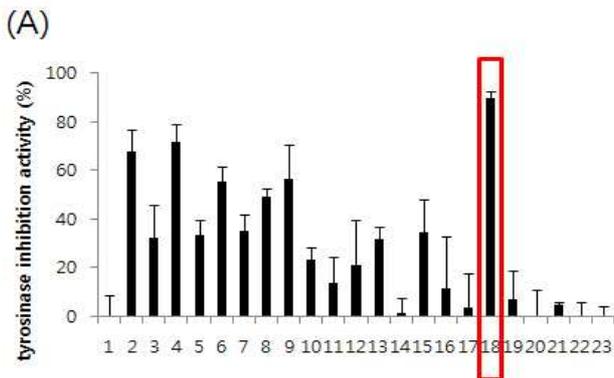


그림 3. 참싸리 추출물 250 µg/ml의 tyrosinase 저해 실험. (A) 잎, (B) 줄기.

그림 1 과 그림 2의 항산화 실험 결과에 따르면 잎의 경우 6번이, 줄기의 경우 11번이 ABTS 및 DPPH 실험에서 가장 큰 Radical scavenging activity (%)를 보인다.

그림 3의 tyrosinase 저해 활성 실험 결과에 따르면 잎의 경우 18번이, 줄기의 경우 11번이

가장 큰 tyrosinase inhibition activity (%)를 보인다.

결론을 표로 정리하면 표 2. 와 같다.

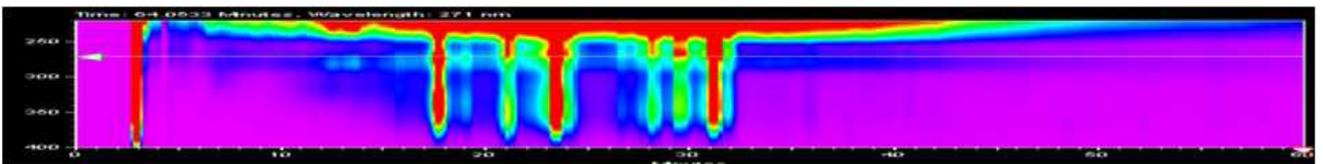
표 2. ABTS, DPPH, tyrosinase 저해 시험법에 의해 고활성을 나타내는 시료.

	고활성	비고
잎6	ABTS, DPPH	항산화 활성 좋음
잎18	tyrosinase 저해	미백활성 좋음
줄기11	ABTS, DPPH, tyrosinase 저해	항산화 및 미백활성 좋음

이 결과를 바탕으로 잎 6, 줄기 11번에서 항산화 활성을 크게 보이는 물질을 찾고 잎 18번, 줄기 11번에서 미백 활성을 크게 나타내는 물질을 찾하고자 preparative HPLC를 수행하였다.

(2) 고활성 샘플에서의 활성에 기여하는 물질의 탐색

(A)



(B)

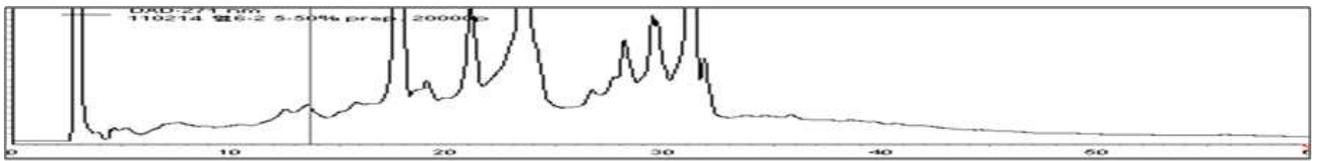


그림 4. 잎 6번 ethyl acetate 추출물의 preparative HPLC profiling의 (A) UV 및 (B) 크로마토그램.

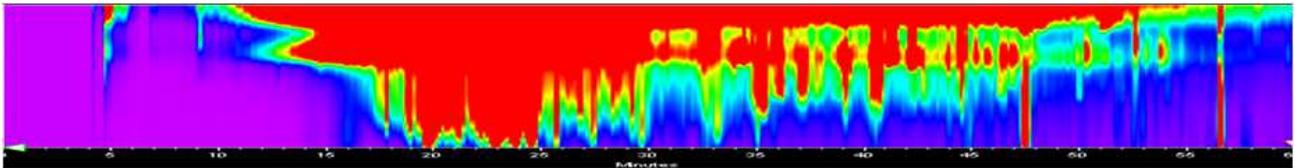
메탄올 추출물 상태에서 항산화 활성이 좋았던 잎 6번을 ethyl acetate 용매로 분획 한 후 HPLC로 profiling 하고 detector를 통과한 후 나오는 물질을 30초 단위로 모아 ABTS 용액으로 활성을 측정하였다. 그 결과 크로마토그램에서 14.5분에 해당하는 물질의 Radical scavenging activity (%)가 80%로 제일 좋았으며 그 물질을 LC-IT-MS를 이용하여 분석 한 결과 다음과 같은 정보를 얻었다.

표 3의 정보와 LC-MS-MS를 통해 나온 MS 스펙트럼을 NIST로 검색한 결과 활성을 나타내는 물질은 이미 항산화 활성이 보고 된 epicatechin 으로 밝혀졌다.

표 3. 잎 6번의 Ethyl acetate 추출물에서 항산화 활성을 나타내는 물질들의 LC-IT-MS 값.

LC/MS Rt(min)	HPLC Rt(min)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MW	MS fragmentation (+)	MS fragmentation (-)	UV λ _{max} (nm)
8	14	291	289	290	291>123>105,77,95 >247>135,121,149,163,177,191,229 >139,165	289>245>203>161,175,188 >205	234, 278
	14.5	291	289	290	291>123>105,77,95 >247>135,121,149,163,177,191,229 >139,165	289>245>203>161,175,188 >205	
	15	291	289	290	291>123>105,77,95 >247>135,121,149,163,177,191,229 >139,165	289>245>203>161,175,188 >205	
	15.5	291	289	290	291>123>105,77,95 >247>135,121,149,163,177,107 >139,165	289>245>203>161,175,188 >205	
	16	291	289	290	291>123>105,77,95 >247>135,121,149,163,177,191,229 >139,165	289>245>203>161,175,188 >205	

(A)



(B)

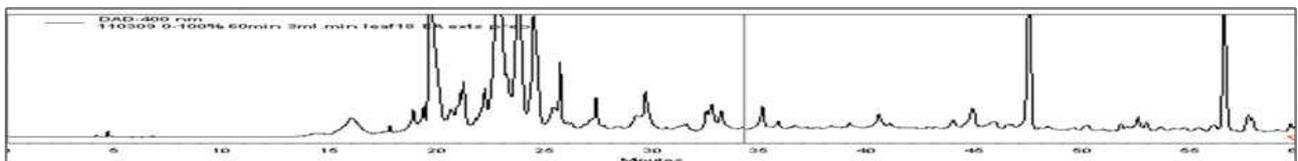


그림 5. 잎 18번 ethyl acetate 추출물의 preparative HPLC profiling의 (A) UV 및 (B) 크로마토그램.

메탄올 추출물 상태에서 tyrosinase 저해 활성이 좋았던 잎 18번을 ethyl acetate 용매로 파티션 한 후 HPLC로 profiling 하고 detector를 통과한 후 나오는 물질을 30초 단위로 모아 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 크로마토그램 상 39분, 40분에 해당하는 물질의 Tyrosinase inhibition activity (%)가 80%로 제일 좋았으며 그 물질을 LC-IT-MS를 이용하여 분석 한 결과 다음과 같은 정보를 얻었다.

표 4. 앞18번 Ethyl acetate 추출물에서 미백 활성을 나타내는 물질들의 LC-IT-MS 값.

LC/MS Rt(min)	HPLC Rt(min)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MW	MS fragmentation (+)	MS fragmentation (-)	UV λ _{max} (nm)
27	38.5	357	355	356			232, 293
	39	357	355	356	357>339>283 >301	355>193>124,125,149 >161	232, 293
	39.5	357	355	356			232, 293
	40	327	325	326	327>191>173>145 >205,271	325>189>134>106,105 >183>119	231, 286
		357	355	356			232, 293
	40.5	355	353	354	355>299>165,281	353>219>133,151,176 >199,267,285,309,310,325	233, 265
		357	355	356			232, 293
41	325	323	324	325>269>251,241,215,159	323>308>253,265 >254>209,225,226	237, 285	

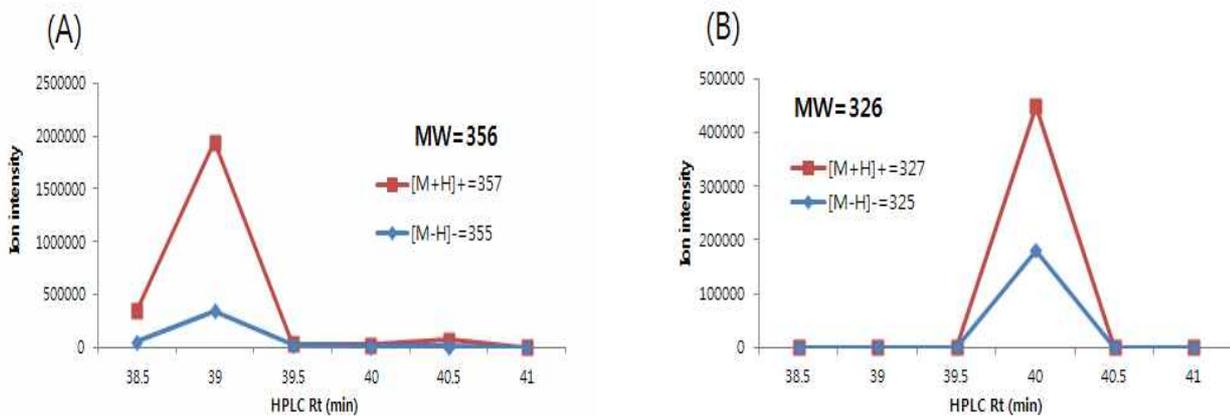


그림 6. 앞 18번 Ethyl acetate 추출물의 HPLC retention time에 따른 분자량 및 ion intensity 값. (A) HPLC에서 39분에 해당되는 물질, (B) HPLC에서 40분에 해당되는 물질.

위의 결과로 보아 HPLC profiling 결과 39분에서 tyrosinase 저해 활성을 나타내는 물질은 분자량 356을 가지며, 40분에서 tyrosinase 저해 활성을 나타내는 물질은 분자량 326을 갖는 물질임을 밝혀내었다. Combined chemical dictionary 검색 결과 분자량 356에 해당하는 물질은 그림 7.과 같은 Lespeyrtin D1임을 밝혀내었다. Lespeyrtin D1은 참싸리에서 이미 보고되었던 물질이며 J. Nat. Prod. 2009, 72, 63-71(Melanin Synthesis Inhibitors from *Lespedeza Cytrototrya*)에 따르면 Normal Human Epidermal Melanocyte 셀에서 IC₅₀=2.1(positive control hydroquinone IC₅₀=2.2)를 갖는 물질임이 보고되었다.

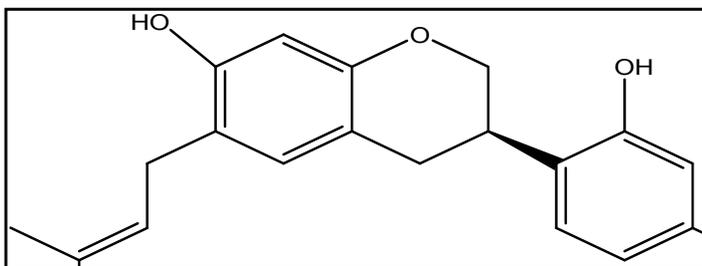


그림 7. Lespeyrtin D1의 구조

HPLC profiling 결과 40분에서 tyrosinase 저해 활성을 나타내는 물질은 분자량 326을 가지며 Combined chemical dictionary 검색 결과 분자량 326에 해당하는 물질은 다음과 같은 Manuifolin H임을 밝혀내었다. Manuifolin H는 콩과 식물인 *Maackia tenuifolia*에서 이미 보고된 물질이며 *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 5, pp. 903-905, 1998 (Three Prenylated Isoflavans From *Maackia tenuifolia*)에 따르면 그림8 과 같은 구조를 갖는다.

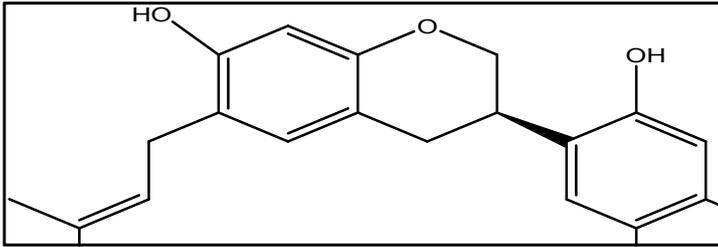


그림 8. Manuifolin H의 구조

그리고 앞 18번의 추출물에서 분리된 물질이 Manuifolin H임을 구조적으로 증명하기 위해, $^1\text{H-NMR}$ 을 분석 하였다.

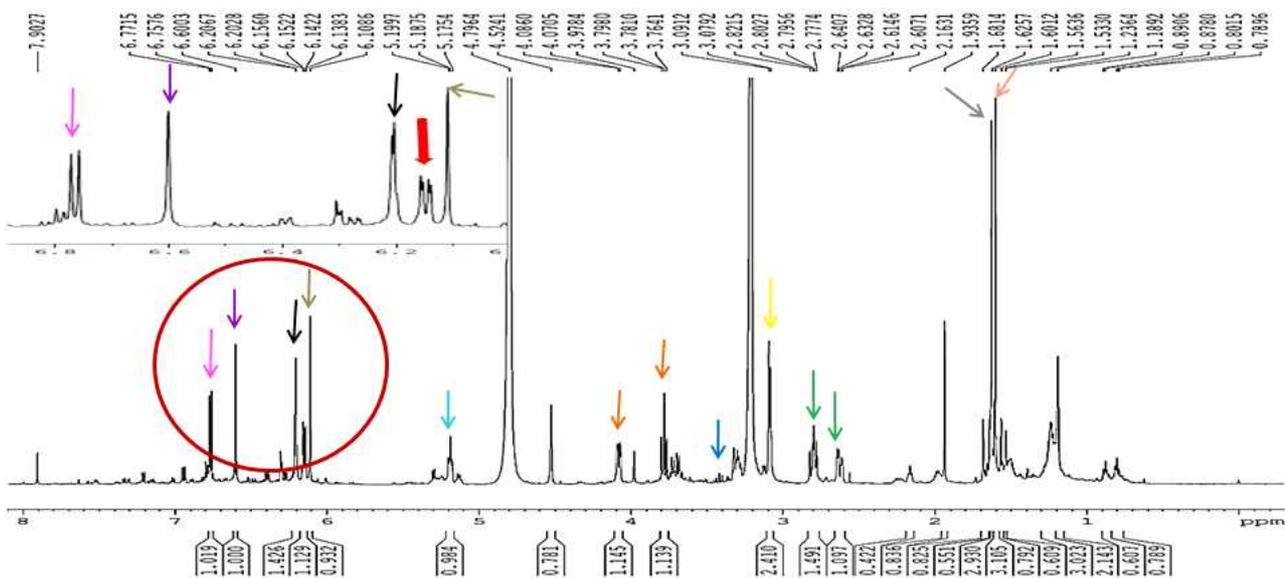


그림 9. 앞 18번 Ethyl acetate 추출물에서 분리한 Manuifolin H의 $^1\text{H-NMR}$ 데이터

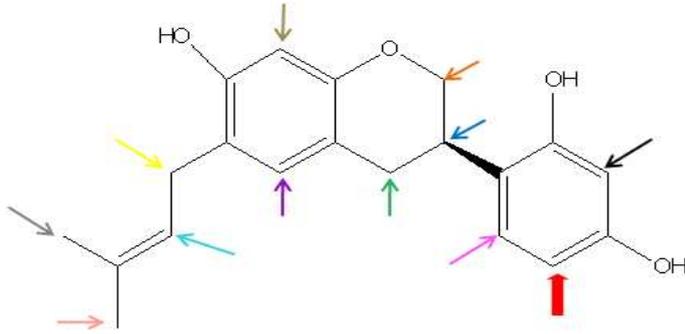


그림 10. Manuifolin H 구조에 해당하는 $^1\text{H-NMR}$ 피크의 확인.

Preperative HPLC를 통해 줄기 11번에서 항산화 활성을 크게 나타냈던 물질은 epicatechin이며, 미백 활성에 크게 기여했던 물질은 Dalbergiodin, Benzofuran, Haginin A임을 밝혀내었다.

그리고 기존에 항산화 및 미백활성이 보고되었던 몇 가지 물질 (Eriodictyol, Dalbergiodin, Benzofuran, Haginin A, Epicatechin, Lespedezol D1, Manuifolin H)을 LC/MS 상에서 정량하였다. Eriodictyol, Dalbergiodin, Benzofuran, Haginin A는 이온 추출법을 통해 샘플 상에서 정량한 면적값을 standard curve의 회귀 방정식에 대입함으로써 시료 안에 함유한 농도(ppm)을 구하였으며, standard 물질이 없는 Epicatechin, Lespedezol D1, Manuifolin H는 시료 상에서의 상대적인 면적값만 구하였다.

표 5. 참싸리 샘플 안에 함유하는 Eriodictyol, Dalbergiodin, Benzofuran, Haginin A의 농도(ppm). (A)잎, (B)줄기.

(A)

Compound No.	1. Eriodictyol	2. Dalbergiodin	3. Benzofuran	4. Haginin A
1	21.5	3.3		
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14	64.2	8.2		
15				
16	27.4	5.8		
17	6.7			
18				
19	63.3	3.2		
20	64.2	1.9		
21	54.7	1.4		
22	59.8	2		
23	50.6	1.1		

(B)

Compound No.	1. Eriodictyol	2. Dalbergiodin	3. Benzofuran	4. Haginin A
1	1.1	0.1		2.1
2				
3				
4				3
5				
6				
7				
8		1.7	0.3	11.3
9		1.5	0.3	2.5
10		1.1		
11		5.8	0.3	12.9
12		3.3	0.3	5.4
13		3.5	0.3	7.9
14	21.8	2.9		
15		3		2.5
16	2.6	0.9		
17		1.5		
18		0.9		
19	17	0.4		
20	3.8	9.3	0.3	17.1
21	21.4	1.3		
22	14.4	1		5.9
23	12	0.8		2.7

표 6. 참싸리 샘플 안에 함유하는 Epicatechin, Lespecyrtn D1, Manuifolin H의 상대적인 면적값. A)잎, (B)줄기.

(A)

Compound No.	1. Epicatechin	2. Lespecyrtn D1	3. Manuifolin H
1	75806		
2	60958		
3	213425		
4	188289		
5	130407		
6	131030		
7	130707		
8	145946		
9	176211		
10	120126		
11	117353		
12	116182		
13	100690		
14	160840		
15	122669		
16	274467		
17			
18	132944	31273	31585
19	114736		
20	150064		
21	91826		
22	147543		
23	181738		

(B)

Compound No.	1. Epicatechin	2. Lespecyrtn D1	3. Manuifolin H
1	87069		
2	134256		
3	287164		
4	287276		
5	158511		
6	225722		
7	118282		
8	126828		
9	246871		
10	249734		
11	186138		
12	181993		
13	122516		
14	148952		
15	109981		
16	206582		
17	56462		
18	309562	108096	
19	635612	288535	
20	73975	296016	
21	245198		
22	517823	42930	
23	520240	41521	

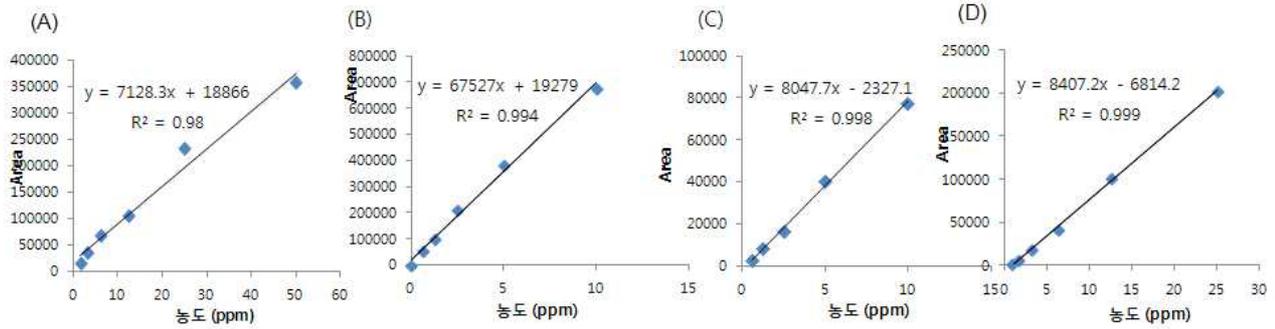


그림 11. Standard compound로 그린 standard curve. (A) Eriodictyol, (B) Dalbergiodin, (C) Benzofuran, (D) Haginin A.

2. Chemotaxonomy 관점

- 채취 시기 및 장소에 따른 metabolite의 차이 규명.



그림 12. 통계분석 과정.

채취 시기 및 장소가 다른 23개의 참싸리 잎, 그리고 참싸리 줄기 샘플의 LC-IT-MS 분석 후 얻은 metabolome 데이터들을 Principal component Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis(PLS-DA) 등의 다변량 통계기법을 통해 채취 시기 및 장소별 변수를 확인. 본 연구에서는 XCMS 소프트웨어를 통해 데이터의 표준화 작업을 수행, 기기분석을 통해 얻어진 피크정보를 excel sheet로 모든 데이터를 수치화함으로써 통계적인 분석 수행함.

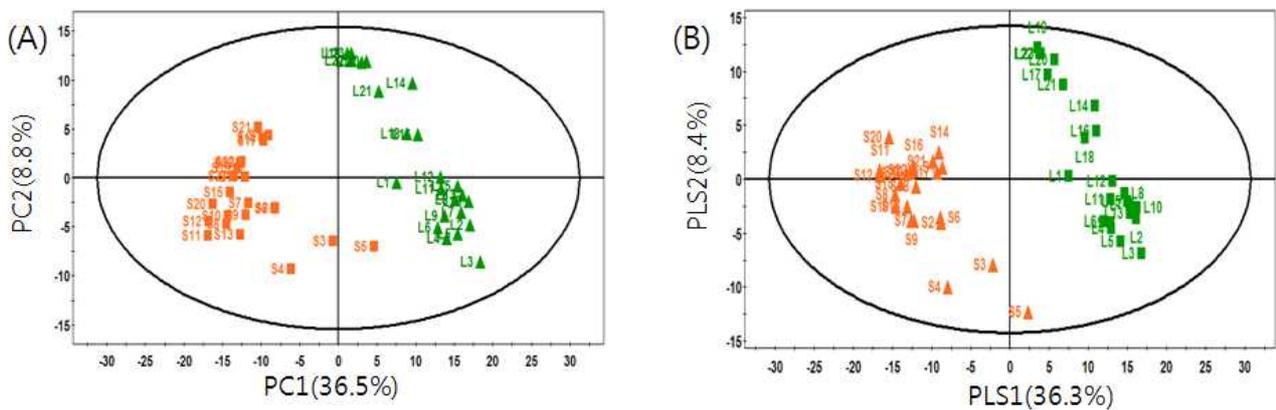


그림 13. 채취 시기 및 장소가 다른 23개의 참싸리 잎과 23개의 참싸리 줄기의 다변량 통계분석. (A) PCA, (B) PLS-DA (주황색 : 줄기, 연두색 : 잎)

그림 13.의 결과와 같이 잎, 줄기의 metabolite들은 PC1에 의해 크게 나뉘었으며 잎, 줄기를 나누는 변수를 확인하였다.

표 7. 그림 13.의 PCA score plot 상에서 잎, 줄기를 구분 짓는 metabolites.

No.	Rt (min)	m/z (-)	λ_{max} (nm)	p value	함량 많은 부위
1	6.9	289	221	0.004173	잎 epicatechin
2	10.7	563	222, 272, 338	0	잎
3	12.3	593	222	0	잎
4	12.4	579	221	0.043778	잎
5	13.2	577	225, 265, 344	0	잎
6	14	271	222, 283	0.036754	잎
7	14.7	635	221	0.000003	잎
8	15	269	260		줄기
9	15.2	431 285 619	222	0.000006 0.000001 0	잎
10	16	619	221	0	
11	17.1	241	223, 320	0.005226	줄기 Benzofuran
12	18.3	313	235	0.000419	줄기
13	18.5	315	226	0.001779	줄기
14	19	269	229	0.000244	줄기
15	19.6	301	226, 233	0.00604	줄기
16	20.6	331	227, 334	0.004405	줄기
17	21.9	299	235, 323	0.003176	줄기 Haginin A

23개의 잎 샘플만 가지고 통계분석을 하였을 때, 그림 14(A) 과 같은 결과를 얻었으며 채취 시기(여름 : 7-8월, 가을 : 9월)별로 어느 정도 나누어지는 듯 보였으며 또한 23개의 줄기 샘플만 가지고 통계분석을 하였을 때, 그림 14(B) 와 같은 결과를 얻었으며 줄기 또한 채취시기에 따라 어느 정도 나누어지는 듯 했다.

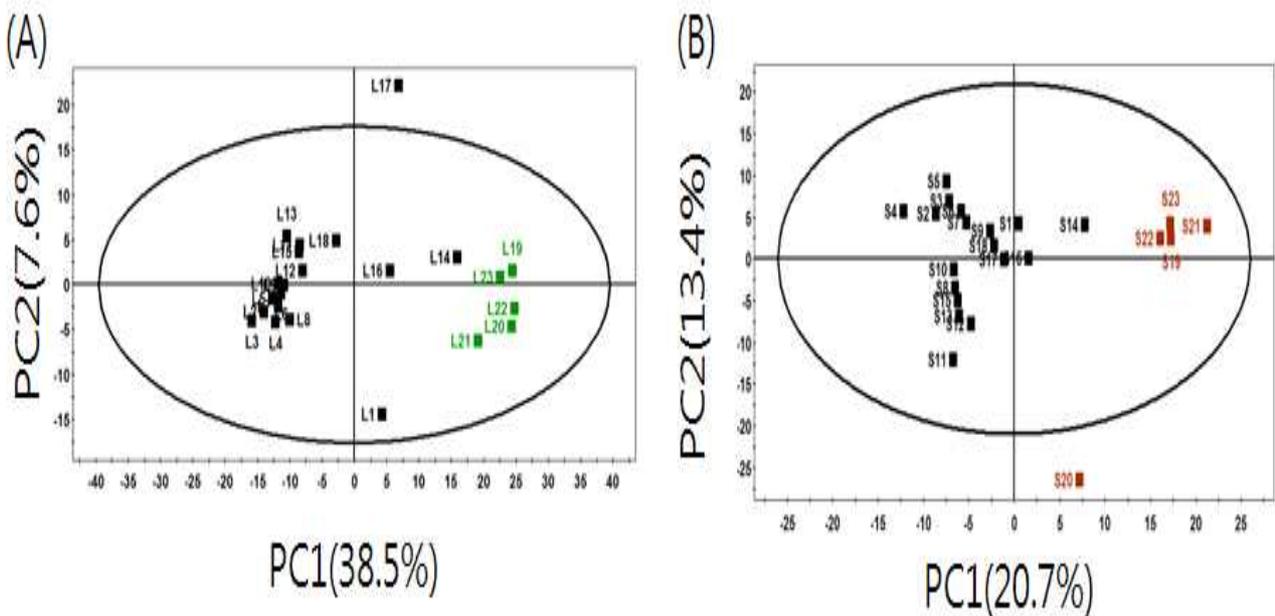


그림 14. 채취 시기 및 장소가 다른 23개 참싸리 샘플의 PCA 통계분석 결과. (A) 잎, (B) 줄기, (검정색 : 여름(7-8월), 색 원(9월))

그림 14의 결과를 채취 장소별, 위도별로 지도상에 나타내었을 때 다음의 그림 15와 같은 결과를 얻었다.

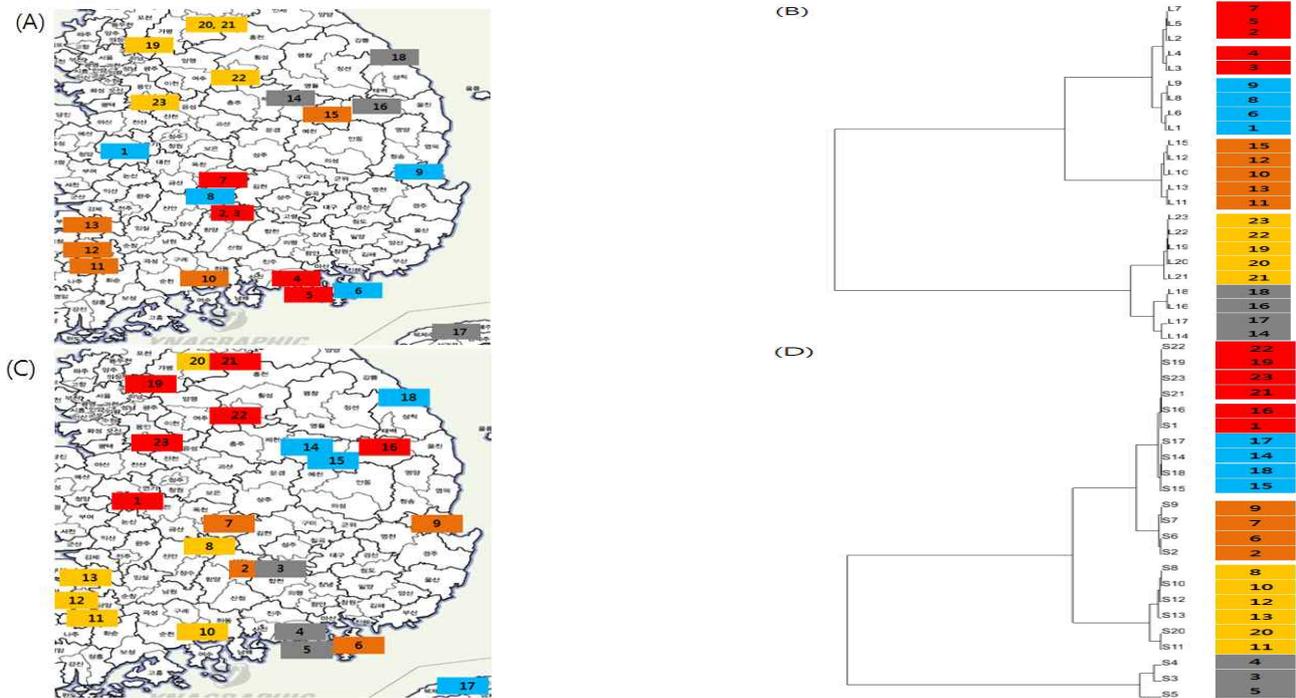


그림 15. PCA score plot 상에 나타난 샘플 번호를 지도상에서 표시함. (A)와 (B)줄기. ;각각의 번호는 샘플 번호를 의미함.

그림 15의 결과로 보아 잎, 줄기 모두 채취 장소와 metabolite 사이의 상관관계는 없는 것으로 보인다. 그리고 활성이 보고된 Eriodictyol, Dalbergiodin, Benzofuran, Haginin A, 즉 활성을 나타내는 물질과 LC-IT-MS 의 PCA 통계분석 결과(Chemotaxonomy) 간의 상관관계를 규명해 보고자 하였다.

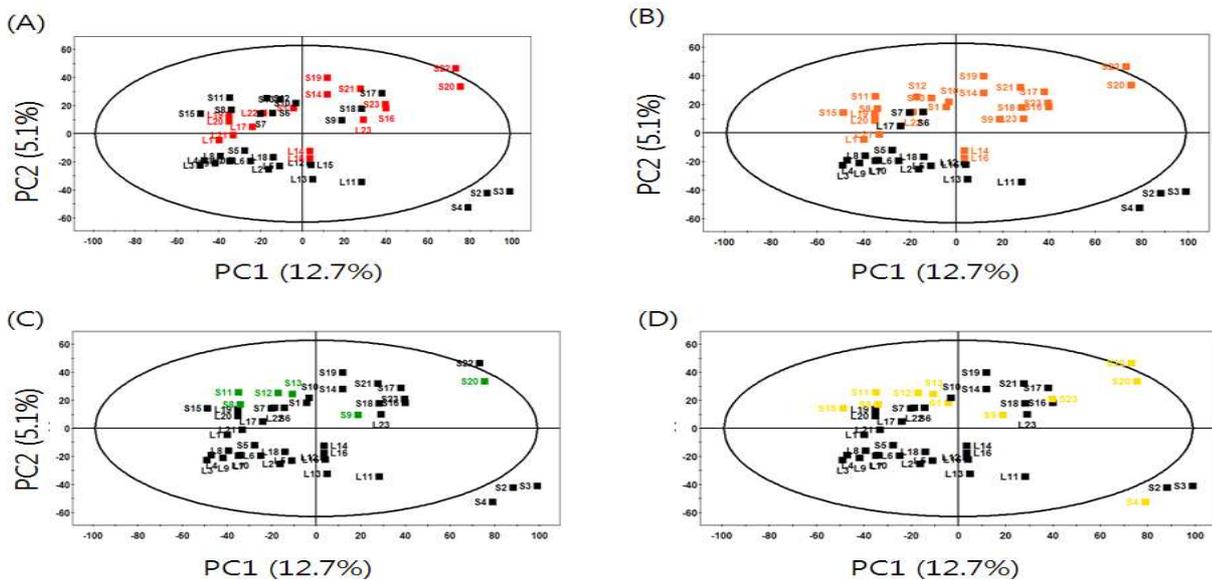


그림 16. 표 5.에서 정량한 값을 토대로 물질의 유무로 색을 지정하였음. (A) Eriodictyol, (B) Dalbergiodin, (C) Benzofuran, (D) Haginin A (검정색 : 물질 없음, 색 : 물질 있음)

그림 16에서 나타난 것 같이 각각의 활성물질이 있는 샘플이 뚜렷하게 클러스터링 되는 경향을 보이지는 않으므로 각각의 활성물질의 유무가 chemotaxonomy에 크게 영향을 주지는 않는다.

한국생명공학연구원으로부터 유전자기법에 기반한 ITS sequence 데이터를 받아 메타볼로믹스적인 접근이 유전자적인 접근과 얼마나 상관관계가 있는지 알아보려고 했다.

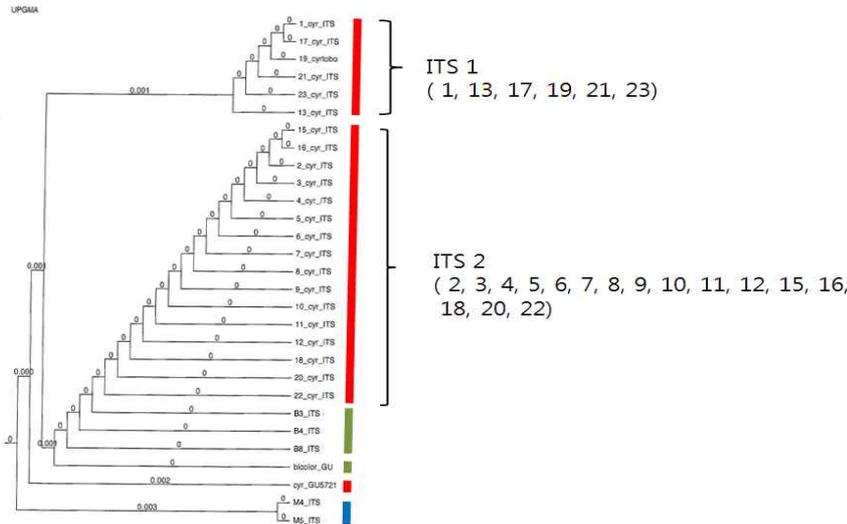


그림 17. 유전자 sequence에 기반한 ITS region dendrogram.

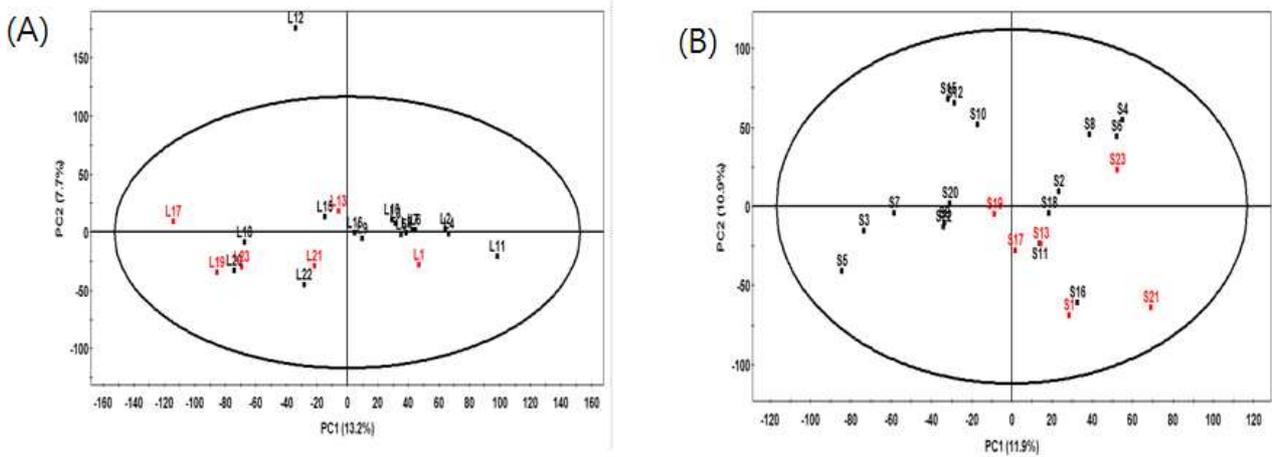


그림 18. LC-IT-MS에 기반한 PCA score plot. ITS1과 ITS2에 해당되는 샘플을 각각 표시함 (빨간색 : ITS1, 검정색 : ITS2). (A) 잎, (B) 줄기.

그림 17과 그림 18의 결과를 보면 잎, 줄기 모두 대사체학적인 관점에서 나타난 PCA score plot과 유전자 sequence에 기반한 ITS region 결과는 크게 상관관계가 없다.

3. 싸리 속 식물의 종별, 채취 지역별· 시기별 대사체 프로파일링 및 대사체 데이터베이스 구축

(1) 샘플 정보

한국생명공학연구원으로부터 제공 받은 싸리속 식물의 잎과 줄기 샘플을 가지고 실험을 하였다. 샘플은 야생으로부터 채취하거나 또는 한국의 식물표본실에서 채집하였다. 샘플은 한국생명공학연구원의 이중구 박사가 감별· 확인하였고 표본샘플은 한국생명공학연구원의 식물표본실에 보관하였다. 채취한 식물 샘플은 음지에서 건조 후 분쇄기로 갈아 미세하고 균일한 가루로 만들었다.

(2) LC-ESI-MS를 이용한 대사체 프로파일링을 위한 샘플 제조

- ① 3g의 분말상태의 샘플을 40mL의 메탄올로 28℃ 조건하에 24시간 동안 150rpm으로 웨이킹 하여 추출하였다.
- ② 추출용액은 5000rpm에서 5분 동안 센트리퓨지 하였다. 그 다음, 상등액 10mL을 20-ml 유리 바이알에 옮겨 담아 진공 하에서 농축시켰다.
- ③ 농축된 샘플은 다시 10mL 메탄올로 희석한 후, 잎과 줄기를 각각 40배, 2배씩 희석하고 희석한 샘플을 0.2- μ m 필터로 필터 하였다.

(3) LC-ESI-MS 분석 조건

- ① 기기 : Varian 500-MS ion-trap mass spectrometer
- ② 컬럼 : Varian PurSuit XR_s C₁₈ column (i.d., 3 μ m, 100 × 2.0mm)
- ③ 유속 : 0.2 mL/min
- ④ 용매 : A - 0.1% (v/v) formic acid in water
B - 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
B (%)를 5-60% 그래디언트 조건으로 30분 동안 분석
- ⑤ MS 조건 : electrospray ionization, negative mode
 m/z 50- 1,000

(4) UPLC-Q-TOF-MS 분석 조건

- ① 기기 : Waters Micromass Q-TOF Premier with UPLC Acquity system
(Waters, Milford, MA, USA)
- ② 컬럼 : Acquity UPLC BEH C₁₈ column (i.d, 1.7 μ m, 100 × 2.1mm)
- ③ 유속 : 3 mL/min
- ④ 용매 : A - 0.1% (v/v) formic acid in water
B - 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
B (%)를 10-100% 그래디언트 조건으로 14분 동안 분석
- ⑤ MS 조건 : electrospray ionization, negative mode

(5) 데이터 프로세싱

- ① LC-MS 데이터는 MS workstation software를 이용하여 분석하였다.
- ② raw 파일은 Vx Capture software를 이용하여 netCDF (*.cdf) 파일로 변환하였다. netCDF 파일을 MetAlign software package를 이용하여 얼라인 한 후, 얼라인 된 데이터는 missing value를 처리하고 분류를 위한 적절한 데이터 셋트로 변환시키기 위해 데이터 처리 과정을 거쳤다.
- ③ RF와 PLS-DA라는 두 가지 변수 선택법이 변수 선택에 사용되었는데 이는 분류에 직접적으로 영향을 주는 변수만을 선택함으로써 데이터 해석력을 높이기 위함이다. 또한 이러한 변수 선택법의 적용은 분류를 하는데 있어 정확성을 높이고 적절한 수의 변수를 선택하기 위함이다.

(6) 다변량 통계분석

- ① SIMCA- P+를 이용하여 PCA, OPLS-DA, HCA plot을 그렸으며, 이로부터 싸리속 식물의 종 간 군집분석 및 거리·계층 분석을 하였다.
- ② 종 간의 유의적으로 차이나는 대사체를 결정하기 위해 OPLS-DA의 S-plot을 분석하였다.

(7) LC-MS 기반 대사체 프로파일링 기법에 의한 싸리속 식물의 표현형 분류

가. 싸리속 식물 잎 추출물의 표현형 분류

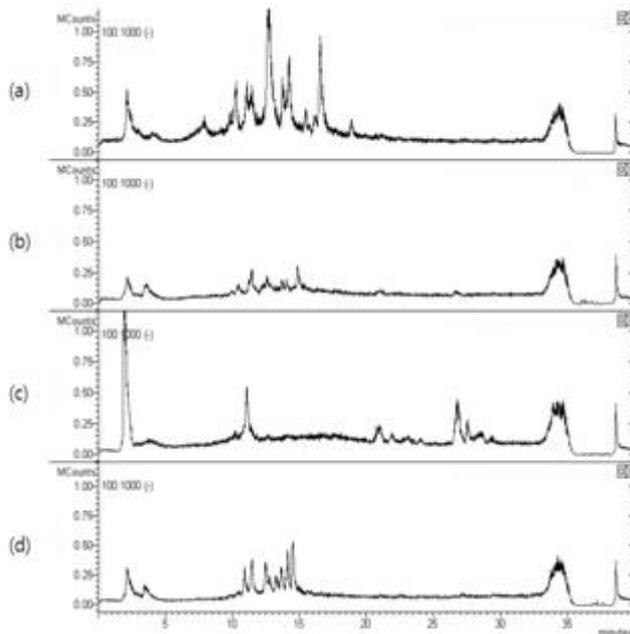
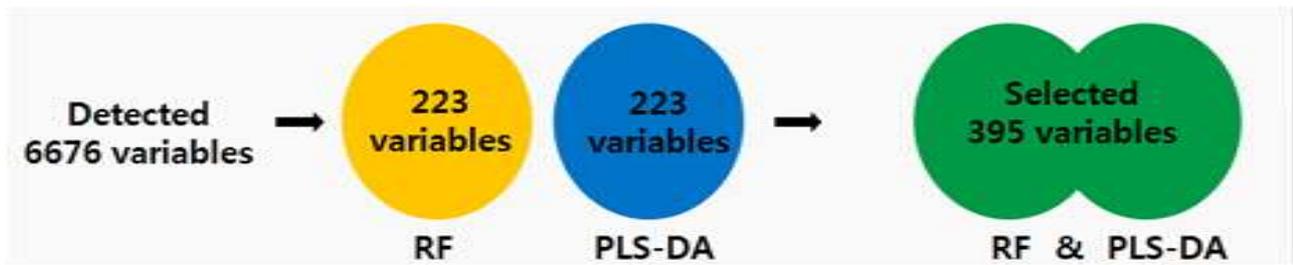


그림 19. 싸리속 식물 잎 부위 메탄올 추출물의 LC-MS 크로마토그램. (a) 참싸리 종, (b) 싸리 종, (c) 조록싸리 종, (d) 비수리 종의 대표적인 크로마토그램을 나타냄.

39개의 싸리속 식물 잎 추출물을 LC-MS로 프로파일링 한 결과 크로마토그램에서 샘플들은 종 간에 큰 차이를 보였다. 각각 종의 대표적인 크로마토그램은 그림 19에 나타내었다. 전체 대사체를 포함하는 MS data에서 네 가지 식물을 구분짓는 주 변수를 확인하기 위해 잎 추출물의 LC-MS 데이터 셋으로부터, Metalign 프로그램으로 얼라인하여 6,676개의 변수가 선택되었다. 분류를 위한 더 정확하고 신뢰성있는 결과를 얻기 위해 얻어진 변수에 RF와 PLS-DA 변수선택법을 적용하였다. 6,676개의 변수로부터, RF 변수선택법에 의해 223개, PLS-DA 변수선택법에 의해 223개의 변수가 선택되었다. Chemotaxonomy를 기반으로 한 변수 선택 방식을 통하여 선정된 변수들은 각각의 식물을 대표하는 대사체로서 특이적으로 발견되거나 식물에서 보다 더 많이 발견되는 대사체이다. Chemotaxonomy의 방법은 대사체를 기반으로 변수를 선정하기 때문에 차이 나는 대사체들이 활성화에 연관이 되어있음을 알 수 있다.



마침내, RF와 PLS-DA의 두 가지 변수선택법 중 적어도 한 방법에서 선택된 변수들인 395개의 변수가 다변량 통계분석에 적용되었다. 그림 20는 395개의 변수로부터 유도된 PCA score plot이다. 전체 변수를 PC1에 의해 14.2%, PC2에 의해 10.8%로 설명한다. 샘플들은 종(species)에 따라 4가지 군집으로 나뉜다.

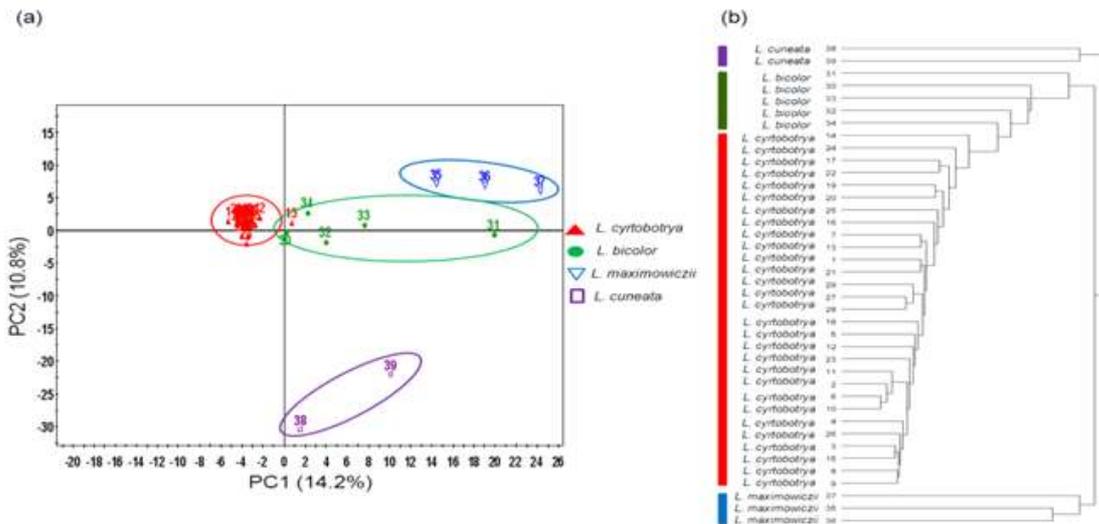


그림 20. 싸리속 식물 잎 부위의 LC-MS 데이터 셋으로부터 유도된 PCA score plot (a), HCA dendrogram (b).

그림 20.b는 395개의 변수로부터 유도된 HCA dendrogram이다. 4가지 종(species)에 따라 샘플들이 거리·계층을 보인다. 참싸리 종으로 구성된 branch는 점진적으로 싸리 종으로 구성된 branch와 합쳐진다. 이 합쳐진 branch는 조록싸리 종으로 구성된 branch와 합쳐진다. 마침내, 이 branch는 비수리 종으로 구성된 branch와 통합되어 전체 tree를 형성한다. 비록 참싸리 종과 싸리 종 샘플들 간의 거리가 가까울지라도, 이 두 종은 큰 branch 안에서 구별되는 두 개의

작은 branch로 나뉜다. 이로써, LC-MS 기반 대사체 프로파일링 기법에 의한 화학분류법에 의해, 참싸리 종과 싸리 종은 표현형이 다른 두 가지 종으로 분류할 수 있다. 싸리속 식물의 잎 추출물을 분류하려는 두 가지 접근법, 즉 유전자 시퀀스로부터 추론한 유전자의 차이에 기반한 분류법과, LC-MS 기반 대사체 프로파일링 기법에 의한 화학분류법에서, 유전형과 표현형에 따른 샘플들의 분류 결과는 비슷했다. 두 분류법에서 잎 샘플들은 형태적인 특징에 기반해 분류한 종(species)에 따라 분류되었다. 유전형과 표현형에 기반한 분류법에서 종 사이의 거리 또한 비슷했다. 참싸리 종과 싸리 종 샘플들 간의 거리는 네 가지 종 사이에서 가장 가까웠고, 비수리 종은 나머지 세 가지 종과 거리가 가장 멀었다. 결과적으로, 싸리속 식물의 잎 부위는 유전자형에 따라 서로 다른 대사체를 생성함을 시사한다.

나. 종 간의 유의적으로 차이 나는 대사체의 확인

본 실험에 사용한 네 가지 싸리속 식물 중, 비수리 종은 목본성 식물이고 나머지 3종 (참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종)은 초본성 식물이다. 비수리 종은 유전자형 분류와 표현형 분류에서 다른 세 가지 종과 거리가 가장 멀었다. 이는 비수리 종이 형태학적 분류에서 다른 세 종과 다르게 목본성이라는 사실에서 예상할 수 있는 결과이기 때문에 나머지 세 종 (참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종)에 초점을 맞추어 이 세 종간의 유의적으로 차이 나는 대사체를 확인하였다. OPLS-DA 모델을 LC-MS 데이터 셋트에 적용하여 종의 분류에 기여하는 대사체를 확인하였다.

다. 참싸리 종, 싸리 종, 그리고 조록싸리 종의 분류에 기여하는 대사체의 확인

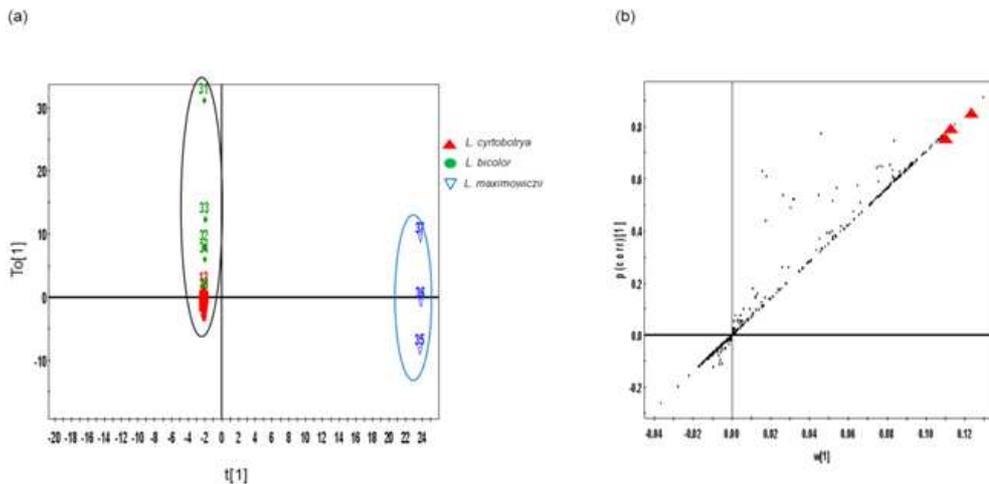


그림 21. 참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종의 LC-MS 데이터 셋트로부터 유도된 OPLS-DA score plot (a), loading S-plot (b). 선택된 변수 ($p < 0.01$)로부터 유의적으로 차이 나는 대사체들은 S-plot 상에 빨간색으로 표시하였음.

참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종의 분류에 기여하는 대사체를 확인하기 위해서 OPLS-DA 모델을 적용하였다. 이를 그림 21에 나타내었다 ($R^2X = 0.573$, $Q^2 = 0.851$). 그림 21(b)에 보는 것처럼 기여하는 변수는 S-plot을 분석하여 선택하였고, p -value 0.01 미만에 해당하는 변수들을 선택하였다. 선택된 피크들은 표 8.에 제시하였다.

표 8. 참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종 사이에서 유의적으로 차이 나는 대사체들.

LC-ESI-MS-MS							UPLC-Q-TOF		
No.	tentative identification ^a	t _R ^b (min)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z)	MW ^c	MS2 fragment ions PI ^d /NI ^e (m/z)	UV λmax (nm)	measured [M-H] ⁻ (m/z)	error (ppm)	i-Fit (norm)
1	Apigenin 6- <i>C</i> -glucosyl-8- <i>C</i> -arabinoside or Apigenin 6- <i>C</i> -arabinosyl-8- <i>C</i> -glucoside	10.9	565/563	564	529, 499, 469, 457/ 473, 443, 383, 353	240, 272, 349	563.1406	0.9	0.6
2	Lespeyrtin D ₁	26.0	357/355	356	339, 283/193, 161	239, 297	-	-	-
3	Lespedezol D ₄	28.5	355/353	354	337, 299, 285/285, 161	238, 299	-	-	-
4	Lespeyrtin F ₁	29.2	339/337	338	321, 311, 283, 255, 177/ 281, 209	239, 298	337.1076	-1.2	0.1

^a Peaks were tentatively identified using LC-ESI-MS-MS and UPLC-Q-TOF

^b t_R, retentiontime

^c MW, molecular weight

^d PI, positive ion mode

^e NI, negative ion mode

참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종에서 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값을 그림 22(a)에 Box & Whisker plot으로 제시하였다. 1-4 에 해당하는 컴파운드들은 참싸리 종과 싸리 종에서보다 조록싸리 종에서 큰 정량값을 보였다.

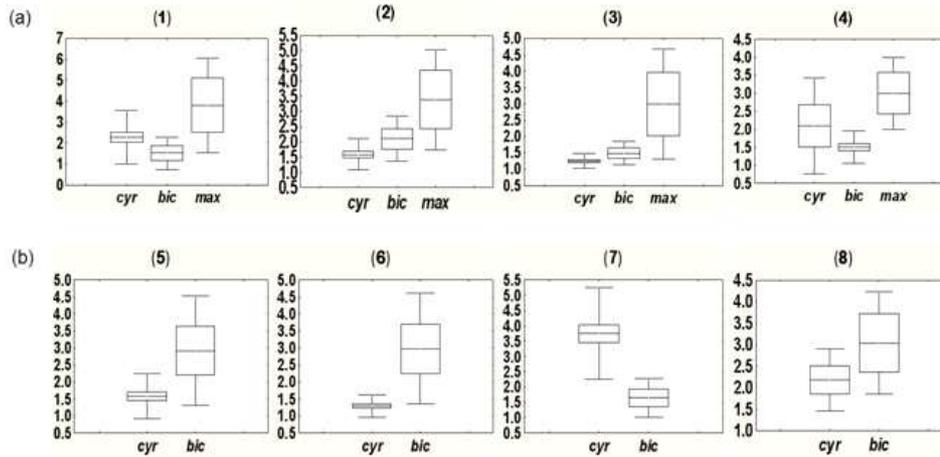


그림 22. (a) 참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종의 잎 추출물로부터 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값. (b) 참싸리 종, 싸리 종의 잎 추출물로부터 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값.

라. 참싸리 종, 싸리 종의 분류에 기여하는 대사체의 확인

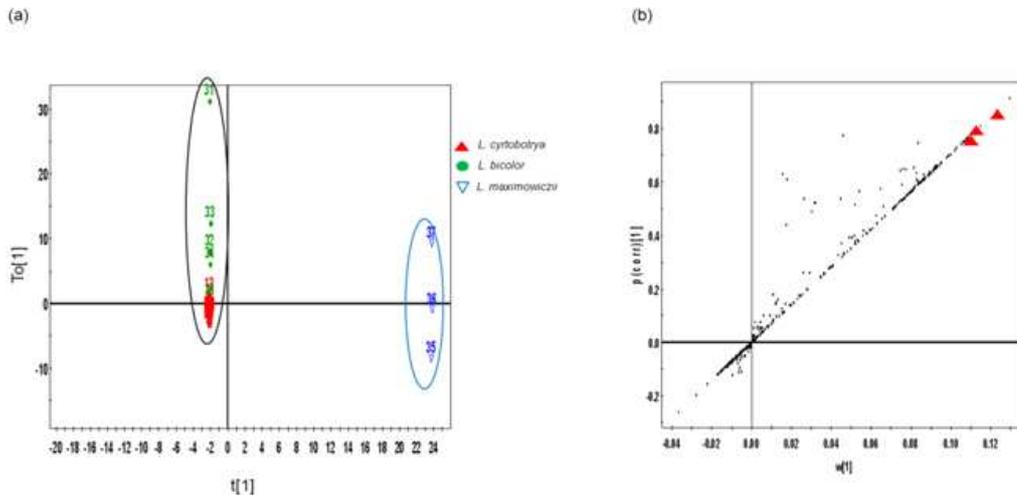


그림 23. 참싸리 종, 싸리 종의 LC-MS 데이터 셋으로부터 유도된 OPLS-DA score plot (a), loading S-plot (b). 선택된 변수 ($p < 0.01$)로부터 유의적으로 차이나는 대사체들은 S-plot 상에 빨간색으로 표시하였다.

참싸리 종, 싸리 종의 분류에 기여하는 대사체를 확인하기 위해서 OPLS-DA 모델을 적용하였다. 이를 그림 23(a)에 나타내었다 ($R^2X = 0.298$ and $Q^2 = 0.664$). 그림 23(b)에 보는 것처럼 기여하는 변수는 S-plot을 분석하여 선택하였고, p -value 0.01 미만에 해당하는 변수들을 선택하였다. 선택된 피크들은 표 9에 제시하였다.

표 9. 참싸리 종, 싸리 종 사이에서 유의적으로 차이나는 대사체들.

LC-ESI-MS-MS							UPLC-Q-TOF		
No.	tentative identification ^a	t _R ^b (min)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z)	MW ^c	MS2 fragment ions PI ^d /NI ^e (m/z)	UV λmax (nm)	measured [M-H] ⁻ (m/z)	error (ppm)	i-Fit (norm)
5	Luteolin 6- <i>C</i> -glucosyl-8- <i>C</i> -arabinoside or Luteolin 6- <i>C</i> -arabinosyl-8- <i>C</i> -glucoside	10.5	581/579	580	425, 407, 365/ 489, 459, 399, 369	238, 272, 358	579.1331	-3.3	0.5
6	Apigenin 6- <i>C</i> -glucosyl-8- <i>C</i> -arabinoside or Apigenin 6- <i>C</i> -arabinosyl-8- <i>C</i> -glucoside	11.2	565/563	564	529, 499, 469, / 473, 443, 383, 353	240, 272, 349	563.1383	-3.2	0.1
7	Kaempferol 3,7-dirhamnoside	13.8	579/577	578	-/430, 285, 255	244, 269, 353	577.1539	-3.1	0
8	N.I. ^f	14.6	609/607	608	463, 301/299, 284	238, 271, 353	607.1640	-	-

^a Peaks were tentatively identified using LC-ESI-MS-MS and UPLC-Q-TOF

^b t_R, retention time

^c MW, molecular weight

^d PI, positive ion mode

^e NI, negative ion mode

^f N.I., not identified

참싸리 종, 싸리 종에서 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값을 그림 24.b에 Box & Whisker plot으로 나타내었다. 5-6, 그리고 8 에 해당하는 컴파운드들은 참싸리 종에서 보다 싸리 종에서 큰 정량값을 보였다. 반대로, 7 에 해당하는 컴파운드는 싸리 종에서보다 참싸리 종에서 큰 정량값을 보였다.

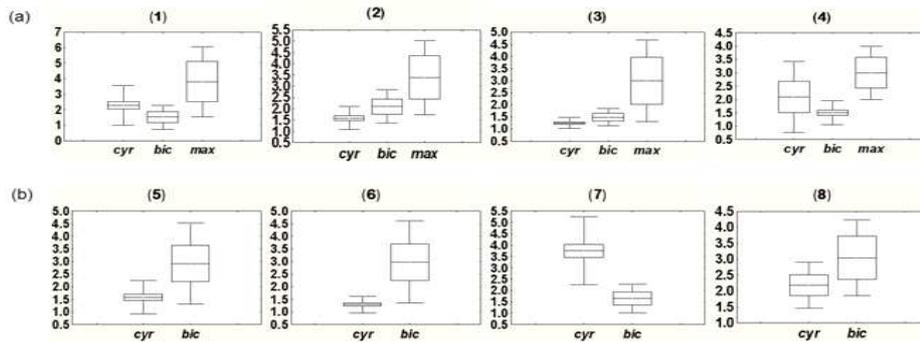
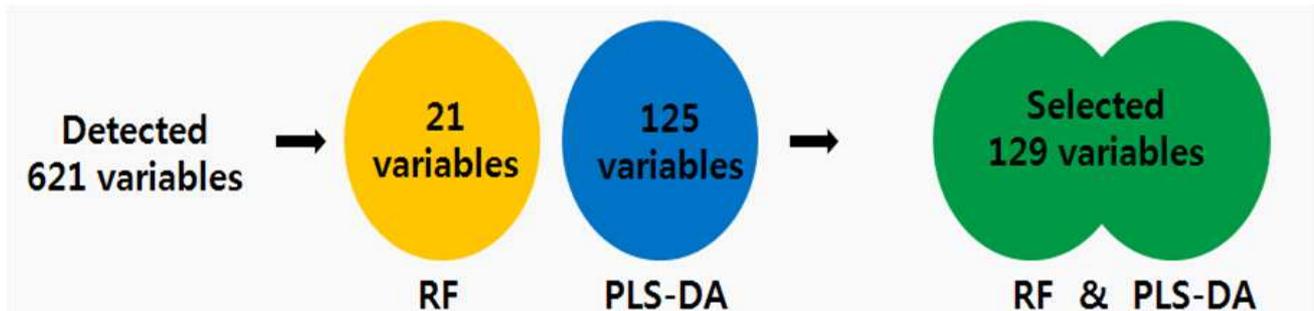


그림 24. (a) 참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종의 잎 추출물로부터 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값. (b) 참싸리 종, 싸리 종의 잎 추출물로부터 유의적으로 차이나는 대사체들의 상대적인 정량값.

4. 싸리 속 식물 줄기 추출물의 표현형 분류

39개의 싸리속 식물 줄기 추출물을 LC-MS로 프로파일링 한 결과 크로마토그램에서 샘플들은 종 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 같은 종 내에서도 샘플들은 차이가 크지 않았다. 줄기 추출물의 LC-MS 데이터 셋으로부터, Metalign 프로그램으로 일라인하여 621개의 변수가 선택되었다. 잎 추출물에서와 같은 방법으로 얻어진 변수에 RF와 PLS-DA 변수선택법을 적용하였다. 621개의 변수로부터, RF 변수선택법에 의해 21개, PLS-DA 변수 선택법에 의해 125개의 변수가 선택되었다. 마침내, RF와 PLS-DA의 두 가지 변수선택법 중 적어도 한 방법에서 선택된 변수들인 129개의 변수가 다변량 통계분석에 적용되었다.



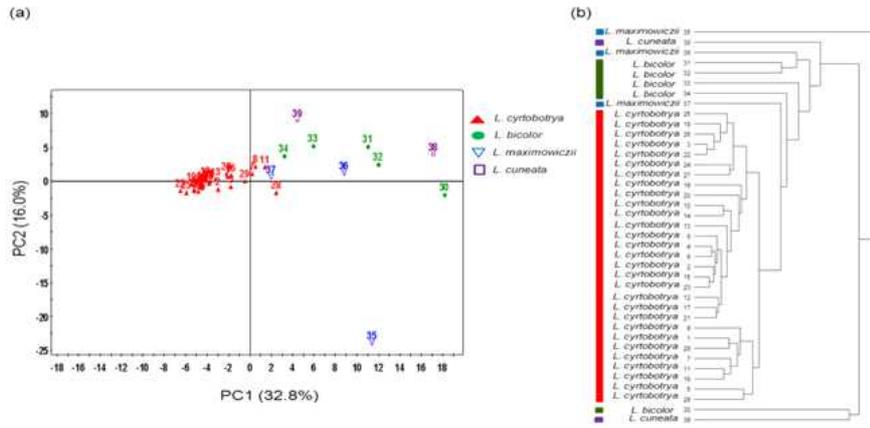


그림 25. 싸리속 식물 줄기 부위의 LC-MS 데이터 셋으로부터 유도된 PCA score plot (a), HCA dendrogram (b).

그림 25(a)는 125개의 변수로부터 유도된 PCA score plot이다. 전체 변수를 PC1에 의해 32.8%, PC2에 의해 16.0%로 설명한다. 참싸리 샘플들은 종 내에서 군집을 형성하는 반면, 다른 세 가지 종 (싸리 종, 조록싸리 종, 비수리 종)은 종 내에서 군집을 형성하지 않는다. 그림 25(b)는 125개의 변수로부터 유도된 HCA dendrogram이다. 참싸리 종 샘플들은 종 내에서 한 branch를 형성하는 반면, 다른 세 종은 종에 무관하게 혼재된다. 잎 추출물과 줄기 추출물을 LC-MS 기반 화학분류법에 의해 표현형으로 분류 한 결과, 잎의 표현형이 줄기의 표현형보다 형태학적 분류 기반-종(species)에 따라서 더 잘 분류된다. 이 결과는 동일 개체의 식물이라도 부위 (잎 부위, 줄기 부위)에 따라 정량적으로나 정성적으로 대사체의 생성에서 차이가 있음을 시사하며 이러한 대사체의 차이가 싸리속 식물의 표현형 분류에 영향을 주었음을 암시한다.

5. 싸리 속 식물의 미백 활성물질 함량 비교

(1) 메탄올 추출물의 항산화능 (antioxidant activity) 비교

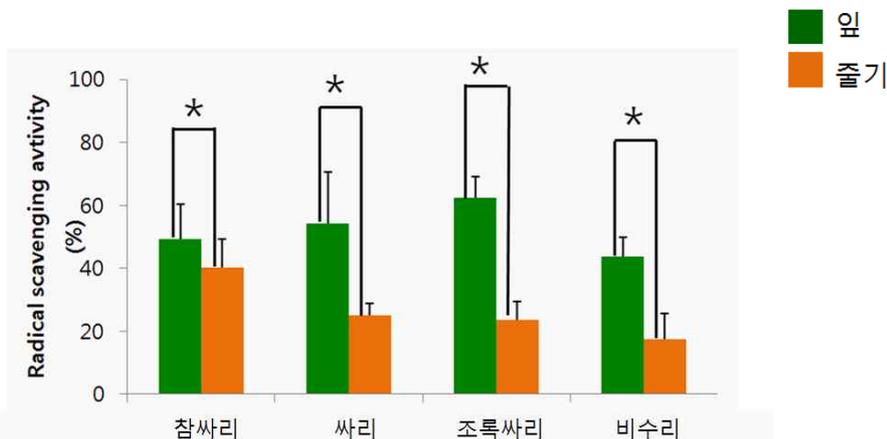
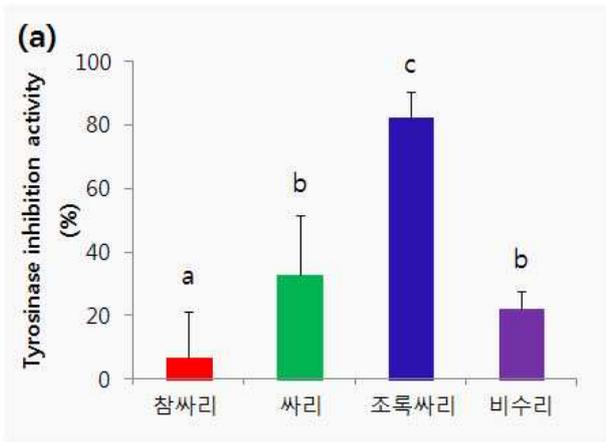


그림 26. 싸리속 식물의 잎과 줄기 부위 메탄올 추출물의 항산화능 비교. 샘플은 동일하게 12.5 ppm으로 농도를 맞추었고 y축은 평균±표준편차로 나타내었고 잎과 줄기 사이의 유의성은 t-test (p < 0.05)에서 확인하였음.

39개의 싸리속 식물을 100% 메탄올로 추출 후 동일 농도 (12.5 ppm)으로 맞춘 후 ABTS 항산화 시험을 하였다. 채집시기 및 지역에 따른 일관성은 없었으나 네 가지 종 (참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종, 비수리 종) 모두에서 줄기보다 잎에서 활성이 더 크게 나타났다. 잎과 줄기 사이의 유의성은 t-test ($p < 0.05$)에서 확인하였다. 정량적인 측면만을 고려해 볼 때, 잎이 줄기보다 항산화 물질을 다량 함유함을 의미한다.

(2) 메탄올 추출물의 타이로시네이즈 저해 활성 (tyrosinase inhibition activity) 비교

▶ 잎



▶ 줄기

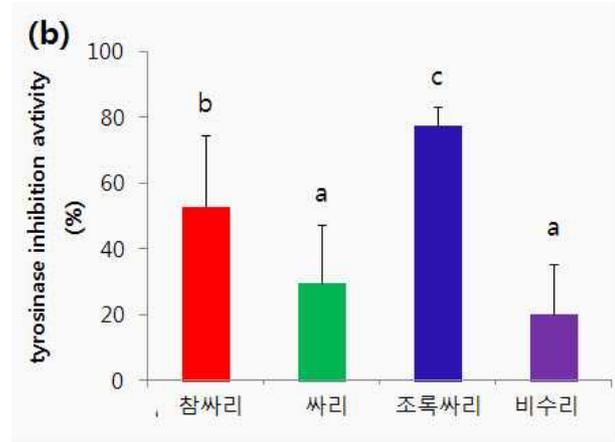


그림 27. 싸리속 식물의 잎과 줄기 부위 메탄올 추출물의 타이로시네이즈 저해 활성 비교. 샘플은 동일하게 100 ppm으로 농도를 맞추었고 y축은 평균±표준편차로 나타내었음.

39개의 싸리속 식물을 100% 메탄올로 추출 후 동일 농도 (100 ppm)으로 맞춘 후 타이로시네이즈 저해 활성 시험을 하였다. 채집시기 및 지역에 따른 일관성은 없었으나 평균적으로 네 가지 종 (참싸리 종, 싸리 종, 조록싸리 종, 비수리 종) 중 조록싸리 종에서 활성이 가장 크게 나타났다. 종 사이의 유의성은 *duncan test* ($q < 0.05$)에서 확인하였다. 이러한 종 특이적인 활성의 차이는 잎과 줄기부위 모두에서 나타났다.

6. 조록싸리 종에서 타이로시네이즈 저해 활성에 기여하는 컴파운드의 탐색

조록싸리 종에서 타이로시네이즈 저해 활성에 기여하는 컴파운드를 탐색하고자 조록싸리 샘플의 ethyl acetate 추출물을 대량분리 하였다. 조록싸리 샘플의 잎 부위를 40g 칭량하여 100% 메탄올 600mL로 200rpm에서 28°C 조건에서 48시간 동안 추출하였다. 추출 용액을 감압 필터 하여 얻어진 추출액을 진공하에서 농축하여 메탄올 추출물 4.3g을 얻었다. 메탄올 추출물을 water : ethyl acetate = 1:1 조건으로 3회 분획하여 ethyl acetate 추출물을 975mg 얻었다. Sephadax LH-20 레진을 유리 오픈 컬럼 (4cm X 78cm)에 충전 후 ethyl acetate 추출물 975mg을 로딩 하였다. 80% 메탄올을 elution 용매로 사용하였고 약 15mL 씩 fraction을 받아 90개의 fraction을 얻었다. 이 fraction을 각각 5uL씩 취하여 tyrosinase inhibition assay를 하였

다. 그림 28.에서 보는 바와 같이, ✓ 표시한 네 부분 (68, 73, 79, 87 fractions) 에서 타이로시네이즈 저해 활성이 가장 크게 나타났다.

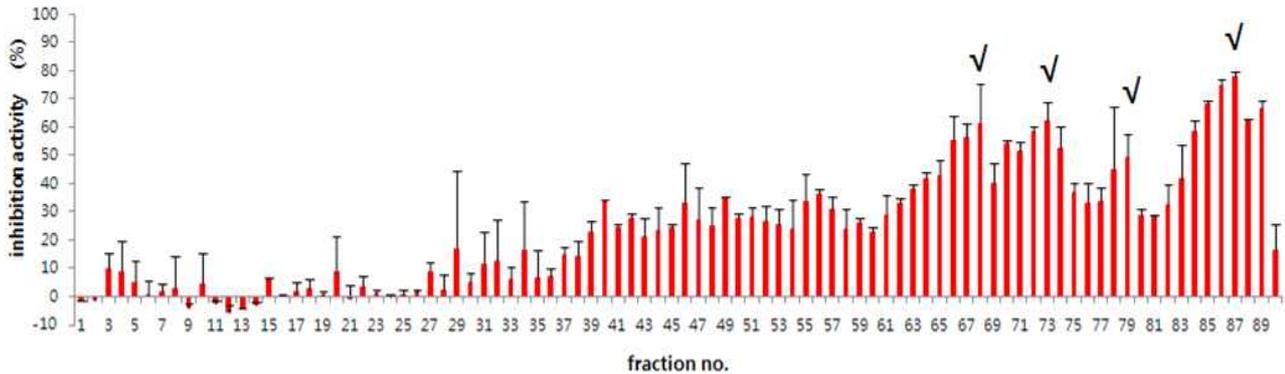


그림 28. 90개 fraction의 tyrosinase inhibition activity assay 결과. fraction은 조록싸리 종 샘플 (37번 샘플 잎 부위)의 ethyl acetate 추출물을 LH-20 레진으로 대량분리하여 얻었음.

(1) 타이로시네이즈 저해 활성을 나타내는 컴파운드의 분리·정제

활성이 크게 나타났던 부분 (68, 73, 79, 87 fractions)을 LC-ESI-MS로 분석하여 분자량 (MW)을 확인하였고, HPLC로 분리·정제하여 single compound를 모았다. 확인되어진 세 가지의 단일 물질은 네 가지 싸리 속에 관련된 선행실험에서 조록싸리에서 특이적으로 많이 발견되는 물질임이 확인되었다.

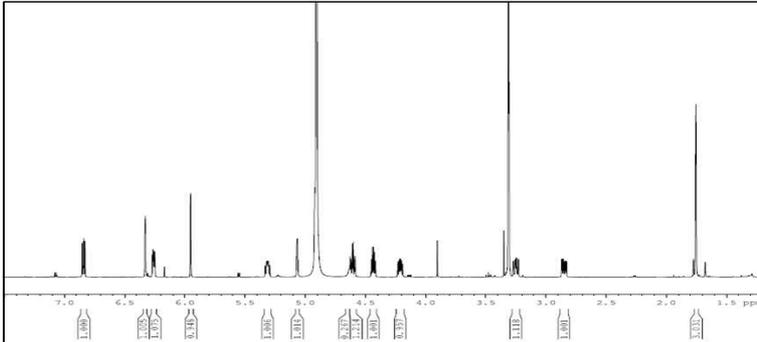
표 10. 타이로시네이즈 저해 활성을 나타내는 단일 컴파운드의 LC-MS 및 UPLC-Q-TOF로부터 얻은 정보.

LC-ESI-MS-MS						UPLC-Q-TOF				MF
No.	t _R (min)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻ (m/z)	MW	MS2 fragment ions P1/N1 (m/z)	UV λmax (nm)	measured [M-H] ⁻ (m/z)	calculated [M-H] ⁻ (m/z)	error (ppm)	i-Fit (norm)	
1	27.2	339/337	338	321, 311, 283, 255, 177/ 281, 209	239, 298	337.1018	337.1076	1.7	17.2	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
2	29.1	355/353	354	337, 299, 285/ 285, 161	238, 299	353.0998	353.1025	7.6	0	C ₂₀ H ₁₈ O ₆
3	29.7	385/383	384		239, 299	383.1107	383.1131	6.3	0.2	C ₂₁ H ₂₀ O ₇

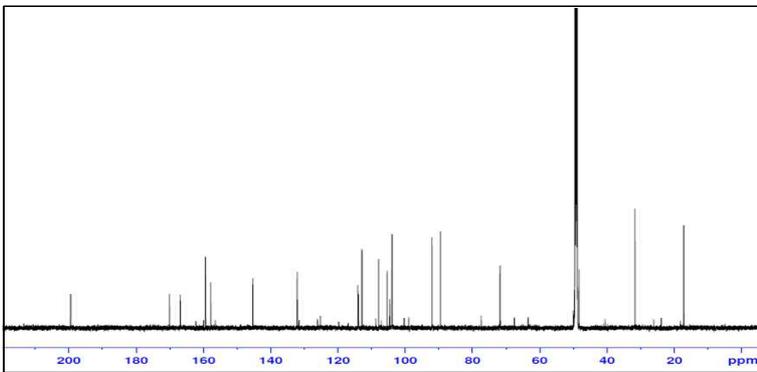
(2) NMR 분석을 통한 구조 동정

MW = 354에 해당하는 2번 컴파운드의 구조를 확인하기 위해 NMR 분석을 하였다.

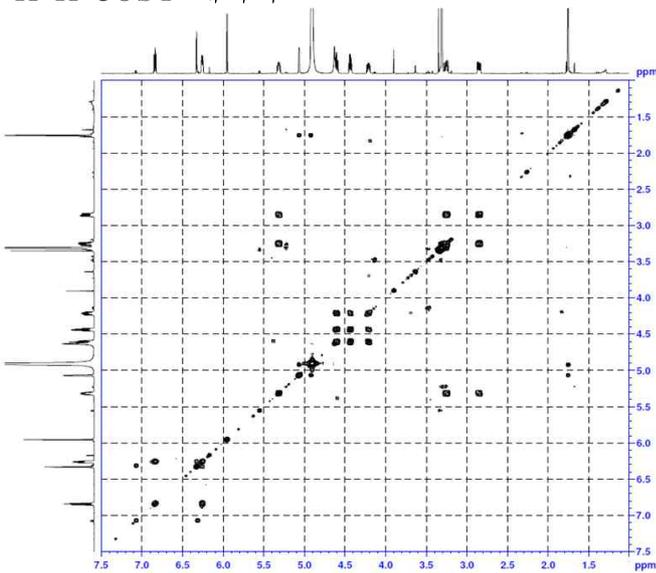
① $^1\text{H-NMR}$ 데이터



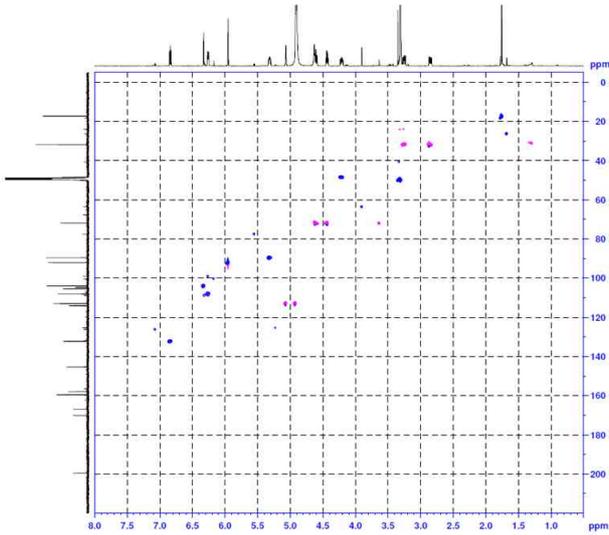
② $^{13}\text{C-NMR}$ 데이터



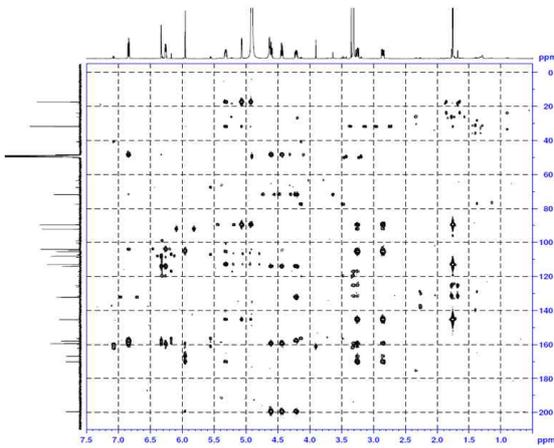
③ H-H COSY 데이터



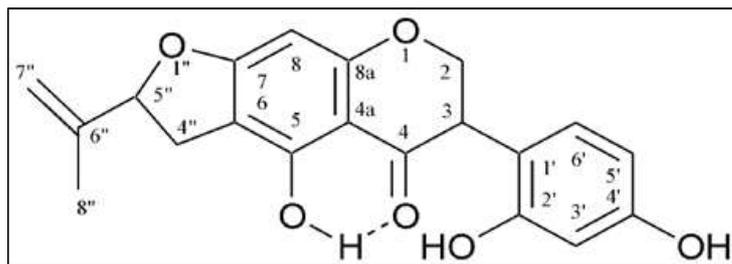
④ HSQC 데이터



⑤ HMBC 데이터



NMR 분석 결과를 표로 정리하면 다음과 같다. 문헌상에 보고된 값과 비교하여 Uncinanone B로 구조를 확인하였다.



Uncinanone B의 구조

Uncinanone B는 2003년도에 *Desmodium uncinatum* (도둑놈의 갈고리)에서 분리·동정된 컵 파운드로 alleopathic (타감작용)을 하는 물질로 알려져 있다. 본 연구를 통해 *Lespedeza* 식물

에서는 처음으로 발견된 킴파운드이다. MW = 338, 384로 확인된 타이로시네이즈 저해 활성을 나타내는 킴파운드 또한 Uncinanone B와 같은 방법으로 NMR 분석을 하여 구조를 확인하는 과정에 있다.

7. 조록싸리 종 잎 부위 ethyl acetate 추출물의 cell line에서 멜라닌 합성 저해율 측정

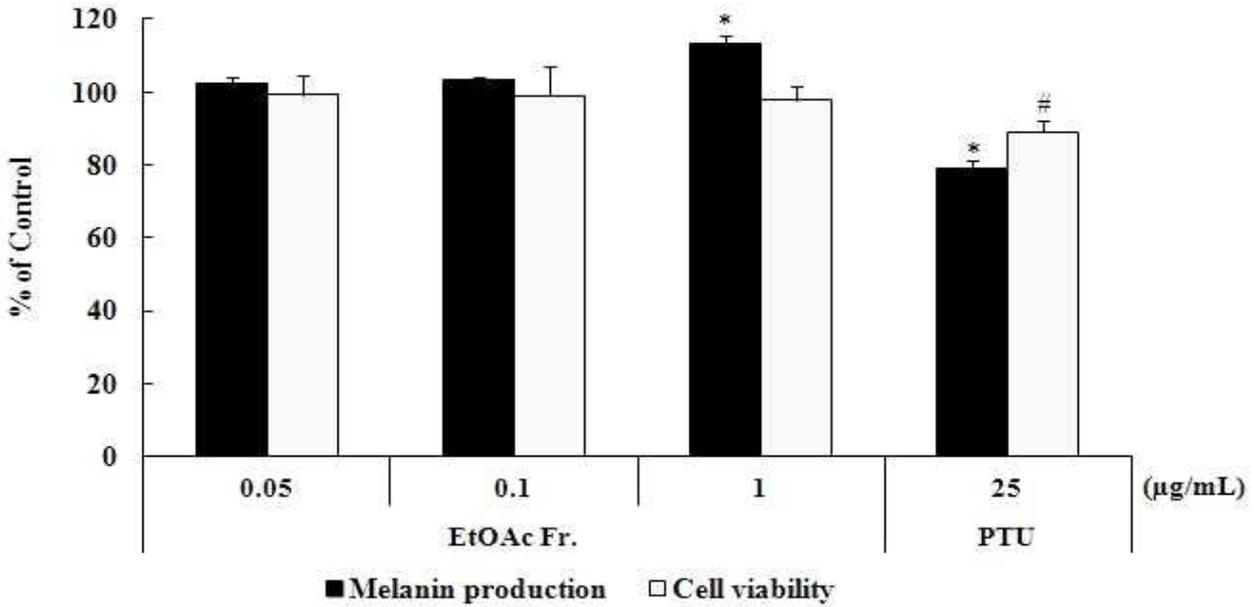


그림 29. 조록싸리 종 잎 부위 ethyl acetate 추출물을 melan-a cell에 처리한 결과. 1회/일, 3일 연속 처리하였으며 멜라닌 합성률과 세포 생존률을 나타내었음.

조록싸리 샘플의 잎 부위를 40g 칭량하여 100% 메탄올 600mL로 200rpm에서 28°C 조건에서 48시간 동안 추출하였다. 추출 용액을 감압 필터하여 얻어진 추출액을 진공하에서 농축하여 메탄올 추출물 4.3g을 얻었다. 메탄올 추출물을 water : ethyl acetate = 1:1 조건으로 3회 분획하여 ethyl acetate 추출물을 얻었다. Ethyl acetate 추출물의 농도를 0.05, 0.1, 1, 그리고 25µg/mL로 맞추어 melan-a cell에 1회/일, 3일 연속 처리하여 멜라닌 합성률을 나타내었고, MTT assay 하여 세포 생존률을 나타내었다. 그림 29에 나타낸 바와 같이 0.05, 0.1µg/mL에서 세포 생존률은 100%를 나타내어 샘플은 낮은 농도에서 독성이 없음을 보인다. 또한, 0.05, 0.1µg/mL에서 멜라닌 합성은 컨트롤과 비슷한 수준을 보인다. Fraction으로부터 분리한 단일 킴파운드 (Uncinanone B, MW=338, 384로 확인된 물질)의 in vitro상에서의 멜라닌 합성률과 세포 생존률을 분석 중임.

8. 조록싸리 종에서 분리한 생리활성 킴파운드의 구조확인 및 정량적 수준에서의 활성 규명

(1) 샘플 정보

한국생명공학연구원으로부터 제공 받은 조륙싸리 식물의 잎 샘플을 가지고 실험을 하였다. 샘플은 야생으로부터 채취하거나 또는 한국의 식물표본실에서 채집하였다. 샘플은 한국생명공학연구원의 이중구 박사가 감별·확인하였고 표본샘플은 한국생명공학연구원의 식물표본실에 보관하였다. 채취한 식물 샘플은 음지에서 건조 후 분쇄기로 갈아 미세하고 균일한 가루로 만들었다.

No.	채집일	채집장소
1	08-03-11	경남 거창군
2	08-16-11	전남 광양시
3	08-17-11	경남 고성군
4	07-26-12	전남 영암군
5	07-26-12	전남 영암군
6	07-26-12	전북 부안군
7	07-26-12	전남 나주시
8	07-26-12	전북 정읍시
9	08-18-12	전남 구례군

(2) 시료 추출 및 분리

120g의 분말상태의 샘플을 1.8L의 메탄올로 30분간 소니케이션한 후 28°C 조건하에 48시간 동안 shaker를 이용하여 200rpm으로 추출하였다. 추출용액은 4°C에서 5000rpm의 속도로 15분 동안 원심분리한 후 침전물을 버리고 필터한 후 추출물을 evaporator를 이용하여 건조시켰다. 건조된 추출물을 물과 에틸아세테이트를 이용해 1:1 분획한 후 물을 제외한 에틸아세테이트 층을 다시 evaporator를 이용해 농축시켰고, 농축된 에틸아세테이트 층을 메탄올을 이용해 다시 녹인 후 LH-20 open column chromatography를 이용하여 일차적으로 분리하였다. 분리된 96개의 fraction 중 활성이 높은 구간을 Preparative-HPLC를 이용하여 세부 분리하여 단일 컴파운드를 얻어내었다. 모든 과정은 tyrosinase 저해활성 test를 통하여 검증 후 진행되었다.

가. LH-20 open column chromatography 조건

- Sephadex LH-20 resin (4 × 83 cm)
- Isocratic elution with 80% MeOH
- 96 fractions

나. Preparative-HPLC 조건

- Column: YMC-Pack Pro C18 reversed-phase column (250 × 4.6 mm i.d., 5µm)
- - Mobile phase
- A: 5% acetonitrile in water
- B: 100% acetonitrile
- Flow rate: 1 mL/min

- Gradient

Time(min)	%A	%B
initial	95	5
1.00	95	5
10.00	0	100
11.00	0	100
11.01	95	5
13.00	95	5

(3) 활성물질 구조확인

가. UPLC-Q-TOF-MS 분석 조건

추출물을 농도를 맞춰 메탄올로 용해한 뒤, 그 추출물 100 μ L를 새로운 e-tube에 넣어 Speed Vacuum에서 overnight 시켜 완전 건조시켰다. 건조된 시료는 분석 전 각 시료에 메탄올을 다시 넣어 용해하였고 0.2 μ m filter를 이용하여 필터 후 vial에 200 μ L씩 옮겨 담은 후 UPLC-Q-TOF-MS (negative, positive mode)에 5 μ L 주입하여 분석을 진행하였다.

UPLC-Q-TOF-MS 장비 및 조건

- LC: Waters ACQUITY UPLC™ system
- MS: Waters Q-TOF Premier

LC 분석 조건

- Column: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1mm x 100mm x 1.7 μ m)
Waters Vanguard pre-column (2.1mm x 5mm x 1.7 μ m)
- Mobile phase
A: 0.1% formic acid in Water
B: 0.1% formic acid in acetonitrile
- Flow rate: 0.3 mL/min
- Gradient

Time(min)	%A	%B
initial	95	5
1.00	95	5
10.00	0	100
11.00	0	100
11.01	95	5
13.00	95	5

MS 분석 조건

- Negative/Positive mode
- Mass range: 100-1000
- Capillary (kV): 2.3
- Sample cone (V): 30.0
- Source temp. (°C): 80

- Ion energy (V): 1.0
- Collision energy: 10.0

나. NMR 분석 조건

추출물을 농도를 맞춰 메탄올로 용해한 뒤, 그 추출물 500 μ L를 새로운 e-tube에 넣어 Speed Vacuum에서 overnight 시켜 완전 건조시켰다. NMR분석 전 시료에 methanol-d₄을 다시 넣어 용해한 후 NMR용 vial에 시료를 옮겨 담은 후 NMR을 이용해 분석하였다.

NMR 장비 및 조건

- LC: Bruker Advance 600MHz NMR
- Software: TopSpin 1.X
- Probe: 5 mm TXI (1H/ 13C/ 15N) cryoprobe
2.5, 5, and 8 mm TXI (1H/ 13C/ 15N)
5 mm BBI (1H ~ 109Ag, broad band)
- Experiment temperature range: 15 $^{\circ}$ C ~ 50 $^{\circ}$ C

(4) Tyrosinase 저해 활성 실험

Tyrosinase 시약은 2500 unit의 tyrosinase를 5 unit/ μ L으로 sodium phosphate buffer에 녹여 희석하고, tyrosine은 1.5mM로 녹인 후 사용하였고, 메탄올에 녹인 추출 시료 5 μ L에 tyrosine 40 μ L, buffer 125 μ L를 넣고 암실에서 tyrosinase 30 μ L를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응 후 microplate reader로 흡광도 495nm에서 측정하였다.

(5) 세포 배양을 통한 멜라닌 합성 저해 활성 실험

가. 세포배양

Murine melanoma 세포주인 B16F10 세포주는 1% PS (penicillin-streptomycin) 및 10% FBS (fetal bovine serum)을 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서, 37 $^{\circ}$ C , 5% CO₂ 조건하에 배양하였다.

나. 멜라닌 생성 억제 실험

각각의 세포를 100 mm 배양접시에 배양한 후, 세포가 배양접시 바닥을 monolayer로 덮을 정도로 자라면 trypsin-EDTA 1 mL를 첨가하여 세포를 바닥에서 떼어낸 후 배지를 9 mL 씩 넣어 부유된 세포를 15 mL 튜브에 담아 원심분리하였다. 상층액 제거 후 새 배지 10 mL를 넣어 세포를 부유시킨 후 10 μ L을 취하여 hemocytometer로 포 세수를 측정하고, B16F10 세포를 24 well test plate에 10⁴ cells/well의 농도가 되도록 분주하였고, 24시간이 지난 후, 각 well에 접종된 B16F10 세포주에 10 nM α -MSH (melanocyte stimulating hormone)과 함께 조록싸리 잎의 메탄올 추출물, 에틸아세트 분획물 및 분리하여 구조가 동정된 두 물질을 농도별로 처

리하였다. 하루에 한 번씩 신선한 배지와 시료를 처리하고, 3일 동안 배양하였다. 마지막 시료 처리를 한 24시간 후 배지를 제거하고 1N NaOH를 일정량 넣어 멜라닌을 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 Phenylthiourea (PTU)를 사용하였다.

다. 세포생존율

세포생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 24 well plate에 MTT용액 (final 농도 : 5 mg/mL)을 20 µL씩 넣고, 37°C , 5% CO₂조건에서 1시간 30분동안 배양하였다. 그리고 나서 배양액을 제거하고 DMSO 1 mL을 넣고 Shaking을 시켜준 후 96 well plate에 200 µL씩 넣어준 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 조록싸리 잎의 생리활성 물질 분리

조록싸리 잎 시료를 그림 1과 같은 과정을 거쳐 두 가지의 단일 컴파운드를 분리하였다. 조록싸리 시료 120g을 이용하여 분리한 결과 컴파운드 1은 0.007%의 수율을, 컴파운드 2는 0.016%의 수율을 보였다. (메탄올 추출물 26%, 에틸아세테이트 분획 2.48% 수율)

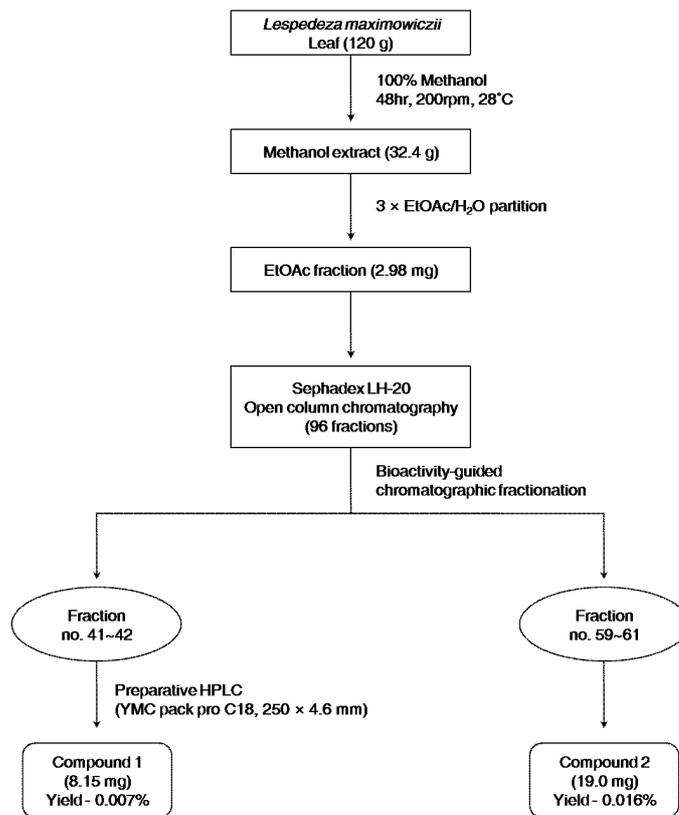


그림 30. 조록싸리 잎에서의 생리활성 컴파운드 분리과정.

Tyrosinase 저해 활성을 통해서 활성을 비교하여, 단계별로 진행하였다. 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 활성은 각각 0.75 mg/mL, 0.12 mg/mL이었다. 에틸아세테이트 분획을 메탄올에 녹여 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 일차적으로 분리하였고 96개의 프랙션을 흡수 번호만 선택하여 활성을 측정해 높은 분획을 선택하여 추가적인 실험을

진행하였다.(그림 31)

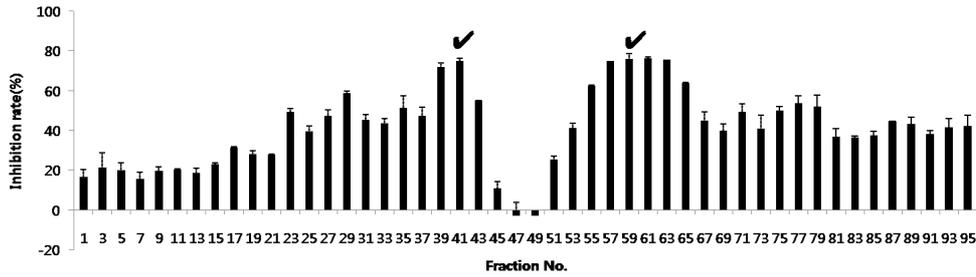


그림 31. 96개 fraction의 tyrosinase inhibition activity assay 결과. fraction은 조륙싸리 종 샘플의 ethyl acetate 추출물을 LH-20 레진으로 대량분리하여 얻었음.

높은 활성을 보인 LH-20 분획을 preparative-HPLC를 이용하여 분리하여 두 가지의 물질을 획득(그림 32), UPLC-Q-TOF-MS를 통하여 단일 물질임을 확인하였다.

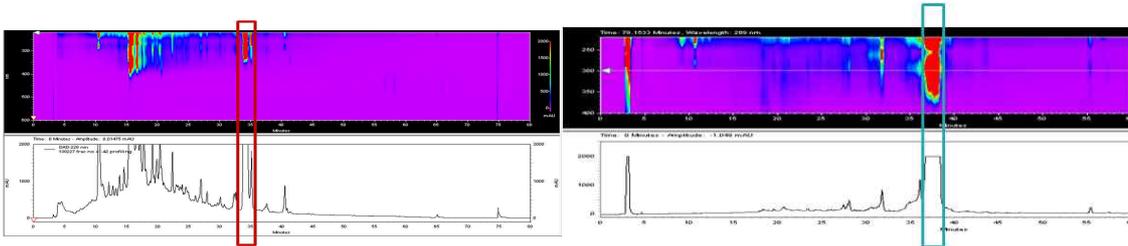
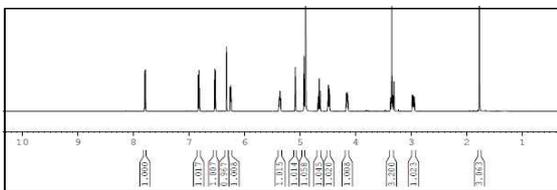


그림 32. Preparative-HPLC를 통해 분리한 MW=338(좌)과 uncinanone B(우).

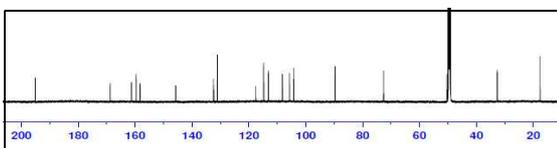
(7) 신규 생리활성 물질의 구조 확인

분리된 활성물질의 구조를 확인하기 위해 NMR 분석을 하였다. 시료는 600MHz NMR spectrometer로 CD₃OD에 녹여 분석하였다. 1D NMR로서 ¹H, ¹³C NMR을 분석하였고, 2D로서 COSY, HSQC 그리고 HMBC NMR을 이용하여 분석하였다.

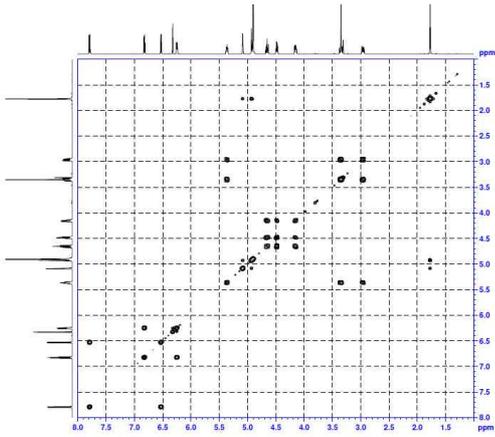
① ¹H NMR data.



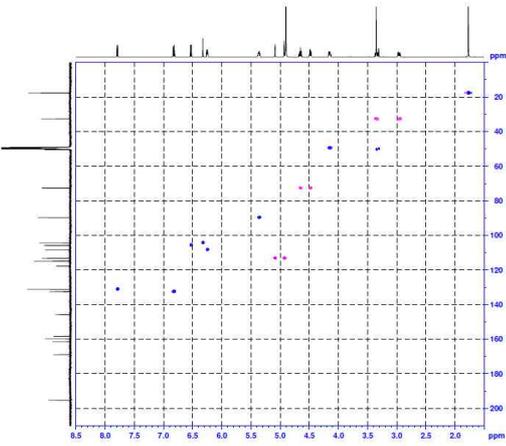
② ¹³C NMR data.



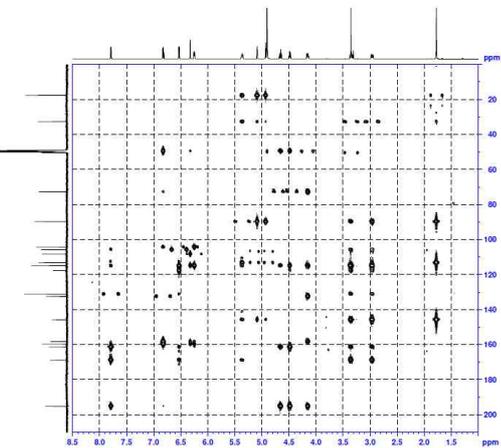
③ ¹H-¹H COSY NMR data.



④ HSQC NMR data.



⑤ HMBC NMR data.



각각의 NMR data는 표 11로 정리하였다.

표 11. 컴파운드 1과 컴파운드 2의 ¹H (600 MHz) 그리고 ¹³C NMR(150MHz) Spectroscopic Data

Desmodianone H			Uncinanone B		
Position	δ _C	δ _H (JinHz)	Position	δ _C	δ _H (JinHz)
2	72.6	4.66 (m) 4.47 (m)	2	69.7	4.59 (m) 4.43 (m)
3	49.1	4.14 (m)	3	45	3.90 (s)
4	195.1		4	196.7	
4a	117.6*		4a	101.6	
5	131.1	7.79 (d, 8.40)	5	159.5	
6	105.7	6.52 (d, 8.40)	6	106.5	
7	168.8		7	170.2	
8	114.8		8	91	5.95 (s)
8a	158.2		8a	164.4	
1'	117.6*		1'	115.5	
2'	159.6		2'	156.9	
3'	104.2	6.32 (s)	3'	105.7	6.32 (s)
4'	161.8		4'	156.9*	
5'	108.2	6.25 (m)	5'	108.8	6.25 (m)
6'	132.4	6.82 (t, 6.60)	6'	128.9	6.84 (t, 6.06)
2''	89.6	5.35 (m)	2''		
3''	32.6	2.95 (m) 3.32 (m)	3''		
4''			4''	30.3	2.85 (m) 3.25 (m)
5''			5''	88.8	5.30 (t, 2.04)
6''	145.7		6''	143.2	
7''	113.1	5.09 (s) 4.91 (s)	7''	113.5	5.06 (s) 4.90 (s)
8''	17.6	1.77 (s)	8''	17.1	1.75 (s)
2'-OH			2'-OH		
4'-OH			4'-OH		

*Assignment interchangeable.

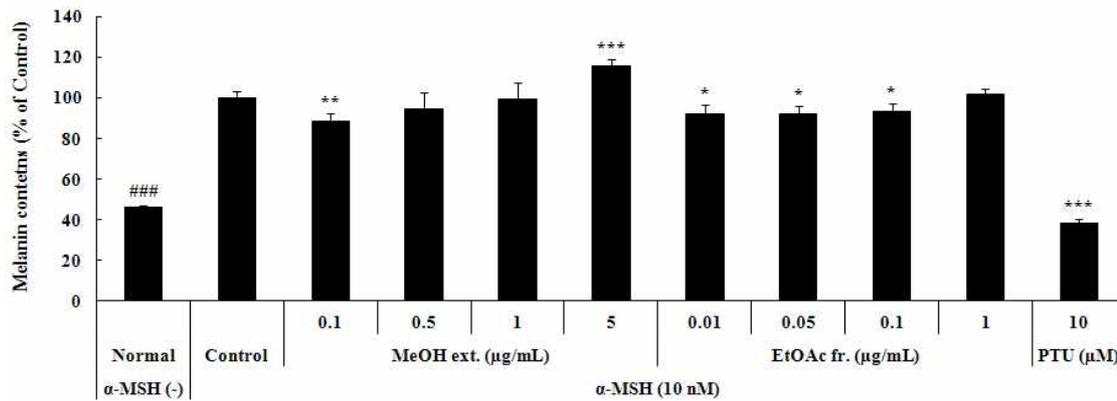
컴파운드 1은 기존에 보고되지 않은 신규 컴파운드로 동정되었고, 이는 *Desmodianum canum*에서 규명된 desmodianone G와 유사한 구조를 가져 desmodianone H라고 명명하였다.

(8) Melanoma 세포주에서의 조륙싸리 종의 메탄올추출물, 에틸아세테이트 분획물, 분리 및 구

조 동정된 두 물질의 멜라닌 생성양 및 세포생존율에 미치는 영향

Murine melanoma 세포주에서의 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 처리시 각각 10 μ g/mL 및 5 μ g/mL 의 농도에서 세포 독성을 보이는 것으로 나타나 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 각각 농도별 0.1-5 μ g/mL 및 0.01-1 μ g/mL 로 3일 처리 후 멜라닌 생성 억제 실험을 하였다. 그 결과, B16F10 세포에서 α -MSH만을 처리한 control 군과 비교하여 메탄올 추출물은 0.1 μ g/mL의 농도에서 12%, 에틸아세테이트 분획물은 0.01 μ g/mL의 농도에서 8% 정도 억제하였다 (그림 33(a)). 각각의 처리 농도에서는 세포독성을 보이지 않은 것으로 확인되었다 (그림 33(b)).

(a)



(b)

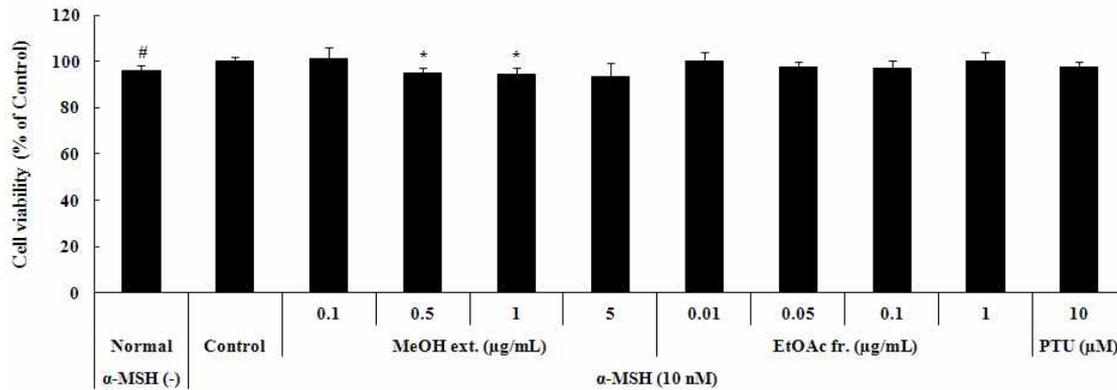
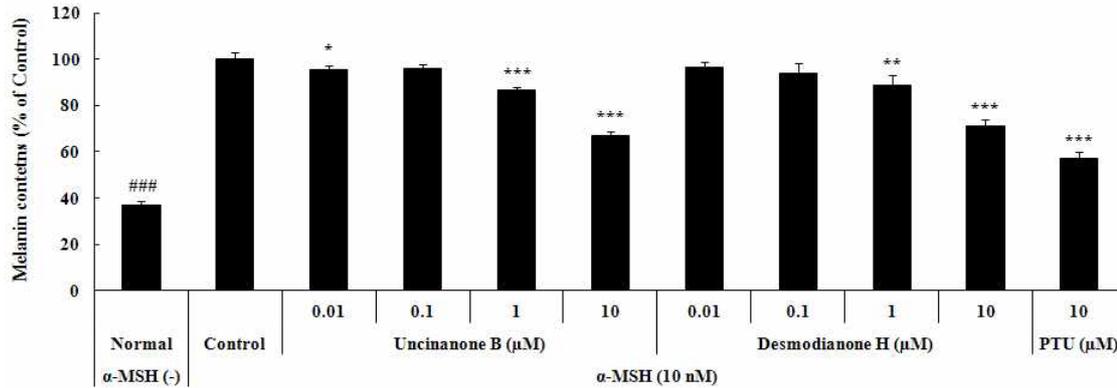


그림 33. B16F10 세포주에서 조록싸리 잎의 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 생성 (a) 과 세포생존율 (b) 에 미치는 영향 (# p <0.05, ### p <0.001, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)

또한, tyrosinase 저해 활성 실험을 토대로 분리, 구조 동정된 Uncinanone B와 Desmodianone H에 대하여 동일한 세포주에서 멜라닌 생성 억제 실험을 시행하였다. Murine melanoma 세포주에서의 두 물질을 세포에 처리시 50 μ M 의 농도에서 세포 독성을 보이는 것으로 나타나 Uncinanone B와 Desmodianone H를 각각 농도별 0.01-10 μ M로 3일 처리 후 멜라닌 생성 억제 실험을 하였다. 그 결과, B16F10 세포에서 α -MSH만을 처리한 control 군과 비

교하여 Uncinanone B는 10 μM 의 농도에서 33%, Desmodianone H은 10 μM 의 농도에서 29% 정도 억제하였다 (그림 34(a)). 각각의 처리 농도에서는 세포독성을 크게 보이지 않은 것으로 확인되었다 (그림 34(b)).

(a)



(b)

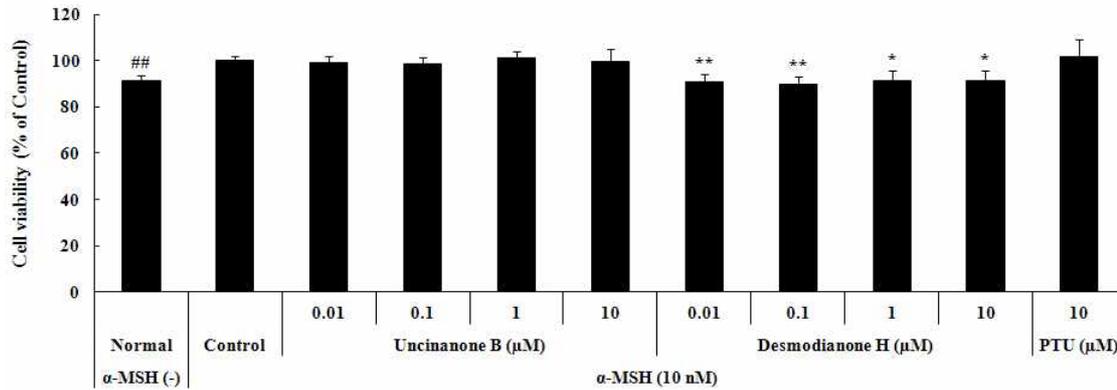


그림 34. B16F10 세포주에서 조룩싸리 잎에서 분리된 Uncinanone B와 Desmodianone H의 멜라닌 생성 (A) 과 세포생존율 (B) 에 미치는 영향 (## p <0.01, ### p <0.001, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)

9. 참싸리 식물의 잎과 줄기별 대사체 프로파일링 및 대사체 데이터베이스 구축

(1) 샘플 정보

한국생명공학연구원으로부터 제공 받은 참싸리속 식물의 잎과 줄기 샘플(22종)을 가지고 실험을 하였다. 샘플은 야생으로부터 채취하거나 또는 한국의 식물표본실에서 채집하였다. 샘플은 한국생명공학연구원의 이중구 박사가 감별·확인하였고 표본샘플은 한국생명공학연구원의 식물표본실에 보관하였다. 채취한 식물 샘플은 음지에서 건조 후 분쇄기로 갈아 미세하고 균일한 가루로 만들었다.

	Collection date	Collection area in Korea	
		province	city
1	07-09-2010	Chungcheongnam	Gongju
2	07-22-2010	Gyeongsangnam	Geochang
3	07-22-2010	Gyeongsangnam	Geochang
4	07-20-2010	Gyeongsangnam	Goseong
5	07-20-2010	Gyeongsangnam	Tongyeong
6	07-21-2010	Gyeongsangnam	Goeje
7	07-30-2010	Chungcheongbuk	Yeongdong
8	07-30-2010	Jeollabuk	Muju
9	08-01-2010	Gyeongsangbuk	Pohang
10	08-05-2010	Jeollanam	Gwangyang
11	08-05-2010	Jeollabuk	Gwangsan
12	08-06-2010	Chungcheongbuk	Jangseong
13	08-06-2010	Gyeongsangbuk	Jeongeup
14	08-12-2010	Gyeongsangnam	Danyang
15	08-12-2010	Jeju special-governing	Yeongju
16	08-12-2010	Gangwon	Bonghwa
17	08-21-2010	Gyeonggi	Jeju
18	08-27-2010	Gangwon	Donghae
19	09-08-2010	Gangwon	Namyangju
20	09-09-2010	Gangwon	Chuncheon
21	09-09-2010	Gangwon	Wonju
22	09-10-2010	Gyeonggi	Anseong

(2) 시료 추출 및 분석

3g의 분말상태의 샘플을 40mL의 메탄올로 28℃ 조건하에 24시간 동안 shaker를 이용하여 150rpm으로 추출하였다. 추출용액은 4℃에서 5000rpm의 속도로 15분 동안 원심분리하였다. 침전물을 버리고 필터(0.22 μm)한 후 추출물을 speed vac을 이용하여 건조시켰다.

(3) GC-TOF-MS 분석방법 표준화 및 분석조건 확립

- ① 추출물을 농도를 맞춰 메탄올로 용해한 뒤, 그 추출물 50 μL를 새로운 e-tube에 넣어 Speed Vacuum에서 overnight 시켜 완전 건조시켰다.
- ② 건조된 각 샘플은 oximation을 위하여 methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL in pyridine)를 50 μL 넣어 30℃에서 90분간 반응시켰다.
- ③ Oximation이 끝나면 유도체화를 위해 MSTFA 50 μL를 넣고 37℃, 30분 동안 반응시켰다.
- ④ 반응물은 autosampler vial에 옮겨 담은 후, GC-MS에 1μL 주입하였다.

GC 분석 조건

- Injector temp. : 250℃
- Split ratio : 5
- Column: DB 5-MS (0.25mm x 30mm x 0.25μm)
- Carrier gas: He

- Flow rate: 1.5 mL/min
- Oven temp.: 75°C (2min) → 300°C (3min), 15°C/min

MS 분석 조건

- EI mode
- Ion source temp.(°C): 230
- Detector voltage (V): 1450
- Mass range: 35-700
- Solvent delay(filament off): 4 min

(4) LC-ESI-MS 분석방법 표준화 및 분석조건

추출물을 농도를 맞춰 메탄올로 용해한 뒤, 그 추출물 100uL를 새로운 e-tube에 넣어 Speed Vac에서 overnight 시켜 완전 건조시켰다. 각 시료에 메탄올을 다시 넣어 용해한다. 0.2 μm filter를 이용하여 필터 후 autosampler vial에 200μL씩 옮겨 담은 후 UPLC-Q-TOF-MS (negative, positive mode)에 10 μL 주입하였다.

LC-ESI-MS 장비 및 조건

- Varian 500-MS ion-trap mass spectrometer

LC 분석 조건

- Column: Varian PurSuit XR_s C₁₈ column (i.d., 3μm, 100 × 2.0mm)
- Mobile phase
 - A: 0.1% formic acid in Water
 - B: 0.1% formic acid in acetonitrile
- Flow rate: 0.2 mL/min
- Gradient

Time(min)	%A	%B
initial	95	5
30.00	40	60
30.06	0	100
35.00	0	100
35.06	95	5
40.00	95	5

MS 분석 조건

- Negative/Positive mode
- Mass range: 100-1000
- Collision energy: 10.0

(5) UPLC-Q-TOF-MS 분석 조건

- ① 추출물을 농도를 맞춰 메탄올로 용해한 뒤, 그 추출물 100uL를 새로운 e-tube에 넣어 Speed Vac에서 overnight 시켜 완전 건조시켰다. 분석 전 각 시료에 메탄올을 다시 넣어 용해하였다.
- ② 0.2 um filter를 이용하여 필터 후 autosampler vial에 200uL씩 옮겨 담은 후 UPLC-Q-TOF-MS (negative, positive mode)에 5 uL 주입하였다.

UPLC-Q-TOF-MS 장비 및 조건

- LC: Waters ACQUITY UPLC™ system
- MS: Waters Q-TOF Premier

LC 분석 조건

- Column: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1mm x 100mm x 1.7µm)
Waters Vanguard pre-column (2.1mm x 5mm x 1.7µm)
- Mobile phase
A: 0.1% formic acid in Water
B: 0.1% formic acid in acetonitrile
- Flow rate: 0.3 mL/min
- Gradient

Time(min)	%A	%B
initial	95	5
1.00	95	5
10.00	0	100
11.00	0	100
11.01	95	5
13.00	95	5

MS 분석 조건

- Negative/Positive mode
- Mass range: 100-1000
- Capillary (kV): 2.3
- Sample cone (V): 30.0
- Source temp. (°C): 80
- Ion energy (V): 1.0
- Collision energy: 10.0

(7) 대사체 데이터처리 및 다변량 분석을 통한 지표물질 선정

가. 데이터 처리

GC-TOF-MS data는 ChromaTOF 소프트웨어를 이용하여 data processing을 위한 소프트웨어 사용 format인 .cdf file로 변환하고, LC-ESI-MS data는 Vx Capture 소프트웨어를 이용하여 .cdf file로 변환한 후, Metalign을 이용하여 peak selection, alignment, base line correction

과 같은 data processing을 하였다.

나. 다변량 통계분석

SIMCA-P(ver.12.0) 소프트웨어를 이용한 다변량 분석을 하였다.

- 주요인분석(PCA; principal component analysis)
 - 부분최소제곱법 관별분석 (PLS-DA; partial least squares-discriminant analysis)
- 다변량 통계 분석 후 주요한 대사체 동정은 스탠다드 화합물의 mass spectra, fragment pattern과 retention time 등의 구분에 의해서 동정되었다. 스탠다드 화합물이 없을 시에는 NIST05 MS Library (NIST, 2005)나 references, combined chemical dictionary version 7.2 (Chapman & Hall/CRC) 및 in-house library에 의해 tentative 동정을 하였다.

(8) 항산화 및 tyrosinase 저해 활성 test

가. 샘플추출

3g의 분말상태의 샘플을 40mL의 메탄올로 28℃ 조건하에 24시간 동안 shaker를 이용하여 150rpm으로 추출하였다. 추출용액은 4℃에서 5000rpm의 속도로 15분 동안 원심분리하였고, 침전물을 버리고 필터(0.22 μm)한 후 추출물을 speed vac을 이용하여 건조시켰다. 건조된 추출물의 농도를 메탄올을 이용하여 희석시켜 사용하였다.

나. ABTS test

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 시약은 7mM ABTS를 2.45mM Potassium persulfate 에 녹여 희석한 후, 750nm에서 OD값 0.7에 맞춰 사용하였다. 메탄올에 녹인 추출 시료 20 μL에 ABTS 시약 180 μL를 넣고, 실온에서 7분 반응 후 ELISA로 측정하였다. Standard solution은 0.5mM부터 5단계 1/2희석하여 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)를 사용하였고 값 계산에 의해 Trolox Equivalent Antioxidant capacity (TEAC)를 측정하였다.

다. Tyrosinase 저해 활성 test

Tyrosinase 시약은 2500 unit의 tyrosinase를 5 unit/μL으로 sodium phosphate buffer에 녹여 희석하고, tyrosine은 1.5mM로 녹인 후 사용하였다. 메탄올에 녹인 추출 시료 5 μL에 tyrosine 40 μL, buffer 125 μL를 넣고 암실에서 tyrosinase 30 μL를 넣어 37 °C에서 20분간 반응 후 ELISA로 OD 495nm에서 측정하였다.

(9) 연구수행 결과

가. 참싸리 잎, 줄기 분석 및 다변량 통계분석

참싸리 잎, 줄기 시료의 PLS-DA분석 결과, 그림 1의 score plot과 같이 잎과 줄기가 각각 구분되어졌다. GC-TOF-MS에서는 PLS1(16.4%), LC-ESI-MS에서는 PLS1(7.3%)에 의해 잎,

줄기가 구분되는 경향을 보이며 22개 지역별보다 오히려, 줄기가 구분되는 것이 보여졌다 (그림 35).

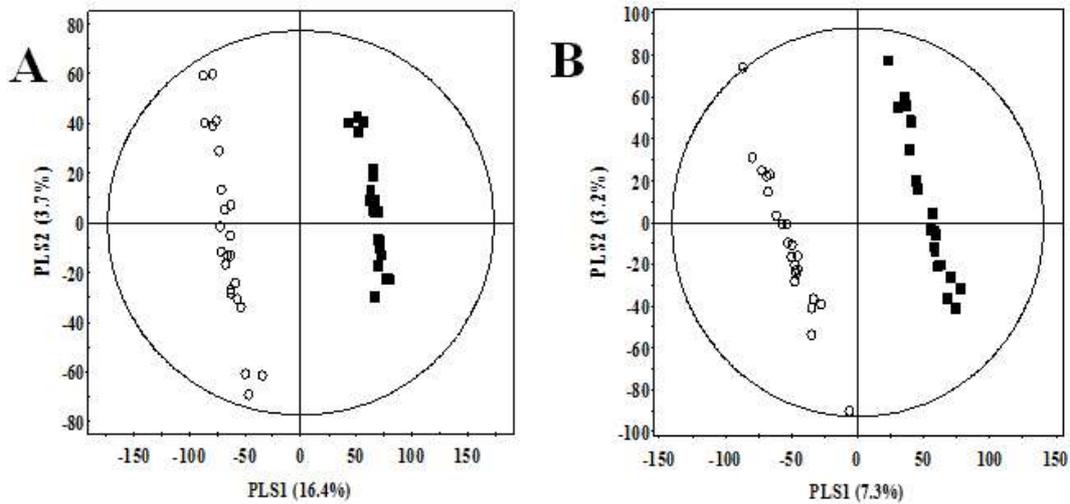


그림 35. 참싸리 잎, 줄기 시료의 PLS-DA score plots (a) GC-TOF-MS (b) LC-ESI-MS.

나. 참싸리 잎, 줄기의 이차대사산물 분석 및 동정

LC-ESI-MS 분석 및 다변량 통계분석에 의해 참싸리 잎, 줄기 차이로 구분지어지는 이차대사산물로 Luteolin, Apigenin glucoside, kaempferol, quercetin glucoside derivatives과 Lespedezol과 Lespecyrtin 계열 등이 동정되었다(표 12).

Luteolin-6-glucosyl-8-arabinoside와 Apigenin-6-glucosyl-8-arabinoside, Apigenin glucoside 그리고 Luteolin glucoside derivatives, Quercetin diglucoside의 경우 잎에서 많은 함량을 나타냈고 대부분의 Lespedezol과 Lespecyrtin 계열은 줄기에서 더 많은 함량을 나타내었다. 이는 표 12의 fold change값으로 표현하였다.

표 12. LC-ESI-MS에 의해 차이 나는 참싸리 잎, 줄기의 이차 대사산물

Putative metabolites	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MW	MSn fragment ion (m/z)	Elemental composition [M-H] ⁻	Error (ppm)	i-FIT (norm)	Fold change (leaf/stem)	Antioxidant activity	Tyrosinase inhibition activity
1 Luteolin-6-C-glucosyl-8-arabinoside	12.2	579	581	580	579, 407	C26H27O15	-0.7	-1.2	1.40	0.44	-0.52
2 Apigenin-6-C-glucosyl-8-arabinoside	12.9	563	565	564	563, 443, 353, 325, 297	C26H27O14	-1.8	-3.2	1.30	-0.17	0.23
3 Dalbergioidin glucoside	14	449	451	450	449, 287, 151, 107	C21H21O11	-6.4	-14.3	0.77	-0.12	0.08
4 Apigenin glucoside	14.1	593	595	594	593, 447, 301, 271, 255	C27H29O16	-4.2	-7.1	1.95	-0.19	0.23
5 kaempferol-3,7-dirhamnoside	15	577	579	578	577, 425, 407, 389, 255	C27H29O14	-2.8	-4.9	1.32	0.23	-0.17
6 Luteolin-6-C-glucoside derivatives	16.4	447	449	448	447, 285, 199, 175, 147	C21H19O11	-2.1	-4.7	1.32	0.13	-0.73
7 Quercetin diglucosides	16.7	637	635	636	635, 446, 299, 271	C29H31O16	-1.9	-3	2.72	0.34	-0.05
8 N.I	17	431	-	-	431, 285, 255, 227, 186	-	-	-	1.73	0.56	-0.26
9 Lespedezol D1	18.5	287	285	286	285, 199, 171, 253	C16H13O5	0.4	1.4	1.42	-0.34	0.62
10 Lespedezol F1	21.9	257	255	256	255, 135, 91	C15H11O4	-1.8	-7.1	0.62	-0.19	0.34
11 Lespedezol D4	23.6	355	353	354	353, 325, 256, 203	C21H21O5	0.4	1.1	0.56	0.28	-0.40
12 Lespecyrin D1	26.4	357	355	356	355, 193, 149, 124, 105	C21H23O5	0.8	2.3	0.66	0.03	0.13
13 Lespecyrin F1	27.7	339	337	338	-	C20H17O5	-1.7	5	0.58	-0.44	0.15

다. 참싸리 잎, 줄기의 일차대사산물 분석 및 동정

GC-TOF-MS 분석 및 다변량 통계분석에 의해 참싸리의 잎, 줄기를 구분 짓는 일차대사산물은 11개의 화합물을 찾아내었고, 그 중 6개를 동정하였다 (표 13). 동정된 6개의 화합물 Urea, Succinic acid, Fumaric acid, malonic acid, arabinose, myo-inositol은 줄기보다 잎에서 더 많은 함량을 나타내고 있었다. 그 외 동정되지 못한 화합물들은 줄기에서 더 많은 함량을 보이는 것으로 표13에 fold change를 통해 나타내었다.

표 13. GC-TOF-MS에 의해 차이 나는 참싸리 잎, 줄기의 이차 대사산물

Metabolites	RT (min)	MS fragment ion (m/z)	Derivatized	Fold change (leaf/stem)	Antioxidant activity	Tyrosinase inhibition activity
urea	6.67	73, 147, 171, 189, 234	2tms	0.85	0.33	-0.20
succinic acid	7.39	73, 147, 172, 247	2tms	0.84	-0.34	0.06
fumaric acid	7.68	45, 73, 147, 217, 245	2tms	0.87	-0.41	0.15
N.I 1	8.32	73, 101, 116, 133, 147, 233	-	1.19	0.09	0.03
malonic acid	8.99	73, 101, 147, 189, 233, 307	3tms	0.87	-0.44	0.33
N.I 3	9.18	45, 73, 103, 147, 217, 307	-	1.43	0.06	-0.06
arabinose	10.45	73, 103, 147, 217, 307	3tms	0.96	-0.38	0.48
N.I 10	11.94	102, 145, 202, 260, 311, 367	-	1.50	0.24	-0.27
N.I 11	12.30	73, 103, 147, 205, 319, 376, 464	-	1.23	0.34	-0.13
N.I 12	12.55	73, 103, 147, 217, 265, 318, 433, 507	-	0.65	-0.50	0.17
myo-inositol	13.41	73, 103, 147, 217, 265, 305, 367	6tms	0.73	0.47	-0.18

라. 참싸리 잎, 줄기의 항산화 및 tyrosinase 저해 활성

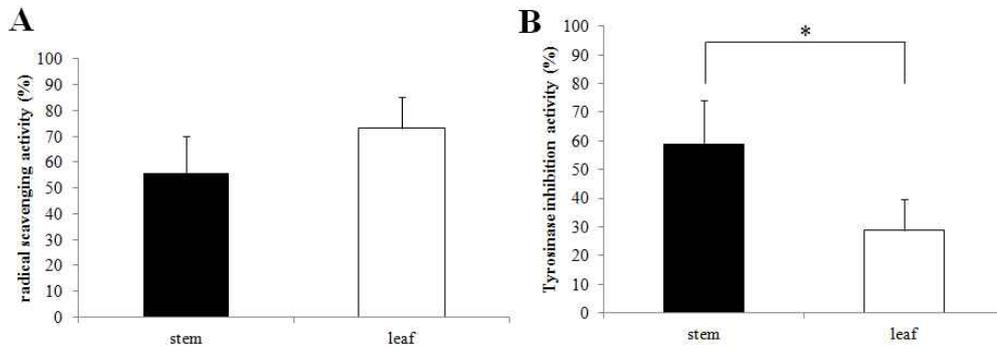


그림 36. 참싸리 잎, 줄기의 항산화 활성(A) 및 tyrosinase 저해 활성(B).

참싸리 잎, 줄기 22종 시료를 항산화 활성과 tyrosinase 저해 활성을 측정하여 각 잎과 줄기별로 평균을 내어 결과를 나타내었다 (그림 36). 참싸리를 채취한 시기와 지역이 다르기 때문에 시료 간 차이가 크지만 전체적으로 항산화 활성은 줄기보다 잎에서 높은 활성을 가지는 것으로 보인다. tyrosinase 저해 활성도 역시 22종의 시료를 측정한 후 잎과 줄기별로 평균을 내어 결과를 나타내었고, 그 결과는 줄기에서 잎보다 더 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 이는 항산화 활성보다 좀 더 뚜렷한 차이를 보이며 둘 간의 차이가 유의성을 나타내는 것으로도 보여진다.

마. 참싸리 속 이차대사산물과 활성과의 상관관계

참싸리 잎, 줄기간 차이나는 이차대사산물과 항산화, tyrosinase 저해 활성과의 상관관계를 보기 위해 prepHPLC를 이용하여 각각의 화합물들을 분리하였다. 그리고 분당 prep을 받아 활성 측정을 다시 하여 화합물의 활성을 tentative하게 확인하였다 (그림 37). 또한 일원배치분산분석법을 통해 이차 대사산물과 활성과의 상관지수 값을 표와 상관지도로 나타내었다 (그림 38).

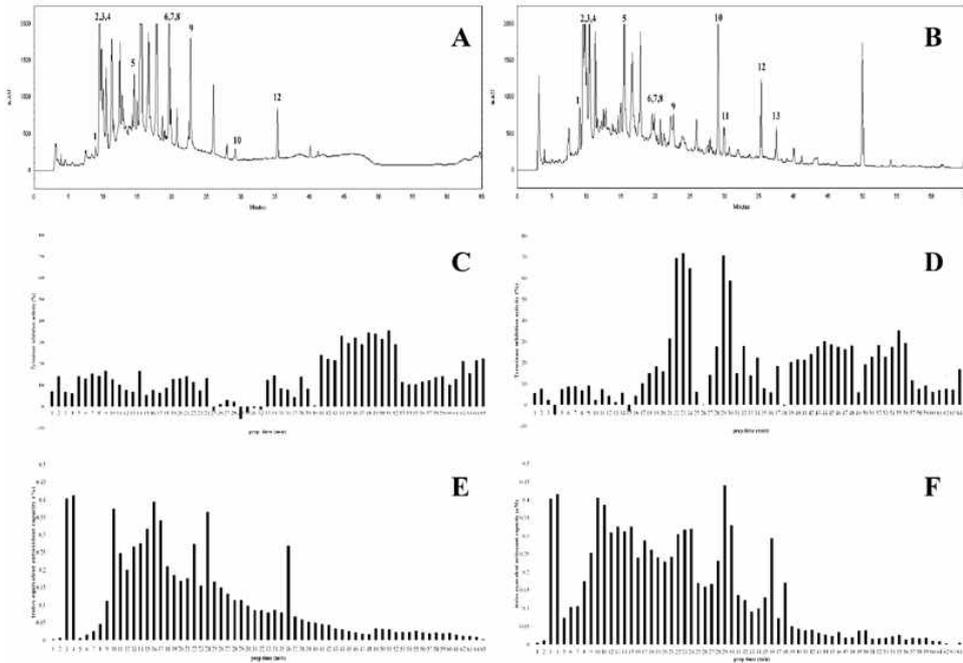


그림 37. 참싸리 잎, 줄기의 prepHPLC 프로파일링 및 활성 측정 결과. 참싸리 잎(A)과 줄기(B)의 크로마토그램, 각각의 분획물들은 잎(C)과 줄기(D)의 tyrosinase 저해 활성과 잎(E), 줄기(F)의 항산화 활성 측정 결과. Luteolin-6-C-glucosyl-8-arabinoside (1); Apigenin-6-C-glucosyl-8-arabinoside (2); Dalbergioidin glucoside (3); Apigenin glucoside (4); kaempferol-3,7-dirhamnoside (5); Luteolin-6-C-glucoside derivatives (6); Quercetin diglucosides (7); and Non-identified (8); Lespedezol D1 (9); Lespedezol F1 (10); Lespedezol D4 (11); Lespecyrtin D1 (12); Lespecyrtin F1 (13).

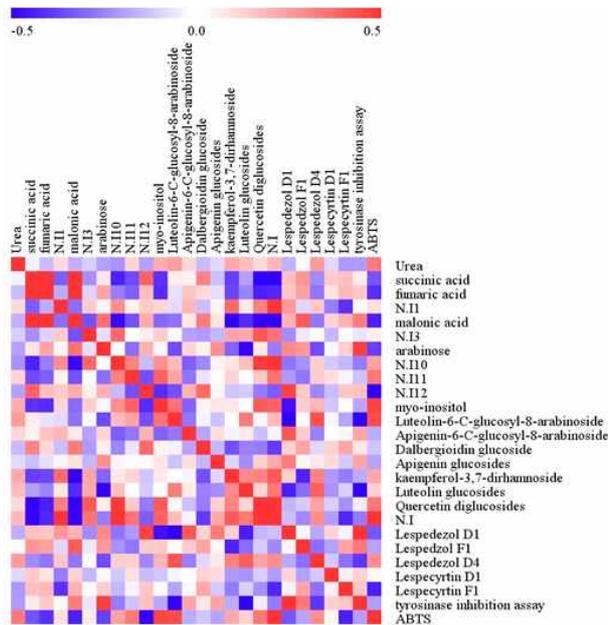


그림 38. 대사산물과 활성과의 상관관계.

제 2 절. 한국생명공학연구원

1. 참싸리 및 근연종의 분류학적 검증

가. 참싸리 및 근연종의 형태학적 분석

Lespedeza속의 참싸리 및 근연종의 외부형태의 분류학적 검증을 위해 참싸리 26집단, 싸리 6집단, 조록싸리 3집단을 대상으로 하였다. 참싸리 및 싸리는 Lespedeza속의 *Macrolespedeza*계열에 속하며, 그동안 외부형태학적 중요한 형질로 인식되어왔던 꽃받침 열편의 형태(calyx), 기관(standard), 익판(wing), 용골판(keel-petal)의 길이 등을 측정한 결과 싸리의 상부꽃받침 열편(lateral calyx-lobe)은 열편의 전체 길이보다 절반 이하로 갈라졌으며, 기관, 익판, 용골판의 길이를 비교해보면 기관이 가장 길고 용골판, 익판 순이었다. 참싸리의 경우 상부꽃받침 열편(lateral calyx-lobe)은 열편의 전체 길이보다 절반 이상 갈라졌으며, 기관, 익판, 용골판의 길이를 비교해보면 기관이 가장 길고 익판, 용골판 순이었다. *Macrolespedeza*계열의 중요한 형질인 8개의 외부형태학적 형질에서 얻어낸 data를 기초로 simple matching coefficient를 사용하여 유사도 지수를 분석한 결과 *Macrolespedeza*계열인 참싸리와 *Heterolespedeza*계열인 조록싸리가 *Macrolespedeza*계열인 싸리보다 꽃의 구조에서는 유사한 것으로 나타났다. 그러나 이번 실험에 사용된 형질의 경우 *Macrolespedeza*계열 내에서 참싸리와 싸리의 중간 유의성을 검증하기 위한 실험이었으며, 조록싸리와 속하는 *Heterolespedeza*계열과 참싸리와 싸리가 속하는 *Macrolespedeza*계열은 동아의 아린(scale)과 앞이 배열에 의해 구분되기 때문에 참싸리와 조록싸리가 금번 형질에 의해서 유사하다는 것은 의미가 없으며, 금번 실험을 통하여 *Macrolespedeza*계열인 참싸리와 싸리는 꽃받침 열편의 형태(calyx), 기관(standard), 익판(wing), 용골판(keel-petal)의 외부형태가 중요 형질임을 제시하는 바이다.

표 14. List of taxa of the Korean *Lespedeza* for the morphological study.

Nc	Code No	Taxon	Date	Locality	Voucher
1	C2	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1001
2	C3	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1002
3	C4	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도고성군 대가면 대곡산	J.K. Kim et al. 2010-1003
4	C5	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 통영시 산양읍	J.K. Kim et al. 2010-1004
5	C6	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-21	경상남도 거제시 동부면	J.K. Kim et al. 2010-1005
6	C7	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-30	충청북도 영동군 용화면 민주지산	S.H. Park et al. 2010-1002
7	C8	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-30	전라북도 무주군 적상면 적상산	S.H. Park et al. 2010-1003
8	C9	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-01	경상북도 포항시 남구 운제산	J.U. Eum 2010-1001
9	C10	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2011-1011
10	C11	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-05	전라남도 광주 광산구 왕동저수지	C. Y. Lee et al. 2010-1002
11	C12	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-06	전라남도 장성군 북하면 대각산	C. Y. Lee et al. 2010-1003
12	C13	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면 수암지	C. Y. Lee et al. 2011-1010
13	C14	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-10	충청북도 단양군 단양읍	J.K. Kim et al. 2011-1013
14	C15	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 영주시 가흥2동	J.K. Kim et al. 2010-1007
15	C16	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 봉화군 춘양면	J.K. Kim et al. 2010-1008
16	C17	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-21	제주도제주시봉개동명도암교차로	J.K. Lee et al. 2010-1001
17	C18	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-27	강원도 동해시	J.K. Kim 2010-1009
18	C19	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-08	경기도 남양주시 화도읍 약수암	C.Y.Lee et al. 2010-1005
19	C20	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-08	강원도 춘천시 서면 삼악산	C. Y. Lee et al. 2010-1006
20	C21	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 춘천시 동면 평촌리	C. Y. Lee et al. 2010-1007
21	C22	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 원주시 신림면 성남리	C. Y. Lee et al. 2010-1008
22	C23	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-10	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C. Y. Lee et al. 2010-1009
23	C24	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역 부근	J.K.Kim et al. 2011-1001
24	C25	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사	J.K.Kim et al. 2011-1002
25	C26	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사	J.K. Kim et al. 2011-1003
26	C27	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사	J.K. Kim et al. 2011-1004
27	B11	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역 근처 도로가	J. K. Kim et al. 2011-1008
28	B12	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C. Y. Lee et al. 2011-1001
29	B13	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-17	경상남도 통영시 도천동	C. Y. Lee et al. 2011-1002
30	B14	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-10	경상북도 영주시 가흥2동	J. K. Kim et al. 2011-1009
31	B17	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면 수암지	C. Y. Lee et al. 2011-1003
32	B22	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-29	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C. Y. Lee et al. 2011-1004
33	M7	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C. Y. Lee et al. 2011-1005
34	M8	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-17	경상남도 고성군 대가면 대곡산	C. Y. Lee et al. 2011-1006
35	M9	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2011-1007

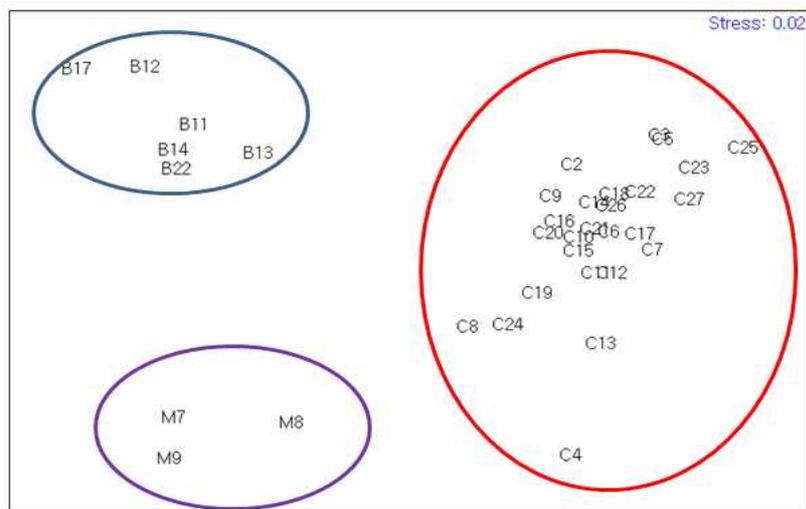


그림 39. Scatter diagram showing 35 *Lespedeza*

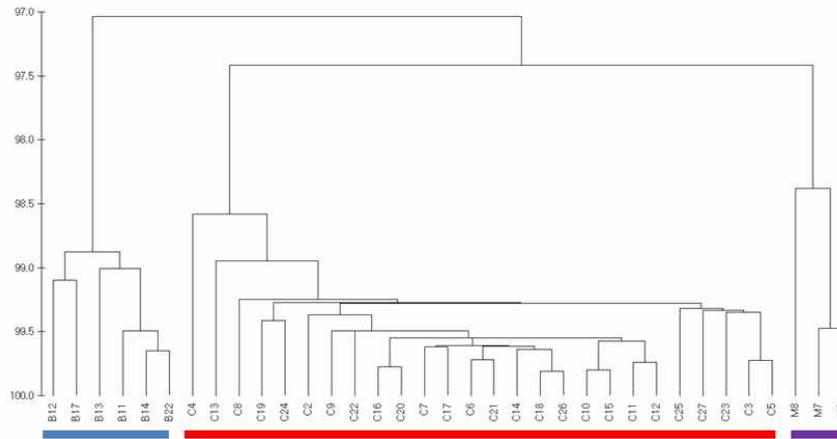


그림 40. A dendrogram of 35 *Lespedeza* based on complete linkage distance method using 8 characters of principal component analysis

나. 참싸리 및 근연종의 화분학적 분석

*Macrolespedeza*절의 참싸리, 싸리, 조록싸리의 화분은 모두 단립(monad)이고, 발아구 또한 모두 삼공구형(tricolporate)이나 나타났다. 화분립의 크기는 참싸리, 싸리, 조록싸리의 대부분의 집단이 소립($19.53\text{--}23.67\mu\text{m}$)이었으며, 전라남도 장성군에서 수집한 C12번 참싸리는 $28.91\pm 2.58\mu\text{m}$, 경기도 안성시에서 수집한 B22번 싸리는 $24.51\pm 1.17\mu\text{m}$ 로 중립의 크기가 나타났으나, 참싸리, 싸리, 조록싸리의 평균값은 모두 소립의 크기로 나타났으며, 모양은 참싸리, 싸리, 조록싸리 집단에서 주로 아장구형(Subprolate:1.15–1.33)이었으며, 참싸리 4개 집단(C12, C18, C19, C25) 및 싸리 B12, B22에서는 장구형(Prolate:1.34–1.99)의 모양이 나타났으며, 통영에서 수집한 B13번 싸리에서는 약장구형(Prolate-spheroidal:1.01–1.14)의 모양이었다. 표벽의 표면무늬는 참싸리, 싸리, 조록싸리 모두 망상형(reticulate)으로 관찰되었으며, 망상의 기부에는 크고 작은 구멍이 존재하는 것으로 관찰되었으나, 참싸리 4개 집단(C10, C25, C26, C27)과 B22번 싸리, M9 조록싸리 에서는 망상 기부에 구멍이 존재하지 않았다. Bo Xu et.al(2011)는 참싸리, 싸리, 조록싸리를 화분립의 크기 및 망상기부에 존재하는 구멍 등의 형질에 의해 구분되어 지며 화분의 형질은 분류학적으로 유용한 형질이라고 하였으나, 금번 실험에서 관찰된 화분의 형질은 같은 종에서도 지역에 따라 화분립의 크기 및 표본무늬, 망상기부의 형태등에서 차이를 보이는 것으로 보아 Akiyama S.(1988)가 화분의 형질은 유용한 형질이 아니라는 결과는 지지하는 것으로 나타났다.

표 14. Quantitative characters of various organs in the Korean *Lespedeza* (F.l: Length of flower; S.l: length of standard; W.l: length of wing; K.l: length of keel-petal; C.l: length of calyx; CL.l: length of lateral calyx-lobe; CT.l: length of calyx tube, (All measurements are given in mm, except CL.l/CT.l, S.l.&W.l&K.l).

Code No	Taxon	F.1	S.1	W.1	K.1	C.1	CL.1	CT.1	CL.1/CT.1	Sl.&W.1&K.1
C2	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.81±0.35	9.29±0.38	8.70±0.39	7.66±0.34	6.00±0.27	2.97±0.35	3.00±0.29	1.00±0.19	S>W>K
C3	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.29±0.2	9.87±0.29	9.44±0.29	8.15±0.20	7.03±0.50	3.71±0.44	3.32±0.27	1.12±0.17	S>W>K
C4	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.88±0.42	9.22±0.57	8.97±0.47	7.75±0.34	4.93±0.28	3.22±0.28	1.72±0.20	1.90±0.31	S>W>K
C5	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.29±0.3	9.93±0.35	9.17±0.22	8.07±0.28	7.01±0.54	3.73±0.47	3.27±0.19	1.14±0.14	S>W>K
C6	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.58±0.3	9.97±0.42	9.28±0.29	8.18±0.25	6.33±0.28	3.54±0.24	2.79±0.09	1.26±0.08	S>W>K
C7	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	11.29±0.4	10.96±0.4	10.08±0.2	8.91±0.16	7.04±0.43	4.19±0.35	2.85±0.14	1.47±0.11	S>W>K
C8	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.86±0.31	9.64±0.28	9.26±0.22	8.09±0.19	5.02±0.44	2.74±0.36	2.29±0.11	1.19±0.13	S>W>K
C9	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.53±0.2	10.28±0.2	9.13±0.35	8.65±0.30	6.27±0.45	3.28±0.31	2.98±0.28	1.11±0.14	S>W>K
C10	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.37±0.40	9.11±0.37	8.43±0.14	7.67±0.12	5.60±0.46	3.02±0.33	2.58±0.16	1.17±0.08	S>W>K
C11	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.43±0.45	9.11±0.44	8.54±0.48	7.78±0.38	5.64±0.47	3.12±0.28	2.46±0.42	1.35±0.34	S>W>K
C12	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.59±0.53	9.03±0.49	8.67±0.50	7.75±0.37	5.71±0.53	3.23±0.28	2.49±0.51	1.36±0.36	S>W>K
C13	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.93±0.52	9.42±0.54	8.77±0.53	7.57±0.54	5.46±0.51	3.28±0.32	2.18±0.36	1.55±0.31	S>W>K
C14	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.18±0.2	9.90±0.28	9.24±0.27	8.26±0.23	6.33±0.40	3.38±0.26	2.95±0.18	1.14±0.07	S>W>K
C15	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.85±0.44	9.57±0.43	8.97±0.42	8.04±0.39	5.83±0.47	3.21±0.29	2.62±0.24	1.22±0.10	S>W>K
C16	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.66±0.3	10.46±0.3	9.53±0.32	8.41±0.27	6.26±0.37	3.36±0.26	2.90±0.21	1.16±0.11	S>W>K
C17	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.89±0.2	10.48±0.2	9.81±0.23	8.65±0.14	6.67±0.43	4.04±0.35	2.93±0.17	1.37±0.12	S>W>K
C18	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.62±0.5	10.39±0.4	9.45±0.36	8.36±0.26	6.69±0.28	3.63±0.23	3.05±0.14	1.20±0.09	S>W>K
C19	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.71±0.19	9.47±0.17	8.94±0.21	7.86±0.18	5.37±0.19	2.96±0.19	2.40±0.15	1.24±0.13	S>W>K
C20	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.62±0.4	10.39±0.3	9.49±0.27	8.34±0.18	6.11±0.43	3.29±0.25	2.81±0.23	1.17±0.08	S>W>K
C21	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	11.04±0.3	10.63±0.3	9.89±0.23	8.87±0.11	6.69±0.33	3.73±0.24	2.95±0.16	1.26±0.09	S>W>K
C22	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.28±0.2	9.76±0.32	9.49±0.33	8.26±0.31	6.63±0.40	3.62±0.33	3.01±0.33	1.23±0.24	S>W>K
C23	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.59±0.5	10.19±0.4	9.64±0.36	8.21±0.18	7.28±0.55	4.12±0.43	3.16±0.23	1.31±0.13	S>W>K
C24	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.80±0.59	9.51±0.57	8.71±0.45	7.73±0.38	5.10±0.39	2.86±0.25	2.23±0.22	1.29±0.13	S>W>K
C25	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.38±0.5	9.99±0.54	9.25±0.42	8.27±0.25	7.52±0.49	4.33±0.46	3.19±0.21	1.36±0.18	S>W>K
C26	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	10.28±0.4	10.07±0.4	9.12±0.40	8.21±0.32	6.43±0.52	3.51±0.31	2.92±0.26	1.21±0.10	S>W>K
C27	<i>Lepedeza cyrtobotrya</i>	9.37±0.42	9.13±0.44	8.42±0.40	7.75±0.36	6.36±0.28	3.57±0.24	2.79±0.33	1.30±0.22	S>W>K
B11	<i>Lepedeza bicolor</i>	11.86±0.4	11.49±0.4	9.22±0.34	10.59±0.3	5.21±0.24	2.06±0.19	3.15±0.10	0.66±0.06	S>K>W
B12	<i>Lepedeza bicolor</i>	11.38±0.5	11.08±0.5	9.22±0.56	10.02±0.3	5.03±0.20	1.62±0.27	3.42±0.26	0.48±0.12	S>K>W
B13	<i>Lepedeza bicolor</i>	11.00±0.4	10.77±0.4	9.42±0.36	9.87±0.37	5.24±0.40	2.11±0.29	3.13±0.20	0.67±0.08	S>K>W
B14	<i>Lepedeza bicolor</i>	12.00±0.6	11.67±0.6	9.64±0.51	10.57±0.4	5.04±0.35	1.99±0.20	3.05±0.18	0.65±0.05	S>K>W
B17	<i>Lepedeza bicolor</i>	10.02±0.4	9.58±0.45	8.24±0.58	9.01±0.47	4.18±0.46	1.15±0.41	3.03±0.23	0.38±0.13	S>K>W
B22	<i>Lepedeza bicolor</i>	11.58±0.6	11.27±0.6	9.82±0.58	10.33±0.6	4.93±0.27	1.92±0.17	3.01±0.16	0.63±0.05	S>K>W
M7	<i>Lepedeza maximowiczii</i>	10.98±0.3	10.52±0.3	9.78±0.31	10.51±0.3	3.95±0.29	2.09±0.24	1.86±0.28	1.14±0.25	S≥K>W
M8	<i>Lepedeza maximowiczii</i>	9.41±0.27	9.13±0.28	8.14±0.17	9.10±0.27	3.91±0.22	2.20±0.18	1.71±0.15	1.29±0.16	S≥K>W
M9	<i>Lepedeza maximowiczii</i>	9.96±0.24	9.69±0.25	9.17±0.45	9.58±0.19	3.51±0.22	1.89±0.27	1.62±0.08	1.17±0.21	S≥K>W

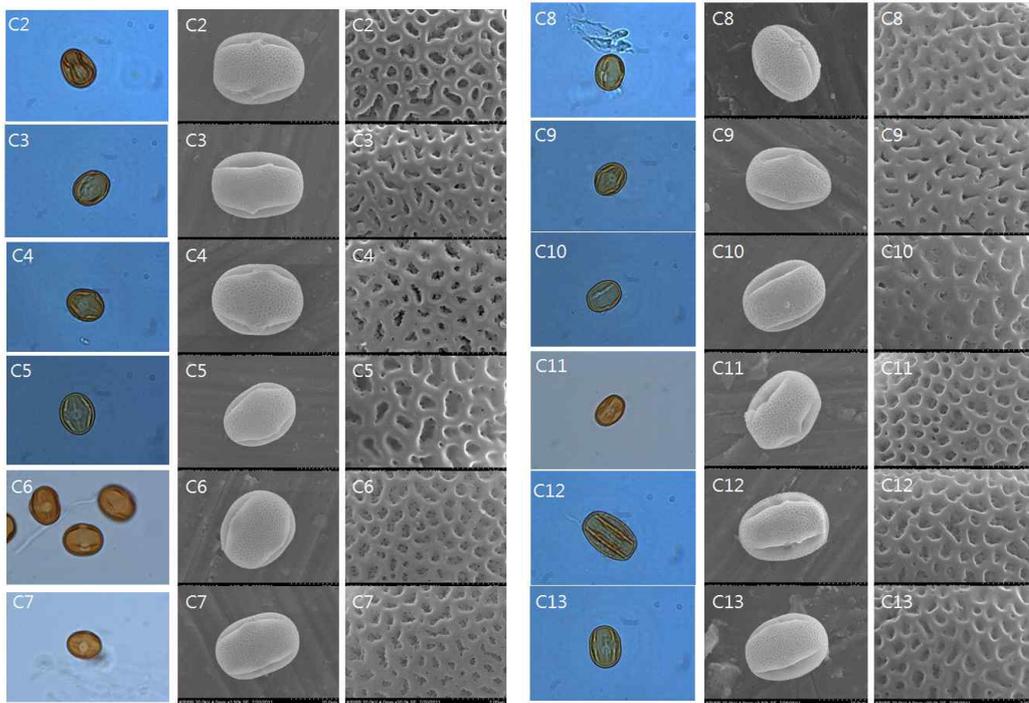
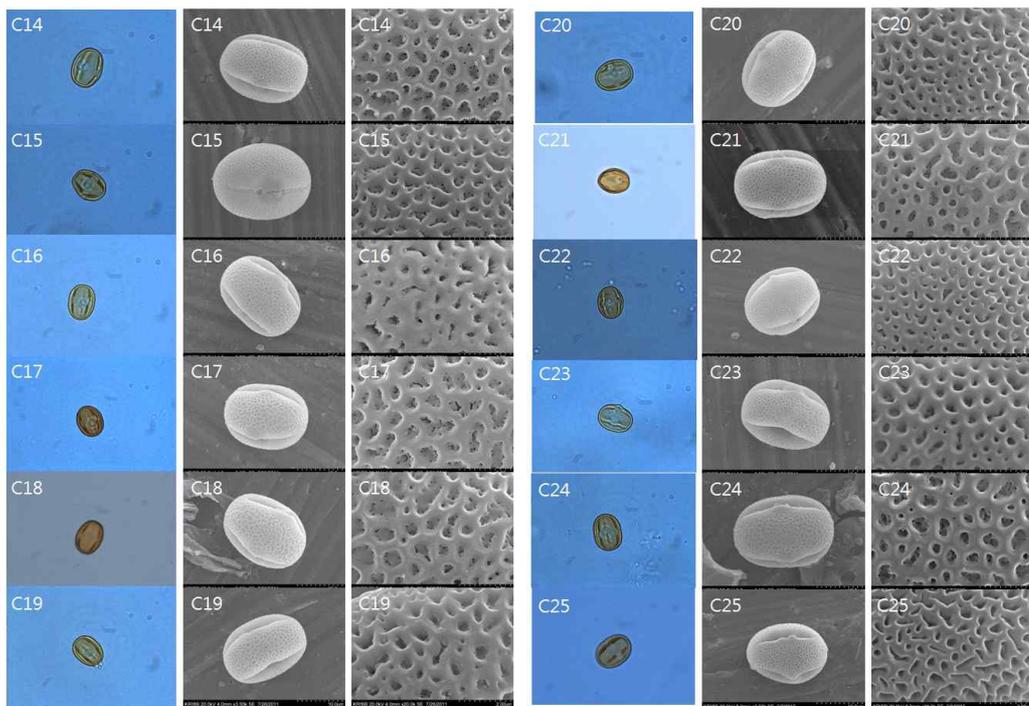


그림 41. LM and SEM micrographs of pollen in *Lespedeza cyrtobotrya*.



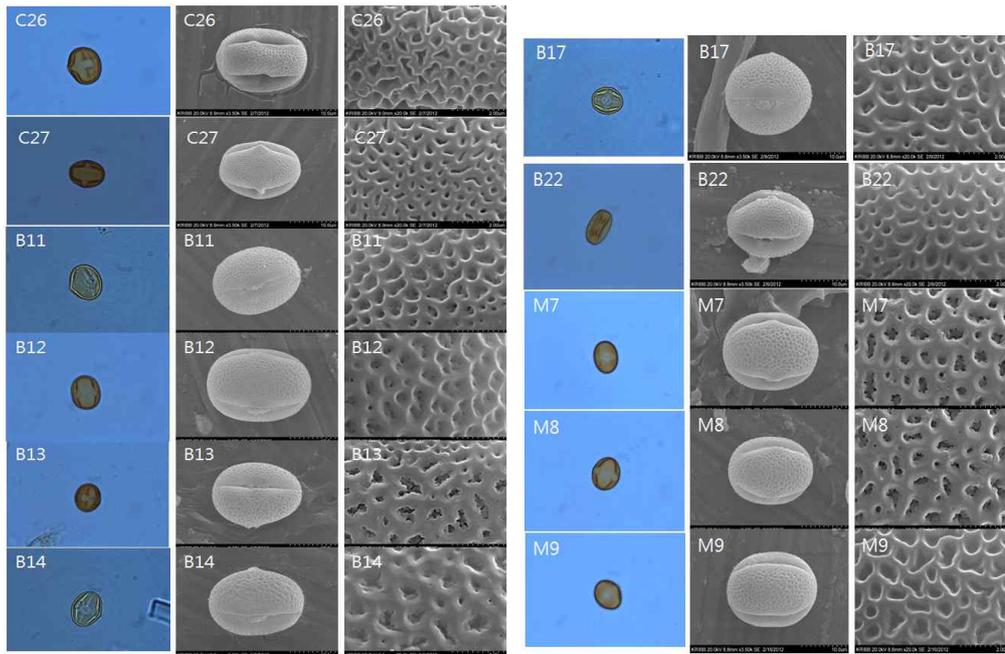


그림 42. LM and SEM micrographs of pollen in *Lespedeza cyrtobotrya* C26-27, *L. bicolor* B11-B14, B17-B22, *L. maximowiczii* M7-M9.

다. 참싸리 및 근연종의 종자형태학적 분석

Macrolespedeza 절의 참싸리, 싸리, 조록싸리에 대하여 종자의 형태와 외종피의 표면무늬에 대하여 관찰하였다. 조사된 분류군에서 종자의 길이는 참싸리는 2.87 - 3.49mm, 폭 1.95 - 2.46mm, 싸리는 2.92±0.25mm, 폭 2.41±0.21mm, 조록싸리는 3.28±0.29mm, 폭 1.81±0.16mm로 참싸리, 싸리, 조록싸리에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 종자의 형태는 길이와 폭의 비가 참싸리, 싸리는 1.22 - 1.58이었으며, 조록싸리는 1.81로서 참싸리, 싸리는 모두 타원형(elliptic)이고, 조록싸리는 신장형(kidney shaped)으로 참싸리, 싸리와는 구분할 수 있었다. 종자의 색깔은 자갈색 및 갈색, 연한 갈색 등 참싸리, 싸리, 조록싸리에서 모두 고루 나타났으며, 또한 흑갈색의 반점 또한 모두 나타났다. 종자의 미세구조는 참싸리, 싸리, 조록싸리에서 모두 평탄하였다 (Smooth). 결과적으로 종자의 형태에 의해서는 참싸리, 싸리, 조록싸리는 색깔, 미세구조 및 크기에 의해서는 구분할 수 없었으며, 참싸리 집단간에서도 차이점을 찾지 못하였다. 다만 종자의 형태에 의해서는 참싸리, 싸리는 모두 타원형인 반면 조록싸리는 신장형의 형태가 보여 다소 차이를 보였다. 그러나 조록싸리 및 싸리의 경우 개체수가 한정되어 있어 결과를 결정하기에는 부족하며 좀 더 많은 개체수를 관찰할 필요성이 있겠다.

표 15. Seed morphological data of *Lespedeza* in the Korean.

Code No	Taxon	Length (mm)	Width (mm)	L/W	Shape	Colour	Surface
C1	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.49±0.28	2.22±0.16	1.58±0.14	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C2	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.17±0.31	2.03±0.23	1.58±0.26	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C3	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.27±0.21	2.29±0.14	1.44±0.12	elliptic	light brown	Smooth
C5	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.28±0.26	2.18±0.24	1.52±0.20	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C6	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.41±0.30	2.28±0.21	1.50±0.09	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C7	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.32±0.16	2.35±0.12	1.42±0.12	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C8	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2.89±0.24	1.95±0.27	1.46±0.10	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C9	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2.98±0.20	2.32±0.17	1.29±0.10	elliptic	light brown	Smooth
C10	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.07±0.25	2.09±0.17	1.47±0.11	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C11	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.43±0.19	2.46±0.12	1.39±0.05	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C12	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.16±0.38	2.36±0.33	1.34±0.09	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C13	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2.87±0.19	2.12±0.13	1.35±0.06	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C14	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.45±0.24	2.37±0.17	1.46±0.11	elliptic	light brown	Smooth
C15	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2.92±0.18	2.10±0.40	1.55±0.92	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C16	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.35±0.33	2.28±0.18	1.47±0.14	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C17	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.57±0.20	2.38±0.18	1.50±0.08	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C18	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.27±0.30	2.18±0.24	1.51±0.19	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C19	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.13±0.27	2.11±0.12	1.49±0.15	elliptic	light brown	Smooth
C20	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.10±0.27	2.24±0.15	1.39±0.10	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C21	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.15±0.27	2.23±0.14	1.41±0.12	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C24	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.30±0.16	2.28±0.09	1.45±0.08	elliptic	dark purple-brown	Smooth
C25	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	3.35±0.38	2.26±0.17	1.49±0.17	elliptic	dark purple-brown	Smooth
B13	<i>Lespedeza bicolor</i>	2.92±0.25	2.41±0.21	1.22±0.09	elliptic	light brown	Smooth
M9	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	3.28±0.29	1.81±0.16	1.81±0.10	kidney shaped	dark purple-brown	Smooth

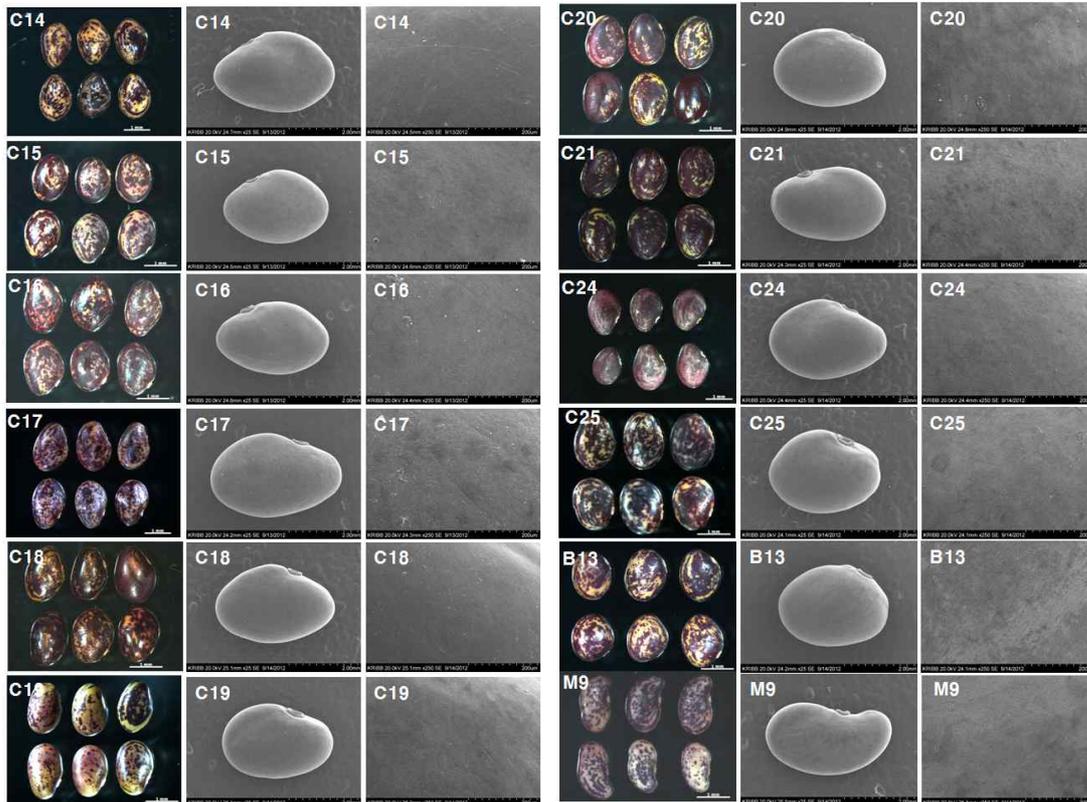
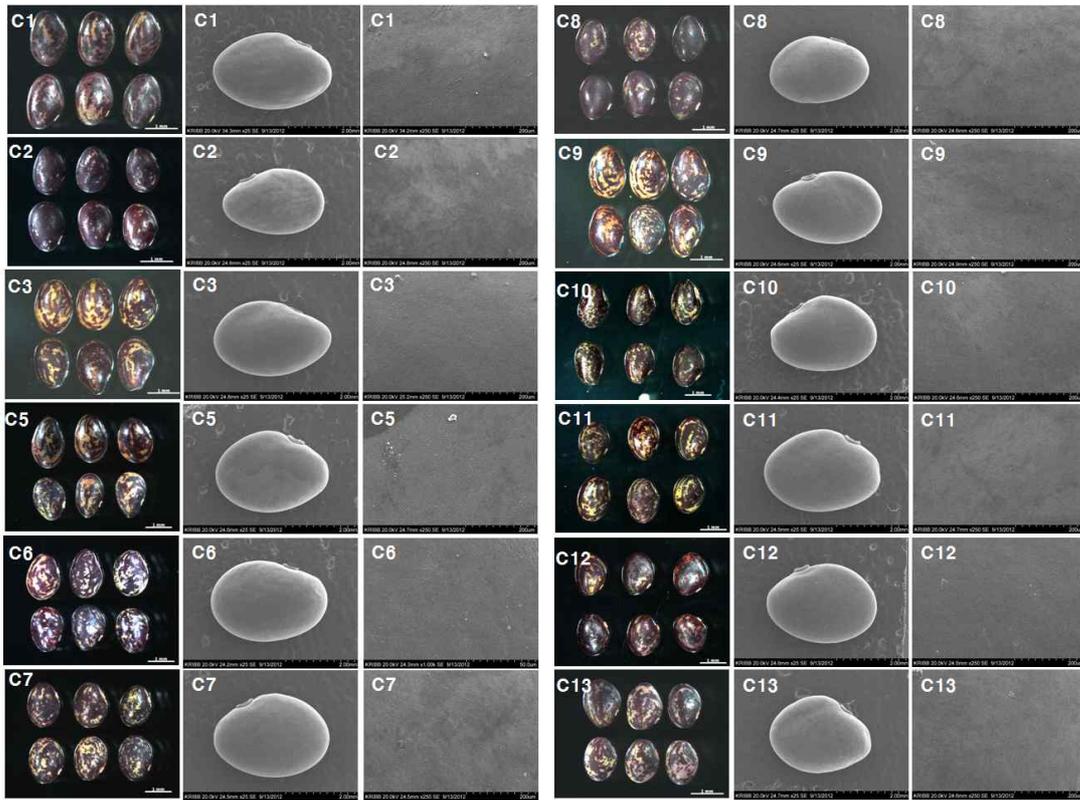


그림 43. LM and SEM micrographs of seed in *Lespedeza cyrtobotrya* C2-25, *L. bicolor* B13, *L. maximowiczii* M9.

라. 참싸리 및 근연종의 분자계통학적 분석

표 16. 분자계통분석을 위해 사용된 참싸리 외 근연종의 채집목록

No.	Code No	학명	채집일	채집장소	채집자 No.
1	C1	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-09	충청남도 공주시 반포면	S.H. Park et al. 2010-1001
2	C2	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1001
3	C3	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1002
4	C4	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 고성군 대가면 대곡산	J.K. Kim et al. 2010-1003
5	C5	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 통영시 산양읍	J.K. Kim et al. 2010-1004
6	C6	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-21	경상남도 거제시 동부면	J.K. Kim et al. 2010-1005
7	C7	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-30	충청북도 영동군 용화면 민주지산	S.H. Park et al. 2010-1002
8	C8	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-07-30	전라북도 무주군 적상면 적상산	S.H. Park et al. 2010-1003
9	C9	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-01	경상북도 포항시 남구 오천읍 운재산	J.U. Eum 2010-1001
10	C10	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2011-1011
11	C11	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-05	전라남도 광주 광산구 왕동저수지	C. Y. Lee et al. 2010-1002
12	C12	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-06	전라남도 장성군 북하면 대각산 관당사 근처	C. Y. Lee et al. 2010-1003
13	C13	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면 수암지	C. Y. Lee et al. 2011-1010
14	C14	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-08-10	충청북도 단양군 단양읍	J.K. Kim et al. 2011-1013
15	C15	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 영주시 가흥2동	J.K. Kim et al. 2010-1007
16	C16	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 봉화군 춘양면	J.K. Kim et al. 2010-1008
17	C17	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-21	제주도 제주시 봉개동 명도암	J.K. Lee et al. 2010-1001
18	C18	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-08-27	강원도 동해시	J.K. Kim 2010-1009
19	C19	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-09-08	경기도 남양주시 화도읍 약수암	C.Y.Lee et al. 2010-1005
20	C20	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-09-08	강원도 춘천시 서면 삼악산	C. Y. Lee et al. 2010-1006
21	C21	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 춘천시 동면 평촌리	C. Y. Lee et al. 2010-1007
22	C22	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 원주시 신희면 성남리	C. Y. Lee et al. 2010-1008
23	C23	<i>L. cyrtobotrya</i>	2010-09-10	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C. Y. Lee et al. 2010-1009
24	C24	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역 근처 작은야산	J.K.Kim et al. 2011-1001
25	C25	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사 대형주차장	J.K.Kim et al. 2011-1002
26	C26	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사 대형주차장	J.K. Kim et al. 2011-1003
27	C27	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사 대형주차장	J.K. Kim et al. 2011-1004
28	C28	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-19	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2011-1005
29	C29	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-19	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2011-1006
30	C30	<i>L. cyrtobotrya</i>	2009-09-07	Fong chun, Hun chun, Ji Lin, China	
31	C36	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-07-21	강원도 평창군 오대산 방아다리 약수인근	J. E. Han 2011-1001
32	C37	<i>L. cyrtobotrya</i>	2011-12-01	Xuefeng Reservoir, Hancheng city, China	J. K. Kim et al. 2011-1007
33	C40	<i>L. cyrtobotrya</i>	2008-09-06	Japan	
34	C41	<i>L. cyrtobotrya</i>	2005-10-02	Shikoku, Kochi Pref. Ino-machi, Japan	
35	B11	<i>L. bicolor</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역 근처 도로가	J. K. Kim et al. 2011-1008
36	B12	<i>L. bicolor</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C. Y. Lee et al. 2011-1001
37	B13	<i>L. bicolor</i>	2011-08-17	경상남도 통영시 도천동	C. Y. Lee et al. 2011-1002
38	B14	<i>L. bicolor</i>	2011-08-10	경상북도 영주시 가흥2동	J. K. Kim et al. 2011-1009
39	B17	<i>L. bicolor</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면 수암지	C. Y. Lee et al. 2011-1003
40	B21	<i>L. bicolor</i>	2009-09-06	Caomaazi, Dongxing town, Ji Lin, China	
41	B22	<i>L. bicolor</i>	2011-08-29	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C. Y. Lee et al. 2011-1004
42	B23	<i>L. bicolor</i>	2011-07-21	강원도 평창군 오대산 방아다리 약수인근	J. E. Han 2011-1002
43	B24	<i>L. bicolor</i>	2011-09-08	Yunmengshan National Forest Part, Beijing, China	
44	B25	<i>L. bicolor</i>	2011-09-08	Yunmengshan National Forest Part, Beijing, China	
45	B26	<i>L. bicolor</i>	2011-09-08	Yunmengshan National Forest Part, Beijing, China	
46	B27	<i>L. bicolor</i>	2011-09-23	XiaoLong MenNationalForestPark, Beijing, China	
47	B28	<i>L. bicolor</i>	1995-08-10	Japan	
48	B29	<i>L. bicolor</i>	2004-09-24	Honshu, Niigata Pref., Kariya-gun, Japan	
49	B30	<i>L. bicolor</i>	2004-08-12	Hokksido, Oshima Division, Kayabe-gun, Japan	
50	B31	<i>L. bicolor</i>	2007-08-01	Honshu, Miyagi Pref., Osaki-shi, Japan	
51	LB1	<i>L. bicolor</i>	2011-09-22	중국 개화원 고전산	J. K. Kim 2011-1011
52	LB2	<i>L. bicolor</i>	2011-09-10	중국 천태원 천태산	
53	M4	<i>L. maximowiczii</i>	2010-08-05	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2010-1010
54	M5	<i>L. maximowiczii</i>	2010-08-05	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2010-1011
55	M7	<i>L. maximowiczii</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C. Y. Lee et al. 2011-1005
56	M8	<i>L. maximowiczii</i>	2011-08-17	경상남도 고성군 대가면 대곡산	C. Y. Lee et al. 2011-1006
57	M9	<i>L. maximowiczii</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C. Y. Lee et al. 2011-1007
58	M10	<i>L. maximowiczii</i>	2012-07-26	전라남도 영암군 군서면 월출산	J. K. Kim et al.
59	M11	<i>L. maximowiczii</i>	2012-07-26	전라남도 영암군 학산면 매월제 근처	J. K. Kim et al.
60	M12	<i>L. maximowiczii</i>	2012-07-26	전라북도 부안군 상서면 내변산 실상사	Y. J. Jeong et al.
61	M13	<i>L. maximowiczii</i>	2012-07-27	전라남도 나주시 노안면 이별제 입구	J. K. Kim et al.
62	M14	<i>L. maximowiczii</i>	2012-07-27	전라북도 정읍시 산내면 들꽃세상	J. K. Kim et al.
63	M15	<i>L. maximowiczii</i>	2012-08-18	전라남도 구례군 지리산	C. Y. Lee et al.
64	KM1	<i>Kummerowia striata</i>	2011-08-17	경상남도 거제시 동부면	C. Y. Lee et al. 2011-1009
65	KM3	<i>K. striata</i>	2011-08-10	경상북도 봉화군 춘양면	J. K. Kim et al. 2011-1012

*Lespedeza*속은 다른 근연속과의 분자계통학적 연구를 위해서 참싸리 34집단, 싸리 18집단, 조록싸리 11집단, 매듭풀(*Kummerowia striata*) 2집단, 총 65집단을 가지고 수행한 결과 *Lespedeza*속은 근연속과의 유연관계에서 단계통임이 확인되었으며 *Lespedeza*속내에서도 참싸리 및 싸리 집단을 제외한 다른 근연종과의 유연관계가 구분되는 것으로 분석되어 분자계통학적 연구방법은 유용한 분류학적 접근방법임이 조사되었다. 하지만 참싸리 집단과 싸리 집단의 분류학적 유연관계가 현재까지 분자계통학적 연구에 의해 분류학적 한계를 설정하기에는 다소 무리가 있는 것으로 조사되었으며 국내외 동일종과의 지리적 차이를 나타나지 않는 것으로 보아 참싸리 및 싸리의 명확한 분류학적 설정이 현재까지 모호한 실정이다. 본 연구 결과 외군인 매듭풀(*Kummerowia striata*)을 포함한 ITS, *trnL*, *trnL-trnF* 구간의 각각의 정렬된 염기서열은 614-622bp, 529-530bp, 354-367bp로 총 1530bp가 나타났다. 5.8S coding region을 포함한 ITS region의 모든 종에서 ITS1의 길이가 ITS2의 길이보다 긴 것으로 나타났다. ITS1은 232~241bp로 C14, C37과 B14, B21, B25, B26, B27이 241bp로 길게 나타났고, outgroup인 매듭풀이 232bp로 가장 짧게 나타났다. ITS2의 길이는 217-218bp로 매듭풀만 218bp를 나타냈고 나머지 모두 217bp로 동일했다. 5.8S coding region는 164bp로 모두 길이가 같았다. *trnL* intron 구간에서는 M11은 529bp, 나머지는 모두 530bp로 동일했다. *trnL-trnF* intergenic spacer에서는 354-367bp로 참싸리 집단이 354-365bp, 싸리 집단에서는 360-365bp로 나타났다. 그리고 조록싸리 집단은 360bp, 매듭풀 집단은 367bp를 나타냈다.

염기조성에서 G+C content는 ITS에서 참싸리는 63.7-64.2%, 싸리 63.8-64.2%, 조록싸리 64.2%, 그리고 매듭풀에서는 63%로 나타났다. *trnL*에서는 참싸리, 싸리, 조록싸리에서 33.6 %로, 매듭풀에서 32.8%로 나타났다. *trnL-trnF*에서는 참싸리 21.3-22.0%, 싸리와 조록싸리 21.4-21.7%, 매듭풀 22.6%로 나타났다.

계통학적 분석에서 총 1530개의 character중 variable character는 83(ITS: 56, *trnL*: 12, *trnL-trnF*: 15)개로 나타났다. 이들 중 2개 이상의 분류군에서 공유되어 계통학적으로 해상력을 제공하는 형질들(Parsimony informative characters) 73개(ITS: 50, *trnL*: 11, *trnL-trnF*: 12) 인 식되었다. Maximum parsimony 분석 결과 indel을 결여형질로 취급한 자료에서 각각의 자료를 얻었다(표 X).

ITS NJ tree(neighbor-joining tree, 그림 X)결과에서 총 3개 clade로 나뉘어졌다. Clade I에서는 한국, 중국, 일본의 참싸리와 한국, 일본 싸리가 혼재되어 있다. 그리고 이 그룹에는 검나무싸리(*L. melanantha*)와 *L. formosa* subsp. *velutina*가 속해 있다. 검나무싸리(*L. melanantha*)는 정, 1999; Nemoto et al., 2010; Han et al, 2010의 분자계통학적 연구에서 싸리와 가장 가까운 유연관계를 나타내고 있으나, 본 결과에서는 참싸리와 싸리 집단의 유연관계를 명확히 논할 수 없게 되었다. 또한 *Macrolespedeza*아속내 *Macrolespedeza*계열에 속하는 참싸리, 싸리, 검나무싸리와 *Formosae*계열에 속하는 *L. formosa* subsp. *velutina* 집단은 염기서열상에서 유연관계가 불분명하게 혼재되어 나타났다. Clade II에서는 조록싸리만 단독으로 clade를 형성하여 참싸리, 싸리와 구분된다. Clade III에서는 한국 영월의 싸리(B11)와 7집단의 중국싸리가 clade를 형성하고 있다.

ITS의 70% majority-rule consensus tree(그림 X)에서 총 5개의 clade로 나뉘며, *Lespedeza*아속의 *L. cuneata*와 구분되어 단계통을 형성하고 있다. Clade I에서는 참싸리, 싸리, 검나무싸리, *L. formosa*는 종간의 해상력을 나타내지 못하고 있다. Clade II, III은 한국과 중국싸리가 혼재되어 있다. Clade IV는 조록싸리 집단이 단독으로 clade를 형성하고 있다. Clade V는 중국

싸리 2집단이 속해있다. 일부 소그룹에서 참싸리와 싸리가 각각 group을 형성하여, 두 종간의 가까운 유연관계를 나타내기도 하였으나, 명확한 구분은 되지 않고 있다. 반면 조록싸리 집단은 독립된 그룹으로 강하게 지지되고 있다.

세 개의 유전자(ITS, *trnL*, *trnL-trnF*)를 유합한 70% majority-rule consensus tree(그림 X)에서 3 clade로 나뉘었다. Clade I에서는 한국의 참싸리와 일본의 참싸리, 싸리가 속해있다. Clade II에서는 참싸리와 싸리가 혼재되어 있으며, Clade III에는 조록싸리 집단만이 속해있다. 위의 결과와 마찬가지로 참싸리와 싸리 그룹간의 뚜렷한 유연관계가 나타나지 않고, 혼재되어 있으며, 조록싸리 집단은 독립된 그룹으로 지지되고 있다.

표 17. Values and statistics from parsimony analyses of ITS, *trnL*, *trnL-trnF* and combined DNA data

	ITS	<i>trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	Combined
Unaligned length of sequences (bp)	614-622	529-530	354-367	1503-1515
Aligned length of sequences (bp)	625	530	375	1530
No. of variable characters	56	12	15	83
No. of parsimony informative characters (%)	50 (8)	11 (2.1)	12 (3.2)	73 (4.8)
G+C content (%)	64.1	33.6	21.6	43
No. of trees retained	3	16	3	>10000
Tree length	58	12	15	91
Consistency index (CI)	0.98	0.92	0.93	0.85
Retention index (RI)	0.99	0.93	0.98	0.92

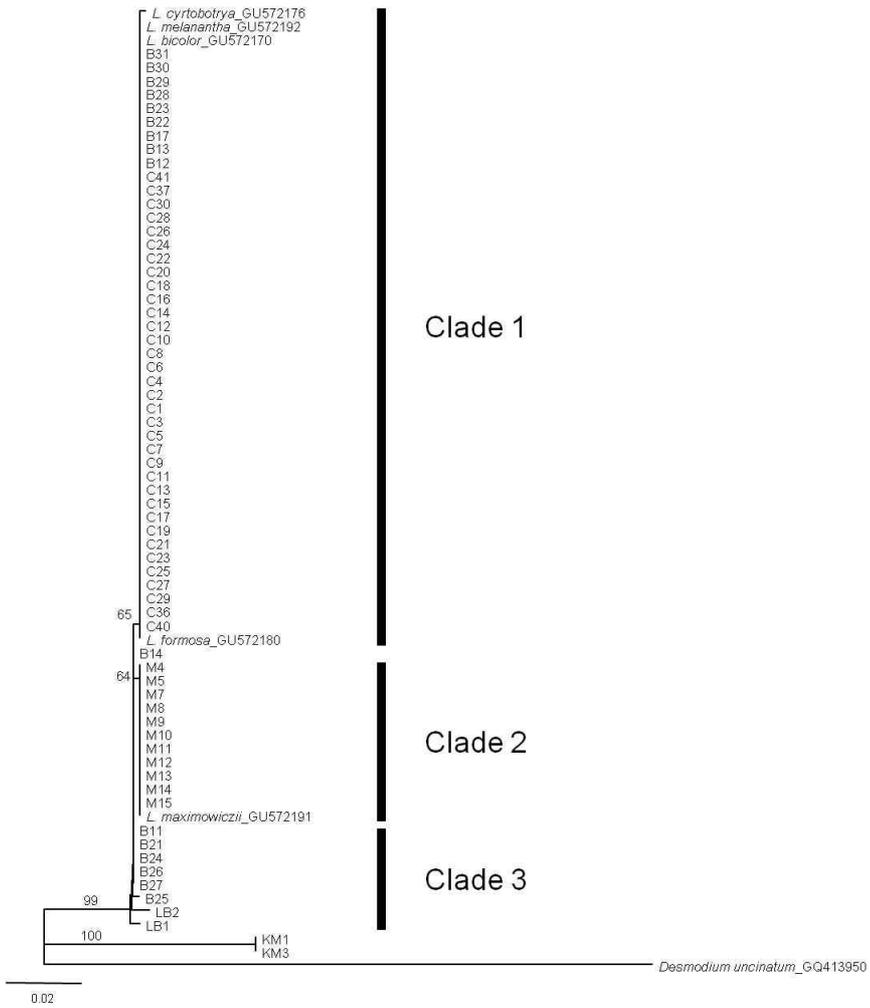


그림 44. NJ tree of ITS based on distance value.

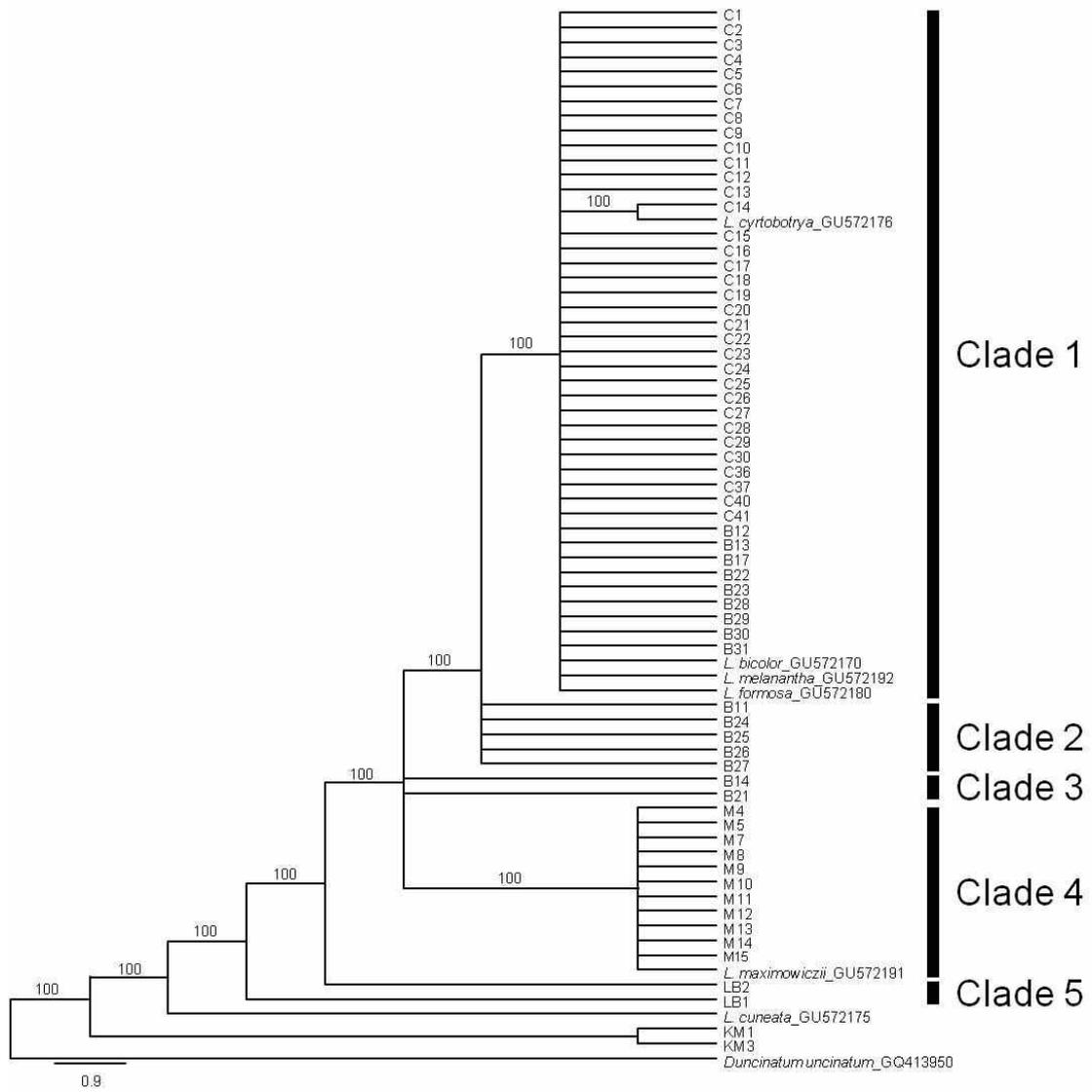


그림 45. The 70% Majority rule tree of the 174 most parsimonious trees from the parsimony analysis [1000 random addition replicates, tree-bisection-recombination (TBR) branch swapping] of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) for Lespedeza and related species. Bootstrap values are given above the branches.

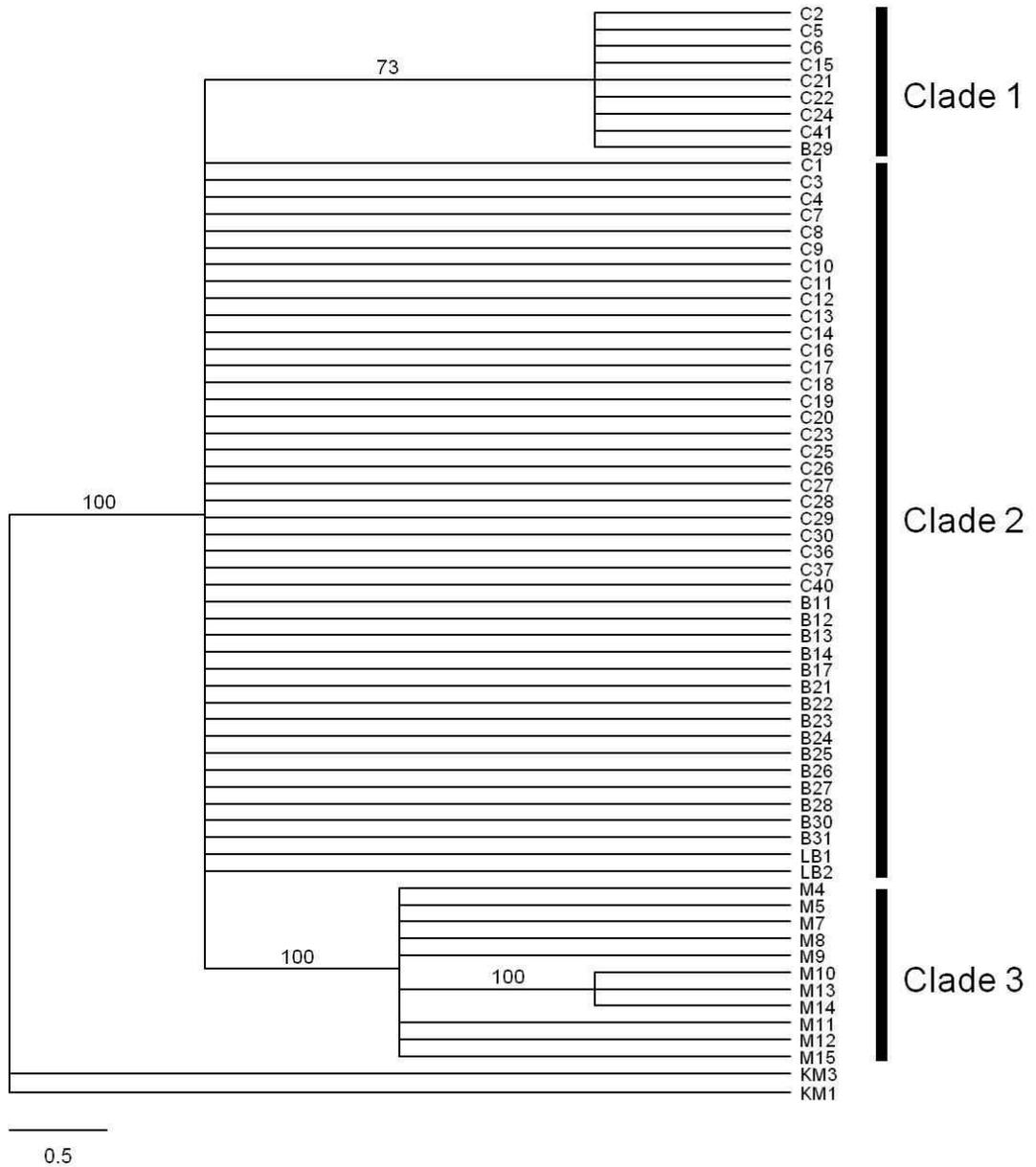


그림 46. The 70% Majority rule tree of the 99 most parsimonious trees from the parsimony analysis [1000 random addition replicates, tree-bisection-recombination (TBR) branch swapping] of combined sequences(ITS, *trnL*, *trnL-trnF*) for *Lespedeza* and related species. Bootstrap values are given above the branches.

마. 참싸리 및 근연종의 분자유전학적 분석

Labchip을 이용하여 참싸리 26집단, 싸리 10집단, 조록싸리 4집단, 총 40집단을 가지고 7개의 primer를 이용해 분자유전학적 연구를 수행한 결과 총 5개의 유집군을 형성하였으나, 종간의 뚜렷한 차이가 나타나지 않았으며 참싸리 및 싸리, 조록싸리 집단간의 유전적 유사성이 독립적이지 못하였다. 따라서 ISSR를 이용한 *Lespedeza*속의 유전학적 비교연구는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

표 18. ISSR분석 실험에 이용한 재료 리스트

No.	Code No.	학명	채집일	채집장소	Voucher
1	C1	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-09	충청남도 공주시 반포면	S.H. Park et al. 2010-1001
2	C2	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1001
3	C3	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-22	경상남도 거창군 가조면 오도산	J.K. Kim et al. 2010-1002
4	C4	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 고성군 대가면 대곡산	J.K. Kim et al. 2010-1003
5	C5	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-20	경상남도 통영시	J.K. Kim et al. 2010-1004
6	C6	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-21	경상남도 거제시	J.K. Kim et al. 2010-1005
7	C7	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-30	충청북도 영동군 용화면 민주지산	S.H. Park et al. 2010-1002
8	C8	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-07-30	전라북도 무주군 적상면 적상산	S.H. Park et al. 2010-1003
9	C9	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-01	경상북도 포항시 남구 오천읍 윤제산	J.U. Eum 2010-1001
10	C10	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C.Y.Leeetal.2011-1011
11	C11	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-05	전라남도 광주광역시 광산구 왕동저수지	C.Y.Leeetal.2010-1002
12	C12	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-06	전라남도 장성군 북하면 대각산	C.Y.Leeetal.2010-1003
13	C13	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면수암지	C.Y.Leeetal.2011-1010
14	C14	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-08-10	충청북도 단양군 단양읍	J.K. Kim et al. 2011-1013
15	C15	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 영주시 가흥2동	J.K. Kim et al. 2010-1007
16	C16	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-12	경상북도 봉화군 춘양면	J.K. Kim et al. 2010-1008
17	C17	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-21	제주도 제주시 봉개동	J.K. Lee et al. 2010-1001
18	C18	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-08-27	강원도 동해시	J.K. Kim 2010-1009
19	C19	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-08	경기도 남양주시 화도읍 약수암	C.Y.Leeetal.2010-1005
20	C20	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-08	강원도 춘천시 서면 삼악산	C.Y.Leeetal.2010-1006
21	C21	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 춘천시 동면 평촌리	C.Y.Leeetal.2010-1007
22	C22	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-09	강원도 원주시 신림면 성남리	C.Y.Leeetal.2010-1008
23	C23	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2010-09-10	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C.Y.Leeetal.2010-1009
24	C24	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역근처 작은야산	J.K. Kim et al. 2011-1001
25	C25	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2011-07-27	경상북도 포항 북구 보경사 대형주차장	J.K. Kim et al. 2011-1002
26	C30	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i>	2009-09-07	Fomg chun, Hun chun, Ji Lin, China	
27	B1	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-09-22	중국 개화현 고전산	J.K. Kim 2011-1011
28	B2	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-09-10	중국 천태현 천태산	
29	B11	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-07-26	강원도 영월 연당역 근처 도로가	J.K. Kim et al. 2011-1008
30	B12	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C.Y. Lee et al. 2011-1001
31	B13	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-17	경상남도 통영시 도천동	C.Y. Lee et al. 2011-1002
32	B14	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-10	경상북도 영주시 가흥2동	J.K. Kim et al. 2011-1009
33	B17	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-04	전라북도 정읍시 용동면 수암지	C.Y. Lee et al. 2011-1003
34	B18	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-10	충청남도 공주시 반포면 계룡산지류	S.H. Park et al. 2011-1001
35	B21	<i>Lespedeza bicolor</i>	2009-09-06	Caomaazi, Dongxingtown, JiLin, China	
36	B22	<i>Lespedeza bicolor</i>	2011-08-29	경기도 안성시 죽산면 칠장리	C.Y. Lee et al. 2011-1004
37	M1	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-09-09	중국 천태현 천태산	
38	M7	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-03	경상남도 거창군 가조면 오도산	C.Y. Lee et al. 2011-1005
39	M8	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-17	경상남도 고성군 대가면 대곡산	C.Y. Lee et al. 2011-1006
40	M9	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	2011-08-16	전라남도 광양시 옥룡면 백운산	C.Y. Lee et al. 2011-1007

표 19. ISSR 분석에 이용된 7 Primer 리스트와 3집단 내의 대립인자에 대한 통계수치

UBC Primer	Sequence	Annealing temp.(°C)	Total Number of bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands(%)
810	(GA) ₈ T	50.4	11	11	100
825	(AC) ₈ T	52.4	15	14	93
827	(AC) ₈ G	52.8	13	13	100
830	(TG) ₈ G	52.3	14	14	100
880	(GGAGA) ₃	50.6	14	13	92.8
881	(GGGTG) ₃	58.8	17	17	100
888	BDB(CA) ₇	52	15	15	100
total			99	97	97.9

B=(C, G, T) ; D=(A, G, T)

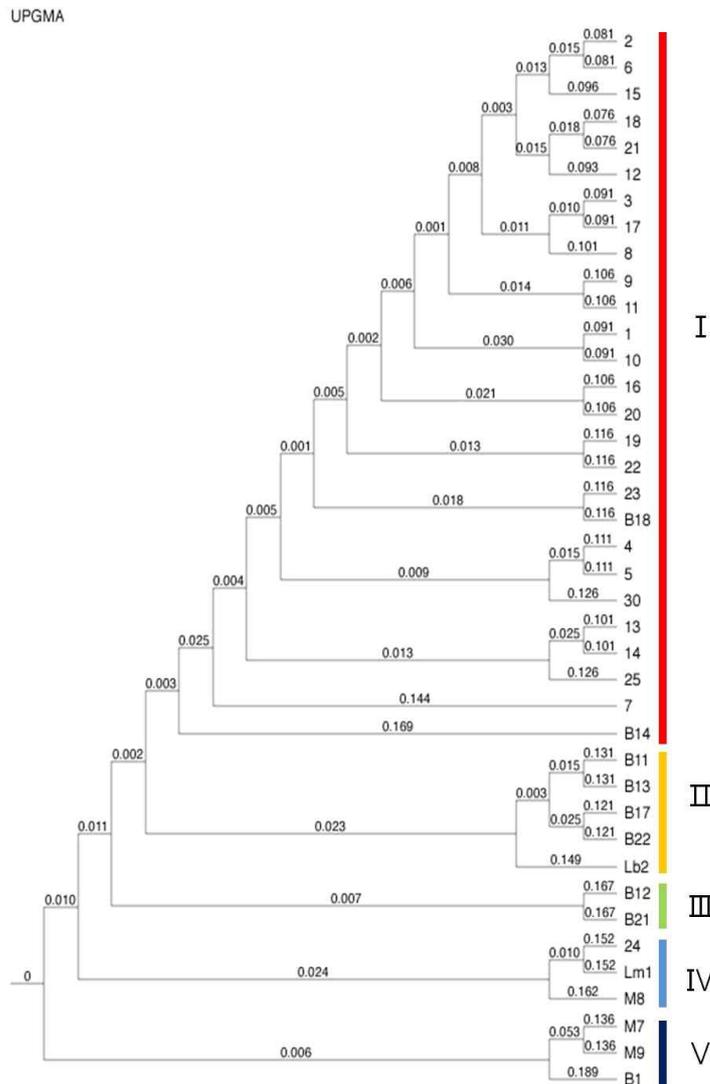


그림 47. UPGMA phenogram and bootstrap of ISSR pattern based on Nei -Li distances (Dice coefficient).

2. 참싸리 및 근연종의 종자특성 연구

(1) Soft X-ray 기기를 통한 종자결실 및 충실도 탐색

종자를 파괴하지 않고 종자의 결실 충실도, 병충해 및 물리적 상해 정도를 확인하기 참싸리 22집단의 종자를 연엑스선(soft x-ray) 장치를 이용하여 95% 이상의 충실도(병충해 및 상해정도)가 높은 종자를 선별하였다.

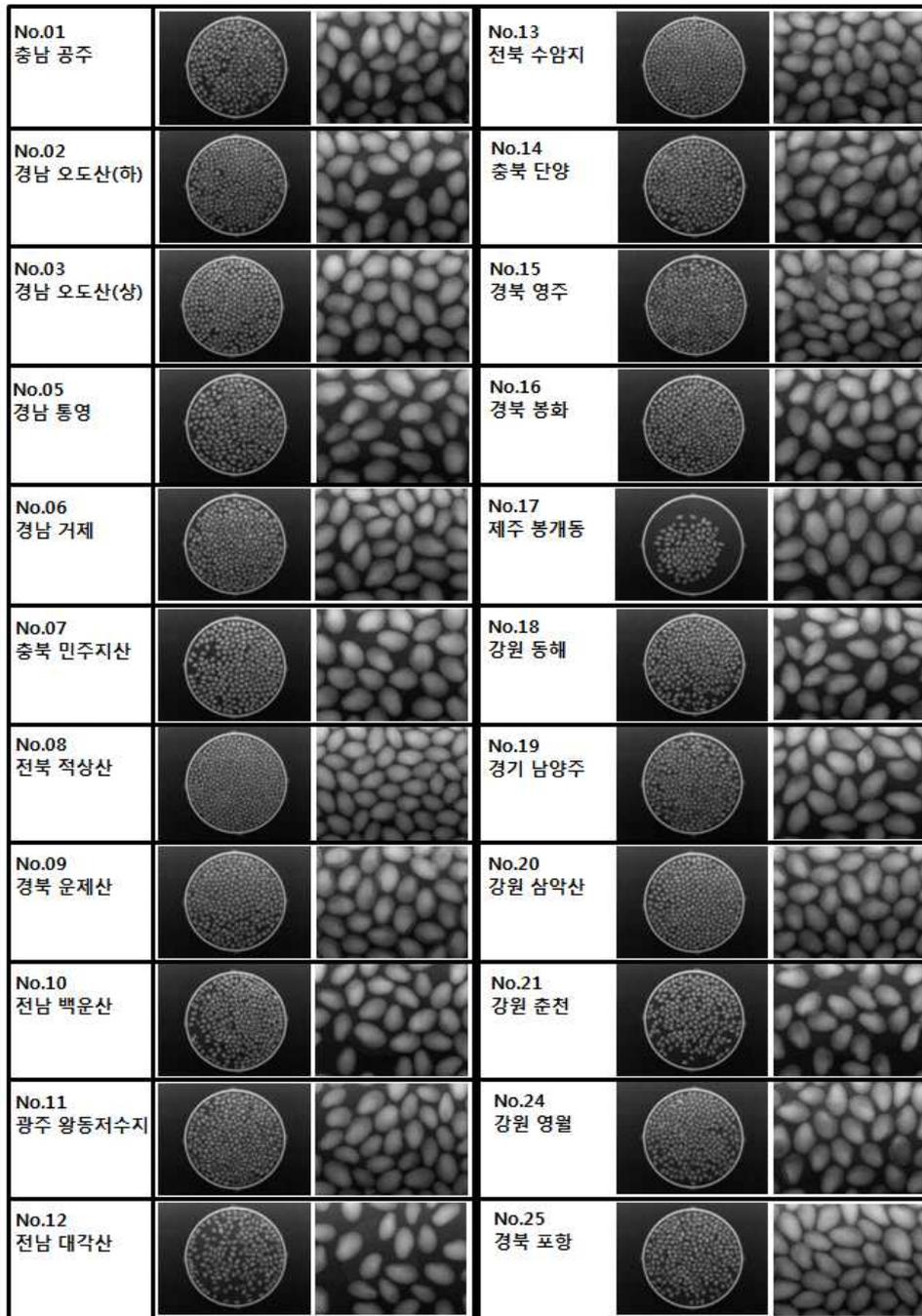


그림 48. 참싸리집단의 Soft X-ray를 통한 종자결실 충실도

	영주	2주	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	20
		3주	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15
		4주	-	-	4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	6	30
		6주	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4	20
IV 단계	No.16 봉화	1주	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	30	
		2주	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8	40	
		3주	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	45	
		4주	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	25	
		6주	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	40	
	No.25 포항	1주	-	7	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	10	50	
		2주	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	30	
		3주	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	15	
		4주	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	35	
		6주	-	-	12	-	1	-	-	-	-	-	-	-	13	65	
V 단계	No.07 민주지산	1주	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0		
		2주	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	10		
		3주	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	3	15		
		4주	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5		
		6주	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15		
	No.24 영월	1주	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0		
		2주	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5		
		3주	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2	10		
		4주	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0		
		6주	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2	10		

(※ 발아소요일 수는 15일 이후에 발아한 종자가 없었기에 14일까지만 나타냄)

다. 종피 연화처리를 통한 발아율 향상

성숙단계별 종자발아 향상 정도를 확인하기 위해 종피연화처리(황산처리)에 의한 참싸리 종자의 발아율 향상 검정을 실시하였으며, 80% 황산용액을 사용하여 25℃ 항온실에서 발아율 추이를 확인하였다. 연구결과 각 분류군별로 약간의 차이는 있지만 30분 동안 처리했을 때보다 1시간 또는 2시간 동안 처리했을 때가 발아율이 최대 3배 정도 높아지는 것을 확인할 수 있었고, 1시간 처리와 2시간 처리 사이에 큰 차이는 없지만 2시간 처리하는 것이 좀 더 높은 발아율을 보이는 것을 알 수 있었다. 발아율에서도 알 수 있듯이 80% 황산용액에 1시간 이상 침지시킬 경우 발아율이 90% 이상으로 급증하는 것을 알 수 있다. 하지만 2시간 동안 80% 황산용액에 참싸리 종자를 침지시켰을 경우 종피가 더 많이 녹아 종자의 발아율을 높일 수는 있지만 종자 내부에 직접적인 상해를 입히기 때문에 발아한 종자가 정상적인 개체로 성장하는 데는 오히려 더 안 좋다는 것을 알 수 있었다. 따라서 참싸리 종자의 발아율을 높이는 방법으로 종피를 연화시키는 데는 80% 황산용액에서 1시간 정도 침지시키는 것이 가장 적당한 방법이라고 판단된다.

표 22. 각 분류군별 80% 황산용액 처리시간에 따른 참싸리 발아율

	분류군	처리시간	파종수	발아소요일수							발아수	발아율(%)
				1	2	3	4	5	6	7		
II 단계	No.02 오도산	30분	20	1	4	2	-	-	-	2	9	45.0
		1시간	19	-	7	10	-	2	-	-	19	100.0
		2시간	20	1	12	6	-	-	-	-	19	95.0
	No.05 통영	30분	20	1	3	9	-	2	-	1	16	80.0
		1시간	20	-	9	6	-	-	-	3	18	90.0
		2시간	20	-	13	2	-	2	-	1	18	90.0
	No.15 영주	30분	20	1	5	2	-	3	-	-	11	55.0
		1시간	20	1	13	2	-	-	-	1	17	85.0
		2시간	20	-	17	1	-	1	-	1	20	100.0
	No.21 춘천	30분	20	2	7	-	-	2	-	3	14	70.0
		1시간	20	1	18	1	-	-	-	-	20	100.0
		2시간	20	-	14	2	-	1	-	1	18	90.0
III 단계	No.02 오도산	30분	20	1	6	2	-	1	-	3	13	65.0
		1시간	20	1	6	7	-	2	-	2	18	90.0
		2시간	20	-	19	-	-	1	-	-	20	100.0
	No.05 통영	30분	20	1	9	6	-	-	-	1	17	85.0
		1시간	20	2	11	5	-	-	-	2	20	100.0
		2시간	20	-	12	3	-	4	-	1	20	100.0
	No.15 영주	30분	20	2	9	5	-	-	-	-	16	80.0
		1시간	20	1	13	1	-	2	-	1	18	90.0
		2시간	19	7	11	-	-	1	-	-	19	100.0
	No.21 춘천	30분	20	1	5	2	-	3	-	1	12	60.0
		1시간	20	1	15	-	-	3	-	1	20	100.0
		2시간	20	1	14	2	-	2	-	1	20	100.0
IV 단계	No.02 오도산	30분	20	5	4	1	-	1	-	3	14	70.0
		1시간	20	-	15	3	-	-	-	-	18	90.0
		2시간	20	2	18	-	-	-	-	-	20	100.0
	No.05 통영	30분	20	1	8	5	-	2	-	2	18	90.0
		1시간	20	2	11	7	-	-	-	-	20	100.0
		2시간	20	-	15	2	-	3	-	-	20	100.0
	No.15 영주	30분	20	5	2	4	-	-	-	-	11	55.0
		1시간	20	9	11	-	-	-	-	-	20	100.0
		2시간	20	13	7	-	-	-	-	-	20	100.0
	No.21 춘천	30분	19	-	3	2	-	1	-	2	8	42.1
		1시간	20	-	9	3	-	3	-	-	15	75.0
		2시간	20	3	16	-	-	-	-	1	20	100.0
V 단계	No.02 오도산	30분	20	7	8	1	-	-	-	-	16	80.0
		1시간	20	1	13	2	-	3	-	1	20	100.0
		2시간	20	6	12	1	-	-	-	1	20	100.0
	No.05 통영	30분	20	-	12	4	-	2	-	-	18	90.0
		1시간	22	1	18	3	-	-	-	-	22	100.0
		2시간	20	-	16	3	-	-	-	1	20	100.0
	No.15 영주	30분	20	1	4	1	-	-	-	-	6	30.0
		1시간	20	5	7	4	-	1	-	1	18	90.0
		2시간	20	6	13	1	-	-	-	-	20	100.0
	No.21 춘천	30분	21	1	2	-	-	3	-	2	8	38.1
		1시간	21	-	9	-	-	8	-	2	19	90.5
		2시간	18	-	8	1	-	3	-	5	17	94.4

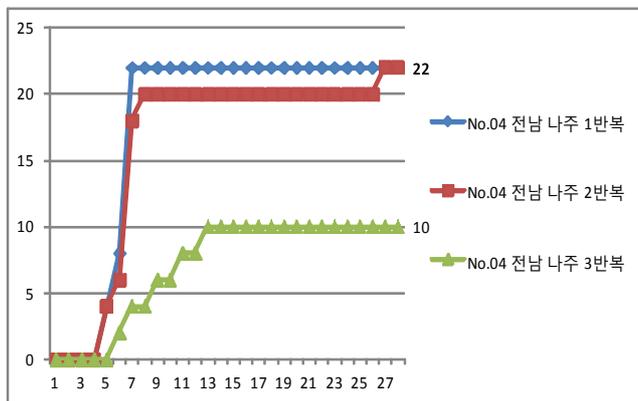
3. 조록싸리 종자의 발아특성 연구

가. 일반 발아율 검정

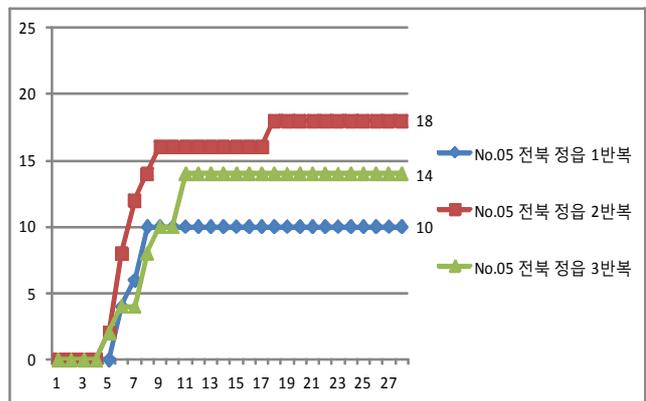
종자의 기본적인 발아율을 검정하는 방법으로 종자에 아무런 처리도 하지 않은 상태에서 종자 자체의 발아율을 확인하고, 이 후에 실시되는 저온처리 기간이 발아율 향상에 미치는 영향과 종피 연화처리에 따른 발아율 향상 정도와의 비교를 위해 실시하였다. 과종은 50립씩 3반복으로 상토에 시행하였으며, 25℃ 항온실에서 4주일 동안 발아율을 관찰하였다. 발아율 확인 결과, 경남 고성(19.3%) > 전남 나주(18.0%) > 전남 광양(14.7%) > 전북 정읍(14.0%) > 경남 통영(8.7%) 순으로 나타났으나, 5분류군 모두 20% 미만의 저조한 발아율을 보였다. 조록싸리 종자 역시 참싸리 종자와 마찬가지로 대량증식을 위해서는 종피 연화처리와 같이 발아율을 향상시킬 수 있는 다른 방법이 필요한 것으로 판단된다.

표 23. 조록싸리 일반 발아율 검정결과

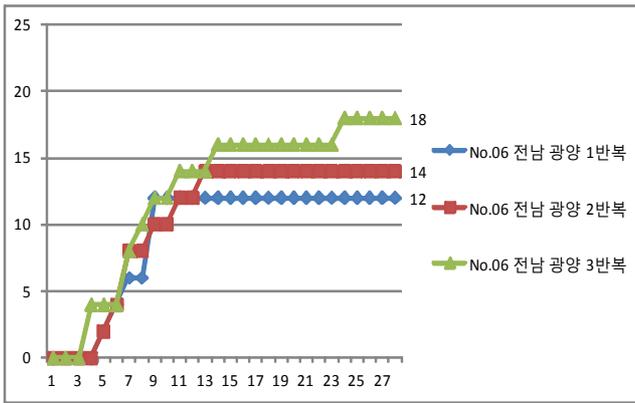
분류군	반복	발아율(%)	분류군별 평균 발아율 (%)	전체 평균 발아율 (%)
No.04 전남 나주	1반복	22	18.0	14.9
	2반복	22		
	3반복	10		
No.05 전북 정읍	1반복	10	14.0	
	2반복	18		
	3반복	14		
No.06 전남 광양	1반복	12	14.7	
	2반복	14		
	3반복	18		
No.08 경남 고성	1반복	22	19.3	
	2반복	14		
	3반복	22		
No.12 경남 통영	1반복	10	8.7	
	2반복	10		
	3반복	6		



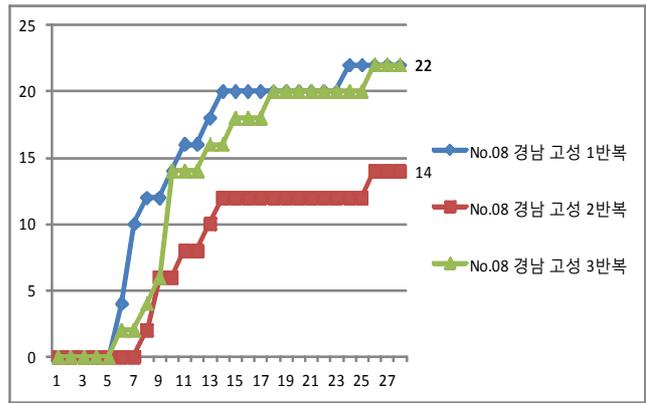
<No.04 전남 나주 분류군의 일반 발아율>



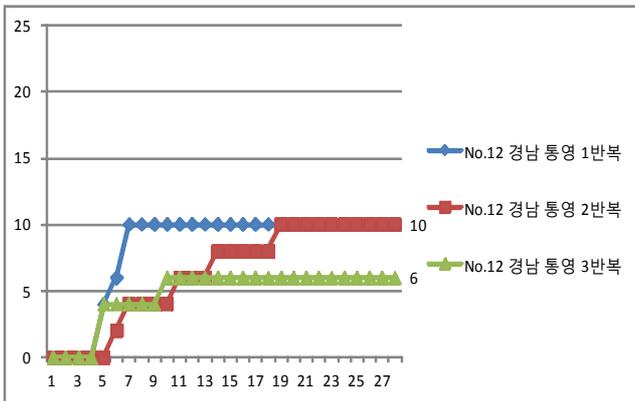
<No.05 전북 정읍 분류군의 일반 발아율>



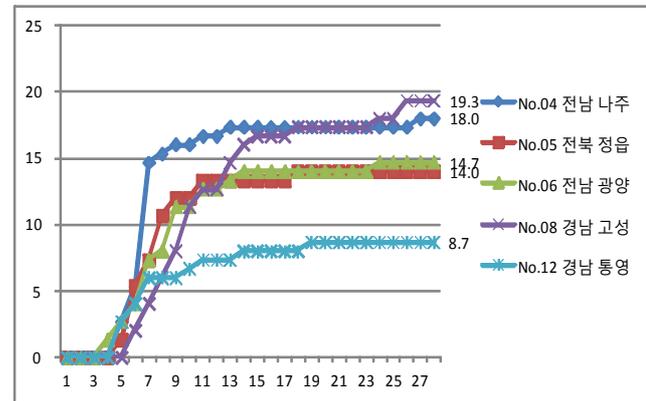
<No.06 전남 광양 분류군의 일반 발아율>



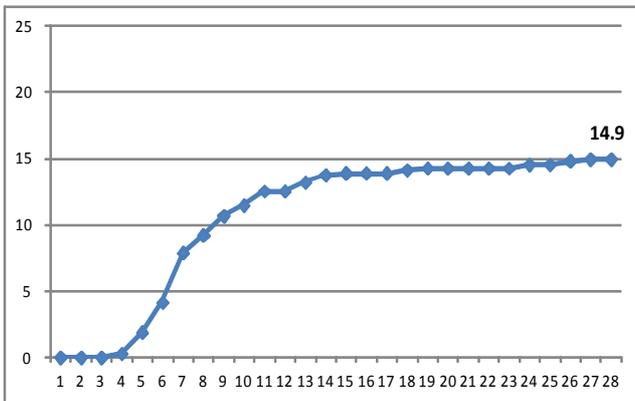
<No.08 경남 고성 분류군의 일반 발아율>



<No.12 경남 통영 분류군의 일반 발아율>



<분류군별 평균 발아율>



<전체 분류군의 평균 발아율>

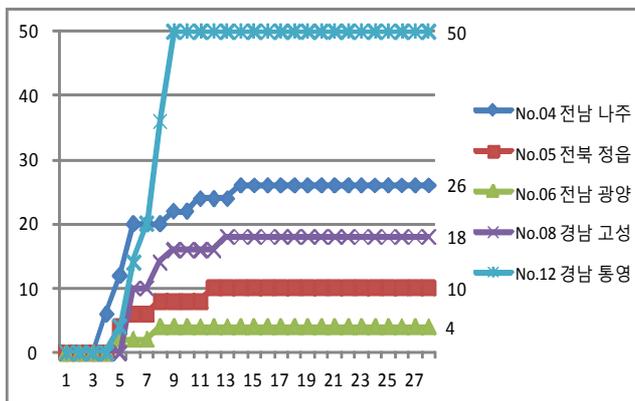
나. 저온처리 기간에 따른 발아율

종자의 저온처리가 조륙싸리 종자의 휴면타파와 발아율 향상에 얼마나 영향을 미치고, 아무런 처리를 하지 않은 일반 발아율과의 차이를 알아보기 위해 참싸리와 마찬가지로 저온처리 기간을 1주, 2주, 3주, 4주, 6주의 차이를 두어 실시하고, 25℃ 항온실에 파종하여 4주일 동안 발아율을 관찰하였다. 발아율 검정 결과, 분류군별 평균 발아율은 전남 나주(20.8%) > 경남 통영(19.2%) > 전북 정읍(17.6%) > 경남 고성(8.4%) > 전남 광양(5.2%) 순으로 나타났으나, 일반 발아율과 마찬가지로 5분류군 모두 20% 이하의 저조한 발아율을 보였고, 전체 분류군의 평균 발아율 역시 14.2%로 매우 저조하게 나타났다. 또한, 모든 분류군에서 저온처리 기간에 따

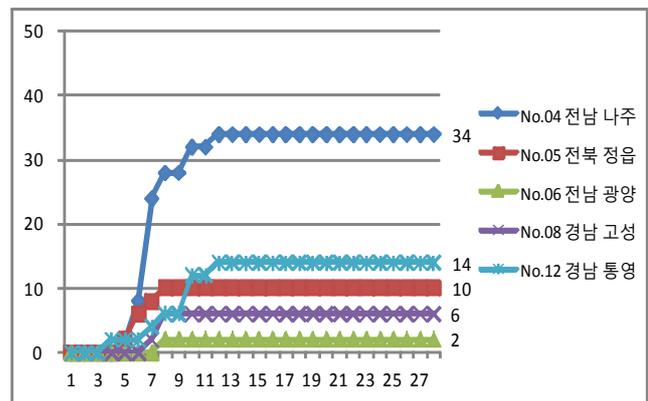
른 발아율이 불규칙하게 나타남에 따라 저온처리 기간이 조록싸리 종자의 발아율 향상에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

표 24. 저온처리 기간에 따른 조록싸리 발아율

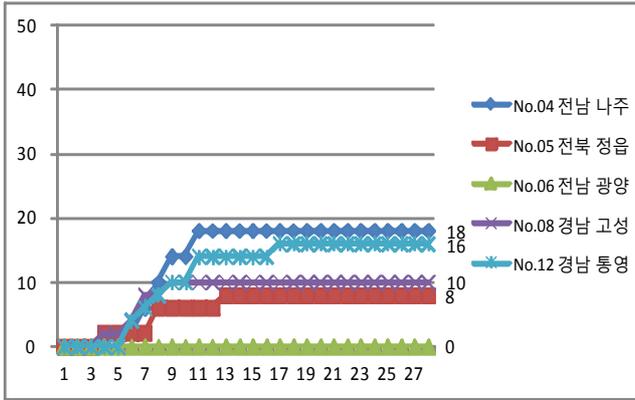
분류군	구분	발아율 (%)	분류군별 평균 발아율 (%)	전체 평균 발아율 (%)
No.04 전남나주	1주	26	20.8	
	2주	34		
	3주	18		
	4주	6		
	6주	20		
No.05 전북정읍	1주	10	17.6	
	2주	10		
	3주	8		
	4주	8		
	6주	52		
No.06 전남광양	1주	4	5.2	
	2주	2		
	3주	0		
	4주	16		
	6주	4		
No.08 경남고성	1주	18	8.4	
	2주	6		
	3주	10		
	4주	8		
	6주	0		
No.12 경남통영	1주	50	19.2	
	2주	14		
	3주	16		
	4주	6		
	6주	10		



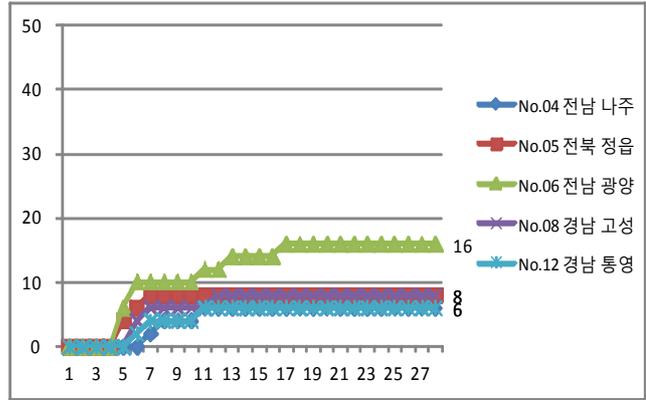
<저온처리 1주>



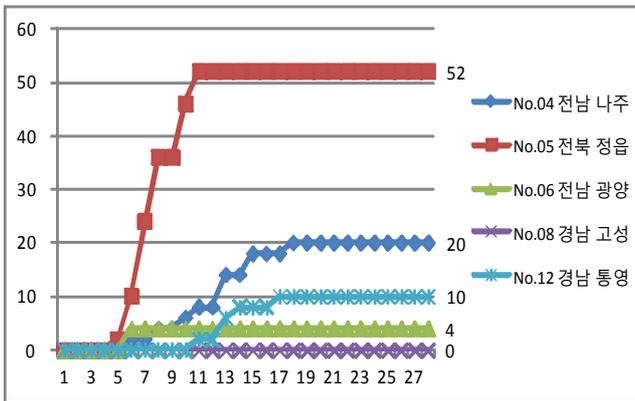
<저온처리 2주>



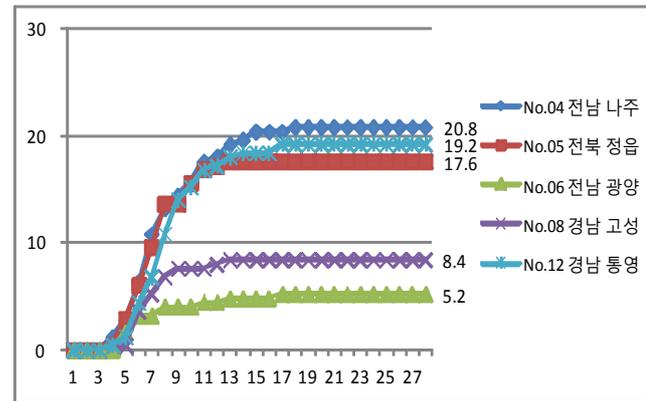
<저온처리 3주>



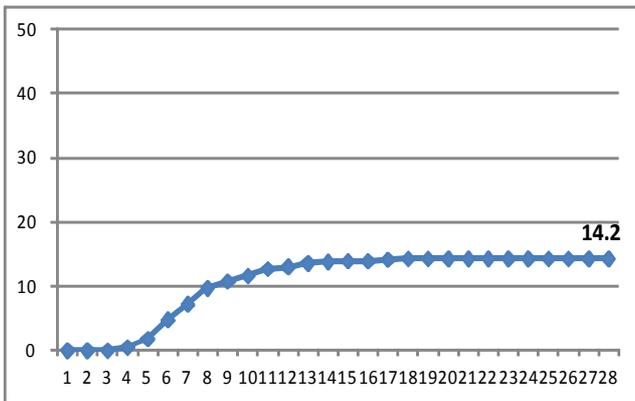
<저온처리 4주>



<저온처리 6주>



<분류군별 평균 발아율>



<평균 발아율>

다. 황산처리를 통한 발아율 향상

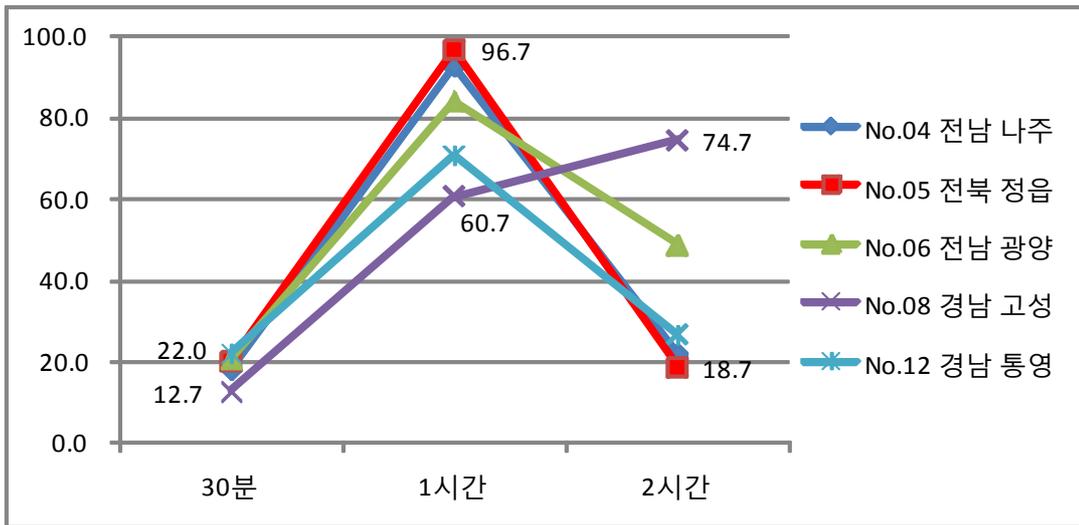
일반 발아율 검정에서는 평균 발아율이 20% 미만, 저온처리 기간에 따른 발아율 또한 평균 발아율이 20% 이하로 매우 낮게 나타나 조록싸리 종자의 발아율을 향상시키는 데는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었기에 참싸리 종자와 마찬가지로 80% 황산용액을 이용하여 종피를 연화시킨 후, 발아율 향상 정도를 확인하고자 하였다. 침지 시간은 참싸리 종자와 같이 30분, 1시간, 2시간으로 차이를 두어 실시하였고, 50립씩 3반복으로 상토에 파종하여 25℃ 항온실에서 4주일 동안 발아율을 관찰하였다. 80% 황산용액에 30분 동안 침지시켰을 경우에는 평균 발아율이 경남 통영(22.0%) > 전남 광양(20.7%) > 전북 정읍(20.0%) > 전남 나주(18.0%)

> 경남 고성(12.7%) 순으로 나타났으나 일반 발아율이나 저온처리 기간에 따른 발아율과 큰 차이를 보이지는 않았다. 80% 황산용액에 1시간 동안 침지시켰을 경우에는 평균 발아율이 전북 정읍(96.7%) > 전남 나주(92.7%) > 전남 광양(84.0%) > 경남 통영(70.7%) > 경남 고성(60.7%) 순으로 나타나 발아율이 크게 향상된 것을 확인할 수 있었고, 30분 동안 침지시켰을 때보다 최고 4배 이상의 발아율 향상 효과를 보였다. 80% 황산용액에 2시간 동안 침지시켰을 경우에는 평균 발아율이 경남 고성(74.7%) > 전남 광양(48.7%) > 경남 통영(26.7%) > 전남 나주(22.0%) > 전북 정읍(18.7%) 순으로 나타났으며, 1시간 동안 침지했을 때 평균 발아율이 가장 낮았던 경남 고성 분류군에서만 발아율이 14% 증가했을 뿐, 나머지 분류군에서는 1시간 처리했을 때보다 오히려 발아율이 크게 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 오랜 침지시간으로 인해 종자 내부에까지 상해를 입어 발아율이 감소한 것으로 보인다. 따라서 조록싸리 종자의 발아율을 향상시키는 데는 80% 황산용액에 1시간 동안 침지시키는 것이 가장 효과적인 방법으로 생각된다.

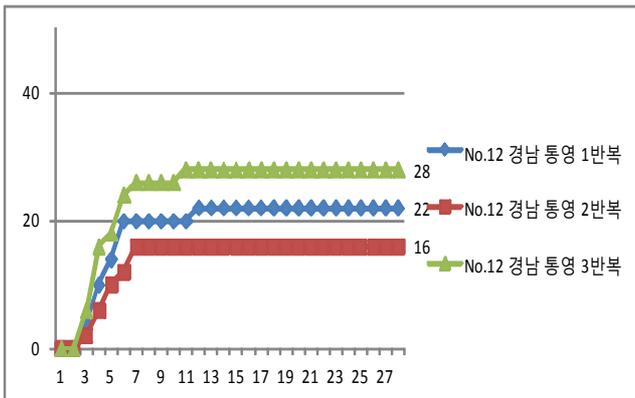
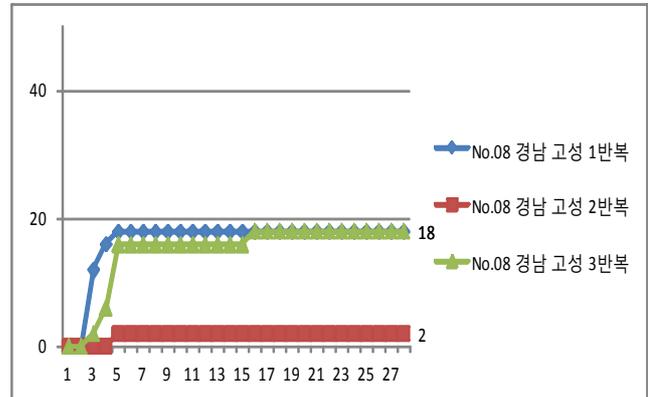
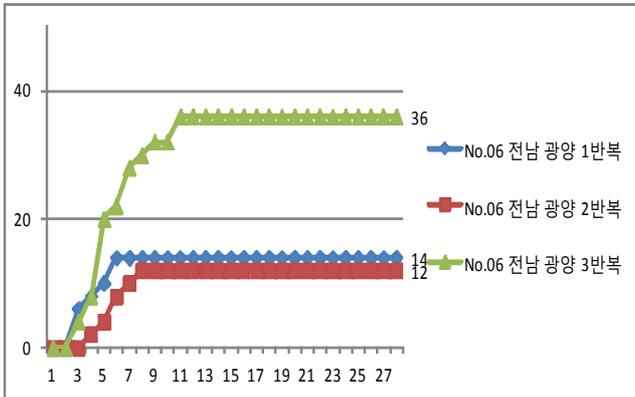
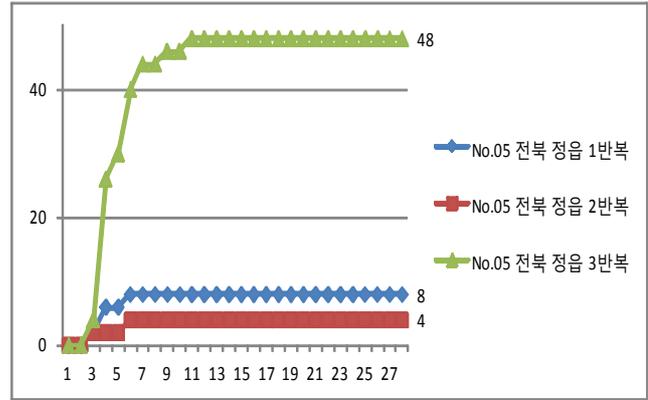
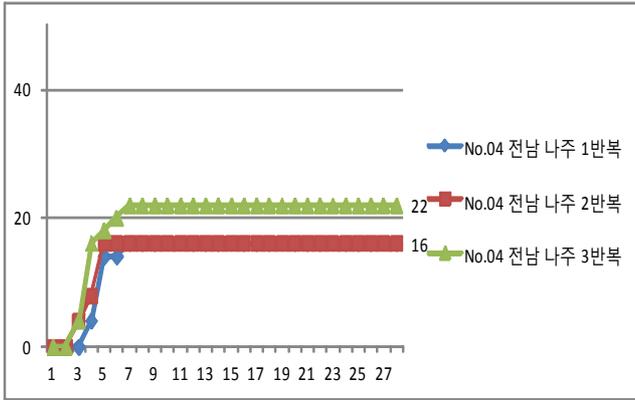
표 25. 황산처리를 통한 조록싸리 발아율

분류군	처리시간	반복	발아율(%)	평균 발아율 (%)
No.04 전남 나주	30분	1반복	16	18.0
		2반복	16	
		3반복	22	
	1시간	1반복	94	92.7
		2반복	92	
		3반복	92	
	2시간	1반복	34	22.0
		2반복	30	
		3반복	12	
No.05 전북 정읍	30분	1반복	8	20.0
		2반복	4	
		3반복	48	
	1시간	1반복	96	96.7
		2반복	100	
		3반복	94	
	2시간	1반복	24	18.7
		2반복	20	
		3반복	12	
No.06 전남 광양	30분	1반복	14	20.7
		2반복	12	
		3반복	36	
	1시간	1반복	72	84.0
		2반복	90	
		3반복	90	
	2시간	1반복	42	48.7
		2반복	66	
		3반복	38	
No.08 경남 고성	30분	1반복	18	12.7
		2반복	2	
		3반복	18	

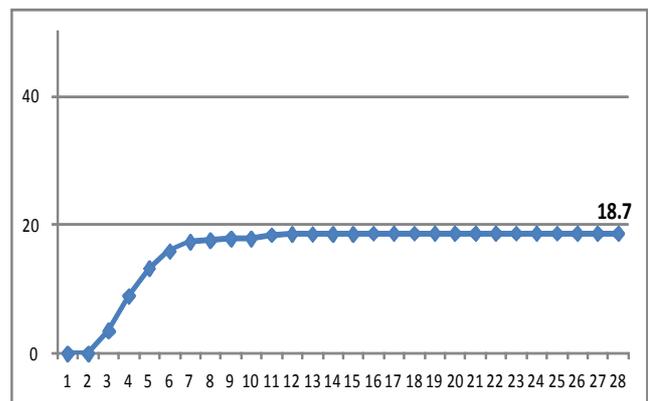
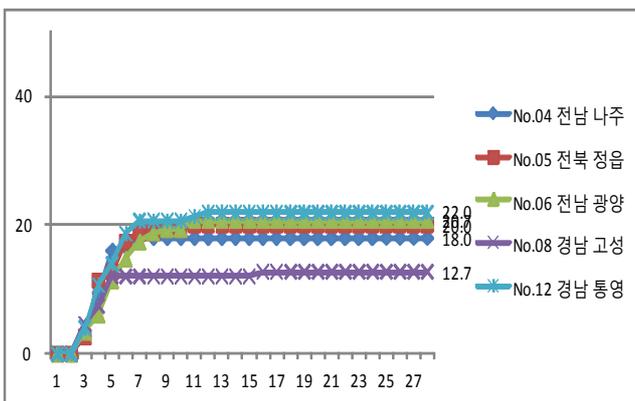
	1시간	1반복	60	60.7
		2반복	64	
		3반복	58	
	2시간	1반복	86	74.7
		2반복	86	
		3반복	52	
No.12 경남 통영	30분	1반복	22	22.0
		2반복	16	
		3반복	28	
	1시간	1반복	68	70.7
		2반복	78	
		3반복	66	
	2시간	1반복	30	26.7
		2반복	4	
		3반복	46	



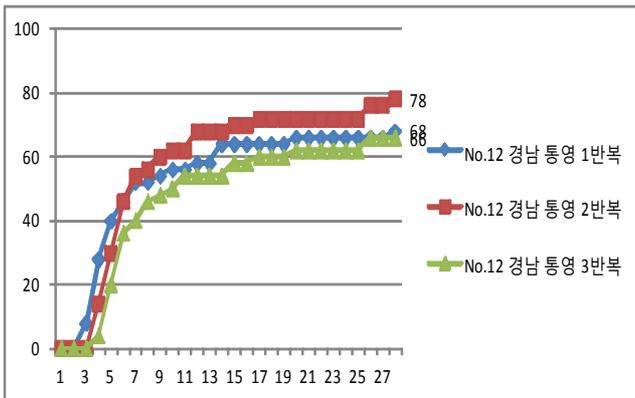
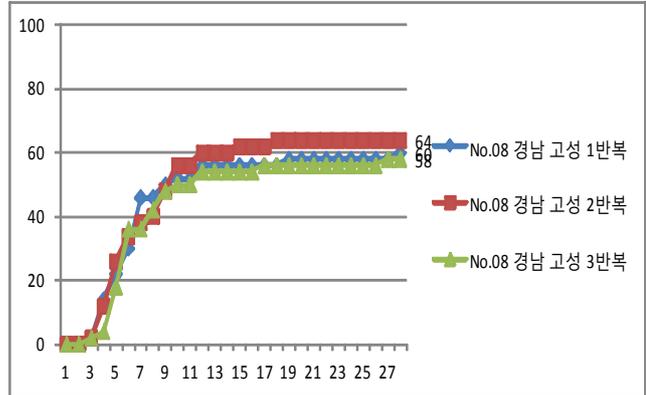
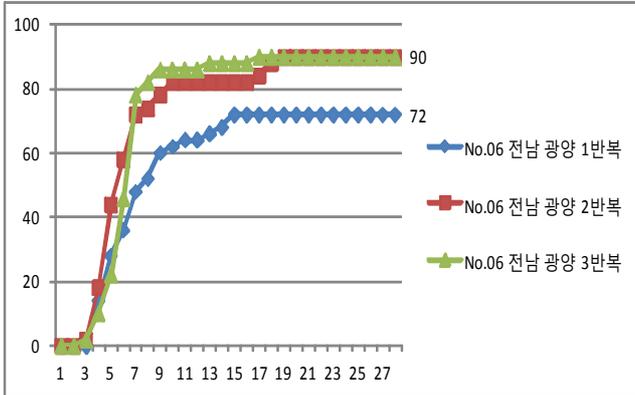
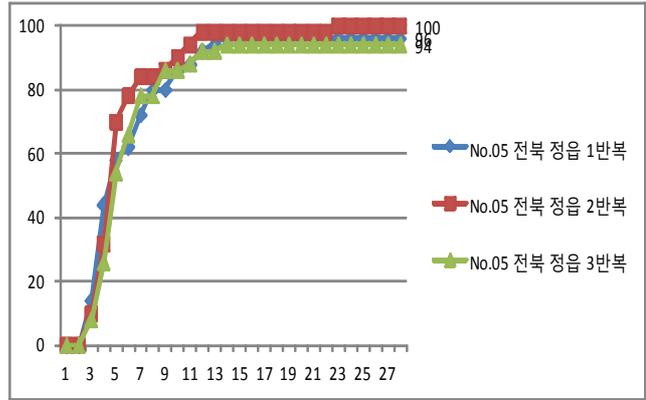
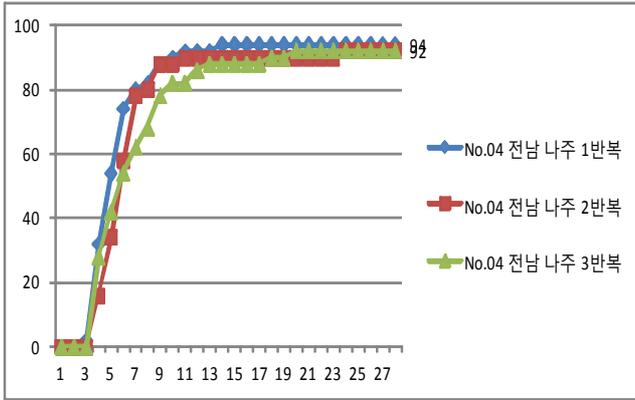
<황산처리 시간에 따른 조류 제거 평균 발아율>



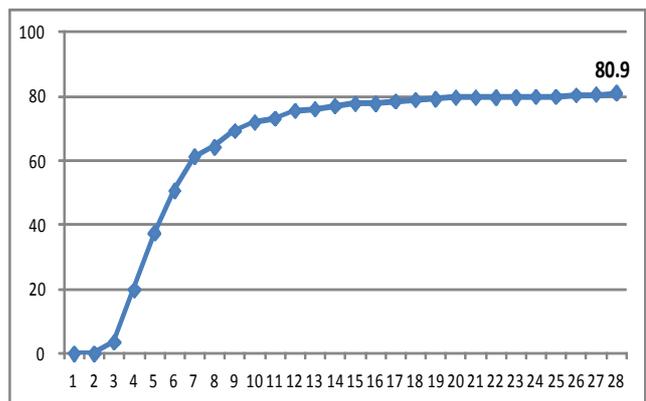
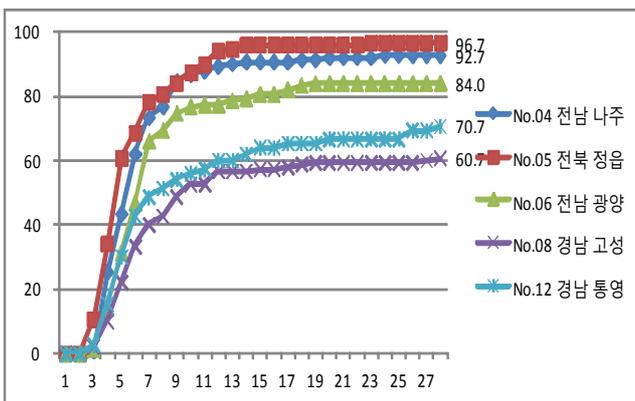
<30분 침지 분류군별 발아율>



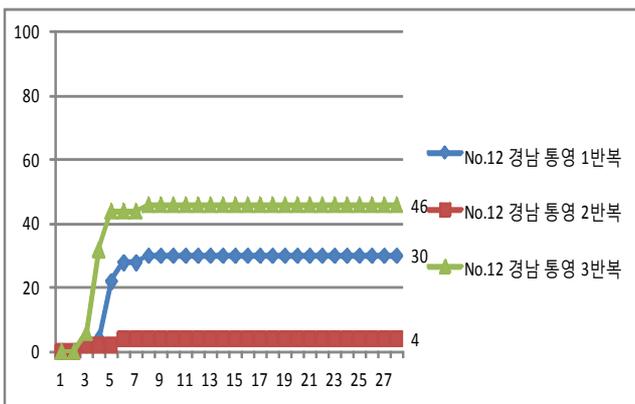
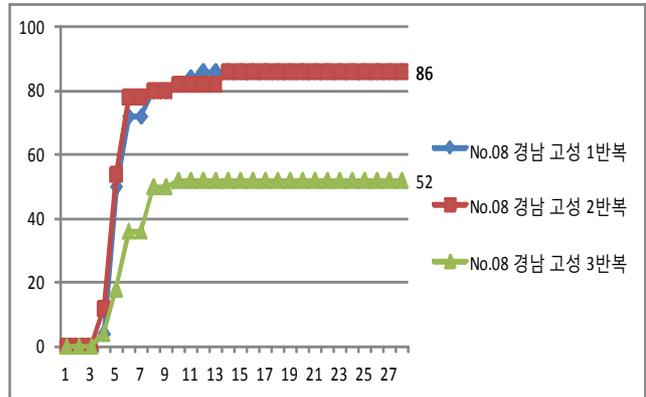
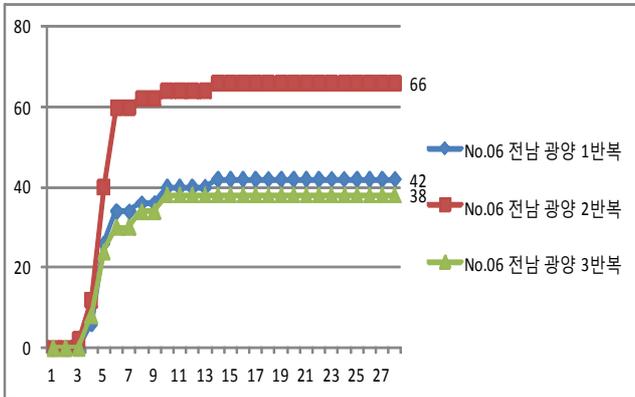
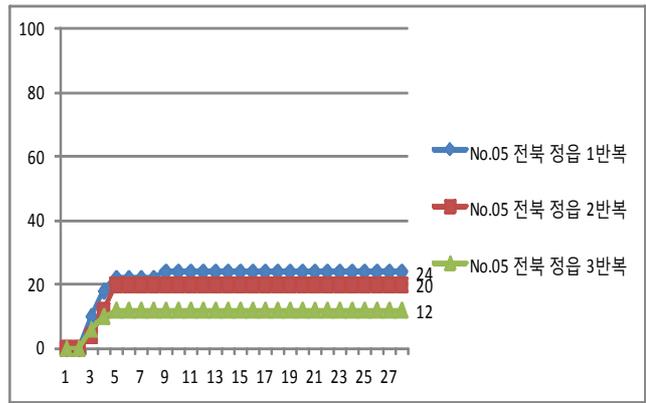
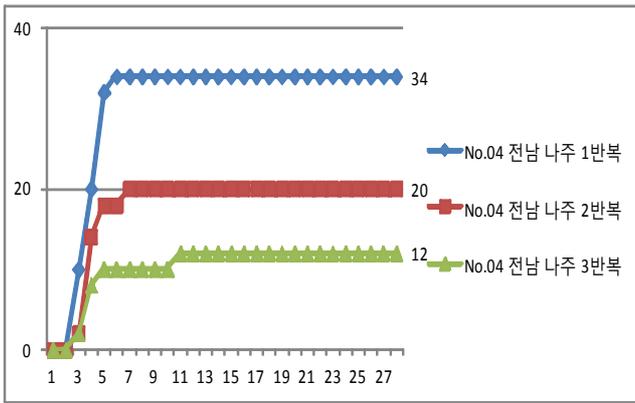
<30분 침지 분류군의 평균 발아율 및 전체 평균 발아율>



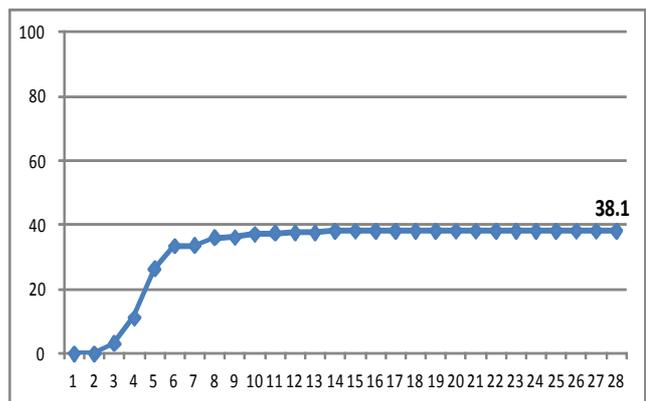
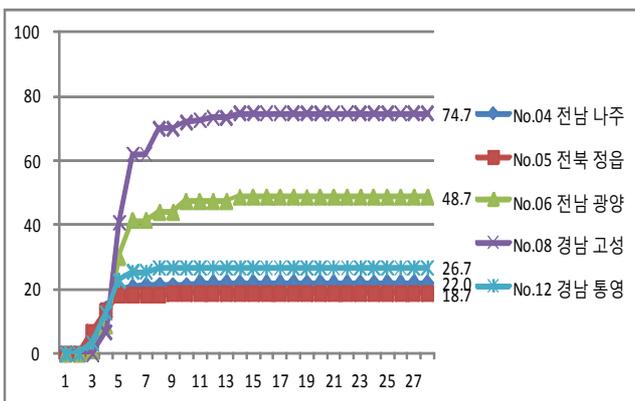
<1시간 침지 분류군별 발아율>



<1시간 침지 분류군의 평균 발아율 및 전체 평균 발아율>



<2시간 침지 분류군별 발아율>



<2시간 침지 분류군의 평균 발아율 및 전체 평균 발아율>

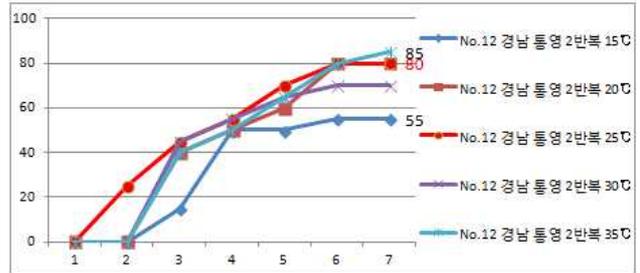
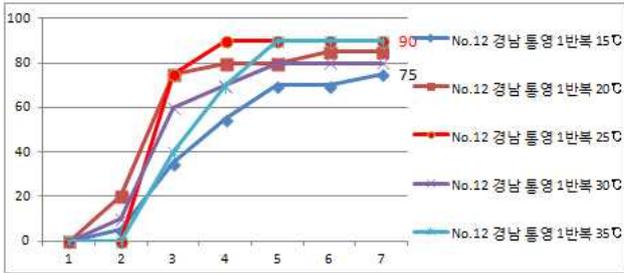
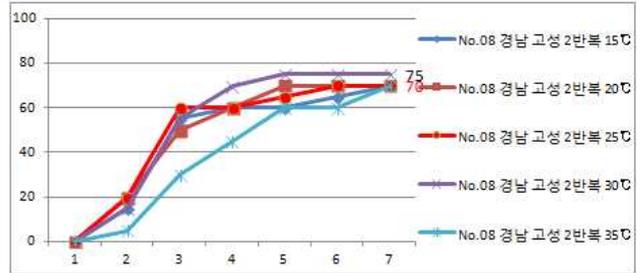
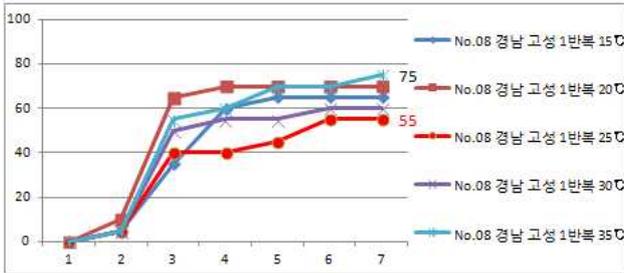
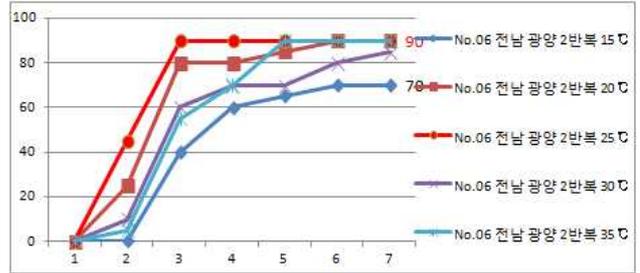
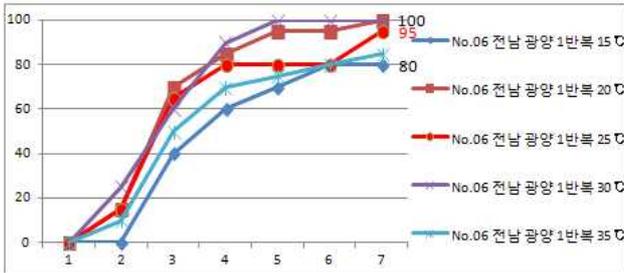
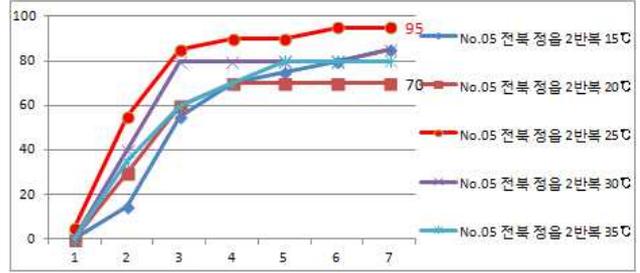
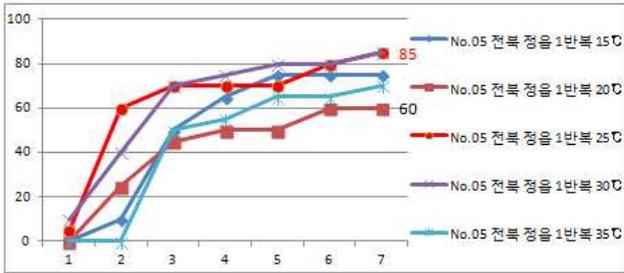
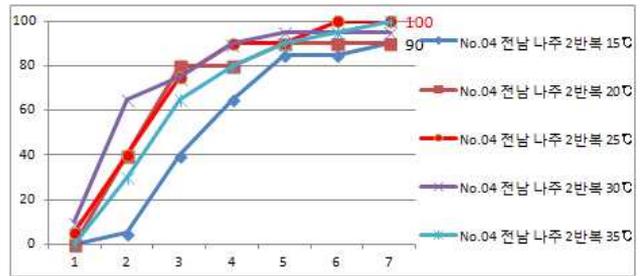
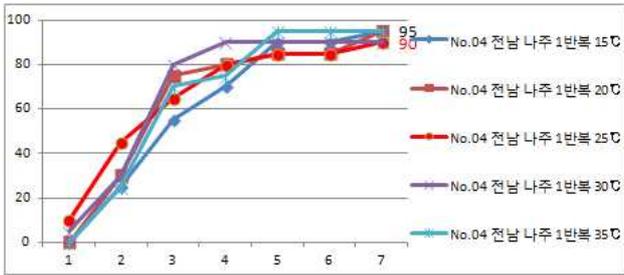
라. 황산처리 후 다운도발아테이블을 이용한 최적발아온도 탐색

80% 황산용액을 이용한 종피 연화처리를 통한 발아율 향상 실험에서 최적의 침지시간이 1시간으로 확인되었기에 조록싸리 분류군들을 80% 황산용액에서 1시간 동안 침지시킨 후, 증류수로 세척하고 petri-dish에 filter paper 2장과 발아용 anchor paper 1장을 깔고 수분을 충분히 공급한 다음 20립씩 3회 반복으로 치상하였다. 치상이 완료된 petri-dish는 다운도발아테이블을 이용하여 15, 20, 25, 30, 35℃에서 1주일 동안 발아율을 관찰하였다. 발아율 확인 결과, 분류군별 전체 평균발아율은 전남 나주(94.0%) > 전남 광양(87.7%) > 경남 통영(82.3%) > 전북 정읍(79.3%) > 경남 고성(70.0%) 순으로 확인되었다. 각 분류군의 반복별 평균발아율에서도 경남 고성 분류군의 1반복 분류군을 제외하고는 모두 70% 이상의 높은 발아율을 나타냈다. 최적발아온도의 경우 모든 분류군들의 종합적인 데이터를 확인한 결과, 25℃에서 가장 빠른 발아소요일수와 발아율을 보인 것으로 확인되었다.

표 26. 다운도발아테이블을 이용한 조록싸리 최적발아온도

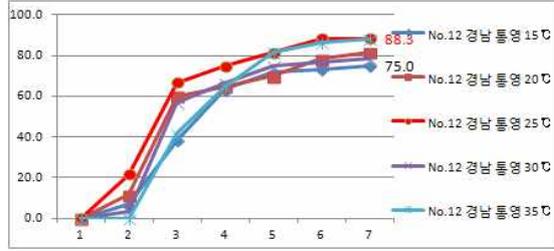
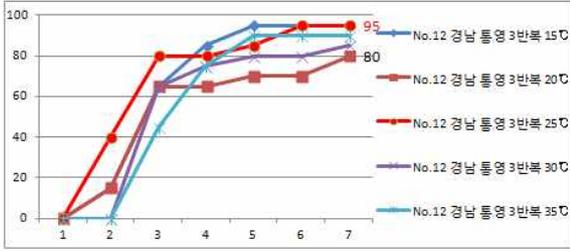
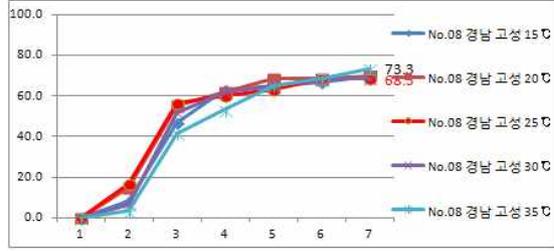
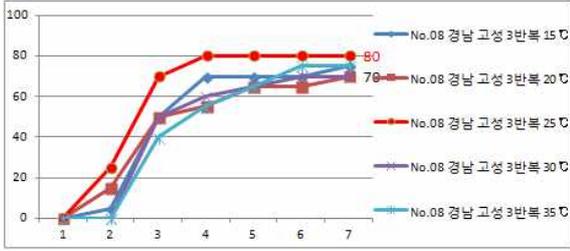
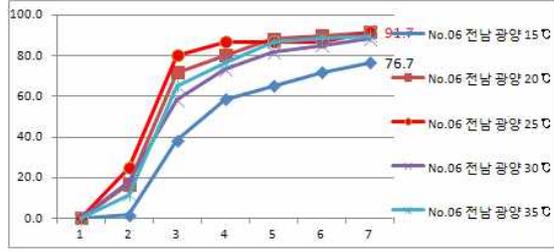
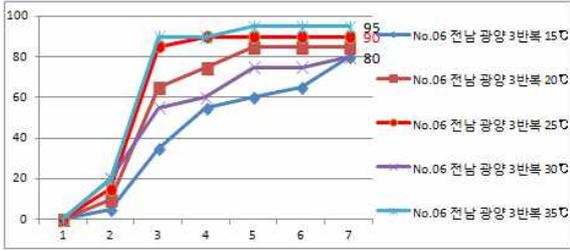
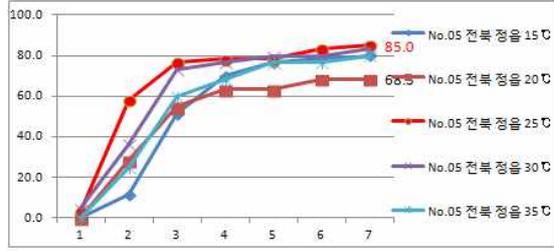
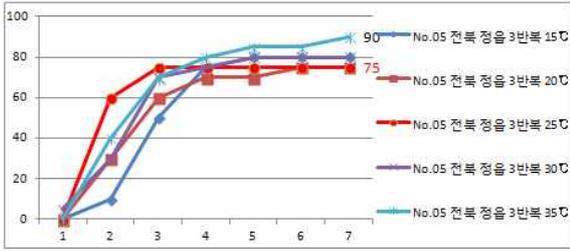
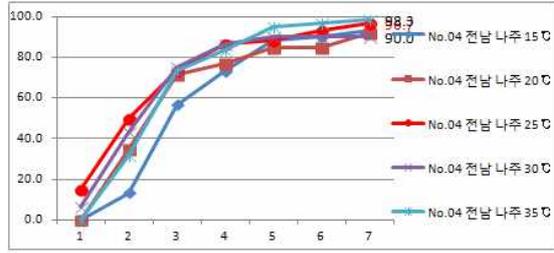
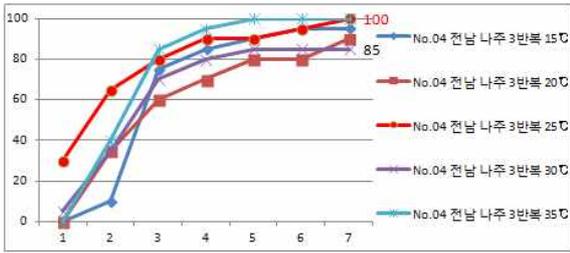
분류군	반복	온도 (℃)	Gem. (%)	분류군반복별 평균발아율 (%)	분류군 평균발아율 (%)
No.04 전남나주	1반복	15	95	93	94.0
		20	95		
		25	90		
		30	90		
		35	95		
	2반복	15	90	95	
		20	90		
		25	100		
		30	95		
		35	100		
	3반복	15	95	94	
		20	90		
		25	100		
		30	85		
		35	100		
No.05 전북정읍	1반복	15	75	75	79.3
		20	60		
		25	85		
		30	85		
		35	70		
	2반복	15	85	83	
		20	70		
		25	95		
		30	85		
		35	80		
	3반복	15	80	80	
		20	75		
		25	75		

		30	80		
		35	90		
No.06 전남광양	1반복	15	80	92	87.7
		20	100		
		25	95		
		30	100		
		35	85		
	2반복	15	70	85	
		20	90		
		25	90		
		30	85		
		35	90		
	3반복	15	80	86	
		20	85		
		25	90		
		30	80		
		35	95		
No.08 경남고성	1반복	15	65	65	70.0
		20	70		
		25	55		
		30	60		
		35	75		
	2반복	15	70	71	
		20	70		
		25	70		
		30	75		
		35	70		
	3반복	15	75	74	
		20	70		
		25	80		
		30	70		
		35	75		
No.12 경남통영	1반복	15	75	84	82.3
		20	85		
		25	90		
		30	80		
		35	90		
	2반복	15	55	74	
		20	80		
		25	80		
		30	70		
		35	85		
	3반복	15	95	89	
		20	80		
		25	95		
		30	85		
		35	90		



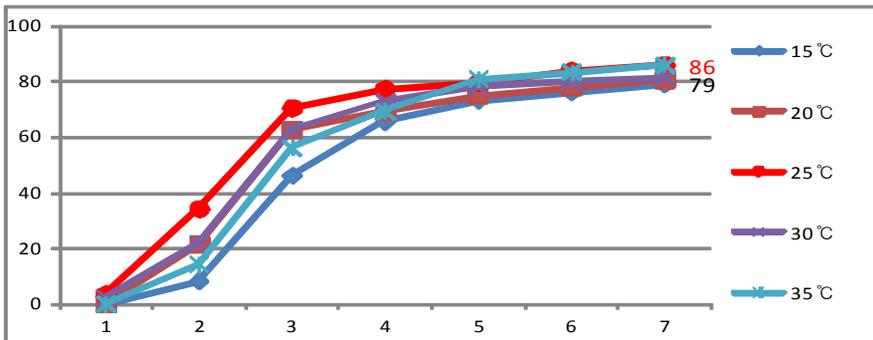
<분류군별 1반복 받아율>

<분류군별 2반복 받아율>



<분류군별 3반복 받아율>

<분류군별 평균 받아율>



<평균 받아율>

마. 발아 증식을 통한 원료 확보

- 80% 황산용액에서 1시간 침지하는 전처리를 통해 조록싸리 종자는 80%이상 발아하는 결과를 도출하였으며, 식재 후 2년간 생육상태를 관찰한 결과 관목형태로 성장함으로써 원료 공급이 가능할 것으로 판단되었다. 따라서 제품화를 위한 조록싸리 종자는 18,000립을 보유하고 있어, 대량생산 체계 구축을 위한 초기원료가 확보된 상황이다.

No.	채집지	날짜	종자수량
1	전남 나주시 노안면 이별재 초입	2012-11-08	4,000
2	전북 정읍시 산내면	2012-11-09	3,500
3	전남 광양시 백운산	2012-11-08	5,000
4	경남 고성군 대곡산	2012-11-20	4,000
5	경남 통영 삼덕항	2012-11-20	1,500

따라서 상용화를 위한 동물실험 및 효력시험에 필요한 원료를 보유 중에 있으며, 제품화 단계 진입 전에 대량재배지 선정을 통해 원료를 대량생산하여 공급할 예정에 있다.

4. 종자를 이용한 지속적 공급을 위한 재배기술 기반마련

가. 조록싸리의 지속적 공급을 위한 기반마련

원예상토를 이용하여 발아시킨 조록싸리를 온실에서 6주 정도 생육시킨 후, 각각 다른 2곳에 식재하여 소재로써 지속적인 공급을 위한 타당성과 소재로 사용할 수 있기까지의 재배 기간을 알아보기 위해 3개월 단위로 성장속도를 확인하였다. 가장 높은 미백활성을 나타내는 조록싸리 시료의 원산지 및 재배지에서 증식중인 조록싸리는 현재까지 약 100주를 보유중에 있음. 일과 줄기를 늦여름부터 가을까지 채취할 수 있도록 증식중에 있는 지역을 지속적으로 관리함으로써, 미백성분의 정제 및 동물실험이나 효력시험에 대한 대량원료 공급이 가능할 것으로 판단되며, 제품화를 위한 대량생산을 위해서는 발아를 통해 대량재배 증식이 요구된다.

표 30. 재배지 조록싸리의 기간별 성장 양상

구분	1지역	2지역
입지 조건	<ul style="list-style-type: none"> 해발 200m 정도의 서사면에 위치한 개활지로 완만한 경사를 이루고 있으며 토양이 척박함 작은 골짜기를 끼고 있어 원활한 수분 공급 가능 	<ul style="list-style-type: none"> 해발 230m 정도의 남사면에 위치한 개활지로 완만한 경사를 이루고 있으며 토양이 비옥한 편임 작은 골짜기를 끼고 있어 원활한 수분 공급 가능
연평균 기온	11.1℃	13.1℃
강수량	1,434mm	1,473mm

일조율	46%	44.5%
식재 (6주)		
<ul style="list-style-type: none"> • 온실에서 6주 동안 생육 • 높이는 약 10~15cm 까지 성장 		
6월 (3개월)		
<ul style="list-style-type: none"> • 온도, 수분 조건 및 일조량 변화, 토양 순화 등으로 생육 부진 • 높이는 약 20~30cm 까지 성장 		

9월
(6개월)



- 온도 및 토양에 적응하여 성장속도가 빨라짐
- 높이 70cm 이상으로 성장

11월
(8개월)



- 높이 80cm 정도까지 성장

2. 참싸리의 지속적 공급을 위한 기반마련

식재한 조록싸리를 약 8개월 동안 관찰한 결과, 식재 직후부터 약 3개월 동안은 수분 및 일조량 변화, 토양 순화 등으로 인해 생육이 부진하였으나 그 이후부터는 생장이 두드러지게 빨

라지는 것을 알 수 있었다. 앞서 식재한 참싸리의 경우에도 식재 후 약 3개월 동안은 생육이 부진하였으나, 기후와 토양에 적응한 이후부터는 생육이 빨라져 이듬해인 올해는 높이 1.2~1.5m, 줄기의 두께가 1~2cm에 이를 정도로 성숙한 개체로 성장하였다. 조록싸리 또한 참싸리와 비슷한 성장 양상을 보일 것으로 판단되며 내년에는 성숙한 개체들이 균락을 이룰 것으로 보인다.

표 31. 재배지 참싸리의 기간별 성장 양상

구분	1지역
<p>2012년 5월 식재 (4주)</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • 온실에서 4주 동안 생육 • 높이는 약 10cm 까지 성장
<p>2012년 10월 (6개월)</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • 온도 및 토양에 적응하여 성장속도가 빨라짐 • 높이 70cm 이상으로 성장

2013년 11월
(1년 7개월)



- 높이는 1.2~1.5m, 본줄기는 직경 1.5~5cm 까지 성장
- 완전히 성숙한 개체로 성장

따라서 산업화 소재로써 지속적인 공급을 위해서는 발아한 조록싸리를 5월 초순경에 노지에 식재하여 약 1년 정도의 생육과정을 거치면 식재 후 2년차부터는 소재로써 지속적인 공급이 가능할 것으로 판단된다.

제 3 절. (주) 액티브온

1. 개발제형

조룩싸리와 같은 추출물을 그 상태로 사용하게되면, 일반 용액과의 반응에 의한 산패현상, 액티브 물질과 기존 추출물과의 반응을 통하여 생성되는 Debris 현상, By product가 시간이 지남에 따라 생성되는 현상 그리고 최종적으로 난용성 물질이 시간이 지남에 따라 비가역적으로 생성되게 되므로 이들 추출물을 안정화시키는 Vehicle 개발은 현재 화장품 원료관점에서 필수적으로 자리잡게 되었다.

또한 Vehicle로 인하여 Active가 경피내로 시간에 지남에 따라 서서히 방출되게 되므로 지속적인 효능을 피부에 부여할 수 있고 또한 빠른시간내 주입으로 인한 독성현상을 없애주므로 이들 Vehicle 개발은 매우 필수적이다.

가. 리포솜(Cho.R.Lipo)

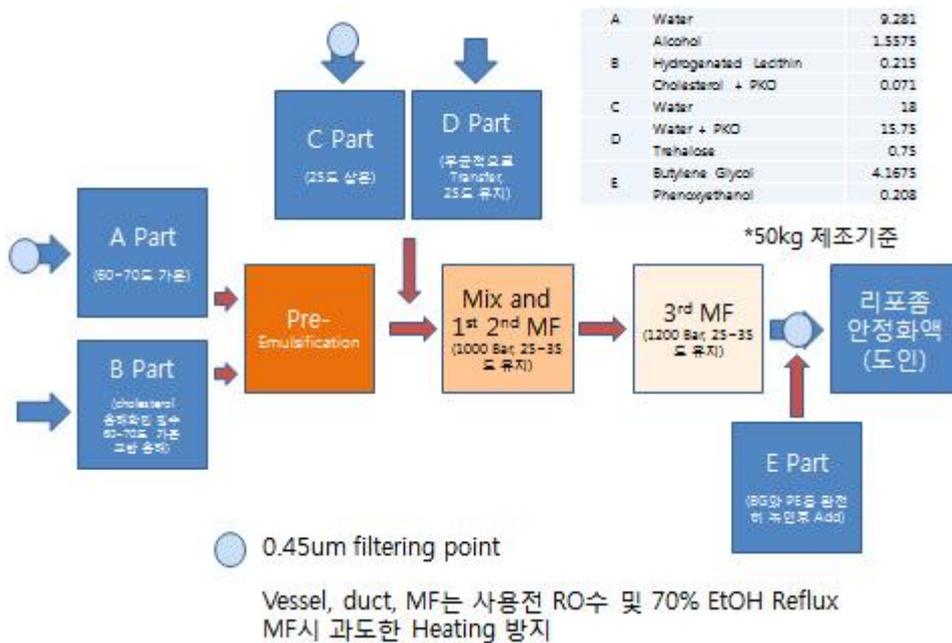


그림 48. 리포솜(Cho.R.Lipo) 제형을 위한 제조공정도

리포솜은 상기와 같은 방법으로 만들어졌으며, Cho.R.(조룩싸리 추출물)은 유상 혹은 수상에 넣는 것으로 제조된다. A상은 Water, B상은 Alcohol, Hydrogenated Lecithin, Cholesterol을 위의 제조지시서에 명기된것과 같이 넣고 C, D상은 물, 혹은 Cho.R.(조룩싸리)를 넣는다. 이후 MF를 이용하여 리포솜화 한다. 3 Pass를 하며 1,2회는 1000 Bar, 25-35도로 유지하며, 3회는 1200 Bar로 하여 25-35도로 유지한다. 초기에는 Cho.R.(조룩싸리)을 B상에 넣고 만들었으나, B상을 올릴 때 Cho.R.가 변성되므로 최종 스텝에는 D상에 넣고 진행하는 것으로 하였다. 그러나 0.1% 이상으로 적용시 제형의 분리가 생성되므로 1% 이상의 제품에 적용되는 반제형이 필요하게 되었다. 또한 액티브 물질중 많은 수가 친유성이므로 이를 개선하기 위한 형태가 필요로

하게 되었다. 이에 부응하기 위해 개발된 형태가 마이크로에멀전, 그리고 젤라틴 인캡슐레이션이다.

나. 마이크로에멀전(Cho.R.ME)

(1) 마이크로에멀전 제조

0.4% Cho.R.(조록싸리)이 함유하는 Microemulsion을 제조하여 mouse skin delivery에 이용하였다. 0.4% Cho.R.는 Microemulsion 그 자체로 피부투과 실험에 사용하였다. Microemulsion의 조성으로는 7.4% oil (IPM, HD), 35.8% LAS, 4% PC, 10% ethanol 또는 1,3-BG, 40.8% water로 구성하여 제조하였다. Cho.R.은 LAS, PC가 들어가 있는 용액에 교반시키면서 첨가하였다. microemulsion은 간단히 교반해주면 스스로 만들어진다. 실험에 사용한 Microemulsion의 조성을 하기에 나타내었으며, 완제품으로 사용된 조성은 PX를 함유한 조성이다. Microemulsion 제조에 필요한 soybean PC (lecithin)는 Lipoid사에서 제조한 것을 사용하였고 들어가는 oil로는 isopropyl myristate (IPM), medium chain triglycerides (MCT oil), Hexyldecanol 또는 Eutanol G16 (HD), CC168을 사용하였고, surfactant로 PEG-8 caprylic/capric glyceride (LAS)를 사용하였다. Enhancers로는 poloxamer (PX), Nerolidol, SEPA, urea, Tween-20을 사용하였다. 방부제로 phenoxyethanol (PE), propyl parabene (PP), methyl parabene (MP)를 사용하였다.

	Control	Enhancer 함유 nanoemulsion					
		PX	SEPA	NOR	PX+NO R	PX+urea	PX+T2 0
Cho.R.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
PC	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
EtOH	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
IPM	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
LAS	35.8	35.8	35.8	35.8	34.8	34.8	34.8
PX	-	1.0	-	-	1.0(0.5)	1.0(0.5)	1.0(0.5)
SEPA	-	-	1.0	-	-	-	-
NOR	-	-	-	1.0	1.0(0.5)	-	-
Urea	-	-	-	-	-	5.0	-
T20	-	-	-	-	-	-	1.0(0.5)
Water	39.2	38.2	38.2	38.2	38.2	34.2	38.2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Cho.R. 함유 nanoemulsion의 조성표 (Cho.R. 0.4% 기준, 본 제품개발에 확인된 제형은 PX 제형)

다. Gelatin Encapsulation(Cho.R.GTE)

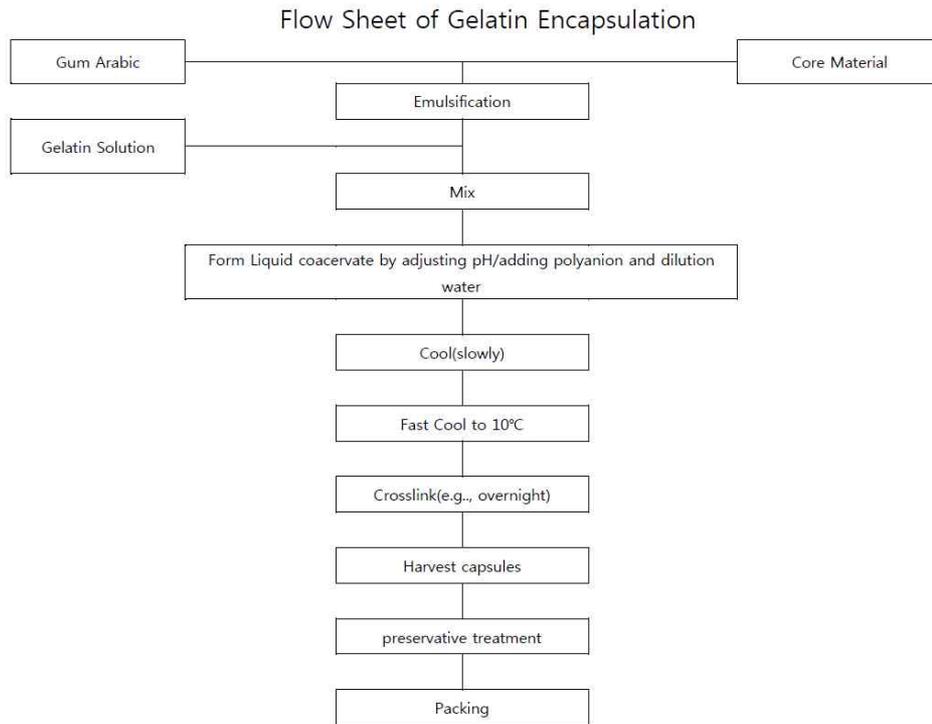


그림 49. Flow Sheet of Collagen/Gelatin Encapsulation

Gelatin Encapsulation은 다음과 같은 Flow으로 진행된다. 먼저 Arabic Gum과 Core Material(조록싸리포함)을 유화한다. 이후 Gelatin Solution을 넣고 교반한다. pH의 조절과 polyanion의 첨가 그리고 물의 희석으로 인하여 Liquid coacervate가 만들어지게 된다. 이를 천천히 냉각하다가 빨리 10도로 냉각한다. 하루정도 숙성시키면 각 내용물간 Crosslink가 생성되게 된다. 이를 회수하여 방부처리하여 제품을 만들게 된다.

Gelatin Encapsulation의 장점은 많은 양의 오일을 수상으로 넣을 수 있으므로 화장품 응용시 광대역으로 응용할 수 있는 장점이 있다.

라. 개발제형 결과

(1) 종합



그림 50. 왼쪽으로부터 1) 젤라틴 인캡슐레이션 제형(Cho.R.GTE) 2) 리포솜 제형(Cho.R.Lipo)

위 사진은 종합적으로 개발된 제형의 사진을 보여주고 있으며 왼쪽으로부터 1) 젤라틴 인캡슐레이션 제형(Cho.R.GTE) 2) 리포솜(Cho.R.Lipo) 제형을 보여주고 있다.

(2) 리포솜 제형의 안정성



그림 51. 왼쪽으로부터 리포솜 initial, 1month 45도(Cho.R.Lipo)

위의 사진은 리포솜 제형에서의 안정성을 보여주는 사진이다. 리포솜 안정성은 1달까지 45도에서 상이 깨지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 다만 0.4%의 고형분을 사용하였을 경우 약간의 Debris가 생성되는 경향은 확인할 수 있었다. 그러므로 콜라겐/젤라틴 인캡슐레이션 제형을 만들게 되었다.

(3) 콜라겐/젤라틴 인캡슐레이션의 안정성



그림 52. 콜라겐/젤라틴 인캡슐레이션 안정화액

왼쪽으로부터 조록싸리 함유 콜라겐/젤라틴 인캡슐레이션 안정화액 원액과 45도 1month 후의 사진이다. 시간이 지남에 따라 층분리가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 색 및 취의 경우 변색이 되지 않음을 알 수 있었다. Oleic acid 및 Linoleic acid의 경우 산화에 의한 산폐가 일어날 수 있으나 안정화가 잘 된 경우 산폐가 일어나지 않아서 색의 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 잘 혼합하였을 경우 하루 동안 층분리가 안 일어났고, 또한 산업계에 적용시 최종 제형에서 층분리가 일어나지 않았다.

마이크로에멀전액과 달리 특수 유화제가 들어가지 않으므로 제형 적용시 유수상, 가용화, 비가용화 관계없이 적용 가능하다는 장점이 있고, 안정성도 좋고, 무엇보다도 particle size의 변화가 가능하므로 다양한 형태의 입자를 만들 수 있다는 장점이 있다. 액티브온에서는 여러 가지 형태의 particle을 제조하였다. 또한 추출물의 함량을 2%까지 높일 수 있으므로 또한 유기용매에 잘 녹는 조록싸리 활성화 물질을 안정화하는 주요 방법으로 채택하였고 이에 대한 원가 계산, 효능테스트, 그리고 임상테스트까지 진행중이며, 일부 진행을 완료하였다.

임상테스트(안전성 테스트)

(1) 시험방법

가. 목적과 개요

신체 건강한 한국인 성인 여성 피험자 30명 이상을 대상으로 시료에 의한 피부 일차 자극 유무를 확인하기 위해 시료를 피부에 단회 첩포 하였다. 48 시간 경과 후에 첩포를 제거하고 시료에 의한 피부 일차 자극 발생 유무를 확인하였다.

피부 반응의 판정 기준에 따라 발생한 반응을 점수화하여 일차피부자극지수(P.C.I)를 계산하고, 일차피부자극지수(P.C.I)와 시료의 유형을 고려하여 시험 결과를 해석하였다.

이 시험으로써 조록싸리를 함유한 화장품원료가 적절하게 만들어졌는지 알 수 있다.

나. 피험자 모집방법

피험자에게 시험의 목적과 방법을 명확하게 알려준 후 피험자가 자유로운 의지로 참여를 결정하고 참가동의서에 서명한 후 시험에 참여하였다. 구체적으로 다음과 같은 절차를 따라 진행하였다.

- 임상평가기관에서는 사전에 수행된 피험자 모집 조사(Medical examination*)를 통해 적절한 피험자를 확보하고 관리한다.
- 시험 계획이 확정되면, 피험자 데이터베이스에서 본 시험의 피험자 선정 조건에 적합한 피험자를 선별한다.
- 선별된 피험자에게 전화하여 시험의 구체적 내용을 설명하고, 시험 참여에 동의한 피험자를 첫날 시험실로 방문하도록 한다.
- 첫째날, 시험 목적과 방법에 적합하도록 구성된 설문(피험자 선정 및 제외조건)을 활용하여, 시험책임자 (또는 시험책임자로부터 위임받은 시험자)가 본 시험에 참여할 피험자를 선정한다. 피험자 최종 선정을 위한 설문지는 피험자 선정조건, 제외조건, 제한사항 등이 시험 내용에 적합하도록 구성되어 있으며, 이 설문 조사는 시험 시작 직전에 수행한다.
- 피험자에게 시험 일정, 참가비, 예상되는 위험성, 중도 탈락 기준을 설명한다. 피험자는 설명된 내용을 고려하여 자유로운 의지로 시험 참여를 결정한 후 참가동의서에 서명한다. 피험자에게 부작용 또는 유해사례 발생 경우 의뢰인이 서명한 피해자 보상 규약에 따라 적절한 보상을 받을 수 있다는 사실을 설명한다.
- 본 시험에 참여한 피험자의 신상 비밀은 보장되며, 의학적 연구 목적으로 피험자의 신원이

밝혀지지 않는 범위에서 시험 자료가 이용될 수 있음을 알린다.

- 참가동의서에 서명한 피험자는 시험에 참여한다.

* Medical examination: 아이이씨코리아(주)의 일반적인 피험자 선정 제외 조건을 적용하여 피험자를 면담하고 모집하여 데이터베이스에 등록하는 것

다. 시험에 참여한 피험자수

피험자 33명을 모집하여 시험을 착수하였다. 최종 방문 일까지 33명의 피험자가 시험을 정상적으로 종료하였다.

(2) 선정 조건

가. 피험자 데이터베이스에서 적용하는 일반적인 선정 조건

- 한국인 남녀
- 체중: 세부 시험의 최종 피험자 선정 시에 시험책임자의 판단으로 시험에 지장을 초래할 가능성이 있는 피험자를 제외시킴.
- 한국어를 이해할 수 있는 자로서, 제공되는 문서를 읽거나, 시험자의 설명을 듣고 이해할 수 있는 자.
- 국민건강보험에 가입되어있는 자, 척추의 심한 뒤틀림이나 휘어짐이 있는 자는 제외함.

* 본 일반적인 선정 조건은 증례기록서(Case Report Form)에는 별도로 기록하지 않았다.

나. 본시험에서 적용하는 피험자 선정 조건

아래 선정 조건을 시험 시작일에 시험책임자가 피험자에게 문진하고 증례기록서에 기록하였다.

- 시험 내용을 이해하고 자발적으로 참가 동의서를 작성하고 서명한 자
- 만 18세 이상 60세 이하의 성인 남녀
- 피부 질환을 포함하여 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

다. 제외조건

피험자 데이터베이스에서 적용하는 일반적인 제외 조건

- 법률적으로 생활에 제약을 받고 있는 자
- 심한 질환을 앓고 있는 자
- 미성년자 또는 국내법상 임상 연구 또는 인체적용시험에 참여할 수 없는 자
- 비상 연락이 불가하거나, 시험 기간 중 소집에 응할 수 없는 자

- 다음 조건으로 부적합한 자
- 시험 기간 중 여러 시험에 중복 참여하는 자(중복 참여가 우려되는 자)
- 시험 재 참여 제한 기간이 경과되지 않은 자: 동일한 유형의 시험에 참여한 후 3주가 경과되지 않은 자
- 임신 중이거나 수유중인 여성, 의학적으로 부적절한 피임 방법을 사용하는 여성
- 최근 5년 이내 장기 (간, 폐, 신장 등 주요 장기) 이식 수술을 받았거나, 장기 절단 수술을 받은 자, 뇌 수술을 받은 자, 수술 후유증을 가진 자
- 심혈관계 질환, 내분기계 질환, 소화기계 질환, 신경계 질환, 비뇨기계 질환을 가진 자
- 항히스타민제, 스테로이드제, 알러지 억제제 또는 이와 유사한 기능을 갖는 약품을 장기 복용 또는 적용하고 있는 자
- 심한 천식을 가진 자
- 약물에 민감 반응을 경험한 자, 시험실에서 사용되는 물질(장갑, 접착제 등)에 알러지가 우려되는 자
- 다음 피부 질환을 가진 자: urticaria, oedema, eczema, recurrent herpes, herpes zoster having erupted in the last 3 months, pityriasis versicolour, common acne with a sudden rise of inflammation or nodular or cystic acne, psoriasis, ichthyosis, lichen planus, chronic lupus erythematosus, keloid scars, severe pigmentation disorders (vitiligo, chloasma, multiple lentigines, numerous or congenital nevi, especially if they are of large size), hyperhidrosis, dorsal hyperpilosity
- 면역계 질환을 가졌거나, 면역 억제제 치료를 받고 있는 자
- 하루 10 개비 이상의 흡연을 하거나, 매일 3 잔 이상의 술을 마시는 자
- 민감성 피부 또는 아토피성 병력을 가진 자 (최대 25% 참여 가능)

* 일반적인 제외 조건은 증례기록서(Case Report Form)에는 별도로 기록하지 않았다. 단, 시험 재 참여 제한 기간과 현재 건강상태 등은 예외적으로 증례기록서에 기록하였다.

라. 본 시험에서 적용하는 피험자 제외 조건

아래 선정 조건을 시험 시작일에 시험책임자가 피험자에게 문진하고 증례기록서에 기록하였다.

- 임신 또는 수유 중이거나 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- 정신과적 질환이나 감염성 피부질환이 있는 자
- 천식, 당뇨, 고혈압 등 소모성 만성질환이 있는 자
- 시험부위에 피부 이상소견이 있어 측정 및 판정이 곤란한 자
- 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외용제를 1개월 이상 사용하는 자
- 셀로판 테이프, 고무장갑, 알루미늄, 알코올 등 물질에 알러지 반응을 보이는 자
- 식품, 화장품, 약품에 알러지가 있거나 민감한 반응을 보이는 자
- 최근 5년 이내에 장기 이식 또는 절제 수술을 받은 자
- 최근 3주 이내에 한약(보약)을 1개월 이상 복용한 자
- 최근 6개월 이내에 소화기계, 심혈관계, 내분비계, 비뇨기계, 신경계 질환을 앓은 자

- 약물에 민감한 반응 또는 시험에 통상적으로 사용되는 물질에 과민반응(특이적 알러지 반응)을 보인 경험이 있는 자
- 최근 4 주 이내에 합염증제를 사용한 자
- 최근 7 일 이내 고열 증세가 24 시간 이상 지속된 경험을 가진 자
- 최근 1 개월 이내에 예방주사를 맞은 자
- 시험 개시 3 주 이내에 동일한 시험부위를 사용하는 다른 시험에 참여한 자
- 동일한 시험에 참가한 뒤 4 주가 경과되지 않은 자
- 그 외 시험 책임자의 판단으로 시험에 부적합 하다고 생각되는 자

마. 제한조건

시험기간 동안 피험자에게 제한되는 사항은 다음과 같다.

- 첩포 부착 후 3일간 등에 물이 묻지 않도록 샤워나 목욕을 하지 않는다.
- 시험 기간 동안 아스피린, 항염제, 항히스타민제, 스테로이드제(한약 포함)의 복용 또는 사용이 금지된다.
- 시험 기간 동안 예방 주사를 맞거나 면역억제제의 치료도 금지된다.
- 시험 기간 중에는 음주와 흡연을 자제한다.
- 시험 기간 중에는 과도한 운동을 자제한다.
- 시험기간 중에는 등에 어떠한 제품도 사용하지 않는다.
- 시험기간 중에는 등이 자외선에 노출되지 않도록 주의한다.
- 시험기간 중 일상생활에서 크게 벗어난 활동을 하지 않는다.

(3) 측정 및 평가

가. 시험 부위

시험 시작일에 피험자의 등 피부를 확인하고, 시험 결과의 판독에 장애가 예상되는 이상 징후가 없는 부위를 시험 부위로 정하였다. 피험자의 첩포 부착 위치를 부드러운 티슈로 가볍게 닦은 후 어깨, 허리와 척추 부위는 피하여 적용하였다.

나. 첩포 부착 방법

시료 20 μ l 를 standard Finn chamber on Scanpor (Epitest Ltd Oy, Finland) 에 담아 피험자의 등 피부에 48시간 동안 부착하였다. 도포 전, 액상 시료는 여과지(직경 7 mm)가 있는 chamber안에 일정한 양의 시료를 떨어 뜨린 후 부착하였고. 로션, 크림상의 시료 또는 점성이 있는 액체 시료는 여과지를 사용하지 않았다.

다. 첩포 농도

본 시험에서는 시료를 희석하지 않고 그대로 피부에 적용하거나 의뢰자와 협의된 농도와

vehicle로 회석하여 적용하였다.

라. 피부반응 판정

칩포 부착 48시간 후 칩포를 제거하고, 피험자를 30분간 피험자 대기실(온도 22±2℃, 습도 45±5%)에서 대기 시킨 후 피부 반응을 육안 검사하였다 (T30min). 칩포 제거 24시간 후 2차 검사를 시행하였다 (T24hr). 피부 반응 판정은 항상 같은 조건에서 수행되도록 하였으며, 특히 조도는 일광과 같은 조건으로 맞추었다. ("day light" lamp : 6500° K).

마. 판정 기준

피부 반응은 다음 판정 기준에 따라 평가하며 기타 증상 (epidermal erosion, subjective sensation: pruritus, prickling, burning sensation …)을 기록하였다. 모든 피부 반응을 사진 촬영하였다.

피부 반응 판정 기준

반응 없음	0
적용부위 3/4이하의 면적에서 매우 약한 홍반 반응이 있음	1
적용부위 전반에 균일하고 뚜렷한 홍반 반응이 보임	2
뚜렷한 홍반 반응이 있고, 약한 부종이 동반됨	3
부종 및 수포가 동반된 강한 반응이 있음	4

바. 데이터 분석과 해석

일차피부자극지수(Primary Cutaneous Irritation index; PCI)를 다음 공식에 따라 산출하였다.

$$\text{일차피부자극지수(P.C.I.)} = \frac{\text{S Grade of each subject}}{\text{Number of subjects} \times \text{number of readings}}$$

사. 피부 자극 평가 기준

기본적으로 산출된 P.C.I. 값에 따라 시료의 피부자극을 다음 기준에 따라 분류하였다. 또한 시료의 특성을 고려하여 시료의 최종적인 결과를 판정하였다.

P.C.I.	APPLICATION
0 ≤ P.C.I. ≤ 0.05	무자극 (no irritant)
0.05 < P.C.I. ≤ 0.15	경자극 (slight irritant)
0.15 < P.C.I. ≤ 0.5	중자극 (moderate irritant)
> 0.5	강자극 (strong irritant)

피험자 구성 : 피험자는 한국인 성인 여성 33 명을 섭외하였다. 시험 첫날 33 명이 방문하여

선정 제외조건에 따른 면담을 통해 본 시험에 적합한 피험자로 전원이 선정되었다. 최종 방문 일까지 33 명의 피험자가 시험을 정상적으로 종료하여 33 명의 유효한 데이터를 획득하고 분석하였다.

표 27. 피험자 구성

사전 모집한 피험자 수	33
선정된 피험자 수	33
시험 도중 탈락한 피험자 수	-
- 시료와 관련 없는 유해 사례	-
- 시료와 관련 없는 부작용	-
- 시료와 관련된 유해 사례	-
- 시료와 관련된 부작용	-
- 시험 규정에 위배되는 부적절한 치료를 받음	-
- 피험자 스스로 시험 동의 철회함	-
- 추적관찰 불가능	-
- 시험 도중 제외조건 발생	-
- 시험 책임자의 판단	-
- 시험 규정 위반	-
최종 결과 분석에 포함된 피험자 수	33

피부일차 자극 판정 결과 : 시험 도중 피부 감염이나 피부 질환 증세는 관찰되지 않았다. 또한 시료와 연관된 특이적 피부 병변과 민감성 자극 등 특이적 유해 사례는 나타나지 않았다.

각 시료의 48 시간 단회칩포 시험으로 도출된 피부일차자극 판정결과는 다음과 같다.

코드	번호*	시료명§	1차 검사	2차 검사	P.C.I.	결론
1	A2621	Cho.R.Lipo (120823)	0.03	0.06	0.05	무자극
2	A2622	Cho.R.GTE (120822)	0.03	0.00	0.02	무자극
3	D.W(ve hicle)	-	0.06	0.03	0.05	무자극

(4) 고찰 및 결론

본 시험은 ‘화장품 원료 2 품목(Cho.R.Lipo, Cho.R.GTE)’의 일차피부자극을 평가하기 위하여 수행되었다.

본 시험에서는 연령 26 세에서 54 세(평균연령 39.6 세) 사이의 한국인 성인 여성 피험자 33 명 이상을 대상으로 48 시간 칩포 시험을 수행하여 얻은 결과를 분석 하였다.

시료의 일차피부자극 발생유무를 평가하기 위해 시료를 피부에 단회 폐쇄칩포 하였다. 48 시간 이후 칩포를 제거하고 피부 반응 판정 기준에 따라 홍반, 부종 등을 육안평가하였다. 일차피부자극지수 (P.C.I)와 시료의 유형을 고려하여 시험 결과를 해석하였다.

본 시험에서 시료 2품목을 33명의 피험자에 48시간 인체 단회 첩포 시험하여 피부 반응을 관찰한 결과, “Cho.R.Lipo, Cho.R.GTE는 모두 무자극으로 제품으로써 피부에 안전한 것으로 확인 되었다.”

피험자정보

Sub. N°	Code [†]	Age	Sex
01	YOOLE10	37	F
02	EUNPA08	42	F
03	SEUGO02	38	F
04	JYKI02	37	F
05	GYEKW03	45	F
06	JEOKI05	39	F
07	HYEKI09	43	F
08	YUNGY	41	F
09	HYEIM06	40	F
10	BOKLE04	42	F
11	EULLE	47	F
12	GEULE06	36	F
13	GYEKI41	38	F
14	MINJE	26	F
15	HYOKW	40	F
16	HYEJO	39	F
17	JEOKI06	41	F
18	MIJJE02	54	F
19	INSHW	34	F
20	MIOBA	38	F
21	EUNLE24	35	F
22	JEOKI23	38	F
23	HYELE30	37	F
24	MISGO	33	F
25	EUNGO04	33	F
26	HYOKI07	40	F
27	INHKI02	41	F
28	JEOME02	39	F
29	SARLE	39	F
30	JEOME02	50	F
31	JEOPA07	47	F
32	YEOCH21	39	F
33	JEOKI22	39	F

† Subjects identification code F: female, M: male

1차피부 반응검사

시료코드 Sub. N°	1	2	3
01	-	-	-
02	1	-	-
03	-	-	-

04	-	-	-
05	-	-	-
06	-	-	-
07	-	-	-
08	-	-	-
09	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	1
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-

	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	1
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	1	-
31	-	-	-
32	-	-	-
33	-	-	-

2차피부반응검사

시료코드 Sub. N°	1	2	3
-----------------	---	---	---

01	-	-	-
02	-	-	1
03	-	-	-
04	-	-	-
05	-	-	-
06	-	-	-
07	-	-	-
08	-	-	-
09	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	1	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-

	-	-	-
26	1	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	-	-	-
33	-	-	-

2. 조록싸리 추출물을 함유하는 안정화 원료의 생산 Scale up

(1) 연구수행 방법

가. 샘플 정보

한국생명공학연구원과 건국대학교 이충환 교수 연구실에서 송부받은 조록싸리 추출물을 이용하여 Cho.R.Lipo 20Kg 및 Cho.R.GTE 40kg 제품의 Scale-up을 진행하였다.

나. 개발제형

100g의 분말상태의 샘플을 각각 리포솜 및 Gelatin Encapsulation 형태로 scale-up 진행하였다.

- Cho.R.Lipo

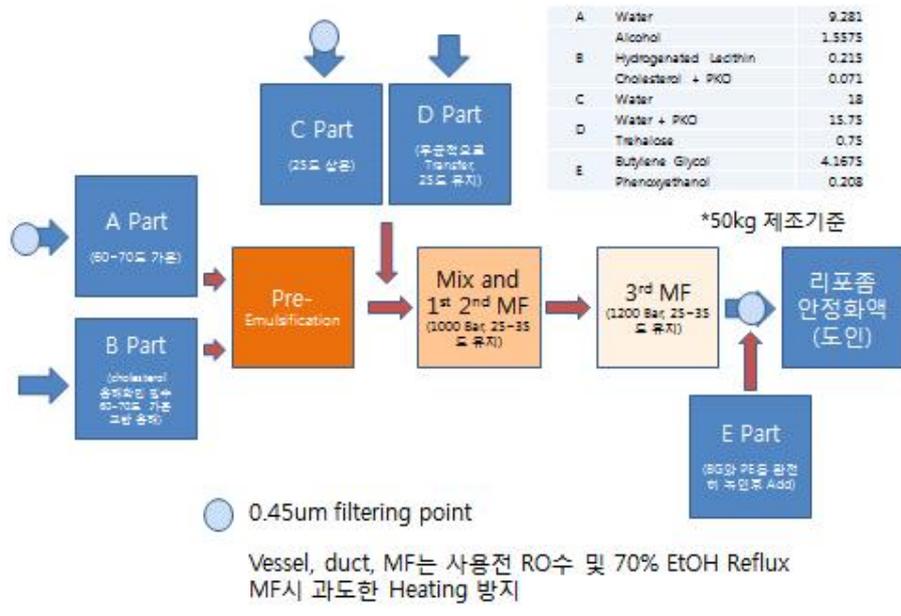


그림 54. 리포솜(Cho.R.Lipo) 제형을 위한 제조공정도

리포솜은 상기와 같은 방법으로 만들어졌으며, Cho.R.(조록싸리 추출물)은 유상 혹은 수상에 넣는 것으로 제조된다. A상은 Water, B상은 Alcohol, Hydrogenated Lecithin, Cholesterol을 위의 제조지시서에 명기된 것과 같이 넣고 C, D상은 물, 혹은 Cho.R.(조록싸리)를 넣는다. 이후 MF를 이용하여 리포솜화 한다. 3 Pass를 하며 1,2회는 1000 Bar, 25-35°C로 유지하며, 3회는 1200 Bar로 하여 25-35°C로 유지한다. 초기에는 Cho.R.(조록싸리)을 B상에 넣고 만들었으나, B상을 올릴 때 Cho.R.가 변성되므로 최종 스텝에는 D상에 50g(0.5%)을 투입하여 진행하는 것으로 하였다. 이를 1,2-Hexanediol(2.5%), 1,3-BG(3%), 정제수(50%)를 첨가하여 희석액을 만들었다.

- Gelatin Encapsulation(Cho.R.GTE)

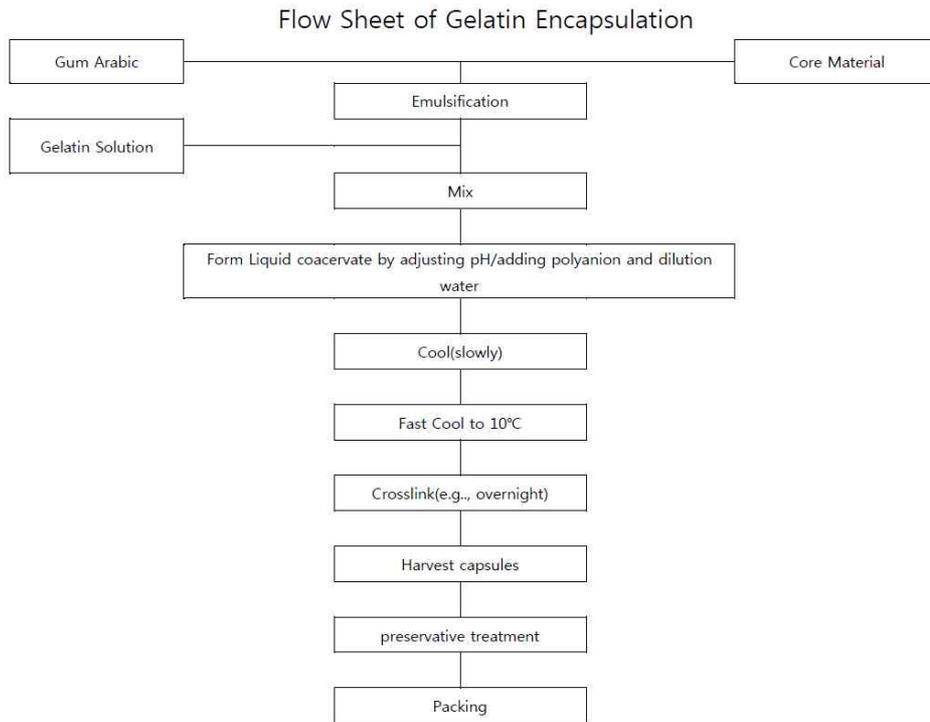


그림 55. Flow Sheet of Collagen/Gelatin Encapsulation

Gelatin Encapsulation은 다음과 같은 Flow으로 진행하였다. 조록싸리 추출물 50g 스케일로 Arabic Gum과 Core Material(조록싸리포함)을 유화한다. 이후 Gelatin Solution을 넣고 교반한다. pH의 조절과 polyanion의 첨가 그리고 물의 희석으로 인하여 Liquid coacervate가 만들어 지게 된다. 이를 천천히 냉각하다가 빨리 10도로 냉각한다. 하루정도 숙성시키면 각 내용물간 Crosslink가 생성되게 된다. 이를 회수하여 방부처리하여 제품을 만들게 된다.

다. 제형 scale-up 결과

(1) 종합



그림 56. 조록싸리 추출물을 이용한 젤라틴 인캡슐레이션 제형, 리포좀 제형

위 그림 56.은 조록싸리 100g 을 이용하여 scale-up 한 젤라틴 인캡슐레이션 40Kg과 리포솜 20Kg의 샘플 제형으로서 전년도에 수행하였던 각각의 제형과 유사한 제형을 가지고 있었다.

(2) 제형의 안정성

각각의 제형 샘플을 실온, 향온, 광에서의 안정도를 비교하였다.

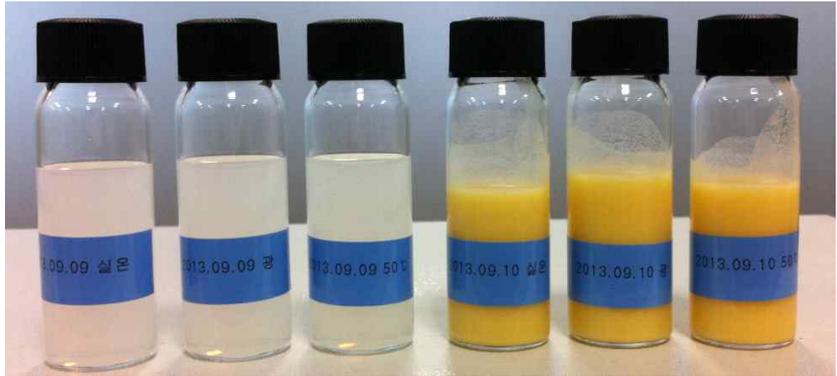


그림 57. 안정성 테스트 시작 전 제형 샘플 (실온, 광, 향온)

각 테스트 샘플들은 1개월마다 체크하였으며 체크항목과 샘플의 상태 다음과 같다. (표 및 그림 참조)

A. 실온

	Cho.R.Lipo		Cho.R.GTE	
	취	색	취	색
초기	양호	백색	양호	노랑
1개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
2개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
3개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음

B. 향온 (50℃)

	Cho.R.Lipo		Cho.R.GTE	
	취	색	취	색
초기	양호	백색	양호	노랑
1개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
2개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
3개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음

C. 광 안정도

	Cho.R.Lipo		Cho.R.GTE	
	취	색	취	색
초기	양호	백색	양호	노랑
1개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
2개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
3개월	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음



그림 56. 리포솜 및 젤라틴 인캡슐레이션 scale-up 제형 샘플 테스트 1개월 후



그림 57. 리포솜 및 젤라틴 인캡슐레이션 scale-up 제형 샘플 테스트 2개월 후

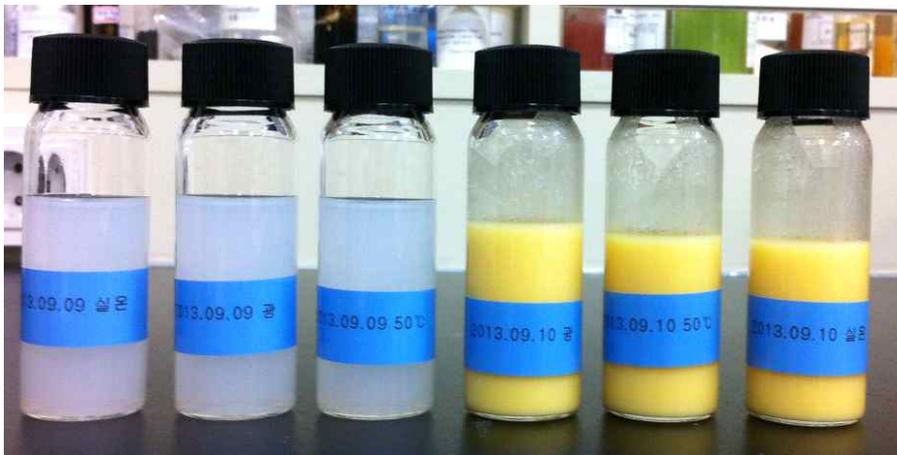


그림 58. 리포솜 및 젤라틴 인캡슐레이션 scale-up 제형 샘플 테스트 3개월 후

위의 결과로 알 수 있듯이 리포솜, GTE 제형의 scale-up 샘플의 안정성 테스트 결과 실온, 항온 50℃, 일광조건에서 3개월동안 변취 및 변색이 되지 않아 제품으로서의 문제가 없다고 판단되어 진다. 향후 조륙싸리 추출물의 대량화가 되면 대량화를 하여 판매가능성이 있다.

라. 향후 계획

생명연에서의 원물의 대량생산 확보와 건국대의 정제방법에 대한 연구의 확립이 되면 산업화에 응용하여 활성성분의 대량 추출과 추출물의 리포솜과 젤라틴 인캡슐레이션 제형을 인체 첩포시험 및 임상시험을 의뢰하여 피부자극에 대한 자극여부와 효능평가를 수행하고 그 결과에 따라 다른 제형(나노솜, 마이크로에멀전)으로도 발전할 예정이다.

현재 유럽을 중심으로 화장품의 동물상대로의 in-vivo test 는 금지화되는 추세이며 만약 실시했을 시 화장품 원료로서 사용을 금하고 있다. 이에 따라 국내에서도 추세에 따르는 실정이므로 동물을 상대로한 시험은 금지되는 추세고 가급적 사람이나 인공피부로 대체하는 것이 실정이므로 인체 첩포 시험이나 임상시험경우는 전문기관(IECKorea)에 의뢰하여 진행할 예정이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2010)	- 참싸리로부터 기능성 미백 물질 추출 분리 및 미백 활성 기전 규명	100	- Preparative HPLC를 이용한 Lespedezol D1 및 Manuifolin H의 대량 분리 수행 - 참싸리로부터 천연 기능성 미백물질의 탐색 (tyrosinase 저해 활성 테스트 수행)
	- 참싸리 종별, 채취 지역별·시기별 대사체 프로파일링 및 미백 활성물질 함량비교	100	- 채집 장소 및 시기가 다른 참싸리 샘플의 LC-IT-MS에 기반한 프로파일링 수행 - LC-IT-MS로부터 얻은 크로마토그램으로부터 이온 추출 방법을 이용하여 미백활성물질(Hagin A)의 정량 분석 수행
	- 국내 서식 다양한 참싸리 자원의 대사체 데이터 베이스 구축	100	- HPLC로부터 분리한 미백활성 물질의 LC-MS/MS, UPLC-Q-TOF 분석, 1H-NMR 분석을 통해 정확한 분자량 확인과 구조 분석을 수행
	- 참싸리 및 근연종의 지역별, 시기별 식물소재 및 종자확보	100	- 참싸리 및 근연종의 국내 및 국외 소재의 지역별, 시기별 소재 확보
	- 소재의 증거표본 제작 및 보관 및 소재정보의 D/B 구축	100	- 분류학적 재현성 검증 및 실체 파악을 위한 증거표본의 확보 및 제작, 보관하며 소재정보의 D/B구축
2차 년도 (2011)	- 참싸리의 종별, 채취 지역별·시기별 대사체 프로파일링을 통한 미백 활성 물질 함량 비교 (LC/MS/MS, GC/MS, NMR)	100	- 참싸리 이외에 Lespedeza 속에 속하는 비수리, 조록싸리, 싸리 등 다른 종 간의 미백 활성물질 함량비교 - 조록싸리 종 잎 부위 ethyl acetate 추출물의 melan-a cell line에 대한 활성비교
	- 대사체 변화 프로파일링을 통한 데이터베이스 구축	100	- 단일 컴파운드를 대량분리하여 NMR로 구조 확인
	- In vitro assay : tyrosinase 효소 저해 활성 측정 - In vitro assay : melanocyte cell assay를 통한 melanin biosynthesis 결과 생성되는 melanin contents 함량의 비교	100	- Uncinanone B, MW=338 활성물질의 타이로시네이즈 저해 활성, 그리고 피부 세포에서 멜라닌 생합성 저해 활성 수준을 정량 적 수치 (IC50)로 규명
	- 대사체 구조 분석 및 프로파일링 시뮬레이션을 이용한 최적 미백 활성 참싸리 소재의 표준화 시스템 기반 구축 (PCA, PLS-DA, OPLS-DA)	100	- Lespedeza 속의 LC-IT-MS 분석을 통해 함유하는 물질의 retention time, mass fragment, UV 값 등의 D/B 구축

구분	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2011)	- 참싸리 및 근연종의 분류학적 검증	100	- 참싸리 및 근연종의 형태, 분자분류를 통한 계통분석
	- 참싸리 및 근연종의 종자특성 연구	100	- 산업화를 위한 참싸리 종자의 Soft X-ray를 통한 종자결실 충실도 탐색, 미세형태 및 해부특성 연구를 통한 물리적 특성연구
	- 효능 및 피부안전도 최적화 유지를 위한 소재제형 안정화 시스템 구축	100	- 미백활성소재에 대한 리포솜, 나노솜, 마이크로 에멀전 타입에서의 피부 안전도 및 제형 안정도 시스템 구축
3차 년도 (2012)	- 대사체 데이터베이스를 이용한 국내 싸리류 분류 및 활성별 분리 시뮬레이션 시스템 실용화	100	- 대사체 비교 분석 시뮬레이션을 통한 시료의 대량 확보 시스템 실용화
	- 신규 구조로 확인된 활성물질의 구조 확인	100	- 단일 컴파운드를 대량분리하여 NMR로 구조 확인
	- 조록싸리 종에서 분리한 생리 활성을 나타내는 컴파운드의 정량적 수준에서 활성 규명	100	- Uncinanone B, Desmodianone H의 타이로시네이즈 저해 활성 수준을 정량적 수치(IC50)로 규명
	- 최적 발아 온도 연구	100	- 다운도발아측정기 (Thermogradient table)을 통한 발아최적온도 연구
	- 참싸리 대량생산체계 구축을 통한 산업화 기반 마련	100	- 재배지역별 지표물질 최적함량 검증소재 공급 및 최적지 선정을 통한 산업화 소재의 지속적 공급체계 완성
	- 마이크로에멀전 함유제형 추가 개발 및 안전성 테스트	100	- 조록싸리 추출물을 함유하는 마이크로 에멀전을 개발, 이후 안전성 및 안정성 확인
- 향장소재로 개발된 Cho.R.Lipo 및 Cho.R.GTE 제품의 대량생산을 하기 위한 Scale up을 진행	100	- Cho.R.Lipo(리포솜 제형)의 경우 1 Batch 정도 30kg 대량생산을 진행, Cho.R.GTE(gelatin capsulation)의 경우 1 Batch 정도 20kg 대량 생산을 진행	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 활용방안

- 국내 자생식물들을 대사체학을 기반으로 한 chemotaxonomy를 이용하여 연구할 수 있는 기반을 마련하여 이를 통한 데이터베이스 구축 및 활성 물질을 탐색하여 활성 물질 또는 신규 화합물의 발굴 가능
- 분류학적 검증을 통한 후보소재의 확보는 표준화된 종자의 규격화로 유사 식물의 종자 사용에 따른 문제점을 해결하고 천연물의 특성화된 식물자원의 대량증식을 통한 원재료 공급으로 고부가가치 산업의 지속성 부여
- 국내에 분포하는 참싸리 및 근연종의 유연관계를 파악하여 국내 산림자원의 분류정보 제공과 기원분석을 통한 근연종의 활용성에 대한 예견적 가치를 부여
- 국내외에 분포하는 참싸리의 지표성분을 비교하여 지역별, 시기별 차이를 분석함으로써 산업화를 위한 우수한 참싸리의 지역별, 시기별 확보 방안마련
- 종자연구를 통한 국내산림자원종자의 기초연구정보를 제공하여 발아연구를 통한 최적지의 대량생산 체계 기반 마련을 통하여 부존자원의 지속적 이용과 농가생산을 통한 지역경제 활성화 유도
- 자연유래 소재에서 분리한 미백 활성물질을 기반으로 한 향장제품 개발 및 미백물질의 독자적인 개발로 인한 제품의 차별화 및 시장 경쟁력 강화

2. 기대성과

가. 기술적 측면

- 싸리 유래의 미백활성 물질을 발굴함으로써 국내 화장품 시장의 원료 자생 가능
- 활성물질 탐구의 새로운 접근방식인 대사체학적인 chemotaxonomy 방법의 실용화
- 종자의 특성 연구를 통한 종합적 정보 특성 정보에 의한 자생식물자원의 체계적 관리
- 멸종위기 및 희귀식물 종자의 특성연구 개발을 통한 보존, 복원 기술 확보
- 식물유전자원의 현지 외 보존기능
- 연구자 및 신약 등의 개발에 대비한 특정종의 대량생산기술 확립

나. 경제적 · 산업적 측면

- 생물산업의 근간이 되는 생물자원의 확보 및 무한한 잠재가치를 지속적으로 이용하고 보존하는 전략적 중요성의 증대
- 생물다양성협약(CBD)에 의한 생물자원주권 시대의 대비
- 효율적으로 보관된 종자에 대한 이용 기술개발로 종자의 효용가치는 지속적으로 증대할 것이며 산업화를 통한 경제적 이익 창출

다. 사회·문화적 측면

- 국민들에게 자생식물에 대한 중요성을 인식시키고 자연학습교육의 장을 마련
- 온실 및 야외포장을 통한 학생들의 야외학습체험장으로 활용
- 자생식물을 이용한 재배 및 품종화 기술개발로 국민정서의 함양

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 아니 됩니다.