

최 중
연구보고서

국내 자생 팔손이 자원의 보존과 활용을 위한
기능성 소재화 및 조직배양기술 개발

Development of functional materials and tissue culture
technology for the application of *Fatsia japonica*
produced in Korea

주관연구기관 : 강원대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생 팔손이 자원의 보존과 활용을 위한 기능성 소재화 및 조직배양 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 강원대학교
총괄연구책임자 : 이 현 용
세부연구책임자 : 이 현 용
연 구 원 : 김 대 호
 : 송 영 규
협동연구기관명 : 국립산림과학원
협동연구책임자 : 이 학 주
협 동 연 구 원 : 윤 갑 희
 : 이 현 정
협동연구기관명 : 전남대학교
협동연구책임자 : 황 백
협 동 연 구 원 : 김 유 정
 : 박 윤 정
참 여 기 업 명 : 명진농장
참여기업 대표 : 정 을 권
참여기업연구원 : 최 광 석

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생 팔손이 자원의 보존과 활용을 위한 기능성 소재화 및 조직배양 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 강원대학교
총괄연구책임자 : 이 현 용
세부연구책임자 : 이 현 용
연 구 원 : 김 대 호
 : 송 영 규
협동연구기관명 : 국립산림과학원
협동연구책임자 : 이 학 주
협 동 연 구 원 : 윤 갑 희
 : 서 선 미
 : 이 현 정
 : 최 인 호
 : 이 연 숙
협동연구기관명 : 전남대학교
협동연구책임자 : 황 백
협 동 연 구 원 : 김 유 정
 : 박 윤 정
참 여 기 업 명 : 명진농장
참여기업 대 표 : 정 을 권
참여기업연구원 : 최 광 석

후 유 무

요 약 문

I. 제 목

국내 자생 팔손이 자원의 보존과 활용을 위한 기능성 소재화 및 조직배양기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

팔손이는 두릅나무과에 속하는 관목으로 동과의 인삼속과 함께 오가피속 등은 다양한 연구가 활발히 진행되어 있어 약리 기능, 기능성 소재화를 비롯한 육종을 통한 활용을 통해 제품화가 가능한 수준이나 팔손이는 관상용으로 주로 이용되고 있을 뿐 다른 유용 활성 기능에 대한 활용 가능성이 매우 높음에도 불구하고 가시오가피나 오가피나무 등에 가려 이의 이용에 대한 연구가 상대적으로 미진하다. 일부 연구되어 있는 기능들은 칼로톡신의 용혈 작용, 사포닌 성분의 거담 작용, 항염증 작용 등이 알려져 있으며, 뿌리·껍질·줄기·열매의 추출액은 항 알레르기, 당뇨 조절에도 효과가 있을 것으로 추정되고 있다. 또한 일부 특정 추출액은 중추신경계통에 자극 작용이 있어 동의보감이나 민간처방에서 주요 약재로 활용되기도 하였다. 따라서 국내 남부지역에 널리 자생하고 있는 두릅나무과의 팔손이나무에 대한 기능성 생리활성 물질을 체계적으로 분석하고 활성 성분에 대한 작용기작을 규명함으로써 국민보건 향상에 기여함은 물론 농가소득의 증진과 더불어 국산 식물자원의 개발 및 응용을 통하여 국가 경쟁력 향상에 크게 기여하고자 한다. 하지만 이들 약리 성분들과 일부 정유 성분들이 뿌리, 껍질과 줄기의 내·외피, 일부 열매에 있는 것으로 알려져 있어 팔손이나무를 약용으로 사용하기 위해 뿌리나 줄기만을 주로 이용하기 때문에 이들의 대단위 수요 발생시 산지의 팔손이나무에 대한 멸종이 우려된다. 반면 목본의 시험관내 배양, 재분화 및 뿌리배양 등의 기술적 확립이 아직 쉽지 않은 실정이며, 특히 팔손이나무 등 두릅나무과 식물에 관한 조직배양 연구는 전무하여, 팔손이나무의 형질전환 시스템 확립은 자원식물의 보존과 개발이라는 새로운 친환경적 측면의 기초연구자료 확보라는 점에서 그 필요성이 절실하게 요구된다. 따라서 이런 문제들의 근본적인 해결을 위해 이 수종의 부위별 유용 활성의 탐색과 함께 대상

유용 물질을 함유하고 있는 켈러스와 같은 체외 배양 기술을 병행하는 새로운 task force 형태의 연구를 통해 향후 임산 자원의 연구에 대한 새로운 paradigm을 제시하는 연구를 수행하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내 자생 팔손이의 부위별 유용 활성 성분의 탐색 및 물질 동정과 함께 이들의 켈러스 등 배양체의 분화와 대량 배양 확립을 통해 궁극적으로 이로부터 나오는 유용 생리 활성 물질들의 기능성 소재화를 통한 새로운 소재의 산업화를 이루는 것이 주목표이다. 이를 위해 3년 동안 다음의 연차별 연구내용으로 추진하였다.

1차 년도에는 팔손이나마의 부위별(근피, 수피, 잎, 꽃, 열매 등) 생리활성 탐색을 위해 팔손이의 부위별 채취 및 용매추출 방법을 결정하였고, 활성 물질의 분리·정제 공정을 확립하였다. 또한 국내 팔손이 활성 성분들의 Data-base 구축을 위한 기초를 확립하였고, 팔손이나마의 형질전환과 전초배양 등의 무균 배양 확립을 위해 형질전환의 효율이 높은 물질 고생산 Line의 선발과 재분화 및 효율을 증진시키는 배양조건을 조사·확립하였다. 이를 바탕으로 팔손이 활성 성분의 소재화 적성을 검토하고, 상기 연구를 통해 연구된 팔손이 활성 물질의 유용성(생리활성 검증), 배양 수율 및 소재화 가능성을 바탕으로 2년차, 3년차의 집중적 연구개발을 위한 팔손이 부위 및 활성 물질을 결정하였다.

2차 연도에는 1차 년도에 진행한 연구결과를 바탕으로 활성이 있다고 판단되는 대상 활성 성분의 추출 및 수율증진 기술 확립을 위해 연구를 진행하였고, 대량 배양을 위한 기초 배양 실험, 배양 공정의 scale-up 및 최적화 기반을 마련하였다. 또한 1차년도에서 결정된 활성 물질의 *in vitro* 및 *iv vivo* 실험을 수행하였으며, 배양 방법별 조직 배양체들의 유용 활성 탐색 및 독성 실험을 수행하여, 기존 활성들과의 비교를 통한 보다 체계적인 *in vitro* 및 *iv vivo* 실험을 실행함으로써 팔손이 유용 성분의 소재화 가능성을 검증하였다. 또 배양 단계에서 배양조건의 미세조절물질 및 생산에 적합한 기본조건을 측정하고 생물반응기의 최적배양 환경 모델도 선정하였다. 또한 팔손이나마의 농가 계약 재배를 위한 유기적 협조 구축을 시도하였고, 팔손이 활성 성분들의 추출, 고농도 농축 및 가공이 용이한 공정 적성 실험을 수행하였

다. 따라서 상기 연구에 의한 팔손이 배양체 및 활성 물질의 유용성(생리활성 검증), 고배양 수율 및 제품화 가능성을 바탕으로 3년차의 집중적 연구 개발을 위한 캘러스, 모상근 등 팔손이 조직 배양체의 유용 물질 분리 및 정제와 함께 생리 활성 기능을 나타내는 유용 물질의 소재화 여부를 판단하였고, 기술 관련 특허 및 학회 발표도 수행하였다.

마지막으로 3차 년도에는 1, 2차 연도에 진행한 연구결과를 바탕으로 생리활성 물질의 대량 생산 시스템을 개발, 최적화하였고, 분리된 순수 물질들의 생리 활성 기작 연구와 활성 유지가 가능한 추출 공정을 확립하여 대상 유용 활성 물질 중 소재화가 가능한 물질을 선별, 배양함으로써 대량 생산 공정을 통해 배양된 팔손이나마의 부위별 조직 배양체를 이용한 기능성 소재화 기술을 확립하였다. 이를 바탕으로 결정된 공정에 따라 시제품 생산 및 특허를 출원하고, 생물반응기에서 증식된 세포 및 기간의 유효생물함량 증가 조건을 규명함으로써 대량 배양 공정 변수의 최적화 및 scale-up을 완료하였다. 또한 유용 활성이 높은 팔손이나마 대량 식재 지역을 선정하여 임업 농가 계약 재배 및 방법 지도를 통해 농가소득 증대에도 기여하고자 하였고, 개발 공정 및 시제품들의 marketing 분석 및 기타 경제성을 검토하여, 농가의 관목 재배 기술지도 및 계약 재배를 위한 방안을 구축하고자 하였다. 최종 연구결과를 바탕으로 학회발표를 수행하고, 실험 결과를 바탕으로 팔손이 유용 물질의 상용화를 위한 시설 및 운영비 계산 등과 같은 경제성 분석을 통해 최종 산업화를 위한 모델을 확정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 배양공정을 이용해 기능성 식품이나 생물의약품 소재 및 제품의 상용화, 범용화를 위해 소요되는 초기 설비 비용의 일부를 정부에서 보조하는 방안이 필요할 것으로 예상되며, 생산 공정의 scale-up을 위한 제조 업체의 기술 확립 및 이전에 관한 인프라 구축에 소요되는 예산 및 인력 지원도 필요할 것으로 예상된다.

SUMMARY

Development of functional materials and tissue culture technology for the application of *Fatsia japonica* produced in Korea

1. Purpose and Necessity of this Research

Fatsia japonica belong to Ginseng family, panax species and Acanthopanax species of this family were studied much and variously so application and manufacture through medical actions, functional materialization and breeding are possible level, but *Fatsia japonica* is only using admiration in spite of it has other very useful active function because its studies were unexhausted compare with studies of Acanthopanax species.

Some functions studied of *Fatsia japonica* were known about anti-inflammatory, hemolytic activity of Kalotoxin and discharge of phlegm action by saponin ingredient etc. and, extracts of *Fatsia japonica* roots, shell, trunk are assumed that there are effects to anti-allergy, control of blood-sugar.

Also, several specific extracts have stimulation activity in central nervous system on this account *Fatsia japonica* utilized for cadinal medicines in folk remedies.

Therefore, we should contribute promotion a people health, income of farmhouse and competitive power of country with scientifically analyze functional physiologic active ingredients from *Fatsia japonica* of Ginseng family in domestic southern area, examine function mechanism about active ingredients of *Fatsia japonica* and development of domestic plant resources through the former.

However, it known that these medicinal ingredients and some essential oils exist in root, shell, inside and outside skin of stem and some fruits, on this account thoughtlessly use only root and stem for medical use of *Fatsia japonica*, so worried about extermination of *Fatsia japonica* in such a happen large scale demand case.

The other side, technological establishment of in vitro culture, re-generation and root culture in trees is not easy situation, especially there are no studies about tissue culture of *Fatsia japonica* etc. in Ginseng family.

Establishment of genetic transformation system is required sincerely in point that obtain of elementary research data in preservation and development of resources plants. It is new paradigm research of green environmental side.

Therefore, we should accomplish research available suggestion new paradigm about hereafter study of forest resources through task force type research. It goes abreast both search of useful activity in each plant parts and in vitro culture technology like callus culture.

2. Research scope and experimental methods

Main purpose of this research is accomplishment industrialization of new type material through functional materialization of useful physiological active ingredients.

It make progress by search of useful physiological active ingredients and material identification in Domestic self-generation *Fatsia japonica*, and establishment of large scale culture system. therefore we progressed to next order by year research contents for 3 years.

The first year, decided picking by *Fatsia japonica* parts and solvent extraction method for search of physiological activities by *Fatsia japonica* parts (root skin, stem skin, leaf, flower, fruit, etc.) and Established separation and refine process of active ingredients. Also, we established basis for data-base construction of active ingredients in *Fatsia japonica*.

We selected high yield lines that were showed high efficiency in transformation and searched and established culture conditions that increase re-generation and yield.

With this, examined materialization aptitude of active ingredient in *Fatsia japonica*, and we decided plant parts and active ingredients for further research development in 2nd, 3rd year, with value, culture yield and materialization possibility of active ingredient in *Fatsia*

japonica that is ensured through former.

Second year, research progressed for establishment of extraction and yield increase in target active ingredients that is judged there are activities through results in last year.

We ensured basis of culture experiment, scale-up program in culture process and optimization of all for large scale culture.

Also, progressed in vitro and in vivo experiment that is decided in first year, and search of useful activities and experiment of toxicity in tissue embryoids by culture methods.

We verified materialization possibility of active ingredient with more scientific in vitro and in vivo experiments through compare with existing activities.

Also, measured suitable basic condition in produce micro-matter for control in culturing steps and chose most suitable environment reactor model.

Also, we tried organize organic cooperation for farmhouse contract growing of *Fatsia japonica* and progressed extraction active ingredients, high density concentration and process aptitude experiment.

Therefore, we judged acceptance or rejection, that materialization, separation and refine of physiologic active ingredients from tissue *Fatsia japonica* embryoid like callus, adventitious root, hairy roo, etc. with value, yield and possibility that is researched in former study.

Finally, the third year, we develops and optimized mass production system of physiological active ingredients with results in 1st and 2nd year research. We established extraction process that it is possible keeping activity and studying physiological activity mechanism, and established materialization using embryoid by *Fatsia japonica* parts that produced with large scale process through chose and cultured mass possible materialization.

We complete scale-up and optimization of process fluent in large scale culture with examine effective biomass contents increase condition, by cells and proliferation cells. and with those produced prototype and applied patents. Also, select large habitation area possibility growth high useful activity *Fatsia japonica* and contribute farmhouse income increase through forestry farmhouse contract growth and guidance growing method. We should making ways for contract growth and guidance growing method to farmhouse

with examine various economical efficiency and marketing analysis of developed process and prototype.

We decided model for last industrialization through economic analysis such as calculate cost of equipment and operating expenses for common use of useful mass with final experimental results, and publish paper with final experimental results, too.

3. Results and proposal for the further utilization of the project

This cultivation process ability using for food or bio-medicines material and common use of product at this time to help part of early equipment expense that is cost for commercialization and popularization in government is expected to need. and support human power and budget are expected to need for organizing infra about technology establish of company and technology transfer for scale-up in manufacturing process.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Recent advances in technology in domestic and foreign countries	25
Chapter 3. Results of the projects	29
Section 1. Extraction processes as of <i>Fatsia japonica</i> by several different extraction solvents	30
1. Experiment methods	30
A. Extraction process according to different extraction solvents	30
2. Results and discussion	31
Section 2. Screening of biological activities of <i>Fatsia japonica</i> extracts	33
1. Experiment methods	33
A. Measurement of cell toxicity and growth inhibition of cancer cell lines	33
B. Measurement of cytokine secretion	34
C. Immune activity of NK cell	35
D. Measurement of cell differentiation of HL-60	35

E. Measurement of biological activities using a microphysiometer -----	36
F. Liver function activation activity ----- (counteraction poison – Glutathione S-transferase measure)	37
G. Inhibition activities in Angiotensin Converting Enzyme -----	38
H. Inhibition activities in α -glucosidase -----	39
I. Measurement of <i>in vivo</i> anti-cancer activity -----	39
J. Anti-stress test with mouse -----	40
2. Results and discussion -----	41
Section 3. Fractionization of ethanol extract of <i>fatsia japonica</i> and screening of ----- its biological activities	70
1. Experimental methods -----	70
A. Fractionization of ethanol extract from <i>Fatsia japonica</i> -----	70
B. Screening of biological activity of the extracts----- from <i>Fatsia japonica</i> roots bark	71
2. Results and discussion -----	75
Section 4. Purification and identification of new useful biologically ----- active compounds from <i>Fatsia japonica</i>	85

1. Experimental methods -----	85
A. Collection of disclosure materials -----	85
B. Extraction and separation process -----	85
C. Instrumental analysis of the extracts -----	85
D. Purification and identification of new compounds -----	86
2. Results and discussion -----	91
Section 5. Screening of biological activities of -----	112
newly purified compounds	
1. Experimental methods -----	112
A. Measurement of cell toxicity and growth inhibition of cancer cell -----	112
B. Immunity increasing activity -----	113
C. Liver function test -----	114
D. Inhibition activities in Angiotensin Converting Enzyme -----	114
E. Inhibition function of α -glucosidase -----	115
2. Results and discussion -----	115

ii

Section 6. Establishment of <i>in vivo</i> culture of <i>Fatsia japonica</i> and development of its mass production systems	-----	123
1. Experimental methods	-----	123
A. Sterile culture of <i>Fatsia japonica</i> seed	-----	123
B. Bud culture of <i>Fatsia japonica</i>	-----	124
C. Optimization of operating bioreactors	-----	125
2. Results and discussion	-----	126
Section 7. Comparison of biological activities of the extracted cultures from different culture systems	-----	136
1. Experimental method	-----	136
A. Extraction of adventitious root of <i>Fatsia japonica</i>	-----	136
B. Measurement of cell toxicity and growth inhibition of cancer cell	-----	136
C. Measurement of cytokine secretion	-----	138
D. Immune activity of NK cell	-----	139
E. Measurement of cell differentiation of HL-60	-----	139
F. Measurement of biological activities using a microphysiometer	-----	140

G. Liver function activation activity -----	141
H. Inhibition in Angiotensin Converting Enzyme -----	142
I. Inhibition function of α -glucosidase -----	142
□	
2. Results and discussion -----	143
Section 8. Development of production systems of the extracts from -----	159
<i>Fatsia japonica</i> and economic feasibility of the proposed functional food	
1. The Proposed process for the functional foods -----	159
A. Powder type product -----	159
B. Granule tea type product -----	161
C. Tablet type product -----	164
D. Pouch type product -----	166
2. Conclusion and discussion (panel test) -----	168
3. Assesment of economic feasibility -----	173
Chapter 4. Summary -----	177
Chapter 5. Objection achievement and contribution to the related industries -----	185
Chapter 6. Application plan of the results -----	188

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	21
제 2 장	국내·외 기술개발 현황 -----	25
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	29
제 1 절	추출 용매에 따른 팔손이나마의 추출 공정 -----	30
1. 실험내용 -----		30
가. 추출 용매에 따른 팔손이나마의 추출 공정 -----		30
2. 결과 및 고찰 -----		31
제 2 절	팔손이나마 추출물의 생리활성 탐색 -----	33
1. 실험내용 -----		33
가. 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정 -----		33
나. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정 -----		34
다. NK 세포의 면역증진효과 -----		35
라. 세포 분화도 측정 -----		35

마. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정 -----	36
바. 간기능 관련 생리 활성측정(해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)-----	37
사. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성 -----	38
아. -glucosidase 억제 기능 탐색 -----	39
a	
자. <i>in vivo</i> 항암 실험 (S-180 복수암의 항암효과 측정) -----	39
차. 마우스를 통한 항스트레스 효과 측정 -----	40
2. 결과 및 고찰 -----	41
제 3 절 팔손이 에탄올 추출물의 분획 및 생리활성 탐색-----	70
1. 실험내용 -----	70
가. 팔손이 에탄올 추출물의 분획-----	70
나. 팔손이 근피 에탄올 추출 분획물의 생리활성 탐색 -----	71
2. 결과 및 고찰 -----	75
제 4 절 팔손이 내 유용 생리활성 물질 추출, 분리 및 정제 -----	85
1. 실험내용 -----	85
가. 공시재료 채취 -----	85

나. 추출 및 용매분획 -----	85
다. 기기분석 -----	85
라. 화합물의 분리·정제 -----	86
2. 결과 및 고찰 -----	91
제 5 절 팔손이로부터 알려진 신물질의 생리활성 탐색 -----	112
1. 실험내용 -----	112
가. 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정-----	112
나. 면역 증진 활성 측정 -----	113
다. 간 기능 관련 생리활성 측정 -----	114
라. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성 -----	114
마. α -glucosidase 억제 기능 탐색 -----	115
2. 결과 및 고찰 -----	115
α	
제 6 절 팔손이 부정근의 기내 배양 확립 및 대량생산 시스템 개발 -----	123
1. 실험내용 -----	123
가. 팔손이나무 종자의 무균 배양 -----	123

나. 팔손이나무 정아 배양 -----	124
다. 생물반응기의 선발 및 운영 -----	125
2. 결과 및 고찰 -----	126
제 7 절 대상 조직 배양체들의 배양 공정별 유용생리활성 비교 및 탐색 -----	136
1. 실험내용 -----	136
가. 팔손이의 부정근의 추출 및 농축 -----	136
나. 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정-----	136
다. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정 -----	138
라. NK 세포의 면역증진효과 -----	139
마. 세포 분화도 측정 -----	139
바. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정 -----	140
사. 간기능 관련 생리활성 측정 (해독작용 - Glutathione S-transferase 측정) --	141
아. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성 -----	142
자. -glucosidase 억제 기능 탐색 -----	142
2. 결과 및 고찰 -----	143

□

제 8 절	팔손이 근피를 이용한 기능성 식품 생산 공정 확립 및 경제성 평가 -----	159
1.	시제품 제작 방법 -----	159
가.	분말 -----	159
나.	과립차 -----	161
다.	타정제품 -----	164
라.	파우치 -----	166
2.	결과 및 고찰 -----	168
3.	팔손이 시제품의 경제성 평가 -----	173
제 4 장	요 약 -----	177
제 5 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	185
제 6 장	연구개발결과의 활용 계획 -----	188
제 7 장	참고문헌 -----	191

연구개발과제의 개요

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

팔손이(*Fatsia japonica* Decaisne et Planchon)는 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 관목으로 이 과에는 오가피나무, 가시오가피 나무, 두릅나무, 팔손이나무, 담장나무, 땅 두릅나무, 엄나무 등이 있다.

이과의 인삼속과 함께 오가피속 등은 다양한 연구가 많이 되어 있어 약리 기능, 기능성 소재화 및 육종에 대한 활용 및 제품화가 가능한 수준이다. 하지만 이들 중 팔손이는 관상용으로 주로 이용되고 있을 뿐 다른 유용 활성 기능에 대한 활용도가 매우 높음에도 불구하고 가시오가피나 오가피나무 등에 가려 이용에 대한 연구가 상대적으로 적어 이 수종의 연구가 필요한 상황이다.

또한 목본의 시험관내 배양, 재분화 및 뿌리배양 등의 기술적 확립이 아직 쉽지 않은 실정이며, 특히 팔손이나무 등 두릅나무과 식물에 관한 조직배양 연구는 전무하여, 팔손이나무의 형질전환 시스템의 확립은 자원식물의 보존과 개발이라는 측면의 기초연구자료 확보라는 점에서 필요성이 요구된다.

연구를 통해 세포배양, 정아배양 및 뿌리배양 등으로 유효 생리활성성분 생합성 장소의 규명이 가능하며, 기존의 팔손이나무 특이적 생리 화합물의 효율적 생산기술의 확보와 배양계를 통한 특이적 신규성 생리활성 화합물의 발굴을 이루고자 한다.

또한 이들 수종(두릅나무과)의 특징은 주로 줄기에 가시가 있으며 약리 성분이 존재하는 부위가 주로 근피나 수피(예 ; 해동피, 초동피 등)에 있다고 알려져 있어, 이들 수종을 약용으로 사용하기 위해 산에 자생하는 나무의 줄기와 뿌리를 무분별하게 채취해 거의 멸종해 가고 있는 상태이다.

한방에서 팔손이는 거담제로 쓰이며, 민간에서는 잎을 육탕에 넣어 류머티즘 치료 및 외용제로 널리 사용하고 있어, 생리활성물질 및 작용기작을 밝히는 것은 매우 중요하다고 볼 수 있다. 따라서 팔손이 연구는 한의학 처방의 과학화에 중요한 근거 자료 및 식·의약품으로의 활용가치를 극대화 시킬 수 있을 것이다.

과거와 같이 단순한 약리 기능 및 기능성에 대한 연구만 진행된다면 이 수종의 멸종 위기를 부르는 실수를 재관할 우려가 높다. 따라서 이 수종의 이용 연구 진행에 관한 기본 방향 및 인식의 일대 전환이 요구된다.

따라서 이런 문제들의 근본적 해결을 위해 이 수종의 부위별 유용 활성 탐색과 함께 대상 유용 물질을 함유하고 있는 켈러스와 같은 체외 배양 기술을 병행하는 새로운 task force 형태의 연구를 수행하고자 한다.

국내 자생하는 자원식물의 발굴 및 효율적인 관리와 이의 적절한 이용기술개발은 산림의 70% 이상을 이루는 국토의 효율적인 이용의 일환이 될 수 있으며, 자생 팔손이나무 자원의 효율적인 보존기술이 확립되고 이들 자원을 활용함으로써 재배농가 및 생산자의 수익증대에 기여할 수 있음은 물론, 최근 전세계적 추세인 천연자원식물의 발굴과 보존에 따른 치열한 국가간 경쟁에서 자국내 자생 자원식물의 보다 효과적인 발굴 및 부가가치 창출의 일환으로도 의미가 있을 것이다.

이에 본 연구는 국내의 남부지역에 널리 자생하고 있는 두릅나무과의 팔손이에 대한 기능성 생리활성 물질을 체계적으로 분석하고 활성성분에 대한 작용기작을 규명함으로써 국민보건 향상에 기여함은 물론 농가소득의 증진과 더불어 국산 식물자원의 개발 및 응용을 통하여 국가 경쟁력 향상에 크게 기여할 수 있는 기술의 개발을 이루고자 한다.

기능성 소재로서의 활용가치가 큰 팔손이나무 활용 기술의 개발은 다양한 부위에 대한 새로운 소재원의 발굴과 같은 이용 방안의 증진과 함께 국내 산림 자원의 보호라는 중요한 가치를 지니고 있다.

따라서 본 과제는 3년 동안의 중기적 연구를 수행함으로써 국내 자생 팔손이나무의 활성 물질 수율 증진, 대량 생산 공정의 확립과 제품화를 위한 유용 활성 유지가 가능한 대량 배양 기술의 확립 및 유용 성분들의 분리·정제와 새로운 생리 활성 및 기능들에 대한 보다 종합적이고 체계적인 연구를 진행하여 새로운 기능성 식품 및 생물 의약품 소재화 기술을 개발하고, 또한 국내 자생 수목자원의 보존을 위한 paradigm을 불러일으킬 수 있는 새로운 형태의 연구 개발을 이룩하고자 한다.

1차 연도에는 팔손이의 부위별 채취 및 용매 추출 방법을 결정하고 활성 물질의 분리·정제 공정을 통해 국내 팔손이 활성 성분들의 Data-base 구축을 위한 기초를 확립한다. 또 무균 배양조건을 조사·확립하고, 팔손이 활성 성분의 소재화 적성 검토를 실시하였다.

2차 연도에는 1차년도의 팔손이 활성 성분의 소재화 적성 검토를 통해 이의 활성 물질을 결정하였고 이를 바탕으로 차기 연도에는 활성이 있다고 판단되는 대상 활성 성분의 추출 및 수율증진 기술을 확립하고, 대량 배양을 위한 기초 배양 실험을 통해 배양 공정의 scale-up 및 최적화 기반을 마련한다. 또한 활성 물질의 *in vitro* 및 *iv vivo* 실험을 수행하고, 팔손이의 농가 계약 재배를 위한 유기적 협조 구축 및 제품화 기초를 확립하였다.

3차 연도에는 팔손이로부터 생산된 활성 물질을 활용한 기능성 식·의약품 소재화 공정 또는 식품 생산을 위한 제품화 공정을 확립하고, 유용 성분의 유지가 가능한 대량 배양기술을 최종적으로 최적화하여 결정 공정에 따른 시제품 및 개발 공정들의 경제적 타당성을 연구 검토해 팔손이 산업화의 초석을 마련하고, 팔손이를 이용한 기능성 식품 및 생물 의약품의 제품화와 판매 기반을 확보하였다.

국내 · 외 기술개발 현황

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

지금까지 국내·외적으로 가시오가피나 오가피나무에 대한 연구에 비해 국산 자생 팔손이의 재배, 산지 분포, 육종, 보존 및 유용 물질의 활용 등 전반적으로 팔손이나마 자체에 대한 연구는 극히 미진한 실정이다.

더욱이 국내 자생하거나 재배 가능한 수목 자원들에 대한 자료나 Data-base화는 지극히 원시적인 수준이다. 수목자원을 이용한 활용 연구는 향나무나, 노간주나무, 가시오가피나무 등과 같이 극히 제한적인 수종을 대상으로 이들 성분 분석 등에 관한 초보적인 연구가 이루어졌을 뿐 극히 미미한 것이 사실이다. 특히 우리나라와 같이 산지가 70% 이상을 차지하고 이에 따른 다양한 산림 자원 특히 수목자원이 풍부함에도 불구하고 이런 산림 자원의 활용성 증진에 관한 연구가 극히 미진한 것은 그 가능성을 생각할 때 매우 안타까운 현실이다.

또한 최근의 기능성 식품 및 소재에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있으나 대부분이 임산자원의 용매 추출물들의 활성을 검증하는 것으로 새로운 소재 개발의 한계에 직면하고 있다.

국내의 경우 팔손이나마의 활용 및 보존을 위한 대체성 연구는 전무한 실정이며, 외국의 경우 팔손이나마에 존재하는 몇가지 물질에 대한 보고는 있으나 이들의 활용 및 유용 생리 활성에 대한 연구는 극히 미진한 상황이다.

초분류에 대한 캘러스 확립 및 배양에 관한 연구는 전세계적으로도 많이 진행되어있으나 수목류에 대한 캘러스 확립 및 이들의 배양을 통한 활용에 관한 연구 역시 미약한 실정이다.

더욱이 팔손이의 보존을 위한 육종 연구는 전무한 실정으로 이 같은 상황에서 팔손이나마의 유용성만을 강조하는 연구 결과를 도출 할 경우 자생하는 산림 자원의 고갈은 너무나 자명한 상황 이다. 하지만 국내에서는 이 같은 유용 자원의 보존 및 활용을 동시에 추구할 수 있는 연구 형태는 거의 찾아볼 수 없다.

이 같이 자생 팔손이의 배양 및 육종에 대한 연구가 미진해 이들 원료의 대량 공급을 위해

서는 재배 기술 연구 및 재배 농가의 육성, 기내 배양 연구가 요구된다.

또한 수목자원을 통한 유용 물질의 기능성 소재화(식품, 의약품, 화장품 등)를 위한 공정 연구역시 매우 취약하여, 이와 함께 이 수목자원을 이용해 부가 가치를 증진시킬 수 있는 생리 활성 물질 탐색 및 가공 기술 역시 절실히 요구된다.

더욱이 well-being이라는 시대적 흐름과 맞물려 건강식품에 대한 관심과 소비가 급속히 증가하고 있는 시점에서 소비자의 요구에 부응할 수 있는 새로운 제품 및 판매 전략의 개발이 필요하다. 이에 수목자원을 활용한 제품들은 다른 농산물 제품들과 달리 단순한 가공 공정을 거치면서도 부가가치가 높은 소재이며, 소비 대상도 안정적 심리를 구축한 중·상류 계층으로 지속적 소비가 가능하리라 판단되었다.

현재 국내 건강식품 시장은 약 3조원, 세계적으로는 약 3,000억불 규모로 고령화 사회 진입에 따른 삶의 질 향상 욕구가 증가함에 따라 건강기능성 식품에 대한 소비자 수요는 점차 급증할 것으로 예상되며, 이러한 기능성 식품 시장에서 경쟁력을 갖기 위해서는 새로운 기능성 소재의 발굴 및 가공, 제품화 기술의 개발을 통한 차별화 전략이 요구된다.

따라서 본 연구와 같이 팔손이의 보존을 근간으로 하면서 유용 성분의 활용 연구를 병행하는 형태만이 궁극적으로 국내 자생 임산 자원들의 보존 및 이들의 활용을 통한 부가 가치 창출을 동시에 이룰 수 있는 win-win 전략 연구이며, 향후 임산 자원의 연구에 대한 새로운 paradigm을 제시하는 중요한 선례로 평가될 것이다.

환경 지향적인 농업의 대표적 표준 산업으로 농업 분야의 새로운 이미지 부각에 매우 중요한 역할을 담당할 수 있을 뿐 아니라 지금까지 다양한 매스컴을 통해 한약 및 건강식품에 대한 부정적 혹은 긍정적 사례들이 나타나고 있어 일반 소비자들이 자연 및 건강식품에 대한 중요성, 필요성 및 이해도는 높아졌으나, 너무나 많은 부분에서 접함으로써 이들에 대한 혼동과 냉소적 경향이 강해지고 있는 현재의 현상을 쇄신시키는 데 큰 몫을 할 것으로 예상되며, 이로서 본 대상 수목자원의 재배 농가 및 가공 업체들의 수익 및 위상이 급속도로 향상되는 결과를 얻을 수 있을 것으로 예측된다.

이 기술이 상용화되면 국내의 임산자원을 이용한 기술 및 산업에 일대 변혁이 예상되며, 임산 자원의 고갈을 막음과 동시에 수목자원이 새로운 소득 작목으로 부상해 지금까지의 단순 가공을 넘어 진정한 의미의 기능성 식품 또는 식·의약품 소재 개발의 시초가 될 것이다. 본 연구의 성공은 기존의 임산물을 이용한 기능성 식품 개발로부터 얻을 수 있는 경제적 파급효과 수 십 배에 달하는 결과를 얻을 수 있을 것이다. 특히 이 같은 제품 및 기술 개발은 다른 식·의약품 공정 개발들에 비해 그 성공 가능성이 매우 높으며, 본 연구 결과로 생산되는 시제품은 지금 소비자들이 요구하는 새로운 형태의 기능성 제품 수요에 절대적으로 부응하는 것으로 성공 기대치가 매우 높다.

연구개발수행 내용 및 결과

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 추출 용매에 따른 팔손이나무의 추출 공정

1. 실험내용

가. 추출 용매에 따른 팔손이나무의 추출 공정

1) 각 부위의 용매별 추출 방법

팔손이나무의 수피, 잎, 열매, 꽃을 부위 별로 세척한 후에 25~30℃로 음건한 후에 100~150 mesh로 분쇄한 후 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대한 10배의 증류수와 ethyl alcohol, 증류수와 ethyl alcohol을 1 : 1의 비율로 혼합한 추출용매를 사용하여 ethyl alcohol 65℃, 증류수 95℃, 증류수와 ethyl alcohol 70℃에서 12시간 동안 2회 반복 추출 후 감압여과장치로 여과하고, 감압농축 후 동결건조 한 뒤에 각각의 수율을 계산하였다.

2) 팔손이 근피의 에탄올 용매를 이용한 다단계 추출 방법

팔손이 근피를 세척한 뒤 25~30℃ 정도에서 음건한 후 100~150 mesh정도로 분쇄하였다. 시료인 팔손이 근피의 중량에 10배수의 에탄올 추출 용매로 추출 flask를 이용하여 실온(20~25℃)에서 12시간 침지를 한 후에 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask를 이용하여 에탄올의 비등점보다 낮은 온도인 35~45℃에서 12시간 동안 추출을 통해 1차 추출을 한 후 20~25℃의 수온에 추출 flask를 담가 냉각시킨다. 추출 flask내 시료와 용매의 온도가 실온(25~25℃)이 되면 다시 12시간 동안 침지를 실시하고 1차 추출온도보다 높은 55~65℃에서 12시간 동안 2차 추출을 하였다. 얻어진 추출물은 감압 여과장치로 여과하여 40~50℃에서 감압 농축 하였다. 이의 방법으로 얻어진 농축 물들은 동결 건조하여 추출물로 하였다.

3) 팔손이 근피의 열수를 이용한 다단계 추출 방법

팔손이 근피를 세척한 뒤 25~30℃ 정도에서 음건한 후 100~150 mesh 정도로 분쇄하였다. 시료인 팔손이 근피의 중량에 10배수의 물을 추출 용매로 추출 flask를 이용하여 실온(20~25℃)에서 12시간 침지를 한 후에 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask를 이용하여 물의 비등점보다 낮은 온도인 65~75℃에서 12시간 동안 추출을 통해 1차 추출을 한 후 20~25℃의 수온에 추출 flask를 담가 냉각시킨다. 추출 flask내 시료와 용매의 온도가 실온(25~25℃)이 되면 다시 12시간 동안 침지를 실시하고 1차 추출온도보다 높은 85~95℃에서 12시간 동안 2차 추출을 하였다. 얻어진 추출물은 감압 여과장치로 여과하여 60~70℃에서 감압 농축 하였다. 이의 방법으로 얻어진 농축 물들은 동결 건조하여 추출물로 하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 각 부위의 용매별 추출물의 수율

팔손이나무의 추출 수율은 부위와 추출 용매에 따라 차이를 보였다. 에탄올과 증류수의 1:1 혼합 용매를 사용한 잎의 추출물이 15.5% 로 가장 높은 추출 수율을 보였고 각 부위별로는 잎, 수피, 근피, 목부 순의 추출 수율을 나타내었으며 잎은 모든 용매에서 다른 부위보다 높은 수율을 나타내었다. 특히 에탄올 추출물이 증류수와 에탄올을 1:1로 혼합한 용매와 증류수의 추출 수율보다 최대 3배수 정도 낮게 나타났다. 따라서 추출 용매의 선택에 있어서 증류수의 활용 가치가 높음을 알 수 있었다.

Table 1. Comparison of extraction yields of *Fatsia japonica* by several extract solvent- distilled water and ethanol and distilled water : ethanol (1:1, v/v)

Sample	Solvent	수율(%)
Roots	distilled water	12.68
	water : ethanol (1:1,v/v)	13.3
	ethanol	4.62
Stems	distilled water	13.86
	water : ethanol (1:1,v/v)	10.64
	ethanol	5.76
Leaves	distilled water	12.88
	water : ethanol (1:1,v/v)	15.50
	ethanol	8.43
Barks	distilled water	5.77
	water : ethanol (1:1,v/v)	5.97
	ethanol	3.43

2) 팔손이 근피의 열수 및 에탄올 용매를 이용한 다단계 추출물의 수율

팔손이 근피의 용매별 추출 수율은 Table 2.에 나타내었다. 에탄올 추출물과 물 추출물중 물의 추출 수율이 약 2.7배 정도 높게 나타났다. 이는 Table 1.에서 근피의 에탄올 추출물과 물 추출물이 각각 4.62 와 12.68% 보다 높은 수율이며 온도와 침지를 통한 다단계 추출은 팔손이 근피의 추출 수율을 향상시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 이는 추후 팔손이 추출물의 산업화에 있어서 효율적인 추출공정으로 사료된다.

Table 2. Comparison of extraction yields of *Fatsia japonica* by extracts of various phases and several extract solvent - ethanol and water

Sample	Solvent	Yield (%)
Roots of <i>Fatsia japonica</i>	ethanol	6.3
	water	15.6

제 2 절 팔손이나무 추출물의 생리활성 탐색

1. 실험내용

가. 암세포의 생육 억제 및 세포 독성 측정

1) 세포주 및 배지조성

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 간암세포인 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 폐세포인 HEL299(Lung nomal, Human)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포들 중 Hep3B, MCF7은 DMEM배지를 HEL299는 RPMI 1640배지에서 10% heating -inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 적응시켜 배양하였다.

2) SRB assay

SRB (sulforhodamine B)assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF7(10% FB DMEM배지)의 농도를 $4\sim5\times 10^4$ cell/ml로 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(tri chloroacetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 보라색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEL299(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 $100\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양한 후, $100\ \mu\text{l}$ 의 MTT(50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO $900\ \mu\text{l}$ 를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 $100\ \mu\text{l}$ 씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Selectivity(암세포 선택적 사멸도) 측정

MTT assay를 이용하여 정상 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, 또한 SRB assay를 이용하여 각 암 세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \text{암세포 생육 억제 활성} / \text{정상 세포에 대한 세포 독성}$$

나. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT assay로 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)assay는 생세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 면역 세포인 Jurkat과 Raji(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml로 $100\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, $100\ \mu\text{l}$ 의 MTT($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 용액을 첨가하여 4시

간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100 μ l씩 취하여 96well plate에 옮긴 다음 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 Chemicon(USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 100 μ l씩 첨가하여 다시 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준 곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

다. NK 세포의 면역증진효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum(FBS)와 12.5% horse serum(Myelocult)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24well plate에 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 900 μ l씩 분주하고 24시간 후 상층액을 각 plate에 100 μ l씩 투여하여 배양 48시간 후 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정하였다.

라. 세포 분화도 측정

세포 분화 측정에 사용된 세포주는 인간 전과립 세포(human promyelocytes; HL60)를 사용하였고 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며 RPMI 1640배지에 10% heat inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 36.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포분화의 정량적인 수치를 측정하기 위해 세포의 농도가 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 포함된 배지를 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Sample을 농도별로 100 μ l씩 첨가하여 24시간 다시 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 배양하면서 배지를 pipetting 하여 15ml C-Tube에 옮겨 320 xg에서 10분간 원심분리 하였다. 배지를 제거한 후 0.1%

Triton x-100을 200 μl 씩 첨가한 후 incubator에서 30분간 용해하였다. 용해된 solution 20 μl 를 96 well plate에 옮긴 후 3 mg/ μl 의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer(pH 5.0)를 100 μl 씩 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰으며 반응 정지를 위해 0.1N NaOH 100 μl 를 첨가한 후 ELISA Leader로 504 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정

세포의 팔손이 추출물에 대한 세포의 대사(산화)활성도의 영향을 측정하기 위하여 Microphysiometer (Molecular Devices, USA)를 사용하였다. Microphysiometer는 약물에 대한 세포의 산도변화를 측정하는 장비로 1회용 capsule 안쪽의 다공성 여과 막 사이에 세포를 놓고 관심대상의 약물을 cell chamber안에 유입시키면서 제한된 시간 내에 배양한다. 이때 세포의 대사활성도의 변화는 산성물질의 방출속도 변화의 결과를 반영하며, 이 신호를 silicon sensor는 전기신호로 바꾸어 해석한다. 한편, 약물에 대한 세포의 영향을 측정하는 일반적인 방법인 MTT assay나 SRB assay는 측정에 소요되는 시간이 3일 정도가 걸리나 Microphysiometer로 측정하면 약물투여 후 세포의 변화를 초(sec)단위 혹은 분(min) 단위로 곧바로 나타내기 때문에 시간절약 면에서 효율적이며, 3일 동안 일어날 수 있는 세포오염이나 세포 염색을 하기 전 상등액 제거 시에 세포의 유실에서 오는 실험오차도 극복할 수 있어서 보다 정확한 실험결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 실험 값은 실시간으로 컴퓨터 화면에 나타나는 장점이 있다. 그래서 Microphysiometer의 측정을 통해 MTT assay나 SRB assay를 측정할 때 비교 값으로 사용된다.

따라서, Microphysiometer의 측정은 본 논문에서 항암 활성 및 면역증강, 신경세포의 일반적인 측정 결과와 비교되었고, 세포에 대한 팔손이 추출물의 시간별 활성도 변화를 측정하였다.

1) 측정조건

Pump cycle은 total cycle time이 2분으로 하여 최종 측정되는 시간(start slope measurement(1min 28sec) → stop slope measurement (1min 58sec))은 30초로 하였다. 그리고 측정된 수치의 표시는 약물투여 전에 running buffer만을 흘려보내면서 측정된 값이 일정하게 유지되어지는 임의의 선으로 baseline을 설정하고 이것을 100%로 하여 이 baseline값에

대한 %로 표현하였다.

2) 접착성 세포의 측정

Adherent cell은 실험 1일전, capsule에 옮겨 안정화시켰다. Plate속에 있는 capsule cup에 3×10^5 cells/ml의 농도로 세포를 투여하여 27°C, 5% CO₂의 incubator에서 24시간 안정화시킨 다음 측정할 때 spacer, insert를 차례로 넣은 후, plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정한다. 이때 running buffer는 세포의 growth medium으로 하였으며, 본 실험에서는 인간 폐암세포인 AGS(stomach adenocarcinoma, human) 와 신경세포주인 PC12(Pheochromocytoma) 를 이용했으며 running buffer로 RPMI 1640배지를 사용하였다.

3) 부유성 세포의 측정

Non-adherent cell은 측정시 세포가 고정되지 않아 agarose로 고정을 시켜 측정하였다. Beaker속 20 ml 증류수를 70°C 이상에서 hot plate를 이용하여 가열(microwave, Heating block등도 사용)하여 agarose가 녹을 때까지 약 2분간 Agarouse Vial을 물 속에 넣는다. Vial을 37°C water bath 나 Incubator에 옮기고, 세포용액을 모아서 centrifugation을 하여 부유물을 제거하고 난 후에 세포를 5×10^6 cell/ml의 농도로 만든 다음 이 세포액과 agarouse를 3 : 1로 혼합하여 10 μ l 만 capsule cup에 넣고 굳힌 다음, 마른 capsule cup에 spacer와 Insert를 넣어 측정할 때 plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정하였다. 본 실험에서 측정된 세포로는 인간 면역세포인 T cell(Jurkat)을 이용하였고, running buffer로 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

바. 간기능 관련 생리 활성측정(해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)

정유의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST

(glutathion-S-transferase)의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4-dinitro benzene을 첨가한 후 다시 37°C에서 2분간 반응시켰다. 반응후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리한 후 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤 다음과 같이 GST의 specific activity와 활성률을 계산하였다.

$$\text{Total activity (units)} = (A_{340}/9.6) \times \text{희석배수} \times (3\text{ml}/0.1) \times \text{crude extract(ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/ml protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

사. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL)

→ Hippuric acid(고혈압 유발) + His-Leu Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

증류수에 50 μl (또는 시료)에 Hip-His-Leu 100 μl 를 첨가하여 37°C에서 5분간 방치한다 (Blank를 만들기 위해 1N HCl 0.25 ml를 첨가한 test tube 2개를 준비). ACE 효소액 150 μl 첨가 후 37°C에서 1시간 방치한다. 1N HCl 0.25 ml 첨가하여 반응을 정지시킨다. Ethyl acetate 3 ml를 첨가한 후 15초간 잘 섞은 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액 1 ml를 취한다. Oil bath 140°C에서 15분간 건조한 후 1M NaCl 3 ml를 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$E_c - E_s$$

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\frac{\text{-----}}{\text{-----}})] \times 100$$

$$E_c - E_b$$

E_c : 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도

E_s : 시료 첨가시의 흡광도

E_b : 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

아. α -glucosidase 억제 기능 탐색

생체 내에서 혈당 상승의 결정적인 역할을 하는 α -glucosidase를 이용하여 실험을 수행하였다. 먼저 효소를 10 mM PIPES buffer에 용해시켜 효소액을 제조하고 20 mM maltose와 각 추출물을 농도별로 혼합한 후 37°C에서 20분간 배양한다. 반응액 60 μ l에 1 ml DNS 시약을 첨가하고 100°C 물에서 열탕 처리(10 min)하여 반응을 정지시킨 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 반응으로 생성된 환원당을 정량하여 각 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소활성 저해율을 계산하였다.

자. *in vivo* 항암 실험 (S-180 복수암의 항암효과 실험)

실험동물은 20~25 g의 ICR계 자성 마우스를 대한 바이오링크로부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 학과의 동물사육실에서 2주 이상 적응시켰다. 사육환경은 명암을 12시간으로 자동 조절하였으며 온도는 22±3°C, 습도는 50±14%로 유지하였고 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며 사료는 제일제당(주)의 사료를 급식하였으며 세포주는 Sarcoma 180(ATCC : CCL 8, USA)을 사용하였다. 10% FBS를 함유한 RPMI 1640의 기본배지에서 배양된 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 배양 flask로부터 떼어낸 후 2×10⁶ cells/mouse의 농도로 하여 50~200 μ l 정도 복강에 1 ml syringe를 이용하여 피하이식 하였고 시료는 종양세포 이식 후, 3~6일 동안 정해진 급여량(50~100 mg/kg)을 나누어 사료에 혼합하여 급식하도록 하였다. 암세포의 접종일로부터 20일간 mouse의 체중을 매 2일마다 측정하였으며, 50일까지 생존일을 관찰하여 생존율(survival rate)을 계산하였다. 실험군은 다음과 같이 복수암을 유발시키지 않고 사료만 먹인 group(no treated group), 복수암 유발 후 사료만 먹인 group(control group), 복수암 유발 후 sample을 먹인 group(treated samples group)의 3가지 군으로 분리하여 실험을 수행하였다.

$$\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{Mean survival days of treated mice}}{\text{Mean survival days of control mice}} \times 100$$

차. 마우스를 통한 항스트레스 효과 측정

실험동물은 20~25 g의 ICR계 자성 마우스를 중앙실험동물로부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 학과의 동물사육실에서 2주 이상 적응시켰다. 사육환경은 명암을 12시간으로 자동 조절하였으며 온도는 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\pm 14\%$ 로 유지하였고 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며 사료는 삼양사(주)의 사료를 급식하였으며 성숙한 마우스의 평균 체중 25 g을 기준으로 하여 사료의 평균 섭취량인 5 g과 그의 1/100의 양의 시료와 함께 혼합하여 실험기간동안 급식하였다.

스트레스의 부과는 3가지의 군으로 나누었으며 Cold Water Swimming Stress는 $30\times 40\times 30\text{ cm}^3$ 직육면체의 플라스틱 수조에 수심이 6 cm가 되도록 하였고, 물의 온도는 $11\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 조절하였고 4일 동안 각 5분의 저온에서 수영을 시켜 스트레스를 부과하였다. 또한 Cold Stress는 4°C 의 저온실에서 연속되는 4일동안 첫날은 4시간, 두번째날은 8시간, 세번째날은 12시간, 네번째날은 24시간동안 방치하였다. 마지막으로 Hot Stress는 37°C 가 유지되는 항온기에 4일 동안 각 15분간 노출시켰다. 각 군의 시료의 투여는 스트레스를 부과하기 1시간에 시료를 혼합한 사료를 급식하였으며 마지막 급식 및 스트레스 부과 24시간후에 혈액을 채취 후 마우스를 희생하여 측정항목을 측정하였다.

혈액의 채취 및 분석을 위해서는 최종 급식 및 스트레스 부과 24시간 후에 각 군별로 capillary tube를 이용한 안와정맥총 채혈법을 이용하여 1.5 ml의 혈액을 얻고 약 30분 동안 방치시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리 후에 상등액인 혈청을 분리하여 DT Slides(Johnson&Johnson, Co.)에 점적 후 혈액생화학분석기를 이용하여 스트레스와 관련이 있다고 생각되는 Cholesterol(CHOL)과 Glucose(GLU)를 선정하여 스트레스 지표로서 사용가능성을 평가하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 암세포의 생육 억제 활성 및 세포 독성측정 결과

1) 세포독성

Table 3.는 인간 정상 폐 세포인 HEL 299에 대한 세포독성효과를 나타낸 것이다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였고 특히 잎의 에탄올 추출물의 농도 1g/L에서 약 21.2% 로 가장 높은 세포 독성을 나타내었다. 용매에 따른 각 추출물들의 세포 독성의 변화를 살펴보면 에탄올을 이용한 추출물들이 다른 용매보다 세포독성이 높게 나타났으며 또한 농도에 따른 세포 독성의 변화량이 완만한 것으로 나타났다.

Table 3. Cytotoxicity of several extracts from *Fatsia japonica* on the human normal cell, HEL299 - solvents of ethanol, water and ethanol:water(1:1, v/v)

Solvent	Sample	Concentration (g/L)				
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Ethanol	Roots	14.3	16.4	16.8	18.2	22.6
	Stems	12.6	13.2	14.1	15.9	16.6
	Leaves	13.4	15.1	15.6	17.8	21.2
	Barks	9.4	11.2	12.6	14.4	15.9
Water	Roots	13.7	15.5	16.2	18.6	19.2
	Stems	10.4	13.7	14.2	17.6	21.1
	Leaves	10.1	13.2	16.4	18.1	20.2
	Barks	9.2	10.8	12.4	13.6	14.2
Water : Ethanol (1:1)	Roots	12.8	13.1	15.8	17.2	17.9
	Stems	10.9	11.2	14.4	15.3	18.6
	Leaves	12.8	13.4	15.2	17.6	18.5
	Barks	10.2	12.1	13.7	14.6	15.2

2) 암세포 생육 억제 활성

가) 유방암 세포의 생육 억제 및 선택적 사멸도

Fig. 1~3.과 Table 4.은 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하여 항암 활성도를 살펴보고 농도 1 g/L에서는 잎의 에탄올 추출물이 72%로 가장 높게 나타났으며 용매에 따른 항암 활성도를 살펴본 결과 에탄올 추출물의 활성이 물과 에탄올을 1:1로 혼합사용한 것과 물을 용매로 사용하여 추출한 시료보다 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 세포 선택성에서는 세가지 용매를 이용한 추출물이 모두 0.4 g/L 이상에서 1.5 이상의 세포 선택성을 보였으며 농도의 증가에 따라 세포 선택성도 증가하는 것을 알 수 있었다. 목부의 에탄올 추출물은 농도 1.0 g/L에서 가장 높은 선택성(약 4.0)을 보였으나 항암 활성도 면에서는 다른 추출물보다 낮은 수치를 보이고 있다. 그러나 물과 에탄올을 1:1로 혼합하여 사용한 근피 추출물은 항암 활성도에서 다른 추출물과 비교하여 높은 수치(65%)를 보이고 세포 선택성 또한 다른 추출물에 비교하여 높은 수치(3.8)를 보이고 있음을 알 수 있었다.

Table 4. Inhibition ratio of growth of MCF and selectivity in adding several solvents extracts from *Fatsia japonica* - solvents of ethanol, water and ethanol:water(1:1, v/v)

Solvent	Sample	Concentration (g/L)									
		Inhibition ratio (%)					Selectivity				
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Ethanol	Roots	18.3	36.2	42.3	58.6	73.5	1.28	2.21	2.52	3.22	3.27
	Stems	16.4	37.6	40.7	55.6	62.3	1.30	2.85	2.89	3.50	3.75
	Leaves	9.3	28.2	39.1	48.5	53.2	0.69	1.87	2.51	2.72	2.51
	Barks	11.4	24.2	37.7	42.3	50.0	1.21	2.16	2.99	2.94	3.14
Water	Roots	15.3	27.3	35.3	46.9	57.7	1.12	1.76	2.18	2.52	3.01
	Stems	12.6	21.8	38.2	46.5	54.8	1.21	1.59	2.69	2.64	2.60
	Leaves	13.3	25.7	33.1	43.5	57.7	1.32	1.95	2.02	2.40	2.86
	Barks	14.4	17.6	22.4	26.2	30.6	1.57	1.63	1.81	1.93	2.14
Water : Ethanol (1:1)	Roots	19.3	35.3	40.1	19.7	66.1	1.51	2.71	2.54	2.89	3.69
	Stems	15.4	33.6	37.2	51.6	61.4	1.41	3.00	2.58	3.37	3.30
	Leaves	12.4	29.4	41.9	58.8	63.6	0.97	2.19	2.76	3.34	3.44
	Barks	11.2	28.3	38.7	40.1	53.1	1.10	2.34	2.82	2.75	3.49

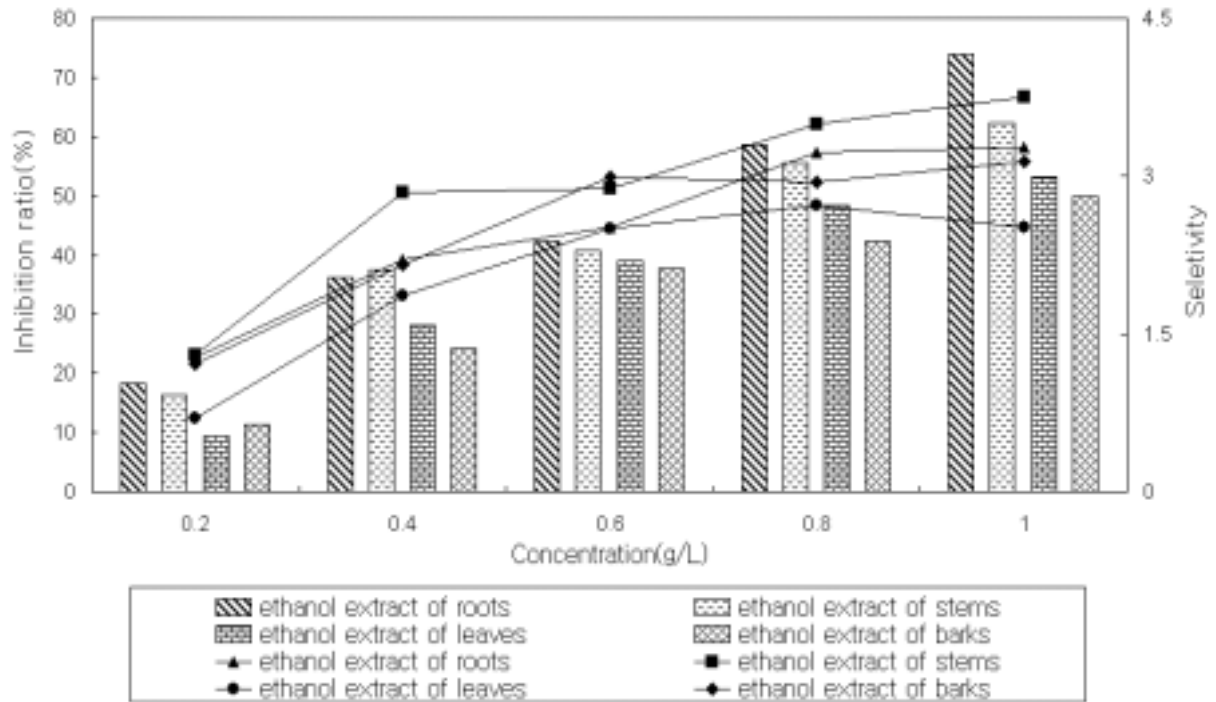


Fig. 1. Inhibition ratio of growth of MCF7(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the ethanol extracts from *Fatsia japonica*

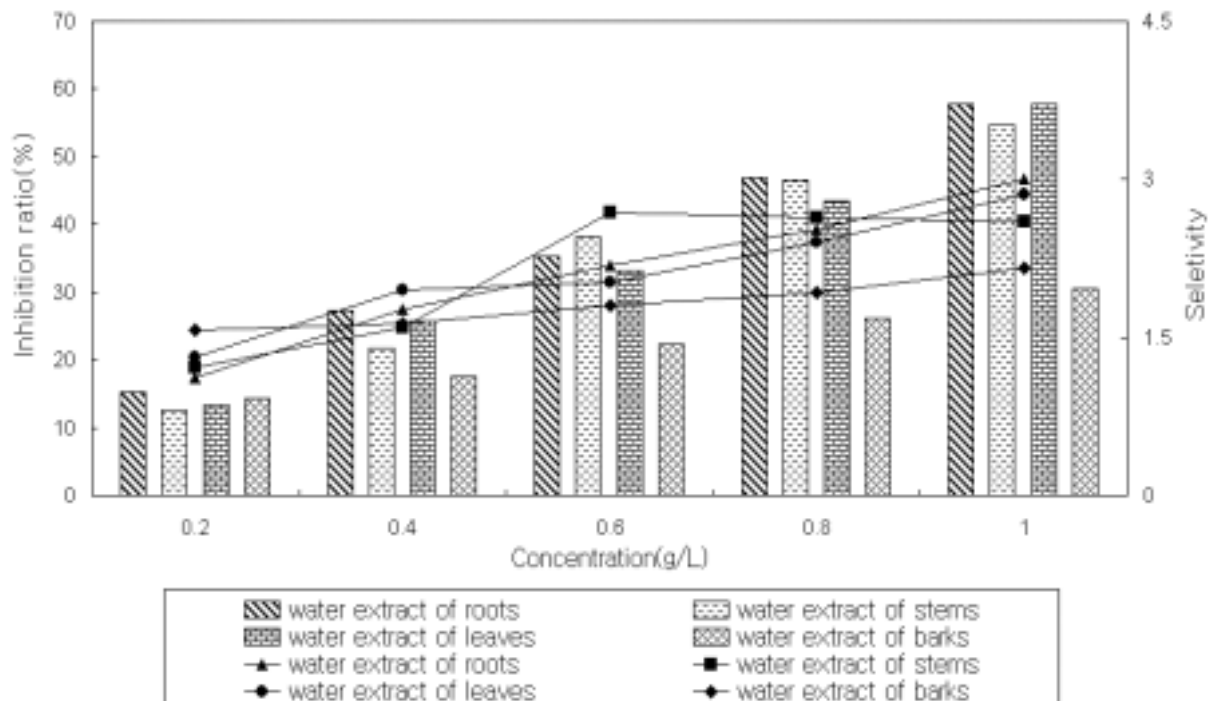


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of MCF7(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the water extracts from *Fatsia japonica*

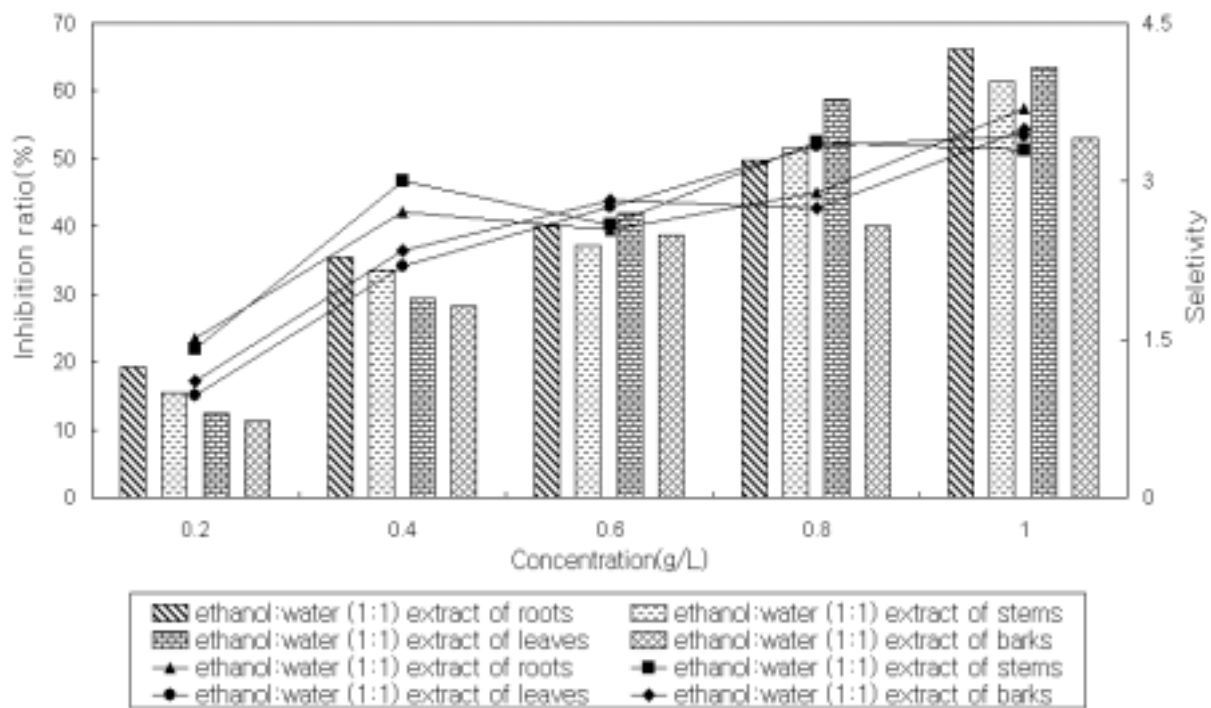


Fig. 3. Inhibition ratio of growth of MCF7(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the ethanol:water(1:1, v/v) extracts from *Fatsia japonica*

나) 간암 세포의 생육 억제 및 선택적 사멸도

Fig. 4~6.과 Table 5.는 간암세포인 Hep3B(Hepatocellular carcinoma, Human)을 이용하여 팔손이 조추출물의 항암활성을 측정된 그림이다. 앞선 결과들과 마찬가지로 근피 추출물들이 항암활성에서 뛰어난 활성을 보이고 있다. 근피의 물 추출물은 1.0 g/L의 농도에서 약 50%의 항암 활성을 보이고 있으며 세포 선택성 역시 다른 추출물과 비교하여 가장 높은 수치 (약 2.6)를 보이고 있다.

Table 5. Inhibition ratio of growth of Hep3B and selectivity in adding several solvents extracts from *Fatsia japonica* - solvents of ethanol, water and ethanol:water(1:1, v/v)

Solvent	Sample	Concentration (g/L)									
		Inhibition ratio(%)					Selectivity				
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Ethanol	Roots	10.3	16.6	20.6	24.0	27.3	0.70	1.02	1.23	1.32	1.21
	Stems	3.9	5.3	6.6	7.2	14.5	0.31	0.40	0.47	0.46	0.87
	Leaves	1.9	5.9	11.3	16.6	21.2	0.15	0.40	0.72	0.93	0.99
	Barks	3.9	6.5	9.2	12.4	15.7	0.42	0.58	0.73	0.86	0.99
	Roots	12.3	22.4	29.7	34.1	49.1	0.88	1.42	1.80	1.83	2.55
Water	Stems	7.8	16.7	21.6	28.4	39.2	0.75	1.22	1.52	1.62	1.86
	Leaves	5.9	10.9	14.9	19.8	23.8	0.59	0.83	0.91	1.09	1.18
	Barks	4.8	5.8	7.7	10.6	16.3	0.52	0.53	0.62	0.78	1.15
Water : Ethanol (1:1)	Roots	9.9	14.6	16.4	25.2	26.5	0.78	1.11	1.04	1.46	1.48
	Stems	3.2	7.8	9.2	16.3	20.3	0.30	1.11	1.05	1.46	1.48
	Leaves	2.2	6.3	9.5	13.3	17.1	0.25	0.47	0.62	0.76	0.92
	Barks	0.6	2.0	4.7	8.2	10.2	0.07	0.17	0.34	0.55	0.66

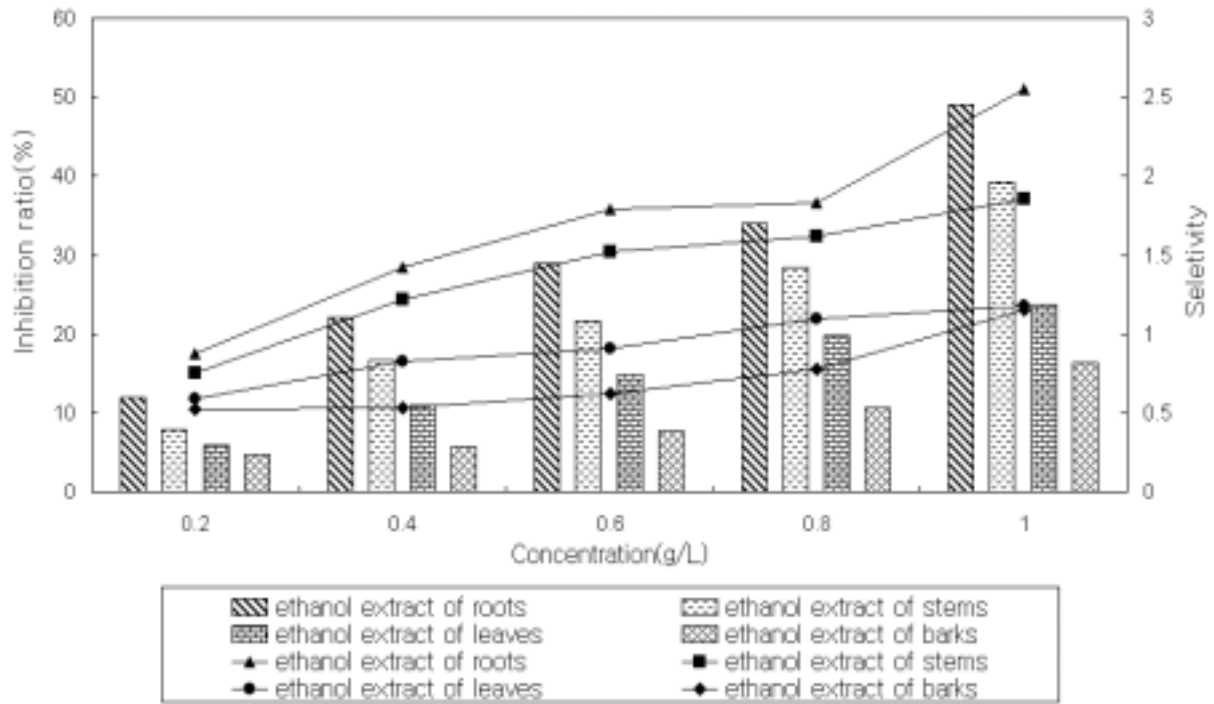


Fig. 4. Inhibition ratio of growth of Hep3B(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the ethanol extracts from *Fatsia japonica*

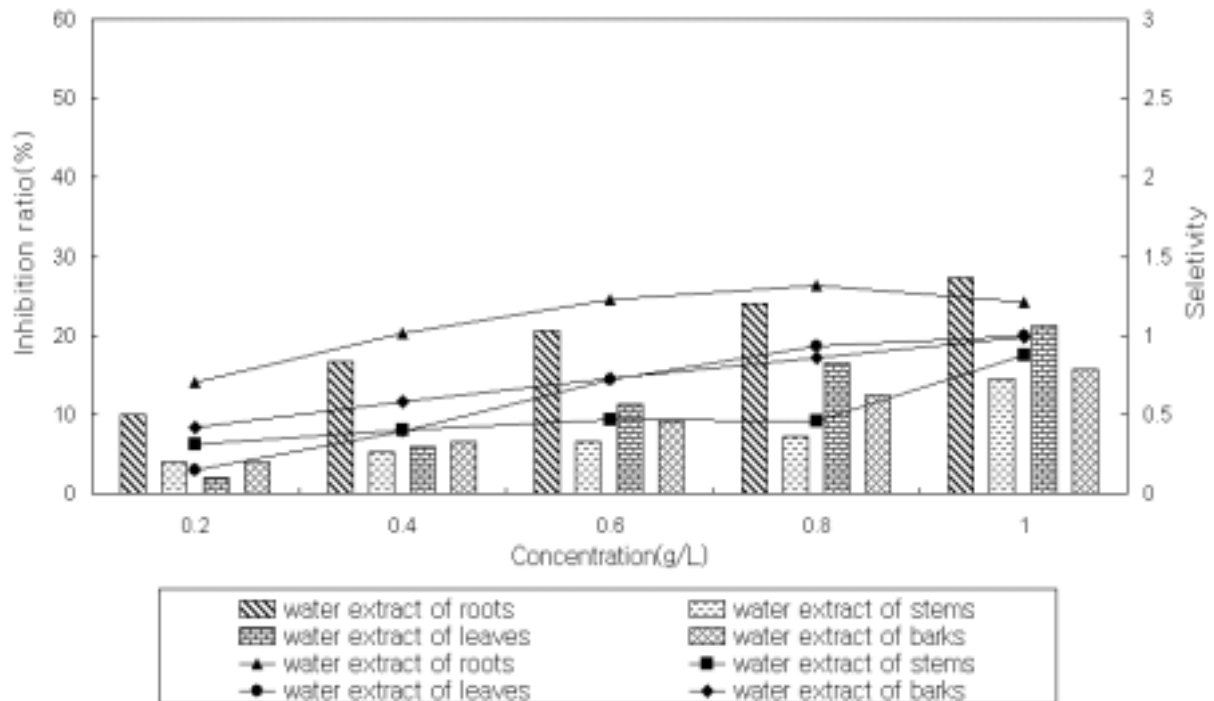


Fig. 5. Inhibition ratio of growth of Hep3B(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the water extracts from *Fatsia japonica*

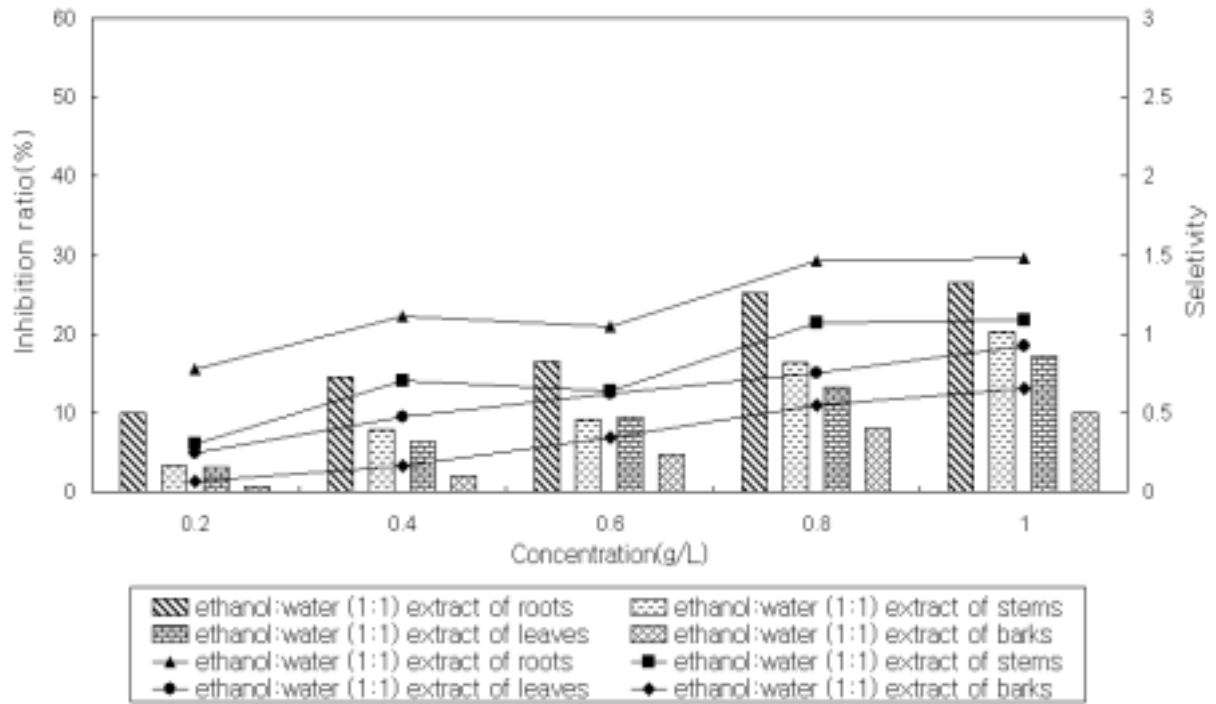


Fig. 6. Inhibition ratio of growth of Hep3B(bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the ethanol:water(1:1, v/v) extracts from *Fatsia japonica*

나. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정 결과

1) 면역 세포의 생육 촉진 및 활성화 실험

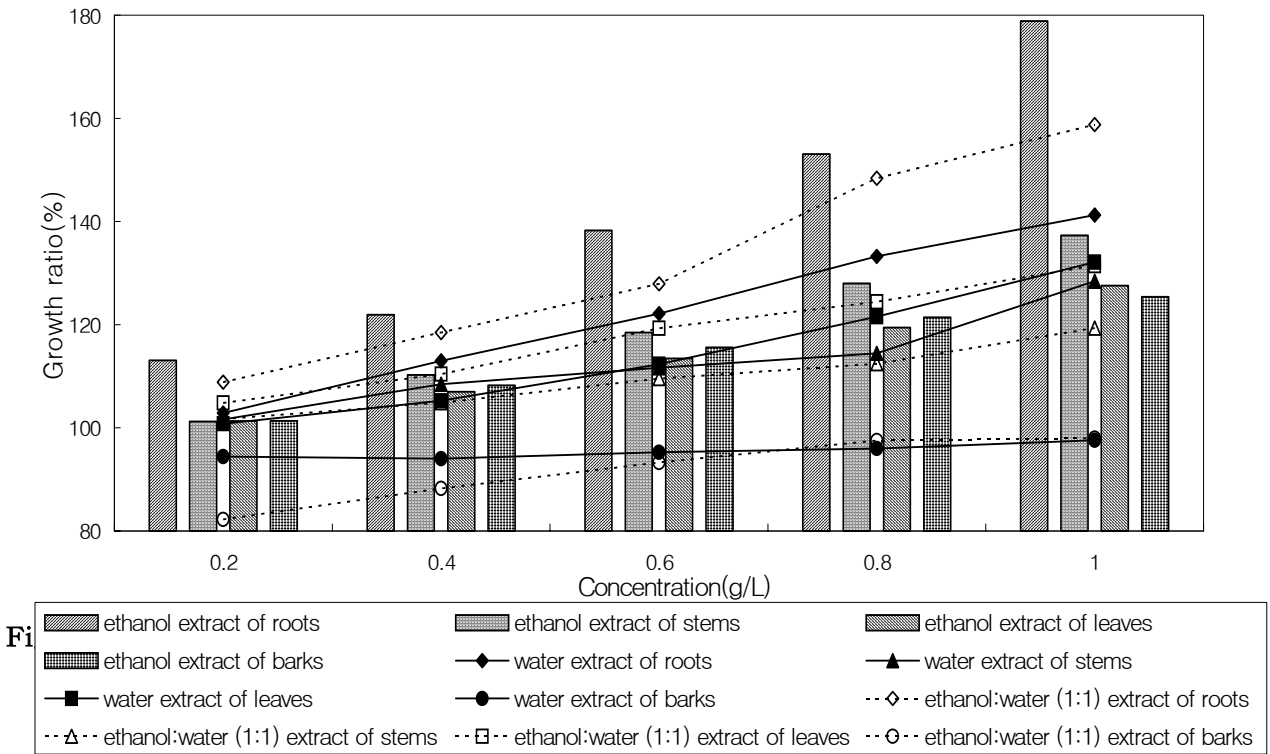
면역체계에 중요한 역할을 하는 면역세포인 인간 면역 T세포와 B세포를 이용하였고 면역 세포의 생육 촉진을 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L로 조절하여 실험하였으며 각각의 실험결과는 다음과 같다.

Fig. 7~8는 각각 T세포와 B세포의 면역 세포의 생육 촉진을 나타내었다. 근피와 수피의 추출물이 가장 높은 면역 증진을 보여주고 있으며 T세포와 B세포는 물과 에탄올을 이용한 근피의 추출물이 다른 추출물과 비교하여 면역 증진도가 증가한 것으로 보이는데 특히 근피의 에탄올 추출물은 1.0 g/L 농도에서 각각 T세포는 약 1.75배와 B세포는 약 1.4배의 면역세포의 생육 촉진을 나타내었다. 또한 수피의 에탄올 추출물은 T세포 1.35배의 B세포는 1.2배의 생육 촉진을 나타내고 있다. 또한 가시오갈피 근피의 50% 에탄올 추출물에 의한 면역세포 생육 촉진은 2.7배의 가장 높은 면역 증진을 보이고 황칠나무 잎이 T세포와 B세포의 면역증진에 최고 1.27배와 1.23배의 생육 촉진을 나타낸다. 또한 최고 4배의 생육 촉진활성을 나타낸다. 그러나 팔손이 목부의 추출물은 각각 1.10배의 면역 증진능을 보이고 있으며 특히 물 추출물은 0.95배의 면역 증진능을 나타내고 최고 농도(1.0 g/L)에서도 1.03배정도의 면역 증진을 보이고 있다. 따라서 다른 추출물에 비해 물 추출물이 1배 이하의 면역 증진능을 보이는 것은 목부의 물 추출물들이 저농도에서는 면역 세포에 대해 저해 활성을 나타내는 것으로 추측할 수 있으며 고농도에서는 면역 증진 성분이 면역 저해 성분에 비해 높은 활성을 나타내어 면역 증진능이 높아지는 것으로 사료된다. 이에 따라 두릅나무과 식물들의 특성과 비교하여 팔손이는 근피의 활용 가능성이 잘 나타나고 있음을 알 수 있다.

Fig. 9~10은 각 8일간의 T 세포와 B 세포의 생육 활성을 나타낸 것이다. Fig. 9에서의 T 세포는 근피의 에탄올 용매 추출물에서 배양 6일째 되는 날에 11×10^4 cells/ml의 세포 농도와 근피의 물 추출물이 10×10^4 cells/ml, 물과 에탄올의 혼합 용매를 이용한 근피 추출물이 9×10^4 cells/ml의 순으로 세포농도가 나타났으며 각각의 용매별로 근피, 수피, 잎, 목부 순으로 세포의 농도가 나타났다. 또한 Fig. 10에서 B 세포는 배양 6일째에서 근피의 에탄올 추출물에서 10×10^4 cells/ml의 세포 농도를 나타내어 B 세포가 T 세포에 비해 생육 촉진이 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 각 T, B 세포의 생육에 있어서 5일과 6일째에서 가장 높은 세포 농도를 보이다가 그 이후 세포의 농도가 감소하는 것을 확인하였고 T, B 세포의

생육 촉진에 있어 근피의 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었고 또한 에탄올을 이용한 모든 추출물들에서는 다른 용매와 비교하여 2×10^4 cells/ml 이상 높은 세포 농도를 나타내었다.

팔손이 근피 에탄올 추출물에 의한 면역 세포인 T, B 세포의 면역 증진능 실험결과에 따르면 수피와 목부, 잎 부위와 물과 50% 에탄올 용매 추출물에 비해 최고 40%의 차이를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었는데 이는 근피의 추출물이 면역 세포의 생육 촉진 결과와 유사하게 나타나고 있음을 확인할 수 있었으며 이후 cytokine 분비량 실험에서 팔손이 근피의 추출물이 다른 부위의 추출물보다 IL-6와 TNF-의 분비량을 증가시킬 것이라고 생각되어 지며 앞선 항암 실험과 비교하여 면역 활성 실험에서도 근피의 추출물이 높은 활성을 나타내었으며 항암활성과 함께 면역 증진을 위한 기능성 소재로서의 가능성을 제시해 주고 있다.



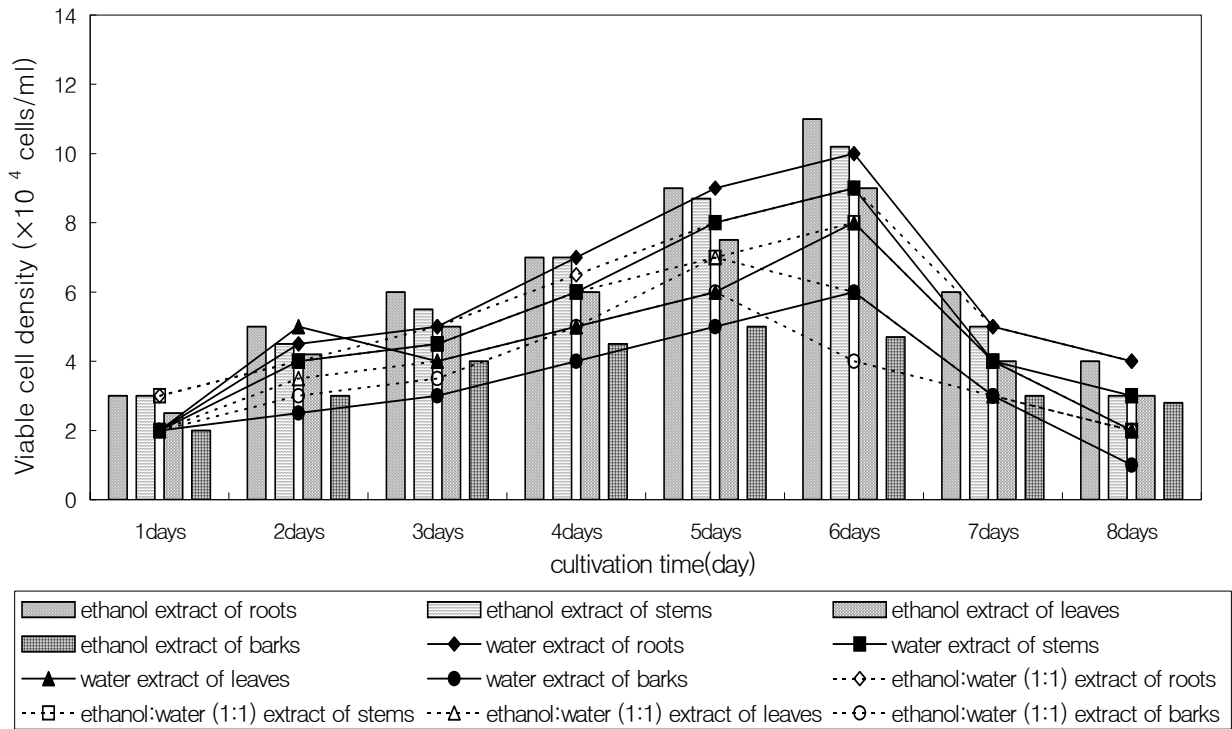
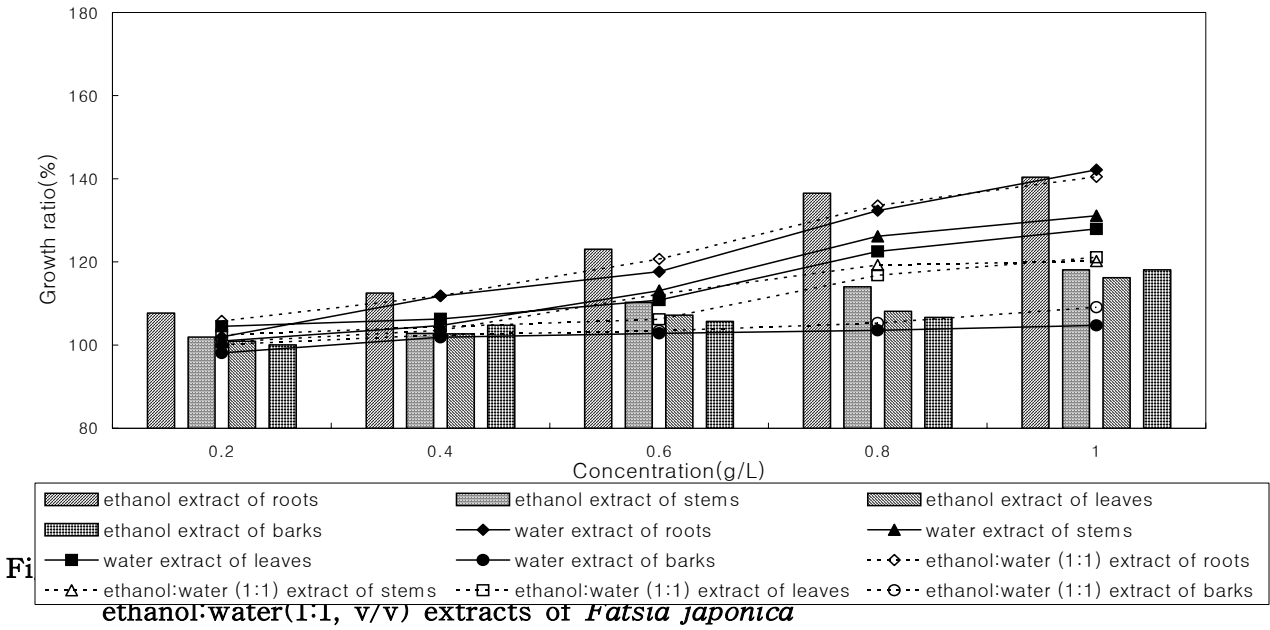


Fig. 9. The growth of viable cell density of human T cell(Jurkat) in adding ethanol, water, ethanol:water(1:1, v/v) extracts of *Fatsia japonica*

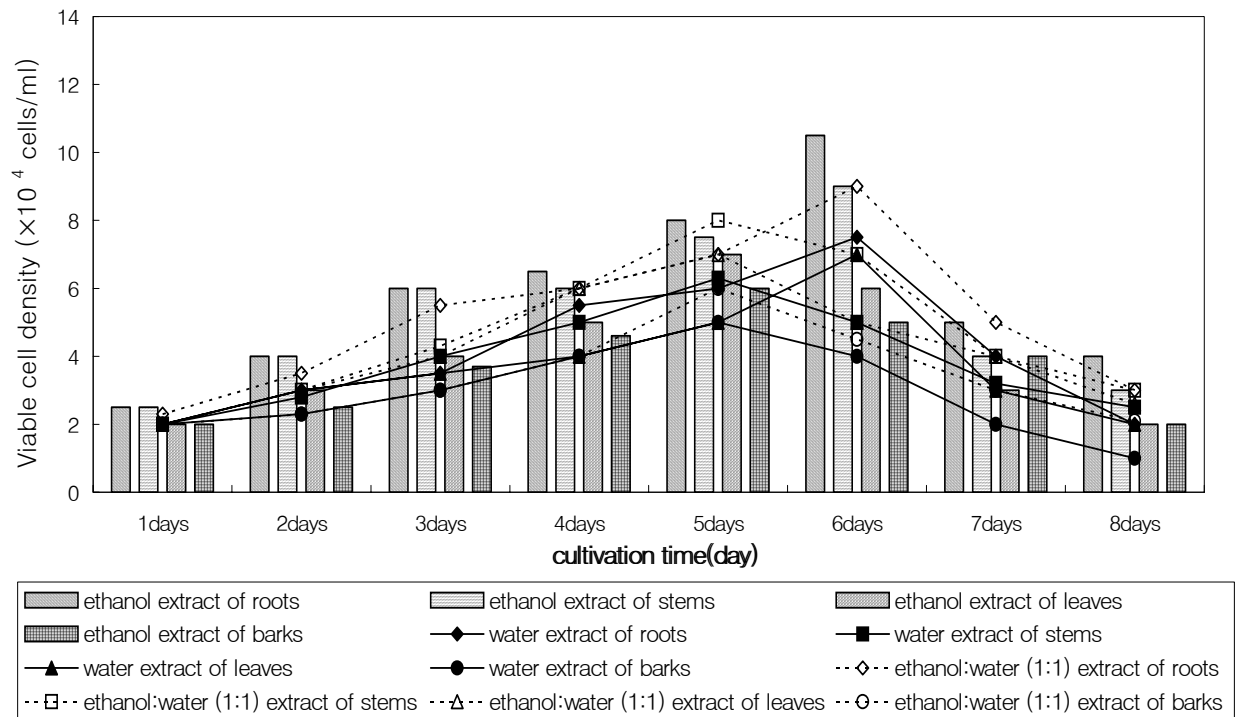


Fig. 10. The growth of viable cell density of human B cell(Raji) in adding ethanol, water, ethanol:water(1:1. v/v) extracts of *Fatsia japonica*

2) 면역 세포의 cytokine 분비량 측정 결과

Table 6~7는 T cell과 B cell의 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량을 나타낸 것이다. 각각의 세포는 IL-6와 TNF- α 를 cytokine kit를 이용하여 측정하였다. 앞선 면역 활성화 실험에서와 같이 cytokine의 양의 변화는 근육의 에탄올 조 추출물이 가장 높게 나타났으며 나머지 부위는 수피, 잎, 목부 순으로 나타났다. 각각의 용매별 추출물의 cytokine의 분비량을 비교해보면 근육의 에탄올 추출물을 투여한 T cell은 약 4배 이상으로 세포의 농도가 증가한 배양 5일째에 IL-6의 분비량이 110 pg/ml가 TNF- α 는 125 pg/ml로 가장 높게 나타났으며 수피의 에탄올 추출물은 98 pg/ml와 105 pg/ml가 각각 나타났고 잎은 92 pg/ml와 98 pg/ml의 순으로 나타났으며 배양 일에 따라 T, B cell의 세포 농도가 증가함에 따라 cytokine의 분비량은 증가하였으며 B cell은 근육의 에탄올 추출물이 최고 95 pg/ml, 105 pg/ml으로 나타났다. 이는 앞선 T cell과 B cell의 면역 촉진 활성화 실험에서와 같이 시료 첨가 후 배양 일에 따라 세포의 농도가 증가하는 것을 확인하였으며 또한 이에 따라 cytokine의 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. 팔손이의 부위에 따라서는 근육, 수피, 잎 그리고 목부 순으로 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 추출 용매에 따른 cytokine의 분비량은 T cell의 근육의 에탄올 추출물의 TNF- α 가 125 pg/ml이며 에탄올과 물의 1:1 혼합용매의 추출물이 99 pg/ml가 나타났으며 물 추출물은 84 pg/ml 순으로 나타났다. 이는 앞선 면역 활성화 실험에서와 같이 에탄올 추출물이 면역 활성화에 있어 다른 용매 추출물보다 높은 활성을 띠는 것을 확인 할 수 있었으며 또한 배양일에 따른 cytokine의 분비량은 모든 용매의 추출물에서 유의적인 변화를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 앞서 살펴본 cytokine의 분비량과 관련하여 팔손이나무의 근육 부위가 면역 활성화와 관련하여 활용도가 높음을 확인할 수 있었다. 또한 면역세포와 cytokine의 관계에 있어서 cytokine에 영향을 받아 생육 및 면역 활성화에 깊은 영향을 받고 있는 NK-cell의 활성화 실험을 실시하기 전에 cytokine의 분비량의 측정을 통하여 NK-cell의 활성을 짐작할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 6. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell(Raji) and T cell(Jurkat) cultured in ethanol extract of *Fatsia japonica*

<i>Fatsia japonica</i>	time (day)	cell line			
		B cell(pg/ml)		T cell(pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
roots	1	19	22	28	31
	2	33	41	48	53
	3	57	67	65	67
	4	69	79	83	85
	5	95	105	110	125
stems	1	17	19	24	27
	2	30	37	39	46
	3	51	59	56	62
	4	59	64	74	78
	5	89	91	98	105
leaves	1	16	17	22	24
	2	28	31	36	41
	3	46	52	51	59
	4	54	58	68	70
	5	74	78	92	98
barks	1	14	14	19	28
	2	22	27	31	34
	3	39	48	44	48
	4	48	54	53	69
	5	66	71	76	86
control(no addition)		13	14	13	16

Table 7. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell(Raji) and T cell(Jurkat) cultured in ethanol : water (1:1) extract of *Fatsia japonica*

<i>Fatsia japonica</i>	time (day)	cell line			
		B cell(pg/ml)		T cell(pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
roots	1	14	16	23	25
	2	27	32	35	39
	3	50	58	49	52
	4	55	67	69	73
	5	79	85	89	99
stems	1	14	15	21	20
	2	25	30	30	35
	3	45	49	44	48
	4	50	61	62	69
	5	72	79	82	84
leaves	1	15	16	19	20
	2	23	27	28	33
	3	46	44	41	45
	4	48	52	57	62
	5	68	71	77	79
barks	1	13	15	17	19
	2	22	26	28	31
	3	41	40	36	43
	4	47	51	54	69
	5	53	58	69	72
control(no addition)		13	14	13	16

다. NK 세포의 면역증진 효과

IL-2 비의존형 NK-92MI cell을 이용한 인간 면역세포인 B, T 세포를 이용하여 이 세포들이 분비하는 IL-2를 비롯한 sample 투여로 인한 cytokine의 분비증가로 인하여 NK-cell도 그 활성도가 증가하는 것을 관찰하였다. 앞선 실험에서 나타난 B, T 세포의 면역 활성도 증가 및 촉진 실험의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 각 B 세포와 T 세포는 근피 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성도를 얻었는데 이의 배양액을 이용하여 NK-cell의 활성도를 측정된 결과 가장 높은 생육 활성을 확인 할 수 있었다. Fig. 11~12은 NK-cell의 B, T 세포의 배양의 첨가에 따른 활성을 나타낸 것이다. 에탄올 용매와 control 과 비교하여 활성을 살펴본 그림이다. 근피 추출물이 가장 높은 활성을 보여 6일째에는 T cell의 배양액을 첨가한 것이 약 13×10^2 cells/ml를 나타냈으며 control보다 약 2배 이상의 생육 증진도가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 근피의 에탄올 추출물을 첨가한 배지를 이용한 NK cell의 활성도가 다른 면역세포와 비슷한 생육활성도의 증가를 보여주고 있다.

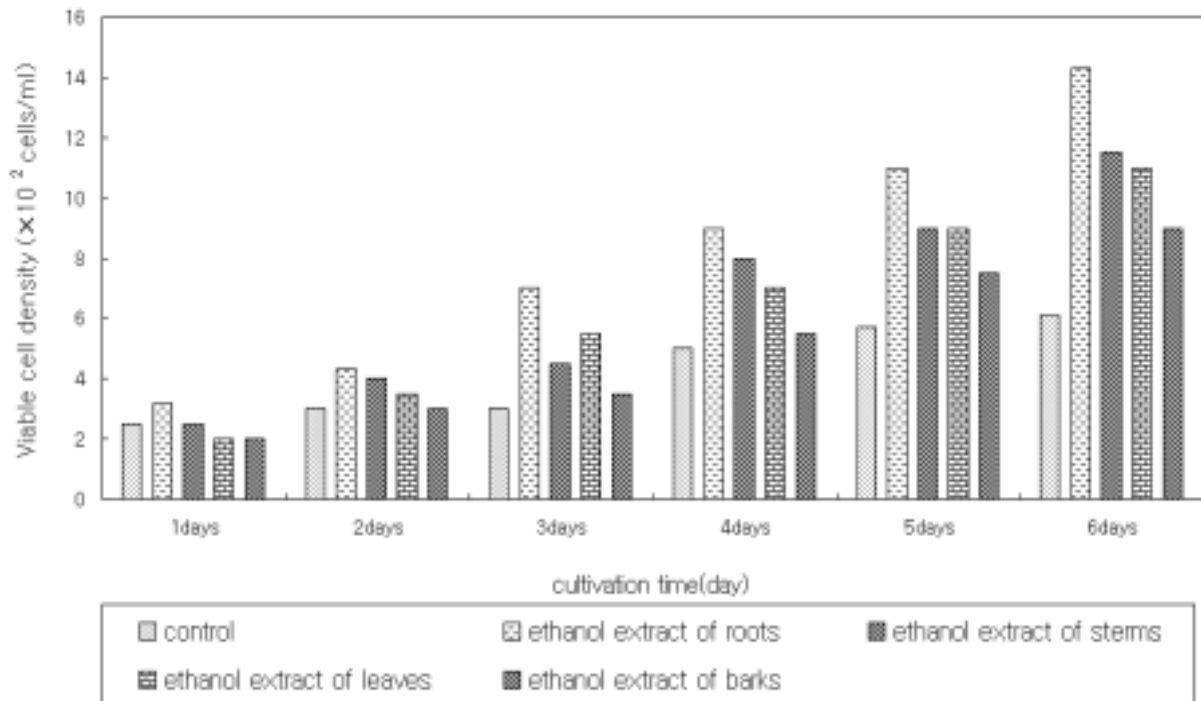


Fig. 11. The NK cell growth of viable cell density of human B cell(Raji) in no adding of adding the ethanol extracts from *Fatsia japonica*

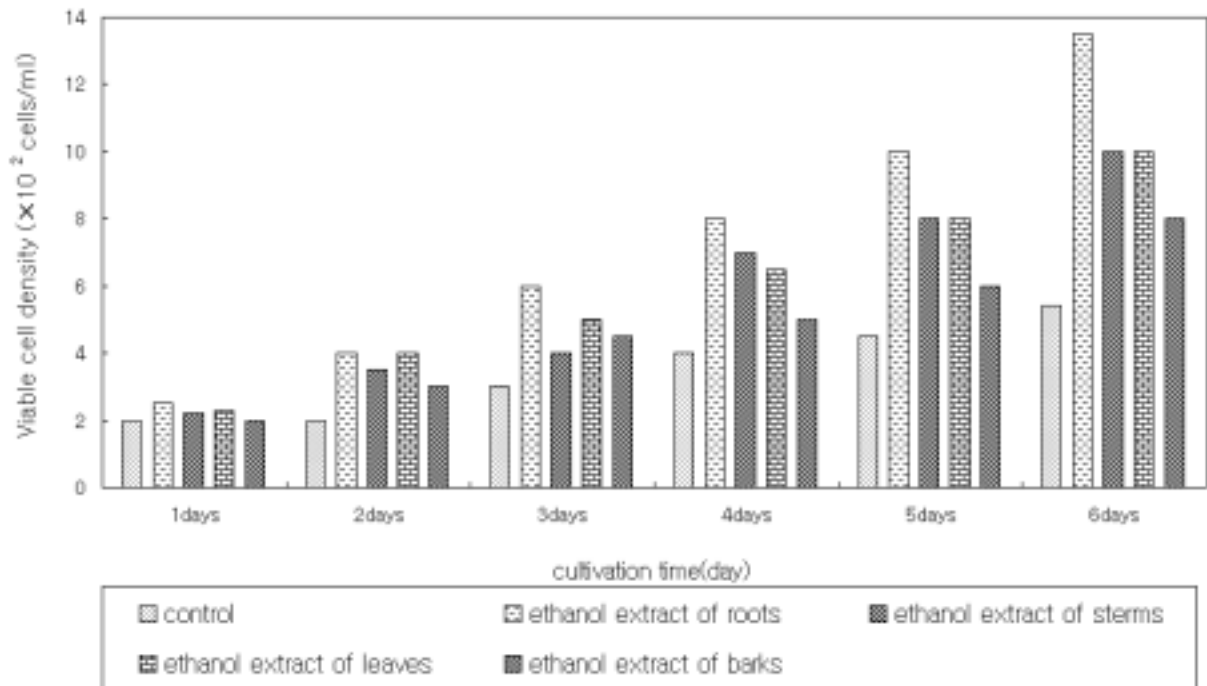


Fig. 12. The NK cell growth of viable cell density of human T cell(Jurkat) in no adding of adding the ethanol extracts from *Fatsia japonica*
 라. 세포 분화도 측정 결과

본 실험에 사용된 세포는 human promyelocytes(HL60)인 전골수세포로서 macrophage나 granulocytes로 분화가 되어 사멸하며 시료를 첨가하여 분화를 진행시키면 판상으로 세포가 군집하며 그 후에 판상의 세포 덩어리가 작은 세포덩어리로 분리가 되면서 세포가 비대해지고 본래의 세포특성인 부유성을 잃고 정착한다. 본 실험에서 시료를 투여하여 24시간 마다 cell의 morphology를 관찰 및 정량적인 분화도를 살펴보았다.

Fig. 13. 과 같이 에탄올 용매를 이용한 근피의 추출물이 다른 추출물과 비교하여 약 5%이상 높은 분화 활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 근피의 추출물은 Fig. 13~15 에서는 추출 용매와 상관없이 근피의 추출물들이 다른 추출물과 비교하여 높은 분화 활성도를 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 근피의 에탄올 추출물에 대한 분화 활성도를 살펴본 그래프이다. 근피의 분화 활성도와 비교해서 분획물의 분화 활성도는 에틸 아세테이트 층의 시료가 약 5%정도 높게 나오는 것을 확인할 수 있었으며 시간의 경과에 따라 근피의 조추출물

은 분화도가 낮아지는 반면에 나머지 분획물은 꾸준한 분화도의 변화를 보이고 있다.

Fig. 13은 근피의 에탄올 용매를 이용한 추출물의 분화도를 사진으로 살펴본 것이다. (A)는 시료를 첨가하지 않은 대조군과 (B)(C)(D)는 0.5 g/l를 투여한 실험군의 배양 1일, 2일과 4일째를 비교한 것이다. Fig. 25의 (A)는 분화가 시작되기 전의 핵과 세포모양이 둥근 granulocytes의 형태를 취하고 있으나 시료를 첨가한 (B)는 분화가 진행되는 형태를 나타내고 있으며 (C)(D)는 핵과 세포의 모양이 길쭉하고 찌그러진 모양의 macrophage의 형태를 하고 있는 것을 확인할 수 있다. 각 세포는 시료의 첨가에 의해 분화 상태의 형태를 나타내는 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 그에 따른 macrophage의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 시료에 의해 일반적인 백혈구의 대부분을 차지하는 과립성백혈구가 면역 작용을 담당하는 대식세포로의 분화를 촉진하는 것을 확인하였으며 이는 시료에 의한 대식세포의 활성을 증가시켜 면역작용을 증가시키는 것을 사료된다.

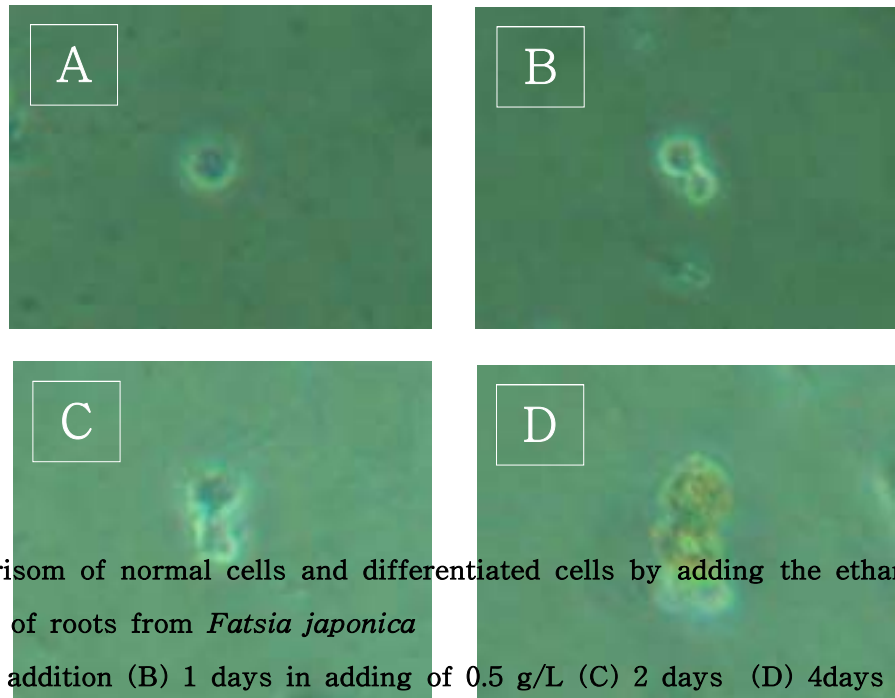
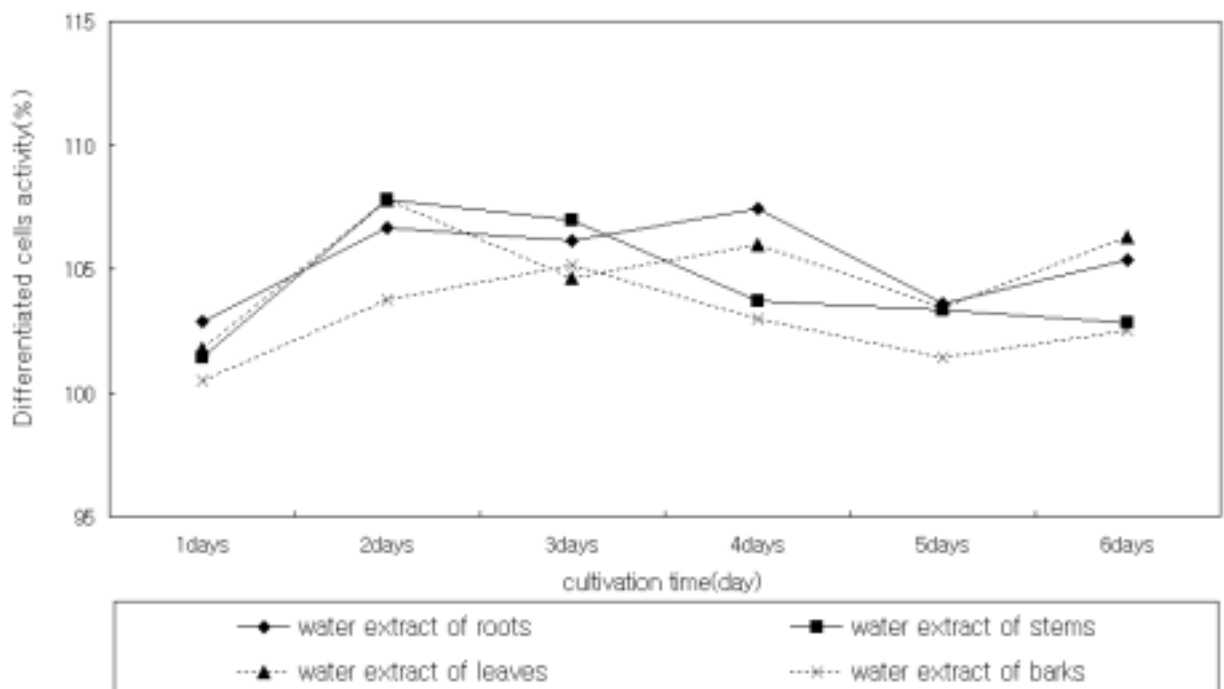
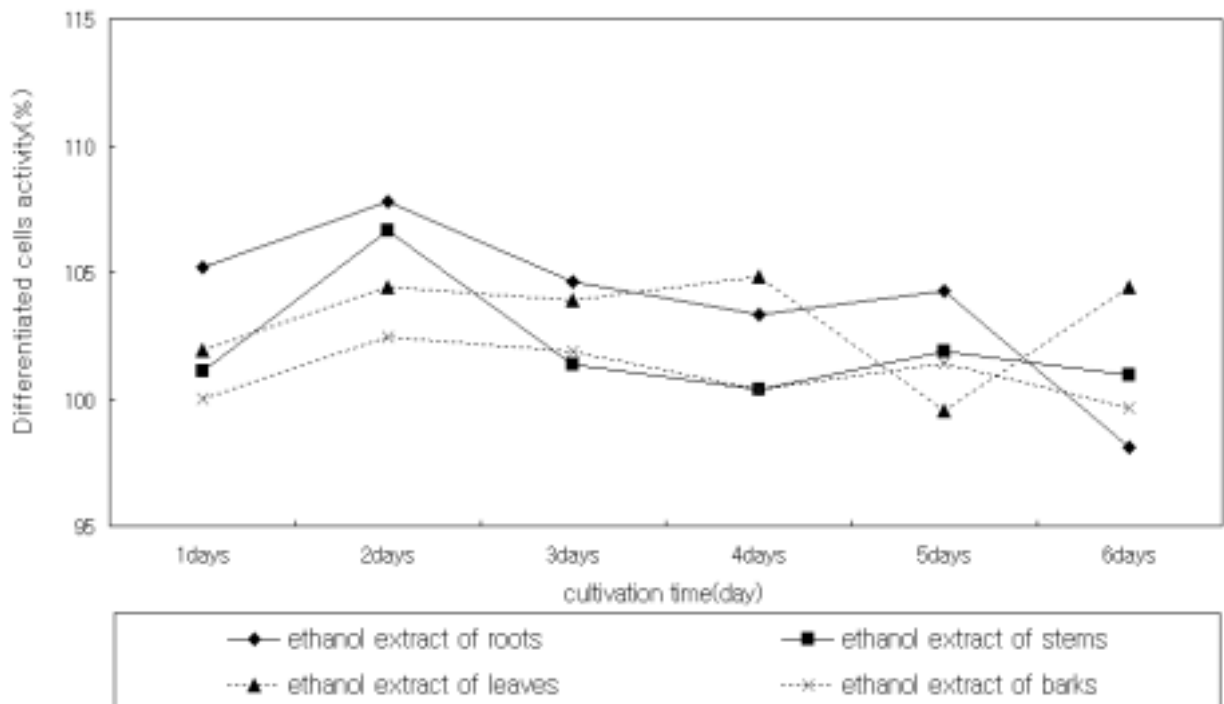
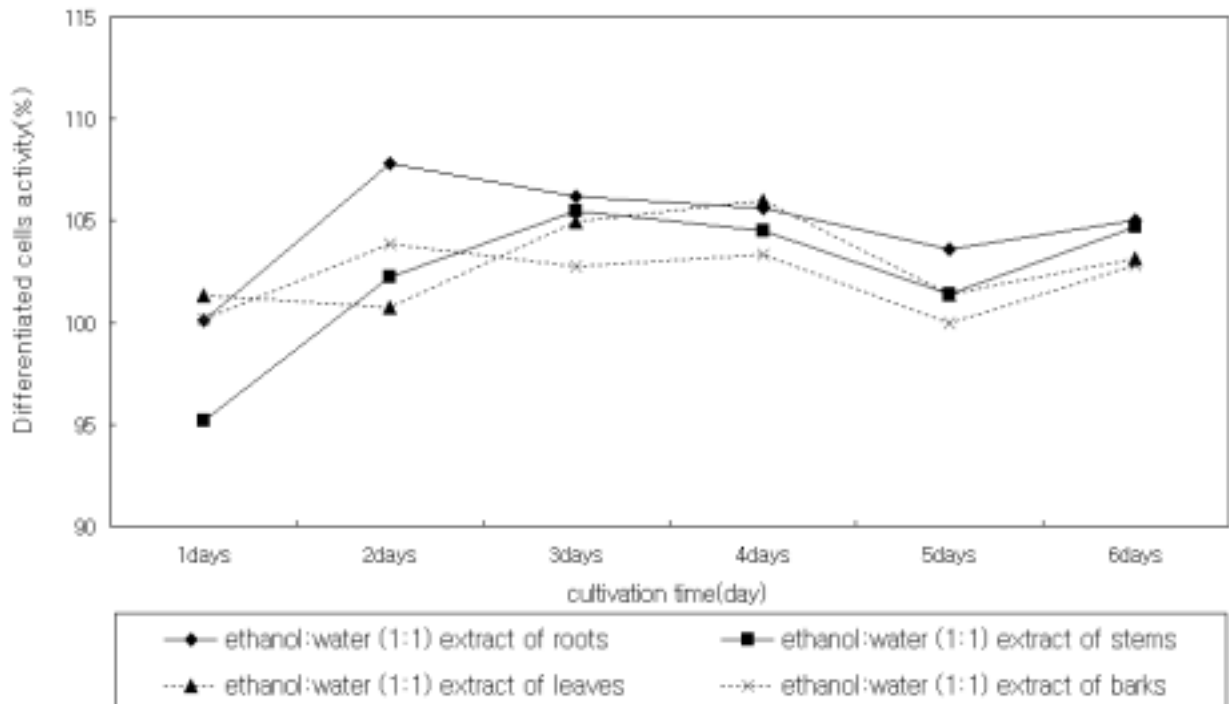


Fig. 13. Comparison of normal cells and differentiated cells by adding the ethanol extract of roots from *Fatsia japonica*
(A) no addition (B) 1 days in adding of 0.5 g/L (C) 2 days (D) 4days





마. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정

본 실험에서 측정된 팔손이 추출물의 암세포들에 대한 억제 활성을 검증하기 위해서 인간 위암 세포인 MCF-7와 인간 면역 세포인 T cell, 신경세포인 PC12를 각각 Microphysiometer를 이용하여 4시간동안 1.0 g/L에서 측정한 결과를 Fig. 17~19에 나타내었고 항암 활성 실험에서 높은 활성이 검증된 에탄올 추출물들을 중심으로 실험을 실시하였다.

Fig. 17.는 MCF-7을 이용하여 앞선 항암실험에서 확인된 억제활성을 검증하는 의미에 가장 나은 억제활성을 나타낸 에탄올 추출물들에 대한 실시간 억제활성을 측정하였다. 앞선 항암 활성 실험에 따라 MCF-7에 대한 에탄올 근피의 항암활성은 최고 40%를 나타내었으며 이와 비슷하게 Microphysiometer를 이용한 활성 측정에서도 근피의 에탄올추출물이 높은 저해 활성도를 나타내는 것을 확인 할 수 있다. Fig. 18은 T cell에 의한 면역활성도를 실시간 측정된 것이고 이것 또한 근피의 에탄올 추출물의 면역활성도 측정 실험인 MTT assay와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 마지막으로 Fig. 19에서는 인간 신경 세포인 PC12를 이용한 신경 세포의 활성율을 측정된 실험이다. 앞선 PC12에 대한 생육 활성 실험에서와 같이

Microphysiometer를 이용한 활성화에서도 110% 미만의 활성율을 나타내었다. 이는 팔손이 추출물들이 신경세포의 신경활성 촉진인자가 비활성화 된 것으로 사료되는 바이다.

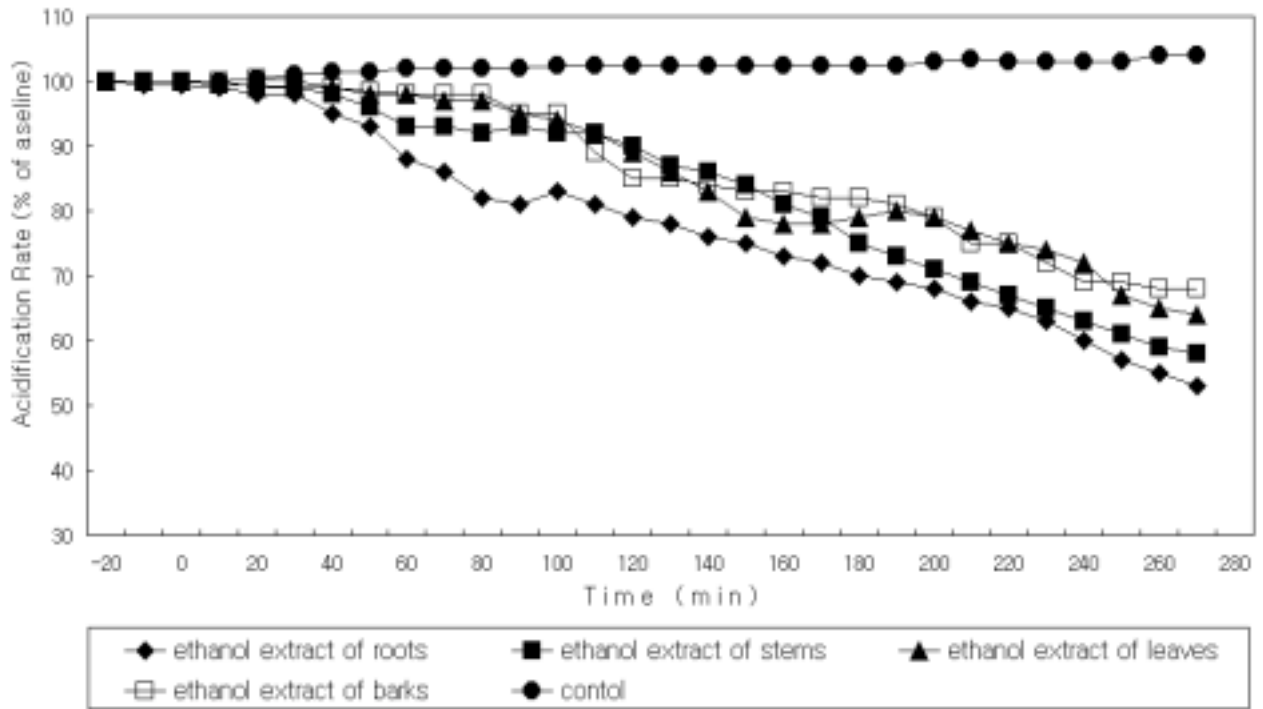


Fig. 17. The results of measuring cellular activity of MCF-7 cells by adding to 1.0 g/L of the ethanol extracts from *Fatsia japonica* for 4 hours, using a microphysiomer.

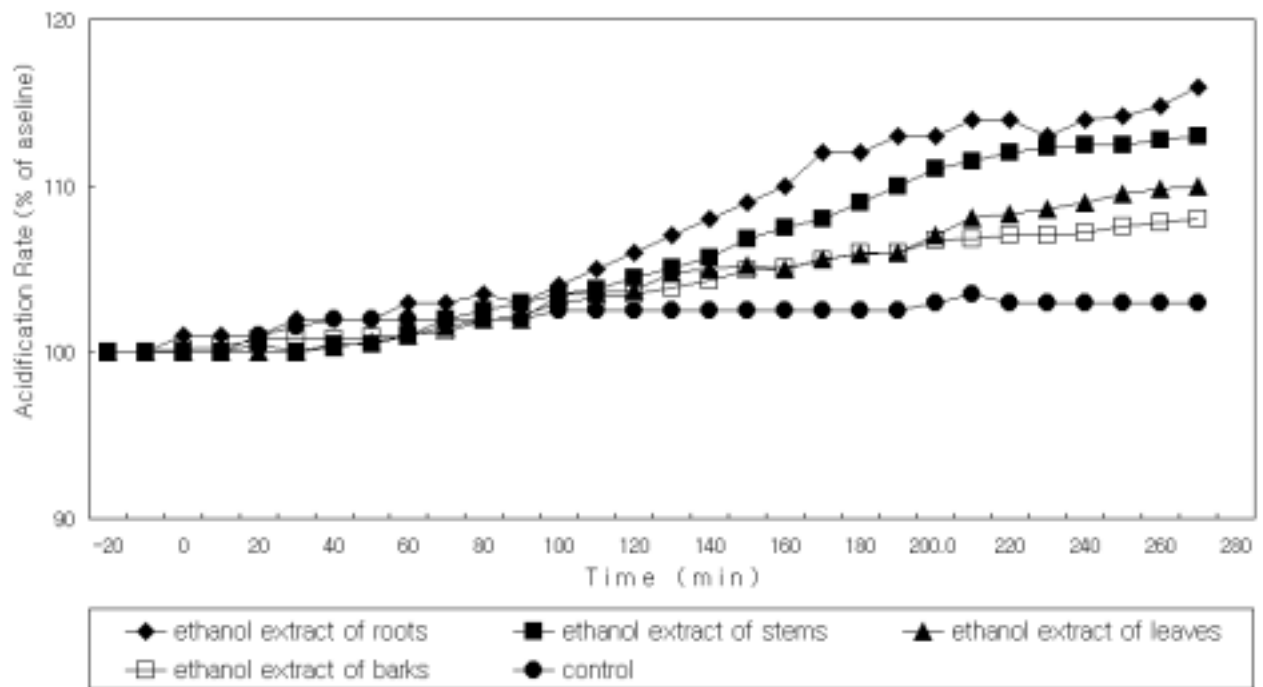


Fig. 18. The results of measuring cellular activity of T cells by adding to 1.0 g/L of the ethanol extracts from *Fatsia japonica* for 4 hours, using a microphysiomer.

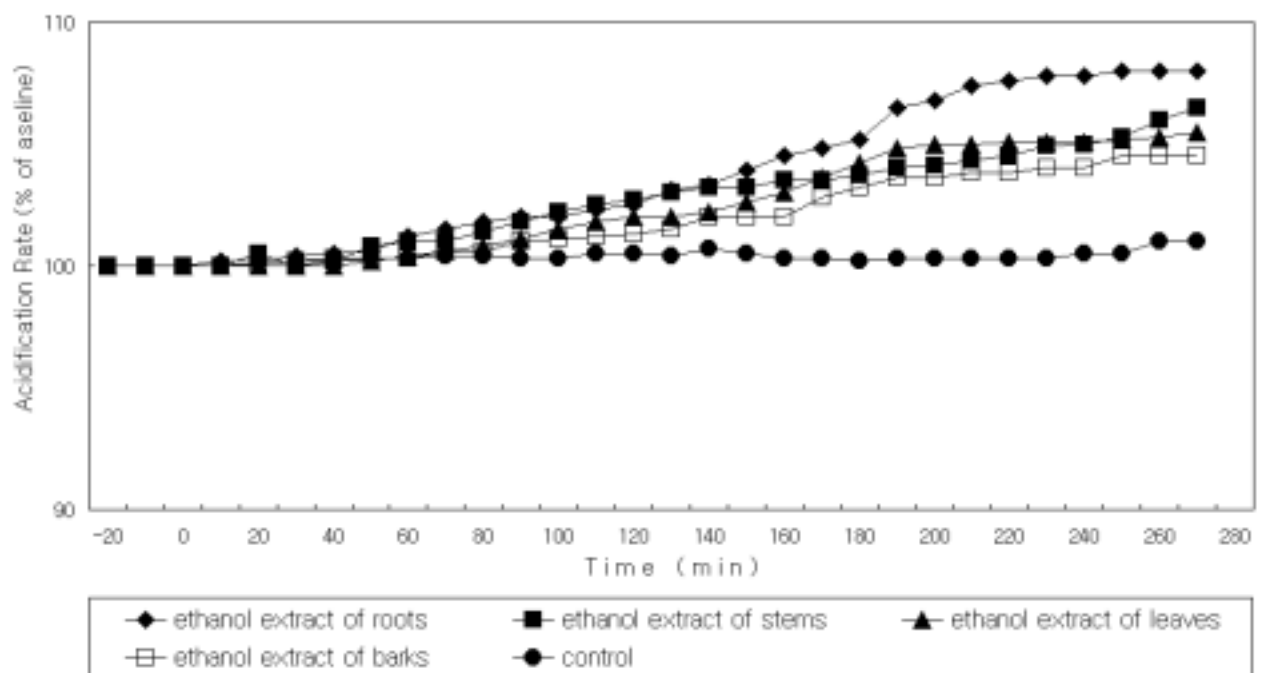


Fig. 19. The results of measuring cellular activity of PC12 cells by adding to 1.0 g/L of the ethanol extracts from *Fatsia japonica* for 4 hours, using a microphysiomer.

바. 간기능 관련 생리 활성 측정(해독작용 - Glutathione S-Transferase 측정)

Fig. 20~21는 팔손이의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST(glutathion-S-transferase)의 활성을 측정하였다. 이는 발암물질들을 해독화하는 메카니즘으로써 중요하게 고려되어지고 있다. 상기의 결과에서는 팔손이 근피와 수피 추출물 농도에 비례하여 간세포의 해독 작용은 증가하는 것을 확인하였으며 특히 Fig. 20에서 근피의 에탄올 추출물은 165%의 해독작용을 나타내어 다른 시료에 비하여 가장 높은 활성도를 나타내었으며 각 부위별 용매에 따른 추출물들의 활성도의 차이를 알 수 있었는데 에탄올을 추출 용매로 이용한 시료가 전체적으로 약 165~120%의 높은 활성을 나타내었으며 가장 좋은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 부위별 활성도를 살펴 본 결과 근피는 모든 용매에서 다른 부위와 비교하여 높은 활성도를 나타내는 것을 알 수 있었다. Fig. 21는 에탄올 추출물들과 달리 150% 미만의 활성을 나타내었으며 잎의 물 추출물이 143%의 활성을 나타내어 가장 높은 활성을 보이고 있으며 수피의 물과 에탄올의 1대1 추출물이 약 150%의 활성을 나타내고 있다. 또한 Kim(A)의 연구에 따르면 가시오갈피 근피가 190% 내외의 높은 활성을 나타내고 50% ethanol 용액의 추출물에서는 최고 241%의 활성을 나타내고 있다. 이에 반해 팔손이의 각 부위 및 추출용매의 GST 실험에서는 에탄올 추출 용매에서는 근피가 물 추출 용매에서는 잎, 물과 에탄올의 1대1 추출물에서는 수피가 가장 높은 활성을 나타내어 각 추출용매에 따라 추출물의 활성이 변화하는 것을 확인하였다. 그러나 기능성 소재로서 다양하게 쓰이고 있는 두릅나무과의 다른 수종과 비교하여 낮은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 그러나 다른 수종들의 활성 실험을 위해서 사용된 시료들은 다양한 용매를 이용한 추출물이나 분획을 통한 추출물들의 최고 활성들을 나타내고 있는 것들이 대부분인 것으로 사료된다. 그래서 추후 팔손이 조추출물들의 GST 활성 결과를 바탕으로 분획이나 성분 분석을 통하여 간기능 활성 성분의 검색이 필요할 것으로 보인다. 또한 가장 높은 활성이 나타난 근피의 에탄올 추출물과 잎의 물 추출물은 타 수종과 유사한 GST 활성 능력을 나타내고 있어 이는 간기능 활성과 관계된 기능성 소재의 개발에 유의할 것으로 사료된다.

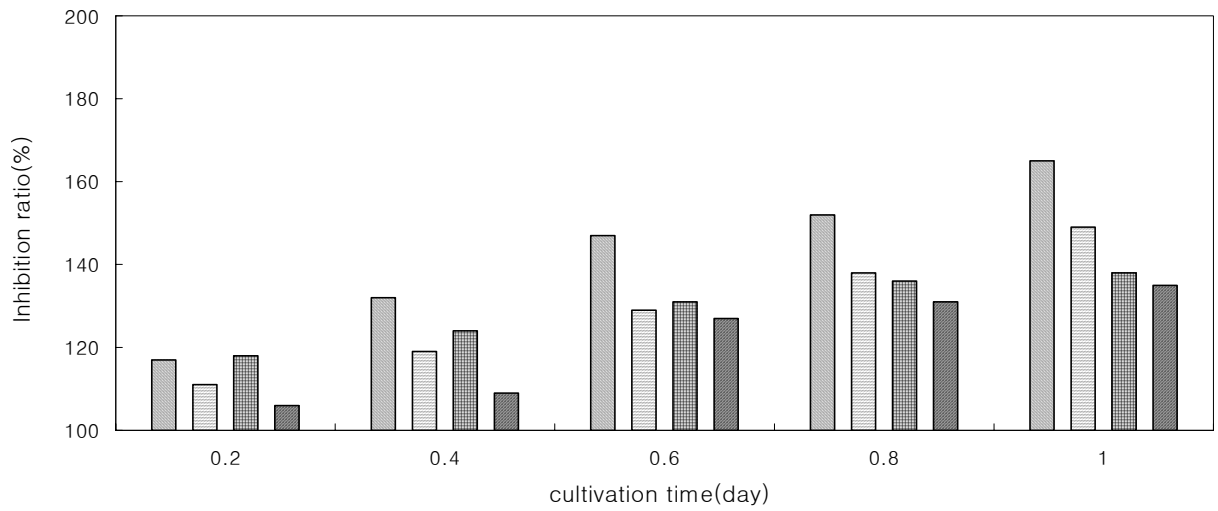


Fig. 20. The enhancement of glutathione-S-transferase activity in adding the ethanol extracts of *Fatsia japonica*.

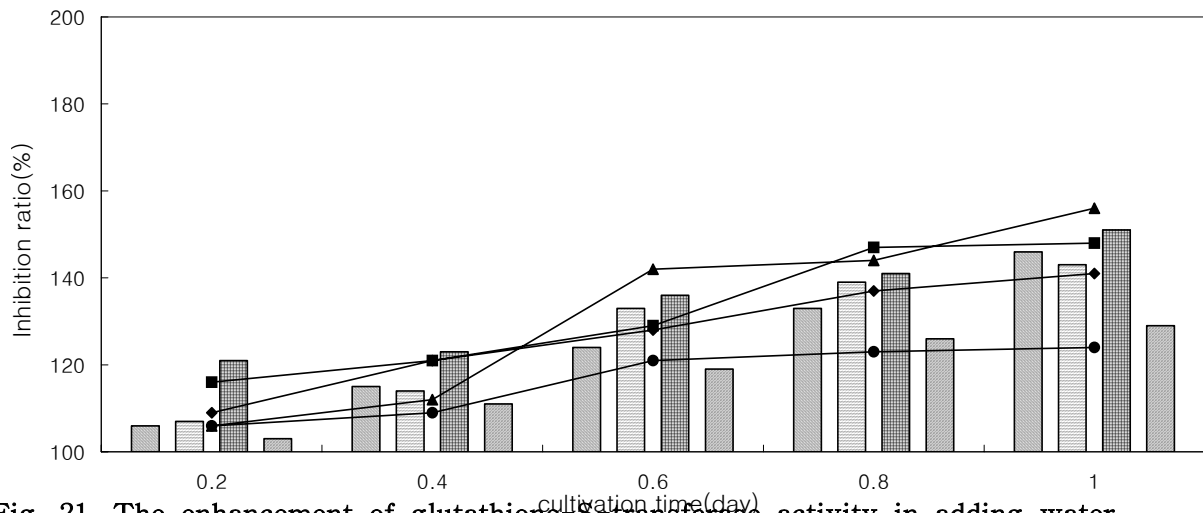


Fig. 21. The enhancement of glutathione S-transferase activity in adding water and ethanol:water (1:1, v/v) extracts of *Fatsia japonica*.

사. Angiotension Converting Enzyme (고혈압) 억제 활성

혈압상승의 주요 기작은 renin angiotensin system으로 angiotensin converting enzyme은 renin에 의해 생성된 angiotensin으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 angiotensin을 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin은 강력한 혈관수축작용을 가지고 aldosterone 의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며 또한 혈관이완 작용을 가진 bradykinin을 불 활성화시켜 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 따라서 ACE를 저해시키면 혈압상승을 억제할 수가 있기 때문에 ACE의 억제활성을 살펴보겠다. Fig. 22~23은 각각의 추출 용매를 중심으로 활성을 살펴보았다. Fig. 22은 에탄올 추출물에 대한 ACE 억제활성을 나타낸 것이다. Fig. 23은 물 추출물 및 물과 에탄올의 1대1 추출물의 ACE 억제활성을 나타낸 것이다. 각각의 앞선 다른 생리 활성 실험의 결과와 유사하게 근피와 수피의 추출물이 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 특히 에탄올을 이용한 추출물들이 다른 용매에 비해 약 20% 이상 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 특히 수피의 에탄올 추출물이 43% 정도의 활성을 나타내었다. 그러나 에탄올 추출물과는 달리 물 추출물은 저농도에서 수피의 활성이 다른 부위보다 높은 활성을 나타내고 있지만 고농도에서는 근피의 활성이 가장 높게 나타나고 있다. 이는 물에 의한 추출시 수피보다는 근피에서 ACE 억제 활성 물질이 다량 추출되어지는 것으로 보여진다. 또한 물과 에탄올의 혼합용매에 의한 추출시에는 수피의 활성이 가장 낮게 나타나고 있고 근피의 활성이 가장 높게 나타나고 있다. 이는 혼합용매를 통해서 근피의 ACE 억제 활성 물질이 비교 선택적으로 높게 추출되어 지는 것으로 생각되어진다. 이로서 팔손이의 각 부위 중에서 ACE의 억제 성분이 수피 부위에 다량 함유되어 있는 것을 암시하고 있으며 에탄올 추출물에 의해 ACE 억제 성분으로 추정되는 지단백질이 쉽게 용해되어 추출되어진 것으로 생각되어진다.

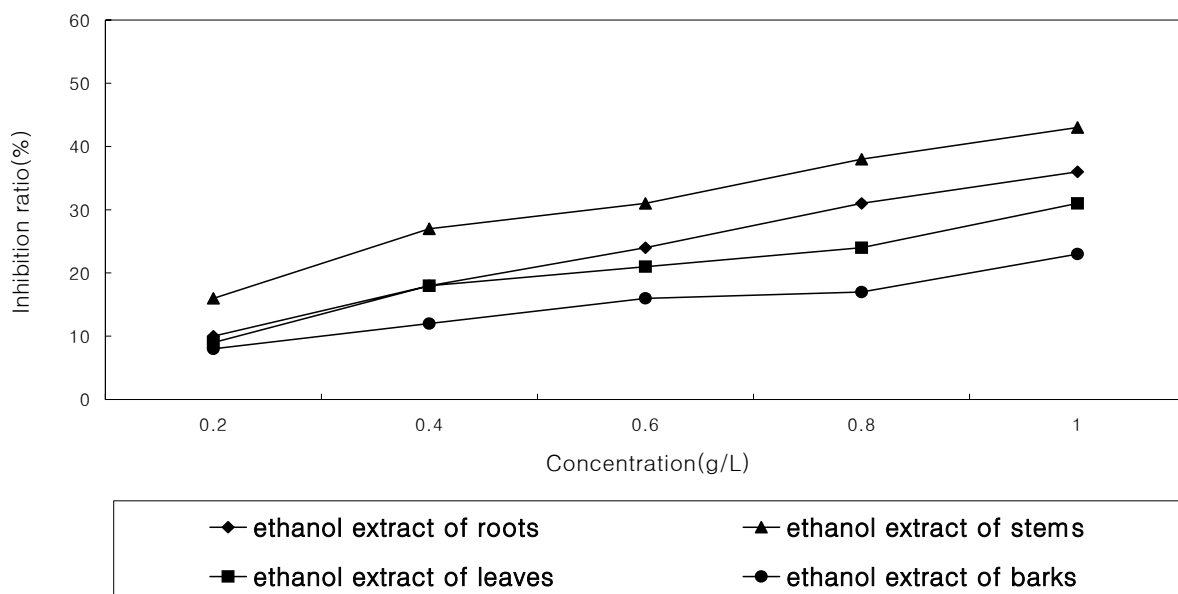


Fig. 22. Inhibition of Angiotension Converting Enzyme activity in adding the ethanol extracts of *Fatsia japonica*

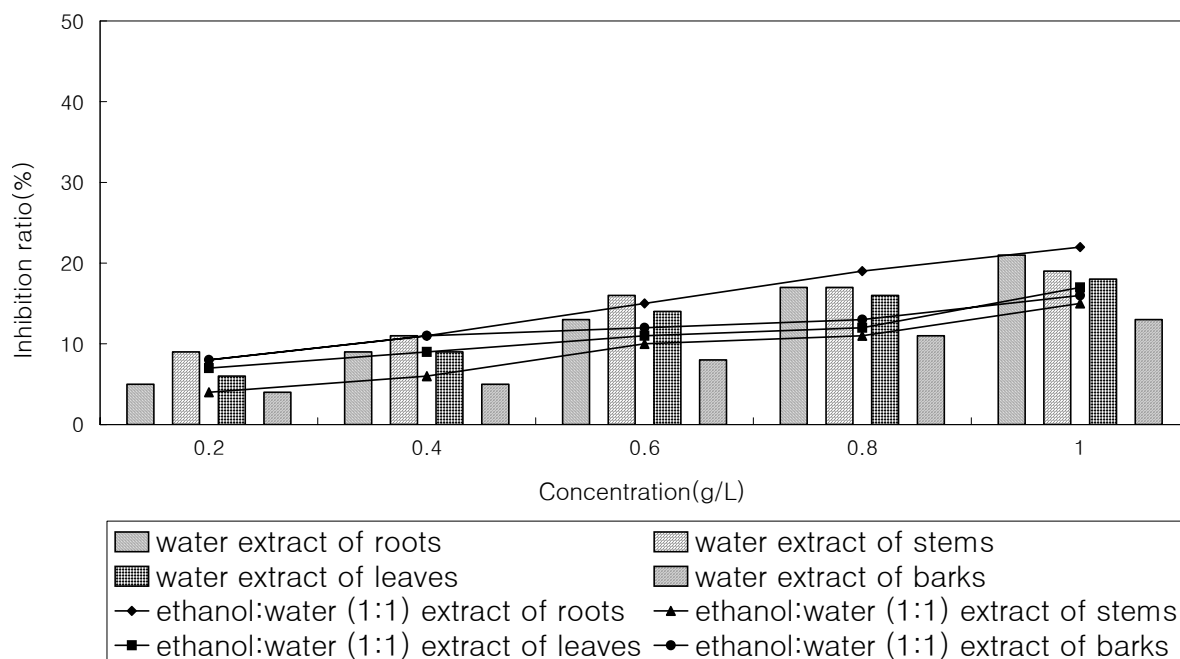
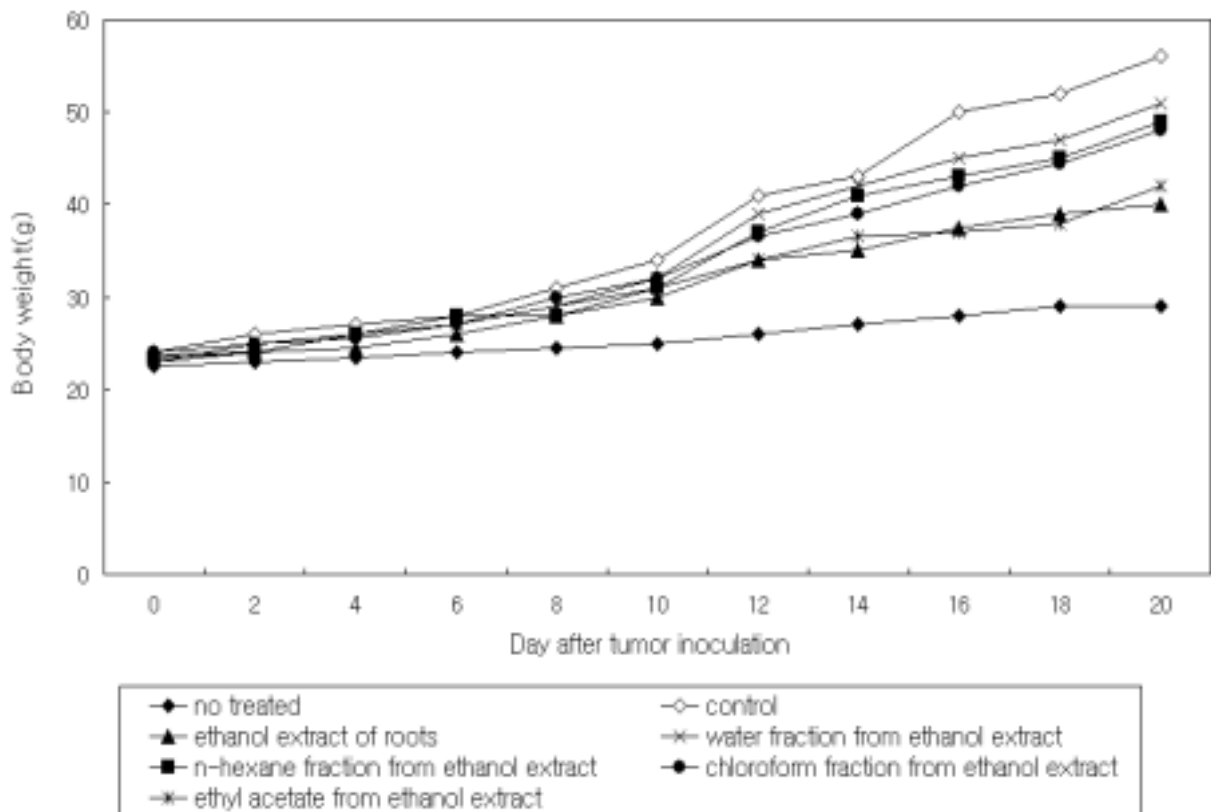


Fig. 23. Inhibition of Angiotension Converting Enzyme activity in adding water and ethanol:water(1:1, v/v) extracts of *Fatsia japonica*

아. *in vivo* 항암 실험 (S-180 복수암의 함암효과 측정)

Fig. 24은 Sarcoma 180을 피하이식한 후에 20일간의 무게변화를 통하여 복수암에 대한 팔손이 근피의 분획물들의 효과를 살펴본 그림이다. 각각의 분획물과 근피의 에탄올 조출물은 control과 같이 날짜의 경과에 따라 무게가 증가하는 것을 확인하였다. 이는 복수암의 크기가 증가하고 있음을 나타내고 있고 각 추출물중 근피의 에탄올 조출물의 무게가 가장 적게 증가하는 것을 확인하였으며 분획물중 에틸아세테이트가 근피의 에탄올 조출물과 가장 유사한 변화를 보이고 있다. Fig. 25은 복수암을 일으킨 마우스의 50일간의 생존율을 나타낸 그림이다. 복수암을 일으키고 시료를 투여하지 않은 마우스는 43일째에서 모두 패사하였지만 시료를 투여한 마우스들은 46, 48, 50일째에서 패사하여 각 시료는 복수암에 대한 수명연장효과가 있는 것을 확인하

였다.



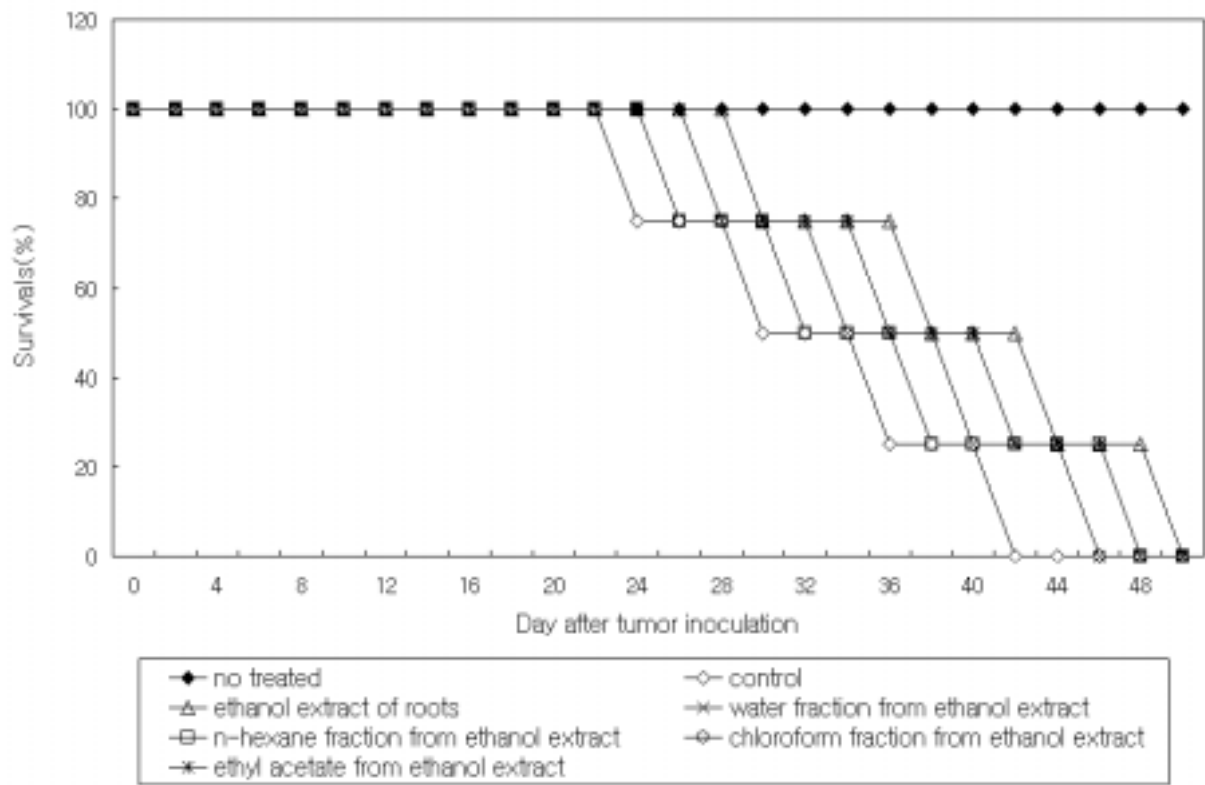


Fig. 26. The features of mice to inoculated after 20 days(A : control, B : ethanol extracts of roots).

자. 마우스를 통한 항 스트레스 효과 측정 결과

1) 혈액분석 결과

Table 8. 에서는 각각의 스트레스를 부과한 ICR mouse를 그룹별로 나누어 혈액을 채취하였으며 그 혈청내 cholesterol과 glucose의 농도변화를 살펴보았다. 각 스트레스 군 control의 혈청 내 cholesterol 농도는 hot Stress를 가한 그룹의 control이 104 mg/dl, cold stress를 가한 그룹이 103 mg/dl, cold water swimming stress를 가한 그룹이 70 mg/dl를 나타내었다. 그러나 스트레스를 가하지 않은 standard control의 cholesterol 농도는 55 mg/dl를 나타내었다. 이것을 살펴보면 cholesterol의 농도는 스트레스 부과에 의해 유의적인 증가를 보이는 것으로 알 수 있었다. 이에 대해 sample를 투여한 mouse의 cholesterol 농도는 cold stress를 가한 후 에탄올 용매를 이용하여 추출한 팔손이 수피의 추출물을 투여한 그룹에서 56 mg/dl가 나타나 standard control에 가까운 cholesterol 농도로 변화하였음을 확인할 수 있었으며 이것은 수피의 에탄올 추출물이 항스트레스 인자로서의 활용도를 보여주고 있으며, 또한 다른 추출물들 모두 Cholesterol 수치에 대해서 유의적인 변화를 보이고 있다. 다른 스트레스의 지표군인 혈당량의 변화를 살펴보면 각 스트레스 군 control의 glucose 농도는 standard control의 glucose 수치 108 mg/dl 보다 상승하였음을 알 수 있다. 이것은 앞서 살펴본 cholesterol 농도와 같이 스트레스에 의해 glucose 농도가 상승하는 것을 알 수 있었으며 각 군 마다 추출물을 투여한 결과 glucose의 농도가 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 가장 큰 변화를 보이는 잎의 에탄올 추출물은 cold stress 군에서 정상 수치에 가까운 117 mg/dl 까지 낮아지는 것을 살펴 볼 수 있었다. 이 실험을 통해서 항스트레스와 관련하여 팔손이 나무의 잎과 수피 추출물의 활용성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

Table 8. The effects of crude extracts on serum cholesterol and glucose in restraint stress induced in ICR mice.

Sample	CHOL (mg/dl) ¹⁾	GLU (mg/dl) ²⁾
Standard Control	55	108
control	85	173
Cold Water Swimming Stress	water extract of leaves	133
	ethanol extract of leaves	134
	ethanol extract of stems	147
	ethanol extract of barks	162
	control	168
Hot stress	water extract of leaves	163
	ethanol extract of leaves	122
	ethanol extract of stems	124
	ethanol extract of barks	146
	control	165
Cold stress	water extract of leaves	156
	ethanol extract of leaves	117
	ethanol extract of stems	133
	ethanol extract of barks	132

1) CHOL: cholesterol

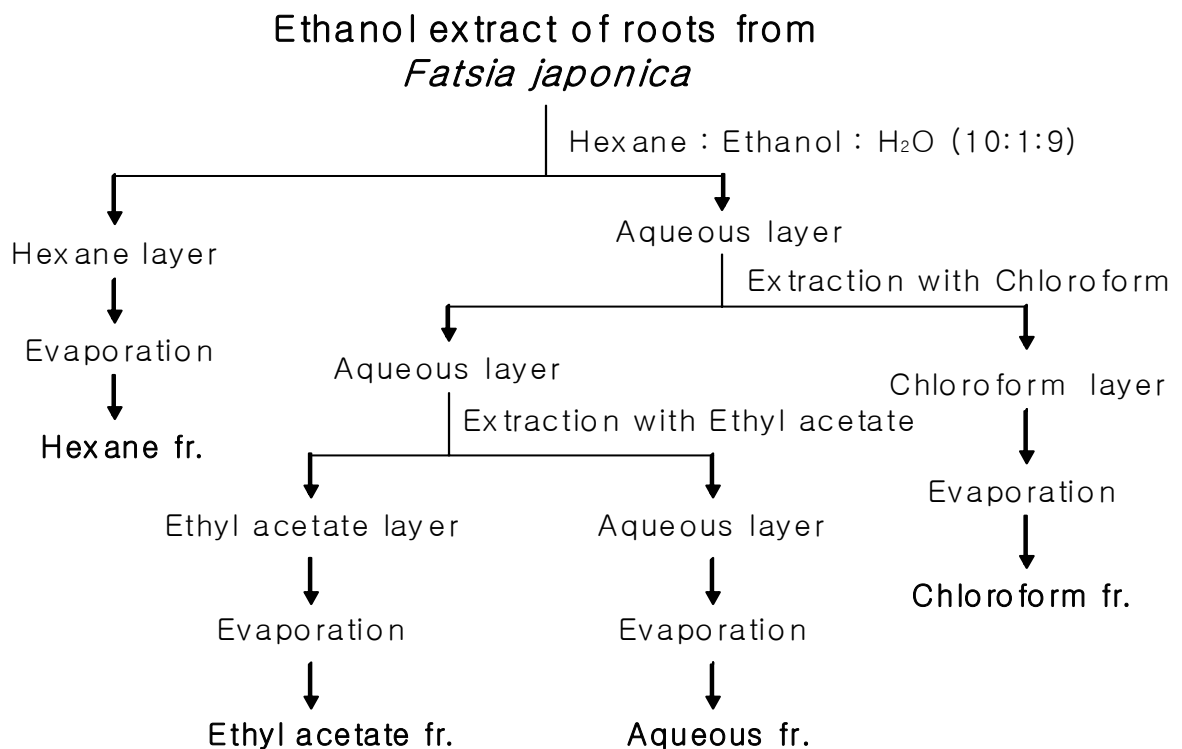
2) GLU: glucose

제 3 절 팔손이 에탄올 추출물의 분획 및 생리활성 탐색

1. 실험내용

가. 팔손이 에탄올 추출물의 분획

팔손이 근피의 ethanol 추출물은 Fig. 27.에 나타난 바와 같이 극성이 다른 용매들을 사용하여 분별분리를 행하였다. 먼저 분획에 들어가기 전에 근피 ethanol 추출물을 ethanol에 먼저 용해시킨 후에 물과 1 : 9의 비율로 혼합한 후에 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 층으로 극성의 차이에 의해 네 가지 분획으로 조제하였다. 분리된 각각의 용매 분획물은 감압 농축하여 용매를 제거하여 농축물을 얻었다.



나. 팔손이 근피 에탄올 추출 분획물의 생리활성 탐색

1) 암세포 생육 억제 활성 및 세포독성 측정

가) 세포주 및 배지조성

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 간암세포인 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 폐세포인 HEL299(Lung nomal, Human)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포들 중 Hep3B, MCF7은 DMEM배지를 HEL299는 RPMI 1640배지에서 10% heating- inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 적응시켜 배양하였다.

나) SRB assay

SRB (sulforhodamine B)assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF7(10% FBS, DMEM배지) 농도를 $4\sim5\times 10^4$ cell/ml로 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배지 (37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(tri chloroacetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

다) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEL299(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100 μ l의 MTT(50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100 μ l씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

라) Selectivity 측정

MTT assay를 이용하여 정상 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, 또한 SRB assay를 이용하여 각 암 세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제의 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \text{암세포 생육 억제 활성} / \text{정상 세포에 대한 세포 독성}$$

2) 면역증진 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT assay로 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)assay는 생세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 면역 세포인 Jurkat과 Raji(10% FBS, RPMI 1640 배

지)의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C , 5% CO_2)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, $100\mu\text{l}$ 의 MTT($50\mu\text{g/ml}$) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO $900\mu\text{l}$ 를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 96well plate에 옮긴 다음 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Cytokine은 IL-6와 TNF-의 정량을 Chemicon(USA)사의 IL-6와 TNF- 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C , 5% CO_2)시킨 후 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 다시 배양(37°C , 5% CO_2)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

3) 세포 분화도 측정

세포 분화 측정에 사용된 세포주는 인간 전과립 세포(human promyelocytes; HL60)를 사용하였고 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며 RPMI 1640배지에 10% heat inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 36.5°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 세포분화의 정량적인 수치를 측정하기 위해 세포의 농도가 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 포함된 배지를 24 well plate에 $900\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Sample을 농도별로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 다시 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 배양하면서 배지를 pipping 하여 15ml C-Tube에 옮겨 320 xg에서 10분간 원심분리 하였다. 배지를 제거한 후 0.1% Triton x-100을 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 incubator에서 30분간 용해하였다. 용해된 solution $20\mu\text{l}$ 를 96 well plate에 옮긴 후 3 mg/ μl 의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer(pH 5.0)를 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰으며 반응 정지를 위해 0.1N NaOH $100\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 ELISA Leader로 504 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 간기능 관련 생리활성 측정(해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)

정유의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST(glutathion - S - transferase)의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4dinitro benzene을 첨가한 후 다시 37℃에서 2분간 반응시켰다. 반응후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리한 후 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정한 뒤 다음과 같이 GST의 specific activity와 활성률을 계산하였다.

$$\text{Total activity (units)} = (A_{340}/9.6) \times \text{희석배수} \times (3\text{ml}/0.1) \times \text{crude extract(ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/ml protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

5) Angiotensin Converting Enzyme (고혈압) 억제 활성

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) → Hippuric acid(고혈압 유발) + His-Leu
Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

증류수에 50 μl(또는 시료)에 Hip-His-Leu 100 μl를 첨가하여 37℃에서 5분간 방치한다 (Blank를 만들기 위해 1N HCl 0.25 ml를 첨가한 test tube 2개를 준비). ACE 효소액 150 μl 첨가 후 37℃에서 1시간 방치한다. 1N HCl 0.25 ml 첨가하여 반응을 정지시킨다. Ethyl acetate 3 ml를 첨가한 후 15초간 잘 섞은 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액 1 ml를 취한다. Oil bath 140℃에서 15분간 건조한 후 1M NaCl 3 ml를 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$E_c - E_s$$

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\frac{\text{-----}}{\text{-----}})] \times 100$$

$$E_c - E_b$$

E_c : 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도

E_s : 시료 첨가시의 흡광도

E_b : 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

2. 결과 및 고찰

1) 팔손이 에탄올 추출 분획물의 수율

4.62%의 수율이 나타난 팔손이 근피의 ethanol 추출물을 물과 에탄올 비율이 9 대 1인 용매에 용해시킨 후 헥산과 클로로포름, 에틸아세테이트 순으로 분획하여 얻은 수율을 Table 1.에 나타내었다. 분획 농축 후 얻어진 시료의 수율을 살펴보면 물층이 2.33%으로 가장 높게 나타났고 헥산층에서는 0.47%로 가장 낮은 수율을 나타내었다.

Table 9. The extraction yields of each fraction from ethanol extract of *Fatsia japonica*

Sample	Yields of ethanol extract(%)	Step-wise fractionation of ethanol extract	Yield(%)
roots of <i>Fatsia japonica</i>	4.62	Haxane	0.476
		Chloroform	0.851
		Ethyl acetate	0.963
		Aqueous	2.330

2) 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정 결과

Table 10.에서 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였고 특히 클로로포름 층의 농도 1g/L에서 약 18.4% 로 가장 높은 세포 독성을 나타내었다. 분획 용매에 따른 각 분획물들의 세포 독성의 변화를 살펴보면 클로로포름층이 다른 분획용매층보다 세포독성이 높게 나타났으며 또한 농도에 따른 세포 독성의 변화량이 완만한 것으로 나타났다.

Fig. 28~29은 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)와 간암세포인 Hep3B(Hepatocellular carcinoma, Human)를 사용하여 암세포 생육 억제율 및 세포 선택성을 살펴보았다. MCF7의 에틸아세테이트층의 분획물의 농도 1.0 g/L에서는 근피의

에탄올 조추출물의 암세포 생육 억제율과 가장 유사한 65%가 나타났으며 세포 선택성에 있어서도 약 3.7로 높게 나타났다. Hep3B에서도 에틸아세테이트층의 분획물이 높은 암세포 생육 억제를 나타냈으며 농도 1.0 g/L에서는 최고 25%로서 역시 근피의 에탄올 조추출물과 유사한 활성을 나타내고 있으며 다른 층의 세포 선택도가 1.0 미만으로 나타나는 반면에 1.5이상의 세포 선택성을 나타내고 있다. 이는 팔손이 근피의 성분 중 사포닌 성분이 에틸 아세테이트층에서 분리가 되어 암세포 생육 억제율을 가장 높게 나타내고 있는 것으로 생각된다.

Table 10. Cytotoxicity of the fraction from roots extract of *Fatsia Japonica* on the human normal cell, HEL299

Sample	Concentration (g/L)	Cell line HEL299
Water fraction	0.2	9.6
	0.4	10.3
	0.6	12.1
	0.8	13.9
n-hexane fraction	1.0	15.1
	0.2	11.3
	0.4	12.4
	0.6	14.8
	0.8	15.2
Chloroform fraction	1.0	17.6
	0.2	10.6
	0.4	11.9
	0.6	13.8
	0.8	16.1
	1.0	18.4
Ethyl acetate fraction	0.2	12.4
	0.4	13.5
	0.6	15.6
	0.8	17.1
	1.0	17.9

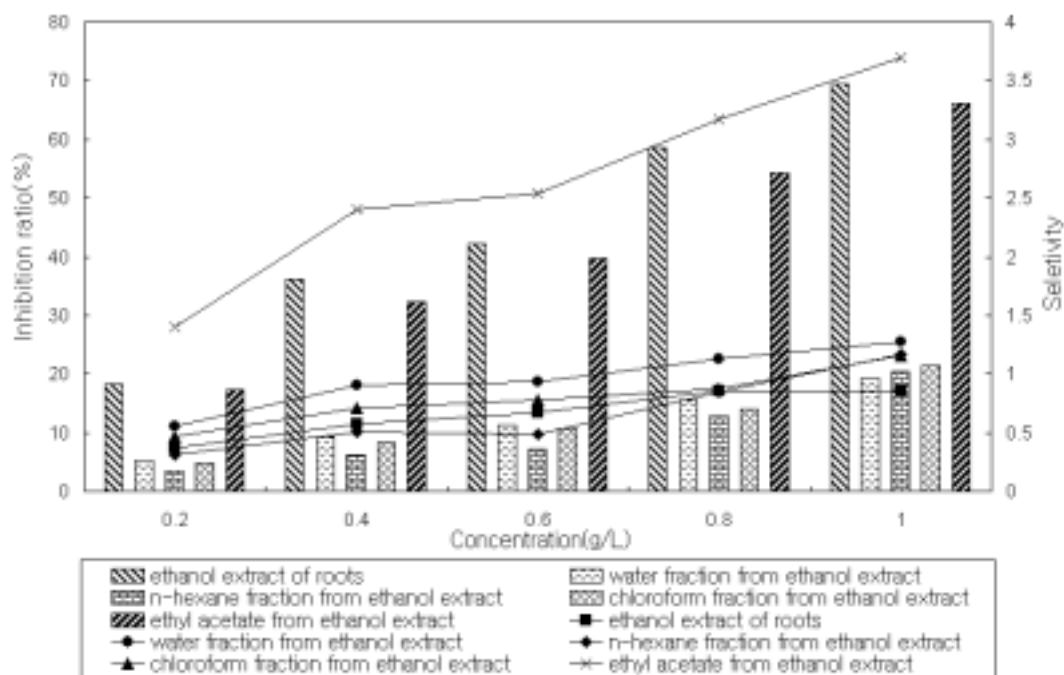


Fig. 28. Inhibition ratio of growth of MCF7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fraction from ethanol extract of roots in *Fatsia japonica*.

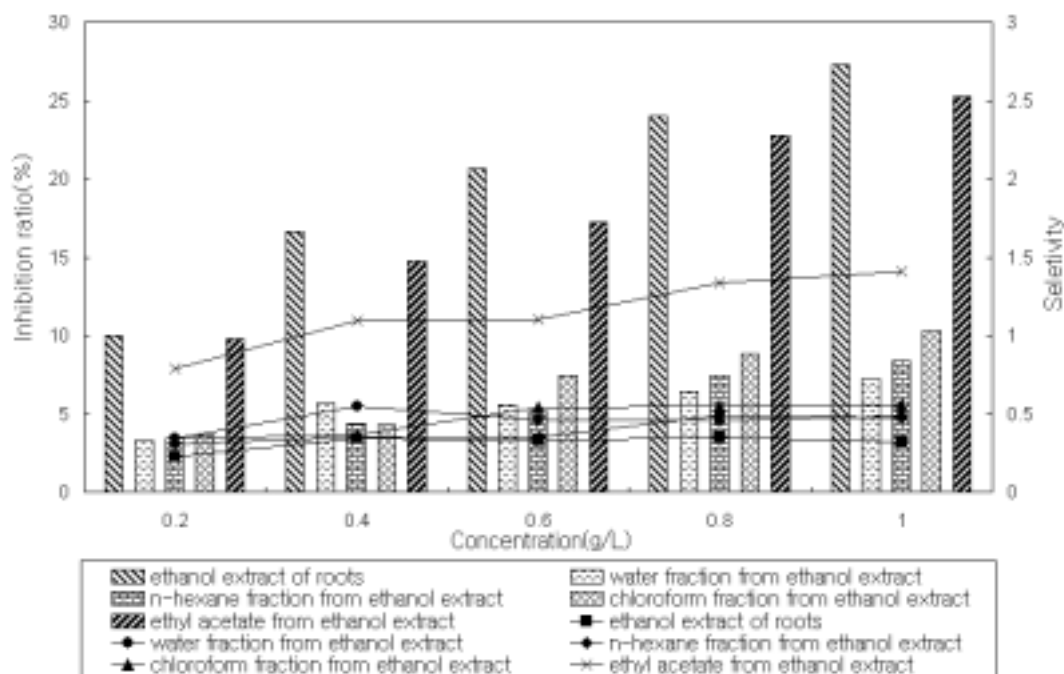


Fig. 29. Inhibition ratio of growth of Hep3B (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fraction from ethanol extract of roots in *Fatsia japonica*.

3) 면역증진 및 cytokine 분비량 측정

Fig. 30. 와 Fig. 31. 은 팔손이 근피의 에탄올 추출물을 n-hexane과 chloroform, ethyl acetate, water 층 순으로 1차 분획을 하였고 이를 이용한 T cell 과 B cell 의 생육활성을 나타낸 그래프이다. 각각의 분획물의 농도에 대한 면역 세포의 생육활성은 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며 에틸아세테이트 층이 각 T cell과 B cell의 생육활성도에 있어서 140%이상의 활성도를 나타내고 있다. 앞서 살펴본 분획물의 항암 활성 실험에서 살펴본 바와 같이 분획물의 면역 활성에 있어서도 조출물에 비해 T cell과 B cell이 20~40% 정도 낮은 활성도를 나타내고 있으며 각각의 분획물들은 서로 상승효과를 통하여 조출물의 면역활성도를 증가시키는 것으로 생각된다

Fig. 32 과 Fig. 33는 근피 에탄올 추출물의 1차 분획에 의한 분획물들의 생육도를 측정한 그래프이다. 각 조출물과 근피의 에탄올 추출 분획물에서 생육도가 전체적으로 6일을 최고점으로 하여 증가하다가 그 이후 감소하는 것을 알 수 있다. 그 중 가장 높은 활성을 보이는 것은 근피의 에탄올 추출물이었으며 6일째 되는 날에는 13×10^4 cells/L 로서 다른 추출물에 비해 20%이상의 생육도의 증가를 보이는 것을 알 수 있었다. 특히 근피와 수피는 다른 조출물과 비교하여 가장 높은 세포 증가를 보였으며 분획물의 생육도 증가에 있어서도 에틸아세테이트 층의 두드러진 활성변화를 확인할 수 있었다.

T cell과 B cell의 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량 측정 실험에서 근피의 에탄올 분획물을 이용하였고 각각의 IL-6와 TNF- α 를 cytokine kit를 이용하여 측정하였다. 앞선 면역활성 실험에서와 같이 분획물에 의한 cytokine의 양의 변화는 근피의 에탄올 조 추출물이 높게 나타났으며 5일째 되는 T cell의 에탄올 조추출물이 123 pg/ml 로 가장 높게 나타났으며 에틸아세테이트 분획물이 근피 에탄올 조출물과 비교하여 가장 비슷한 분비량을 나타냈으며 물층의 분획물이 가장 낮은 89와 99 pg/ml를 나타내었다.

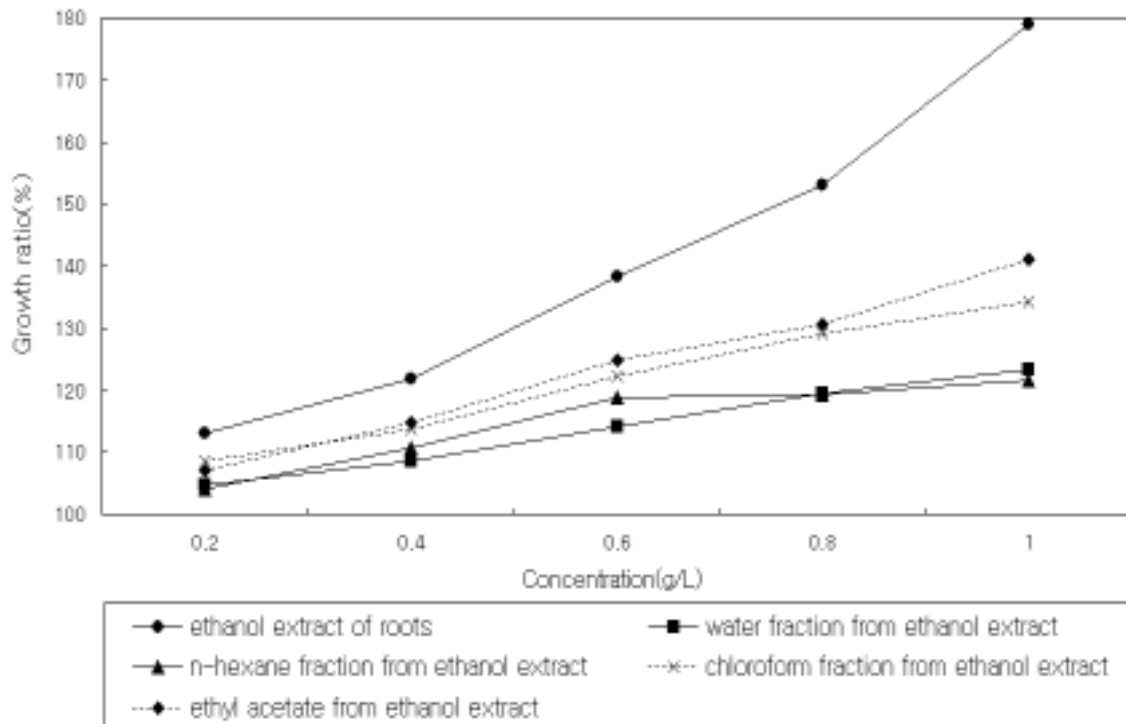


Fig. 30. The growth of human T cell(Jurkat) in adding the fraction from ethanol extract of roots in *Fatsia japonica*

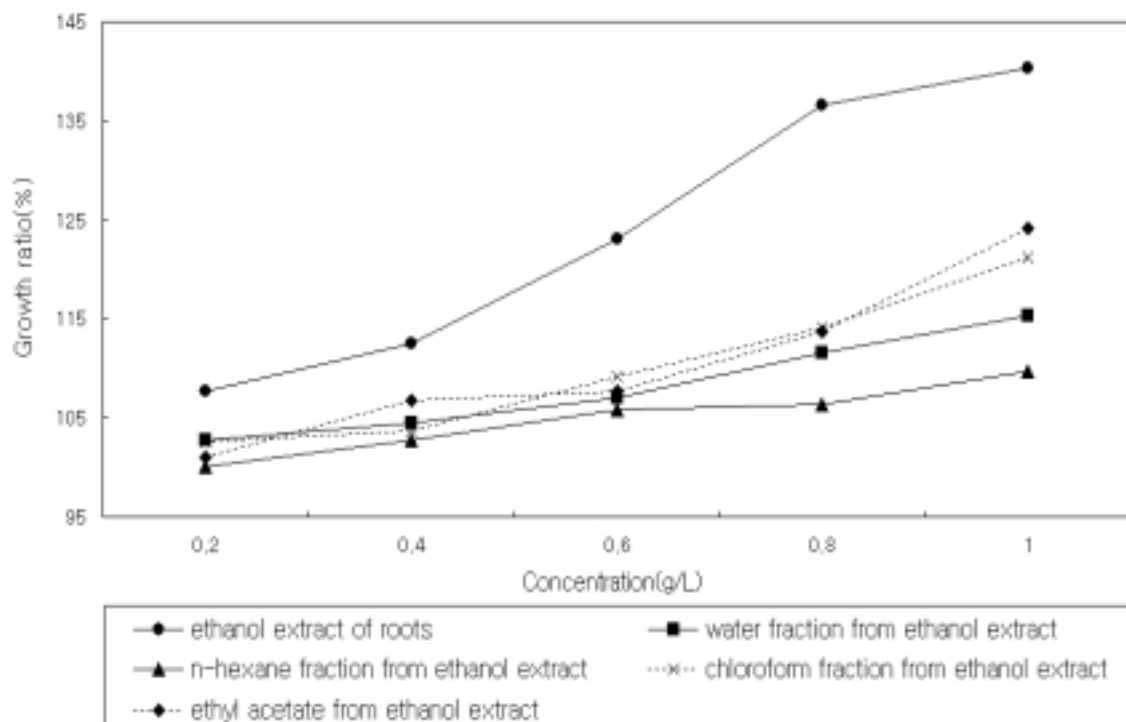


Fig. 31. The growth of human B cell(Raji) in adding the fraction from ethanol extract of roots in *Fatsia japonica*

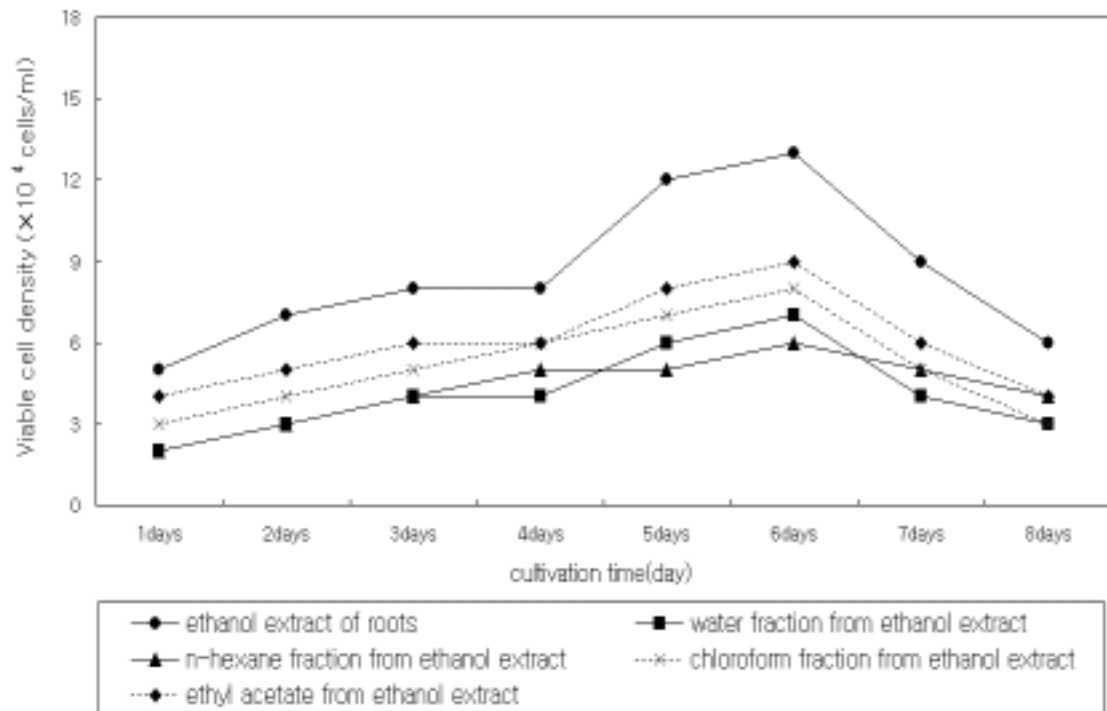


Fig. 32. The growth of viable cell density of human T cell in adding the fraction from roots extract of *Fatsia japonica*

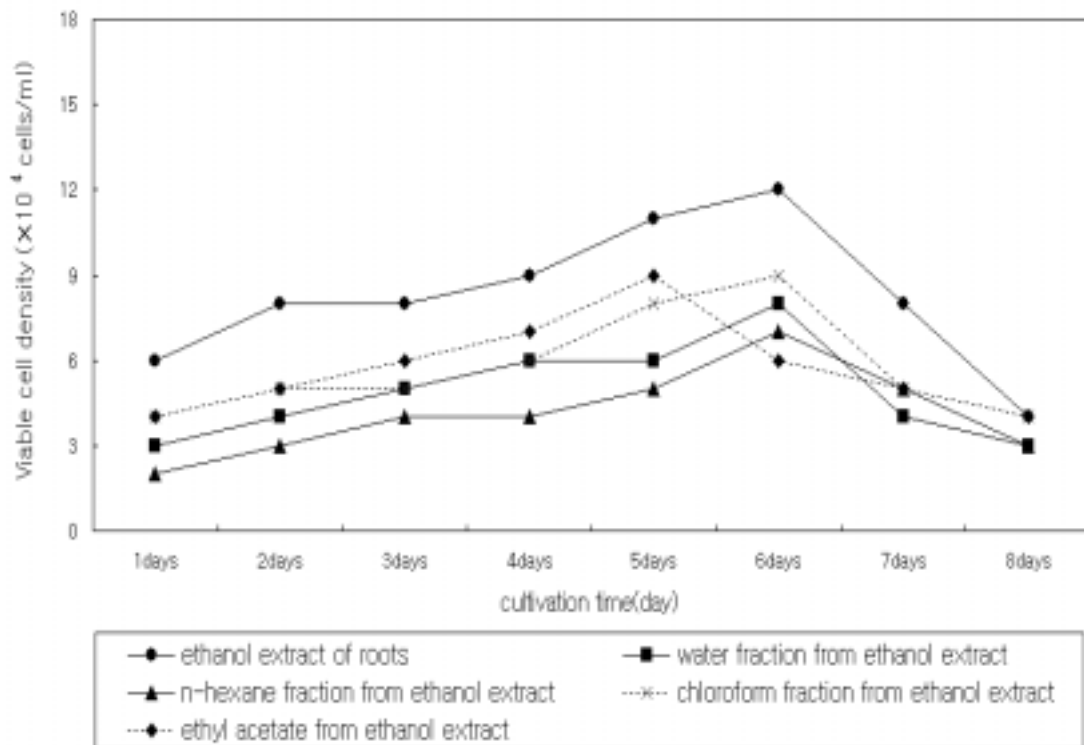


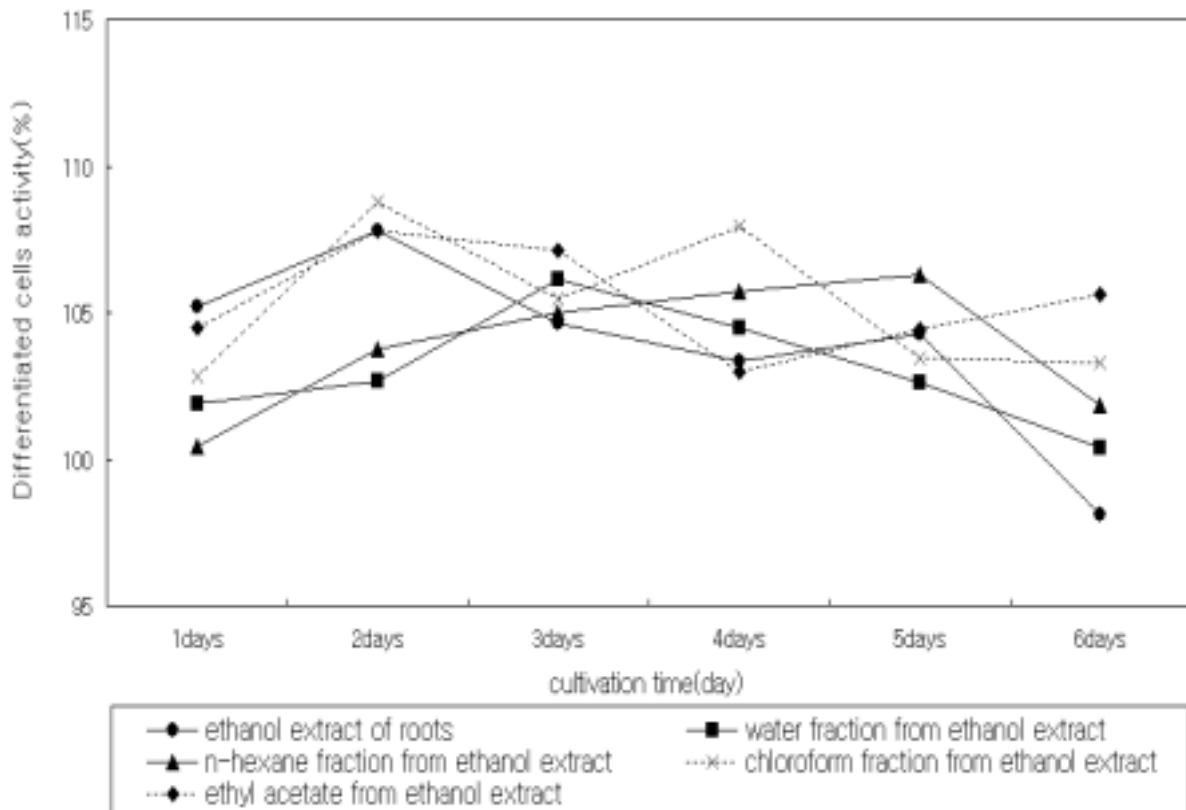
Fig. 33. The growth of viable cell density of human B cell in adding the fraction from ethanol extract of roots in *Fatsia japonica*

Table. 11. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell(Raji) and T cell(Jurkat) cultured in the fractions and ethanol extract from roots of *Fatsia jopnica*

Roots of	time (day)	cell line			
		B cell(pg/ml)		T cell(pg/ml)	
Fatsia japonica		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
	1	35	46	38	51
	2	48	57	49 ^a	63
Ethanol extract	3	63	71	61	75
	4	78	89	77	89
	5	95	112	96	123
Water fraction of	1	33	42	35	49
ethanol extract	2	41	50	43	55
	3	59	52	61	64
	4	66	71	72	78
	5	82	94	89	99
n-hexane fraction of	1	33	43	36	47
ethanol extract	2	42	52	38	51
	3	58	55	57	66
	4	65	76	68	70
	5	84	89	90	102
Chloroform fraction of	1	32	42	40	51
ethanol extract	2	39	44	51	55
	3	47	51	66	69
	4	61	69	82	74
	5	88	101	103	96
Ethyl acetate fraction	1	32	44	38	50
of ethanol extract	2	34	45	51	59
	3	59	53	57	74
	4	64	74	81	91
	5	92	99	92	122
control(no addition)		32	42	36	46

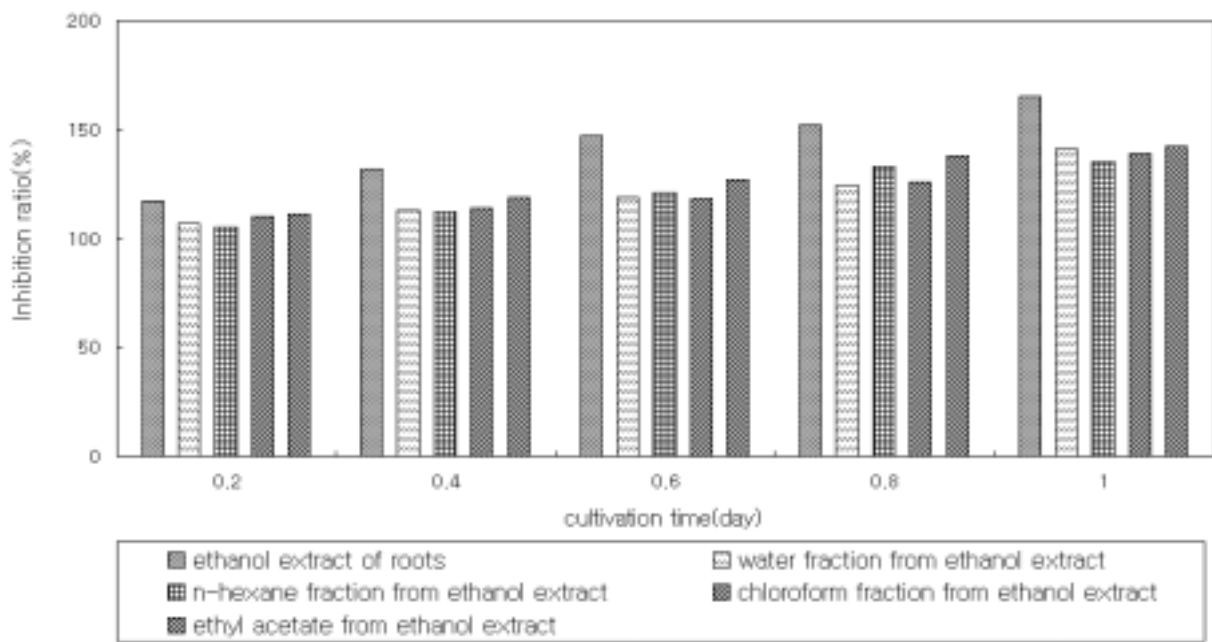
4) 세포 분화도 측정

Fig. 34.는 근피의 에탄올 추출물의 분획물에 대한 분화 활성도를 살펴본 그래프이다. 근피의 분화 활성도와 비교해서 분획물의 분화 활성도는 에틸 아세테이트 층의 시료가 약 5%정도 높게 나오는 것을 확인 할 수 있었으며 시간의 경과에 따라 근피의 조출물은 분화도가 낮아지는 반면에 나머지 분획물은 꾸준한 분화도의 변화를 보이고 있다.



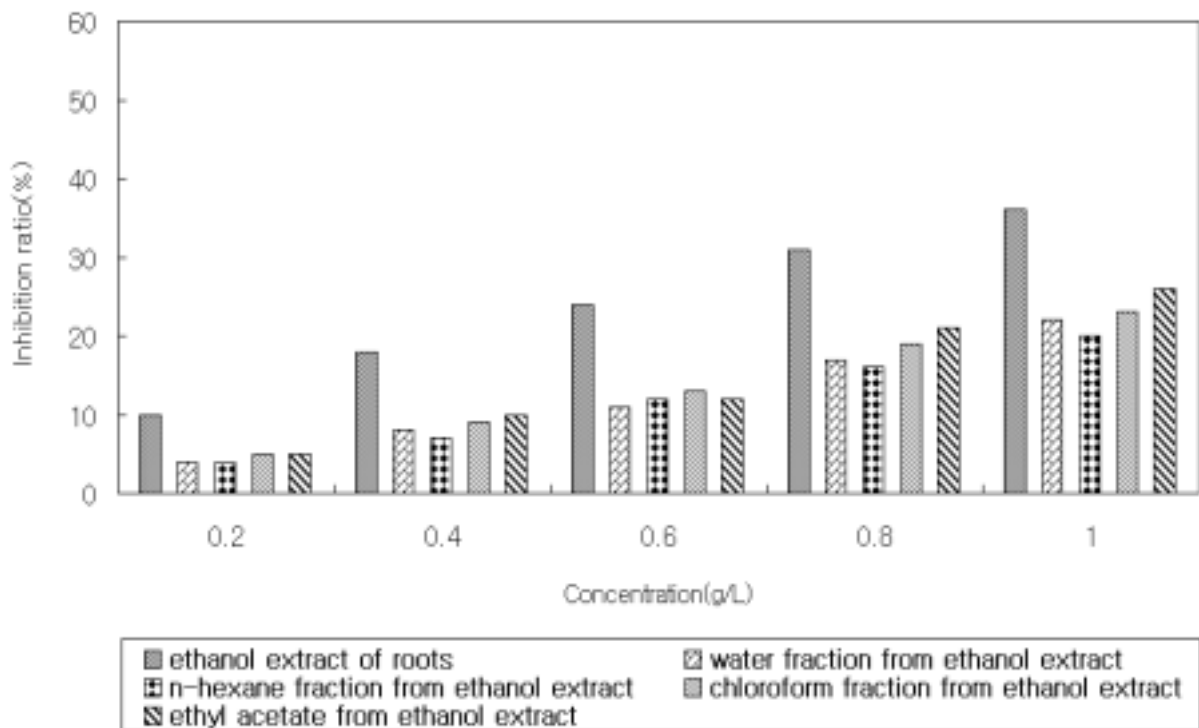
5) 간기능 관련 생리 활성추정(해독작용 - Glutathione S-transferase 추정)

Fig. 35는 분획물에 의한 간기능 활성도를 나타낸 그래프이며 각 분획물의 활성도는 근피의 에탄올 추출물보다 현저히 낮은 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었으며 각 분획물 자체의 활성도를 증대를 꾀하는 것보다는 근피의 조출출물에 의한 조출물의 활성도의 상승효과를 바라볼 수 있을 것으로 생각된다.



6) Angiotension Converting Enzyme (고혈압) 억제 활성

Fig. 36.는 근피의 에탄올 추출물의 분획을 통해 ACE의 억제활성을 살펴보았다. 앞선 다른 생리 활성 실험허의 결과와 유사하게 근피과 수피의 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 특히 에탄올을 이용한 추출물들이 다른 용매에 비해 20%정도 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 분획물 또한 근피의 에탄올 추출물보다 낮은 활성을 나타냈고 이는 각 분획물의 활성도 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다.



F

제 4 절 팔손이 내 유용물질 추출, 분리 및 정제

1. 실험내용

가. 공시재료 채취

실험에 사용된 수종으로는 2002년 11월 국립산림과학원 난대림시험장(제주도 서귀포시 상호동 1253)에서 채취한 수령 5년생(흉고직경 10 cm 이하)의 팔손이(*Fatsia japonica*)를 사용하였다.

나. 추출 및 용매분획

팔손이의 수피는 박피하여 음건 후 아세톤(ME_2CO) 추출물을 석유에테르(petroleum ether), 디클로로메탄(dichloromethane: CH_2Cl_2 , 34.76 g), 에틸아세트(ethyl acetate: EtOAc, 9.20g), 부탄올(buthanol) 등의 용매를 사용하여 순차 연속추출하여 분획 하였다.

또한 팔손이의 목부는 박피 후 분쇄하여 분말화 한 시료를 아세톤(ME_2CO)으로 추출하였으며, 여기서 얻어진 조추출물을 석유에테르(petroleum ether), 디클로로메탄(CH_2Cl_2 , 10.78 g), 에틸아세트(EtOAc, 2.13 g), 부탄올(BuOH) 등의 용매로 순차연속 추출하여 분획 하였다.

다. 기기분석

분리한 화합물들의 구조를 밝히기 위해 핵자기공명(NMR) 스펙트럼(1H - ^{13}C -NMR, 1H - 1H COSY, HMQC, HMBC)은 한국기초과학 지원연구원의 Varian UI 500, 그리고 질량(MS) 스펙트럼은 국립산림과학원의 JEOL JMS-600W를 이용하여 측정 하였다.

라. 화합물의 분리·정제

1) 팔손이 수피(stem) 화합물의 분리 및 구조동정

가) 화합물 1

팔손이 수피의 EtOAc 분획물의 FBE-2 분획물(1.36 g)을 CHCl_3 -MeOH (5:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel column (6.0 × 44 cm) 크로마토그래피에 의해 5개의 분획물(FBE-2-1~FBE-2-5)로 나누었다. 이 중 FBE-2-2 분획물(391.3 mg)을 용출용매 benzene-EtOAc (1:1, v/v)을 이용한 실리카겔 컬럼(5.0 × 40 cm) 크로마토그래피하여 5개의 분획물(FBE-2-2-1~FBE-2-2-5)로 나누었으며, 이 중 FBE-2-2-2로부터 화합물 1 (126.6 mg)를 얻었다.

2) 팔손이 목부 화합물의 분리 및 구조동정

가) 화합물 2

팔손이 목부의 에틸아세트(EtOAc) 가용부(2.12 g)를 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피 (5.0 × 40 cm)에서 용출용매 MeOH-EtOH (1:1, v/v)를 사용하여 4개의 분획물(FWE-1~FWE-4)로 나누었으며, 이 중 세 번째 FWE-3 분획물(114.5 mg)로부터 benzene-MeOH (5:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel column (5.0 × 37 cm)를 이용하여 4개의 분획물(FWE-3-1~FWE-3-3)로 나누었다. 다시 분획물 FWE-3-2 (65.2 mg) 분획물을 용출용매 benzene-MeOH (5:1, v/v)를 사용한 silica gel column (5.0 × 30 cm)으로 3개의 분획물(FWE-3-2-1~FWE-3-2-3)로 나누었으며, 이 중 FWE-3-2-2 분획물에서 화합물 2 (64.2 mg)를 분리하였다.

3) 팔손이 열매 화합물의 분리 및 구조동정

가) 화합물 3

팔손이 열매의 EtOAc 가용부 6g에 대해 Sephadex LH-20 resin을 이용하여 MeOH 100%를 이용하여 컬럼크로마토그래피(50 × 600 mm)를 실시하였다. 60 ml씩 분취하여 70개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FFE-I ~ V)으로 나누었다. 분획(FFE-II)을 클로로포름(CHCl₃): MeOH (7:1 v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼크로마토그래피(30 × 360 mm)를 이용하여 30 ml씩 분취하여 130개의 분취물을 얻었으며 이를 9개의 분획(FFE-II-I ~ FFE-II-IX)으로 나누었다. 이중 두 번째 분획(FFE-II-II)을 전개용매 클로로포름(CHCl₃) : MeOH (5 : 1, v/v)로 사용한 prep. TLC를 이용하여 백색분말의 화합물 3 (40.0 mg)을 분리하였다.

나) 화합물 4

팔손이 열매의 EtOAc 가용부 6g에 대해 sephadex LH-20 resin을 이용하여 MeOH 100%를 이용하여 컬럼크로마토그래피(50 × 600 mm)를 실시하였다. 분취물로는 60 ml씩 분취하여 70개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FFE-I ~ FFE-I V)으로 나누었다. 다시 분획물(FFE-II)을 클로로포름(CHCl₃): MeOH (7:1 v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼크로마토그래피(30 × 360 mm)를 이용하여 30 ml씩 분취하여 130개의 분취물을 얻었으며 TLC에 전개시켜 확인한 후, 이를 9개의 분획(FFE-II-I ~,FFE-II-IX)으로 나누었다. 이중 네 번째 분획물(FFE-II-VI)에서 CHCl₃ : MeOH : H₂O (15 : 6 : 0.6 v/v/v)을 전개용매로 사용하여 prep. TLC를 하여 화합물 4를 190 mg을 분리하였다.

다) 화합물 5

팔손이 열매의 부탄올(Buthanol, BuOH) 가용부 42.0 g에 대해 CHCl₃ : MeOH : H₂O (15 : 6 : 1, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(60 × 400 cm)을 이용하여 150

ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 6개의 분획(FFB-I, VI)으로 나누었다. 분획 4(FFE-IV)를 에칠아세테이트(EtOAc) : 부탄올(BuOH) : H₂O (8 : 2 : 1, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(3 × 36 cm)를 이용하여 30 ml씩 분취하여 130개의 분취물을 얻었으며 이를 3개의 분획(FFB-IV-I ~ FFB-IV-III)으로 나누었다. 이 중 두 번째 분획물(FFB-IV-II)에서 CHCl₃ : MeOH : H₂O (10 : 6 : 1, v/v/v)을 전개용매로 prep TLC를 하여 화합물 8를 29 mg을 단리하였다.

라) 화합물 6

팔손이 열매의 EtOAc 가용부 6.0 g에 대해 sephadex LH-20 resin을 이용하여 MeOH 100%를 이용하여 컬럼크로마토그래피(50 × 600 mm)를 실시하였다. 60 ml씩 분취하여 70개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FFE-I ~ FFE-V)으로 나누었다. 분획(FFE-II)을 클로로포름(CHCl₃): MeOH (7:1 v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼크로마토그래피(30 × 360 mm)를 이용하여 30 ml씩 분취하여 130개의 분취물을 얻었으며 이를 9개의 분획(FFE-II-I ~ FFE-II-IX)으로 나누었다. 이 중 8 번째 분획물(FFE-II-VIII)에서 CHCl₃ : MeOH (5 : 1, v/v)을 전개용매로 prep. TLC를 하여 백색분말의 화합물 5를 20.0 mg을 분리하였다.

마) 화합물 7

팔손이 열매의 부탄올(Buthanol) 가용부 42.0 g에 대해 CHCl₃ : MeOH : H₂O (15 : 6 : 1, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(60 × 400 cm)을 이용하여 150 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 6개의 분획(FFB-I ~ FFB-VI)으로 나누었다. 이 중 2번 분획물 (FFB-II)을 클로로포름(CHCl₃): acetone : MeOH : H₂O (15 : 10 : 5 : 1, v/v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼크로마토그래피(30 × 360 mm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FFB-II-I ~ FFB-II-V)으로 나누었다. 이 중 두 번째 분획(FFB-II-II)을 전개용매 에칠아세테이트(EtOAc) : 부탄올(BuOH) : H₂O (4 : 2 : 1, v/v/v)로 prep. TLC를 이용하여 백색분말의 화합물 7은 27.0 mg을 단리하였다.

바) 화합물 8

팔손이 열매의 Buthanol 가용부 42.0 g에 대해 CHCl_3 : MeOH : H_2O (15 : 6 : 1, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(60×400 cm)을 이용하여 150 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 6개의 분획(FFB-I ~ FFB-VI)으로 나누었다. 분획2 (FFE-II)을 클로로포름(CHCl_3) : acetone : MeOH : H_2O (15 : 10 : 5 : 1 v/v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(30 × 360 mm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FFB-II-I ~ FFB-II-V)으로 나누었다. 이중 두 번째 분획(FFB-II-IV)을 전개용매 에칠아세테이트(EtOAc) : 부탄올(BuOH) : H_2O (4 : 2 : 1, v/v/v)에 전개시켜 prep. TLC를 이용하여 백색분말의 화합물 8를 54.0 mg을 단리하였다.

4) 팔손이 뿌리 화합물의 분리 및 구조동정

가) 화합물 9

팔손이 뿌리의 CH_2Cl_2 분획물(FRD)을 MeOH에 녹여 여과한 후 여과물 FRD-1과 여과액 FRD-2를 얻었으며, 여과액인 FRD-2 (100.0 g)를 Sephadex LH-20 column (6.5 × 63.0 cm, MeOH)으로 100 ml씩 분취, 45개의 분취물을 얻어, 이들 분취물들을 4개의 분획물(FRD-2-1 ~ FRD-2-4)로 나누었다. FRD-2-2 분획물(20.0 g)을 silica gel column (4.5 × 50.0 cm, CHCl_3 -MeOH = 20:1, v/v)으로 20.0 g씩 분취한 뒤 1100개의 분취물을 얻어, 15개의 분획물(FRD-2-2-1 ~ FRD-2-2-15)로 나누고, FRD-2-2-10 (310.0 mg)에 대해 다시 silica gel column (2.5 × 40.0 cm, CHCl_3 -MeOH = 7:1, v/v)으로 6.0 g씩 분취, 100개의 분취물을 얻어, 3개의 분획물(FRD-2-2-10-1 ~ FRD-2-2-10-3)로 나누었다. 이중 FRD-2-2-10-2 분획물 (112.0 mg)을 Sephadex LH-20 column (2.5 × 25.0 cm, acetone)으로 정제하여 화합물9 (50.0 mg)를 단리하였다.

나) 화합물 10

팔손이 뿌리의 FRD-2-2-9 분획물 (2.78 g)에 대해 silica gel column (3.5 × 27.0 cm, benzen-MeOH = 5:1, v/v)을 사용하여 7.0 g씩 분취, 100개의 분취물을 얻어, 3개의 분획물 (FRD-2-2-9-1~FRD-2-2-9-3)로 나누고, 이중 FRD-2-2-9-2 (1.52 g)를 Sephadex LH-20 column (2.5 × 30.0 cm, acetone)으로 2.0 g씩 분취, 150개의 분취물을 얻어, 이들 분취물들을 2개의 분획물(FRD-2-2-9-2-1~FRD-2-2-9-2-2)로 나누고, 이중 FRD-2-2-9-2-2에서 화합물 10 (350 mg)을 얻었다.

다) 화합물 11

FRD-2-2-6 분획물(1.13 g)을 silica gel column (3.5 × 30.0 cm, benzene-MeOH = 5:1, v/v)으로 7.0 g씩 분취한 뒤 100개의 분취물을 얻어, 4개의 분획물(FRD-2-2-6-1~FRD-2-2-6-4)로 나누고, FRD-2-2-6-1 (351.0 mg)에 대해 Sephdex LH-20 column (2.5 × 30.0 cm, acetone)으로 2.0 g씩 분취, 120개의 분취물을 얻어, 3개의 분획물(FRD-2-2-6-1-1~FRD-2-2-6-1-3)로 나누었다.

라) 화합물 12

팔손이 뿌리의 Buthanol 가용부 80.0 g에 대해 CHCl₃ : MeOH : H₂O (20 : 8 : 0.5, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(70 × 350 cm)을 이용하여 200 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 6개의 분획(FRB- I, VI)으로 나누었다. 분획 4(FRB-IV)를 에칠아세테이트(EtOAc) : 부탄올(BuOH) : H₂O (8 : 2 : 1 v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼프로마토그래피(3.5 × 360 mm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 140개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FRB-IV-I ~FRB-IV-V)으로 나누었다. 이들 중분획 2 (FRB-IV-IV)를 40% 아세토나이트릴(MeCN)을 용출용매로 한 ODS gel 칼럼 크로마토그래피(2.5 × 150 cm)을 이용하여 10 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 4개의 분획(FFB-VI-II-I ~FFB-VI-IV)으로 나누었다. 이중 두 번째 분획물(FFB-VI-II-II)에서 CHCl₃ : MeOH

: H₂O (10 : 6 : 1, v/v/v)을 전개용매로 prep. TLC를 하여 화합물 12를 130.0 mg 단리하였다.

마) 화합물 13

팔손이 뿌리의 Buthanol 가용부 80.0 g에 대해 CHCl₃ : MeOH : H₂O (20 : 8 : 0.5, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(70 × 350 cm)을 이용하여 200 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 6개의 분획(FRB-I ~ FRB-VI)으로 나누었다. 분획물 4 (FRB-IV)를 에칠아세테이트(EtOAc) : 부탄올(BuOH) : H₂O (8 : 2 : 1, v/v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(3.5 × 360 mm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 140개의 분취물을 얻었으며 이를 5개의 분획(FRB-IV-I ~ FRB-IV-V)으로 나누었다. 이들 중분획 2 (FRB-IV-IV)를 40% 아세토나이트릴(MeCN)을 용출용매로 한 ODS gel 칼럼 크로마토그래피(2.5 × 150 cm)을 이용하여 10 ml씩 분취하여 100개의 분취물을 얻었으며 이를 4개의 분획(FRB-IV-IV-I, II, III, IV)으로 나누었다. 이 중 세 번째 분획물(FRB-IV-IV-III)에서 CHCl₃ : MeOH : H₂O (10 : 6 : 1, v/v/v)을 전개용매로 prep. TLC를 하여 화합물 13를 68.0 mg을 단리하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 팔손이 수피(stem) 화합물의 분리 및 구조 동정

1) 화합물 1

화합물 1은 EI-MS 스펙트럼에서 분자량 및 베이스 이온이 m/z : 154 (M⁺ base ion)를 나타냈으며, 주요한 이온피크로는 m/z 136, 109 등을 나타냈다. 화합물 1의 ¹H-NMR 스펙트럼에서는 간단한 2개의 시그널만이 나타났으며, 6.80에 1H를 나타내는 doublet의 시그널은 그 결합정수가 $J = 8.0$ Hz를 나타내어 H-5번 프로톤에 귀속하였다. 또한 7.43에서 보이는 2H분의 시그널의 결합정수도 각각 $J = 2.0$ Hz, 8.0 Hz로 나타나 H-2 및 H-6번 프로톤에 귀속하였다. 또한 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 115.76는 C-5, 117.73은 C-2, 123.90는 C-6에 각각 기인한다.

170.21은 C-7의 카복실릭 탄소에 귀속하였다. 이상의 분석결과 화합물 1은 3, 4-dihydroxybenzoic acid로 동정하였다(Fig. 37).

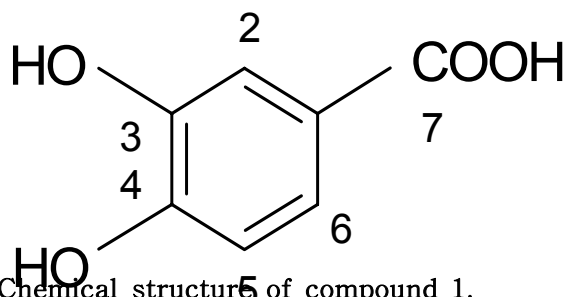


Fig. 37. Chemical structure 5 of compound 1.

나. 팔손이 목부 화합물의 분리 및 구조동정

1) 화합물 2

팔손이 목부의 EtOAc 가용부로부터 분리된 화합물 2는 노란색 분말상태로 얻어졌으며, TLC상 팔손이 목부부분의 주요성분의 하나로 생각되었다. 화합물 I의 EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온 피크(M^+)가 m/z 244, CI-MS에서는 245 $[M + H]^+$ 를 나타냈으며, 아세틸화에 의한 tetraacetate I a의 EI-MS에서는 분자이온 피크(M^+)가 m/z 412를 나타내, 화합물 2에는 수산기가 4개 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 1H -NMR 스펙트럼에서는 6.88 ppm (1H, $J = 16.5$ Hz)과 7.32 ppm (1H, $J = 16.5$ Hz)의 2개의 doublet 시그널은 stilbene부분구조의 7위 및 8위의 proton에 유래하는 것으로, 그 결합정수로부터 *trans* 형태의 olefinic proton의 존재를 나타내고 있다. 또한, 6.23 ppm (1H, *t*, $J = 2.0$ Hz) 및 6.51 ppm (2H, *d*, $J = 2.0$ Hz)의 3개의 시그널은 전형적인 1, 3, 5- 치환 벤젠핵의 존재를, 그리고 6.37 ppm (1H, *dd*, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz), 6.43 ppm (1H, *d*, $J = 2.5$ Hz) 및 7.39 ppm (1H, *d*, $J=8.5$ Hz)의 3개의 시그널은 특징적인 1', 2', 4'- 치환 벤젠핵의 존재를 시사하고 있다. 또한, 화합물 I의 ^{13}C -NMR에서는 합계 12개의 시그널이 나타났으며, 이중 126.32 ppm 및 124.35 ppm 피크는 stilbene부분구조 중의 C-7위 및 C-8위의 탄소에 각각 귀속하였다. 그밖에 1H - 1H COSY, DEPT, HMQC, HMBC 등의 분석결과, 화합물 2는 2', 3, 4', 5 - tetrahydroxystilbene, 즉 oxyresveratrol로 동정하였다(Fig. 38).

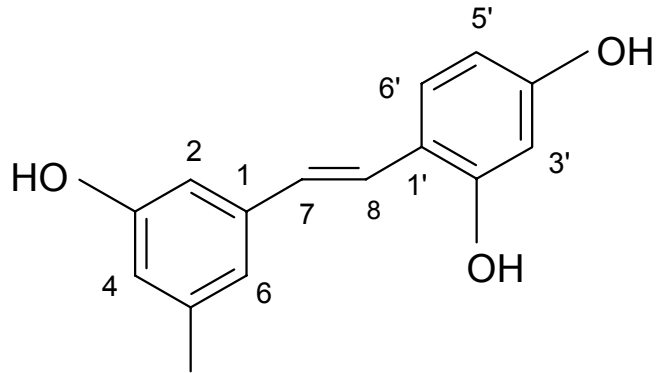


Fig. 38. Chemical structure of compound 2.

다. 팔손이 열매 화합물의 분리 및 구조 동정

1) 화합물 3

팔손이 열매의 EtOAc 가용부로부터 분리된 화합물 3은 백색의 분말상태로 얻어졌으며, TLC상 팔손이 열매부분의 주요성분의 하나로 생각되었다. 화합물 3의 FAB-MS에서는 분자이온을 $m/z : 604 [M]^+$ 를 나타냈다.

화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6개의 메틸기의 존재를 나타내는 케미칼시프트 (0.93, 0.95, 0.96, 1.01, 1.04, 1.25)가 나타났다. 10개의 메틸렌기의 존재를 나타내는 멀티플렛의 케미칼시프트가 1.08-2.32에 나타났다. 3개의 메틸기의 존재를 나타내는 케미칼 시프트가 1.68-1.81에 나타났다. oxygen을 포함하는 3급 탄소의 메틴 프로톤의 케미칼시프트가 3.29, 3.30(dd, 10.0 Hz)에서 나타났다. 또한, 하나의 하이드록실기를 포함하는 메틸렌 프로톤이 3.67 (t)에서 나타났다. 이중결합의 메틴프로톤의 케미칼시프트가 5.52(t)에서 나타났다. 4개의 하이드록실기를 포함하는 케미칼시프트(4.03-5.00)는 5탄당이 존재를 나타낸다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 data로부터 화합물 3은 트리테르페노이드의 배당체 화합물임이 추정되었다.

화합물 3의 $^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT로부터 6개의 메틸기(13.5, 16.0, 17.5, 23.8, 26.2, 33.3), 10개의 메틸렌기(18.1-39.7), 3개의 메틸기(46.5, 47.5, 48.1), oxygen을 포함하는 메틸기(

81.1), 하이드록실기를 포함하는 메틸렌기(64.5), 이중결합의 메틴기(122.5) 시그널의 존재는 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 결과와 일치하였다. 180.5의 시그널의 존재는 카르복실기를 나타내며, 이중결합의 4급탄소를 나타내는 시그널(144.9), 6개의 4급탄소를 나타내는 시그널이 30.9, 36.9, 39.7, 42.1, 43.4, 46.7에서 각각 나타났다. 또한 106.7, 73.1, 74.7, 69.6과 70.0의 시그널은 5탄당의 존재를 나타내고, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 결과와 일치하였다.

$^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 3.29, 3.30의 시그널은 2.00의 메틸렌 프로톤과 상관, 2.00의 메틸렌 프로톤은 1.59의 메틸렌 프로톤과의 상관관계가 존재하였고, 이들은 서로 인접하여 있음을 나타내고 있다. 또한, 5.52 (t)의 이중결합 메틴프로톤이 1.96 (m)의 메틸렌 프로톤과의 상관, 1.96 (m) 메틸렌 프로톤과 1.81의 메틴 프로톤과의 상관을 나타냈고, 이들은 서로 인접하여 있음을 나타내고 있다. 1.68 (m)의 메틴프로톤과 1.30 (m)의 메틸렌 프로톤과의 상관관계의 존재로 서로 인접하고 있음을 나타내고 있다. 1.70(m) 메틴 프로톤과 1.39 메틸 프로톤과의 상관, 1.39 메틸 프로톤과 1.62 메틸프로톤과의 상관관계로 서로 인접함을 나타내고 있다. 2.16 메틸렌 프로톤과 1.96 메틸렌 프로톤과의 상관, 2.05 메틸렌 프로톤과 1.83 메틸렌 프로톤과의 상관관계는 각각 서로 인접하고 있음을 나타내고 있다. 또한, 5탄당을 나타내는 시그널의 상관관계로 arabinose로 추정되어, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼의 데이터를 문헌상의 데이터와 비교하여 arabinose임을 확인하였다.

HMBC 스펙트럼으로부터, 43.5의 4급탄소와 1.39, 1.59, 2.00의 메틸렌 프로톤, 1.70, 3.29, 3.30의 메틴프로톤, 0.93의 메틸프로톤, 3.67의 하이드록실기를 포함하는 메틸렌 프로톤과의 상관관계가 나타났다. 39.7의 4급탄소와 1.62 메틸렌 프로톤, 1.81 메틴 프로톤, 1.04 메틸 프로톤과의 상관관계가 나타났다. 36.9의 4급탄소와 1.59, 1.96, 2.00 메틸렌 프로톤, 1.70, 1.81 메틴프로톤, 0.95의 메틸프로톤과의 상관관계가 나타났다. 또한, 144.8의 이중결합 4급탄소와 5.52 이중결합의 메틴프로톤, 1.70 메틴프로톤, 1.24의 메틸프로톤과의 상관관계가 나타났다. 42.1의 4급탄소와 1.96, 2.16 메틸렌 프로톤, 1.24의 메틸프로톤과의 상관관계가 존재하였다. 46.6의 4급탄소와 1.83, 1.96, 2.05, 2.16 메틸렌 프로톤, 1.68 메틴프로톤과의 상관, 30.9의 4급탄소와 1.30, 1.83, 2.05, 메틸렌 프로톤, 1.68 메틴프로톤, 0.94, 1.03 메틸프로톤과의 상관이 각각 나타났다. 또한, 180.1의 카르복실기의 탄소는 2.05의 메틸렌 프로톤과의 상관관계를 나타내고 있다. 상관관계의 결과로부터 화합물 3은 5원환을 가진 트린테르페노이드 화합물이며, oleanan 형태를 지닌 화합물로서 탄소 3번에 당이 결합된 배당체의 화합물로 추정되었다.

위의 결과들로부터 화합물 3은 탄소 3번에 arabinose당이 결합된 oleanan 형태의 트리테르

페노이드 배당체인 hederagenin 3-O- -L-arabinopyranoside 로 구조해석하였으며, 문헌과 비교한 결과, 화합물 3은 기지화합물로서 Cauloside A로 동정하였다(Fig. 39~43).

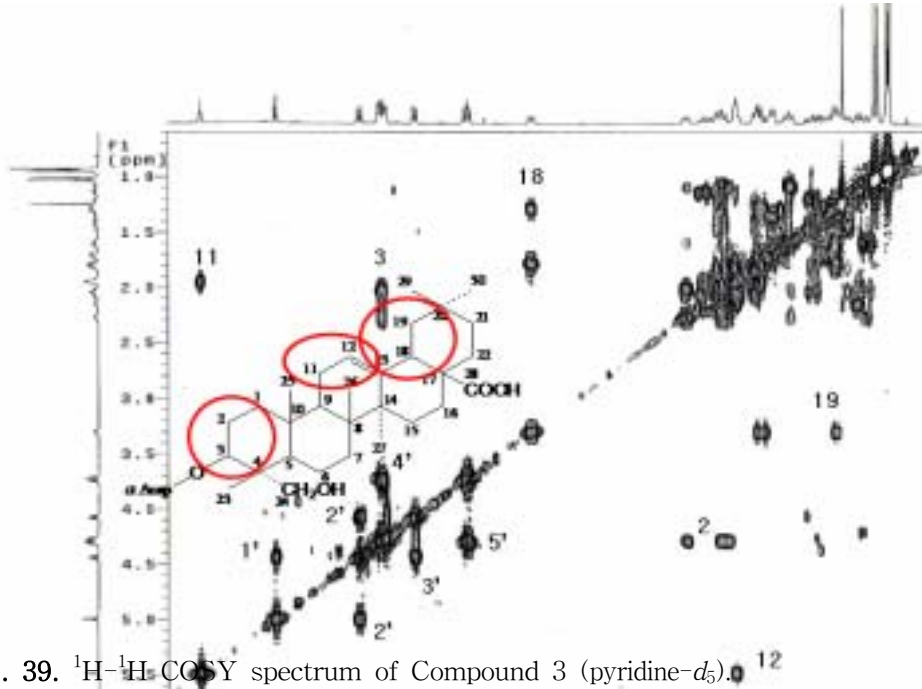


Fig. 39. ^1H - ^1H COSY spectrum of Compound 3 (pyridine- d_5).

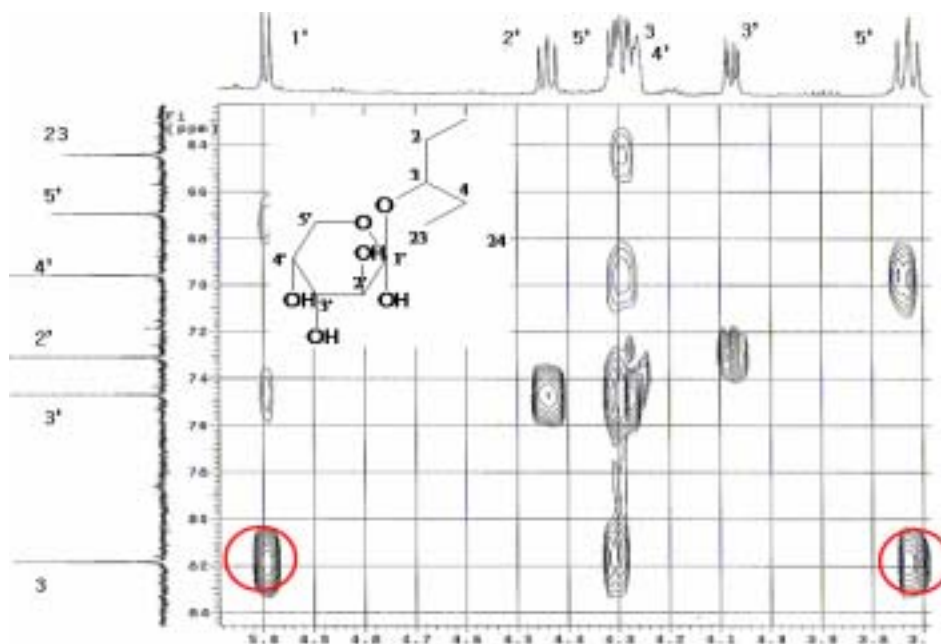


Fig. 40. HMBC spectrum of Compound 3 (pyridine- d_5).

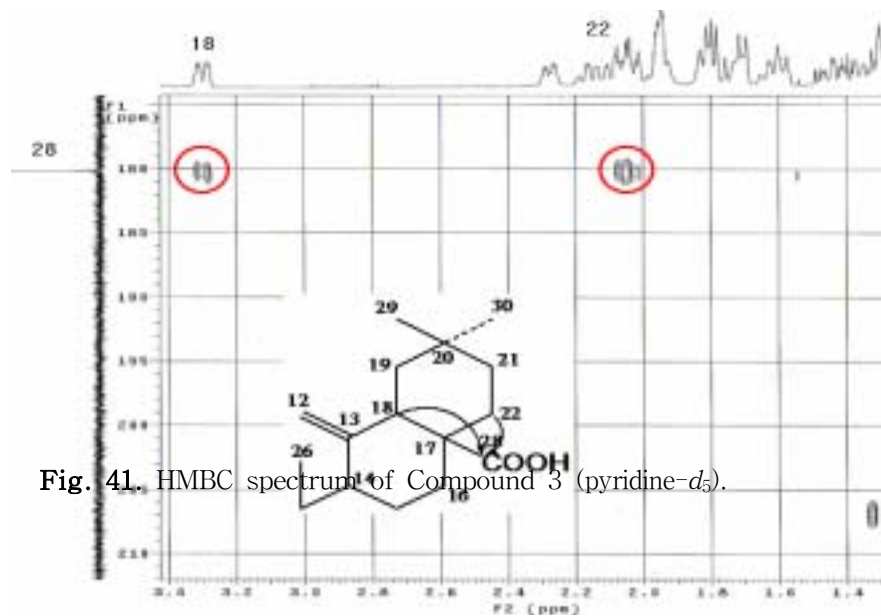
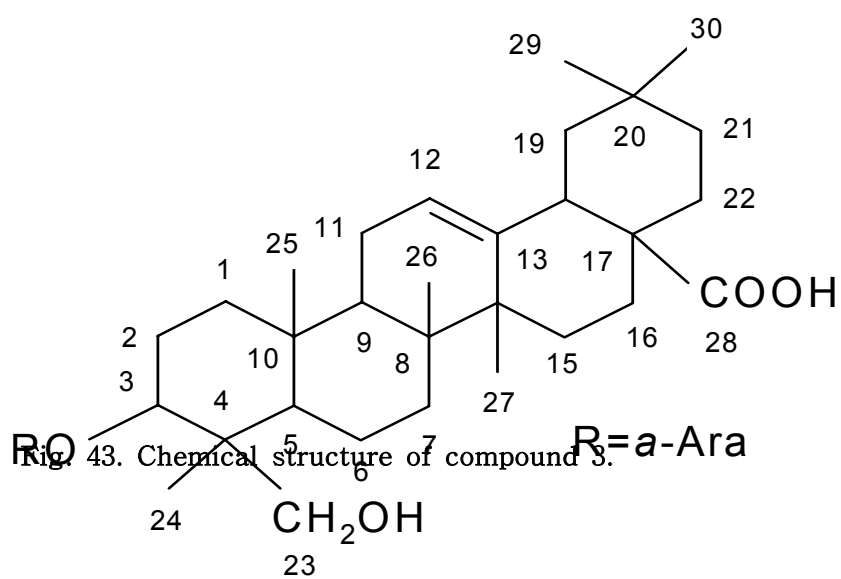
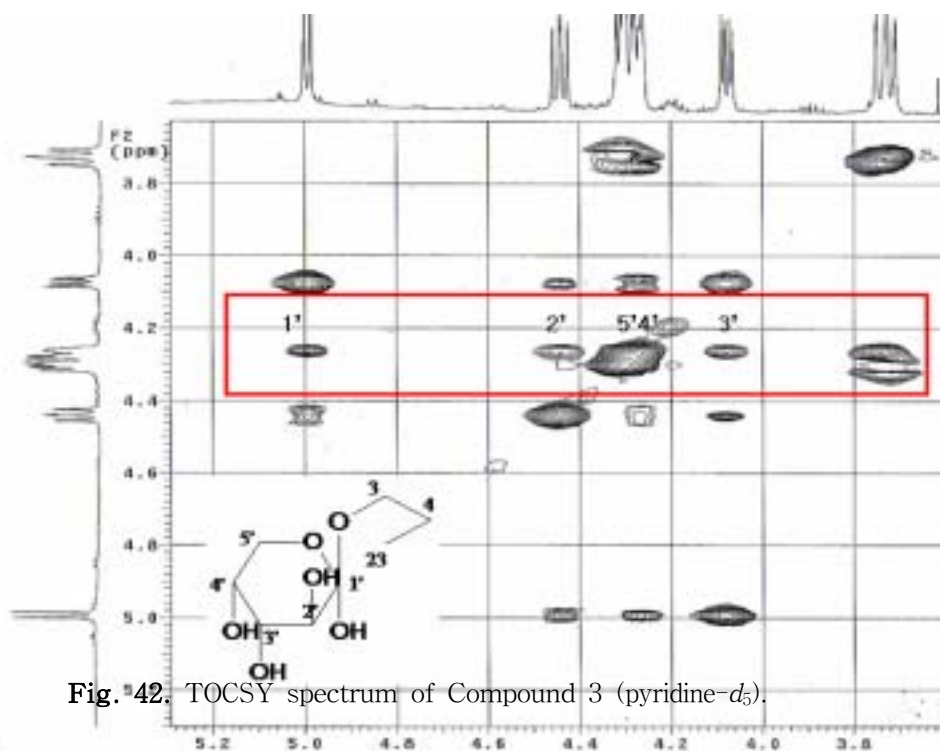


Fig. 41. HMBC spectrum of Compound 3 (pyridine- d_5).



2) 화합물 4

팔손이 열매의 EtOAc 가용부로부터 단리된 화합물 4는 백색의 분말상태로 얻어졌으며, TLC 상 팔손이 열매부분의 주요성분의 하나로 생각되었다. 화합물 4의 FAB-MS : m/z : 634 [M]⁺를 나타냈다. ¹H-NMR ¹³C-NMR 스펙트럼 데이터를 화합물 3과 비교한 결과, 화합물 4는 화합물 3과 같은 hederagenin 형태의 화합물이었다. ¹³C-NMR에서 6개의 시그널은 한개의 6탄당을 나타내고 2D-NMR 분석결과, glucose로 확인되었다. 위의 결과로, 화합물 4는 화합물 3의 C-3에 arbinose가 아닌 glucose가 결합된 트리테르페노이드 배당체인 hederagenin 3-O-β-D-glucopyranoside로 구조해석 하였으며, 문헌과 비교하여 Caulosaponin로 동정하였다.

Table. 12. Comparison of ¹³C NMR spectrum data of compound 3 and 4

C-No.	3	4		3	4		3	4		3	4
1	38.7	38.8	11	23.8	23.3	21	34.2	34.2	Ara C-1	106.7	
2	25.8	26.0	12	122.5	122.8	22	33.2	33.3	Glc C-1		105.4
3	81.9	82.0	13	144.9	144.0	23	64.6	65.1			
4	43.4	43.3	14	42.1	42.3	24	13.5	13.5			
5	47.5	47.6	15	28.3	28.2	25	16.0	16.1			
6	18.1	18.1	16	23.7	23.8	26	17.5	17.5			
7	32.8	32.5	17	46.7	47.0	27	26.2	25.8			
8	39.7	39.9	18	42.0	42.0	28	180.5	180.0			
9	48.1	48.1	19	46.5	46.6	29	33.3	33.0			
10	36.9	36.9	20	30.9	30.8	30	23.8	23.6			

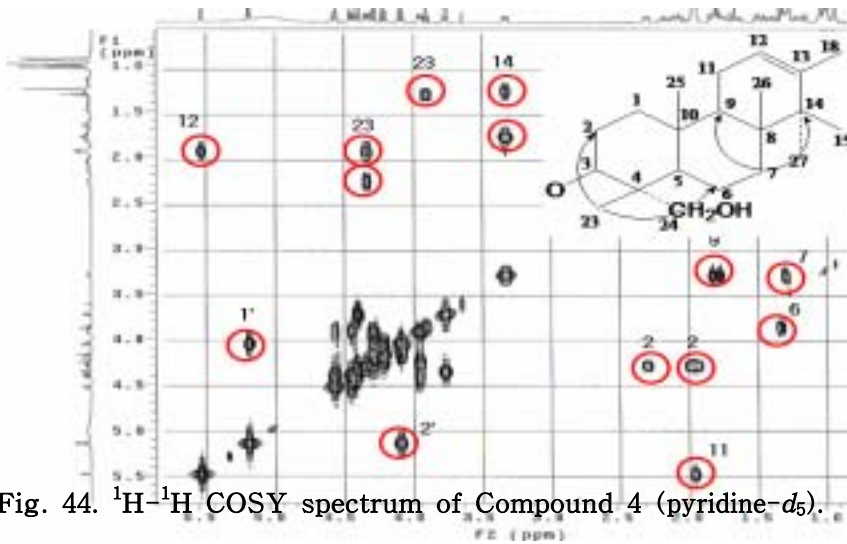


Fig. 44. ^1H - ^1H COSY spectrum of Compound 4 (pyridine- d_5).

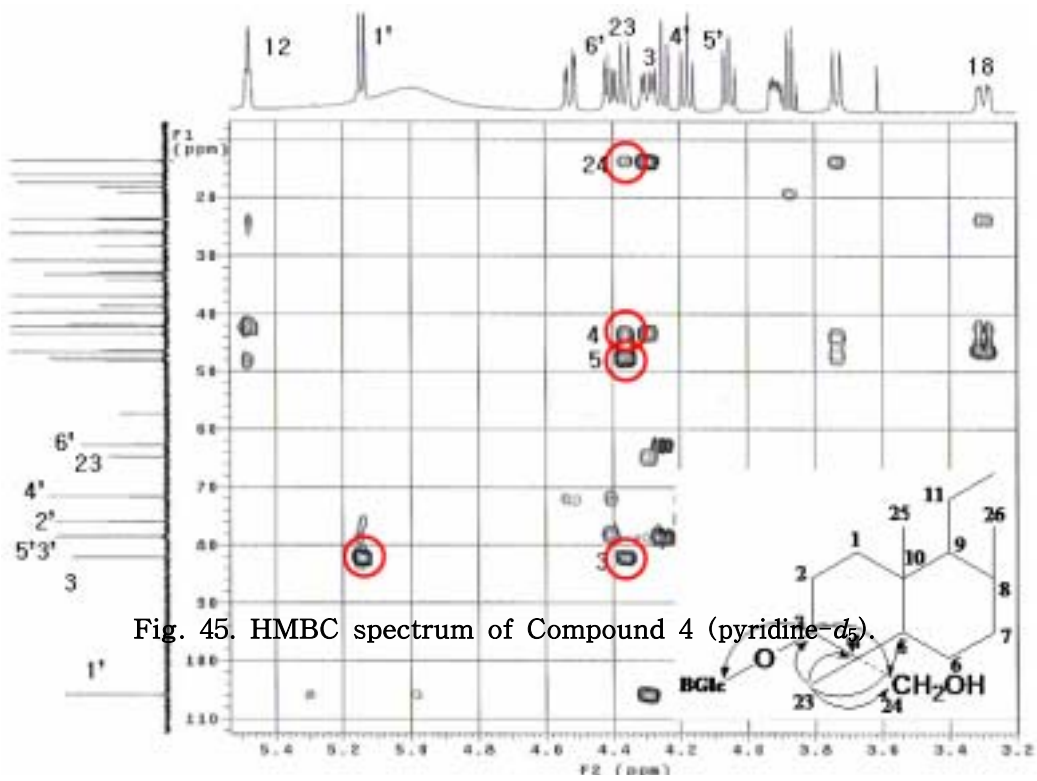
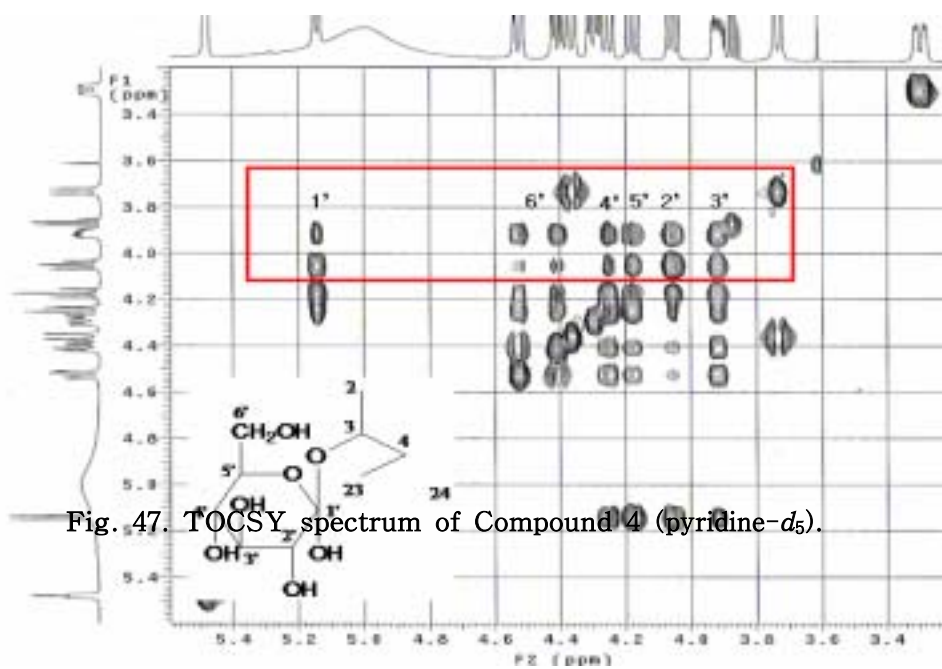
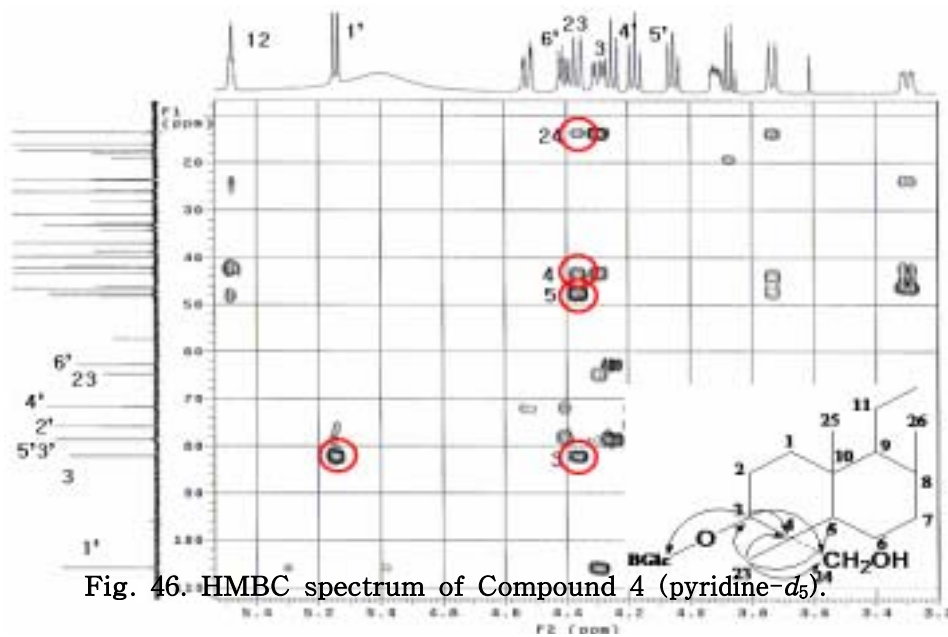
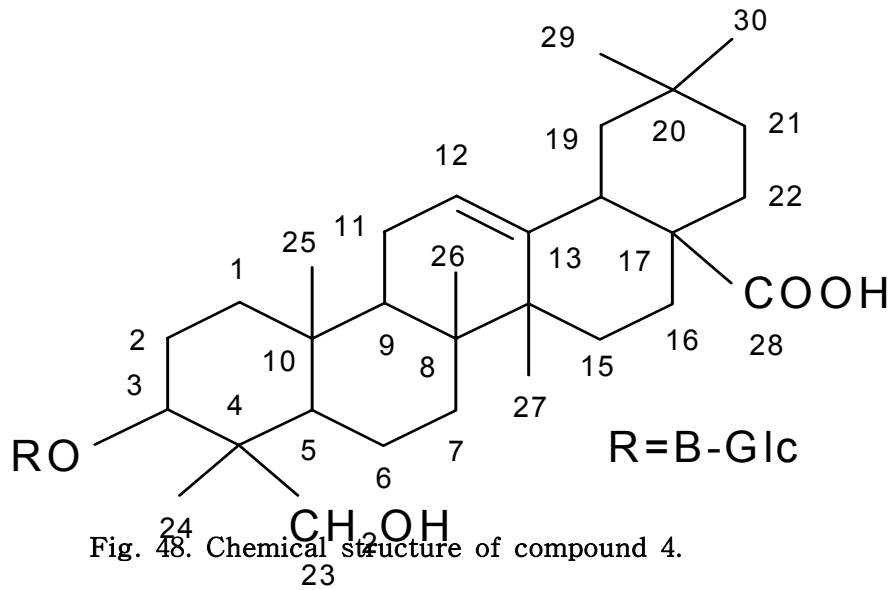


Fig. 45. HMBC spectrum of Compound 4 (pyridine- d_5).





3) 화합물 5

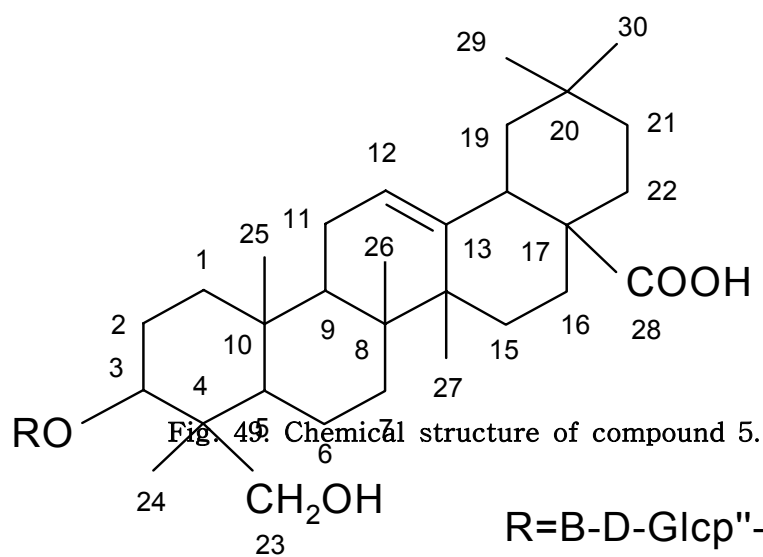
팔손이 열매의 에칠아세테이트 가용부로부터 단리된 화합물 5는 백색의 분말상태로 얻어졌으며, TLC상 팔손이 열매부분의 주요성분의 하나로 생각되었다. 화합물 5의 분자량은 FAB-MS에서 m/z : 779 $[M-H]^+$, 780 $[M]^+$ 를 나타냈다. 또한 화합물 5의 1H -NMR ^{13}C -NMR 스펙트럼 데이터를 화합물 3과 비교한 결과, 화합물 5는 화합물 3과 같은 hederagenin 형태의 화합물이었다. ^{13}C -NMR에서 11개의 시그널은 5탄당과 6탄당을 각각 나타내고, 화합물 3과 4의 당부분의 1H -, ^{13}C -NMR 데이터 분석결과 arabinose와 glucose임을 확인하였다. arabinose의 1번 탄소의 시그널이 106.7로서, 화합물 3의 아그리콘 C-3 위치에 당이 결합한 시그널과 같고, $-D$ -glucose의 1번 탄소의 시그널은 103.8로 화합물 4의 C-3와 비교하여 1.6 ppm정도 고자장의 영역에서 나타났다. 이것은 화합물 5의 C-3에 $-O$ -arabinose-glucose로 결합되어 있음을 나타낸다. 따라서 화합물 5는 화합물 3의 C-3에 arbinose-glucose가 결합된 β 트리테르페노이드 배당체인 hederagenin-3- O - $-L$ -arabinopyranosyl- O - $-D$ -glucopyranoside로 구조해석 하였으며, 문헌과 비교하여 지지물질로 동정하였다.

β

a

Table. 13. Comparison of ^{13}C NMR spectrum data of compound 3 and 5

C-No.	3	5		3	5		3	5		3	5
1	38.7	38.7	11	23.8	23.8	21	34.2	34.2	Ara C-1	106.7	106.7
2	25.8	25.8	12	122.5	122.6	22	33.2	33.0	Glc C-1		103.8
3	81.9	82.1	13	144.9	144.9	23	64.6	64.5			
4	43.4	43.4	14	42.1	42.2	24	13.5	13.6			
5	47.5	47.7	15	28.3	28.3	25	16.0	16.1			
6	18.1	18.2	16	23.7	23.7	26	17.5	17.5			
7	32.8	32.5	17	46.7	46.7	27	26.2	26.2			
8	39.7	39.8	18	42.0	42.0	28	180.5	180.2			
9	48.1	48.1	19	46.5	46.4	29	33.3	33.3			
10	36.9	36.9	20	30.9	30.9	30	23.8	23.6			



4) 화합물 6

팔손이 열매의 에칠아세테이트 가용부의 주요성분의 하나로 여겨지며, silica gel 칼럼프로마토그래피 및 prep. TLC를 이용하여 백색 분말상으로 화합물 6 (20 mg)을 분리하였다. 화합물 6의 FAB-MS 스펙트럼에서는 분자이온을 m/z : 385 $[M-H]^+$, 386 $[M]^+$ 를 나타냈다. 화합물 6의 1H -NMR 스펙트럼에서는 1.38 (3H, s, H-14), 1.21 (3H, s, H-8), 1.14 (3H, s, H-9), 2.00 (3H, s, H-7)에서 나타나는 12H에 해당하는 singlet이 시그날은 메틸기에 유래한다. 또한 당에서 유래하는 시그날로는 4.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1')에서 아노머 프로톤을 비롯하여 3.81 (1H, m, H-5'), 3.89 (1H, t, H-2'), 4.00 (1H, m, H-4'), 4.09 (1H, t, H-3'), 4.17 (1H, dd, H-6'), 4.43 (1H, dd, H-6') 등에서 당에서 기인하는 시그날에 각각 귀속하였다. 화합물 6의 부분구조에 기인하는 2.35 (1H, $J = 16.6$ Hz, H-7) 및 2.65 (1H, $J = 16.6$ Hz, H-7)의 두개의 doublet 시그날은 메칠렌 프로톤에 귀속하였다.

화합물 6의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 13.31 (q, C-7), 18.83 (q, C-14), 22.90 (q, C-8), 24.08 (q, C-9), 49.76 (t, C-6), 75.78 (d, C-13), 78.42 (s, C-4), 126.35 (d, C-2), 130.78 (d, C-12), 134.84 (d, C-11), 197.79 (s, C-1)과 같이 각각 귀속하였다.

이상의 기기분석 결과 화합물 6은 3, 5, 5 -Trimethyl-4-(4-glucopyranosyl-2-pentenyl)-4-hydroxyl-cyclohex-2-ene-1-one으로 동정하였다.

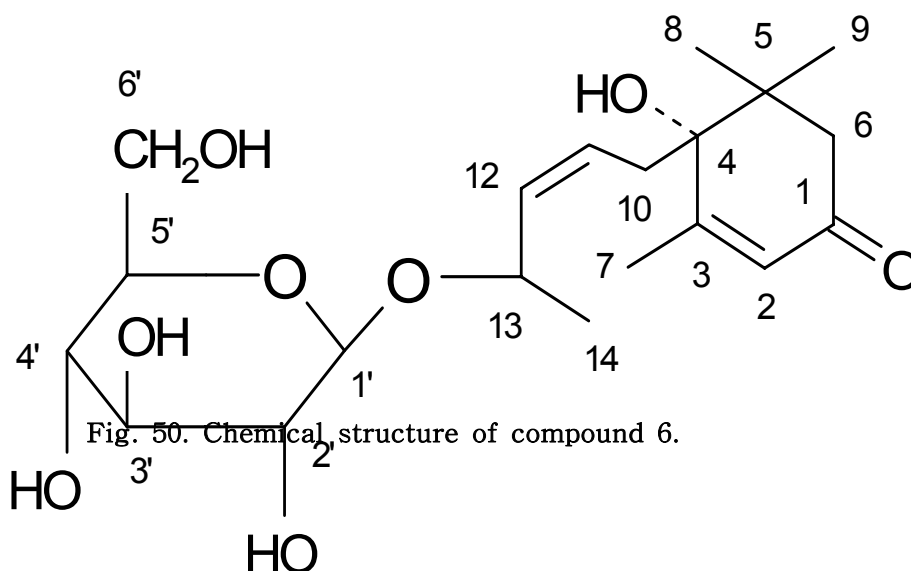


Fig. 50. Chemical structure of compound 6.

5) 화합물 7

팔손이 열매의 부탄올 가용부로부터 백색분말로 분리한 화합물 7의 FAB-MS 스펙트럼에서는 분자이온을 $m/z : 958 [M]^+$ 를 나타냈다. 화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터를 화합물 3, 4, 5와 비교한 결과, hederagenin 형태의 트리테르페노이드 배당체로서, 화합물 7은 hederagenin를 aglycone 구조로하고, 2개의 Glucose가 3번 위치에, 그리고 28번 카복실기에 에스테르 결합한 화합물로 추정되었다. 또한 화합물 7의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터와 화합물 3, 4, 5 데이터 및 유사구조를 가진 화합물들과의 문헌데이터와 비교한 결과, 화합물 7은 기지화합물인 hederagenin 3-O- β -D-glucoopyranosyl(1-6)- β -D-glucoopyranosyl-28-O- β -gentiobiosyl ester(AB)으로 동정하였다.

Table. 14. Comparison of ^{13}C NMR spectrum data of compound AA and 7

C-No.	AB	4		AB	4		AB	4		AB	4	
1	38.8	38.7	11	23.9	23.9	21	34.2	34.0	Glc C-1	105.6	105.8	
2	25.9	25.8	12	123.0	122.9	22	32.6	32.5		Glc C-1'	95.7	95.7
3	82.7	82.2	13	144.4	144.2	23	65.1	64.8		Glc C-2'	105.0	105.3
4	43.4	43.4	14	42.3	42.1	24	13.6	13.7				
5	47.9	47.7	15	28.4	28.3	25	16.3	16.3				
6	18.4	18.3	16	23.5	23.4	26	17.7	17.6				
7	33.0	32.8	17	47.2	47.0	27	26.2	26.1				
8	40.1	39.9	18	41.8	41.7	28	176.7	176.5				
9	48.3	48.2	19	46.4	46.2	29	33.2	33.1				
10	37.1	36.6	20	30.8	30.7	30	23.8	23.7				
								24.2				

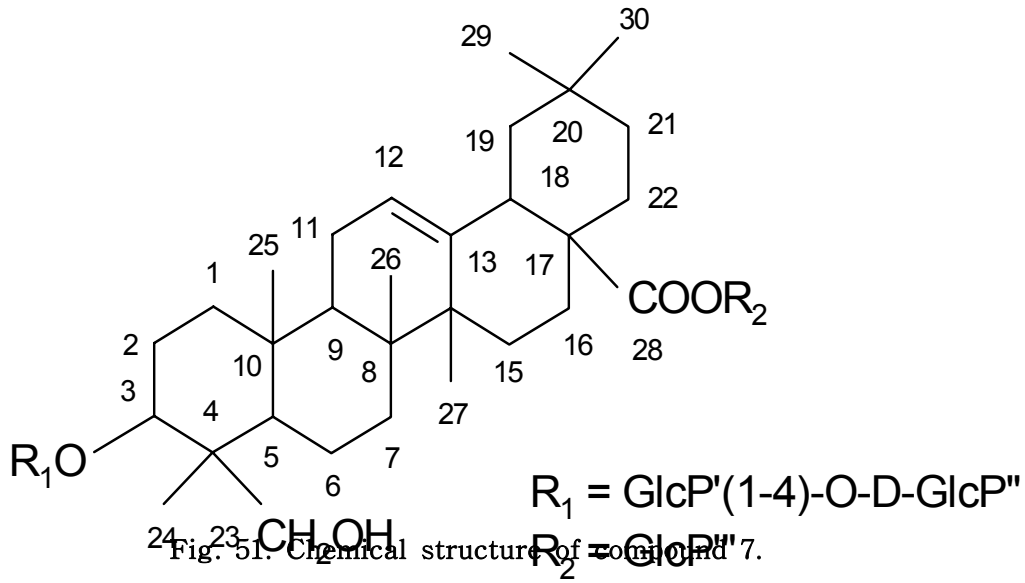


Fig. 51. Chemical structure of compound 7.

6) 화합물 8

화합물 8은 팔손이 열매의 Buthanol 가용부로부터 백색분말로 분리 하였다. 화합물 8의 FAB-MS 스펙트럼에서는 분자이온을 $m/z : 1219 [M-H]^+, 1220 [M]^+$ 을 나타냈으며, 화합물 8의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터를 화합물 3, 4, 5, 7과 비교한 결과, hederagenin 형태의 트리테르페노이드 배당체로서, 5개의 당을 가진 화합물로 추정되었다. 화합물 10의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터와 화합물 3, 4, 5와 7의 데이터 및 유사구조를 가진 화합물의 문헌데이터와 비교한 결과, 화합물 8은 기지화합물로 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28- O- β -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (AC)로 동정하였다.



Table. 15. Comparison of ^{13}C NMR spectrum data of compound AC and 10

C-No.	AC		10		IAC		10		AC		10	
	AC	10	IAC	10	AC	10	AC	10	AC	10		
1	38.9	38.8	11	23.8	23.8	21	34.1	34.0	Ara C-1	104.6	104.8	
2	26.4	26.5	12	122.9	122.9	22	32.6	32.6	Rham C-1	102.6	102.8	
3	89.1	88.8	13	144.2	144.1	23	28.3	28.2	Glc C-1	105.5	106.0	
4	39.5	39.5	14	42.2	42.1	24	16.8	16.7	Glc C-1'	95.6	95.6	
5	56.0	55.8	15	28.3	28.3	25	15.6	15.6	Glc C-1''	104.6	104.8	
6	18.6	18.5	16	23.5	23.4	26	17.6	17.5				
7	33.2	33.1	17	47.2	47.1	27	26.1	26.1				
8	40.0	39.9	18	41.8	41.7	28	176.6	176.5				
9	48.2	48.1	19	46.4	46.2	29	33.2	33.2				
10	37.1	37.0	20	30.8	30.8	30	23.8	23.7				

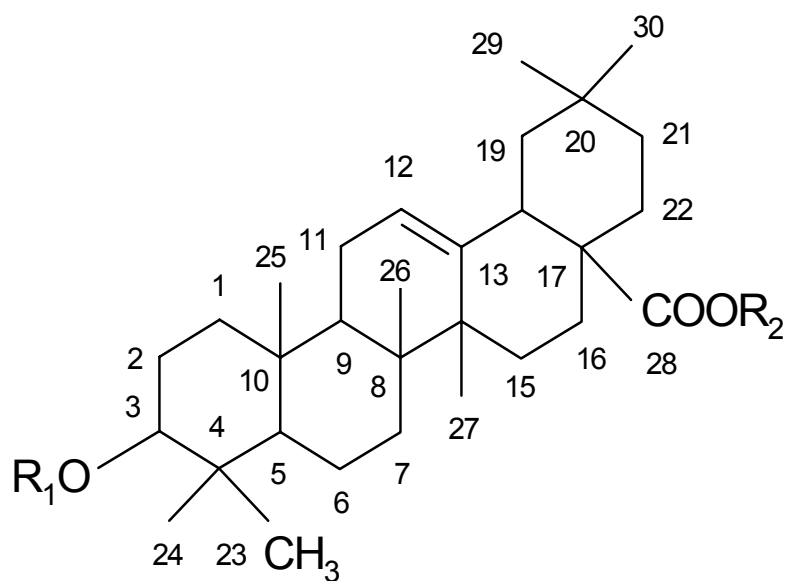
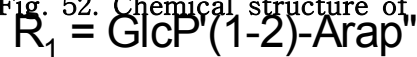


Fig. 52. Chemical structure of compound 8.



라. 팔손이 뿌리 화합물의 분리 및 구조동정

1) 화합물 9

팔손이 뿌리의 CH₂Cl₂ 가용부로부터 silica gel 및 Sephadex LH-20 등의 충전제를 이용하여 분리된 화합물 6의 EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온을 $m/z : 154 ([M]^+)$ 를 나타냈다. 뿌리 부분에 많이 존재하는 화합물로 추정된다. 화합물 9의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 간단한 3개의 시그널만이 존재한다. 이는 6.91의 doublet 시그널 및 7.49의 double doublet, 그리고 7.55의 double의 시그널은 각각 (J = 8.5 Hz, H-6), 7.49 (J = 2.0, 8.5 Hz, H-5), 7.55 (J = 2.0 Hz, H-3)에 귀속하였다. 또한 화합물 6의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 115.62 (d, C-6), 117.39 (d, C-3), 123.56 (d, C-5), 145.41 (s, C-2), 150.58 (s, C-4), 167.76 (s, C-1)에 각각 귀속하였다. 이상의 결과 화합물 9는 1, 2, 4-benzenetriol로 동정하였다(Fig. 53).

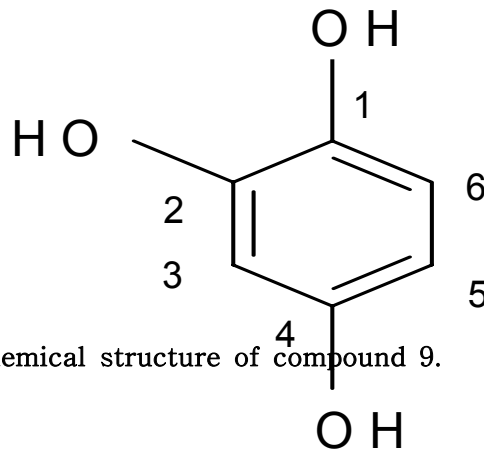


Fig. 53. Chemical structure of compound 9.

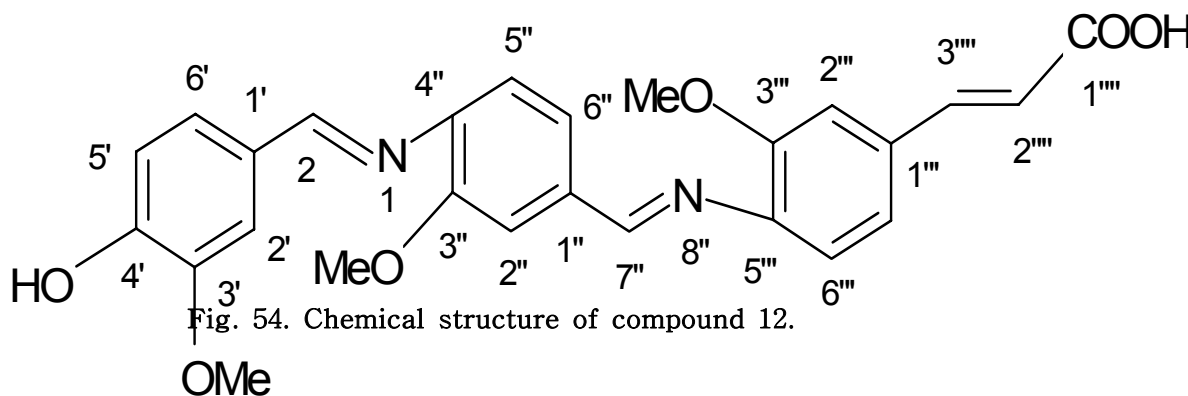
2) 화합물 10

팔손이 뿌리의 디클로로메탄 가용부로부터 silica gel column 및 Sephadex LH-20 column을 이용하여 화합물 10을 얻었다. 화합물 10의 ¹H-NMR 스펙트럼에서는 8H에 해당하는 프로톤이 방향핵에서 유래하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 3.57 (3H, s, 2-OMe), 3.74 (3H, s, 20-OMe) 및 3.96 (3H, s, 9-OMe)에서는 모두 12H에 상당하는 메톡실기 프로톤이 존재

함을 확인할 수 있었다. 또한 방향족 영역에 나타나는 7.06의 double doublet ($J = 2.0, 8.0$ Hz), 7.35의 doublet ($J = 2.0$ Hz), 및 6.73의 doublet의 ($J = 8.5$ Hz) 시그널과 7.10 ($J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6''), 6.72 ($J = 8.0$ Hz, H-5''), 및 7.37 (H-2''), 그리고 7.31 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'''), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''') 및 7.05 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6''')의 시그널로부터 화합물 12에는 3개의 전형적인 1, 3, 5-치환 벤젠핵의 존재를 시사하고 있다, 또한 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2''') 및 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3''')의 시그널로부터는 트랜스 형태의 부분구조를 확인할 수 있었다.

화합물 10의 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 56.91 (q, 3''-OMe), 56.25 (q, 3'-OMe), 56.72 (q, 3'''-OMe)는 메톡실기에 유래하며, 그밖의 탄소의 시그널은 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMQC, 및 HMBC 등의 상관 피크를 확인하여 112.73 (d, C-2'''), 113.72 (d, C-2''), 114.36 (d, C-5'), 114.63 (d, C-2'), 114.81 (d, C-5'''), 116.20 (d, C-5''), 117.80 (d, C-2'''), 123.19 (d, C-6'''), 125.55 (s, C-4''), 125.70 (d, C-6''), 126.52 (d, C-6'), 128.10 (d, C-7''), 128.44 (s, C-4'), 129.12 (d, C-2), 130.65 (s, C-1'''), 146.01 (d, C-3'''), 148.57 (s, C-3''), 148.84 (s, C-1'), 149.13 (s, C-4'''), 149.80 (s, C-1''), 150.03 (s, C-3'), 150.49 (s, C-3''')등에 기인한다. 그리고 170.59은 카복실기에 각각 귀속하였다. 3개의 벤젠핵이 질소에 의해 결합한 형태의 화합물로 추정하였다. 이상의 기기 분석결과 화합물 10는 N-

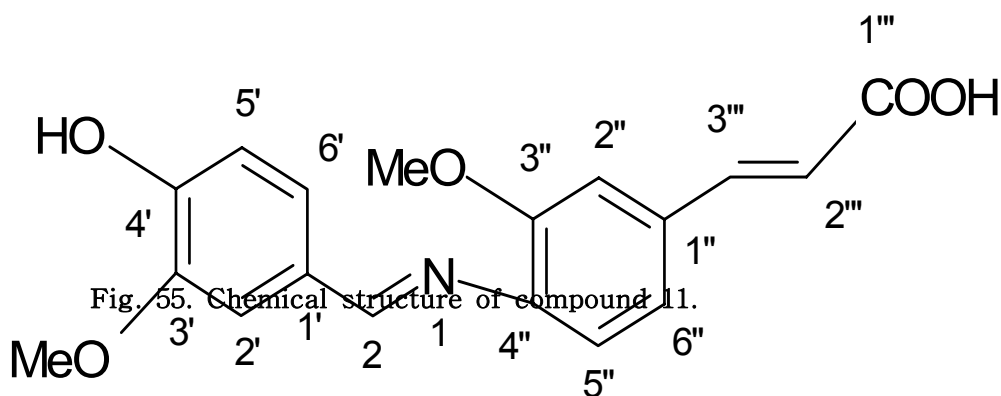
[(N-(3'''-methoxy)-3'''-phenylprop-2'''-enoic acidyl)-3''-methoxy-phenylmethanimine] -3'-methoxy-4'-hydroxyphenylmethanimine으로 추정하였다.



3) 화합물 11

팔손이 뿌리의 디클로로메탄 가용부로부터 silica gel column 및 Sphadex LH-20 column을 이용하여 화합물 11 을 얻었다. 화합물 11의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 3.70 (3H, s, 3'-OMe), 3.97 (3H, s, 3''-OMe)에 두개의 메톡실기의 존재, 그리고 7.44 (d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.75 (d, $J = 10.0$ Hz, H-5') 및 7.10 (dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 그리고 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, H-6''), 7.07 (dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-5'') 및 7.32 (d, $J = 10.0$ Hz, H-2'')에서 2개의 방향족의 존재를 시사하고 있다. 7.60 (d, $J = 15.5$ Hz, H-3''')와 6.38 (d, $J = 15.5$ Hz, H-2''')은 결합정수로부터 트랜스 형태의 화합물 구조임을 알 수 있다. 화합물 10의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 56.04 (q, 3'-OMe), 56.73 (q, 3''-OMe), 그리고 170.67의 시그날은 카복실기에 귀속하였다. 그밖에 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, DEPT, HMQC, HMBC 등의 분석 결과 화합물 11은

N- [(N-(3''-methoxy)-3'''-phenylprop-2'''-enoic acyl)-3'-methoxy-4'-hydroxyphenylmethanimine]으로 추정하였다.



4) 화합물 12

팔손이 뿌리로부터 분리한 화합물 12는 열매의 8번과 같은 화합물로 단리되었으며, 기지 화합물인 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-O- α -L-

β

α

α

rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside 으로 동정하였다.

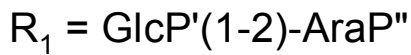
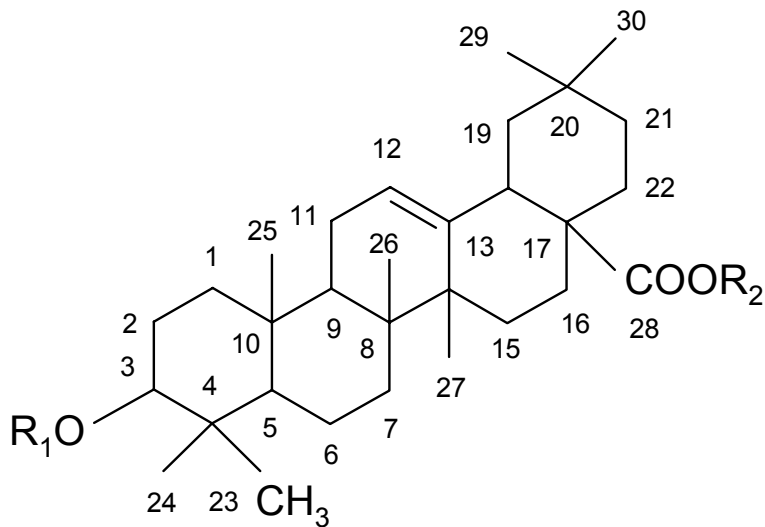


Fig. 56 Chemical structure of compound 13

5) 화합물 13

화합물 13의 화합물은 뿌리의 부탄을 가용부로부터 silica gel column 및 Sphadex LH-20 column을 이용하여 백색의 분말상태로 얻어졌으며, TLC상 팔손이 열매부분의 주요성분의 하나로 생각되었다. 화합물 13의 FAB-MS 에서는 분자이온을 $m/z : 1110 [M]^+$ 를 나타냈다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터를 화합물 3, 4, 7와 비교한 결과, hederagenin 형태의 트리테르페노이드 배당체로서, 4개의 당이 결합한 화합물로 추정되었다. 화합물 13의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 데이터와 화합물 7의 데이터 및 유사구조를 가진 화합물의 문헌 데이터와 비교한 결과, 화합물 13은 기지화합물로 hederagenin 3-O-β-sophonosyl-28-O-β-*getiobiosyl ester*(AA)로 동정하였다.

β

β

Table 16. Comparison of ^{13}C -NMR spectrum data of compound AA and 7

C-No.	AA	7		AA	7		AA	7		AA	7
1	38.8	39.3	11	23.6	24.4	21	34.1	33.6	Glc C-1'	108.1	107.2
2	26.0	26.6	12	122.5	123.4	22	32.7	33.0	Glc C-1''	103.1	103.2
3	82.2	82.4	13	144.2	144.6	23	64.6	65.0	Glc C-1'''	95.1	96.1
4	43.4	44.0	14	42.1	42.2	24	13.5	14.1	Glc C-1''''	105.2	104.8
5	47.5	48.1	15	28.3	28.8	25	16.2	16.7			
6	18.3	19.0	16	23.0	23.8	26	17.5	18.1			
7	33.2	33.0	17	47.0	47.5	27	26.0	26.5			
8	39.9	40.4	18	41.7	42.6	28	176.7	177.0			
9	47.9	48.7	19	46.2	46.7	29	33.2	33.3			
10	37.0	37.4	20	30.7	31.2	30	23.6	24.2			

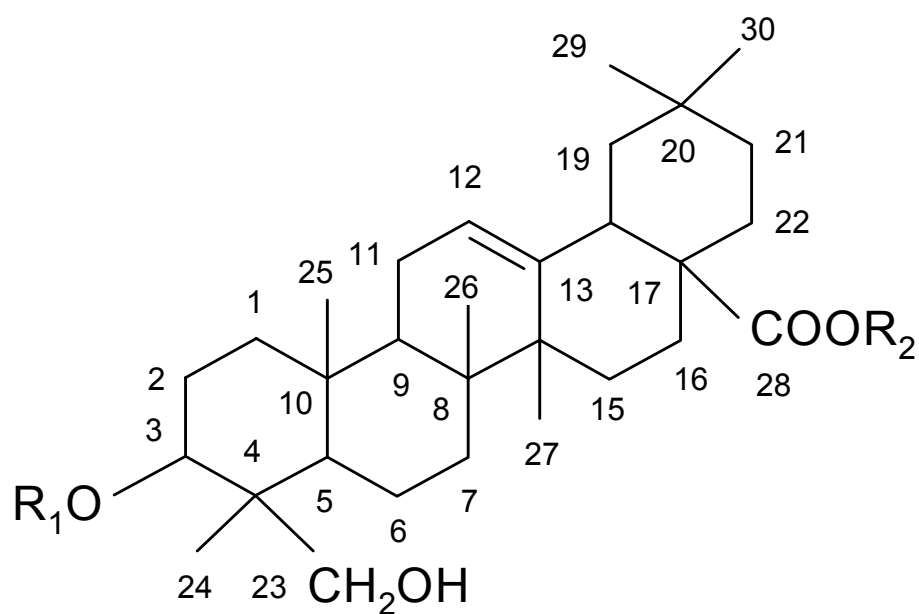
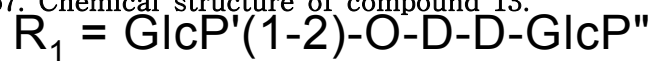


Fig. 57. Chemical structure of compound 13.



제 5 절 팔손이나무의 분리, 정제 화합물의 생리활성 탐색

1. 실험내용

가. 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정

1) 세포주 및 배지조성

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 간암세포인 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 폐세포인 HEL299(Lung nomal, Human)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포들 중 Hep3B, MCF7은 DMEM배지를 HEL299는 RPMI 1640배지에서 10% heating- inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 적응시켜 배양하였다.

2) SRB assay

SRB (sulforhodamine B)assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF7(10% FBS, DMEM배지) 농도를 $4\sim5\times 10^4$ cell/ml로 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배지 (37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료 된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(tri chloroacetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEL299(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100 μ l의 MTT(50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100 μ l씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Selectivity 측정

MTT assay를 이용하여 정상 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, 또한 SRB assay를 이용하여 각 암 세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \text{암세포 생육 억제 활성} / \text{정상 세포에 대한 세포 독성}$$

나. 면역 증진 활성 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT assay로 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)assay는 생세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 면역 세포인 Jurkat과 Raji(10% FBS, RPMI 1640 배

지)의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, $100\mu\text{l}$ 의 MTT($50\mu\text{g/ml}$) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO $900\mu\text{l}$ 를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 96well plate에 옮긴 다음 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

다. 간 기능 관련 생리활성 측정 (해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)

정유의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST(glutathion - S - transferase)의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하였다. GST의 specific activity를 측정할 때, 37°C에서 2분간 반응시켰다. 반응후 20% TCA

$$\text{Total activity (units)} = (A_{340}/9.6) \times \text{희석배수} \times (3\text{ml}/0.1) \times \text{crude extract(ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/ml protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

라. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) → Hippuric acid(고혈압 유발) + His-Leu
 Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

증류수에 $50\mu\text{l}$ (또는 시료)에 Hip-His-Leu $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C에서 5분간 방치한다 (Blank를 만들기 위해 1N HCl 0.25 ml를 첨가한 test tube 2개를 준비). ACE 효소액 $150\mu\text{l}$ 첨가 후 37°C에서 1시간 방치한다. 1N HCl 0.25 ml 첨가하여 반응을 정지시킨다. Ethyl acetate 3 ml를 첨가한 후 15초간 잘 섞은 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액 1

mℓ를 취한다. Oil bath 140℃에서 15분간 건조한 후 1M NaCl 3 mℓ를 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{저해율(\%)} = \left[1 - \left(\frac{E_c - E_s}{E_c - E_b} \right) \right] \times 100$$

E_c : 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광
 E_s : 시료 첨가시의 흡광도
 E_b : 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

마. -glucosidase 억제 기능 탐색

생체 내에서 혈당 상승의 결정적인 역할을 하는 -glucosidase를 이용하여 실험을 수행하였다. 먼저 효소를 10 mM PIPES buffer에 용해시켜 효소액을 제조하고 20 mM maltose와 각 추출물을 농도별로 혼합한 후 37℃에서 20분간 배양한다. 반응액 60 μℓ에 1 mℓ DNS 시약을 첨가하고 100℃ 물에서 열탕 처리(10 min)하여 반응을 정지시킨 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 반응으로 생성된 환원당을 정량하여 각 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소활성 저해율을 계산하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 암세포 생육 억제 활성 및 세포 독성 측정

Table 17는 단리화합물의 세포독성을 나타낸 것이고 FRD- I 이 16.5%, FFE- I 이 12.8%, FWE- I 이 13.2%의 세포독성을 나타내었다.

Fig 58, 59은 팔손이의 부위별 단리 화합물의 암세포 생육 억제 및 선택적 사멸도를 나타낸 것으로 FRD- I 이 MCF-7에서 54.8%를 나타내었고 Hep3B에서 54.4%의 암세포 생육억제와 각 2.0이상의 암세포 선택적 사멸도를 나타내었다.

Table 17. Cytotoxicity of fraction extracts of *Fatsia Japonica* on the human normal cell, HEL299

Sample	Dose (mg/ml)	Cell line
		HEL299
FRD- I	0.2	7.3
	0.4	9.2
	0.6	11.3
	0.8	14.2
	1.0	16.5
FFE- I	0.2	6.4
	0.4	7.2
	0.6	9.4
	0.8	11.2
	1.0	12.8
FWE- I	0.2	5.7
	0.4	7.4
	0.6	9.1
	0.8	10.3
	1.0	13.2

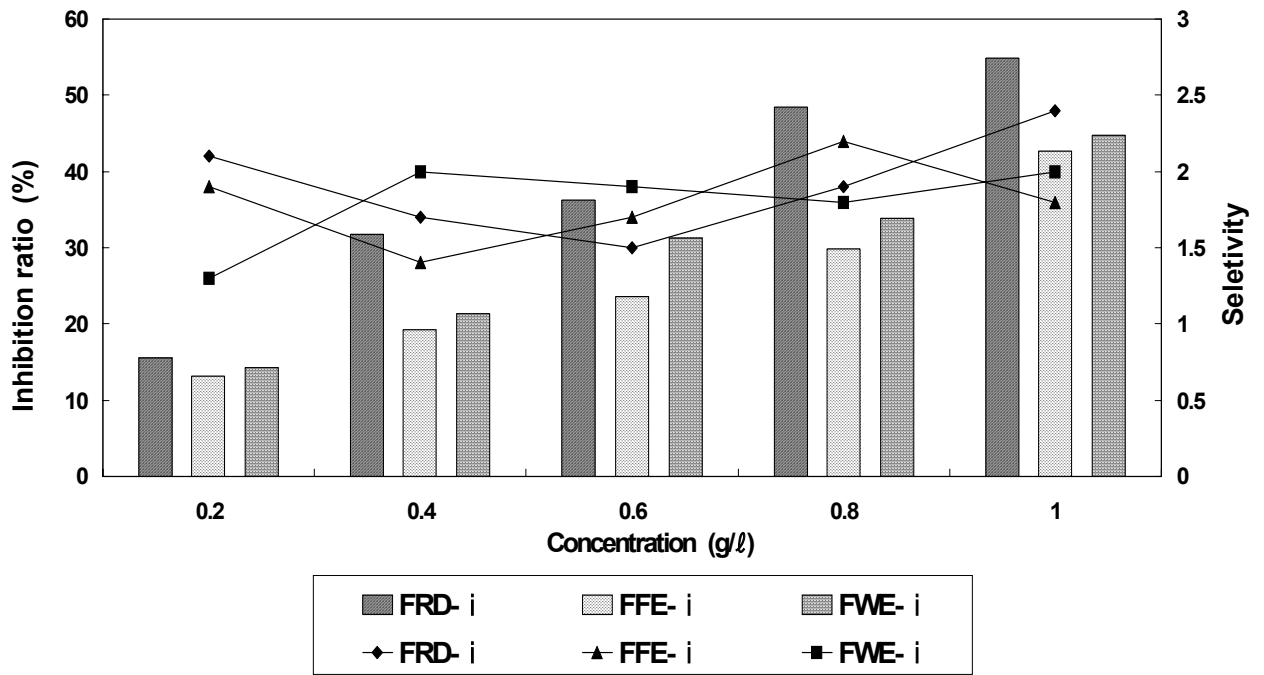


Fig. 58. Inhibition ratio of growth of MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fraction extracts in *Fatsia japonica*

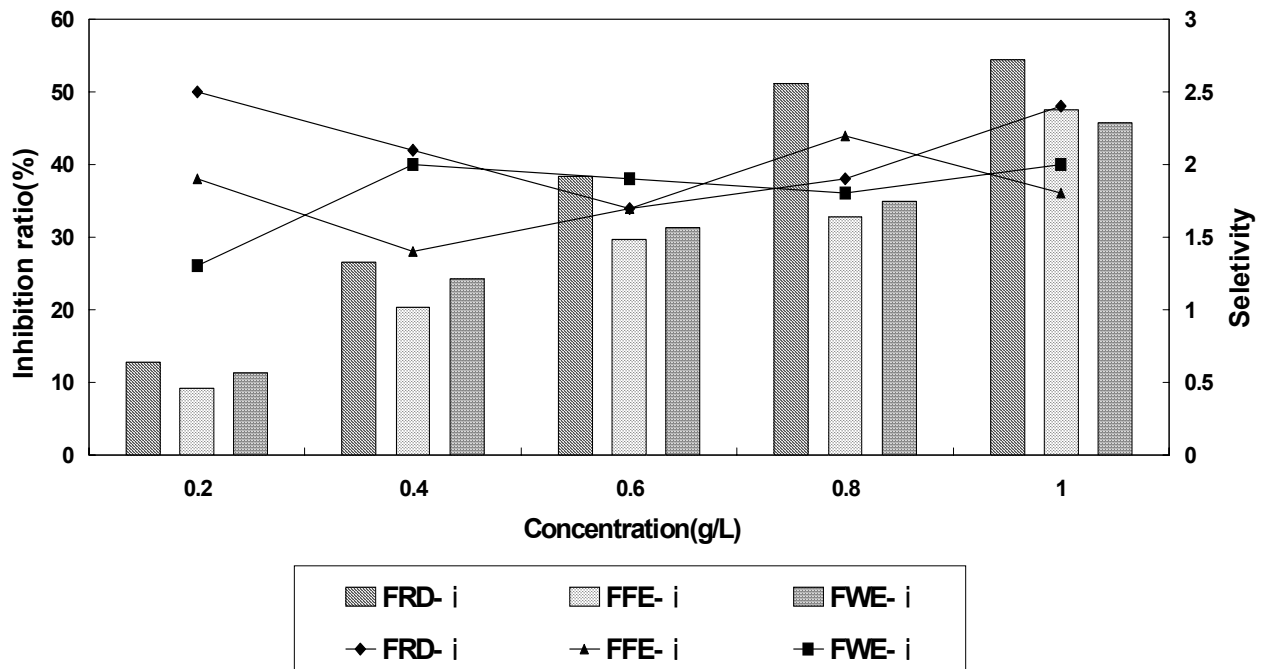


Fig. 59. Inhibition ratio of growth of Hep3B (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the fraction extracts in *Fatsia japonica*

나. 면역증진 활성 측정

또한 Fig. 60, 61는 팔손이의 부위별 단리 화합물의 면역 세포의 생육 증진 효과를 살펴본 것으로 뿌리의 단리화합물인 FRD- I 의 생육 증진 효과가 가장 높은 154%를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 열매의 단리화합물인 FFE- I 과 목부의 단리 화합물인 FWE- I 이 142%와 129%의 생육 증진 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

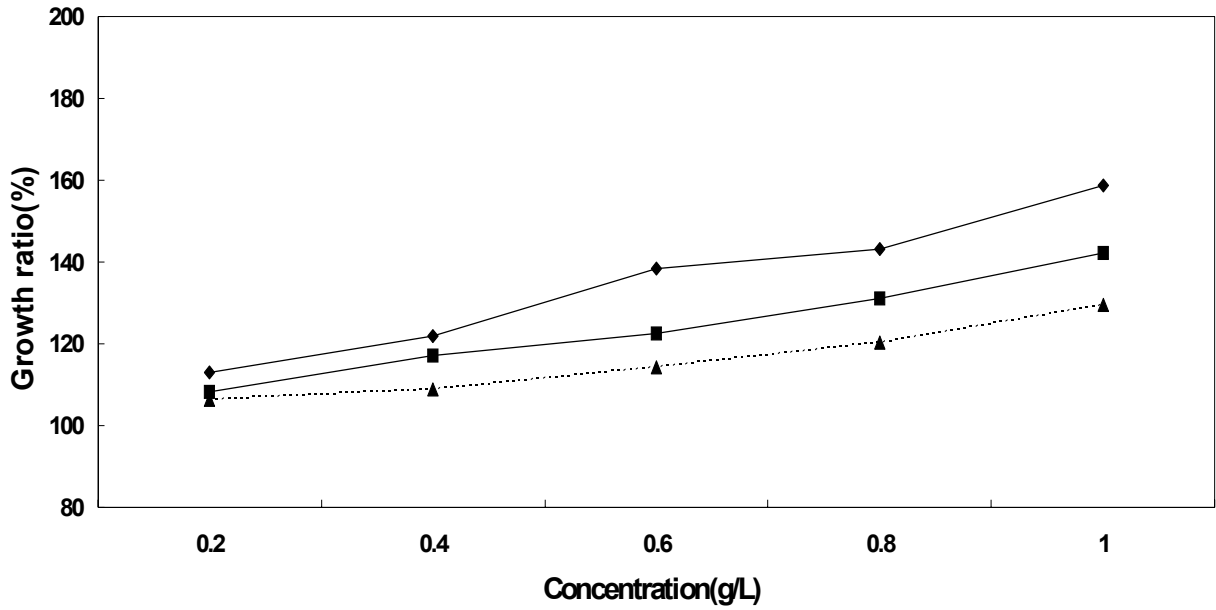
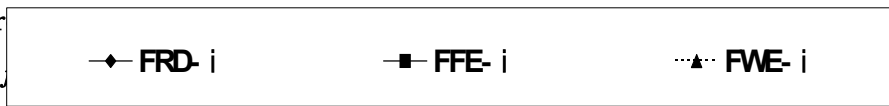


Fig. 60. The gr
Fatsia



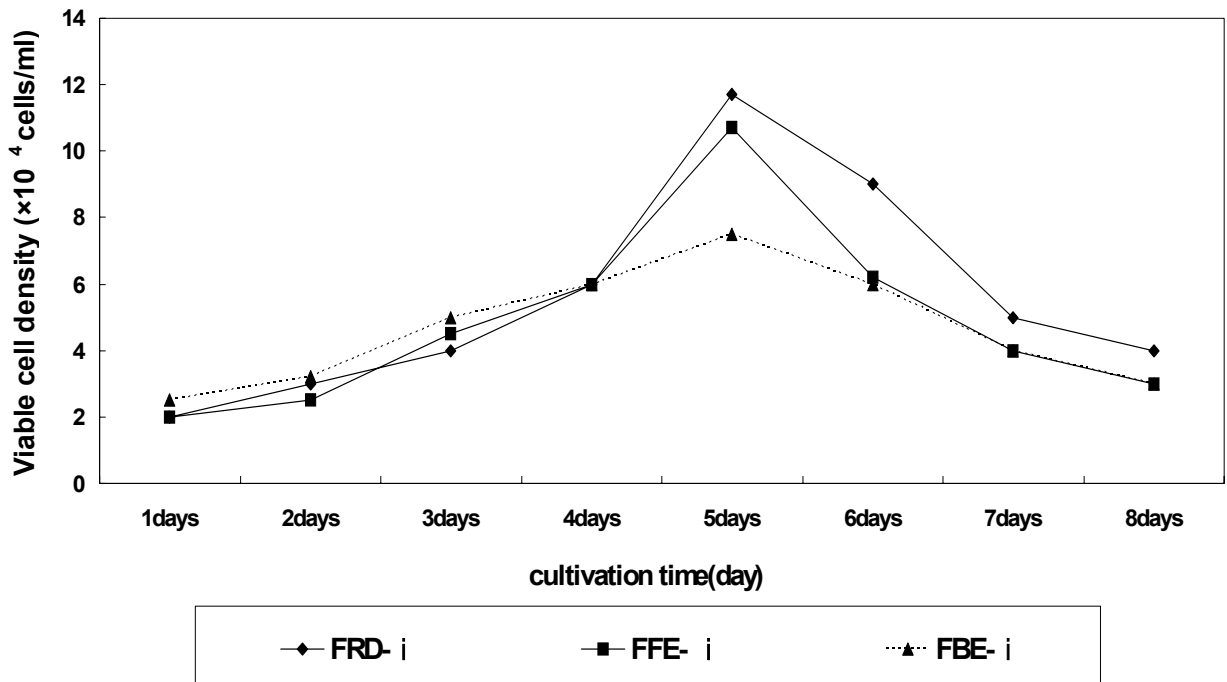


Fig. 61. The growth of viable cell density of human immune T-cells in adding the fraction extracts in *Fatsia japonica*

간 기능 관련 생리활성 측정 (해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)

다.

Fig. 62는 분획후 분리 정제한 화합물에 의한 간기능 활성도를 나타낸 그래프이다. 각 화합물의 활성도는 FFE-1 화합물과 비교하여 FEW-1 화합물이 유사한 활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 가장 높은 활성도를 나타내는 FRD-1은 뿌리 추출물로 유의적인 활성을 나타내고 있다.

앞선 팔손이 부위별 추출물의 생리활성 결과에서 근피의 활성이 타 부위에 비해 15%까지 높게 나타나고 있다. 이와 비교하여 뿌리의 단리 화합물인 FRD-1이 높은 활성이 나타나는 것은 뿌리 부위의 활성 증진 성분인 것으로 사료되어 진다.

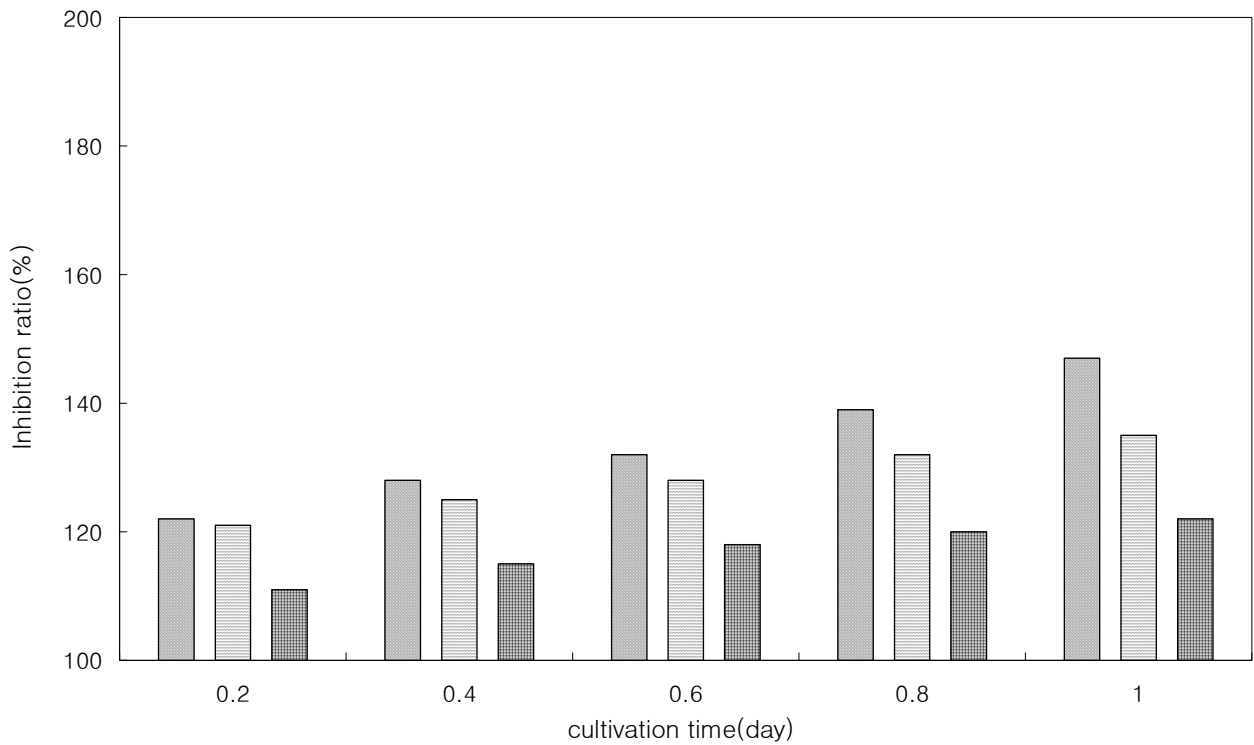


Fig. 62. The enhancement of glutathione-S-transferase activity in adding the fraction extracts in *Fatsia japonica*

Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성

혈압상승의 주요 기작은 renin angiotensin system으로 angiotensin converting enzyme은 renin에 의해 생성된 angiotensin으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 angiotensin을 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin은 강력한 혈관수축작용을 가지고 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며 또한 혈관이완 작용을 가진 bradykinin을 불활성화시켜 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 따라서 ACE를 저해시키면 혈압상승을 억제할 수가 있기 때문에 ACE의 억제활성을 살펴보았다. Fig. 63은 각각의 분획과정을 거쳐 분리 정제된 화합물로 활성을 살펴보았다. 앞선 다른 생리 활성 실험의 결과와 유사하게 근피와 열매에서 추출된 FRD와 FFE 화합물이 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 특히

FRD-1 화합물은 다른 화합물에 비해 약 20% 이상의 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 특히 FRD 화합물이 43% 정도의 활성을 나타내었다.

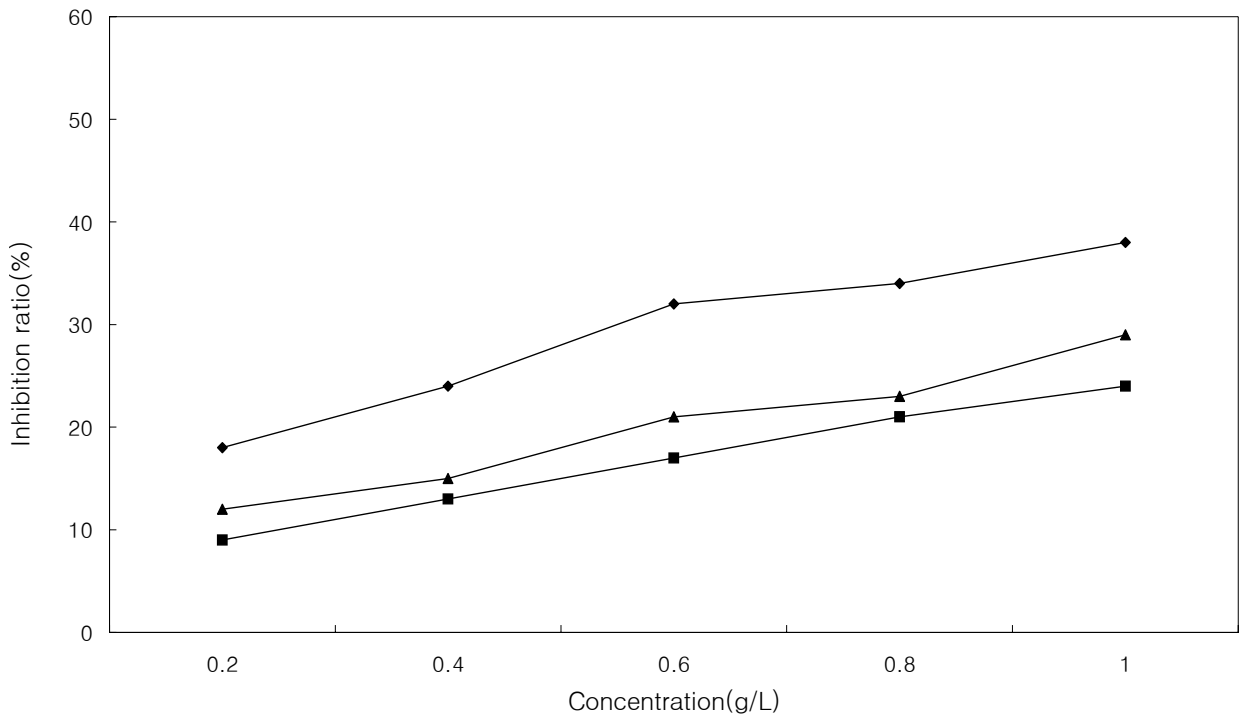


Fig. 63. Inhibition of Angiotension Converting Enzyme activity in adding the fraction extracts of *Fatsia japonica*

-glucosidase 억제 기능 탐색

Fig. 64 는 혈당강하 실험의 결과를 나타낸 것으로 팔손이 각 부위의 용매별 추출물에 의한 활성을 살펴보았다. 각 추출물은 농도에 따라 유의적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 FRD 화합물은 1 g/l의 농도에서 최대 35%이상의 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 최저 농도인 0.2 g/l에서는 18%정도로 다른 부위의 단리 화합물에 비교하여 상당히 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

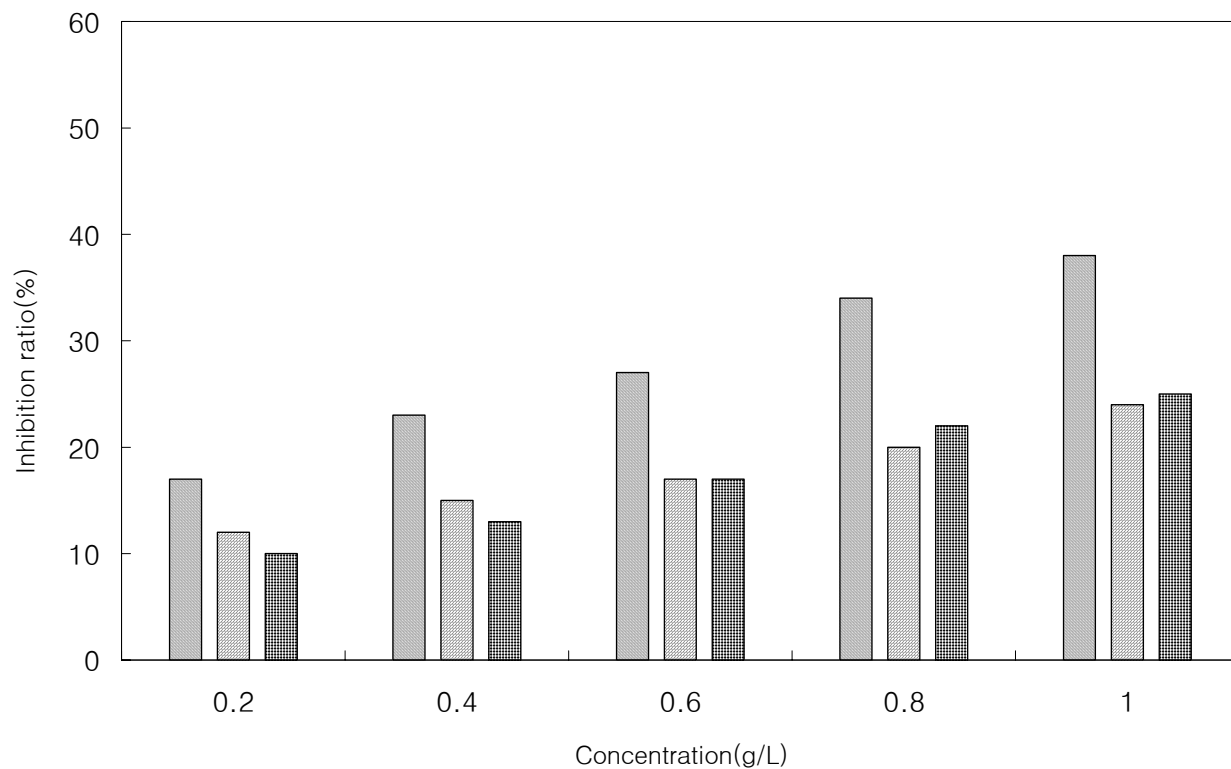


Fig. 64. Inhibition effect on Hypoglycemic activity in adding the fraction extracts from *fatsia japonica*

제 6 절 팔손이나무의 기내 배양 확립 및 대량생산 시스템 개발

1. 실험내용

가. 팔손이나무 채종의 무균 배양

1) 채종 관리 및 무균발아

종자는 각기 채종한 모본과 번호를 같게 하여 전남대학교 자원보존연구소에 보관하며 그 중 일부는 전남대학교내 약대 약초원 및 하우스의 포장에서 과종 관리하며, 필요할 경우 종자의 일부를 조직배양을 위한 모본식물로 이용하였다. 종자의 무균발아는 무균처리 후 자연발아나 embryo 적출 후 적정 호르몬의 처리로 촉진 받아시켰다.

팔손이 종자 표면살균은 종자를 약1~2시간정도 streaming을 행한 후에 70% Ethanol에 3분 정도 살균하였고 이후 5% NaOCl에 4분정도 살균하였다. 멸균수에 3회이상 세척하여 살균액이 남아있지 않도록 제거하였으며 무균상태에서 건조시킨 후 MS배지에 치상하였다.

2) 현탁세포 배양확립

탈분화된 현탁배양세포의 유도는 무균 발아된 유식물을 약 1cm의 크기로 절단한 다음 MS, B5, 및 WP 기본배지에 호르몬 Auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinins(BA, BAP, kinetin)을 working concentration 범위내에서 조합하여 조성한 고체배지에 치상하고 4주 이상 배양조건과 동일한 액체배지에 일부를 이식하여 액체진탕배양한다. 배양세포는 2주 간격으로 새로운 배지에 옮겨 계대배양을 하며 필요에 따라서는 배지조성과 배양조건을 달리하여 배양한다. 한편, 필요에 따라서는 배양한 시료는 생중량을 측정하고 동결건조하여 건중량을 측정하며, 건조시료 중 일부는 성분분석을 위한 시료로 사용한다.

3) 캘러스, 부정근 및 모상근 유도 및 배양

무균 유식물의 잎, 줄기 및 뿌리 조직을 절편화하고 auxin과 cytokinins를 단독 또는 조합으

로 설정한 배지를 사용하여 캘러스의 유기 및 성장률을 측정하고, 아울러 부정근을 유도, 생장시키는 최적조건을 조탐색하였다. 탐색된 조건을 기초로 호르몬과 각종 배지 구성요소를 fine tuning하여 최적의 성장조건을 규명하였으며 팔손이 callus 및 부정근 유도는 발아 후 약 2주에서 3주정도 된 팔손이 식물체의 첫 번째와 두 번째 잎을 사용하였다.

나. 팔손이나마의 줄기 정아(액아) 배양

1) 팔손이 줄기 절편의 정아(액아)로부터 신초의 증식

팔손이(*Fatsia Japonica* DECNE. et Planchon)의 액아부분을 포함한 줄기를 15~20 cm의 크기로 절단하여 흐르는 물에 충분히 수세하였다. 원료를 무균상에서 70% 에탄올에 3분, sodium hypochlorite에 6분 정도 침적하여 표면살균한 후 멸균수로 3회 이상 세척하고 멸균된 여과지로 물기를 제거한 후 1.0 cm~ 1.5 cm 크기로 절단하여 3% sucrose만을 포함한 MS고형배지(0.3% gelite, pH 5.8)에서 24시간 배양하였다. 신초를 유도하기 위하여 MS기본배지에 Cytokine BA(Benzyl Adenine)와 식물호르몬 NAA(Naphthalene acetic acid), IAA(Indoleacetic acid), 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)를 표-1. 과 같이 조합하여 처리하였다. 모든 배지는 3%의 sucrose 와 0.3% gelite를 첨가한 후 pH를 5.7~5.8로 조절하여 121℃에서 20분간 고압숙윤 멸균처리 하였다. 표면살균 처리된 팔손이의 액아부분이 포함된 줄기절편을 무균조건하에서 0.5 cm~ 1.0cm 크기로 절단한 다음 신초 유도배지에 치상하여 온도 25±1℃의 암조건에서 배양하고 약 4~5주 후 신초가 유기되었다.

2) 팔손이 줄기의 액아에서 증식된 신초로부터 발근유도

신초로부터 발근을 유도하기 위하여 MS기본배지에 식물호르몬 IBA(Indole butylic acid)를 농도별로 조합하여 처리하였다. 모든 배지는 3%의 sucrose 와 0.3% gelite를 첨가한 후 pH를 5.7~5.8로 조절하여 121℃에서 20분간 고압숙윤 멸균처리 하였다. 발근 유도배지에 신초를 치상하여 온도 25±1℃의 암조건에서 약 5주 동안 배양하였다.

다. 생물반응기의 선발 및 운영

부정근 생장에 적절한 생물반응기를 선정하기 위해서 4가지 형태의 생물반응기를 비교하였다. 실험에 사용된 생물반응기의 용적은 5L의 cylinder, balb, balloon, cone 형태이며, 배지는 변경된 MS배지에 NAA 2.0mg/, Sucrose 50g/L을 4L첨가하여 사용할 것이다. 또한 20L bulb형태의 하부의 column의 길이에 따른 생장을 조사하기 위하여 8cm, 16cm를 각각 근주입량, 분사기 (sparger)의 직경 및 pore size를 조절하고 그에 따른 산소 전달계수를 산출하였다.

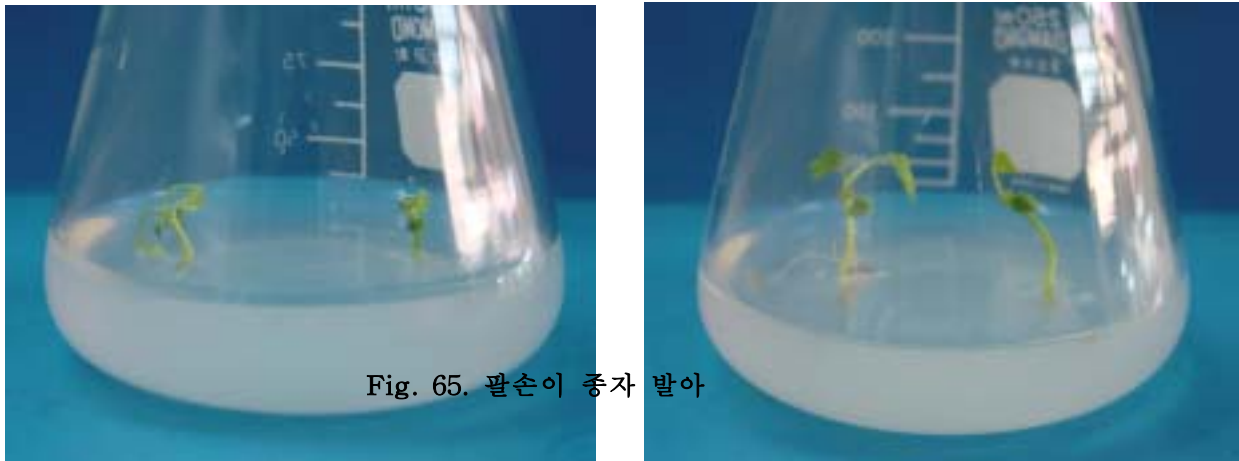
공기 주입량은 압축공기를 이용하여 0, 0.5, 0.1, 0.3 및 0.05-0.3(0.05로 시작하여 부정근의 생장에 따라 점진적으로 0.3까지 증가) vvm으로 처리하고 분사기의 직경은 1.5, 3.0, 5.0, 8.0cm로 하였으며, pore의 크기는 15, 30, 60 μ m로 달리하여 배양한 후, 부정근의 생장을 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 팔손이나무 채종의 무균 배양 결과

1) 팔손이나무의 종자발아

팔손이나무의 무균 배양 확립을 위하여 기내 무균 종자 발아를 시켰다. 70% Ethonal과 5% Sodium hypochlorite solution을 이용하여 표면살균하고 멸균수에 3회 이상 세척한 후 MS배지에 치상하여 발아를 유도하였다. Fig. 65. 는 팔손이 나무의 발아 상태를 나타낸 그림이다. 파종 약 3주 후에 발아되었으며, 발아율은 80%로 나타났다.



2) 캘러스 유도 및 배양 조건 확립

무균 발아된 유식물의 잎을 1cm² 크기로 절단하여 Auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinins(BA, BAP, kinetin)을 조합하여 MS고체배지에 치상하였다. 그 결과 약 5주 후에 BA 1mg/l와 NAA 2mg/l, kinetin 0.5mg/l과 2,4-D(1 또는 2)mg/l를 첨가한 배지에서 유백색의 캘러스를 형성하였다. 반면, kinetin 1mg/l과 2,4-D(1 또는 3)mg/l를 조합한 배지에서는 갈색의 캘러스가 유도되었다. 또 BA 1mg/l와 NAA 1mg/l에는 캘러스와 함께 약간의 부정근

이 형성되었다. BA 1mg/l와 NAA 2mg/l와 kinetin 1mg/l과 2,4-D 2mg/l에서 가장 좋은 유도율을 보였으며 다양한 호르몬을 처리하여 MS 기본배지에 치상하였다.

캘러스는 전반적으로 노란색(미색)을 띠고 있으며 비교적 단단한 특징을 나타냈다. 같은 조건의 호르몬 배지에서 일부는 Fig 66.에서와 같이 약간의 부정근을 형성하였다. 그러나 이 부정근이 자라면서 다시 캘러스화 되었다.

Table 18. 팔손이 잎절편을 이용하여 부정근 유도율을 조사. (단위 : mg/l)

BA	Kinetin	2,4-D	NAA	IAA	color	callus induction frequency(%)
0.5				1	-	
0.5				2	yellow	73
0.5				3	yellow	61
0.5		1			dark yellow	63
0.5		2			yellow	74
0.5		3			yellow	71
1			1		light yellow	78(R)
1			2		light yellow	80
1			3		light brown	69
1		3			brown yellow	71
2			0.5		light yellow	78
2			1		dark yellow	70
	0.5	1			light yellow	62
	0.5	2			light yellow	68
	0.5	3			brown yellow	72
- : no response		1			brown yellow	70
R : adventitious root		2			yellow	80
	1	3			brown yellow	73

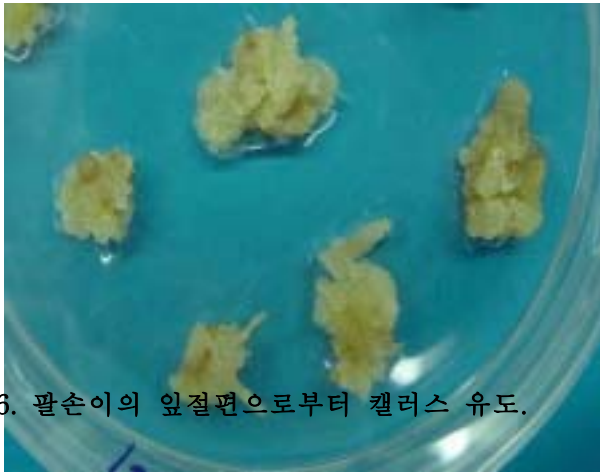
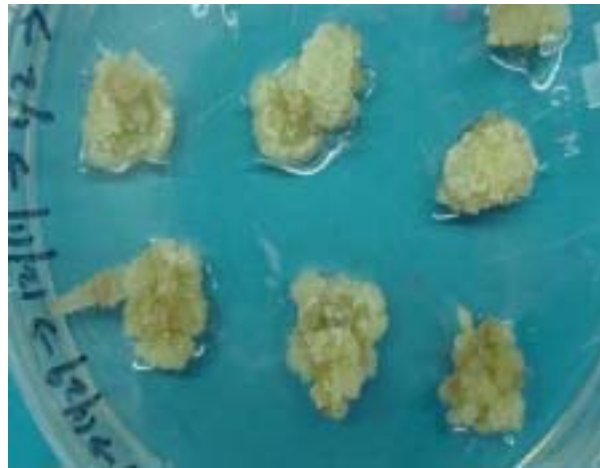


Fig. 66. 팔손이의 잎절편으로부터 캘러스 유도.

3) 팔손이나무의 부정근 유도

캘러스 유도와 같은 방법으로 무균 발아된 유식물의 잎을 1cm² 크기로 절단하여 Auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinins(BA, BAP, kinetin)을 조합한 MS고체배지에 치상하였다. 그 결과 전반적으로 부정근의 발생은 매우 느리게(치상 5주 후) 이루어졌고 그 중에서도 IAA 3mg/l(69%), NAA 3mg/l(71%), BA 0.5mg/l+NAA 1mg/l(70%)에서 부정근이 잘 유도되었다. 이 중 NAA 3mg/l에서 가장 높은 형성율을 보였다. 그 외의 조건들에서도 부정근이 유도되었으나 유도율이 현저히 떨어지거나 자라면서 갈변하였다. NAA 3mg/l과 BA

0.5mg/l+NAA 1mg/l, IAA 3mg/l에서 부정근이 잘 유도되었으며 다양한 호르몬을 처리하여 MS기본배지에 치상하였다.

Fig. 67.에서와 같이 팔손이나무 절편을 호르몬 조합배지에 치상한 약 5주 후, 처음에는 캘러스가 먼저 형성되었고 그 다음 2주 후에 부정근이 형성되었다. Fig. 67. A의 경우는 캘러스를 형성하지 않고 바로 부정근이 형성되었다.

Table. 19. 팔손이 잎절편을 이용하여 부정근 유도 (단위 : mg/l)

BA	2,4-D	NAA	IAA	adventitious root induction frequency(%)
			1	49
			2	50
			3	69
		1		-
		2		46
		3		71
0.5	1			30
0.5	2			-
0.5	3			-
0.5		1		70
- : no response		2		-
0.5		3		32

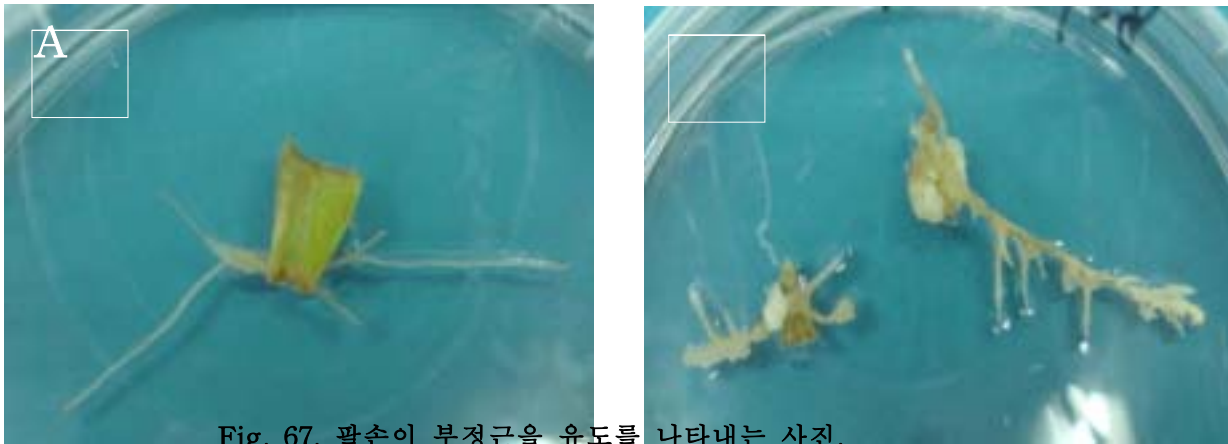


Fig. 67. 팔손이 부정근을 유도를 나타내는 사진.

나. 팔손이나마의 줄기 정아(액아) 배양

1) 팔손이나마의 정아로부터 신초의 유도

팔손이나마의 대량증식을 위하여 정아부분을 채취하여 살균처리 하였다. 70% Ethanol과 5% Sodium hypochlorite solution을 이용하여 표면살균하고 멸균수에 4회 이상 세척한 후 MS배지에 치상하여 1~2일 정도 오염여부를 확인하였다. 오염되지 않은 부분을 확인하고 식물생장조절제를 첨가한 배지에 치상하여 정아부분을 증식 시켰다. 치상 후 약 8주 후에 증식 하였다.

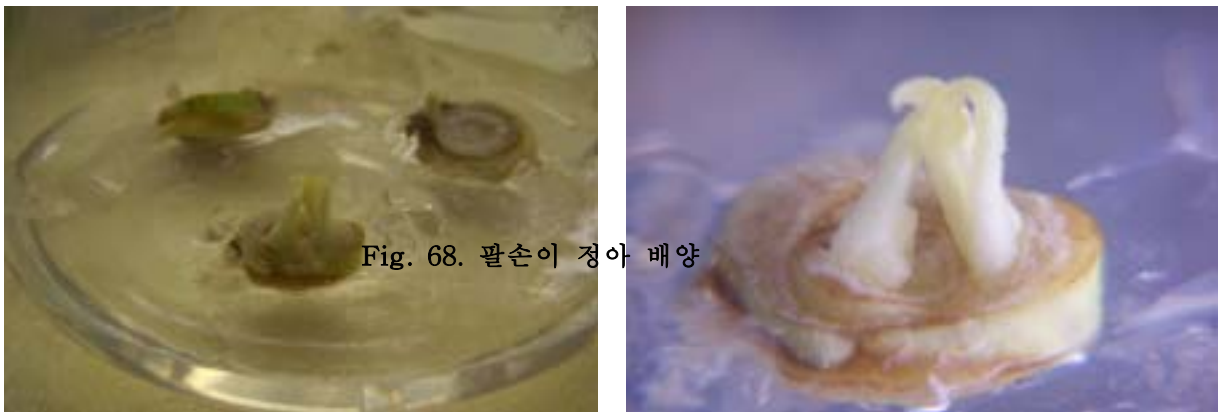


Fig. 68. 팔손이 정아 배양

2) 신초로부터 발근의 유도

신초로부터 발근을 유도하기 위해 IBA를 0.1, 0.25 그리고 0.5mg/L 농도로 처리하여 암조건에서 약 5주 동안 배양하였다. 그 결과 처음에는 신초당 2~3개에 불과하였으나, 이후 부정근의 형성이 빠른 속도로 진행되었으며 초기에 형성된 부정근보다 성장 상태가 양호하였다. 조직 배양에서 반복적인 계대배양은 줄기의 재 유령화를 촉진하는 것으로 알려져 있고 팔손이도 이와 유사한 결과를 보였다. 성숙목의 기내배양에서 root 유도의 향상은 재유령화 정도를 나타내는 지표가 되는데 이러한 재유령화는 배지에 처리된 cytokine의 영향으로 알려져 있다. 한편 IBA 0.5 mg/L와 1 mg/L 처리구 모두에서 발근율은 비슷하였으나, 길이생장에 있어서 큰 차이를 보였다. 즉, 0.5 mg/L IBA 처리구에서 보다 길이생장이 빠르게 이루어졌다.

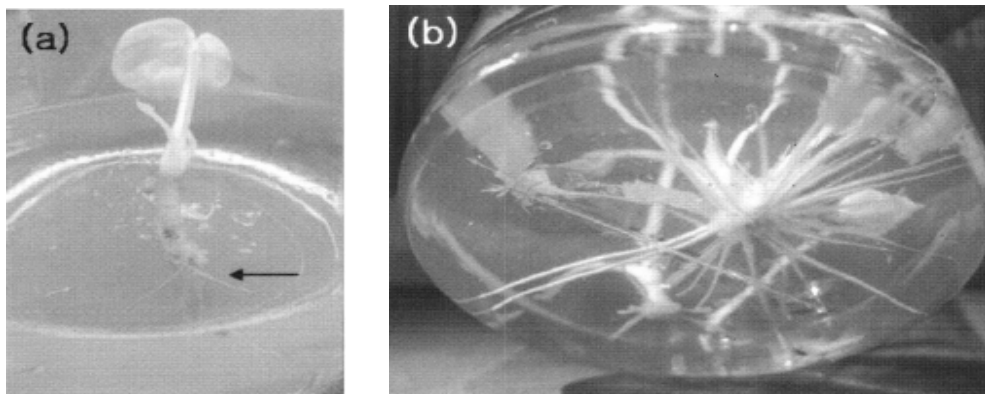


Fig. 69. (a) Root development of microshoot induced from axillary bud of *Fatsia japonica* on MS medium supplemented 0.5mg/l-1 IBA

(b) Root proliferation on MS medium containing 0.5mg/l-1 after 6 weeks.

오염이 없는 정아부분을 포함한 줄기를 1cm² 크기로 절단하여 Auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinin(BA)을 첨가한 MS고체배지에 치상하였다. 그 결과, 약 8주 후에 0.5mg/L BA와 2mg/L IAA를 첨가한 배지에서 shoot가 가장 잘 유도 되었다. 그 외 다른 호르몬을 첨가한 배지에서는 shoot가 조금씩 형성 되었으며, 유백색의 캘러스만을 형성하기도 하였다.

Table 20. 팔손이나무의 정아부분을 채취하여 shoot 유도. (단위 : mg/L)
 다양한 호르몬을 처리하여 MS 기본배지에 치상.

Plant growth regulators(mg/L)				Shoot
BA	IAA	NAA	2,4-D	induction(%)
0.5		1		-
0.5		2		25%
0.5		3		C
0.5			1	25%
0.5			2	C
0.5			3	-
0.5	1			C
0.5	2			50%
0.5	3			-

- : no response, C : Callus

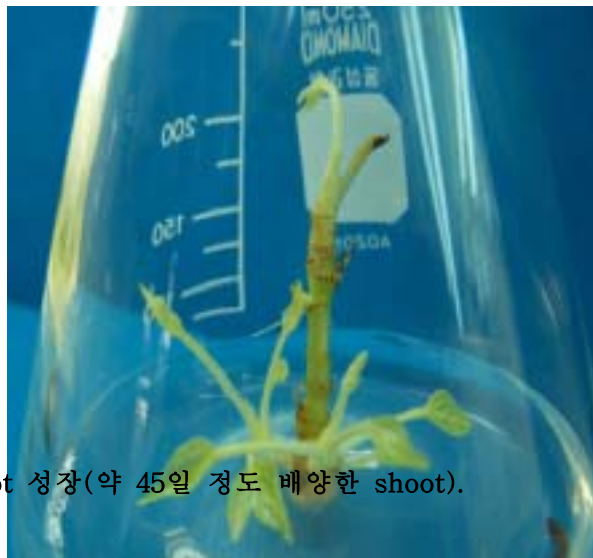


Fig. 70. 팔손이나무의 정아부분에서 shoot 성장(약 45일 정도 배양한 shoot).

다. 생물반응기의 선발 및 운영

1) 고체배지에서부터 고체배지로 옮김

유도된 팔손이 부정근을 NAA(3 ml/L), sucrose 3% 첨가된 MS고체배지에 치상하여 암상태에서 배양하였다. 4-5주 배양 후 팔손이 부정근을 고체배지에서부터 액체배지로 옮겼다. (Fig. 71 / Fig. 72)



Fig. 71. 고체배지에서 배양한 팔손이 부정근

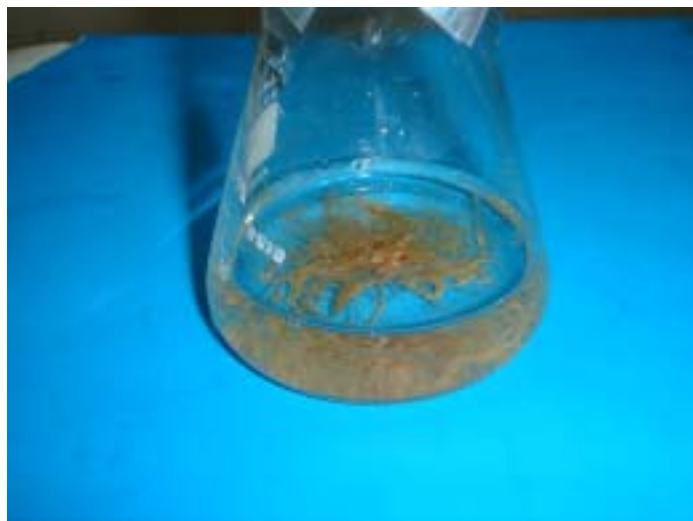


Fig. 72. 액체배지에서 배양한 팔손이 부정근

2) 액체배지에서의 배양

액체배지로 옮길 때에는 호르몬농도를 1/2로 즉 NAA(1.5 ml/L)로 낮추었다. NAA(1.5 ml/L), sucrose 3% 첨가된 MS액체배지는 100 ml 삼각flask에 각각 30 ml씩 분주하였고 고체배지에서의 팔손이 부정근을 2-3 cm크기로 2-4개/삼각flask 로 옮겨 shaking(100 rpm)조건하에서 암배양하였다. 액체배지에 옮긴 후 3-4주를 주기로 Subculture 해주었다.

계속 Subculture 해주면서 일정한 크기로 성장하여 직경이 약 3cm인 크기로 성장하면 중간부위 진한 갈색부위는 제거하고 일부는 3-4 개로 나누어 하나씩 각각 100 ml 삼각flask에 배양하고 일부는 2개로 나누어 250 ml 삼각flask에 접종하였다. 250 ml 삼각flask에는 같은 조건의 액체배지를 70 ml씩 분주하였다.

같은 방법으로 계속 Subculture 해주면서 5-6주 지난 후 250 ml 삼각flask 2-3개의 팔손이 부정근을 3L Reactor(같은 조건의 배지를 2L씩 분주하였다.)에 옮긴 후 암상태에서 대량배양하였다.



3) 팔손이 부정근의 색깔

Fig. 73. Reactor에서 배양한 팔손이 부정근

배양과정에서 관찰한 결과 팔손이의 부정근은 갈색, 옅은 갈색, 옅은 노란색 등 3가지의 색으로 관찰되었다.

4) 팔손이 부정근의 모양

같은 배지 조건에서 배양을 하였음에도 부정근의 모양이 각각 다르게 형성 되었다. 부정근 길이가 길고 가늘게 형성되는가 하면, 캘러스 덩어리와 함께 부정근이 짧게 형성되기도 하고, 캘러스는 형성되지 않고 부정근만 길이가 짧고 굵게 형성되기도 한다. (Fig. 74)

이것은 유전자 Phenotype 에 따라 나타나는 현상으로 보여진다.



Fig. 74. 팔손이 부정근의 모양.

제 7 절 대상 조직 배양체들의 배양 공정별 활성 비교 및 유용 생리활성 탐색

1. 실험내용

가. 팔손이의 부정근의 추출 및 농축

1) 부정근의 추출 및 농축

팔손이의 부정근 배양체는 채종 배양체 (SH Media-1), 정아 배양체(SH Media-2), 정아의 reactor에서의 대량배양체(B5 Media)를 배양배지를 제거하기 위해 충분히 수세하여 열풍건조 후 분쇄한 후 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대한 10배의 물과 에탄올을 사용하여 95℃와 65℃ 에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조 한 뒤에 각각의 수율을 계산하였다.

나. 암세포 생육 억제 및 세포 독성 측정

1) 세포주 및 배지조성

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 간암세포인 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방암세포인 MCF7(brest adenocarcinoma, pleural effusion, human)을 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 폐세포인 HEL299(Lung nomal, Human)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포들 중 Hep3B, MCF7은 DMEM배지를 HEL299는 RPMI 1640배지에서 10% heating- inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 적응시켜 배양하였다.

2) SRB assay

SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF7(10% FBS, DMEM배지) 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cell/ml로 96 well plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배지 (37°C , 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(tri chloroacetic acid) $100\mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 상온에서 30분동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer $100\mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay는 생세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 세포인 HEL299(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 $4\sim 5\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C , 5% CO_2)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, $100\mu\text{l}$ 의 MTT(50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO $900\mu\text{l}$ 를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Selectivity 측정

MTT assay를 이용하여 정상 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, 또한

SRB assay를 이용하여 각 암 세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$\text{Selectivity} = \text{암세포 생육 억제 활성} / \text{정상 세포에 대한 세포 독성}$$

다. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT assay로 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)assay는 생세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로 실험 대상 면역 세포인 Jurkat과 Raji(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 4~5×10⁴cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ml로 100 μl씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양한 후, 100μl의 MTT(50μg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900μl를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 각 well에서 100μl씩 취하여 96well plate에 옮긴 다음 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Cytokine은 IL-6와 TNF-의 정량을 Chemicon(USA)사의 IL-6와 TNF- 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 4~5 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 100 μl씩 첨가하여 다시 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

라. NK 세포의 면역증진효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum(FBS)와 12.5% horse serum(Myelocult)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24well plate에 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 900 μ l씩 분주하고 24시간 후 상층액을 각 plate에 100 μ l씩 투여하여 배양 48시간 후 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정하였다.

마. 세포 분화도 측정

세포 분화 측정에 사용된 세포주는 인간 전과립 세포(human promyelocytes; HL60)를 사용하였고 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며 RPMI 1640배지에 10% heat inactivated FBS(fetal bovin serum)으로 36.5°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포분화의 정량적인 수치를 측정하기 위해 세포의 농도가 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 포함된 배지를 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Sample을 농도별로 100 μ l씩 첨가하여 24시간 다시 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 배양하면서 배지를 pipetting 하여 15ml C-Tube에 옮겨 320 xg에서 10분간 원심분리 하였다. 배지를 제거한 후 0.1% Triton x-100을 200 μ l씩 첨가한 후 incubator에서 30분간 용해하였다. 용해된 solution 20 μ l를 96 well plate에 옮긴 후 3 mg/ μ l의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer(pH 5.0)를 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰으며 반응 정지를 위해 0.1N NaOH 100 μ l를 첨가한 후 ELISA Leader로 504 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정

세포의 팔손이 추출물에 대한 세포의 대사(산화)활성도의 영향을 측정하기 위하여 Microphysiometer (Molecular Devices, USA)를 사용하였다. Microphysiometer는 약물에 대한 세포의 산도변화를 측정하는 장비로 1회용 capsule 안쪽의 다공성 여과 막 사이에 세포를 놓고 관심대상의 약물을 cell chamber안에 유입시키면서 제한된 시간 내에 배양한다. 이때 세포의 대사활성도의 변화는 산성물질의 방출속도 변화의 결과를 반영하며, 이 신호를 silicon sensor는 전기신호로 바꾸어 해석한다. 한편, 약물에 대한 세포의 영향을 측정하는 일반적인 방법인 MTT assay나 SRB assay는 측정에 소요되는 시간이 3일 정도가 걸리나 Microphysiometer로 측정하면 약물투여 후 세포의 변화를 초(sec)단위 혹은 분(min) 단위로 곧바로 나타내기 때문에 시간절약 면에서 효율적이며, 3일 동안 일어날 수 있는 세포오염이나 세포 염색을 하기 전 상등액 제거 시에 세포의 유실에서 오는 실험오차도 극복할 수 있어서 보다 정확한 실험결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 실험 값은 실시간으로 컴퓨터 화면에 나타나는 장점이 있다. 그래서 Microphysiometer의 측정을 통해 MTT assay나 SRB assay를 측정할 때 비교 값으로 사용된다.

따라서, Microphysiometer의 측정은 본 논문에서 항암 활성 및 면역증강, 신경세포의 일반적인 측정 결과와 비교되었고, 세포에 대한 팔손이 추출물의 시간별 활성도 변화를 측정하였다.

1) 측정조건

Pump cycle은 total cycle time이 2분으로 하여 최종 측정되는 시간(start slope measurement(1min 28sec) → stop slope measurement (1min 58sec))은 30초로 하였다. 그리고 측정된 수치의 표시는 약물투여 전에 running buffer만을 흘려보내면서 측정된 값이 일정하게 유지되어지는 임의의 선으로 baseline을 설정하고 이것을 100%로 하여 이 baseline값에 대한 %로 표현하였다.

2) 접착성 세포의 측정

Adherent cell은 실험 1일전, capsule에 옮겨 안정화시켰다. Plate속에 있는 capsule cup에 3×10^5 cells/ml의 농도로 세포를 투여하여 27°C, 5% CO₂의 incubator에서 24시간 안정화시킨

다음 측정할 때 spacer, insert를 차례로 넣은 후, plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정한다. 이때 running buffer는 세포의 growth medium으로 하였으며, 본 실험에서는 인간 폐암세포인 AGS(stomach adenocarcinoma, human) 와 신경세포주인 PC12(Pheochromocytoma) 를 이용했으며 running buffer로 RPMI 1640배지를 사용하였다.

3) 부유성 세포의 측정

Non-adherent cell은 측정시 세포가 고정되지 않아 agarose로 고정을 시켜 측정하였다. Beaker속 20 ml 증류수를 70℃ 이상에서 hot plate를 이용하여 가열(microwave, Heating block등도 사용)하여 agarose가 녹을 때까지 약 2분간 Agarose Vial을 물 속에 넣는다. Vial을 37℃ water bath 나 Incubator에 옮기고, 세포용액을 모아서 centrifugation을 하여 부유물을 제거하고 난 후에 세포를 5×10^6 cell/ml의 농도로 만든 다음 이 세포액과 agarose를 3 : 1로 혼합하여 10 μ l 만 capsule cup에 넣고 굳힌 다음, 마른 capsule cup에 spacer와 Insert를 넣어 측정할 때 plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정하였다. 본 실험에서 측정된 세포로는 인간 면역세포인 T cell(Jurkat)을 이용하였고, running buffer로 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

사. 간기능 관련 생리 활성측정(해독작용 - Glutathione S-transferase 측정)

정유의 해독작용 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST(glutathione - S - transferase)의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4dinitro benzene을 첨가한 후 다시 37℃에서 2분간 반응시켰다. 반응후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리한 후 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤 다음과 같이 GST의 specific activity와 활성률을 계산하였다.

$$\text{Total activity (units)} = (A_{340}/9.6) \times \text{희석배수} \times (3\text{ml}/0.1) \times \text{crude extract(ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/ml protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

아. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) → Hippuric acid(고혈압 유발) + His-Leu Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

증류수에 50 μl (또는 시료)에 Hip-His-Leu 100 μl 를 첨가하여 37°C에서 5분간 방치한다 (Blank를 만들기 위해 1N HCl 0.25 ml를 첨가한 test tube 2개를 준비). ACE 효소액 150 μl 첨가 후 37°C에서 1시간 방치한다. 1N HCl 0.25 ml 첨가하여 반응을 정지시킨다. Ethyl acetate 3 ml를 첨가한 후 15초간 잘 섞은 후 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액 1 ml를 취한다. Oil bath 140°C에서 15분간 건조한 후 1M NaCl 3 ml를 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$E_c - E_s$$

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{-----})] \times 100$$

$$E_c - E_b$$

E_c : 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도
 E_s : 시료 첨가시의 흡광도
 E_b : 반응 정지 후 시료 첨가시의 흡광도

자. α -glucosidase 억제 기능 탐색

생체 내에서 혈당 상승의 결정적인 역할을 하는 α -glucosidase를 이용하여 실험을 수행하였다. 먼저 효소를 10 mM PIPES buffer에 용해시켜 효소액을 제조하고 20 mM maltose와 각 추출물을 농도별로 혼합한 후 37°C에서 20분간 배양한다. 반응액 60 μl 에 1 ml DNS 시약을 첨가하고 100°C 물에서 열탕 처리(10 min)하여 반응을 정지시킨 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 반응으로 생성된 환원당을 정량하여 각 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소활성 저해율을 계산하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 팔손이 부정근의 용매별 추출물의 생리활성 결과

1) 부정근

Table 21.는 배양 배지 별 부정근 추출물의 수율을 나타낸 것이다. 물과 에탄올 추출물에서 각각 채종 배양 부정근(SH media- I)는 6.76%와 4.31%, 정아 배양 부정근(SH media-II)는 6.51%와 4.52%, 정아 reactor 배양 부정근(B5 media)는 7.96%와 5.87%의 수율이 나타났다.

Table 21. The extraction yields of each fraction from ethanol extract of *Fatsia japonica*

Sample	Media type	extract solvents	Yield(%)
Adventitious Roots	SH Media- I	water	6.76
		ethanol	4.31
	SH Media- II	water	6.51
		ethanol	4.52
	B5 Media	water	7.96
		ethanol	5.87

나. 암세포 생육 억제 및 세포독성

1) 세포독성

Table 22.는 팔손이 부정근의 세포 독성을 나타낸 것으로 SH media-II으로 배양을 한 부정근이 가장 높은 13.3%의 세포독성을 나타내었고 SH Media-I가 11.2% B5 media가 10.3%의 세포독성을 나타내었다.

Table 23.은 팔손이 부정근의 에탄올 추출물의 독성을 나타낸 것으로 reactor 대량체의 독성이 1.0 g/L에서 10.6%의 세포독성을 나타내었고 타 배양 부정근에 비해 낮은 독성을 나타내었다.

Table 22. Cytotoxicity of Advetitious Root extracts of *Fatsia Japonica* on the human normal cell, HEL299 - extract solvents of water.

Sample	Dose (mg/ml)	Cell line
		HEL299
SH Media- I	0.2	4.3
	0.4	5.2
	0.6	7.2
	0.8	9.6
	1.0	11.2
SH Media- II	0.2	4.9
	0.4	6.1
	0.6	8.7
	0.8	10.4
	1.0	13.3
B5 Media	0.2	3.6
	0.4	5.2
	0.6	6.7
	0.8	8.2
	1.0	10.3

Table 23. Cytotoxicity of Advetitous Root extracts of *Fatsia Japonica* on the human normal cell, HEL299 - extract solvents of ethanol

Sample	Dose (mg/ml)	Cell line
		HEL299
SH Media- I	0.2	5.7
	0.4	6.6
	0.6	8.6
	0.8	10.3
	1.0	12.6
SH Media- II	0.2	5.8
	0.4	6.9
	0.6	7.8
	0.8	9.6
	1.0	14.7
B5 Media	0.2	4.2
	0.4	6.8
	0.6	7.6
	0.8	9.1
	1.0	10.6

2) 암세포 생육 억제 활성

Fig 75, 76은 팔손이 부정근의 암세포 생육 억제율을 나타낸 것으로 MCF-7와 Hep3B 모두에서 B5 media의 reactor 이용한 부정근 배양체에서 가장 높은 암세포 생육 억제율을 나타냈으며 SH media- I 과 SH media- II 순으로 암세포 생육 억제율을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 각 배양체의 세포 선택적 사멸도에 있어서도 유의적인 수준인 1.5 이상을 나타내는 것을 확인하였다.

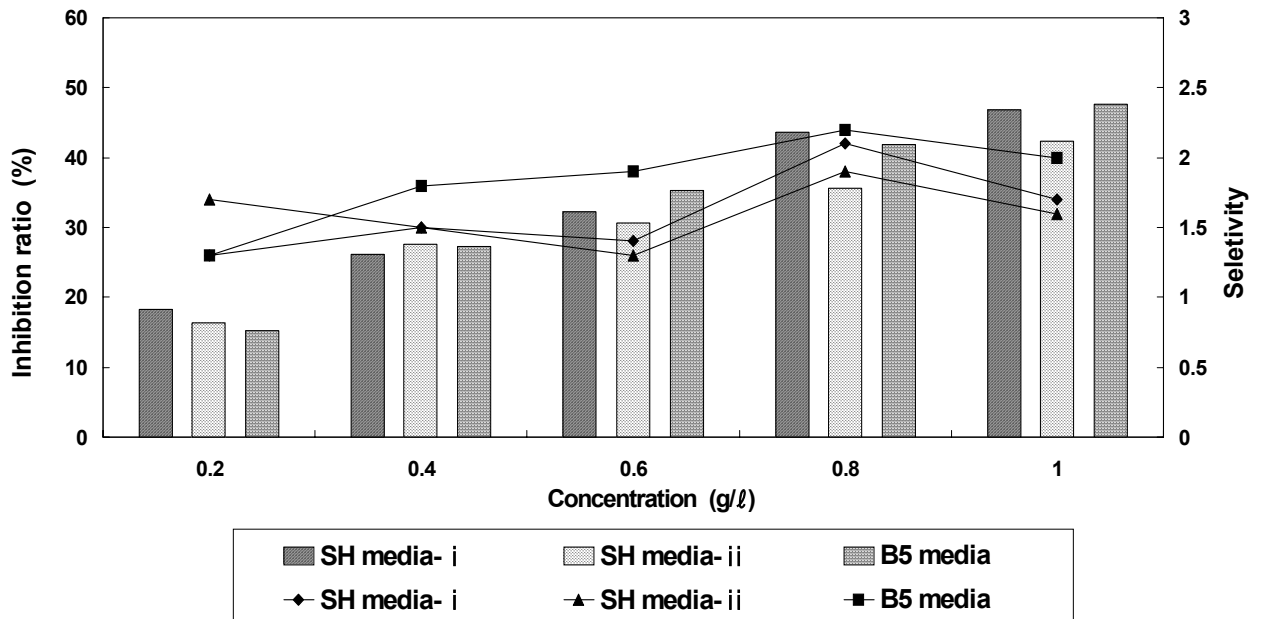


Fig. 75. Inhibition ratio of growth of MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

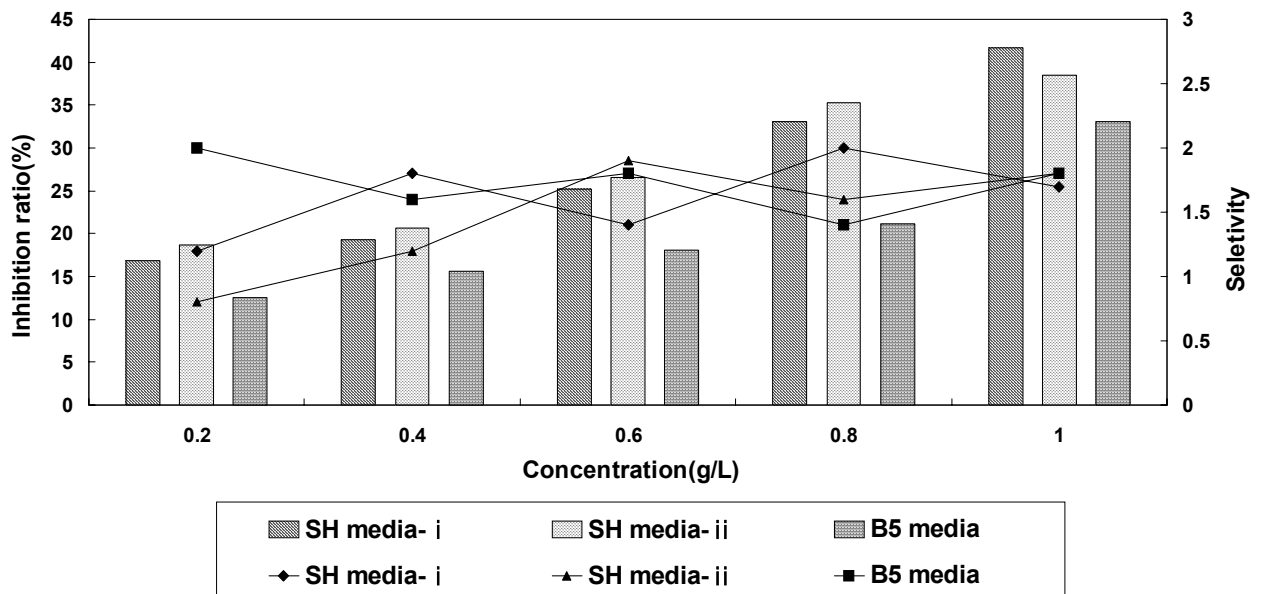


Fig. 76. Inhibition ratio of growth of Hep3B (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

다. 면역 증진 및 cytokine 분비량 측정결과

1) 면역 증진 측정

Fig. 77은 팔손이 배양체인 부정근을 배양 배지 별로 배양하여 그 추출물을 이용한 것으로 SH media-I 이 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 133%의 생육 증진을 나타내었고 이후 SH media-II와 B% media를 이용한 부정근의 생육 증진이 110%와 113%를 나타내는 것을 확인하였다.

Fig. 78은 팔손이 배양체인 부정근의 면역 세포인 T cell에 대한 생육 활성를 나타낸 것으로 SH media-I 을 이용하여 배양된 부정근 추출물이 가장 활발한 생육 변화를 나타내는 것을 확인하여 면역세포에 대한 생육 증진 효과가 가장 높게 나타나는 것을 확인하였다.

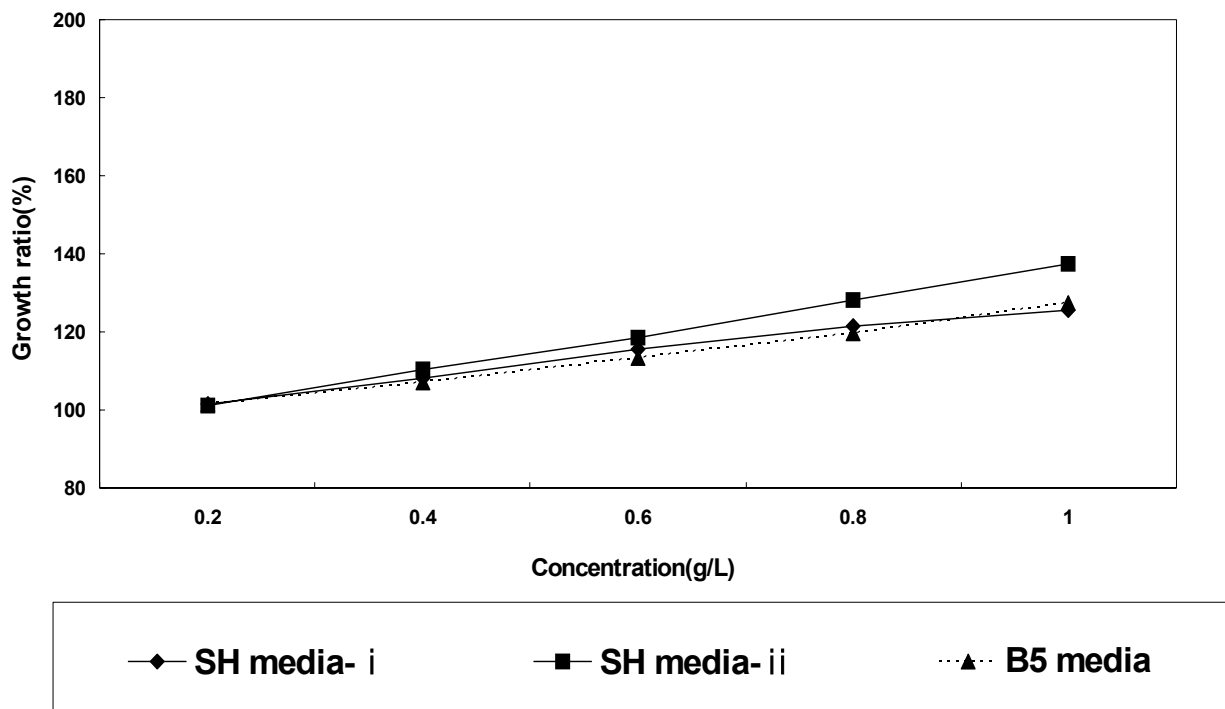


Fig. 77. The growth of human T cell(Jurkat) in adding the extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*.

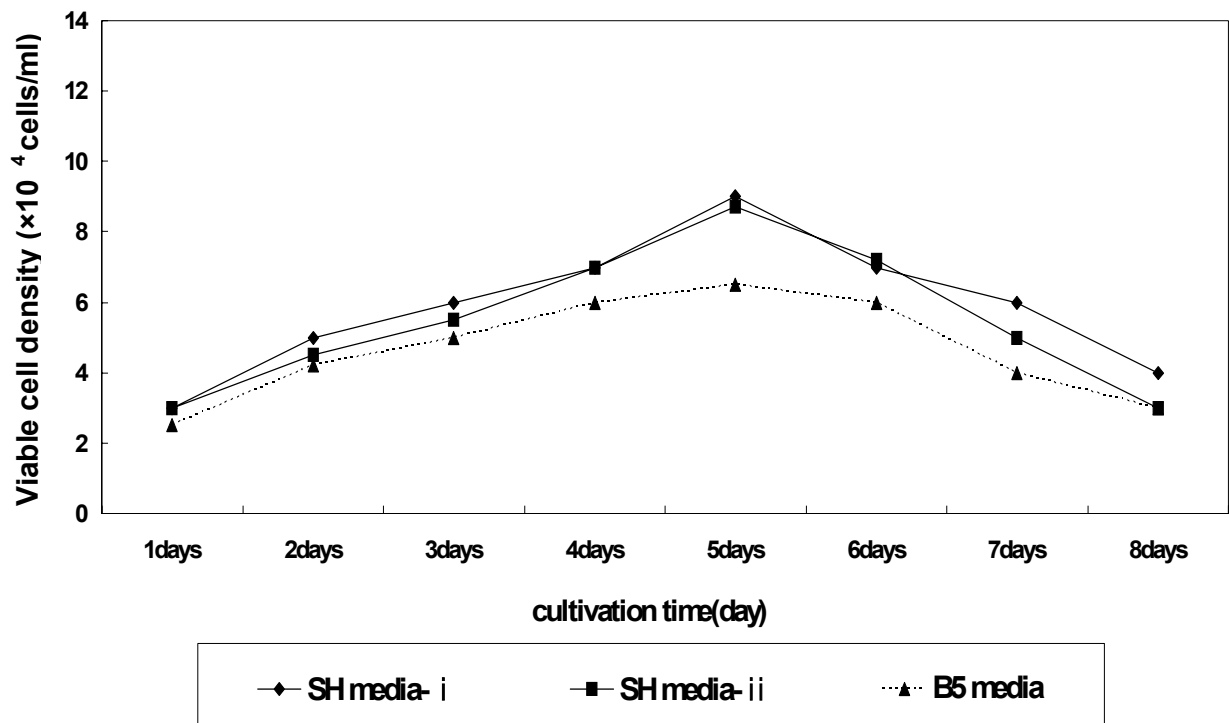


Fig. 78. The growth of viable cell density of human immune T-cells in adding the extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

2) Cytokine 분비량 측정

Table 24-1.은 배양공정별 부정근의 물 추출물을 첨가한 B, T 면역세포의 cytokine 분비량의 변화를 측정 한 것이다. 5일간의 배양기간 동안 cytokine IL-6와 TNF- 는 증가하는 것을 확인하였다. 이는 추출물의 첨가에 따라 면역세포의 생육이 증가에 따른 cytokine의 분비가 증가하는 것으로 확인할 수 있었으면 특히 reactor 배양 부정근의 추출물을 첨가한 면역세포의 cytokine 분비량이 증가하였다. 이를 통해 SH media-2를 통해 부정근 배양 공정을 최적화 시킨 후 대량배양에 성공하였기 때문에 reactor에 의한 배양 부정근은 팔손이 모체의 근피와 유사한 활성 증진을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. Table 24-2는 부정근의 에탄올 추출물의 cytokine 분비량을 나타내었고 물 추출물과 비교하여 평균 15%이상의 분비량 증가 효과를 보이는 것을 확인하였다. 이로서 최적화된 대량 배양공정을 통해 배양된 부정근은 팔손이 모체에 유사한 생리활성을 갖는 다는 것을 확인할 수 이었다.

Table 24-1. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell(Raji) and T cell(Jurkat) cultured in water extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

sample	time (day)	cell line			
		B cell(pg/ml)		T cell(pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
SH media-1(W)	1	22	18	25	39
	2	42	35	39	51
	3	52	64	62	64
	4	61	75	79	81
	5	79	87	85	90
SH media-2(W)	1	25	38	34	45
	2	48	54	55	51
	3	56	74	62	84
	4	68	85	78	87
	5	85	92	91	99
B5 media(W)	1	36	42	44	45
	2	47	66	56	54
	3	61	77	74	75
	4	77	84	84	86
	5	91	95	92	97

Table 24-2. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell(Raji) and T cell(Jurkat) cultured in ethanol extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

sample	time (day)	cell line			
		B cell(pg/ml)		T cell(pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
SH media-1(E)	1	34	24	32	35
	2	48	41	43	51
	3	54	68	74	71
	4	79	86	81	78
	5	81	91	86	94
SH media-2(E)	1	36	44	46	51
	2	52	63	59	60
	3	61	76	64	87
	4	74	81	81	91
	5	89	95	97	103
B5 media(E)	1	44	47	44	45
	2	53	61	56	54
	3	74	79	74	75
	4	82	87	84	86
	5	93	99	92	97
control(no addition)		13	14	13	16

라. NK 세포의 면역증진효과

IL-2 비의존형 NK-92MI cell을 이용한 인간 면역세포인 B, T 세포를 이용하여 이 세포들이 분비하는 IL-2를 비롯한 sample 투여로 인한 cytokine의 분비증가로 인하여 NK-cell도 그 활성도가 증가하는 것을 관찰하였다. 앞선 실험에서 나타난 B 세포의 면역 활성화도 증가 및 촉진 실험의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. B 세포는 B5 media 부정근의 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성도를 얻었는데 이의 배양액을 이용하여 NK-cell의 활성도를 측정 한 결과 가장 높은 생육 활성을 확인 할 수 있었다. Fig. 79 은 NK-cell의 B 세포의 배양액의 첨가에 따른 활성을 나타낸 것이다. 에탄올 추출물이 물 추출물과 비교하여 평균 18%정도의 활성 증진을 확인할 수 있는데 B5 media 추출물이 가장 높은 활성을 보여 6일째에는 B cell의 배양액을 첨가한 것이 약 14×10^2 cells/ml를 나타냈으며 control보다 약 2배 이상의 생육 증진도가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

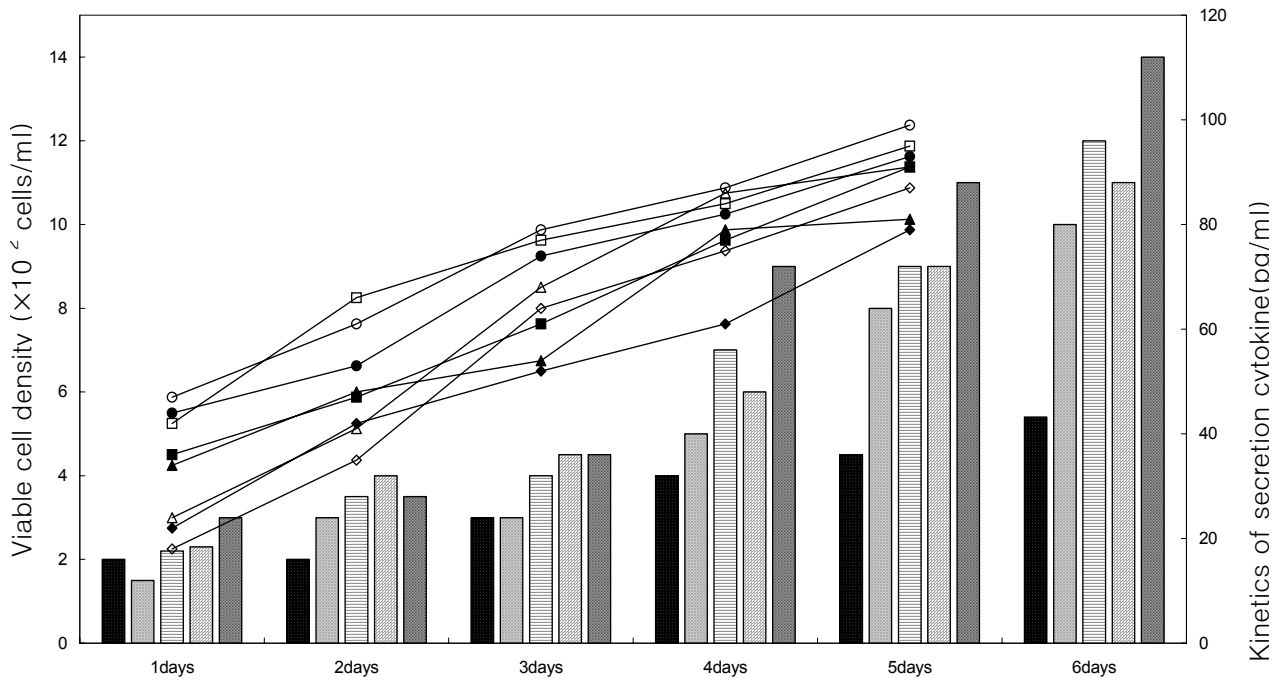


Fig. 79. The NK cell growth of viable cell density of human B cell(raji) in no

adding of adding the ethanol extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

Control
 SH MEDIA-1(W) B5 MEDIA(W) SH MEDIA-1(E) B5 MEDIA(E)
 SH MEDIA-1(W):IL-6 B5 MEDIA(W):IL-6 SH MEDIA-1(E):IL-6 B5 MEDIA(E):IL-6
 SH MEDIA-1(W):TNF- α B5 MEDIA(W):TNF- α SH MEDIA-1(E):TNF- α B5 MEDIA(E):TNF- α

마. 세포 분화도 측정

본 실험에 사용된 세포는 human promyelocytes(HL60)인 진골수세포로서 macrophage나 granulocytes로 분화가 되어 사멸하며 시료를 첨가하여 분화를 진행시키면 판상으로 세포가 군집하며 그 후에 판상의 세포 덩어리가 작은 세포덩어리로 분리가 되면서 세포가 비대해지고 본래의 세포특성인 부유성을 잃고 정착한다. 본 실험에서 시료를 투여하여 24시간 마다 cell의 morphology를 관찰 및 정량적인 분화도를 살펴보았다.

Fig. 80. 과 에탄올 용매를 이용한 부정근의 추출물이 물 추출물과 비교하여 약 5%이상 높은 분화 활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

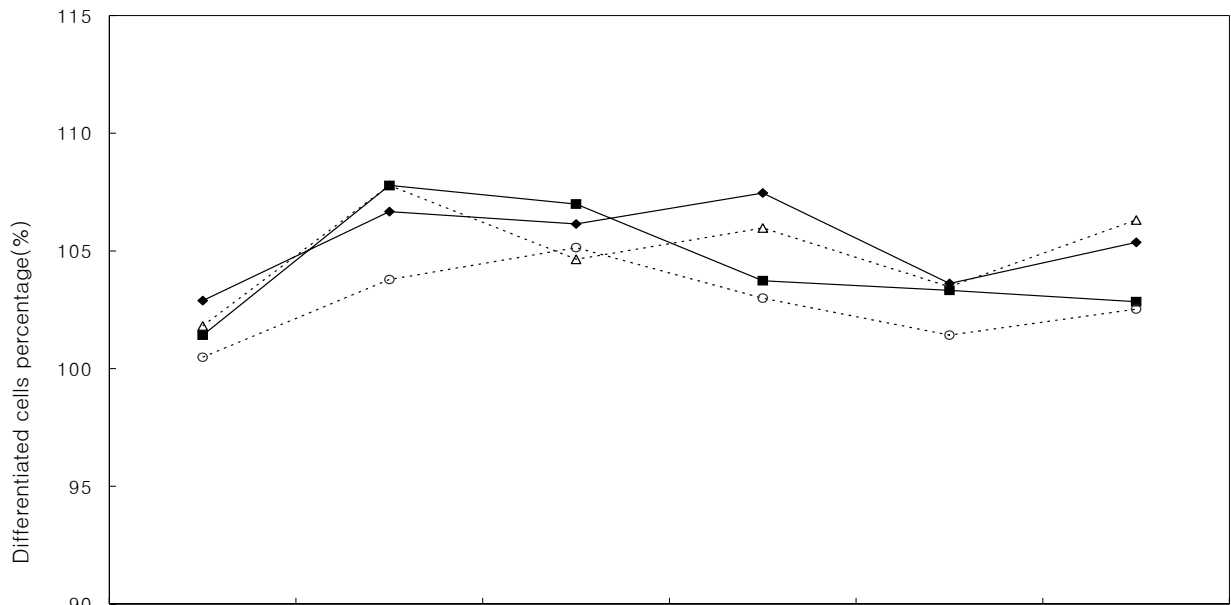


Fig. 80. Differentiated cells activity of HL60 cells in adding the water

extracts of Adventitious Roots in *Fatsia japonica*



바. Microphysiometer를 이용한 생리활성 측정

본 실험에서 측정된 팔손이 추출물의 암세포들에 대한 억제 활성을 검증하기 위해서 인간 유방암 세포인 MCF-7과 인간 면역 세포인 T cell, 신경세포인 PC12를 각각 Microphysiometer를 이용하여 4시간동안 1.0 g/L에서 측정한 결과를 Fig. 81~83.에 나타내었고 항암 활성 실험에서 높은 활성이 검증된 에탄올 추출물들을 중심으로 실험을 실시하였다. Fig. 81. 은 MCF-7을 이용하여 앞선 항암실험에서 확인된 억제활성을 검증하는 의미에 가장 나은 억제활성을 나타낸 에탄올 추출물들에 대한 실시간 억제활성을 측정하였다. 앞선 항암 활성 실험에 따라 MCF-7에 대한 B5 media 부정근의 에탄올 추출물이 항암활성은 최고 40%를 나타내었으며 이와 비슷하게 Microphysiometer를 이용한 활성 측정에서도 근피의 에탄올추출물이 높은 저해 활성도를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 82.은 T cell에 의한 면역활성도를 실시간 측정한 것이고 이것 또한 B5 media 부정근의 에탄올 추출물의 면역 활성도 측정 실험인 MTT assay와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 마지막으로 Fig. 83.에서는 인간 신경 세포인 PC12를 이용한 신경세포의 활성율을 측정한 실험이다. 앞선 PC12에 대한 생육 활성 실험에서와 같이 Microphysiometer를 이용한 활성도에서도 110% 미만의 활성율을 나타내었다. 이는 팔손이 부정근 추출물들이 신경세포의 신경활성 촉진인자가 비활성화된 것으로 사료되는 바이다.

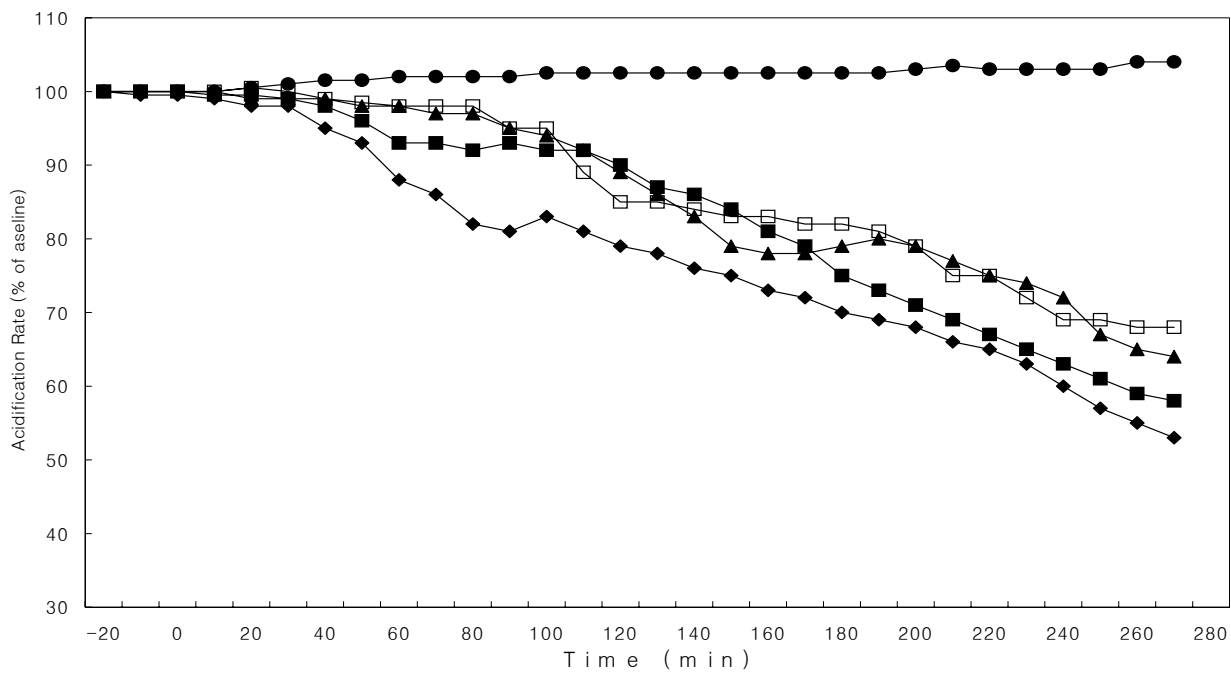


Fig. 81. The res ◆ SH MEDIA-1(E) ■ B5 MEDIA(E) ▲ SH MEDIA-1(W) □ B5 MEDIA(W) ● Control
 1.0 g/L of the ethanol and water extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica* for 4 hours, using a microphysiomer.

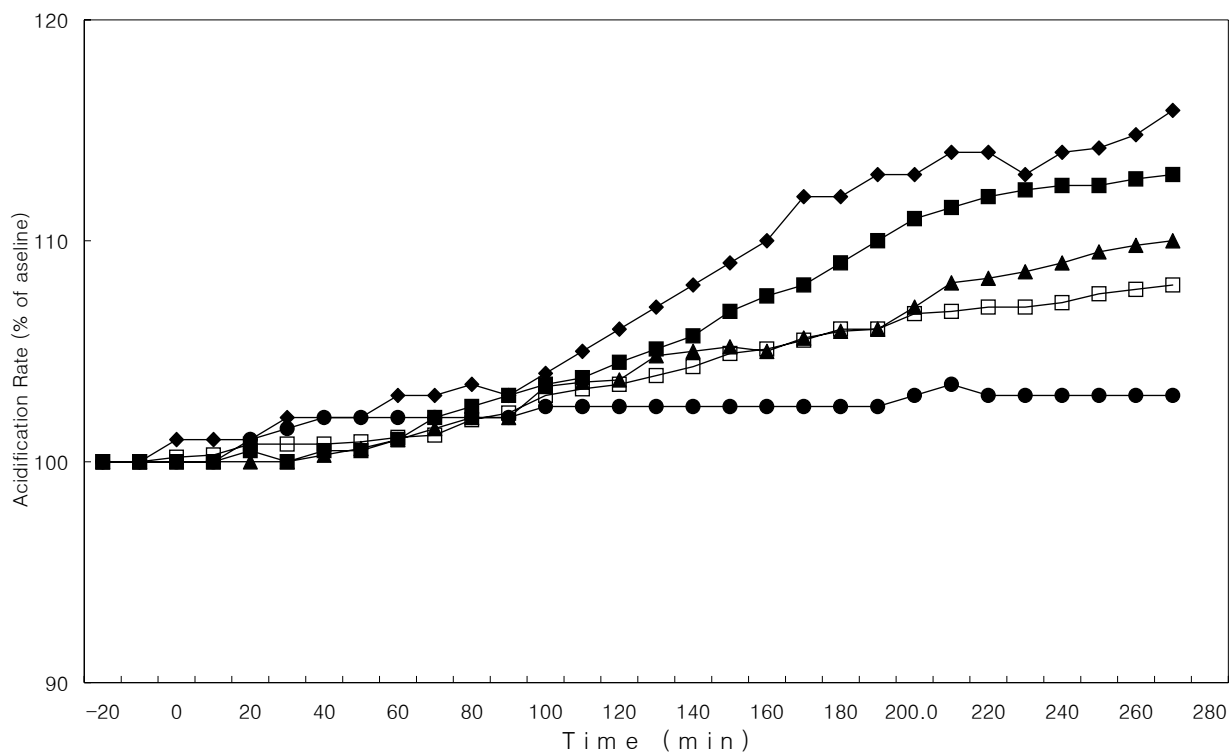


Fig. 82. The r ◆ SH MEDIA-1(E) ■ B5 MEDIA(E) ▲ SH MEDIA-1(W) □ B5 MEDIA(W) ● Control
 g/L of the ethanol extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*
 for 4 hours, using a microphysiomer.

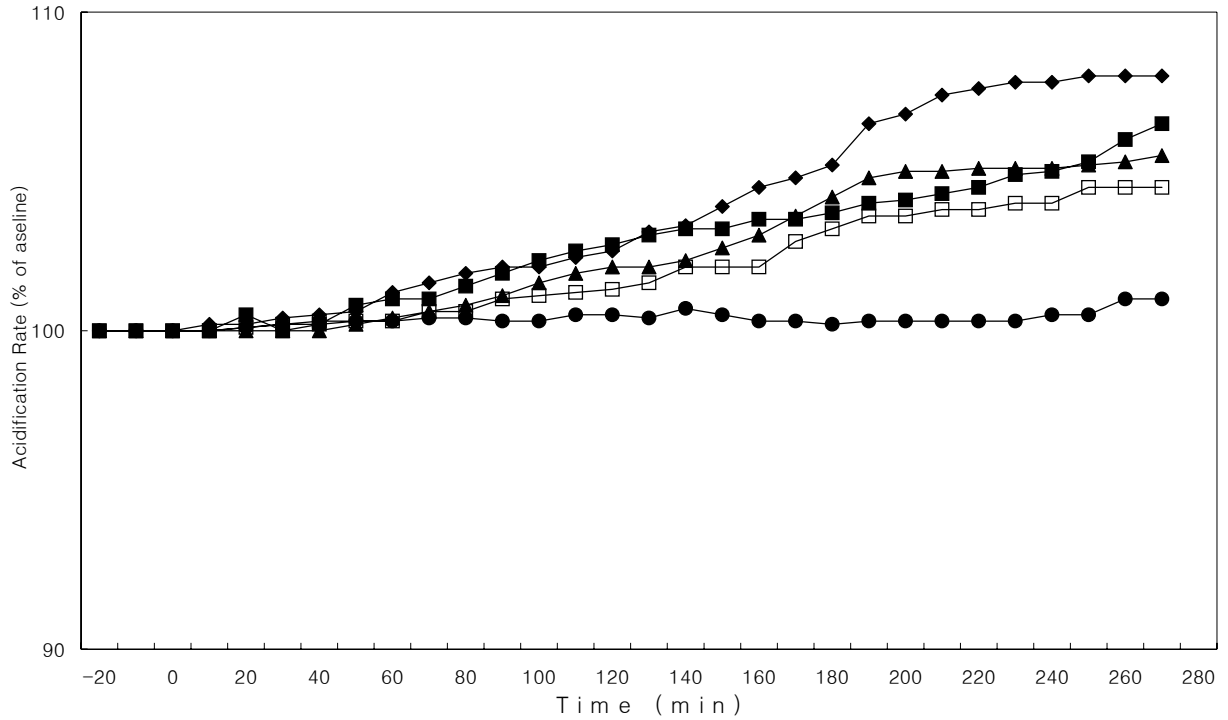


Fig. 83. The res ◆ SH MEDIA-1(W) ■ B5 MEDIA(W) ▲ SH MEDIA-1(E) □ B5 MEDIA(E) ● Control
 1.0 g/L of the ethanol extracts from Adventitious Roots in *Fatsia japonica* for 4 hours, using a microphysiomer.

사. 간 기능 관련 생리 활성측정(Glutathione S-transferase 측정)

Fig. 84.은 부정근의 물과 에탄올 추출물에 의한 간 기능 활성도를 나타낸 그래프이다. 각 추출물의 활성도는 B5 media 에탄올 추출물이 가장 높은 145%의 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 에탄올 추출물이 물 추출물과 비교하여 높은 활성을 나타내고 있다. 그러나 물 추출물이 낮은 농도인 0.5 g/1 이하에서는 에탄올 추출물 보다 높은 활성을 나타내는 현상을 확인할 수 있었다. 이 결과에 따라 에탄올 추출물을 효율적인 활용을 위해선 높은 농도의 추출물을 활용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

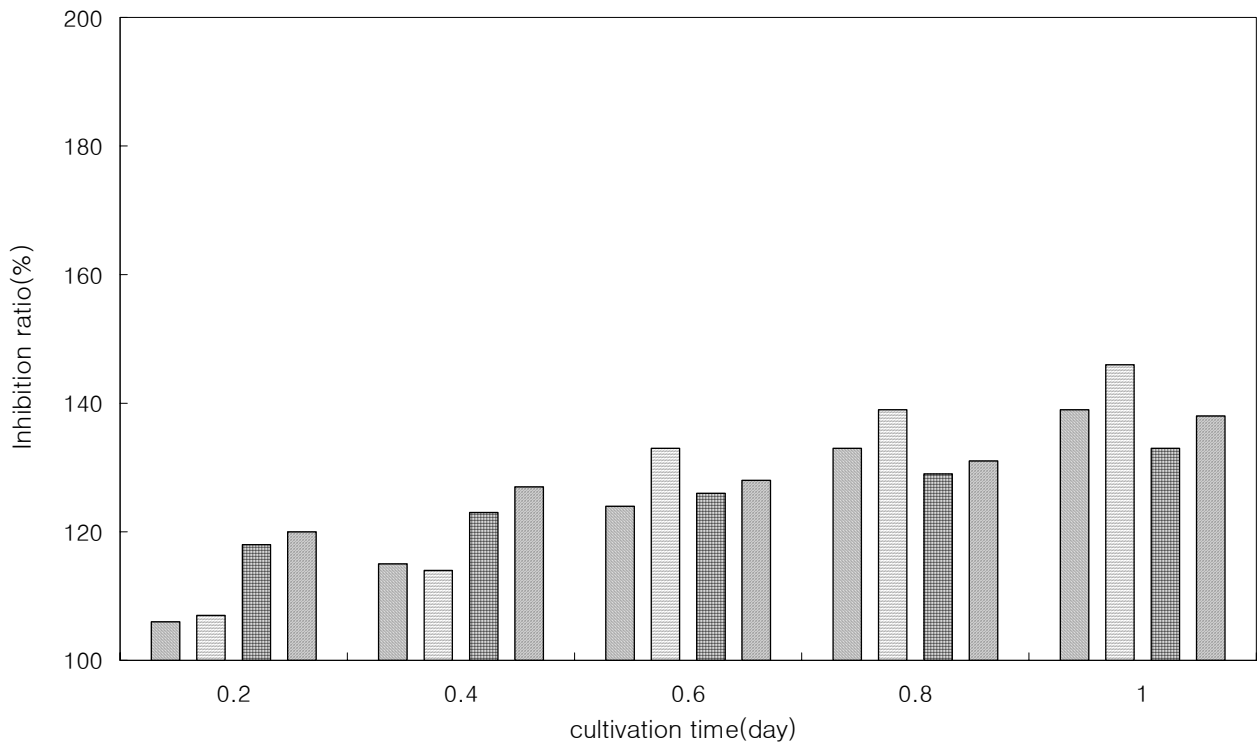


Fig. 84. The enhancement of glutathione-S-transferase activity in adding the fraction from ethanol extract from Adventitious Roots in *Fatsia japonica*

■ SH MEDIA-1(E) ■ B5 MEDIA(E) ■ SH MEDIA-1(W) ■ B5 MEDIA(W)

아. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 억제 활성

혈압상승의 주요 기작은 renin angiotensin system으로 angiotensin converting enzyme은 renin에 의해 생성된 angiotensin으로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로서 강력한 혈관수축작용을 갖는 angiotensin을 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. 생성된 angiotensin은 강력한 혈관수축작용을 가지고 aldosterone 의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며 또한 혈관이완 작용을 가진 bradykinin을 불활성화시켜 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 따라서 ACE를 저해시키면 혈압상승을 억제할 수가 있기 때문에 ACE의 억제활성을 살펴보겠다. Fig. 85. 은 각각의 추출 용매를 중심으로 활성을 살펴보았다. 앞선 다른 생리 활성 실험의 결과와 유사하게 SH media-1 부정근의 물과 에탄올

추출물이 가장 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며 특히 에탄올을 이용한 추출물들이 다른 용매에 비해 약 20% 이상의 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 특히 SH media-1 에탄올 추출물이 43% 정도의 활성을 나타내었다.

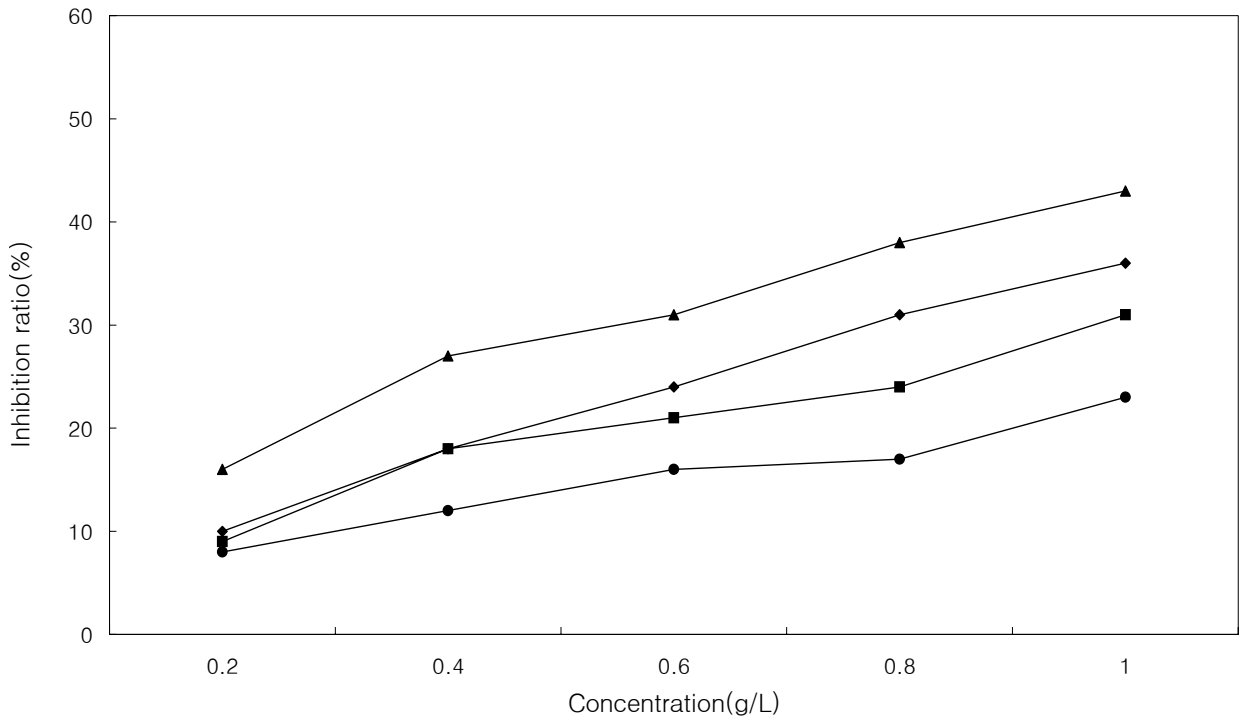


Fig. 85. Inhibition of Angiotension Converting Enzyme activity in adding the ethanol and water extracts from Adventitious Roots of *Patsia japonica*

자. -glucosidase 억제 기능 탐색

Fig. 86. 은 혈당강하 실험의 결과를 나타낸 것으로 팔손이 각 부위의 용매별 추출물에 의한 활성을 살펴보았다. 각 추출물은 농도에 따라 유의적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 에탄올 용매를 이용한 SH media-1 부정근의 추출물은 1 g/l의 농도에서 최대 50%

이상의 활성이 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며 최저 농도인 0.2 g/l에서는 30%정도로 상당히 높은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 유사하게 SH 부정근은 모든 추출물에서 다른 부위보다 상당히 높은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

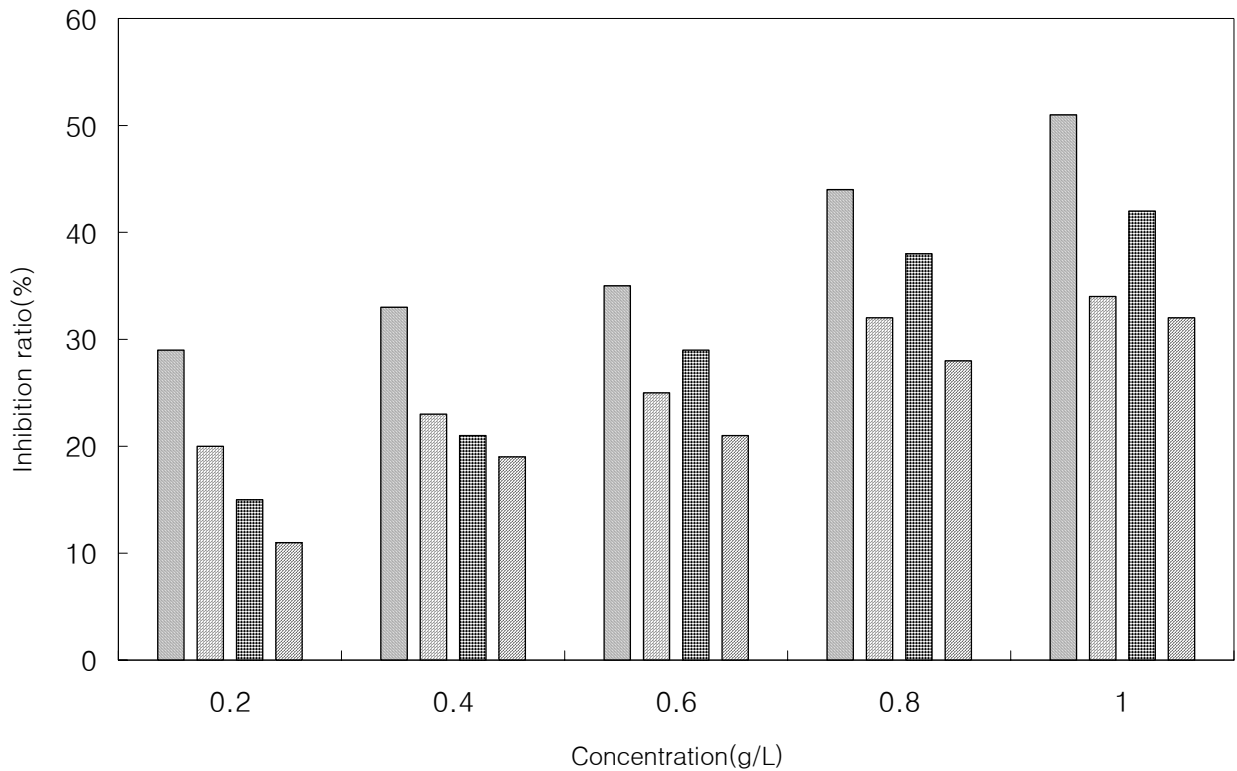
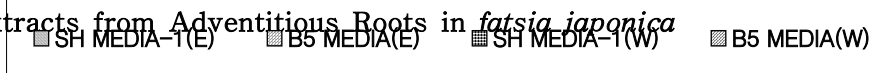


Fig. 86. Inhibition effect on Hypoglycemic activity in adding the water and ethanol extracts from Adventitious Roots in *fatsia japonica*



제 8 절 팔손이 근피를 이용한 기능성 식품 생산 공정 확립 및 경제성 평가

1. 시제품 제작 방법

가. 분말

1) 개요

팔손이 근피의 추출액을 이용한 분말 시제품 제조 및 관능평가를 실시하였다.

분말 제품의 제조를 위해 Fig. 87와 같은 순서로 분무건조기를 사용하여 팔손이 근피 추출액을 분말화 하였으며 분말제품의 제조를 위해 텍스트린을 이용하였다. 팔손이 근피 추출액 분말은 일반적으로 물과 함께 섭취하거나 물에 희석하여 음용할 수 있도록 부드러운 분말제로 제조한 것이 특징이다.

2) 추출

분쇄한 팔손이 근피 원료의 10배수에 해당하는 100℃ 열수에서 12시간씩 2회 반복 추출하여 추출액을 얻었다.

3) 분무 건조 방법

팔손이 근피 추출액에 텍스트린을 첨가하여 45~50 °Brix 을 유지시킨 후 150℃로 예열된 분무건조기를 이용하여 분말 제품을 제조하였다.

4) 관능검사

관능검사는 30명의 관능평가 대상자 (남 19명, 여 11명) 들에게 팔손이 티백차를 열수 100ml에 침출 시킨 후 5점 채점법 (5점: 아주 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 조금 나쁘다, 1점: 나쁘다) 을 이용하여 색상, 향, 맛의 전반적인 기호도에 대하여 실시하였다.

팔손이의 분말제조공정도

팔손이 근피 및
부정근의 열수 추출
(100℃, 12시간 2회)



당도 조정
(40~45°Brix)



Spray Dryer (110℃, 2시간)



분말화
(powder)



진공 포장

Fig. 87. 팔손이의 분말화 공정도

나. 과립차

1) 개요

팔손이 근피 추출 농축액 및 부정근 추출 농축액을 이용한 과립차의 시제품 제조 및 관능평가를 실시하였다.

과립 시제품은 팔손이 근피 추출액의 2배수 농도 농축액을 이용, Fig. 88 과 같은 방법으로 제작하였고 농축액의 당도는 3~4 °Brix를 유지하였다. 이를 기준으로 강한 향미 순화에 유용한 감초와 가시오가피 추출액을 첨가하였다. 이후 관능평가를 통해 과립차의 원재료인 팔손이 근피 농축액 및 부정근 추출 농축액의 농도를 6배수 이상으로 증가시켜 관능평가에 임하였다.

2) 추출 및 농축

100℃ 열수에서 12시간씩 2회 반복 추출하고 감압 농축기를 이용하여 3, 9, 14 °Brix 로 농축한 후 과립차의 원료로 이용하였으며 감초 및 가시오가피는 각각 12시간동안 1회 100℃의 열수를 이용하여 추출하였다.

3) 과립화 방법

팔손이 근피 농축액 및 부정근 추출 농축액과 감초 추출액의 일정량, 가시오가피 추출액의 일정량, 무수결정포도당 일정량을 혼합하여 체망이 설치된 과립차 제조기를 이용하여 과립화시켰다. 과립 건조는 37℃의 열풍건조기를 이용하여 10%의 수분함량이 되도록 건조하였다.

4) 원료의 혼합비

가) 팔손이 근피 과립차

- 팔손이 근피 추출액(14%)+가시오가피 추출액(30%)+감초 추출액(4%)+무수결정포도당(52%)

나) 팔손이 부정근 과립차

- 팔손이 부정근 추출액(14%)+가시오가피 추출액(30%)+감초 추출액(4%)+무수결정포도당(52%)

5) 관능검사

관능검사는 30명의 관능검사 대상자 (남 19명, 여 11명) 들에게 팔손이 과립차 3g 을 열수 100ml에 녹인 후 5점 채점법 (5점: 아주 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 조금 나쁘다, 1 점: 나쁘다) 을 이용하여 색상, 향, 맛의 전반적인 기호도에 대하여 실시하였다.

팔손이의 과립차 제조공정도

팔손이 근피 및
부정근의 열수 추출
(100℃, 12시간 2회)



농축
(3, 9, 14°Brix)



분무 건조

농축액과 분말을
이용한 반죽



과립기를 이용한 과립 제조



진공 포장

Fig. 88. 팔손이의 과립화 공정도

다. 타정제품

1) 개요

타정 제품은 과립제품과 동일 공정을 거쳐 Fig. 89 와 같은 순서로 제조하였으며 팔손이 근피 추출물과 부정근 추출물을 이용한 과립 제품의 관능평가에서 가장 높은 점수를 보여준 과립 시제품을 이용하여 제조하였다. 타정제품은 복용이 간편한 장점이 있다.

2) 원료의 추출 및 농축

분쇄한 팔손이 근피와 대량 배양된 부정근에 원료의 10배수에 해당하는 100℃ 열수에서 12시간씩 2회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 또한 감압 농축기를 이용하여 14 °brix의 농도로 농축하여 이용하였으며 감초와 가시오가피는 12시간 동안 1회 추출하였다.

3) 과립 제조

농축한 팔손이 근피 추출액(10%) 및 부정근 추출액(10%)과 가시오가피 추출액(30%), 감초 추출액(6%)을 혼합하여 무수결정정포도당(54%)과 반죽하여 과립제조기계를 이용하여 과립을 제조하였다. 이후 약 10%의 수분량이 유지되도록 열풍건조기에서 건조한 후에 과립 균질기를 이용하여 타정제조에 적합한 크기로 분쇄한다. 분쇄한 과립의 원활한 타정 공정을 돕기 위해 magnesium stearate(0.5%, 결합제)를 첨가하여 타정하였다.

4) 관능검사

관능검사는 30명의 관능검사 대상자 (남 19명, 여 11명) 들에게 팔손이 근피 타정을 섭취시킨 후 5점 채점법 (5점: 아주 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 조금 나쁘다, 1점: 나쁘다)을 이용하여 색상, 향, 맛의 전반적인 기호도에 대하여 실시하였다.

팔손이의 Tablet 제조공정도

팔손이 근피 및
부정근의 열수 추출
(100℃, 12시간 2회)



농 축
(3, 9, 14°Brix)



과립 제조

농축액과 분말
반죽



분무 건조



타정기를 이용한 Tablet 제조



진공 포장

라. 파우치

1) 개요

기능성 식품으로 판매 및 제조되는 제품군들 중 가장 많은 양을 차지하는 파우치 제조공정은 살균 처리된 착즙, 추출액, 농축액을 포장 판매하기 위해 사용되는 방법 중 하나이다.

본 연구에서는 팔손이의 음용이 용이한 제품을 제조하고자 다양한 감미 원료를 첨가한 후 Fig. 90 과 같은 방법으로 시제품 제조에 이용하였으며 팔손이의 추출 원액 및 부정근 추출 원액과 함께 관능평가를 실시하여 비교 평가하였다.

2) 원료의 추출

분쇄한 팔손이 근피와 대량 배양된 부정근 원료의 10배수에 해당하는 90℃ 열수에서 12시간씩 2회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 사용된 감미 원료는 모두 혼합하여 90℃ 열수에서 12시간 추출하여 이용하였다.

3) 파우치 제조

팔손이 근피 추출액과 부정근 추출액의 감미 원료 추출액을 4%의 올리고당과 혼합하여 멸균 파우치 포장기를 이용하여 80ml 용량으로 포장하였다.

4) 관능검사

관능검사는 30명의 관능평가 대상자 (남 19명, 여 11명) 들에게 팔손이나무 추출액과 파우치 제품을 음용하게 한 후 5점 채점법 (5점: 아주 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 조금 나쁘다, 1점: 나쁘다) 을 이용하여 색상, 향, 맛의 전반적인 기호도에 대하여 실시하였다.

팔손이의 파우치 제조공정도

팔손이 근피 및
부정근 열수 추출
(100°C, 12시간 2회)



농축
(약 5°Brix)



pouch 진공 포장 (80 ml / pack)



Fig. 90. 팔손이 근피와 부정근을 이용한 액상의 기능성 pouch 제조 후 살균



액상 pouch

2. 결과 및 고찰

가. 분말

팥손이 근피 분말의 관능평가 결과는 Table 26-1, 26-2와 같이 나타났다.

팥손이 근피의 분말은 30명을 대상으로 한 관능검사 결과에서 대체적으로 직접섭취시보다 열수에 용해 후 음용한 것에 대한 선호도가 높게 나타났다. 물에 녹임으로서 분말만 섭취하였을 경우 나타나는 거부감을 없앨 수 있다는 것이 주된 이유였으며, 단맛이 조금 더 강했으면 좋겠다는 것이 대상자들의 전반적인 추가 의견이었다. 따라서 팥손이 분말만을 단독적으로 직접 섭취하는 제품보다는 다른 식품이나 분말과 혼합함으로써 적당히 당도를 높인 분말 차로 제품화하는 것이 좋을 것이라는 결론을 얻었다.

팥손이 부정근 분말은 팥손이 근피와 달리 팥손이 특이의 saponin 향이 강하게 나타났으나 추출액을 분말화하는 과정에서 분무건조기 chamber 내의 150℃에 달하는 열에 의해 특이 향이 실활된 것으로 생각된다. 관능평가 결과 팥손이 근피 분말과 거의 유사한 결과를 얻었다.



Fig. 91. 팥손이 분말 시제품

Table 26-1. 팔손이 근피 분말의 관능평가 결과

구분	색상	향	맛
직접섭취시	3.80	3.65	3.70
열수에 용해 후 음용	4.05	3.70	3.90

Table 26-2. 팔손이 부정근 분말의 관능평가 결과

구분	색상	향	맛
직접섭취시	3.20	3.89	3.90
열수에 용해 후 음용	3.70	3.58	3.75

나. 과립차

팔손이 근피 및 부정근 과립차의 관능평가 결과는 Table 27. 과 같이 나타났다.

팔손이 근피와 부정근 과립차는 감초 및 가시오갈피 추출물을 이용해 단맛등을 증가시켜 높은 선호도를 나타내었다. 또한 팔손이 추출액의 농도가 지나치면 오히려 거부감을 나타내어 높은 선호도의 제품 제조를 위해선 팔손이 근피 및 부정근 추출물의 함량 조절과 당도의 증가가 적절히 이루어져야 할 것이라는 결론을 얻었다.



Fig. 92. 팔손이 과립 시제품

Table 27. 팔손이 근피와 부정근 과립차의 관능 검사 결과

구분	색상	향	맛
팔손이 근피	3.55	3.15	2.85
팔손이 부정근	3.50	3.25	2.90

다. 타정 제품

팔손이 근피와 부정근의 타정 제품에 대한 관능평가 결과는 Table 28. 과 같이 나타났다.

팔손이를 이용하여 만든 제품으로서 관능검사를 통해서 3번째의 선호도가 매겨진 제품은 팔손이 Tablet 제품으로 그 선호도가 비교적 높았다. 또 팔손이 성분의 집약이 이루어져 파우치와 더불어 가장 기능성이 뛰어날 것으로 판단된다. 선호도가 비교적 낮게 나온 것은 관능 검사에 참여한 인원의 대부분이 대학생으로 젊은 연령층이기 때문에 맛을 위주로 하는 다른 식품과 달리 타정은 약용일 것이라는 선입견 때문에 이런 결과가 나온 것으로 판단된다. 다만 팔손이의 색깔과 Tablet이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 불식시킬 수 있는 제품화 방법의 개선이 이루어진다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다. 팔손이 특유의 색과 질감이 단점으로 생각된다.



Table 28. 팔손이 근피 및 부정근 추출물의 타정 제품의 관능 검사 결과

구분	색상	향	맛
팔손이 근피	4.10	3.80	3.85
팔손이 부정근	4.15	3.95	4.00

라. 파우치

팔손이 근피 및 부정근 파우치의 관능평가 결과는 Table 29-1, 29-2.과 같이 나타났다.

팔손이를 이용한 기능성 액상 파우치 제품은 시제품 중에 가장 기호도가 좋은 제품으로 30명을 대상으로 한 관능검사에서 대다수에게 제일 좋은 점수를 받은 제품이다. 팔손이 농축액 특유의 향미에 감미제인 올리고당을 첨가하여 만든 이 팔손이 농축액 파우치는 감압과 가열이 없는 것이 특징으로 팔손이가 추출 될 때 기능성 성분들의 파괴가 일어나지 않고 그대로 농축액 중에 존재하는 것이 큰 특징이다. 특히 관능검사에서 가장 좋은 점수를 받을 수 있었던 것은 부담 없이 음료처럼 마실 수 있다는 장점 때문인 것으로 생각되며 이러한 장점을 이용하여 팔손이 기능성 음료의 개발을 시도한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 본다.



Fig. 94. 팔손이 파우치 시제품

Table 29-1. 팔손이 근피 파우치의 관능 검사 결과

구분	색상	향	맛
팔손이 근피 추출액	3.60	3.65	2.80
팔손이 근피 파우치	4.05	3.90	4.15

Table 29-2. 팔손이 부정근 파우치의 관능 검사 결과

구분	색상	향	맛
팔손이 부정근 추출액	3.85	3.70	3.12
팔손이 부정근 파우치	4.00	3.85	4.10

3. 팔손이 시제품의 경제성 평가

위 시제품 중 관능평가 결과에서 가장 높은 선호도를 보인 팔손이 근피 및 부정근 파우치에 대한 경제성 평가를 실시하였다. 주원료인 팔손이 근피와 기내배양공정을 통해 대량 배양된 부정근을 이용해 파우치를 생산하는 공정을 2차 가공공정을 거치지 않고 판매하였을 경우와 비교분석 하였다.

팔손이 근피는 팔손이 수목자체를 수집해야만 얻을 수 있는 부위이기 때문에 수목자체의 가격을 근피 원료의 가격으로 책정하였다. 팔손이 수목자체는 경동시장 및 기타 약재상에서 유통되지 않는 탓에 사제 수목원 등에서 두 뿌리 당 약 8,000원의 가격이 형성되어있으며 이를 통해 얻을 수 있는 최대 근피량은 약 250g 정도로 상당히 고가의 재료임에 틀림이 없다. 이는 팔손이 수목이 천연기념물로 제정되어 있어 대량 유통에 어려움이 따르기 때문인 것으로 사료되어 농가와의 계약적 재배를 통해 대량재배 한다면 이 원재료 가격은 더욱 낮아질 수 있을 것으로 생각된다. 이외에 제품 생산에 소요되는 기타 재료비 및 광열비, 인건비 등을 고려해 Table 30-1 과 같은 근거를 거쳐 팔손이 근피 100kg 당 제품화에 들어가는 비용을 6,636,000원으로 추정하였다. 이는 기존의 다른 수목을 이용한 제품화에 비해 결코 경제적인 비용은 아니다. 팔손이 파우치 제품과 비슷한 종류 및 기능의 기존 파우치 제품들이 시장에서 1box (80ml×20pack) 당 7,000~8,000원 정도의 가격대를 형성하고 있어 팔손이 파우치의 기능성과 선호도를 고려할 때 약 8,000원 정도에서 시장 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 생각되며 이 경우 팔손이 근피 100kg 당 564,000원의 이익을 기대할 수 있다. 이처럼 팔손이 파우치 제품 자체가 시장에서 경쟁력을 구비할 수 있는 가능성이 충분함에도 경제성 평가에서 높은 경제성을 가지지 못하는 이유는 주재료인 팔손이 근피의 원재료 가격의 고가에 기인한다. 따라서 팔손이 수목의 대량 재배 또는 기내배양을 통한 부정근의 배양체를 이용하여 원재료에서 소요되는 비용을 절감할 수 있다면 팔손이를 이용한 제품은 경제성 면에서도 막대한 경쟁력과 부가가치를 가질 수 있을 것이다. 이런 이유에서 팔손이 배양체인 부정근을 이용한 제품화에 대한 경제성 평가를 병행하여 팔손이 근피를 이용한 제품화와 비교하였다.

팔손이 부정근을 주원료로 하는 제품화 공정은 기타 비용에서 팔손이 근피와 동일한 재료 및 공정을 통하기 때문에 제반 소요 비용은 동일하게 책정하고 원재료의 가격에서만 차이를 가졌다. 팔손이 근피의 100kg 당 원료가는 320만원이지만 팔손이 부정근 100kg을 생산하기 위한 비용은 160만원이 소요되어 주원료인 팔손이 원료 구매가에서 1/2이 절약되었다. 팔손이 배양체를 이용한 파우치 제품이 기능성 및 성장에서 근피를 이용한 제품과 동일하다고 보

여지기 때문에 판매가는 동일하게 책정하였다. 따라서 Table 30-2의 근거에 따라 팔손이 부정근을 이용한 파우치 제품은 팔손이 배양체 100kg 당 1,864,000원의 이익이 발생하는 것으로 추정된다.

이처럼 팔손이를 이용한 파우치 제품은 그 경제성 평가를 통해 시장에서의 경쟁력 및 부가가치 창출이 가능함을 확인하였고 팔손이 기내배양 및 대량 생산을 통한 원재료의 원가 절감이 팔손이 제품의 시장 경쟁력 향상 및 부가가치 증진에 크게 작용할 것으로 생각되어진다. 따라서 팔손이 부정근 대량 배양 기술을 농가에 보급은 팔손이를 통한 보다 높은 이익과 농가 소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 30-1. 팔손이 근피의 원료와 이를 이용한 파우치 제품의 경제성 평가

(단위 : 원)

항목	팔손이 근피 파우치 제품 제작시
◦ 원료비	4,700,000
- 팔손이 부정근의 대량생산 비용	3,200,000
- 기타 부재료	1,500,000
◦ 생산량	900 box (80mL*20포)
◦ 전기료	36,000 (300Kw * 120원/Kw)
◦ 인건비	300,000 (50,000원 * 6명(일용직))
◦ 포장 재료비	1,600,000
◦ 판매가	7,200,000 (8,000원 * 900 box)
◦ 이익	564,000

Table 30-1. 팔손이 부정근 원료와 이를 이용한 파우치 제품의 경제성 평가

(단위 : 원)

항목	팔손이 부정근 파우치 제품 제작시
◦ 원료비	3,400,000
- 팔손이 부정근의 대량생산 비용	1,600,000
- 기타 부재료	1,800,000
◦ 생산량	900 box (80mL*20포)
◦ 전기료	36,000 (300Kw * 120원/Kw)
◦ 인건비	300,000 (50,000원 * 6명(일용직))
◦ 포장 재료비	1,600,000
◦ 판매가	7,200,000 (8,000원 * 900 box)
◦ 이익	1,864,000

요 약

제 4 장 요약

본 연구는 국내 자생 팔손이나무의 유용 활성 물질 생산과 대량 배양 공정 개발 그리고 이를 이용한 기능성 제품 및 생물의약품 소재와 같은 새로운 제품 개발이라는 주목표를 달성하기 위하여 3년 동안 연차별 연구를 추진하였으며, 이 결과를 토대로 식이가 가능한 물과 에탄올 용매를 이용한 팔손이의 부위별 추출물의 생리활성을 탐색하기 위하여 항암 및 면역활성, 분화 및 자기사멸, 신경세포의 활성, 효소활성 및 마우스를 이용한 항 스트레스 실험을 수행하였고 이의 실험결과에 따라 가장 높은 생리활성이 나타난 부위의 추출물 및 분획물을 이용하여 생리활성 실험 및 단리 화합물을 분리하였고, 동일한 실험을 수행한 결과, Ethyl acetate 분획층이 모든 생리 활성 실험에서 가장 높게 나타났으며 이의 단리화합물을 이용한 실험에서도 유사한 생리 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 조직배양체인 부정근은 암세포 생육 억제 및 면역세포 생육 증진 실험을 통해서 각 배양 배지에서 배양된 부정근의 생리활성을 확인할 수 있었다. 3년 동안 수행된 연구결과를 다음과 같이 요약할 수 있었다.

1. 근피, 수피, 잎, 목부의 부위별로 분쇄하여 물과 에탄올, 에탄올과 물의 (1:1) 혼합 용매를 이용하여 각각 90, 60, 75°C에서 12시간 2회 반복 추출하여 근피는 에탄올 추출물이 4.62%의 수율을 나타냈으며 물은 12.68%, 혼합용매는 13.3%의 수율을 나타냈다. 또한 수피는 3.43, 5.99, 5.97% 그리고 잎은 8.43, 12.88, 15.50%, 목부는 5.76, 13.86, 10.64 %로 물, 에탄올과 물의 혼합용매, 에탄올 순으로 추출수율이 높게 나타나 물 추출물의 경제성을 확인할 수 있었다.
2. 각 부위의 용매별 추출물의 정상 세포에 대한 독성을 살펴보기 위하여 인간 정상 폐 세포인 HEL299를 이용하였으며 각 추출물은 최대 농도인 1.0 g/L의 농도에서 22%미만의 세포 독성을 나타내었다. 암세포 활성 억제 활성 측정 결과에서 인간 유방암 세포(MCF7)는 에탄올의 근피 추출물이 1.0 g/L의 농도에서 약 74%의 억제활성을 나타내었고, 인간 위암 세포(AGS)는 45%, 인간 간암 세포(Hep3B)는 50%, A549는 53%가 나타났다. 또한 암세포의 생육활성에 대한 정상 세포의 세포 독성의 비로 나타낸 세포 독성은 최고 농도에서는 모두 1.5 이상으로 나타나 모두 암세포에 대한 선택성이 있는 것으로 나타났다. 또한 모든 실험

에서 에탄올 추출물의 활성이 가장 높게 나타났으며 그중 근피의 활성은 다른 부위의 추출물에 비해 최고 40%까지 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다

3. 면역세포의 생육 촉진 및 활성화 실험을 위하여 인간의 B cell과 T cell을 이용하였으며 각 추출물의 1.0 g/l의 농도에서 모두 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였으며 생육 활성화에 있어서는 B cell은 140%, T cell은 170%의 수치를 나타내었다. 생육 촉진에 있어서는 배양 6일째에서 T cell에서 근피의 에탄올 추출물에 의해 11×10^4 cells/ml의 세포 농도를 나타내었으며 B cell은 10×10^4 cells/ml의 농도를 나타내었다. 또한 근피는 모든 추출물 용매에서 다른 부위보다 높은 생육 촉진 활성을 갖는 것을 확인 하였으며 생육 활성화도와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

4. T cell과 B cell을 이용하여 cytokine의 분비량을 측정한 실험에서는 근피의 에탄올 추출물에 의한 cytokine의 분비 촉진이 배양시간에 따라 유의적으로 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 cytokine의 분비량은 배양 5일째에서 각 추출물 별로 가장 높게 나타났으며 T cell의 IL-6는 110 pg/ml와 TNF- 는 125 pg/ml 로 나타나 control에 비해 약 10 배 정도로 분비량이 증가하였으며 B 세포는 IL-6와 TNF- 가 각각 95 pg/ml, 105 pg/ml 로 control보다 약 9배 정도로 증가하였다. 또한 팔손이 추출물들을 첨가한 배지에 의한 T, B cell의 면역활성 및 cytokine의 분비량에 따른 NK-cell의 면역 활성을 측정하였으며 모든 추출물에서 배양 시간에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 앞선 면역세포의 활성 및 cytokine 분비량의 결과와 유사하게 근피의 에탄올 추출물을 첨가한 B cell의 배양액은 6일째에서 가장 높은 세포 농도인 13×10^2 cell/ml의 세포농도를 나타내는 것을 확인하였으며 T cell의 배양액은 14×10^2 cell/ml을 나타내었다. T cell과 B cell이 각 추출물에 따라 분비하는 IL-6와 TNF- 의 양에 따라 NK-cell의 생육 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 그래서 근피의 에탄올 추출물에 의한 NK-cell의 생육활성을 증가와 cytokine 그리고 T, B cell의 생육활성이 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다..

II

5. 추출물에 의한 유방암 세포인 MCF-7과 면역 세포인 T cell 그리고 신경세포인 PC-12의 활성을 실시간으로 측정하기 위하여 Microphysiometer를 이용하였다. 위암세포는 최종 측정시간인 280분에는 근피의 추출물이 최고 50%까지 활성을 저하시켰으며 측정 시간에 따라 활성이 점차 감소하는 것을 확인하였다. 또한 면역세포와 신경세포는 각각 최종 측정시

간에 120%와 108%로 활성을 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 앞선 항암 및 면역 활성, 그리고 신경 세포에 대한 활성 실험에서 SRB assay나 MTT assay를 이용하여 시료를 투여한 2일 후의 암세포 생육 억제 활성이나 면역 활성을 측정하여 결과를 얻었고 이와 비교하여 Microphysiometer의 결과와 유사한 경향을 보인 것을 확인하였지만 SRB assay나 MTT assay는 활성이 나타나는 과정을 실시간으로 파악하지 못하기 때문에 Microphysiometer에 의해 SRB assay나 MTT assay에서 정확한 활성의 경향을 확인할 수 있었다.

6. 세포의 분화는 인간의 전골수성세포인 HL-60을 이용하여 분화도의 정량적인 측정을 하였으며 근피의 에탄올 추출물들이 다른 추출물과 비교하여 약 5% 정도 이상의 분화활성도를 나타내었으며 배양 2일째에서 약 108%정도의 분화활성도를 나타내는 것을 확인하였다.

7. 각 추출물에 의한 효소 실험 결과에 따라서 α -glucosidase 억제 실험에서는 근피의 에탄올 추출물이 최고 농도인 1 g/L에서 50%이상의 활성을 나타내었으며 근피는 모든 추출 용매에서 각 농도별로 다른 부위보다 10%이상의 높은 활성을 나타내었다. ACE 효소 억제 실험은 고혈압 발생 인자의 억제와 관련된 실험으로서 이 실험에서는 다른 실험에서는 근피의 활성이 높게 나타난 반면에 수피의 에탄올 추출물이 1 g/L의 농도에서 43%의 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 간 기능 활성 실험에서는 간의 해독작용 기전 중의 하나인 GST의 활성을 통하여 간 기능 활성을 측정하였으며 근피의 에탄올 추출물이 1 g/L의 농도에서 165.2%의 높은 활성을 나타내었다.

8. 추출물에 의한 항 스트레스 효과를 측정하기 위하여 스트레스 실험을 하였으며 각 추출물에 의한 효과 측정을 위해 ICR 마우스의 혈청과 장기의 무게변화를 측정함으로써 확인하였다. 팔손이의 근피와 수피의 에탄올과 물 추출물을 경구 투여하여 항 스트레스 측정하였으며 수영 스트레스 실험에서는 근피의 에탄올 추출물이 standard control의 콜레스테롤 수치 55 mg/dl와 포도당 수치 108 mg/dl에 가장 가까운 64 mg/dl과 133 mg/dl가 나타났으며 열풍스트레스에서는 91 mg/dl 과 122 mg/dl와 냉온스트레스에서는 72 mg/dl, 117 mg/dl이 각각 나타났다. 그러므로 근피에 의한 항 스트레스 효과가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 추후 이것의 성분 분석을 통해 항 스트레스 성분을 확인해야 할 것으로 사료된다.

9. 팔손이 근피의 에탄올 추출물을 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Aqueous 층으로 각각 분획 추출을 실시하여 각각 0.476, 0.851, 0.963, 2.330% 의 수율을 얻었으며 부정근의 물 추출 수율은 SH media-I, SH media-II, B5 media를 이용한 배양체는 각 6.76, 6.51, 5.96% 의 수율을 나타내었다.

10. 1차 분리된 분획물의 암세포 생육 억제 및 면역 세포 활성 증진 실험에서 Ethyl acetate 층의 분획 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며 근피의 에탄올 조추출물과 유사한 활성을 보여 근피의 생리활성 물질이 Ethyl acetate 층에서 분리되어진 것으로 추측된다.

11. 팔손이의 유용 활성에 대한 작용을 규명하기 위해 팔손이 각 부위별 단리화합물을 분리하고 단리 화합물의 생리활성 실험을 수행하여 팔손이 단리 화합물에 대한 생리활성을 최초로 규명하였다.

12. 근피에서 분리된 단리 화합물인 28-O-β-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside 대체적으로 55% 의 암세포 생육 억제율을 나타내어 근피의 에탄올 추출물의 암세포 생육 억제율인 70% 와 유사한 활성을 보였다.

13. 근피에서 분리된 단리 화합물인 28-O-β-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside는 면역 세포의 생육 증진 효과에서 154%를 나타내 열매의 단리화합물인 3, 4-dihydroxybenzoic acid와 목부의 단리 화합물인 oxyresveratrol에 비해 높은 생육 증진 효과를 나타내었으며, 간기능 활성에서도 타 부위에 비해 15%까지 높게 나타났다.

14. 단리 화합물을 이용한 ACE 억제 활성에서도 열매의 단리 화합물인 3,4-dihydroxybenzoic acid와 근피 단리 화합물인 28-O-β-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside이 타 화합물에 비해 각각 20%와 43% 정도 높은 활성을 보였으며, 열매의 단리 화합물은 혈당강하 실험에서도 다른 부위의 단리 화합물에 비해 높은 활성을 나타내었다.

15. 수행된 실험의 결과에서 팔손이 근피로부터 분리한 화합물들의 활성이 다른 부위의 그것보다 높은 생리활성을 가지는 것을 확인하였다.

16. 팔손이나마의 무균 배양 확립을 위한 기내 무균 종자 발아를 위하여 표면살균하고 멸균수에 3회 이상 세척한 후 MS배지에 치상 후 발아를 유도하였고 과종 약 3주 후에 발아하였다.

17. Auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinins(BA, BAP, kinetin)을 조합하여 MS고체배지에 치상후 약 5주 후에 BA 1mg/l와 NAA 2mg/l, kinetin 0.5mg/l과 2,4-D(1 또는 2)mg/l를 첨가한 배지에서 유백색의 캘러스를 형성, 반면 kinetin 1mg/l과 2,4-D(1 또는 3)mg/l의 배지에서는 갈색의 캘러스가 유도되었다.

캘러스는 전반적으로 노란색(미색)를 띄고 비교적 단단하였으며 같은 조건의 호르몬 배지에서 일부는 약간의 부정근을 형성하였으나 이는 다시 캘러스화 되었다.

18. IAA 3mg/l(69%), NAA 3mg/l(71%), BA 0.5mg/l+NAA 1mg/l(70%)에서 부정근이 잘 유도되었고 이 중 NAA 3mg/l에서 가장 높은 형성율을 보였으나 다른 조건에서는 유도율이 현저히 떨어지고 갈변하였으며 NAA 3mg/l과 BA 0.5mg/l+NAA 1mg/l, IAA 3mg/l에서 부정근이 잘 유도고 다양한 호르몬 처리를 통하여 MS기본배지에 치상하였다.

팔손이나마 절편을 호르몬 조합배지에 치상한 약 5주 후, 초기에 캘러스가 먼저 형성되고 그 다음 2주 후에 부정근을 형성하였다.

19. 부정근 추출물은 배양 배지 별로 유사한 암세포 생육 억제 및 면역 세포 활성 증진율을 보이는데 SH 배지의 활성이 가장 높게 나타났다. 또한 근피 에탄올 추출물의 분획물을 이용한 NK 세포 생육 증진에 있어서도 에틸아세테이트 층의 추출물이 가장 높은 활성을 보였다.

HL60 세포의 분화도 측정에 있어서 에탄올 추출물들이 배양일이 증가함에 따라 분화율을 감소시키는 것을 확인하였다.

간 기능 활성 실험에서도 에틸아세테이트 층의 활성이 최고 150%의 간기능 활성 증진을 보였다. 그리고 고혈압 발현 효소의 억제 활성에 있어서는 에탄올 수피 추출물이 55%의 가장 높은 활성을 보였다.

20. ICR 마우스를 이용한 복수암 발현 실험에서는 근피의 추출물이 가장 높은 생존율을 보였고 에틸아세테이트 분획 추출물이 유사한 생존율 보여 Ethyl acetate 층에서 활성 성분이 분리되어진 것으로 보였다.

21. 팔손이의 부위별 추출물 및 배양체를 이용하여 분말, 과립차, 타정제품, 파우치 4종의 시제품을 제작하고 관능평가를 실시한 결과 팔손이 근피 파우치의 선호도가 가장 뛰어났으며 팔손이 부정근을 이용한 파우치도 거의 동일한 선호도를 나타냈다.

팔손이 파우치를 통한 경제성 평가에서 팔손이 근피를 이용한 파우치 제품은 팔손이 근피 100kg 당 564,000원의 이익을 발생할 것으로 기대되었다. 이를 통해 제품의 시장 경쟁력 및 부가가치 창출 가능성을 확인하였지만 제품 판매가의 70%를 차지하는 주재료인 팔손이 근피의 고가로 인한 높은 원가가 단점으로 지적되었다.

이러한 문제점 해결을 위해 팔손이 제품화에 팔손이 배양체를 이용함으로써 100kg 당 3,200,000원이었던 주재료의 원가를 1,600,000원으로 대폭 감소시킬 수 있다. 따라서 팔손이 근피를 배양한 커 배양체를 이용해 팔손이의 제품화를 함으로써 팔손이 수목자원의 보호는 물론 팔손이를 이용한 막대한 부가가치 증진 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

팔손이의 각 부위별, 용매별 활성 평가 실험 결과를 통해 팔손이 근피의 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 팔손이는 동과의 수종인 가시오갈피, 음나무, 두릅나무, 인삼등과 유사하게 근피의 활성이 타 부위와 비교하여 탁월한 효능을 보였는데 이에 근피 추출물을 분리, 동정, 정제하기 위해 근피의 에탄올 추출물의 분획을 실시하고 각 분획물의 생리활성을 확인한 결과, 에틸아세테이트 층의 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 추후 이를 활용한 단리 화합물의 분리 공정을 확립하고 부위별로 분리된 단리 화합물의 생리활성을 확인한 결과, 팔손이 근피로부터 분리된 단리 화합물이 다른 부위에서 분리된 단리 화합물 보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 기내배양을 통해 팔손이 부정근을 대량 배양하여 같은 실험을 수행하여 부정근의 에탄올 추출물 또한 앞선 팔손이 근피의 에탄올 추출물과 같이 유용한 생리활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 수행된 결과에 따라 팔손이의 생리활성이 가능한 근피 부위를 선별하고 이의 대량 배양 공정을 확립하였으며 이를 바탕으로 제안 공정에 따른 시제품을 생산하고 경제성 평가를 수행하였다. 또한 유용 활성이 높은 팔손이나무의 대량 식재 가능 지역을 선정하여 임업

농가 계약 재배 및 방법 지도를 통해 농가 소득 증대에도 기여하였으며, 수행된 연구 결과를 토대로 학회 논문 발표(9건) 및 특허 출원(2건) 등을 수행하였다.

목표 달성도 및
관련 분야에의 기여도

제 5 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

본 연구는 국내 자생 팔손이나무를 활용하여 유용 활성 물질 선별과 대량 배양 공정 개발 그리고 이를 이용한 기능성 제품 및 생물의약품 소재와 같은 새로운 제품을 개발이 주목표이다. 이를 위해 3년 동안 연차별 연구를 추진하여 당초 연구 개발 최종 목표 달성은 이루어진 것으로 평가된다.

이와 함께 각 단계별 연구 목표 및 달성 정도에 관한 결과는 다음과 같다.

1차년도 연구에서는 팔손이나무의 부위별 생리활성 탐색을 위해 팔손이의 부위별 채취 및 용매추출 방법을 결정하였고, 활성 물질의 분리·정제 공정을 확립하였다. 국내 팔손이 활성 성분들의 Data-base 구축을 위한 기초를 확립하였고, 팔손이나무의 형질전환과 진초배양 등의 무균 배양 확립을 위해 형질전환의 효율이 높은 물질 고생산 Line의 선발과 재분화 및 효율을 증진시키는 배양조건을 조사·확립하였다. 이를 바탕으로 팔손이 활성 성분의 소재화 적성을 검토하고 상기의 연구에 의한 팔손이 활성 물질의 유용성, 대량 배양, 소재화 가능성을 바탕으로 2년차, 3년차의 집중적 연구 개발을 위한 팔손이 및 활성 물질을 결정하였다.

2차년도 연구에서는 대상 활성 성분의 추출 및 수율증진 기술 확립을 위해 연구를 진행하였고, 대량 배양을 위한 기초 배양 실험, 배양 공정의 scale-up 및 최적화 기반을 마련하였다. 또한 1차년도에서 결정된 활성 물질의 *in vitro* 및 *iv vivo* 실험을 수행하였으며, 배양 방법별 조직 배양체들의 유용 활성 탐색 및 독성 실험을 수행하여, 기존 활성들과의 비교를 통해 *in vitro* 및 *iv vivo* 실험을 보다 체계적으로 실행함으로써 팔손이의 소재화 가능성을 검증하였다. 또 배양 단계에서의 배양조건 미세조절 물질생산에 적합한 기본조건을 측정하고 생물반응기의 최적배양 환경 모델도 선정하였다. 이와 같이 팔손이나무의 농가 계약 재배를 위한 유기적 협조 구축을 위한 시도를 진행하였고, 팔손이 활성 성분들의 추출, 고농도 농축 및 가공이 용이한 공정 적성 실험을 수행하였다. 따라서 상기의 연구에 의한 팔손이 배양체 및 활성 물질의 유용성(생리활성 검증), 고배양수율 및 제품화 가능성을 바탕으로 3년차의 집중적 연구 개발을 위한 모상근 등 팔손이 조직 배양체내 유용 물질 분리 및 정제와 함께 유용 물질의 생리 활성 기능의 소재화 여부를 판단하였고, 기술 관련 특허의 출원 및 학회 발표를

완료하였다.

3차년도 연구에서는 그동안의 연구결과를 바탕으로 생리활성 물질의 대량생산 시스템을 개발, 최적화하였고, 분리된 순수 물질들의 생리 활성 기작 연구와 활성 유지가 가능한 추출 공정을 확립하여 대상 유용 활성 물질 중 소재화가 가능한 물질을 선별, 대량 생산 공정을 통해 배양된 팔손이나마의 부위별 조직 배양체를 이용한 기능성 소재화 기술을 확립하였다. 또 생물반응기에서 증식된 세포 및 기간의 유효생물함량 증가 조건을 규명함으로써 대량 배양 공정 변수의 최적화 및 scale-up을 완료하였다. 이를 바탕으로 결정된 공정에 따라 시제품 생산 및 특허 출원을 완료하였다. 또한 개발 공정 및 시제품들의 marketing 분석 및 기타 경제성을 검토하여 농가의 관목 재배 기술지도 및 계약 재배를 위한 방안을 구축하고 연구 결과를 바탕으로 팔손이 유용 물질의 상용화를 위한 시설 및 운영비 계산 등과 같은 경제성 분석을 통해 최종 산업화를 위한 모델을 확정하였다.

최종적으로 3년 동안 단계적 연구를 통해 팔손이의 유용 활성 물질을 확인하고 대량 배양 공정을 확립시킴으로써 국내 자생 팔손이의 부위별 활용을 증진시킬 수 있었고 이를 이용한 제품화 공정을 산업화시킴으로써 고부가가치를 창출할 수 있는 공정 system을 확립하였으며, 대상 활성 성분들의 *in vitro*, *in vivo* 관련 생리활성 검증 및 가공적성 평가를 통해 팔손이나 무로부터 새로운 건강기능성식품 및 생물 의약품 또는 소재화 기술 개발을 이루어 고부가가치를 창출할 수 있는 새로운 형태의 팔손이나마 활용 기반을 마련할 수 있었다.

연구 개발 결과의 활용 계획

제 6 장 연구 개발 결과의 활용 계획

팔손이의 부위별 추출물, 단리화합물, 부정근 배양체등을 이용한 생리활성 결과를 통해 각 공정별 기술의 확립이 가능하였다. 특히 팔손이와 동과의 수종인 가시오갈피, 음나무, 두릅나무 등의 유용생리활성이 알려지면서 민간 및 기능성 식품 및 제약 회사의 원료로 이용되어 국내에서의 무분별한 채취가 자행되고 있다. 이에 따라 두릅나무과의 수종들은 멸종위기에 처해있고 이에 따라 이들 수종에 대한 종 보호를 위한 연구가 지속되고 있다. 그 예로 본 보고서에서 실시한 조직의 대량 배양법에 대한 연구와 기내 무균 종자 발아를 통한 유식물의 대량 생산을 통한 토양재배 등의 연구를 통해 각 종의 보호를 위한 연구가 진행되고 있으나 조직배양을 통한 유전자의 돌연변이 형질의 발현 등의 문제로 인하여 완전한 결과를 얻기가 힘든 실정에 있다. 이에 본 연구는 두릅나무과 수종의 대체 작물로서의 활용성을 극대화시키기 위하여 팔손이 수종을 활용하였다.

팔손이를 식·의약품 소재로 활용하기 위해 식용이 가능한 용매를 선택하였고 팔손이의 각 부위에 대한 추출물의 활성 비교를 통해 근피 추출물을 선택하여 이의 추출공정을 개발하였다. 이 추출공정에 의해 추출 수율이 약 5%까지 증가하는 것을 확인하였다. 또한 근피의 생리활성 실험 결과는 타 수종의 근피 추출물들과 결과와 유사한 것을 확인하였고 이를 활용한 식·의약품으로서 소재화의 경제성 효과가 높을 것으로 사료된다.

또한 타 수종의 대량 배양 연구에서와 같이 팔손이 부정근의 기내배양을 통한 이들의 추출물의 활용성도 확인할 수 있었다. 특히 부정근의 대량 배양은 기후 및 지형의 조건에 구애받지 않고 언제 어디서나 가능하기 때문에 경제적으로나 수종 보존을 위해서나 높은 효율성을 나타낼 것으로 사료된다.

이 기술이 상용화 되면 국내의 특용 작물 및 기타 임산물들을 이용한 산업에 일대 변혁이 예상되며, 수목자원이 새로운 소득 작목으로 부상해 지금까지의 단순 활용을 넘어 진정한 의미의 기능성 식품 또는 식품 소재의 개발에 시초가 될 것이다. 본 연구의 성공은 기존의 임산물을 이용한 기능성 식품 개발로부터 얻을 수 있는 경제적 과급효과의 수십 배에 달하는 결과를 얻을 수 있을 것이다. 특히 이 같은 대량 배양 공정에 의한 수목자원의 보존 방안을 병행한 산업화 기술은 다른 가공 공정에 비해 인식과 성공 가능성이 매우 높으며, 공정 개발이 곧 산업화와 직결되는 장점을 갖고 있다.

공정 개발의 산업화를 위해 분말, 과립, 타정, 파우치의 4종류 시제품을 제작하여 관능평가

를 실시하였으며 평가결과 팔손이 근피 및 부정근을 이용한 파우치의 선호도가 가장 높은 것으로 나타났다. 이 파우치 제품을 통해 경제성 평가를 수행한 결과, 원재료에 비해 가공 공정을 통한 파우치 제품이 상품성 및 경제성에서 우수함을 알 수 있었다. 하지만 팔손이 근피의 경우 나무 전체를 매입해야 이용가능한 부위인 턱에 원재료가 고가라는 단점을 안고 있어 원재료 및 가공물 모두 다른 작물과의 가격 경쟁에서 약점을 가지고 있다. 하지만 대량 기내 배양 공정을 통한 팔손이 부정근을 대신 사용함으로써 원재료 비용을 대폭 절감하여 가격 경쟁력을 갖출 수 있음이 경제성 평가를 통해 나타났다. 따라서 높은 기능성을 가지는 팔손이의 배양체를 이용함으로써 수목자원의 기능성과 경제성 모두에서 활용 가치가 높은 제품화가 가능성이 입증되었다.

또한 본 연구의 결과물인 시제품들을 marketing 조사한 결과 지금 현재 소비자들이 요구하는 새로운 형태의 기능성 제품 수요에 부응하는 것으로 성고 가능성이 매우 높다. 현재 시판 중인 제품에 기능성을 부여하여 새로운 형태로 개발, 시판하고자 한다.

참 고 문 헌

제 7 장 참고문헌

1. Herbert, T. B., World health, 47th year No.2, 4-5 (1994)
2. Cohen, S. and Herber, T. B., Health Psychology : Psychological factor and physical disease from the perspective of human psycholneuro -immunology, Annual Review of Psychology, 47, 113-142 (1996)
3. Biondi, M., Peronti, M., Pacitti, F., Pancheri, R., Altieri, I., Paris, L., Zuccaro, P. G., Personality, endocrine and immune changes agter eight months in healthy individuals under normal daily stress, Psychother Psychosomatic, 61 (1994)
4. Canter, A., Cluff, L. E., Imboden, J. B., Hypersensitive reactions to immunization and antceent psychological inoculations an antcedent psychological vulnerability, Journal of Psychosomatic Research, 16, 99-101 (1972)
5. Dobbin, J. P., Harth, M., McCain, G. A., Cousin, K., Cytokine production and lymphocyte transformation during stress, Brain Behavior immunology, 5(4), 339-348 (1991)
6. Jamner, L. D., Schwartz, G. E., Leigh, H., The relationship between repressive and defensive coping styles and monocyte, eosinophil, and serum glucose levels : support for the opioidpeptide hypothesis of repression, Psychosomatic Medicine, 50, 567-575 (1988)
7. Kiecolt-Glaser, J. K., Kennedy, S., Malkoff, S., Fisher, L., Speicher, C. E., Glaser, R., Marital discord and immunity in males, Psychosomatic Medicine, 50, 213-229 (1988)
8. Scheiderman, N., Behavior autonomic function and animal models of cardiovascular pathology, In Dembrodki T., Schmidt T., Blumchen G.(eds) : Biobehaviora l Bases of Coronary Heart Disease-Behavioral Approaches to a 20th Century Epidem ic. Basle, Switzerland, 304-364 (1983)

9. Shepard, R. J., Shek, P. N., Aminoacid, dieting, glycogen, muscle injury, overtraining, reactive, and species : Heavy exercise, nutrition and immune fuction. Is there a connection, *International Journal of Sports Medicine*, 16, 491-497 (1995)

10. Brenner I., Zamecnik J., Shek P., Shephard R. J.,The impact of heat exposure and repeated exercise on circulating stress hormones. *Eur. J. Appl. Physiol.* 76, 445-454 (1997)

11. Colins K. J., Weiner J. S., Endocrinological aspects of exposure to high environmental temperatures. *Physiol. Rev.* 48, 785-839 (1968)

12. Lee H., Kim W. S., Ann E. N., Son T. Y., Ann E. S., Exercuse stress and Immune responses. *The korean Journal of Exercise Nutrition* 2, 1-13 (1998)

13. Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plasnts. *Columbia Univ. Press, NewYork.* 843-845 (1981)

14. Hoo, G., Tseng C. C., *Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Tomus 54. Angiospermae Dicotyledonae Araliaceae. Facultas Biologica Universitatis Amoensis.* 25-26, 89-115 (1978)

15. Lawrence, G. H. M. *Taxonomy of vascular plants. The Mcmillan company. Newyork.* 370-372. (1951)

16. 김철환, 한국산 두릅나무과 식물의 분류학적 연구, 전북대학교 대학원 이학석사학위논문 (1989)

17. Baranov, A. I. Medicinal uses of ginseng and related plants in the Soviet Union : recent trends in the Soviet literature. *J. Ethnopharmacol.*, 6, 339-353 (1982)

18. Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Soejarto, D. D., Waller D. P. Siberian Ginseng(*Eleutherococcus senticosus*) : Current status as an adaptogen. In economic and Medicinal Plant Research (Wagner, H., H. Hikino and N. R. Farnsworth), Academic Press, London, Vol. 1, 155-215

19. Halstead, B. W., Hood, L. L. *Eleutherococcus senticosus*. Siberian ginseng, America, Oriental Healing Arts Institute. 1-94

20. 문관심, 약초의 성분과 이용, 일원서각 419 (1991)

21. 김영희, 김종평, 윤봉식, 문선식, 유익동, 엄나무 유래 신규 항산화물질. 천연항암자원에 관한 국제학술회의 논문집(한국약용작물학회) 11(2), 89-109 (1998)

22. Shao. C. J., Kasai, Ohtani R., Ohtani K., Tanaka O., Kohda H., Saponins from leaves of *Kalopanax pictus*(THUNB.) Nakai, Harigiri : Structures of *Kalopanax* saponins JLa and JLa. Chem. Pharm. Bull. 38(4), 1087-1089 (1990)

23. 이경준, 박종영, 박관하, 박훈, 고로쇠나무 수액의 화학적 성분, 영양가치와 saponins 함유 여부에 관한 연구. 한국임학회지. 84(4), 415-423 (1995)

24. Choi S. W. Antioxidative properties of methanolic extracts in leaves of *Kalopanax pictus* Naki.-Antioxidative activity of flavonoid in leaves of *Kalopanax pictus* Nakai. 대구 효성카톨릭대학교 연구논문집, 제54집, 1131-139 (1997)

25. 조종수, 단기임산신소득원 개발에 관한 연구. 임산 유지 및 칠 자원 개발. 임업연구원. 임업연구원. (1990)

26. 임기표, 정희중, 이정석, 황칠나무자원 이용기술의 개선 및 활용방안의 다양화 (I). 과학기술처 연구보고서. p. 109 (1995)

27. 문교부편, 한국동·식물도감. p. 99 (1982)
28. 이선주, 한국민속약, 서문당. p. 99 (1976)
29. 현대한방연구소편, 현대의 한방, 수예사(2권). p. 82 (1984)
30. Saito, S., Sumita, K., Tamurs, N., Nagamura, Y., Nishida, K., Ito, M., Ishiguro, I.,
Chem. Pharm. Bull. 38, 411 (1960)
31. 이창복, 대한식물도감. 향문사. 서울. p.575 (1989)
32. Perry, L. M., Medicinal plants of east & southeast asia. Attributed properties and
uses. The MIT Press. London. P.41 (1980)
33. 紫田承二 等 : 藥用天然物, 南山堂, 402
34. 강인희, 이경복, 한국식생활풍속. 삼영사 p.265 (1984)
35. Lee, C. H., Lee, S. T., A palynotaxonomic study of the genus *Fatsia* Decne. & Planch.
and its relatives (Araliaceae). Kor. J. Plant Tax. 21, 9-25 (1991)
36. 한국문화재청 천연기념물 백서. 문화재청 p. 331 (2003)
37. Shin, E. T., Kim, C. J., Yook, C. S., Stuiies on the Chemical Constituents of
Acanthopanax Fruits. Bull K. H. Pharma. Sci. 20, 63-73 (1992)
38. Nikaido, T., Ohmoto, T., Noguchi, H., Kinoshita, T., Saitoh, H., Sankawa., U. Planta.
Mediaca. 43, 18 (1981)
39. Samochowiec, L., Herba Pol. 29. 151 (1983)

40. Tkhor, L. F., Taranenko, C. A., Kozlov, Yu. P., Mosk. Odshch. Ispitatley Priorody 16, 73 (1966)
41. Ivanov, I. I., Kozlov, Yu. P., Tkhor, L. F., Bull. Mosk. Obshch. Ispitatley Priorody 70, 167 (1965)
42. Deng, H., Li, Y., Shem, N., Chen, X., Zhou, Z., Zhongguo Yaolixue Yu Dulizue Zachi 2, 29 (1988); Chem Abstr. 108, 133-143 (1988)
43. Seifulla, H. I., Lekarstvennie sredstva iz Rasteniy. Medgiz. Moscow. p. 278 (1962)
44. Han, B. H., Han, Y. N., Han, K. A., Park, M. H., Lee, E. O., Studies on the anti-in-flammatory activity of *Aralia continentalis* (I). Arch. Pharm. Res. 6(1), 17-23. (1983)
45. Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N., Manalo, J. B., Studies on the anti-in-flammatory activity of *Aralia continentalis* (II). Arch. Pharm. res. 6(1), 75-77. (1983)
46. Han, B. H., Woo, E. R., Park, M. H., Han, Y. N., Studies on the anti-in-flammatory activity of *Aralia continentalis* (III). Arch. Pharm. res. 8(2), 59-65. (1985)
47. Yun-choi, H. S., Kim, J. H., Lee, J. R., Screening of potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources (II). Kor. J. Pharmacogn. 17(1), 19-22. (1986)
48. Kosela, S., Rasad, A., Achmad, S. A., Wicaksonon. W., Baik, S. K., Han, Y. N., Han, B. H., Effects of diterpene acids on malon-dialdehyde generation during thrombin induced aggregation of rat platelets. Arch. Pharm. Res. 9(3), 189-191 (1986)
49. Sawamura, M., Lee-Kim, M. S., Shichiri, K. I., Tsuji, T., Machida, K., Volatile constituents of Japanese and Korean Udo (*Aralia cordata* Thunb.) and Butterbur (*petasites japonica* Miq.). Research Reports of the Kochi University 38, 1-12 (1989)

50. Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, M. W., Kim, O. K., Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(3), 239-243 (1995)
51. Kim, J. S., Kang, S. S., Choi, J. S., Lee, M. W., Lee, T. S., Antioxidant Components from *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(1), 13-17 (1998)
52. Park, H. J., Kim, D. H., Choi, J. W., Park, J. H., Han, Y. N., A potent antidiabetic agent from *Kalopanax pictus*. *Arch. Pharm. Res.* 21(1), 24-29 (1998)
53. Kim, D. W., Bang, K. H., Rhee, Y. H., Lee, K. T., Park, H. J., Growth inhibitory activities of kalopanaxsaponin A and I against human pathogenic fungi. *Arch. Pharm. Res.* 21(6), 688-691 (1998)
54. Kim, K. H., Yu, K. W., Bae, E. A., Park, H. J., Choi, J. W., Metabolism of Kalopanaxsaponin B and H by human intestinal bacteria and antidiabetic activity of their metabolites, *Biol. Pharm. Bull.* 21(4) 360-365 (1998)
55. Lee, H., Lin, J. Y., Antimutagenic activity of extracts from anticancer drug in chinese medicine. *Mutat. Res.* 204(2) 229-234 (1988)
56. Okuyama, T., Hayashi, T., Baba, M., Kishi, N., Matsumaru, Y., Okada, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicine XVIII. Antitumor promoting activity of araliaceous plants. *Nat. Med.* 52(4) 314-321 (1998)
57. 지형준, 이상인, 대한약전외 한약(생약)규격집, 한국메디칼인텍스사, 서울, p. 407 (1988)
58. 공영토, 강인애, 황칠나무 수액(황칠)의 도료적 성질과 도막의 성능, *임산에너지*, 13(1), 1-6 (1993)

59. 김형량, 정희중, 황칠나무 잎 및 종실의 화학적 특성, J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 63-66. (2000)
60. Lee, S. H., Lee, H. S., Park, Y. S., Hwang, B., Kim, J. H., Lee, H. Y., Screening of immune Activation Activities in the Leaves of *Dendropanax morbifera* Lev., Korean J. Medicinal Crop Sci. 10(2), 109-115. (2002)
61. Lee, I. R., Kim, J. S., Lee, S. H., Pharmacological Activities of Leaves of *Hedera rhombea* Bean, Kor. J. Pharmacogn. 23(1), 34-42 (1992)
62. Sobolev, E. A., Grishkovets, V. I., Shashkov, A. S., Tolkacheva, N. V., Chirva, V. Ya., Triterpenoid Glycosides of *Fatsia japonica*. III. Isolation and structure of Glycosides from fruit pericarp. Chemistry of Natural Compounds. 36(5), 538-539 (2000)
63. Philip, S., Ritsa, S., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112 (1990)
64. Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Comparison of in vitro anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst., 82, 1113-1118 (1990)
65. Han, B. H., Park, M. H., Cho, J. Y., Park, J. S., Yoo, E. S., Baik K. U., Effect of Ginsenosides from *Panax Ginseng* on TNF- Production and T cell Proliferation, Yakhak Hoeji, 42(3), 296-301 (1998)
67. Sylvain, M., Bernard, M., Induction of apoptosis in nutrient deprived cultures of hybridoma and myeloma cell. Biotechnol. Bioeng., 44, 1140-1154 (1994)
66. Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Yeon KD : Antimutagenic and cytotoxic effects of extracts of *Kalopanax pictus* NAKAI endoermis. Korean J. Medicinal Crop. Sc. 10:132-138 (2002)

68. Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G., Cell & Tissue culture : Laboratory procedures, Wiley (1993)
69. George, C., Staining procedure, Williams & Wilkins (1981)
70. Feng, J., Ci, Y. X., Gao, C. M., Li, Y. Z., Voltammetric Behavior of Living Cells T. Shanghaiensis and its Bio-analytical Application, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 44, 89-93 (1997)
71. Tadahide F., Nobuyuki O., Mamoru N., The Relation between Degranulation and Rapid Metabolic Responses in RBL-2H3 Cells, Biol. Pharm. Bull., 22(3), 310-312 (1999)
72. Masanori K., Hiroshi K. Creation of an in vivo Cytosensor Using Engineered Mesangial Cells, J. Clin. Invest. 100(6) 1394-1399 (1997)
73. Ci, Y. X., Zhang C. Y., Fen. J., Photoelectric Behavior of Mammalian Cells and its Bioanalytical Applications. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 45, 247-251 (1998)
74. Longchuan C., Armen H. T., Identification of Distinct Signalling Pathways for Somatostatin Receptors SSTR1 and SSTR2 as Revealed by Microphysiometry, Cell Signal, 11(7) 499-505 (1999)
75. Rukenstein. A., Green L. A., The Quantitative Bioassay of Nerve Growth Factor, Use of Frozen 'Primed' PC12 Pheochromocytoma cells. Brain Research., 263, 177-180 (1983)
76. Shinichiro, T., Katsuhiko, A., Mayumi, Y., Yuzuru, M., S-990 A Novel Neurotrophic Compound from Acremonium sp. J. Antibiotics., 47(11), 1175-1181 (1994)
77. Hames, B. D., Rickwood, D., Gel Electrophoresis of protein. IRL press., (1981)

78. Welling D., Tina, J., Mikael, B., Troels, S., Michael, R. S., Evaluation of Isofagomine and Its Derivatives as Potent Glycosidase Inhibitors, *Biochemistry*, 35, 2788-2795 (1996)
79. Seico, Y., Kazumaxa, S., Gunki, F., Isolation from α -Zein of Thermolysin Peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(40), 661-663 (1996)
80. Benson A. M., Bueding, E., Cha Y. N., Heine, H. S., Talalay P., Elevation of Extrahepatic Glutathione S-Transferase and Epoxide Hydratase Activities by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole, *Cancer Res.*, 38, 2971-2977 (1979)
81. Kim, S. H., Park, E. S., Jo, T. H., Choi, J. W., The study of Pretreated GE-132 on the Hepatic Glutathione-S-transferase Activity in Rat, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(4) 581-586 (1994)
82. Chae, K. R., Lim, C. J., Kang, T. S., Kim, C. K., Jang, I. S., Cho, Y. Y., Hwang, J. H., Cho, J. S., Forced swimming stress on physiological aspects of spontaneously hypertensive Rat. *Korean J. of Lab. Ani. Sci.* 12, 97-102 (1996)
83. Cho, T. S., Lee, J. C., Cho, S. I., Lee, S. M., A Study on Anti-Stress Activities of Cholic Acid Derivatives. *The Journal of Applied Pharmacology.* 6, 232-241 (1998)
84. Kimura, M., Suzuki, M., Araki, S., Effect of immunostimulators on involution of lymphoid organs in mice exposed to heat and cold stress. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 255-257 (1996)
85. Bowers, G. N., McComb, R. B., A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 12, 70-89 (1966)

86. Flegg, H. M., An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* 10, 79 (1973)
87. Brekhman, I. I., Pharmacological investigation of glycosides from Gingseng and Eleutherococcus. *Lludia.* 32, 46 (1969)
88. Kim, N. D., Hamn, B. H., Lee, E. B., Kong, J. Y., Kim, M. H., Jin, C. B., Studies of Ginseng on the Antistress Effects. *Kor. J. Pharmacog.* 10, 61-67 (1979)
89. Lopez-Carbonell M., Alegre L., Vam Onckelen H., Changes in cell ultrastructure and endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid concentrations in *Fatsia japonica* leaves under polyethylene glycolinduced water stress. *Plant Growth Regulation.* 15, 165-174 (1994)
90. Kim, S. K., Kim, Y. G., Lee, M. K., Han, J. S., Lee, J. H., Lee, H. Y., Comparison of biological activity according to extracting solvents of four *Acanthopanax* root bark. *Kor. J. Medicinal Crop Sic.* 8(1), 21-28 (2000)
91. Kim, M. J., Kim, J. S., Kang, W. H., Yeon, K. D., Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Extracts of *Kalopanax pictus* NAKAI Endodermis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10(2) 132-138 (2002)
92. 황우익, 인삼의 항암작용, *Korean J. Ginseng Sci.* 16(2) 170-171 (1992)
93. Cho, T. S., Lee, S. M., Yeom, J. H., Yu, E. J., Lim, S. W., Jang, B. S., Kim, Y. M., Yu, Y. H., Park, M. H., Anti-stress effects of Ursodeoxycholic Acid on the Restraint Stress in Rats. *Yakhak Hoeji.* 39(5) 548-553 (1995)
94. Park, I., Kim Y. I., Lee, S. M., Cho, T. S., Anti-stress Effect of Cholic acid Derivatives in Restraint Stress Induced Rats. *The Journal of Applied Pharmacology.* 4, 162-166 (1996)

95. Ahmad Ru (1993) Medicinal plants used in ISM - their procurement, cultivation, regeneration and import/export aspects: a review. In: Govil JN, Singh VK & Hashmi S (eds) Medicinal Plants: New Vistas of Research. Part 1 (pp221-258)
95. Banerjee S, Zehra M & Kumar S (1999) In vitro multiplication of *Centella asiatica*, a medicinal herb from leaf explants. *Curr. Sci.* 76 : 147-148
96. E. Villalobos-Amador, G. Rodriguez-Hernandez, E. Perez-Molphe-Balch : Organogenesis and Agrobacterium rhizogenes-induced rooting in *Pinus maximartinezii* Rzedowsky and *P. pinceana* Gordon, *Plant Cell Rep.*, 20 : 779-785 (2002)
97. É. P. Kemertelidze, Z. S. Kemoklidze, G. E. Dekanosidze, A. I. Bereznyakova : Isolation and Pharmacological Characterization of Triterpenoid Glycosides from *Fatsia japonica* Cultivated in Georgia 35 : 429-432 (2001)
98. Heyenga AG, Lucas JL and Dewik PM. : Production of tumor- inhibitory lignans callus cultures of *Podophyllum Hexandrum*, *Plant Cell Rep.*9 : 382-385 (1990)
99. Hsiang-Chih Wang, Jen-Tsung Chen, Shieh-Ping Wu, Mei-Chun Lin, Wei-Chin Chang : Plant regeneration through shoot formation from callus of *Areca catechu* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*75 : 95-98 (2003)
100. Jaime Nino, Clarita M. Gallego, Yaned M. Correa, Oscar M. Mosquera : Production of scopolamine by normal root cultures of *Brugmansia candida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*74 : 289-291 (2003).
101. J. Li, M. Jain, Vunsh, J. Vishnevetsky, U. Hanania, M. Flaishman, A. Perl, M. Edelman : Callus induction and regeneration in *Spirodela Lemna*, *Plant Cell Rep.*, 22 : 457-464 (2004)

102. Kothari SL & Chandra N (1984) In vitro propagation of African marigold. Hortscience 19 : 703-705
103. Kothari SL & Chandra N (1986) Plant regeneration in callus and suspension cultures of *Tagetes erecta* L. (African marigold). J. Plant Physiol. 122 : 235-241
104. Lu C & Vasil IK (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59 : 275-280
105. Mohd. Faisal, Mohammad Anis : Rapid mass propagation of *Tylophora indica* Merrill via leaf callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 75 : 125-129 (2003)
106. Murashige T and Skoog F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol Plant. 15 : 473-497 (1962)
107. Prathanturug S., Soonthornchareonnon N., Chuakul W., Phaidee Y., Saralamp P. : High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron, Plant Cell Rep., 21 : 1504-1509 (2003)
108. Shi H.P., Kintzios S. : Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots, Plant Cell Rep., 21 : 1103-1107 (2003)
109. S. K. Roy, M. S. Islam, S. Hadizzaman : Micropropagation of *Elaeocarpus robustus* Roxb., Plant Cell Rep., 17 : 810-813 (1998)
110. Tomimori T, Kizu H. : On the saponins from the leaves of *Fatsia japonica* Decne. et Planch (author's transl), Yakugaku Zasshi. 99 : 92-94 (1979)

111. Y. Sahoo, S. K. Pattnaik, P. K. Chand : Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedling and mature plants, *Scientia Horticulturae*, 69 : 85-98 (1997)
112. Arnaud Y, Franciet A, Tranvan H, Jacques M : Micropropagation and rejuvenation of *sequoia sempervirens* (Lamb) Endl : a review *Ann. Sci. For.* 50:273-295
113. Arrilaga I, Lerrna V, Segura J : Micropropagation of juvenile and adult flowering ash. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:346-350 (1992)
114. Bonga JM : Clonal propagation of mature trees : problems and possible solutions. In : JM Bonga and Don J Burzan (eds.), *Cell and Tiss. Cult. in Forestry*, Martinus Nijhoff pub, p. 249-271 (1987)
115. Choi YE, Kim JW, Yoon ES : High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Annals of Botany.* 83:309-314 (1999)
116. Daykin A, Scott IM, Francis D, Causton DR : Effect of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. *Planta.* 203:526-535 (1997)
117. George EF : Plant propagation by tissue culture, Part 2. Exegetics Limited Pib., P. 653-669 (1996)
118. Heyenga AG, Lucas JL, Dewick PM : Production of tumor inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum* *Plant Cell Rep.* 9:382-385 (1990)
119. Greenwood MS : Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regul.* 6:1-12 (1987)
120. Hoo g. Tseng CJ : *Flora reipublicae popularis sinicae.* Tomis 54. angiospermae dictyledone Araliaceae. *Facultas Biologia Universitatis Amoensis.* p 210 (1978)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.