

최 종
연구보고서

기능성 향장품 개발을 위한 겨우살이와
느릅나무의 유전자원 및 유용물질의 소재화 연구

Studies on genetic property and useful substances
of *Viscum album* and *Ulmus davidiana* var. *japonica*
for the development of functional cosmetics

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 향장품 개발을 위한 겨우살이와 느릅나무의 유전자원 및 유용물질의 소재화 연구”에 관한 연구 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 25 일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 이 재 선

(제1세부과제)

연구기관명 : 강원도 산림개발연구원

세부연구책임자 : 함 연 호

연구원 : 배 영 수, 심 상 준, 전 두 식, 이 성 재
김 진 규, 조 재 현, 권 동 주, 장 용 환

(제2세부과제)

연구기관명 : 강원대학교

세부연구책임자 : 이 재 선

연구원 : 송 재 모, 김 철 우, 강 효 진

요 약 문

I. 제 목

기능성 향장품 개발을 위한 겨우살이와 느릅나무의 유전자원 및 유용물질의 소재화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내의 산림자원을 이용하여 생물공학 기술을 응용한 고부가가치의 기능성 제품개발은 유망한 경쟁력 있는 분야이며, 최근 산림식물의 추출성분을 이용한 연구에 관심이 집중되고 있으며 이에 관한 체계적인 연구가 필요하다

선진국에서는 유기합성 제품의 안전성에 대한 문제로 산림자원을 비롯한 천연 식물로부터 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향충제, 방향제 등의 제품개발이 활발히 수행되고 있다.

겨우살이 및 느릅나무는 면역증강, 항암, 동맥경화, 고혈압, 항산화, 미백 및 주름개선 효과가 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 천연 약재 및 식품으로 이용되기 위하여 매년 대량의 자원이 중국에서 수입되는 것으로 추정되고 있다.

또한, 현대에 들어서 화장품은 피부를 단순히 보호하고자 하는 목적 외에 외부의 환경에 대해 피부의 상태를 적극적으로 개선시키려는 목적으로 사용하고 있어 기능성 화장품 개발은 국내 시장뿐 만 아니라 세계시장을 지배할 수 있는 새로운 keyword가 될 것이다,

따라서 고기능성 물질 즉, 미백 효과가 우수하고 피부에 안전한 물질의 분리와 개발은 새로운 화장품 개발에 있어서 가장 큰 부가가치를 창출 할 수 있는 분야로 활성 물질의 규명 과 목적 설계에 의한 물질개발, 천연물(산림자원) 등으로부터 효능이 뛰어난 소재 개발과 이들 정보의 database 구축 등 소재의 효능 및 안전성 평가 등이 필요하며, 이를 위한 식물체의 대량증식을 위해 이 연구를 수행하였으며, 결과는 다음과 같다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 신갈나무와 밤나무 겨우살이 및 느릅나무 수피 추출물 제조
- 추출물 농축 후 핵산용성, 메틸렌클로라이드용성, 에틸아세테이트용성 및 수용성으로 분획
- 칼럼크로마토그래피 및 박층크로마토그래피법으로 추출물 분리 및 단리 화합물에 대한 구조분석 (^1H , ^{13}C -NMR 및 MS 분석)
- 추출분획 및 단리화합물을 대상으로 세포독성, 항산화활성(DPPH 소거능, 전자공여능, SOD 유사 활성, 지방산 자동산화 억제, 과산화물에 의한 세포 손상 억제), 미백 활성(Melanin 생합성 억제, Tyrosinase 저해 활성), 항균활성, 주름개선 효과(Elastase 활성 억제, Collagen 생성 촉진), 항염증활성(NO assay) 및 항암활성(MTT assay) 등의 기능성 화장품 개발을 위한 다양한 활성 시험을 수행
- 추출물의 제형안정화 실험 및 Pilot 제조 실험
- Mexameter 분석, 설문조사, 보습 효과 및 피부 자극성 test 등의 제품 효능 평가
- 겨우살이류 및 느릅나무류의 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명
- 겨우살이는 기주식물이 다양하므로 기주식물에 따른 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명
- 겨우살이의 번식을 위한 기주식물별 번식법과 느릅나무의 번식법 개발
- 겨우살이와 느릅나무의 기내증식

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 겨우살이와 느릅나무 추출물을 이용한 화장품 개발 연구

신갈나무, 밤나무 겨우살이와 느릅나무 수피를 95% EtOH 용액으로 추출하여 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물에 대한 칼럼크로마토그래피 및 박층크로마토그래피를 실시하여 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물로부터 homoflavoyadorinin B와 느릅나무 수피 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물로부터 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apiofuranoside, (+)-catechin-7-O-xylopyranoside 및 (+)-catechin(4 α - \rightarrow 8)-(+)-catechin (procyanidin B-3)을

단리하여 ^1H 과 ^{13}C -NMR과 MS 스펙트럼을 분석하여 화합물의 구조를 동정하였다. 느릅나무 수피는 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside가 가장 많이 단리된 것으로 보아 느릅나무 수피 추출물의 주요 성분임을 알 수 있었다.

세포독성 측정 결과 느릅나무 수피 추출물 분획은 고농도에서 세포독성을 보였으며 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside만이 세포독성을 나타냈고 겨우살이 추출물 분획들은 대부분 78 ppm 이상부터는 세포독성이 높게 나타났다. 항산화활성은 서로 다른 메카니즘 실험에서 대부분 느릅나무 수피 분획물, 단리 화합물 및 신갈나무, 밤나무 겨우살이는 항산화 활성이 우수한 것으로 나타났으며 추출물의 에틸아세테이트용성 분획물이 대부분 항산화 활성이 우수하였다. 미백효과를 측정하기 위한 B16F10을 이용한 melanin 생합성 억제와 tyrosinase 활성 저해 실험 결과 느릅나무 수피에서 단리 한 (+)-catechin의 경우 양성대조구로 사용한 arbutin과 유사한 melanin 생합성 억제 효과를 나타내어 미백효과가 우수한 것으로 나타났으며, (+)-catechin-7-O-xyloside 역시 arbutin보다는 낮지만 일정부분의 melanin 생합성 억제 효과가 있다는 결과를 나타내었다.

항균활성 느릅나무 단리 화합물보다는 추출물 분획들이 항균력이 우수한 것으로 나타났으며 주름개선 효과는 느릅나무 수피 고형분, procyanidin B-3 및 homoflavoyadorinin B가 elastase 활성 억제 효과를 약간의 보였지만 주름 개선에는 효과가 없는 것으로 판단되었다. 항염증활성 측정 결과 (+)-catechin과 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside는 90% 이상의 NO 저해율을 나타냈다. 항암활성 결과 느릅나무 에틸아세테이트용성, 메틸렌클로라이드용성 분획물 및 (+)-catechin은 4가지 암세포주에 대해 높은 항암활성이 나타낸 것으로 보아 느릅나무 수피의 추출성분이 항암활성을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

(+)-catechin을 최대 함량 0.05%를 첨가한 에센스, 크림에 대한 제형실험 및 제형 내의 안정도 실험을 실시하여 안정한 제형을 확보할 수 있었으며 시제품(에센스, 크림)을 제조하여 mexameter 분석과 설문조사를 통해 시험제품이 미백 효능이 있으며 피부에 자극이 없는 것으로 판단되었다.

2. 겨우살이 느릅나무의 형태적·생태적 조사, 번식법 개발 및 유전분석

겨우살이의 자생지의 해발고는 207~920m까지 매우 다양하게 나타났고, 사면방향은 남서사면(4개), 남동사면(2개), 북동사면(1개)과 북서사면(1개)으로 나타났으며, 조사지의 경사는

10~20° 이하 4곳, 20~30° 이하 3곳, 30° 이상은 1곳이었다.

자생지의 식생구조는 북방면2의 박달나무를 제외한 모든 상층의 우점종이 참나무과(신갈, 갈참, 굴참, 상수리나무)로 나타났으며, 겨우살이가 출현한 수종 또한 북방면2의 박달나무를 제외하면 모두 참나무과 수종이었다.

겨우살이의 무성번식 및 기내번식에서 실험 결과를 얻지 못하였고, 유성번식에서 겨우살이의 흡기가 90%이상 발생하였다. 이는 겨우살이의 유성번식의 가능성을 보여준다.

느릅나무의 과실은 원형, 당느릅나무의 과실은 타원형의 형태를 나타냈으며, 느릅나무는 과실이 낙과하기 약 1주 전, 당느릅나무는 이보다 다소 이른 종자가 모두 낙과하기 약 2주 전에 외형적 성장이 완료되었다. 과실의 색깔은 밝은 녹색 또는 진한 녹색을 띄고 있다가 과실이 낙과하기 시작하면 탈색되어 노랑색을 띄기 시작한다. 이 후 낙과가 더욱 진행되면 노랑 또는 흰색에 가까운 밝은 노랑을 띄게 된다.

2년차, 3년차 느릅나무와 당느릅나무의 발아율 실험에서 모두 과실이 낙과하기 전 약 1주일 동안 채취한 종자의 발아율이 가장 높았다. 느릅나무와 당느릅나무 모두 과실이 낙과하기 전 약 1주일 동안 채취한 종자에서 발아한 묘목의 생장이 가장 좋았다.

느릅나무와 당느릅나무의 종자를 시기별로 채취하여 발아율과 묘목의 생장을 실험한 결과 두 수종 모두 종자의 낙과가 이루어지기 전 약 1주일 동안의 발아력이 가장 높았다. 느릅나무류와 같이 개화기와 종자의 성숙기가 짧은 수종의 번식은 종자의 채취시기가 매우 중요한데 이 시기에 종자를 채취한다면 높은 발아율과 우수한 묘목을 얻을 수 있을 것이다.

당느릅나무(*Ulmus davidiana* Planch) 기내번식 방법을 개발하기 위해 유식물의 뿌리로부터 부정근을 유도 한 후 이들 부정근 절편으로부터 부정아 유도과정을 거쳐 식물체를 재생시켰다. 기내발아 식물체의 뿌리 절편을 0.2 mg/L IBA 처리한 1/2 SH 배지에 배양한 결과 다수의 부정근을 유도할 수 있었다. 유도된 부정근으로 부터 절편을 만들어 부정아 유도를 위해 MS배지에 4가지 종류의 cytokinin (zeatin, 2-iP, BA, kinetin)을 첨가한 결과, 0.2 mg/L kinetin 을 첨가한 배지에서 가장 높은 부정아 유도율과 절편 당 부정아수를 얻었다. 유도된 부정아로부터 줄기생장 및 뿌리유도를 위한 실험에서 줄기 생장은 1/2 WPM배지에서 가장 양호하였고, 뿌리유도는 1/4 WPM배지에서 가장 양호하였다. 또한 기내 재분화묘를 기외로 순화시킨 결과 4주후 100%의 식물체 생존율을 얻었다.

이 연구에서는 느릅나무의 부정근을 사용하여 새롭고 효과적인 재분화 체계를 확립하였

다. 뿌리에서 직접 부정아를 유도하기 때문에 줄기나 잎 절편과 같이 부정아를 유도한 다음 별도의 발근 과정이 필요없기 때문에 보다 효율적이고 신속한 식물체를 얻을 수 있는 장점을 지닌다. 따라서 이 재분화 방법은 다른 느릅나무 종의 재분화에 적용 시킬 수 있을 것이며, 또한 형질전환 연구를 위한 기본적인 토대로도 사용될 수 있을 것이다.

겨우살이 유전변이 분석에 사용된 4개의 I-SSR primer(#818, 826, 830, 855)에서 총 32개의 증폭 산물을 관찰 하였으며, primer당 평균 8개의 다형성 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 다형성 I-SSR 표지자의 비율은 전체평균 90.6%으로 나타났으며, 4개의 I-SSR primer에서 총 32개의 증폭산물을 초대로 Shannon의 유전다양성지수를 계산한 결과 평균 0.4579로 비자나무(S.I.=0.353;Hong et al., 2000), 은행나무(S.I.=0.388;Hong et al., 2001) 보다는 다소 높은 유전다양도를 나타냈으며 구상나무(S.I.=0.492;강, 200), 주목(S.I.=0.478;Kwon, 2002)보다는 낮았다.

SUMMARY

I. Title

Studies on genetic property and useful substances of *Viscum album* and *Ulmus davidiana* for the development of functional cosmetics.

II. Purpose and Necessity of the Research

To facilitate forest products of high value using domestic forest resources with the application of biotechnology is a prospective field. Recently, the research using extraction component of forest resources is worthy of attention and to practice systematic research is quite necessary.

In an developed country, because of problems about safety of organic compound product, products development of forest resources including natural plant is actively performed.

Visum album and *Ulmus davidiana* var. *japonica* becomes known that it is highly effective for reinforcement, anticancer, arteriosclerosis, high blood pressure, anti-oxidation, wrinkle exclusion, and skin whitening. Finally it is presumed that every year natural products more than ten thousand ton is imported from China to use as material for drugs and food.

Recently, cosmetics not only protect skins but also mitigate the skin conditions against environment outside. So functional cosmetics development will be important and competitive source in the world market. Consequently, cosmetics effective as skin beautifier and skin safety is a field which will create valuable goods.

From forest resources important material development is quite promising and the

database construction about information of resources quite necessary to evaluate effect and stability of such material. To provide raw materials constantly, mass-propagation and genetic studies were carried out.

III. Contents and Scope of the Research

1. The cosmetics development research using extracts of *Viscum album* and *Ulmus davidiana* var. *japonica*.
 - Barks of *Viscum album* (in *Quercus mongolica* and *Castanea crenata*) and *Ulmus davidiana* var. *japonica* were extracted with 95% EtOH.
 - The extracts were evaporated under reduced vacuum pressure and concentrated successively fractionated with a series of hexane, methylene chloride, ethyl acetate and water on a separatory funnel.
 - The extracts were isolated using column chromatography (Sephadex LH-20) and TLC (Thin Layer Chromatography).
 - The structures of isolated compounds were characterized by ^1H , ^{13}C -NMR and MS spectrum.
 - For the development of functional cosmetics, activity tests were done such as antioxidative activity (DPPH radical scavenging, electron donating ability, fatty acid autoxidation inhibition, inhibition of cell damage by H_2O_2), whitening activity (Melanin synthesis inhibition, Tyrosinase inhibition activity), antifungal activity, improvement in wrinkle activity (Elastase activity inhibition, Collagen synthesis acceleration), anti-inflammatory activity (NO assay) and anticancer activity (MTT assay).
 - Stabilization test of extracts and pilot manufacturing test were carried out.
 - Efficacy of functional cosmetics were evaluated using mexameter analysis, survey, moisture-containing effect and skin irritation test.

2. Research for morphologic and ecologic characteristic of *visum album* and *ulmus davidiana* var. *japonica* development in propagation and analysis of genetic variety.

- Study about morphologic, ecologic, and genetic characteristics of *visum album* and *ulmus davidiana* var. *japonica* was carried out.
- Study about morphologic, ecologic, and genetic characteristics of a host plant of *visum album* was carried out.
- The propagation system development of *visum album* and *ulmus davidiana* var. *japonica*.
- The tissue culture of *visum album* and *ulmus davidiana* var. *japonica*.

IV. Results of Research and Suggestion for Application

Barks of *Viscum album* (in *Quercus mongolica* and *Castanea crenata*) and *Ulmus davidiana* var. *japonica* were extracted with 95% EtOH. For isolation, separation and purification of ethyl acetate and water soluble powder, CC(column chromatography) and TLC(thin layer chromatography) were repeatedly performed. Homoflavoyadorinin B was isolated from *V. album* (in *Q. mongolica*) and (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apiofuranoside, (+)-catechin-7-O-xylopyranoside, (+)-catechin(4a→8)-(+)-catechin (procyanidin B-3) were isolated from *U. davidiana* var. *japonica* bark. Spectrometric analysis such as NMR and MS was performed to characterize the structures of isolated compounds. (+)-catechin-7-O-apiofuranoside was the main component of *U. davidiana* var. *japonica* bark.

In cytotoxicity test, the fractions of *U. davidiana* var. *japonica* bark extracts appeared a cytotoxicity from high concentration and (+)-catechin-7-O-apiofuranoside only showed a cytotoxicity. The cytotoxicity appeared high from above 78 ppm in *V. album* (in *Q. mongolica*) extracts. IN antioxidative activity test (DPPH radical scavenging, electron donating ability, fatty acid autoxidation inhibition, inhibition of cell damage by H₂O), most of the fractions of *U. davidiana* var. *japonica* bark extracts and *V. album* (in *Q.*

mongolica) extracts and isolated compounds showed high antioxidative potential. In whitening test (melanin synthesis inhibition, and tyrosinase inhibition activity), (+)-catechin from *U. davidiana* var. *japonica* bark showed the similar inhibitory potency for melanin synthesis compared with arbutin implying excellent whitening activity. In antifungal activity test, the fractions of *U. davidiana* var. *japonica* bark extracts indicated high antifungal activity than isolated compounds. In anti-wrinkle activity test (Elastase activity inhibition and Collagen synthesis acceleration), *U. davidiana* var. *japonica* bark solid, procyanidin B-3 and homoflavoyadorinin B showed low inhibition effect of elastase activity. But to wrinkle improvement it was concluded with the fact that it does not have an effect. In anti-inflammatory activity test, most of the isolated compound from *U. davidiana* var. *japonica* bark showed the similar inhibitory potency for NO (Nitric oxide) production to the control. particularly for (+)-catechin and (+)-catechin-7-O-apiofuranoside, which could inhibit more than 90% of the NO production implying excellent anti-inflammatory activity. In anticancer activity test, the ethyl acetate and methylene chloride soluble fraction of *U. davidiana* var. *japonica* bark and (+)-catechin showed high anticancer activity against 4 cancer cell lines. The extracts of the *U. davidiana* var. *japonica* bark are thought to have a anticancer activity.

The essence and cream included the maximum content 0.05% (+)-catechin. In evaluation of efficacy of functional cosmetics performed the mexameter analysis and survey, the whitening effect was good and the skin irritation did not appear.

The altitude of *visum album*'s distribution area appeared between 207m and 920m. The vegetation of *visum album*'s distribution area was almost covered with Fagaceae. We could not get the experiment result in the unsexual propagation and tissue culture but haustorium occurred more 90%. We collected seeds and experimented for germination. The experiment showed high germination ratio if seeds collected before the seeds fell off.

We investigated the genetic variation in *Visum album* using I-SSR markers. The percentage of polymorphic I-SSR amplicons was 90.6% and mean number of amplicons per I-SSR primer was 7.25. Level of genetic diversity within 8 individual was 0.458[Shannon's index].

Micropropagation of *Ulmus davidiana* Planch was established via adventitious shoot formation from the segments of adventitious roots. Adventitious roots were produced directly from root segments of seedlings on a 1/2 SH medium plus various concentrations of IBA. The maximum growth of adventitious roots was observed in the presence of 2.0 mg/L IBA. After the segments of adventitious roots were cultured on various cytokinins (zeatin, 2-iP, BA, kinetin) and cytokinins plus auxin (IBA), formation of adventitious shoot was investigated. Among cytokinin treated, kinetin was the most effective on both adventitious shoot induction and number of shoots. Especially, 2.0 mg/L kinetin was the best to increase adventitious shoot induction (95.8%) and a number of shoots (8.4). Adventitious shoots were rooted on 1/2 WPM medium and the plantlets were acclimated 100% on composed soil (peatmoss : vermiculite = 1 : 1).

CONTENTS

Chapter 1. Outline of researches	16
Chapter 2. Trend of foreign and domestic researches	19
Chapter 3. Results of researches	22
Paragraph 1. The cosmetics development research using extracts of <i>Viscum album</i> and <i>Ulmus davidiana</i>	
1. Objectives and contents of study	22
2. Results	22
1). Introduction	24
2). Extractives from <i>V. album</i> and <i>U. davidiana</i> var. <i>japonica</i> bark	27
3). Test of biological activities	52
4). Stabilization test of extracts and pilot manufacturing	91
5). Evaluation of efficacy of functional cosmetics	95
3. Conclusions	102
Paragraph 2. Research for morphologic and ecologic characteristics of <i>visum album</i> and <i>ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> and development of propagation system and analysis of the genetic variety	
1. Objectives and contents of study	105
2. Results	116
1). <i>Visum album</i>	116
2). <i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	128
3. Conclusions	150
Chapter 4. Achievement of goals and contribution to related fields	152
Chapter 5. Future plan for utilization of results from the research	154
Chapter 6. Information on foreign scientific technology obtained from the research	155

Chapter 7. Reference 157

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	16
제 1 절	연구개발의 필요성	16
제 2 절	연구개발의 목적	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	18
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점	19
제 2 절	앞으로의 전망	21
제 3 절	기술도입의 타당성	21
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	22
제 1 절	겨우살이와 느릅나무 추출물을 이용한 향장품 개발 연구	22
1.	연구개발 목표 및 내용	22
가.	연구결과 목표 및 내용	22
나.	연차별 연구개발 목표와 내용	22
2.	연구결과	
가.	서 론	24
나.	겨우살이와 느릅나무 수피의 추출성분	27
다.	생리활성 시험	52
라.	추출물의 제형안정화 및 Pilot 제조	91
마.	제품의 효능 평가	95
3.	결 론	102
제 2 절	겨우살이와 느릅나무의 형태적·생태적 조사, 번식법 개발 및 유전 분석	105
1.	연구개발 목표 및 내용	105
가.	연구결과 목표 및 내용	105

나. 연차별 연구개발 목표와 내용	105
다. 연구개발 방법 및 설계	106
2. 연구결과	116
가. 겨우살이	116
나. 느릅나무	128
3. 결 론	150
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	152
제 1 절 연구개발 목표 달성도	152
제 2 절 관련분야에의 기여도	152
제 5 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	154
제 6 장 연구개발결과 활용계획	155
제 7 장 참 고 문 헌	157

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- IMF 등으로 인하여 국내 중소기업 및 농산촌 주민이 어려움에 처해있으며 새로운 고부가가치의 소득원의 개발이 절실히 필요함
- 국내의 산림자원을 이용하여 생물공학 기술을 응용한 고부가가치의 기능성 제품개발은 유망한 경쟁력 있는 분야임
- 국내의 산림자원을 이용하여 생물공학 기술을 응용한 기능성 제품개발은 유망한 경쟁력 있는 산업 분야임
- 최근 산림자원의 추출성분을 이용한 연구에 관심이 집중되고 있으며 이에 관한 체계적인 연구가 필요함
- 선진국에서는 유기합성 제품의 안전성에 대한 문제로 산림자원을 비롯한 천연 식물로부터 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향충제, 방향제 등의 제품개발이 활발히 수행되고 있음
- 겨우살이 및 느릅나무는 면역증강, 항암, 동맥경화, 고혈압, 항산화, 미백 및 주름개선 효과가 매우 우수한 것으로 알려져 연간 수만톤 이상이 약재 및 식품으로 이용되기 위하여 중국에서 수입되는 것으로 추정됨
- 따라서 겨우살이류 및 느릅나무류의 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명이 필요
- 겨우살이(*Viscum album* var. *koloratum* (Kom) Ohwi)는 기주식물이 다양하므로 기주식물에 따른 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명이 필요
- 겨우살이의 번식을 위한 기주식물별 번식법과 느릅나무의 대량 증식법 개발이 필요
- 약용자원에서 신약개발 등과 같이 시간과 자금이 천문학적으로 투자되는 의약품보다 상대적으로 적은 비용과 시간으로도 세계적인 수준의 제품을 개발할 수 있는 가능성이 높다는 점에서 기능성 향장품 개발은 자본이 빈약한 우리나라에 매우 유망한 산업이 될 수 있을 것이며 따라서 이에 대한 연구와 투자가 필요
- 현대에 들어서 화장품은 피부를 단순히 보호하고자 하는 목적 외에 외부의 환경에 대해 피부의 상태를 적극적으로 개선시키려는 목적으로 사용하고 있어 기능성 화장품 개발은 국내 시장뿐 만 아니라 세계시장을 지배할 수 있는 새로운 keyword가 될 것 임

- 따라서 고기능성 물질 즉, 미백 효과가 우수하고 피부에 안전한 물질의 분리와 개발은 새로운 화장품 개발에 있어서 가장 큰 부가가치를 창출 할 수 있는 분야로 활성 물질의 규명과 목적 설계에 의한 물질개발, 천연물(산림자원) 등으로부터 효능이 뛰어난 소재 개발과 이들 정보의 database 구축 등 소재의 효능 및 안전성 평가 등이 필요함

2. 경제·산업적 측면

- 새로운 건강기능성식품 등에 관한 법률의 발효로 과학적 입증 등을 통하여 기능성제품에 관한 효과를 인증받을 수 있으므로 기능성제품의 시장이 확대될 전망이다
- 느릅나무의 추출물은 피부의 노화를 막아주는 항산화 효과, 미백 및 주름개선 효과 등의 생리활성 효과가 매우 우수한 것으로 알려지고 있으나 개체 수의 부족 등으로 아직 상품화로 개발되지는 못하고 있는 실정이며 매년 중국에서 다량 수입되고 있는 것으로 알려지고 있어 상품화를 위한 체계적인 연구가 필요함
- 체내외적으로 안전성이 확보된 천연물을 원료로 제품을 개발함으로써 소비자들에게 만족을 줄 수 있으므로 시장규모의 확대를 꾀할 수 있음
- 번식법의 개발에 의해 대량생산을 위한 기초가 마련되므로 장차 중국산 겨우살이와 느릅나무 수입량을 줄일 수 있음
- 겨우살이와 느릅나무의 임내 재배에 의한 농산촌 주민의 새로운 소득원으로 각광 받을 수 있음

3. 사회·문화적 측면

- 산림자원의 고부가가치화 및 화학적 이용 가능성과 그 중요성을 일깨워줄 수 있음
- 기타 산림 및 식물자원들의 활용가능성에 선두적인 모델화로 자원 재활용의 기능 강화
- 천연추출물을 이용한 제품화로 새로운 수요창출과 시장 형성이 기대됨
- 금후 산림자원의 소중함과 이를 이용한 연구에 많은 관심을 증대시킬 수 있음
- 국내 생산 제품의 질을 제고하여 국민들에게 품질과 기능성 면에서 외국 제품보다 우수하다는 것을 인식시켜 국산품 소비 증대에 기여할 수 있음
- 농산촌의 소득 증대로 산촌활성화에 기여할 수 있음
- 식물자원의 가치에 대한 국민의 의식을 제고하여 문화국가로의 도약 발판을 마련할 수 있음

제 2 절 연구개발의 목적

- 겨우살이 및 느릅나무의 추출 성분을 분리하여 화학조성과 그 구조를 밝히며 이들 추출물을 대상으로 기능성 향장품의 제조기술을 개발하고자 함
- 겨우살이 및 느릅나무의 추출물 대한 항산화, 항균, 미백 및 수렴효과 등 우수한 기능성 활성을 갖는 추출 분획 및 단리 화합물을 대상으로 독성, 제형화, 임상실험을 통한 안전성을 평가함
- 우수한 기능성 효과를 갖는 물질들에 대해서는 특허를 신청하고 기능성 향장품의 원료로 이용함으로써 원료의 대체효과를 높이고, 기술축적을 통하여 외국기업과의 경쟁력을 강화하고자 함
- 해외(미국 오레곤주립대학) 전문가와의 최신 정보의 공유와 추출물의 분리 정제 및 구조분석에 대한 자문으로 보다 체계적이고 효율적인 연구가 될 수 있도록 하고자 한다.
- 겨우살이류 및 느릅나무류의 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명- 각 식물 종의 분포 지역을 문헌에 의하여 조사하고 현지 답사하여 해당되는 유사종의 형태적 특징, 생태적·입지환경의 차이와 유전적 식별과 종판별을 위해 분자지표를 활용
- 겨우살이는 기주식물이 다양하므로 기주식물에 따른 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명- 겨우살이에 있어서는 기주식물에 따른 집단 간 형태적 특징, 생태적·입지환경의 차이와 유전적 식별과 종판별을 위해 분자지표를 활용
- 겨우살이의 번식을 위한 기주식물별 번식법과 느릅나무의 번식법 개발- 유·무성번식법 개발 및 개선에 의한 집단조성법 개발
- 겨우살이와 느릅나무의 기내증식 기술 개발- 잎/동아/종자 등을 이용한 기내배양에 의한 번식법의 확립
- 증식법 개발을 통하여 기술을 농가에 보급함으로써 안정적인 원료수급과 농산촌의 소득 증대에 기여하고자 함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

- 국내에서는 천연물에 대한 관심이 계속 증가하고는 있으나 아직 미약한 실정이며 화장품 등의 경우원천기술개발에 의하기 보다는 외국회사의 제품을 복제하거나, 기능성이 알려진 원료 자체를 수입하여 제품에 첨가하는 등 전반적인 기술수준과 그 효능이 선진국과 비교할 때 매우 미약함
- 기능성 화장품 중 시장규모가 가장 큰 피부 미백제에 대한 국외 연구는 멜라닌 세포에서 기원한 악성 흑색종이나 백색증(albinism)에 대한 연구가 활발한 반면, 색소침착의 원인 규명 및 치료에 대한 연구는 상대적으로 미흡(Medline을 통하여 국제적인 학술지에 실린 논문 검색시 기미(melasma 또는 chloasma)라는 색인 단어로 등록된 논문수는 매년 10편 이내)
- 국내에서는 의과대학의 피부과학교실에서 미백제 개발 및 기미치료를 위한 임상연구가 진행되고 있으며 태평양화학, LG화학, 애경산업, 코리아나 화장품 및 동아제약에서 미백제를 상용화하였으나 원천기술개발에 의하기 보다는 외국회사의 제품을 복제하거나, 기능성이 알려진 원료자체를 수입하여 제품에 첨가하는 등 전반적인 기술수준과 그 효능이 선진국과 비교할 때 매우 미약함
- 최근 유럽산 *V. album* L.에는 비스코톡신 A₂, A₃, B가 발견되었는데 항암제로 인정되어 상품화된 제품이 국내에서도 시판되고 있다. 스위스의 Hiscia 연구소는 다양한 겨우살이 유전자원을 확보하고 항암제로 상용화하는데 기여하였고, 독일의 경우도 Helixor사 등에서 자궁경부암 치료용 주사제 생산 등의 목적으로 원료를 타국에서 수입하여 이용하고 있는 실정이다. 겨우살이류에 대한 국내의 연구는 아주 미미한 실정으로 인공재배를 위한 기초자료로 해부학적 특성이 보고된 바 있다(박충현 등, 2003). 겨우살이의 기생위치는 5~10m의 높이의 일사량이 많은 상단부에 기생하였고, 기주목의 흠착부에서 기주조직의 코르크층을 통과하여 목질부에 뿌리를 내리고 여러 갈래로 분지하여 성장함.
- 겨우살이의 생태, 번식 또는 유전적 구조에 대해서는 연구가 전무한 상태로 이 분야의 연구가 앞으로 이 식물을 자원화하기 위해 필수적으로 수행되어야 할 것이며, 본 신청과제 제2세부과제와 관련하여 연구책임자가 실시한 식물의 유전변이와 번식에 대한 내용

을 본 신청연구에 비교하여 기술하여 보면 아래와 같음

- 1) 유전변이에 대한 연구를 보면. 참나무류의 재유령화에 따른 엽형 및 기공밀도의 변화를 조사하였고(문과 이, 1993), 굴참나무의 유전적 변이에 있어서는 엽형의 변이(송 등, 2000), 동아의 형태적 변이(송 등, 2001), 성상모의 변이와 생육범위(송 등, 2002) 및 최근 많이 활용되는 분자지표 중 RAPD를 이용한 집단 유전 변이(송 등, 2002)를 실시하였다. 이외에도 강원도 소나무림의 생장특성 비교(한 등, 1993), 소나무류 육종에 있어 RAPD 지표의 활용성(1995), 소나무 천연림 집단의 변이 비교(이 등, 1999), 강원도 소나무의 RAPD 지표에 의한 변이 구명(Yi et al, 2002) 등
- 2) 전통적 유·무성번식과 조직배양법을 이용한 증식에 있어서는, ① 상수리나무에 대하여는 재유령화에 의한 삽목번식(Moon & Yi, 1993), 기내배양에 의한 식물체의 대량생산과 기후순화 방법(문 등, 1993)과 유목과 성숙목의 기내번식의 차이 구명(Moon et al., 1997), ② 사시나무에 있어서는 액아를 이용한 기내대량증식(Cheong & Yi, 1997), ③ 두릅나무에 있어서는 동아를 이용한 체세포배 발생과 증식(문 등, 1998)과 기후순화를 위한 배양토 및 공급액의 효과(문 등, 2001), ④ 왕벚나무에 대한 기내 배지 조건 구명(Cheong et al, 2000), ⑤ 가시오갈피 숙지삼목 조건 구명(이 등, 2001), ⑥ 호두나무의 접목 활착율 증대법 구명(황 등, 2002; 황 등, 2002), ⑦ 음나무의 근삽에 의한 증식법(김 등, 2002) 및 ⑧ 히어리나무의 기내번식법 구명(강 등, 2003) 등
- 3) 전통적 임목육종법을 이용한 잣나무의 선발과 잣증산 방법(한과 이, 1994; 한과 이, 1995; Han & Yi, 1995; 이 등, 1999; 한 등, 1999; 이 등, 2000; 이 등, 2002)에 대한 연구 등

그러나, 최근 기능성 식품과 향장품 및 의약품에 있어서는 앞에서 언급한 것과 같은 연구 방법을 이용하면서 천연물질의 성분 및 함량 등에 대한 연구와의 학제간의 연구가 시도되지 않고 있으나 앞으로 그 필요성과 중요성은 점점 증가할 것이다. 식물의 이용은 이제 기호과실의 생산, 우량목재의 생산이나 소수 관상용 가치의 증대를 위한 것으로는 불충분하며 고부가 가치를 가진 천연물질의 생산 쪽으로 방향을 전환할 시점에 이르렀다. 따라서 제 2세 부과제 팀에서 수행한 연구를 병행하여 특수성분과 다기능 물질을 가진 겨우살이와 느릅나무를 대상으로 한 새로운 고부가 가치 소재의 개발이 필요하다고 판단된다. 여기에는 형태적 특성의 구명은 물론 유전적 차이 특히 최근의 분자지표를 이용한 각 종간 또는 종내 산지 간의 변이의 구명이 함께 수행되어야 할 것이다.

제 2 절 앞으로의 전망

- 최근에는 약용식물을 중심으로 추출성분을 이용한 신기능성 물질의 탐색 및 이용에 관한 연구가 국내외에서 활발하게 수행되고 있으며 일부에서는 이미 제품화하여 생산 판매하기도 하고 있음
- 겨우살이와 느릅나무는 다양한 약리효과, 항산화 및 미백 효과 등의 항산화 활성이 우수한 화합물을 이용한 화장품의 원료로 각광 받을 수 있음
- 생리 및 약리효능이 우수한 추출물에 대해 과학적인 방법을 통한 화학구조의 구명으로 천연소재의 기능성 제품에 대한 소비자의 신뢰 증진을 기대
- 독성 및 안전성에 대한 문제로 천연물 함유 제품에 많은 관심이 증대되고 있으며 이를 이용한 기능성 제품의 생산 및 수요가 크게 증대될 것으로 기대
- 새로운 계통 또는 품종의 개발로 연결되어 앞으로 UPOV의 식물종 등록까지 이루어져 새로운 품종 인증이 가능할 것으로 기대되며, 또한 자원의 남체에 의한 종멸실의 위기를 극복할 기술이 개발됨으로써 궁극적으로 생물다양성 보전에도 기여할 것임

제 3 절 기술도입의 타당성

전체적으로 국내의 학문적 수준으로 보아 본 연구를 수행하는데 기술도입의 필요성은 크지 않다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 겨우살이와 느릅나무 추출물을 이용한 향장품 개발 연구

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표 및 내용

- 겨우살이 및 느릅나무의 추출 성분을 분리하여 화학조성과 그 구조를 밝히며 이들 추출물을 대상으로 기능성 향장품의 제조기술을 개발하고자 함
- 겨우살이 및 느릅나무의 추출물 대한 항산화, 항균, 미백 및 수렴효과 등 우수한 기능성 활성을 갖는 추출 분획 및 단리 화합물을 대상으로 독성, 제형화, 임상실험을 통한 안전성을 평가함
- 우수한 기능성 효과를 갖는 물질들에 대해서는 특허를 신청하고 기능성 향장품의 원료로 이용함으로써 원료의 대체효과를 높이고, 기술축적을 통하여 외국기업과의 경쟁력을 강화하고자 함
- 해외(미국 오레곤주립대학) 전문가와의 최신 정보의 공유와 추출물의 분리 정제 및 구조분석에 대한 자문으로 보다 체계적이고 효율적인 연구가 될 수 있도록 하고자 함

나. 연차별 연구개발 및 목표와 내용

구분	1차년도(2005)
연구개발 목표	1. 시료의 채취, 추출물 조제 및 추출성분 분석 2. 추출성분의 기능성 효능 검증
연구개발 내용 및 범위	<ul style="list-style-type: none"> ○ 겨우살이 및 느릅나무 시료 수집 ○ 유기용매(에탄올) 추출 ○ 에탄올 추출물을 농축한 후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 헥산, 에틸아세테이트 및 수용성으로 분획 ○ 칼럼크로마토그래피법으로 추출물 분리(전문가 초청자문) ○ 박층크로마토그래피(TLC)로 분리물질 확인 ○ 단리물질의 구조분석(전문가 초청 자문) <ul style="list-style-type: none"> - ^1H, ^{13}C 및 2D-NMR 및 MS 분석 등 ○ 추출분획물을 대상으로 기능성 향장품 개발을 위한 다양한 기능성 시험 수

	<p>행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 효능 시험 <ol style="list-style-type: none"> 1) 전자공여능 측정 2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정 3) Xanthine oxidase(XOase) 저해활성 측정 - 추출물의 미백효과 <ol style="list-style-type: none"> 1) Tyrosinase 저해활성 측정 2) MTT assay - 추출물의 수렴효과 <p>Bovine hemoglobin과의 단백질 응고작용을 이용한 화학적 수렴작용을 측정</p>
연구개발 결과	<p>느릅나무 수피에서 (+)-catechin 및 (+)-catechin 유도체 화합물 3종을 단리, 겨우살이에서 Homoflavoyadorinin B을 단리하였다. 추출분획물은 우수한 항산화활성을 보였으며, 미백활성은 미비하였다.</p>
구분	2차년도(2006)
연구개발 목표	<ol style="list-style-type: none"> 1. 추출물로부터 유효성분의 분리, 생리활성 비교 및 유용 추출성분의 대량 확보 2. 겨우살이 및 느릅나무 추출물 및 단리화합물에 대한 기능성 시험 3. 우수한 추출물 및 단리물질의 독성, 임상실험
연구개발 내용 및 범위	<ul style="list-style-type: none"> ○ 겨우살이 및 느릅나무 추출물에 대한 유효성분의 계속적인 분리 수행 <ul style="list-style-type: none"> -칼럼크로마토그래피법으로 추출물 분리, 박층크로마토그래피(TLC)로 분리물질 확인, 단리물질의 구조분석 ○ 1차년도에서 활성이 우수한 추출분획 및 단리된 화합물을 대상으로 대량 확보 ○ 추출물 및 단리화합물에 대한 계속적인 기능성 시험 <p>항산화효과, 미백효과, 수렴효과, 항균효과(여드름 원인균에 접종하여 항균활성을 측정): Disc plate method</p> ○ 추출물의 독성실험 <ul style="list-style-type: none"> -국소독성실험(피부자극실험) ○ 추출물의 제형화 실험 <ul style="list-style-type: none"> -Skin Lotion, Milk Lotion, Essence, Cream 제형화 실험 ○ 제품의 임상실험 <ul style="list-style-type: none"> -미백효과, 주름개선효과, 보습효과, 항균효과 실험
연구개발 결과	<p>(+)-catechin 유도체 화합물 대량 확보하였으며, 항산화활성이 우수하였으며 미백활성은 (+)-catechin이 대조구와 유사한 활성을 보였다. 제형화 실험을 통해 확보한 제형의 임상실험 결과 미백효과가 있는 것으로 판단되었다.</p>

구분	3차년도(2007)
연구개발 목표	1. 겨우살이 및 느릅나무 추출물을 이용한 기능성 향장품 개발
연구개발 내용 및 범위	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품 제작을 위해 활성이 우수한 추출물 및 단리화합물의 대량 생산체제 확립 ○ 추출물 및 제품의 안정도 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 온도별로 추출물 및 제품의 기간별 안정도 측정 ○ 추출물 및 제품별 scale up test 및 pilot test <ul style="list-style-type: none"> - 안정화된 추출물 및 제품별 scale up 및 pilot test 실시 ○ 기능성 향장품의 시제품 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 안정화된 추출물 및 제품의 양산화를 위한 체제 구축 ○ 산업화, 상용화 방안 강구
연구개발 결과	안정도 실험을 통하여 확보한 안정한 제형 처방을 바탕으로 시제품 Pilot 제조를 실시하였으며 산업화, 상용화하기 위한 추출물의 미백 기능성 물질들의 사용상 안전성 문제점에 대한 해결방안 및 개선방안을 강구하고 있다.

2. 연구결과

가. 서 론

겨우살이는 황록색 줄기와 잎으로 Y자를 만들며 엉켜 자라는 식물이다. 겨우살이는 겨울에만 잎이 달리는 나무가 아니고 상록성 식물이지만 엽혀 자라며, 나무의 잎이 다 떨어지고 가지가 드러날 때만 온전한 모습을 보인다. 다른 나무의 가지 하나를 점령하고 살아가는 겨우살이는 그 나무의 양분을 가로채어 먹고 사는 기생식물이다. 기생식물 가운데는 새삼과 같이 스스로 양분을 만들지 못하여 모든 양분을 숙주(기생 식물이 달라붙어 양분을 빼앗기는 식물)에게 의존하는 전기생 식물도 있으나 겨우살이는 엽록소를 가지고 있어서 광합성을 하지만 그것만으로는 부족하여 숙주에게서 물이나 양분을 일부 빼앗아 이용하는 반기생식물이다. 또 아무 나무에나 붙어 기생하는 것이 아니라 참나무류, 버드나무, 팽나무, 밤나무, 자작나무와 같은 일부 활엽수만 골라 뿌리를 내린다. 그래서 ‘기생목(寄生木)’이라고 부르기도 하고 겨울에도 푸르다고 하여 ‘동청(凍靑)’으로 부르기도 한다(이유미, 1995). 겨우살이는 세계적으로 30속 1500여종의 식물이 주로 열대에 퍼져 있으며 우리나라에는 3속 4종이 있다(문관심, 1984). 겨우살이는 성장지역, 숙주식물의 종류, 채취시기 등에 따라 성분에 차이가

있으며 한방에서는 ‘냉청(冷靑)’, ‘해기생(懈岐生)’, ‘표기생(票岐生)’, ‘기엽(技葉)’, ‘비상(比桑)’ 등으로 부르며 오래전부터 암, 동맥경화, 고혈압, 당뇨, 동상, 심장병, 불임증, 생리통 등 각종 질병에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(박원봉, 1998).

느릅나무는 낙엽성 활엽 교목으로 높이 30 m에 달하며 잎은 광란형 또는 타원형으로 밑은 썸기 모양이고 길이는 3~12 cm로써 끝은 뾰족하며 톱니가 있다(육창수, 1981). 느릅나무의 수피는 한방에서 ‘유피(榆皮)’ 또는 ‘유백피(榆白皮)’라 하며 예로부터 대·소변불통, 불면증, 부종, 거담, 위통 등에 효능이 탁월한 것으로 알려진 약용 수목이다(문관심, 1984).

겨우살이와 느릅나무 수피의 추출성분 및 생리활성에 대한 국·내외 연구현황으로는 1920년대 유럽산 겨우살이 수용성 추출물을 멸균하거나 유산균을 이용하여 발효시켜 주사제 형태의 항암제로써 이용하여 왔다. 또한 겨우살이는 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하여 면역증강효과가 있으며(Bolksma 등, 1979; Franz 등, 1981; 윤택준 등, 1994) 동물 및 임상 실험결과 종양세포에 대하여 직접, 간접적으로 대응하는 대식세포 및 NK세포의 활성을 증가시킴으로써 종양세포의 성장을 억제하고(Hajto 등, 1989), 암 환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다(Evans 등, 1973). Mannel 등(1991)은 유럽산 겨우살이의 tumor necrosis factor의 유도에 대하여 보고하였으며 Zarkovic 등(1997)은 유럽산 겨우살이의 B16F10 melanoma cell에 대한 저해효과를 보고하여 피부암에 대한 효과가 있음을 보고한 바 있다. 서지희 등(2004)은 한국산 겨우살이 전초의 MeOH 추출물이 A549 (비소세포폐암주), SK-OV-3 (난소암주), SK-MEL-2 (흑색종주), XF498 (중추신경계암주) 및 HCT-15 (직장암) 등 5종의 인체유래 암세포주에 대한 세포성장 저해효과를 나타냄을 확인하고 겨우살이 MeOH 추출물의 EtOAc 분획에서 oleanolic acid와 β -amyrin acetate 및 BuOH 분획에서 homoflavoyadorinin B를 분리하여 보고하는 등 겨우살이에 대하여 많은 생리활성이 보고되고 있는 실정이다.

임제빈 (1979)은 느릅나무에서 추출한 물질에는 점액이 풍부하고 이 점액은 glucose와 uronic acid를 함유하고 이것의 가수분해 물질에는 rhamnose, mannose, arabinose, galactose, uronic acid를 함유하고 있다. 또한 aspartic acid, glutamic acid, alanine, hydroxyproline, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, serine 등의 아미노산을 함유하고 있다고 보고하였으며, 배영수 등(2000)은 느릅나무 수피에서 (+)-catechin과 (+)-catechin-7-O-xylopyranoside, (+)-catechin-7-O-apiofuranoside와 같은 (+)-catechin 배

당체 화합물 및 (+)-catechin의 이량체인 소량의 procyanidin B-3을 분리하여 구조를 동정하였다. Lee 등(2001)은 느릅나무 근피에서 lyoniside, 5'-methoxyisolariciresinol-9'-O- β -D-xylopyranoside, isolariciresinol-9'-O- β -D-xylopyranoside, rel-*trans*-dihydrodehydroconiferyl alcohol 4'-O- α -rhamnoside, icariside E3 등의 6개의 lignan 및 neolignan을 분리하여 보고하였다. 이태완 등(2004)은 피부 노화의 대표적인 현상인 주름의 다양한 생성 기전 중 collagenase 활성 억제제인 sorbitol과 유백피 추출물을 matrix 형태로 처방화한 압력 감응형 점착성 하이드로겔 패치는 얼굴의 주름을 치료하는 새로운 국소제제로써 약제학적 응용 가능성이 높다고 보고하는 등 느릅나무 추출물의 구성성분 및 생리활성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다.

따라서 본 연구는 겨우살이와 느릅나무 추출물을 이용한 천연 기능성 화장품을 개발하기 위한 연구의 일환으로 신갈나무 및 밤나무 겨우살이와 느릅나무 수피 추출성분을 연구하였으며 각 추출물 분획과 단리된 화합물에 대한 생리활성 시험으로 항산화활성, 항균활성, 세포독성, 항염증활성 및 Tyrosinase 저해활성 등의 검정을 통해 추출성분의 화학적 기초 자료를 제공하고 이를 토대로 기능성 향장품 산업 및 약리적으로 응용하고자 하였다.

나. 겨우살이와 느릅나무 수피의 추출성분

1) 공시재료

본 연구에 사용된 느릅나무는 2004년 4월 강원도 홍천군 소재의 강원대학교 학술림에서 벌채하였으며, 2005년 1월 강원도 산림개발연구원에서 분양받아 수피부를 분리하여 실내에서 3주간 기건 시킨 후 분쇄기로 분쇄한 수피를 사용하였다. 겨우살이는 2004년 11월 강원도 홍천군 내면 창촌리 소재의 신갈나무와 밤나무에 기생하는 겨우살이를 채취하여 깨끗이 수세한 후 실내에서 4주간 기건 시킨 후에 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2) 유기용매 추출

분쇄한 느릅나무 수피(2.8 kg)와 신갈나무 겨우살이(2.3 kg) 및 밤나무 겨우살이(2.5 kg)을 각각 20 ℓ의 유리용기에 넣고 95% 에탄올(EtOH)을 사용하여 5일 동안 침지하여 추출하였다. 각각의 추출액은 40℃ 이하에서 evaporator로 감압 농축하여 유기용매를 모두 증발시켜다. 충분한 추출용액을 얻기 위하여 상기의 과정을 느릅나무는 3회 겨우살이는 4회 반복 실시하였다.

3) 추출물 분획

농축된 추출용액은 Fig. 1과 같이 분획깔대기상에서 첫 번째로 헥산(hexane)을 사용하여 분획하였다. 헥산에는 수지성분 및 왁스성분 등이 포함된다. 두 번째로는 메틸렌클로라이드(CH_2Cl_2)를 사용하여 메틸렌클로라이드용성과 수용성으로 분리하였는데 메틸렌클로라이드에는 주로 엽록소 성분인 클로로필 화합물들이 포함된다. 마지막으로 에틸아세테이트(EtOAc)를 사용하여 EtOAc용성과 수용성화합물로 분획 하였다. EtOAc용성 부분에는 주로 저분자량의 화합물이 포함되며 수용성에는 고분자성의 화합물과 다량의 수산기를 갖는 화합물 및 탄수화물과 그유도체들이 주로 포함된다. 각각 분리된 분획 추출물은 evaporator로 감압 농축하여 냉동시킨 다음 동결건조하여 분말로 만들어 보관하였

다. 겨우살이의 경우는 농축과정에서 발생하는 고분자성 물질이 다량 발생하였으며 이 고분자성 물질은 겨우살이의 주성분인 lectin 함유 물질로 판단되며 이 점액성 물질을 다시 수용성으로 분획한 후 에틸아세테이트용성으로 다시 분획하였다. 각 분획별 얻은 추출물의 양은 다음과 같다.

느릅나무 수피 에탄올 추출 분획물에서는 헥산용성 28.05 g, CH_2Cl_2 용성 3.69 g, EtOAc용성 25.94 g, 수용성 177.17 g을 얻었다.

신갈나무 겨우살이 추출 분획물에서는 고분자성 분획물 90 g, CH_2Cl_2 용성 13.02 g, EtOAc용성 3.3 g, 수용성 112.1 g을 얻었다.

밤나무 겨우살이 추출 분획물에서는 헥산용성 9.41 g, CH_2Cl_2 용성 1.54 g, EtOAc용성 11.79 g, 수용성 281.40 g, 고형분 65.81 g을 얻었다.

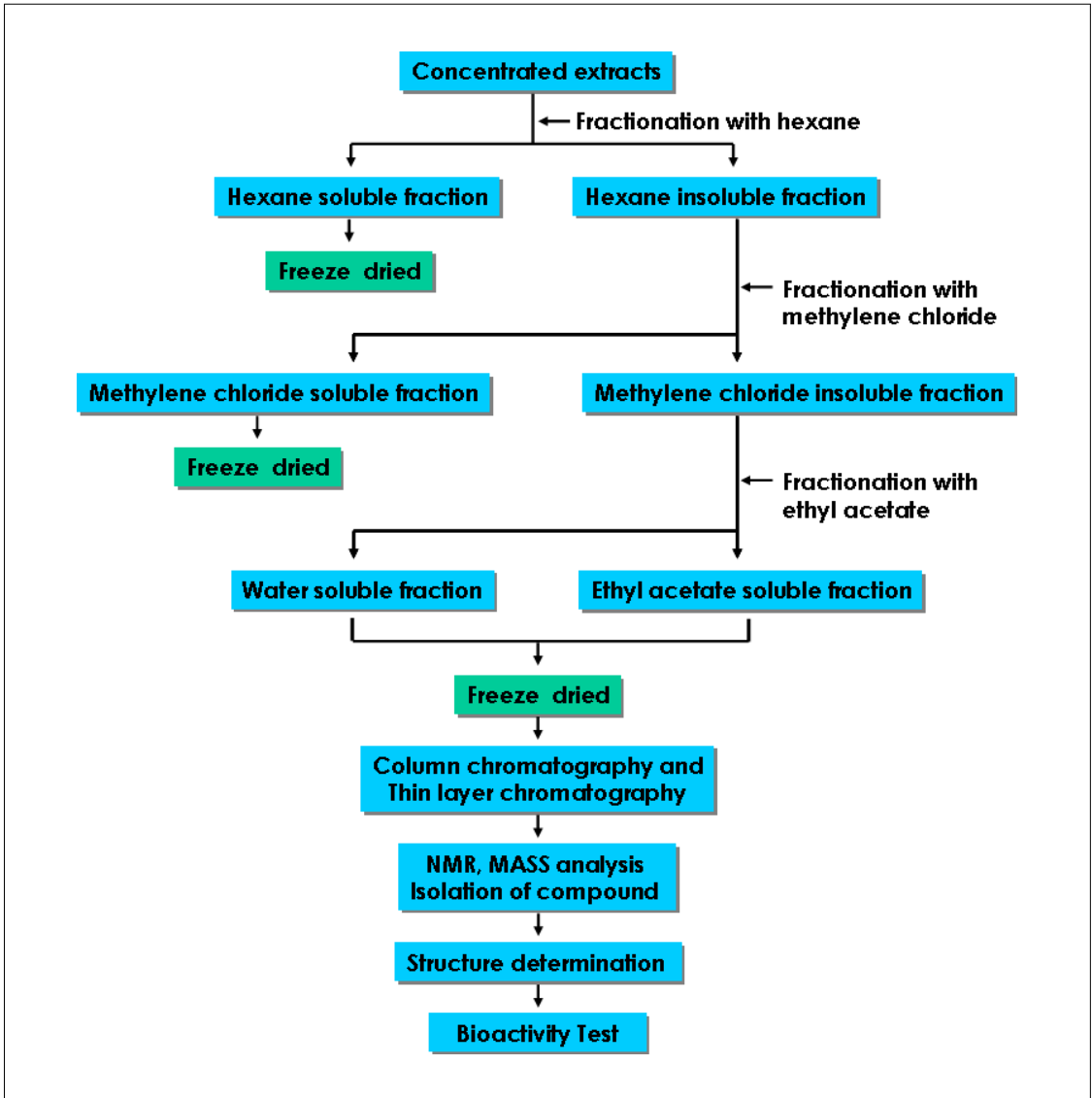


Fig. 1. 추출물의 분획 모식도.

4) 칼럼크로마토그래피 (Column Chromatography)

혼합물로부터 순수한 단일화합물을 얻기 위해 느릅나무 수피와 신갈나무, 밤나무 겨우살이 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물에 대한 칼럼크로마토그래피를 실시하였으며 유리

칼럼은 직경 4.5cm, 3cm, 1.5cm 및 1cm, 길이 60cm인 유리칼럼을 사용하였다. 충전물질로는 Sephadex LH-20을 사용하였으며 용리용매는 MeOH-H₂O (5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, v/v), ethanol-hexane (2:1, 3:1, 4:1, 4:3, v/v) 혼합액을 사용하였다. 칼럼으로부터 떨어지는 용출액은 fraction collector (Gilson FC 204)를 이용하여 순차적으로 시험관에 일정량을 받았으며 칼럼이 모두 용출되어 나와 무색에 가까워지면 acetone-H₂O (1:1, v/v) 혼합액을 사용하여 칼럼을 세척하였다.

5) 박층크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography)

일정량으로 모아진 화합물의 순도를 확인하기 위하여 박층크로마토그래피(TLC)를 실시하였다. 셀룰로오스판은 Merk사의 DC-Alufolien cellulose F(Art.no. 5574)을 사용하였으며 전개용매로는 에틸아세테이트(EtOAc) 용성 부분은 비극성 용매인 *t*-BuOH-HOAc-H₂O (3:1:1, v/v/v, solvent A)를 사용하였고, 수용성 부분은 극성용매인 6%초산 수용액(6% HOAc, solvent B)를 사용하였다. 단일물질의 확인을 위한 방법으로는 TLC상에 용액을 점적하여 전개용매에 전개시킨 후 건조하고, UV램프로 전개높이를 확인하여 화학적이동값(R_f)을 구하였다.

또한 발색제로 vanillin-HCl-EtOH (60:0.15:6, w/v/v)와 1% FeCl₃ (in EtOH)을 사용하여 TLC판에 분무하고, 가열 건조하여 반응하는 색을 관찰하였다.

6) 단리화합물의 구조분석

핵자기공명 분광분석(NMR; Nuclear Magnetic Resonance)을 위해 강원대학교 공동실험실습관의 Bruker Avance DPX 400MHz NMR spectrometer를 이용하였으며 분석용매로는 MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆를 사용하였다. 화합물의 분자량을 측정하기 위하여 강원대학교 공동실험실습관의 Micromass Autospec M363 질량분석기를 사용하여 FAB-MS를 MALDI-TOF는 Applied Biosystems, Voyager-DE STR을 사용하여 분자량을 측정하였다.

7) 단리화합물

느릅나무 수피 에탄올 추출물의 에틸아세테이트용성 분획물 20.71 g을 먼저 메탄올:물(3:1, v/v) 혼합액으로 분리하여 7개의 fraction (E1~E7)으로 분리하였고 수용성 37.1 g은 메탄올:물(1:1, v/v) 혼합액으로 분리하여 7개의 fraction (W1~W7)으로 분리하였다. 추후 각 fraction은 메탄올 수용액을 이용하여 단일 화합물로 분리 정제 될 때까지 반복적인 크로마토그래피를 수행하였다.

겨우살이 추출물은 비극성용매에 주로 용해되는 고분자성 물질로 존재하였다. 신갈나무 겨우살이 수용성에서는 장시간 냉장실에 저장 시 노란색의 침전물이 다량 발생하여 원심분리기를 이용하여 침전물질을 결정화 시켜 결정성분을 분석하였다.

가) 화합물 1 ((+)-catechin)

E5 fraction을 메탄올:물(1:1, v/v)혼합액으로 분리하여 세 번째와 다섯번째 fraction에서 483mg과 980mg을 얻었으며 E52 fraction을 메탄올:물(1:2, v/v)로 분획하여 E524 fraction에서 410mg을 얻었다. 발색제에는 붉은색으로 반응하였으며 이 화합물의 R_f 및 NMR data는 다음과 같다.

R_f : 0.56(solvent A) 및 0.41(solvent B).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , CD_3OD) : 2.50 (1H, *dd*, $J=8.13, 16.11\text{Hz}$, H_{ax-4}), 2.86 (1H, *dd*, $J=5.45, J=16.13\text{Hz}$, H_{eq-4}), 3.99 (1H, *m*, H-3), 4.58 (1H, *d*, $J=7.5\text{Hz}$, H-2), 5.87 (1H, *d*, $J=2.21\text{Hz}$, H-6), 5.99 (1H, *d*, $J=2.24\text{Hz}$, H-8), 6.69-6.88 (3H, *m*, H-2',5',6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , CD_3OD) : 83.1 (C-2), 69.08 (C-3), 28.79 (C-4), 158.10 (C-5), 96.58 (C-6), 157.19 (C-7), 95.79 (C-8), 158.43 (C-9), 101.09 (C-10), 132.49 (C-1'), 115.53 (C-2'), 146.52 (C-3'), 146.50 (C-4'), 116.38 (C-5'), 120.33 (C-6').

나) 화합물 2 ((+)-catechin-7-O-apiofuranoside)

E3 fraction에서 5.72g,을 E5 fraction을 메탄올:물(1:1, v/v)혼합액으로 분리하여 1.24g을 얻었다. 또한, 수용성 분획물 중 대부분을 차지하는 W5 fraction을 분석한 결과 화합물 2 6.98g 을 단리하였다. 따라서 이 화합물은 느릅나무 수피의 주성분으로 사료된다. 발색제에는 붉은색으로 반응하였으며 이 화합물의 R_f 및 NMR data는 다음과 같다.

R_f : 0.47(solvent A), 0.50(solvent B), **FAB-MS** : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 423.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , CD_3OD) : 2.54 (1H, *dd*, $J=8.0, 16.3\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{ax}}-4$), 2.85 (1H, *dd*, $J=5.4, 16.3\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{eq}}-4$), 3.60 (1H, *d*, $J=12.1\text{Hz}$, H_a-5''), 3.63 (1H, *d*, $J=12.1\text{Hz}$, H_b-5''), 3.86 (1H, *d*, $J=9.8\text{Hz}$, H_a-4''), 3.99 (1H, *dd*, $J=9.5, 16.0\text{Hz}$, H-3), 4.08 (1H, *d*, $J=9.7\text{Hz}$, H_b-4''), 4.13 (1H, *d*, $J=2.8\text{Hz}$, H-2''), 4.60 (1H, *d*, $J=7.3\text{Hz}$, H-2), 5.47 (1H, *d*, $J=2.8\text{Hz}$, H-1''), 6.07 (1H, *d*, $J=1.8\text{Hz}$, H-6), 6.13 (1H, *d*, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 6.71 (1H, *dd*, $J=1.2, 8.1\text{Hz}$, H-6'), 6.76 (1H, *d*, $J=8.1\text{Hz}$, H-5'), 6.83 (1H, *s*, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , CD_3OD) : 28.77 (C-4), 65.31 (C-5''), 68.98 (C-3), 75.79 (C-4''), 78.64 (C-2''), 80.66 (C-3''), 83.23 (C-2), 97.23 (C-8), 97.64 (C-6), 103.61 (C-10), 109.04 (C-1''), 115.56 (C-2'), 116.49 (C-5'), 120.35 (C-6'), 132.47 (C-1'), 146.59 (C-3'), 146.61 (C-4'), 157.23 (C-5), 157.92 (C-7), 158.52 (C-9).

다) 화합물 3 ((+)-catechin-7-O-xylopyranoside)

W4를 채크로마토그래피를 수행하여 화합물 1의 7번위치에 xylose가 결합된 화합물 3(109mg)을 분리하였다. 이 화합물의 화합물의 R_f 및 NMR data는 다음과 같다.

R_f : 0.31(solvent A), 0.55(solvent B), **FAB-MS** : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 423.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , CD_3OD) : 2.53 (1H, *dd*, $J=8.0, 16.3\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{ax}}-4$), 2.85 (1H, *dd*, $J=5.3, 16.3\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{eq}}-4$), 3.31 (1H, *m*, $\text{H}_{\text{ax}}-5''$), 3.39 (2H, *m*, H-2'',3''), 3.55 (1H, *m*, H-4''), 3.89 (1H, *m*, $\text{H}_{\text{eq}}-5''$) 4.00 (1H, *m*, H-3), 4.59 (1H, *d*, $J=7.4\text{Hz}$, H-2), 4.76 (1H, *d*, $J=7.2\text{Hz}$, H-1''), 6.11 (1H, *d*, $J=2.1\text{Hz}$, H-6), 6.16 (1H, *d*, $J=2.2\text{Hz}$, H-8), 6.72 (1H, *dd*, $J=1.8, 8.1\text{Hz}$, H-6'), 6.77 (1H, *d*, $J=8.1\text{Hz}$, H-5'), 6.84 (1H, *d*, $J=1.72\text{Hz}$, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , CD_3OD) : 28.71 (C-4), 67.10 (C-5''), 68.80 (C-3), 71.30 (C-4''), 74.92 (C-2''), 77.98 (C-3''), 83.13 (C-2), 97.19 (C-8), 97.69 (C-6), 103.03 (C-1''), 103.96 (C-10), 115.48 (C-2'), 116.41 (C-5'), 120.29 (C-6'), 132.28 (C-1'), 146.46 (C-3'), 146.50 (C-4'), 157.06 (C-5), 157.76 (C-7), 158.69 (C-9).

라) 화합물 4 ((+)-catechin(4a \rightarrow 8)-(+)-catechin, Procyanidin B-3)

E6, 7을 모아서 메탄올:물(1:2, v/v)로 채크로마토그래피를 수행하여 화합물 1이 서로 4번과 8번이 결합한 화합물 4(59mg)를 분리하여 구조를 규명하였다. 이 화합물의 R_f 및 NMR

data는 다음과 같다.

R_f : 0.38(solvent A), 0.50(solvent B).

(Notes: M= major rotamer, m= minor rotamer, *= changable)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , CD_3OD) : 2.49 (1H, *dd*, $J=8.0, 16.2\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{ax}}-4''$), 2.76 (1H, *dd*, $J=5.7, J=16.4\text{Hz}$, $\text{H}_{\text{eq}}-4''$), 3.79, 4.08 (1H, *m*, H-3''), 4.25 (1H, *d*, $J=9.5\text{Hz}$, H-4), 4.35, 4.52 (1H, *t*, $J=9.4, 7.8, 8.6\text{Hz}$, H-3), 4.41 (H-2, *d*, $J=7.8\text{Hz}$, H-2''), 4.74 (1H, *d*, $J=7.3\text{Hz}$, H-2), 5.78 (3/4H, *d*, $J=2.3\text{Hz}$, H-6(M)), 5.81 (1/4H, *d*, $J=2.3\text{Hz}$, H-6(m)), 5.84 (1/4H, *d*, $J=2.3\text{Hz}$, H-8(m)), 5.89 (1/4H, *d*, $J=2.4\text{Hz}$, H-8(M)), 5.94 (1/4H, *s*, H-6''(m)), 6.07 (3/4H, *s*, H-6''(M)), 6.24-6.99 (6H, *br-m*, H-2', 2'', 5', 5'', 6', 6'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , CD_3OD) : 28.74 (C-4''(m)), 29.03 (C-4''(M)), 38.85 (C-4), 68.83 (C-3''(m)), 69.18 (C-3''(M)), 73.97 (C-3), 82.71 (C-2''(M)), 83.19 (C-2''(m)), 84.21 (C-2(M)), 84.36 (C-2(m)), 96.33 (C-8(M)), 96.51 (C-8(m)), 97.14 (C-6(M)), 97.60 (C-6''(M)), 97.77 (C-6(m)), 97.83 (C-6''(m)), 100.76 (C-10''(m)), 102.51 (C-10''(M)), 107.47 (C-10), 108.46 (C-8''(M)), 108.62 (C-8''(m)), 115.47 (C-2'(m)), 115.78 (C-2'(M)), 116.21 (C-5'(m)), 116.34 (C-5'(M)), 116.43 (C-5'''(m)), 116.48 (C-5'''(M)), 116.69 (C-2'''), 120.12 (C-6'''(M)), 120.44 (C-6'''(m)), 120.90 (C-6'(M)), 121.32 (C-6'(m)), 132.12 (C-1''(M)), 132.43 (C-1''(m)), 132.67 (C-1(m)), 132.89 (C-1(M)), 145.74* (C-4'''(M)), 145.88* (C-4'''(m)), 146.06* (C-3'''(m), 4'(m)), 146.34* (C-3'''(M), C-4'* (M)), 146.39* (C-3'(M)), 146.64* (C-3'(m)), 155.14 (C-5''(M)), 155.25 (C-5''(m)), 155.91 (C-5'(M)), 156.03 (C-5'(m)), 156.12* (C-7'''), 157.38* (C-7'(M)), 157.39* (C-9'' (M)), 157.56* (C-7'(m)), 157.71* (C-9''(m)), 158.90 (C-9').

마) 화합물 5 (Homoflavoyadorinin B, luteolin 3',7-dimethyl ether 4'-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2) β -D-glucopyranoside)

신갈나무 겨우살이의 수용성 분획물을 장시간 냉장실에 방치한 후 발생하는 노란색의 결정성 화합물을 원심분리기를 이용하여 정제하여 분석한 결과 luteolin의 기본골격에 3'와 7번 위치에 methoxyl 기가 결합되어 있으면 B환의 4'에 glucose의 2번 위치에 5탄당인 apiose의 1번이 결합된 화합물을 단리하였다. 이 화합물의 NMR data는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, δ , DMSO- d_6) : 3.19~4.06 (11H, *m*, glc and api protons), 3.87, 3.89 (each 3H, *s*, 7, 3'-OCH₃), 5.14 (1H, *d*, $J=7.7\text{Hz}$, H-1''), 5.43 (1H, *s*, H-1'''), 6.38 (1H, *d*, $J=2.0\text{Hz}$, H-6), 6.84 (1H, *d*, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 7.05 (1H, *s*, H-3), 7.22 (1H, *d*, $J=8.7\text{Hz}$, H-5'), 7.63 (1H, *d*, $J=1.6\text{Hz}$, H-2'), 7.67 (1H, *d*, $J=8.6\text{Hz}$, H-6'), 12.84 (*s*, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, δ , DMSO- d_6) : 56.82 (7-OCH₃), 56.95 (5-OCH₃), 61.41 (C-6''), 65.30 (C-5'''), 70.75 (C-4''), 74.82 (C-4'''), 75.59 (C-3''), 76.86 (C-2'''), 77.87 (C-2''), 78.01 (C-5''), 80.22 (C-3'''), 93.69 (C-8), 98.76 (C-6), 98.93 (C-1''), 105.12 (C-10), 105.62 (C-3), 109.16 (C-1'''), 110.86 (C-2'), 115.64 (C-5'), 120.64 (C-6'), 124.77 (C-1'), 149.92 (C-4'), 150.48 (C-3'), 158.16 (C-9), 161.99 (C-5), 164.31 (C-2), 166.08 (C-7), 182.92 (C-4).

8) 단리화합물의 구조결정

각각의 공시재료를 에탄올로 추출한 후 칼럼크로마토그래피법을 사용하여 분리 정제한 결과 느릅나무 수피는 그림 2와 같이 주로 flavan-3-ol계 화합물로 구성되어 있었다. 에틸아세테이트용성과 수용성 성분을 분석 한 결과 화합물 2 ((+)-catechin-7-O-apioside)가 다량 (13.9g) 함유되어 느릅나무 수피의 주요 구성성분임을 알 수 있었다.

한국산 겨우살이에 대한 연구는 주로 당단백질인 lectin 및 항암활성에 집중되어 있어 저분자 활성 화합물 및 기타 생리활성에 대한 연구는 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 고분자성의 당단백질 성분뿐만 아니라 저분자 화합물을 수용성 분획에서 결정으로 분리하였다. 이 화합물은 luteolin의 기본골격에 3'와 7번 위치에 methoxyl 기가 치환되어 있고 4'에 pentose와 hexose가 glycoside 결합을 하고 있는 화합물로 이 화합물은 겨우살이에서만 특이적으로 생합성되는 flavonoid로 식물화학적으로 그 의미가 있다.

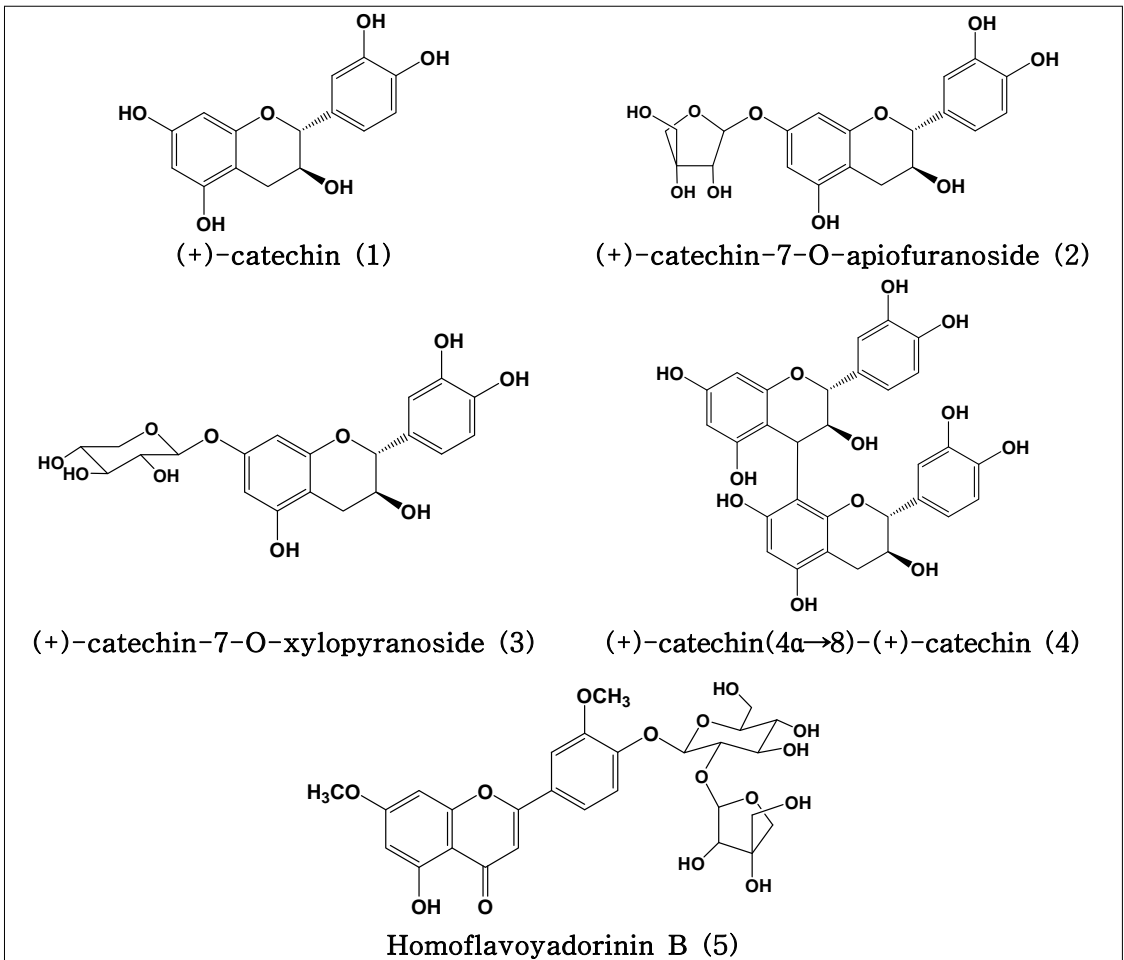


Fig. 2. 느릅나무 수피와 겨우살이에서 단리 된 화합물의 구조.

가) (+)-Catechin (화합물 1)

화합물 1은 flavan 3-ol의 대표적인 화합물로서 Fig. 3의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 5.86 ppm과 5.94 ppm에서 두 개의 doublet은 H-6과 H-8의 피크로서 J 값이 2.2 Hz와 2.3 Hz인 것으로 보아 meta coupling이 되어있음을 알 수 있고, Fig. 4의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-6과 C-8은 각각 96.32 ppm과 95.5 3ppm에서 나타나며 수산기가 결합되어 있는 C-5, 7,

9는 157.61 ppm, 157.86 ppm 그리고 156.95 ppm에서 나타나는데 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 피크다. Quaternary 탄소인 C-10은 다른 탄소의 피크보다 작게 100.85 ppm에서 나타나고 있다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 2.51ppm에서 나타나는 double doublet은 H-4의 axial 수소로서 vicinal 수소인 H-3과의 coupling으로 8.1 Hz의 J 값과 geminal 수소인 H-4의 equatorial 수소에 의해 16.1 Hz의 J 값을 나타내며, 2.85 ppm의 double doublet은 H-4의 equatorial 수소로서 geminal 수소인 H-4의 axial 수소에 의해 16.1Hz의 J 값과 vicinal 수소인 H-3의 의해서 5.4Hz의 J 값을 나타내고 있다. 3.98 ppm은 H-3의 수소로서 인접한 H-2, H-4ax 그리고 H-4eq에 의해서 multiplet으로 나타나고 있으며 H-2는 H-3의 수소에 의해서 4.57 ppm에서 J 값이 7.5 Hz인 doublet 피크를 보이고 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 28.55 ppm의 피크는 C-4에 carbonyl기가 치환되어 있지 않은 flavan-3-ol의 전형적인 피크이며 C-3과 C-2는 68.84 ppm과 82.88 ppm에 나타나는데 이는 flavan류 화합물의 heterocyclic C환의 특징적인 피크 형태이다(Agrawal, 1989).

한편, B환의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-2'은 H-6'과 meta coupling으로 6.84 ppm에서 J 값이 1.8 Hz인 doublet 피크로 나타나고 있으며, H-5'은 6.77 ppm에서 H-6'과 ortho coupling으로 J 값이 8.1 Hz인 doublet 피크를 보이고 있고, 6.72 ppm에서 나타나는 double doublet은 H-6'의 피크로 인접한 H-2'과 meta coupling, H-5'과 ortho coupling으로 J 값은 1.8 Hz와 8.1 Hz이다. B환의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 수산기가 결합 되어 있지 않은 C-2', 5', 6' 피크들은 115.28 ppm, 116.12 ppm, 120.08 ppm에서 나타나며 C-3'과, 4' 피크들은 수산기가 결합되어 있어 146.26 ppm과 146.28 ppm에서 나타나고 있는데, 이것은 이 화합물의 B환이 catechol 형태를 가지고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과는 Ham 등(1995)이 *Populus albaglandulosa*의 수피로부터 단리한 화합물의 NMR값 및 보고된 data와 일치하였다. 따라서 이 화합물은 (+)-catechin으로 구조를 구명하였다. (+)-catechin은 지혈(hemostatic), 지사(antidiarrheal), 항궤양(antiulcer)등의 약리 효과가 있으며 간장 질환(hepatic disorders) 치료제 등으로 사용되고 있다(장일식, 2003).

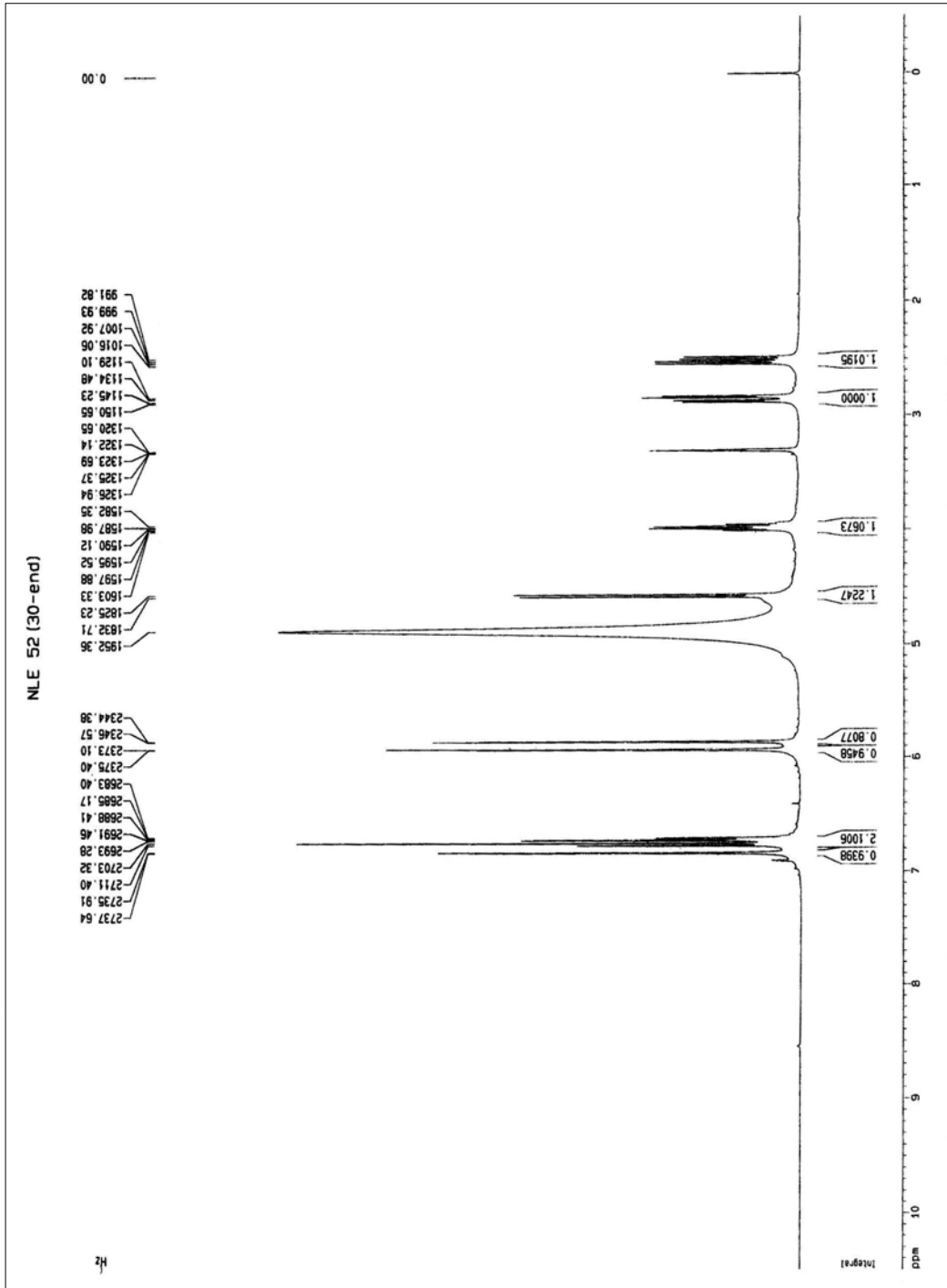


Fig. 3. (+)-catechin의 ^1H -NMR spectrum.

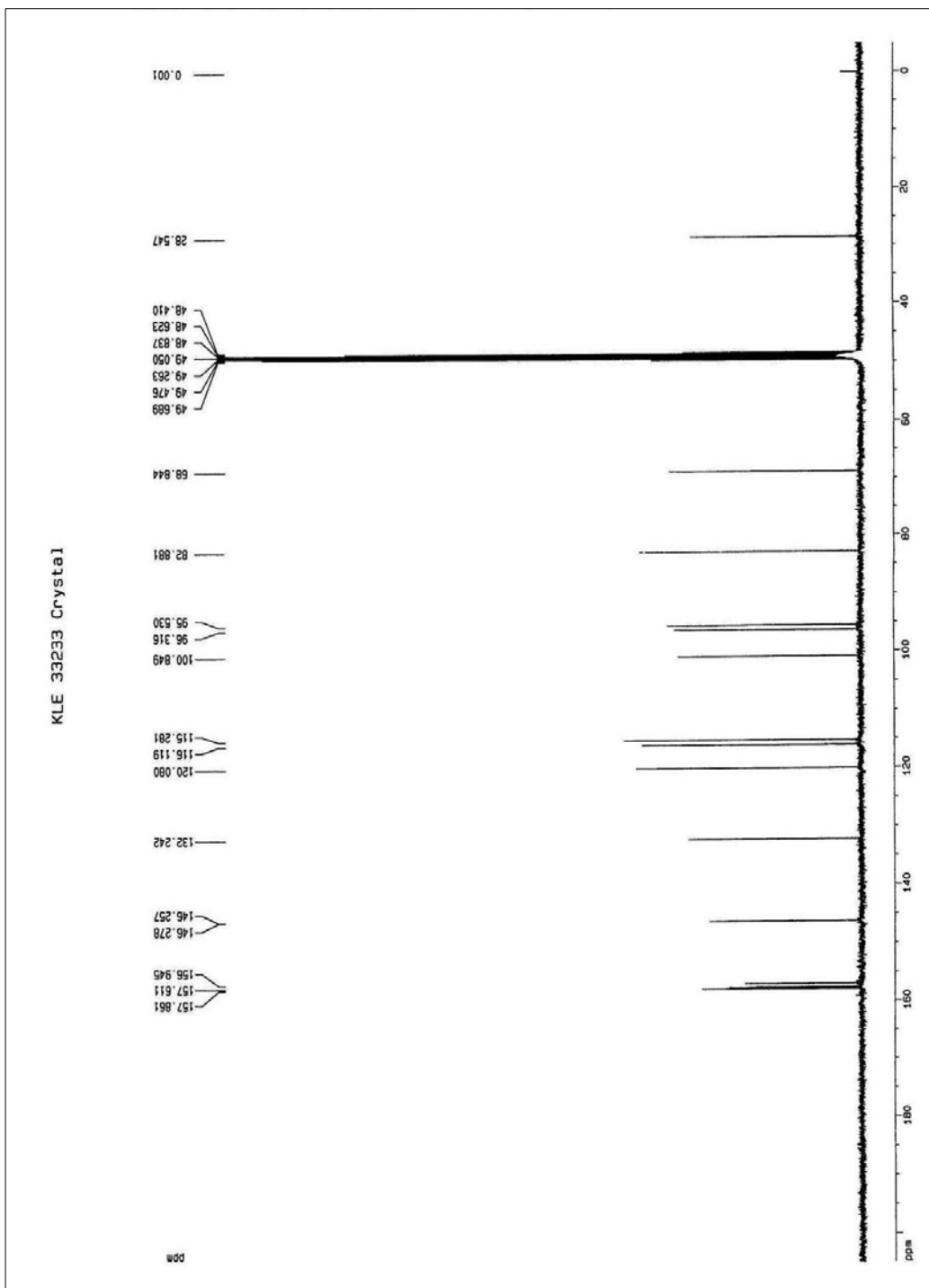


Fig. 4. (+)-catechin의 ^{13}C -NMR spectrum.

나) (+)-catechin-7-O-apiofuranoside (화합물 2)

화합물 2는 (+)-catechin의 7번 탄소에 apiose가 결합한 구조로 Fig. 5의 $^1\text{H-NMR}$ 에서 5.47ppm의 doublet은 apiose의 anomeric proton의 피크로 J 값이 2.78 Hz으로 나타난 것으로 보아 furan형 구조를 하고 있음을 알 수 있으며, H-2"은 인접한 H-1"의 영향으로 4.13 ppm에서 doublet으로 나타나며 2.79 Hz의 J 값을 가진다. H-4"의 두개의 수소는 3.86 ppm에서 H-4a"가 4.08 ppm에서 H-4b"가 각각 doublet으로 나타나고 J 값은 9.8 Hz와 9.7 Hz였으며, H-5"의 두개의 수소는 H-5a"이 3.60 ppm, H-5b"이 3.63 ppm에서 각각 doublet으로 J 값은 12.1 Hz로 동일하게 나타났다. 나머지 수소들의 피크는 (+)-catechin의 피크와 동일하게 나타났다.

Fig. 6의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 109.04 ppm에서 나타난 피크는 apiose의 1번 탄소로 pyran형의 1번 보다 약 2 ppm downfield 된 것으로 이 화합물의 apiose가 furan형 구조임을 알 수 있으며 나머지 apiose의 탄소들인 C-2", 3", 4", 5"은 78.64 ppm, 80.66 ppm, 75.79 ppm, 65.31 ppm에서 나타나고 있다(Imperato, 1996). A환의 C-7에 apiose가 결합한 영향으로 C-6과 8은 (+)-catechin의 비해 약 2 ppm과 1 ppm downfield 되어 97.64 ppm과 97.23 ppm에서 나타나며, C-9와 10 역시 약 2 ppm과 3 ppm downfield 되어 158.52 ppm과 103.61 ppm에서 나타나는 차이를 보이고 있다. 나머지 탄소들은 (+)-catechin의 피크와 동일하게 나타났다. 따라서 이 화합물은 (+)-catechin의 7번 위치에 apiose가 결합되어 있는 화합물로 구조를 구명하였다.

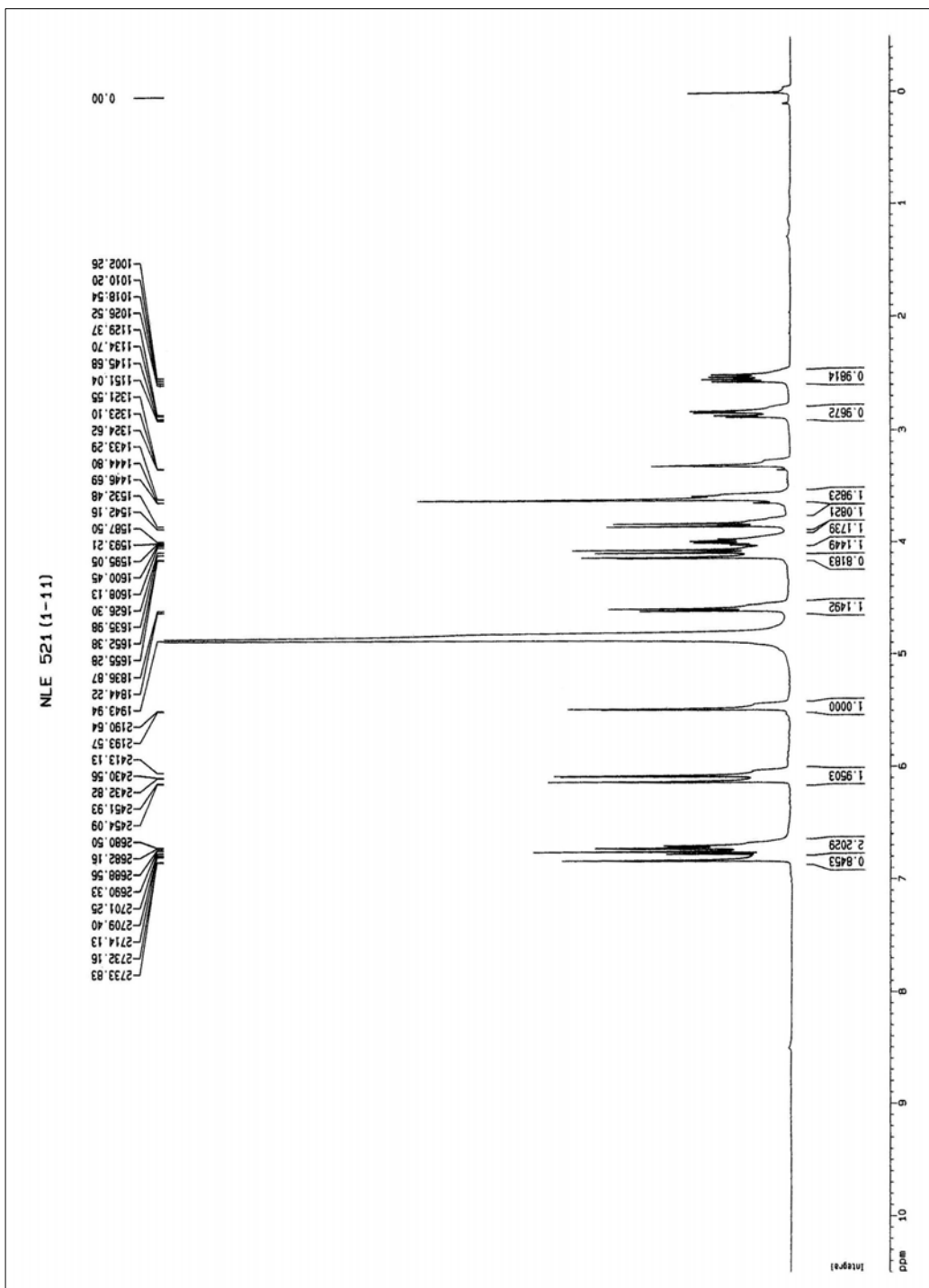


Fig. 5. (+)-catechin-7-O-apiofuranoside^{2]} ¹H-NMR spectrum.

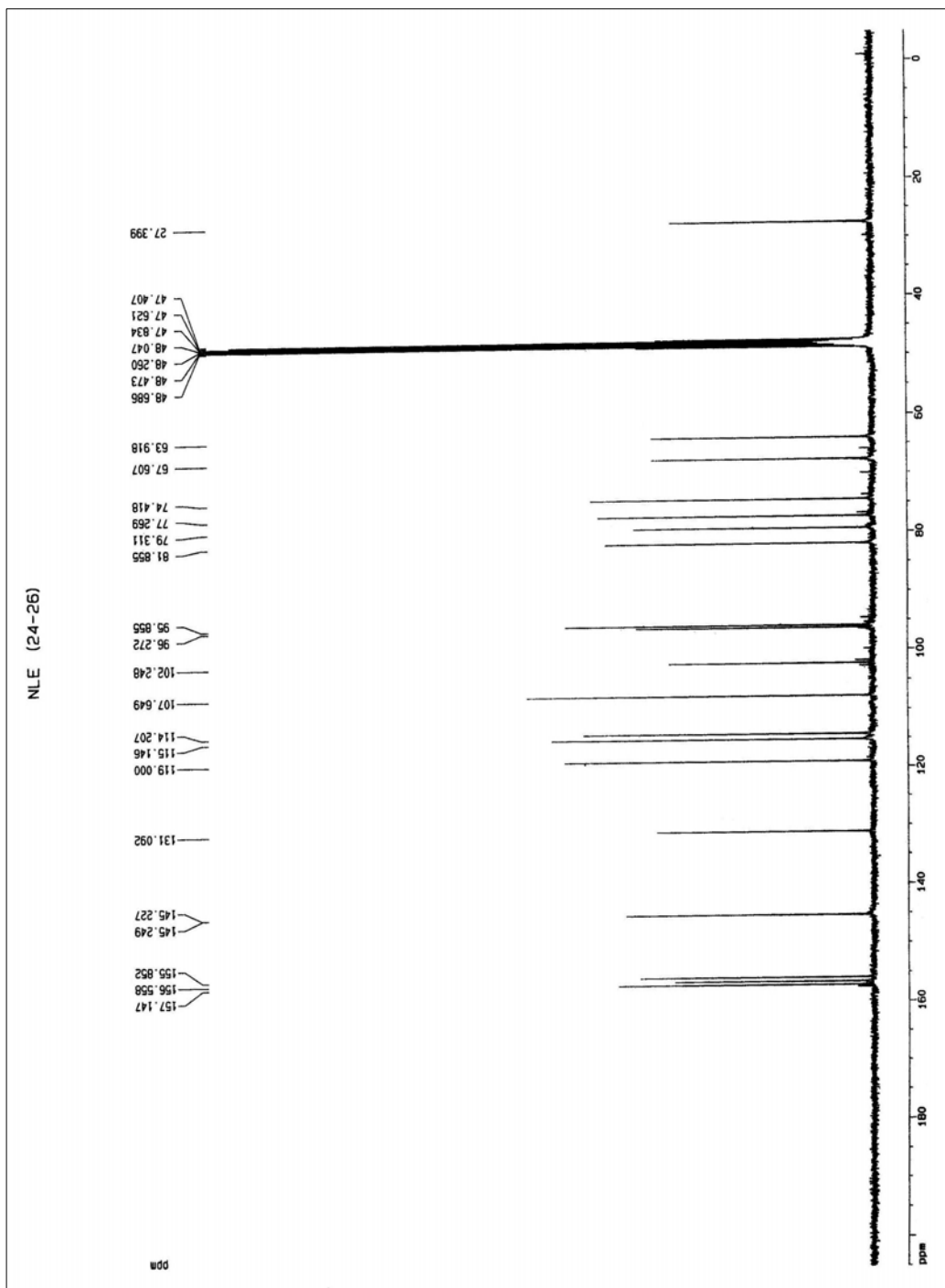


Fig. 6. (+)-catechin-7-O-apiofuranoside ^{13}C -NMR spectrum.

다) (+)-catechin-7-O-xylopyranoside (화합물 3)

화합물 3은 (+)-catechin의 7번 탄소에 xylose가 결합한 구조로 Fig. 7의 $^1\text{H-NMR}$ 에서 3.31~3.89 ppm 사이의 피크들은 5탄당인 xylopyranose의 H-2''~H-5''의 수소들의 signal을 보여 주고 있으며 4.76 ppm에서 나타난 doublet은 J 값이 7.2 Hz로서 H-1''의 피크가 나타난다. Fig. 8의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 67.17 ppm에서 나타난 signal은 xylopyranose의 C-5''을 나타내며 α 형의 xylopyranose 경우에는 62 ppm 정도에서 나타나게 된다. 또한 103.03 ppm의 피크는 C-1''으로서 C-1''이 hemiacetal 결합을 하는 β 형의 xylopyranose임을 알 수 있다. 74.92 ppm, 77.98 ppm, 71.30 ppm의 피크들은 C-2'', 3'', 4''에 해당하는 피크들로 Agrawal (1989), Mizuno 등(1991)과 Ishii 등(1990)이 보고한 전형적인 β -D-xylopyranose의 피크 형태와 동일함을 보여준다.

기타 피크들은 aglycone인 (+)-catechin과 매우 유사한 형태를 나타냈으며 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-6과 H-8은 (+)-catechin보다 각각 약 0.2 ppm 정도씩 downfield로 이동되어 나타나고 있으며 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 C-6과 C-8은 각각 1 ppm과 1.4 ppm downfield로 이동되어 나타났다. 또한 C-7은 약 0.6 ppm 정도 downfield로 이동되어 나타났다. 이것은 C-7에 xylopyranose가 결합되어 있음을 나타낸다. 이상의 결과로 화합물은 3은 (+)-catechin의 7번 위치에 xylopyranose가 결합되어 있는 화합물로 구조를 구명하였다.

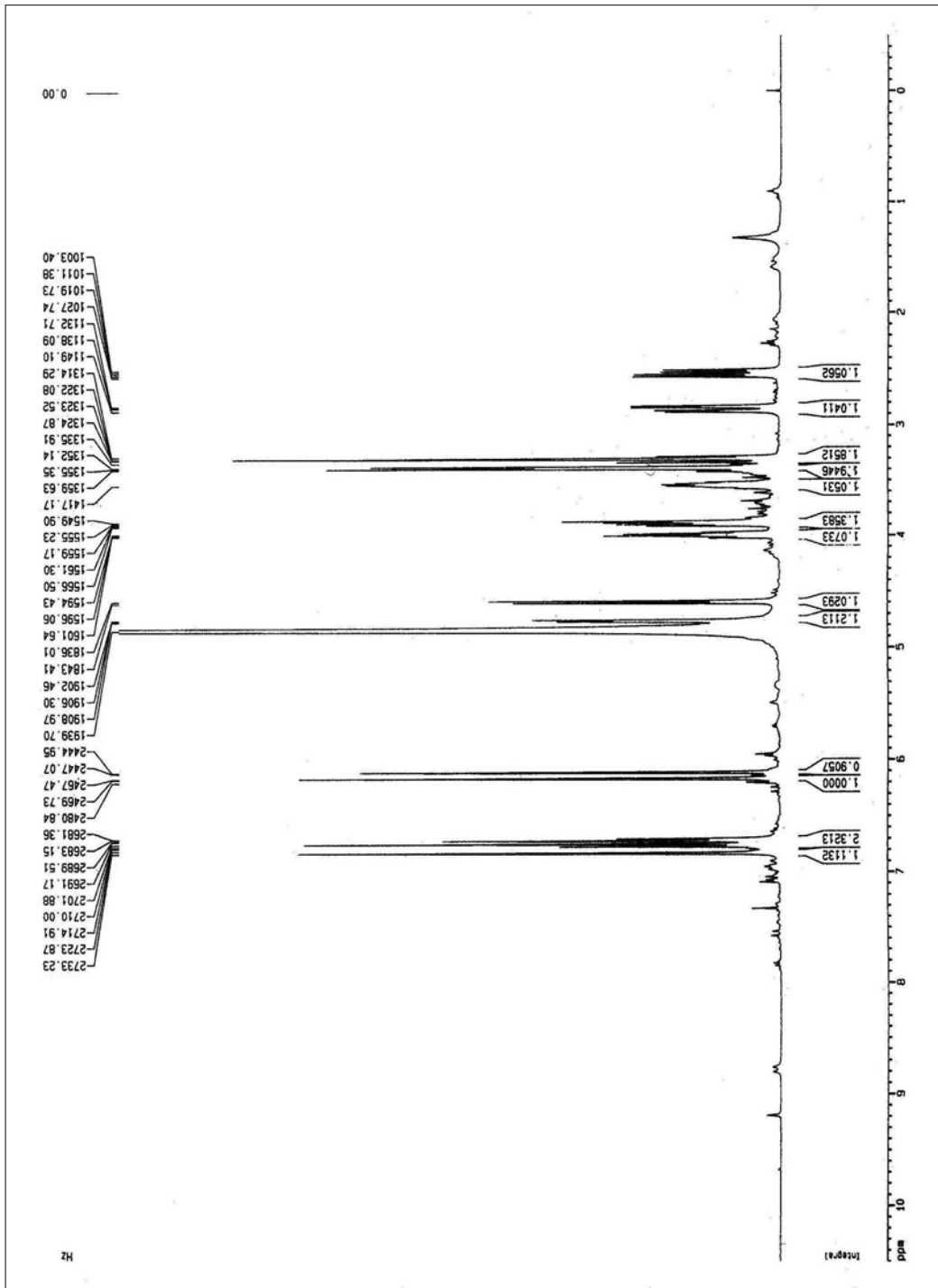


Fig. 7. (+)-catechin-7-O-xylopyranoside의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

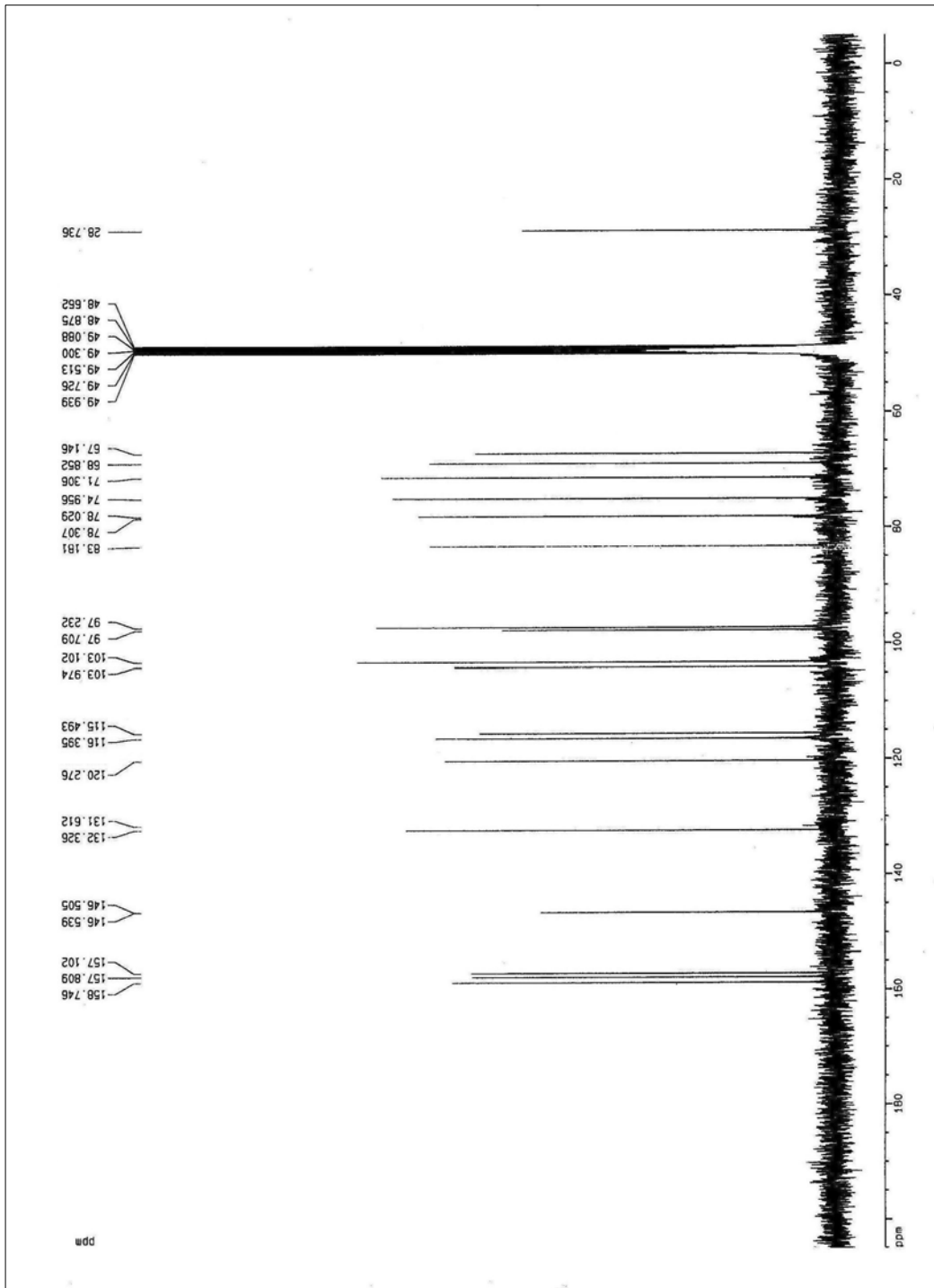


Fig. 8. (+)-catechin-7-O-xylopyranoside의 ^{13}C -NMR spectrum.

라) (+)-catechin(4 α →8)-(+)-catechin (화합물 4)

화합물 4는 (+)-catechin 2 unit의 4번 탄소와 8번 탄소가 결합을 하고 있는 구조로 NMR 상에서 procyanidin 이량체 화합물들은 free rotation에 의하여 각각 두 개씩의 복잡한 피크로 나타나며 결합 단위체들의 입체구조와 단위체 사이의 결합형태에 따라 C-2와 C-3의 화학적 이동 값들이 특징적으로 차이를 나타내고 있으므로 이를 비교함으로써 구조를 결정할 수 있다. Fig. 9의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 bottom unit의 C-4"에 결합된 두 수소는 2.49 ppm과 2.76 ppm에서 각각 double doublet으로 나타나고 있으며 *J*값은 각각 8.0과 16.2 Hz 그리고 5.7과 16.4 Hz로써 (+)-catechin의 특징을 나타내고 있다. Top unit의 H-4는 4.25 ppm에서 doublet으로 나타나고 있으며 *J*값은 9.5 Hz로서 α 결합되어 있음을 나타낸다. Top unit의 H-3은 free rotation에 의하여 3.79 ppm과 4.08 ppm에서 triplet으로 나타남으로 C-4가 bottom unit와 결합되어 있음을 알 수 있다. Bottom unit의 H-6"은 5.94 ppm과 6.07 ppm에서 나타나고 있으며 H-8"과의 meta coupling이 없는 singlet으로 나타났다.

Fig. 10의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 29.03 ppm과 38.85 ppm의 피크는 각각 bottom unit 및 top unit의 C-4"와 C-4로서 top unit의 C-4가 bottom unit와 결합되어 downfield로 이동되어 있음을 나타낸다. 69.18 ppm, 73.97 ppm, 82.71 ppm 및 84.21 ppm의 피크들은 top unit와 bottom unit의 C-2와 C-3으로써 (+)-catechin과 (+)-catechin이 결합된 procyanidin B-3의 특징적인 피크를 나타내고 있다. Bottom unit의 C-8"은 약 10 ppm 정도가 downfield로 이동 된 108.46 ppm에서 나타남으로서 C-8"에 top unit의 C-4가 α 결합되어 있음을 알 수 있다. 화합물 4의 NMR값들은 Foo 등(1982), Karchesy 등(1980), Hemingway 등(1983) 및 Kolodziej (1985)이 보고한 procyanidin B-3과 일치하였다. 따라서 화합물 4는 2개의 (+)-catechin의 C-4와 C-8"이 결합을 하고 있는 (+)-catechin(4 α →8)-(+)-catechin (procyanidin B-3)으로 구조를 구명하였다.

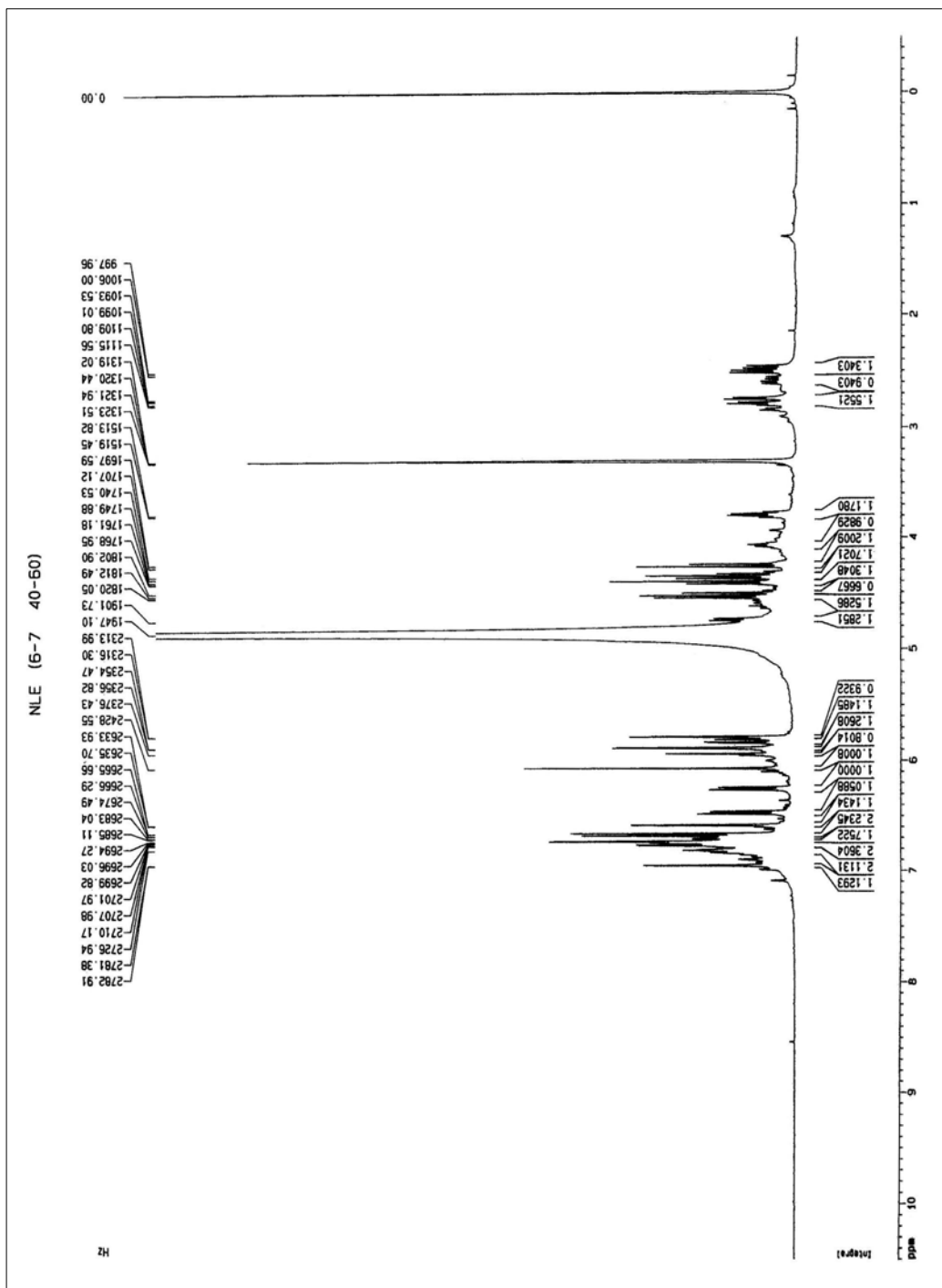


Fig. 9. (+)-catechin(4 α →8)-(+)-catechin의 ^1H -NMR spectrum.

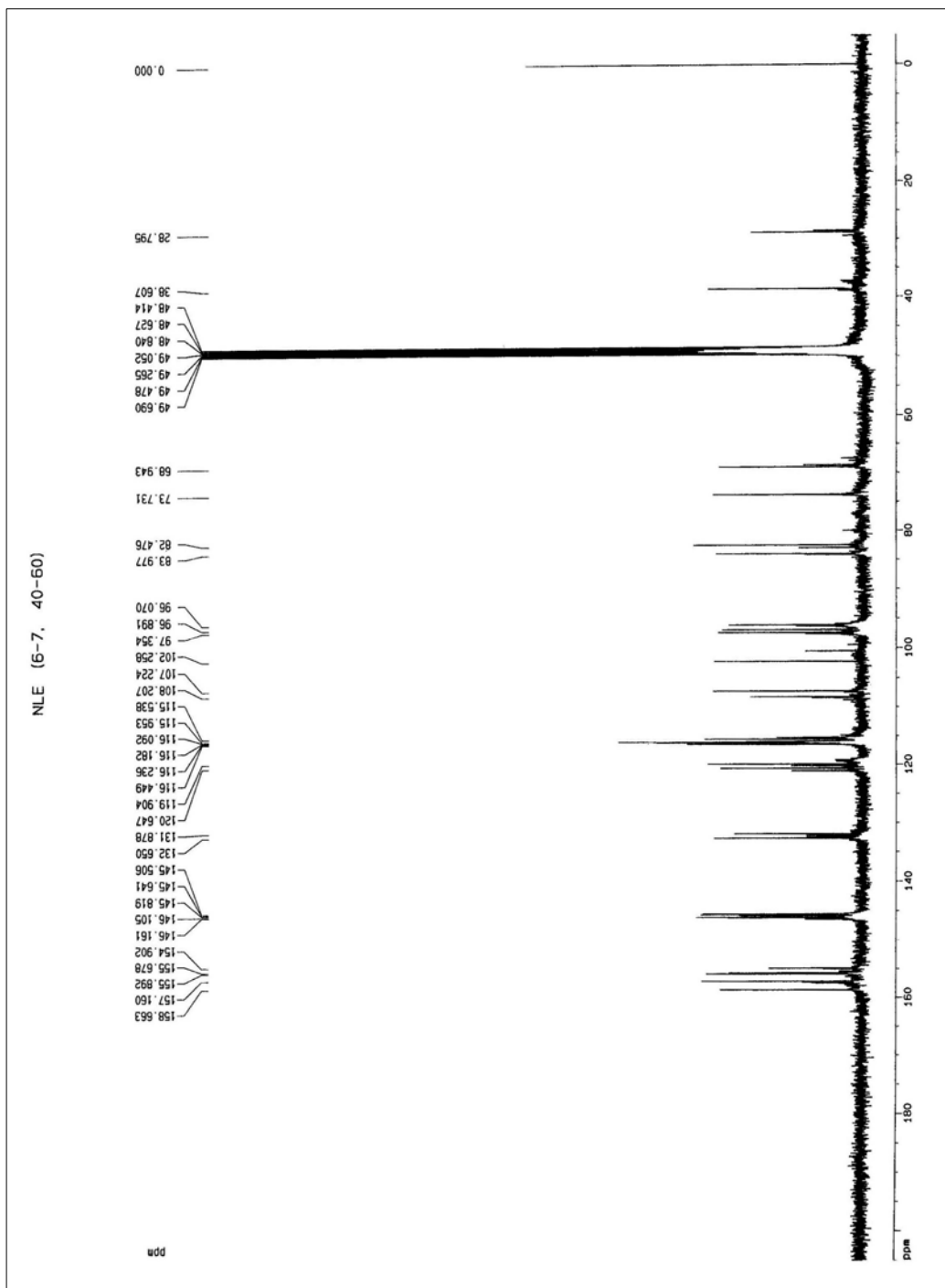


Fig. 10. (+)-catechin(4 α →8)-(+)-catechin ^{13}C -NMR spectrum.

마) Homoflavoyadorinin B (화합물 5)

화합물 5는 aglyconed인 velutin (luteolin 3', 7-dimethyl ether)에 4' 탄소에 glucose의 2번 탄소와 apiofuranose 1번 탄소가 결합한 화합물이다.

Fig. 11의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 7.63 ppm의 doublet은 H-2'가 H-6'과 meta coupling ($J=1.6\text{Hz}$) 되어 나타나며 H-5'와 H-6'은 서로 ortho coupling 되어 각각 7.22 ppm과 7.67 ppm에서 doublet으로 나타난다. A환의 H-6과 H-8은 서로 meta coupling 되어 doublet으로 각각 나타나는데 이는 Watanabe (1999)가 보고한 luteolin의 H-6과 H-8 보다 약 0.1 ppm, 0.3 ppm 정도 downfield되어 6.38 ppm과 6.84 ppm에 나타나고 있다. 또한, C-3'에 methoxyl 기와 C-4'에 glucose와 apiose가 결합한 영향으로 H-3은 luteolin의 H-3 보다 약 0.5 ppm downfield 되어 7.05 ppm에서 singlet으로 나타나는 특징을 보이고 있으며 3.87 ppm과 3.89 ppm에서 C-7과 3'에 methoxyl 기의 수소들이 피크가 나타난다. Glucose H-1'' 수소는 5.14 ppm에서 J 값이 7.7 Hz인 것으로 보아 $\beta\text{-D-glucose}$ 임을 알 수 있으며 5.43 ppm의 apiose의 H-1'''이 singlet으로 나타나고 3.19~4.06 ppm에서 나머지 glucose와 apiose의 11개의 수소들의 피크가 나타난다. Fig. 12의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 C-2와 C-3이 164.31 ppm과 105.62 ppm에서 나타나는 것으로 보아 이중결합이고 C-3이 치환되어 있지 않음을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4가 182.92 ppm에서 피크를 보이는 것으로 보아 flavone C환임을 알 수 있다(Agrawal, 1989). C-5, 6, 8은 C-7에 methoxyl 기가 결합한 영향으로 luteolin의 C-5는 약 2ppm, C-6과 8은 약 1 ppm 정도 upfield되어 161.99ppm, 98.76 ppm, 93.69 ppm에서 나타나며 C-7는 약 1 ppm 정도 downfield되어 166.08 ppm에서 나타난다. C-4'은 velutin의 C-4' 보다 약 2 ppm 정도 downfield되어 149.92 ppm에서 나타나는 것으로 보아 glucose가 결합하고 있음을 알 수 있었으며(Harborne and Mabry, 1982) glucose와 apiose의 anomeric 탄소인 C-1''과 C-1'''은 98.93 ppm과 109.16 ppm에서 나타나며 나머지 glucose 탄소들인 C-2'', 3'', 4'', 5'', 6''은 77.87 ppm, 75.59 ppm, 70.75 ppm, 78.01 ppm, 61.41 ppm에서 나타난다. C-2''은 apiose와 ether 결합의 영향으로 결합을 하고 있지 않은 glucose보다 약 2 ppm downfield 되어 나타난다. Apiose의 나머지 탄소들인 C-2''', 3''', 4''', 5'''는 76.86 ppm, 80.22 ppm, 74.82 ppm, 65.30 ppm에서 나타나며 methoxyl 기의 두개의 탄소는 56.82 ppm과 56.92 ppm에서 특징적으로 나타난다. 이상의 결과는 서지희 등

(2004)이 한국산 겨우살이에서 분리한 homoflavoyadorinin B의 NMR 값들과도 일치하여 화합물 4는 luteolin 3',7-dimethyl ether 4'-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2) β -D-glucoopyranoside (homoflavoyadorinin B)으로 구조를 구명하였다.

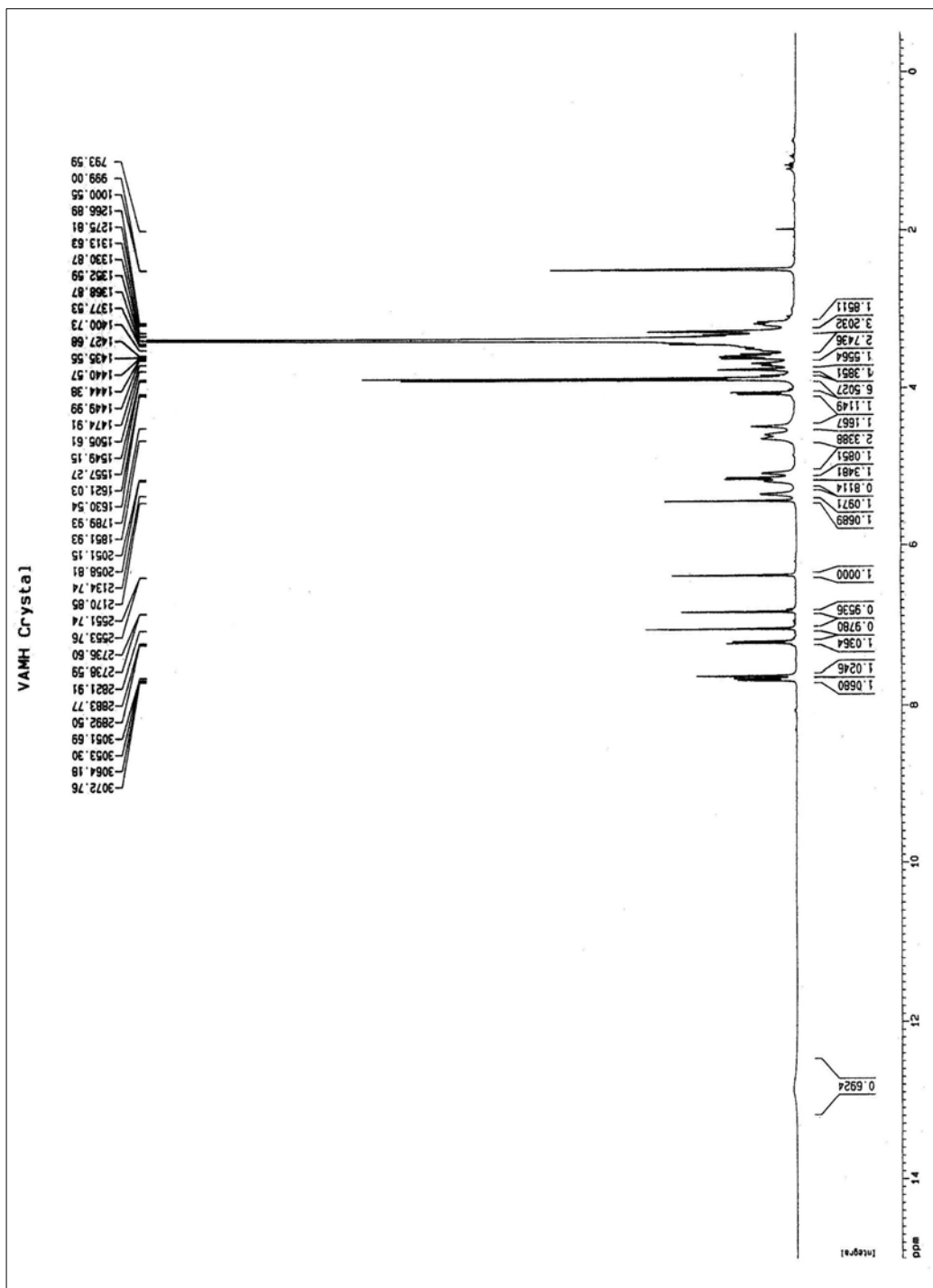


Fig. 11. Homoflavoyadorinin B의 ^1H -NMR spectrum.

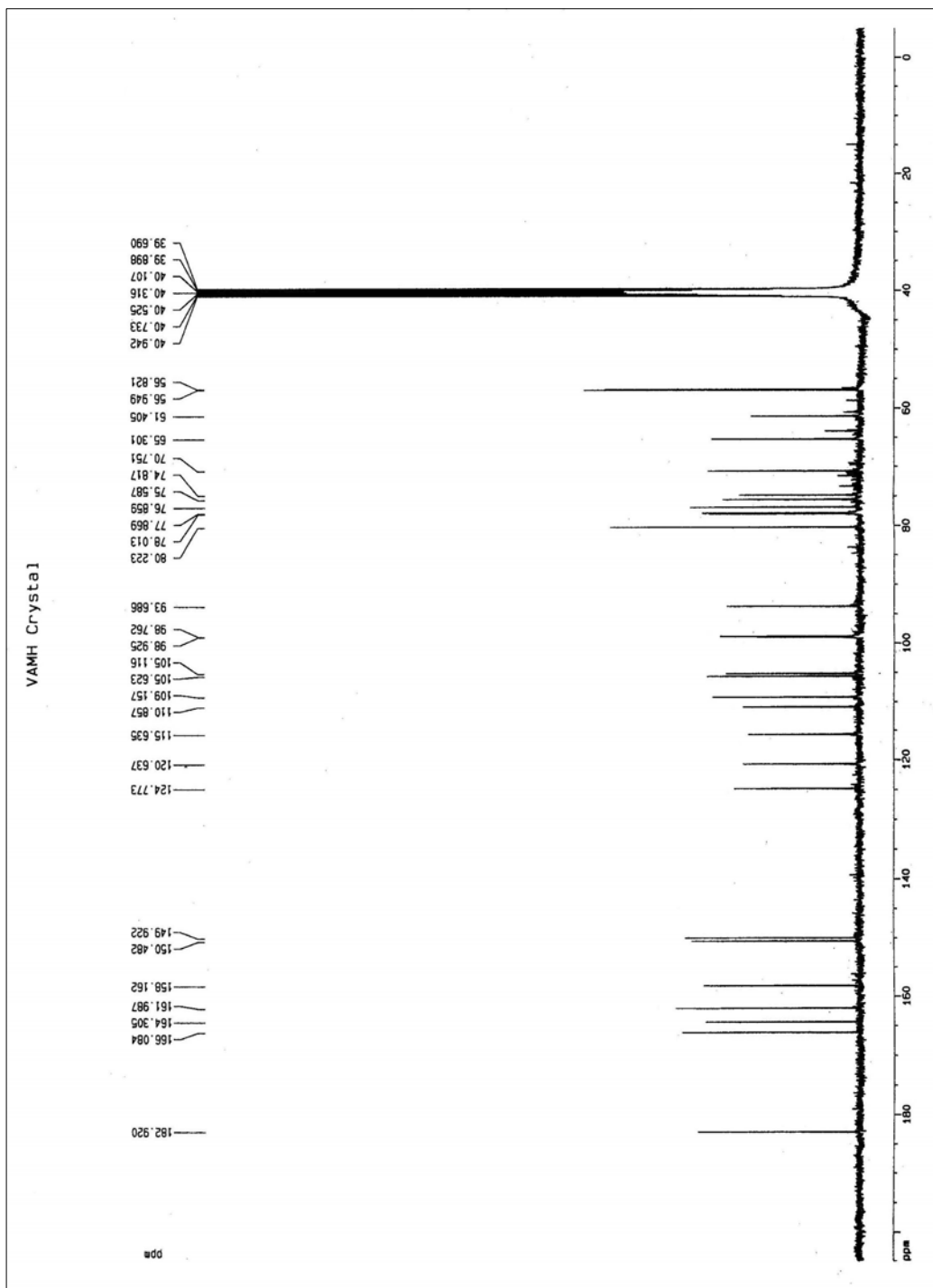


Fig. 12. Homoflavoyadorinin B의 ^{13}C -NMR spectrum.

다. 생리활성 시험

생리활성 시험에 사용한 시료들은 느릅나무 수피 분획물과 신갈나무 겨우살이와 밤나무 겨우살이 분획물 및 느릅나무 수피에서 단리 된 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apiofuranoside, (+)-catechin-7-O-xylopyranoside, (+)-catechin(4a→8)-(+) catechin (procyanidin B-3)과 신갈나무 겨우살이에서 단리 한 homoflavoyadorinin B를 각각 사용하였다.

1) 세포독성 시험

느릅나무 수피 추출물 분획과 신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획 및 단리화합물에 대한 세포 독성 유무를 측정하기 위한 시약 및 human skin fibroblast를 배양하기 위한 배지로는 MEME(Minimum Essential Medium Eagle, Sigma), Fetal bovine serum (Difco), 100×Antibiotic-Antimycotic (10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 µg/ml streptomycin sulfate and 25 µg/ml amphotericin B in 0.85% saline, Gibco), Trypsin 250 (Difco), Trypan blue solution (0.4%, Sigma), Neutral red (Sigma)를 사용하였으며 기타 CaCl₂, Formaldehyde, Acetic acid 등은 특급시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기로는 CO₂ incubator (Sanyo, Japan), 도립현미경 (Leica DMI 4000B, German), Waterbath (Taitec, Japan), 원심분리기(ALC, Italy), Clean bench (Jeio tech, Korea), Microplate reader (Bio-Rad 680, USA) 등이 사용되었다.

가) 세포배양

본 실험에 이용한 CCD-986sk (Human dermal skin fibroblast)는 Korean Cell Line Bank(KCLB 21947)로부터 구입하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 100×Antibiotic-Antimycotic으로 조성한 EMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다.

나) 세포독성 실험

시료의 CCK-986sk에 대한 세포독성 측정은 neutral red assay를 실시하였다. 즉, CCK-986sk(Human dermal skin fibroblast)을 10% FBS-MEME에 배양한 후 이를 취하여 세포농도를 2.5×10^4 cell/ml로 조정된 세포액을 조제한 후 이를 96 well-plate에 200 μ l씩 분주하고 이를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다.

24시간 배양 후 배지를 제거한 후 10% FBS-MEME로 조제한 농도별 시료 100 μ l와 10% FBS-MEME 100 μ l를 다시 첨가하여 동일 조건에서 7일간 배양시켰다. 이 때 10% FBS-MEME만을 사용한 실험구를 대조구로 사용하였다. 7일간 배양한 후 배지 및 용액을 제거하고 50 μ g/ml neutral red (in 10% FBS-MEME)를 200 μ l씩 넣은 후 37°C incubator에서 2시간 반응시켰다. Neutral red 용액을 제거한 후 1% CaCl₂, 1% Formaldehyde(in D.W) 용액을 100 μ l씩 넣고 1분간 교반시킨 후 용액을 제거하고 이에 1% Acetic acid, 50% EtOH (in D.W)을 다시 100 μ l씩 넣고 15분간 교반시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) 세포독성 결과

느릅나무 수피 추출물 및 단일물질의 CCK-986sk(Human skin dermal fibroblast)에 대한 세포 독성을 측정한 결과는 Fig. 13, 14과 같다. 느릅나무 수피 추출물의 경우 312 ppm 농도 이상에서부터 농도비례로 모든 분획물이 세포 독성을 나타내었으며 에틸아세테이트용성 분획물의 경우, 78 ppm에서도 독성을 나타내었다. 따라서 세포 독성을 나타내지 않은 농도 범위의 100 ppm과 250 ppm 이 두 가지 농도를 설정하여 이에 대한 효능 실험을 진행하였으며 에틸아세테이트용성 분획물의 경우, 추후의 효능 실험에서 제외하였다.

또한, 느릅나무 수피로부터 분리한 화합물들의 경우, (+)-catechin-7-O-apioside는 78 ppm 이하에서 독성을 나타내지 않았으며 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-xyloside, procyanidin B-3의 경우 시료별로 156~625 ppm 내에서 세포독성이 나타나지 않는 농도를 보였으며, 따라서, 위의 결과를 바탕으로 추후의 효능 실험은 100 ppm 이하의 농도에서만 진행하였다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획물 시료를 DMSO에 용해시켜 각각의 시료를 39 ppm ~ 5000 ppm까지 단계적으로 희석하여 96 well에 배양한 cell에 처리하여 시료가 세포에 독성을 나타내는 농도를 확인하였다. 그 결과 Fig. 15의 신갈나무 겨우살이 추출물

분획물의 경우 점액질(viscous extract)과 에틸아세테이트용성 분획물이 39 ppm에서 50% 이상의 세포독성을 보였으며 수용성 분획과 homoflavoyadorinin B은 78 ppm까지는 약 30% 정도의 세포독성을 나타냈으나 156 ppm부터는 50%에 가까운 세포독성을 나타냈다. 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 경우 Fig. 16에서와 같이 메틸렌클로라이드용성 분획물이 39 ppm에서 세포생존율이 40% 정도로 세포독성을 보이는 것을 확인 할 수 있었으며 기타 밤나무 겨우살이 추출물 분획들 역시 156 ppm에서 부터는 세포독성이 50% 이상 나타났다. 겨우살이 추출물 분획들은 모두 세포독성이 높게 나타났으며 신갈나무 겨우살이 추출물 점액질과 에틸아세테이트용성 분획물 및 밤나무 겨우살이 메틸렌클로라이드용성 분획물을 제외한 나머지 시료에 대해서는 세포독성을 나타내지 않는 농도인 78 ppm 또는 최대 100 ppm을 세포항산화 실험과 기타 활성 실험 가능 농도로 결정하였다.

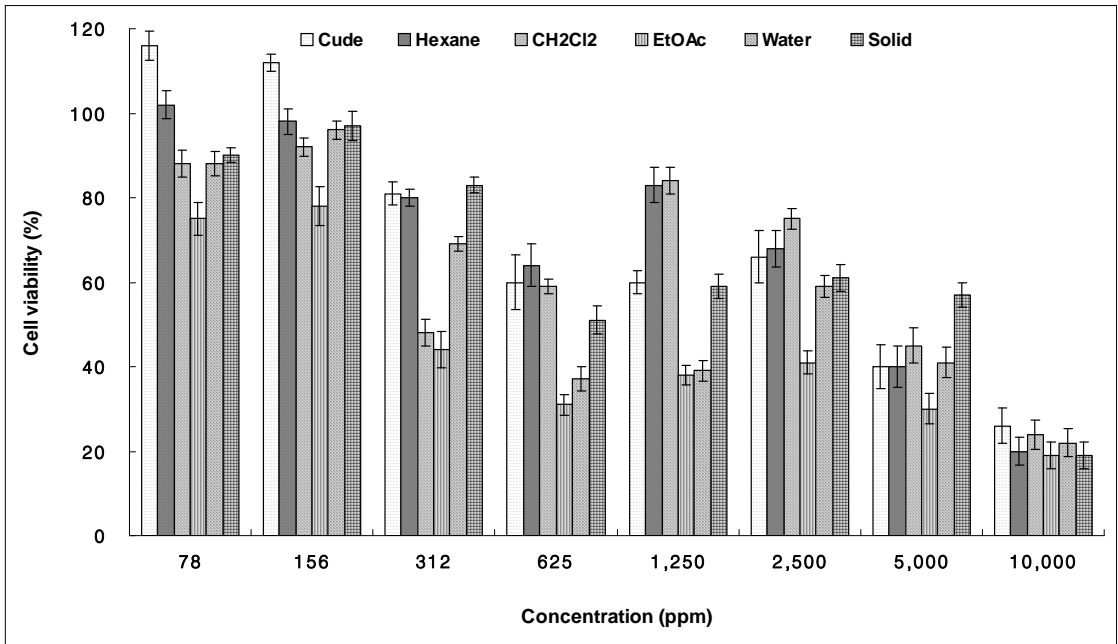


Fig. 13. 느릅나무 수피 추출물 분획의 세포생존율.

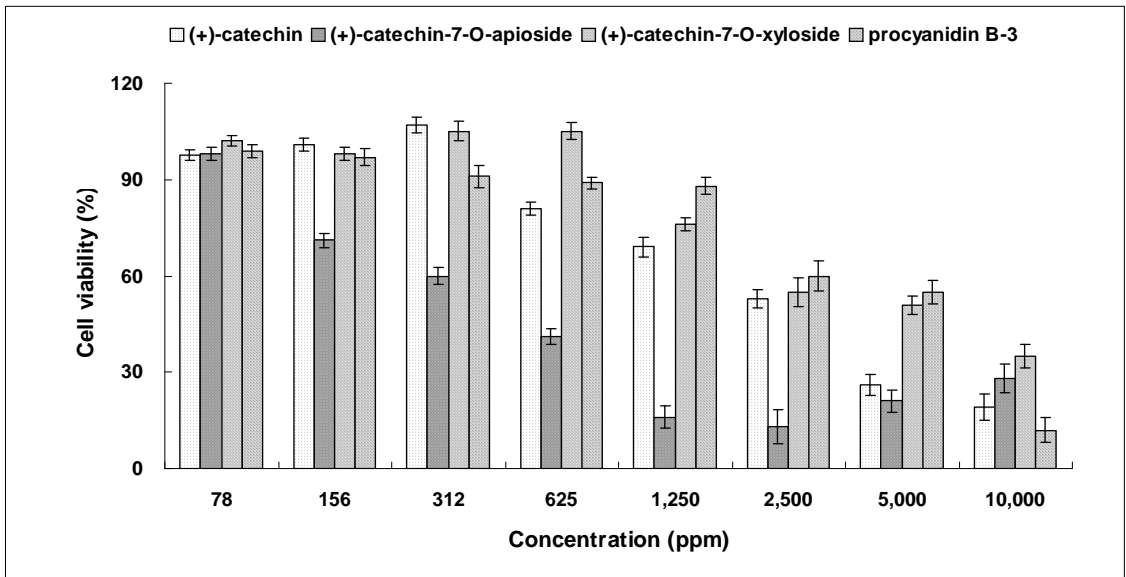


Fig. 14. 느릅나무 수피에서 분리된 화합물의 세포생존율.

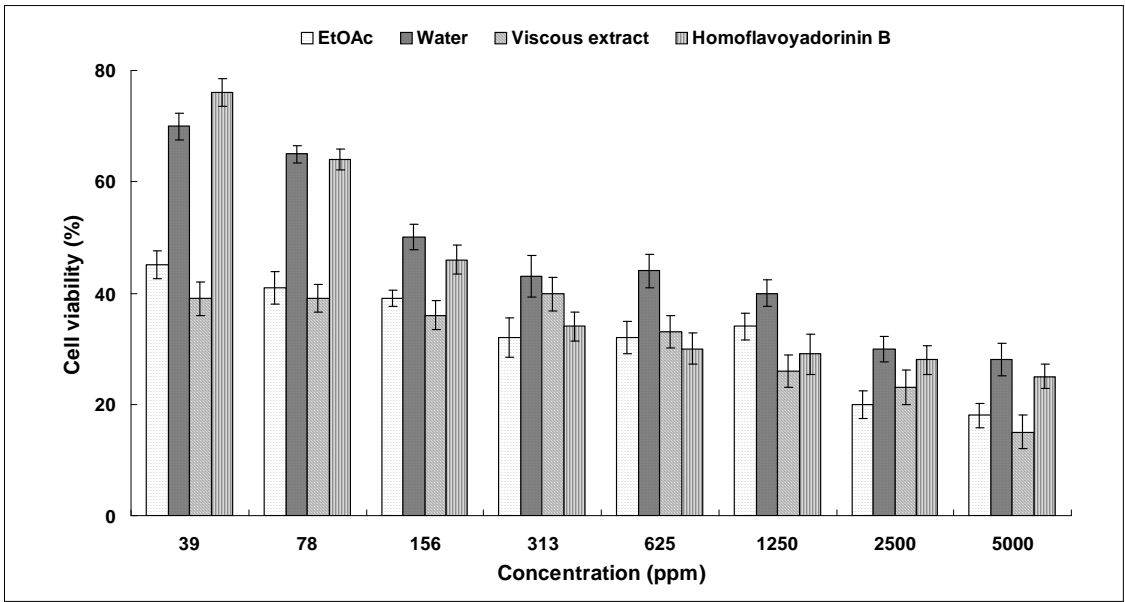


Fig. 15. 신갈나무 겨우살이 추출물 분획과 homoflavoyadorinin B의 세포증식률.

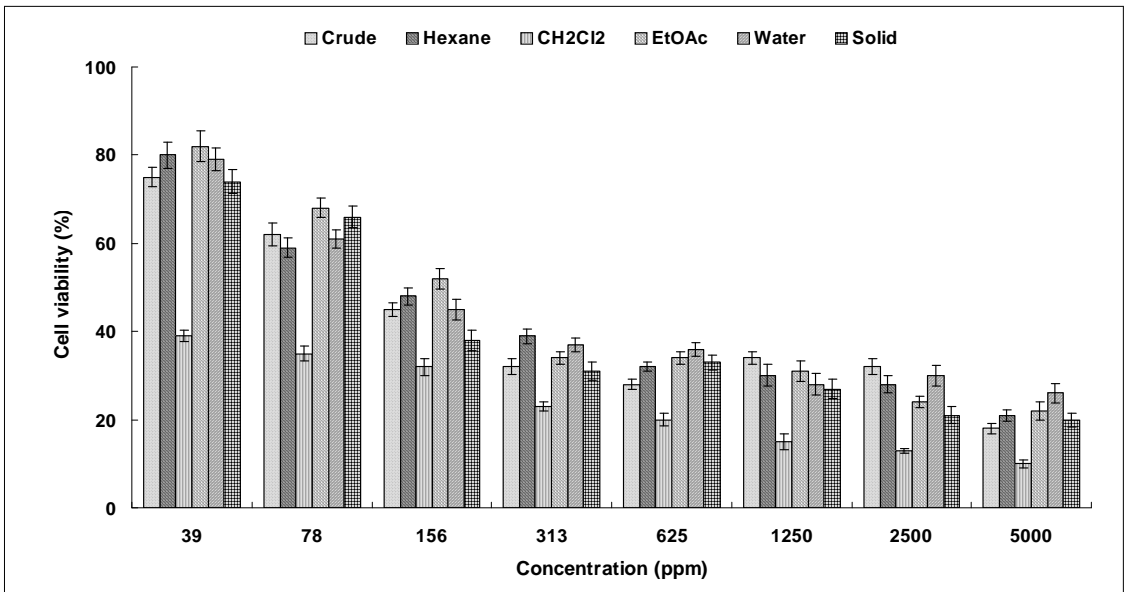


Fig. 16. 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 세포증식률.

2) 항산화활성 시험

가) 항산화활성 실험방법

본 실험에서의 항산화효과를 검토하기 위해 사용된 시약으로서 DPPH(1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, Sigma), SOD assay kit-WST (Dojindo), Ascorbic acid (Sigma), BHA (Wako), BHT (Wako)를 사용하였으며 이외 Linoleic acid, Ammonium thiocyanate, Barium chloride dihydrate, Ethanol (95%, v/v) 등은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 UV/Vis spectrophotometer(Shimatsu, Japan), Microplate reader(Bio-Rad 680, USA) 등을 사용하였다.

(1) DPPH radical 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 free radical 소거능 활성을 검정하기 위하여 UV-visible spectrophotometer (Libra S32)를 사용하여 항산화 시험을 실시하였다. 먼저 각각의 분획물들과 화합물들을 1000 ppm(5 mg/5 ml)의 농도로 만들고 methanol용액 4 ml가 들어있는 다섯 개의 시험관에 각각 0, 10, 20, 40, 80 μ l씩 넣은 다음 0.15 mM의 DPPH 1 ml를 섞은 후 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 양(μ g)을 검체의 농도(IC₅₀)로 나타내었다. 항산화력은 기존의 합성 항산화제인 BHT와 천연항산화제인 α -tocopherol과 비교하면서 각 화합물 및 분획물의 IC₅₀을 구하여 항산화력이 우수한 물질을 탐색하고자 하였다.

단리된 화합물들의 농도별 UV측정값을 나타내는 것으로 IC₅₀값은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$Y = AX + B$$

X=투여량

Y=흡광도값=(1/2)×(무첨가구의 값)

(2) 전자공여능 측정

각각의 분획물들과 화합물들의 전자공여능 측정은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 각 추출물 당 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm의 농도별 시료용액 100 μl 에 5×10^{-4} M의 DPPH (1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 100 μl 를 넣고 1분간 교반한 후 25°C incubator에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 대조구로는 동일농도의 L-ascorbic acid를 사용하였으며 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다(Cho 등, 2003; Ratty 등, 1988).

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{S_{abs} - B_{abs}}{C_{abs}} \right) \times 100$$

S_{abs} : 시료용액 첨가구의 흡광도

B_{abs} : DPPH 대신 정제수를 사용한 시료용액 첨가구의 흡광도

C_{abs} : 시료용액 무첨가구의 흡광도

(3) SOD 유사활성능 측정

SOD 유사활성은 다음과 같이 실시하였다. 각 시료 당 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별 시료용액 20 μl 에 SOD assay kit-WST 내 WST working solution 200 μl 을 넣어 교반한 후 다시 Enzyme working solution 20 μl 를 넣어 혼합한 후 37°C incubator에서 20분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 대조구로는 동일 농도의 L-ascorbic acid를 사용하였으며 SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성(\%)} = \left(1 - \frac{S_{abs} - B_{abs}}{C_{abs}} \right) \times 100$$

S_{abs} : 시료용액 첨가구의 흡광도

B_{abs} : Working solution 대신 정제수를 사용한 시료용액 첨가구의 흡광도

C_{abs} : 시료용액 무첨가구의 흡광도

(4) 지방산 자동산화 억제 효과 측정

지방산의 자동산화를 억제하는 효과를 측정하기 위해 다음과 같이 실시하였다. Test tube에 10 mM linoleic acid를 3 ml 넣은 후 농도를 1%로 조정된 각 시료를 0.03 ml 넣고 혼합시키고 이를 40°C incubator에 7일간 반응시켰다(시료의 최종농도 100 ppm). 이로부터 20 μ l를 취하여 microtube에 옮긴 후 95% Ethanol 0.94 ml를 넣고 혼합하고 다시 30% 시오시안산 암모늄 용액 20 μ l, 염화제일철시약 용액 20 μ l를 순차적으로 넣은 뒤 상온에서 3분간 반응시켰다. 반응액으로부터 1 ml씩 취하여 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 대조구는 동일 농도의 BHA 및 BHT를 사용하였으며 지방산 자동산화 억제 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

(5) 과산화물에 의한 세포 손상 억제 효과 측정

과산화물에 의한 CCD-986sk (Human skin dermal fibroblast)의 손상을 억제하는 효과를 측정하기 위해 다음과 같이 실시하였다. 즉, CCD-986sk(Human dermal skin fibroblast)을 10% FBS-MEME에 배양한 후 이를 취하여 세포농도를 2.0×10^5 cell/ml로 조정된 세포액을 조제한 후 이를 96 well-plate에 200 μ l씩 분주하고 이를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다.

24시간 배양 후 배지를 제거한 후 1.5 mM H₂O₂ solution in Earle' solution (0.12 M NaCl, 5 mM KCl, 0.83 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5.5 mM glucose, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 26.2 mM NaHCO₃ in D.W)로 조제한 농도별 각각의 추출물 분획물과 화합물 200 μ l을 다시 첨가하여 동일 조건에서 90분간 반응시켰다. 이 때 Earle' solution만을 사용하여 제조한 실험구를 대조구로 사용하였다.

90분간 반응한 후 배지 및 용액을 제거하고 50 μ g/ml neutral red (in 10% FBS-MEME)를 200 μ l씩 넣은 후 37°C incubator에서 2시간 반응시켰다. Neutral red 용액을 제거한 후 1% CaCl₂, 1% Formaldehyde(in D.W) 용액을 100 μ l씩 넣고 1분간 교반시킨 후 용액을 제거하고 이에 1% Acetic acid, 50% EtOH (in D.W)을 다시 100 μ l씩 넣고 15분간 교반시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) 항산화활성 결과

(1) DPPH radical 소거능

유해산소에 의해 피부세포의 산화 및 여러 질병을 발생시키는 라디칼 소거활성을 갖는 항산화 성분을 분석한 결과 Table 1과 같이 느릅나무 수피 추출물은 전체 분획물이 우수한 활성을 나타내었으며, 특히 에틸아세테이트용성과 수용성은 IC_{50} 값이 $11.9 \mu g$ 와 $12.2 \mu g$ 로 대조구보다 우수한 활성을 나타내었다. 이는 에틸아세테이트용성과 수용성 분획에 flavan-3-ol계 화합물들이 다량 함유되어 있어 항산화 효능이 우수한 것으로 생각된다. 신갈나무 겨우살이 추출물 분획의 경우 항산화활성은 높지 않게 나타났다. 또한, Table 2의 단리된 화합물의 경우 (+)-catechin의 IC_{50} 값은 대조구보다 적은 $11.6 \mu g$ 으로 추출물 분획과 화합물 중 가장 높은 항산화 효능을 보였으며, (+)-catechin-7-O-apiofuranoside와 (+)-catechin-7-O-xylopyranoside 및 procyanidin B-3의 경우 대조구인 α -tocopherol과 유사한 항산화 효능이 나타낸 반면 신갈나무 겨우살이 수용성에 분리한 homoflavoyadorinin B는 항산화 효능이 나타내지 않았다.

Table 1. 느릅나무 수피와 신갈나무 겨우살이 추출물 분획의 항산화활성 IC₅₀ 값

Concentration		IC ₅₀ (μg)
Fraction		
<i>Ulmus davidiana</i> Bark	Hexane soluble fraction	19.5
	CH ₂ Cl ₂ soluble fraction	23.1
	EtOAc soluble fraction	11.9
	H ₂ O soluble fraction	12.2
	Crude	15.5
	Solid state	17.9
<i>Viscum album</i> (in <i>Q. mongolica</i>)	Solid state	141.1
	EtOAc soluble fraction	75.4
	H ₂ O soluble fraction	396.6
	Crude	-
Control	BHT	14.0
	α-tocopherol	12.0

Table 2. 단리화합물의 항산화활성 IC₅₀ 값

Concentration		IC ₅₀ (μg)
Compounds		
Isolated compounds	(+)-catechin (1)	12.6
	(+)-catechin-7-O-apiofuranoside (2)	14.3
	(+)-catechin-7-O-xylopyranoside (3)	15.7
	Procyanidin B-3 (4)	14.5
	Homoflavoyadorinin B (5)	111.4
Control	BHT	14.0
	α-tocopherol	12.0

(2) 전자공여능

수소공여능 측정에 사용되는 DPPH는 안정한 형태로 존재하는 free radical로서 그것의 비공유전자로 인하여 전자 또는 수소를 받으면 흡광도가 감소한다. 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거활성이 있다고 기대할 수 있으며, 인체 내에서 활성라디칼에 의한 노화를 억제하

는 척도로도 이용할 수 있다. 느릅나무 추출물의 전자공여능 측정결과 Fig. 17과 같이 50 ppm과 100 ppm의 농도에서는 대조구인 L-ascorbic acid에 미치지 못하였으며, 250 ppm의 농도에서는 조추출물과 수용성 분획물, 고형물이 ascorbic acid와 유사한 결과를 나타내어 약 70~80 %의 전자공여능을 나타내었다. 느릅나무 수피로부터 단리 한 화합물들의 전자공여능은 Fig. 18에서와 같이 (+)-catechin의 경우 10 ppm의 저농도일때 대조구인 L-ascorbic acid보다 높은 전자공여능을 보였으며 100 ppm의 경우 (+)-catechin과 procyanidin B-3의 경우 대조구와 유사한 전자공여능을 보여 항산화활성이 우수한 것으로 나타났다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 경우 250 ppm의 농도에서 전자공여능을 측정하였다. Fig. 19와 Fig. 20에서와 같이 신갈나무 겨우살이의 에틸아세테이트용성 분획물과 점액질(당단백질, viscous extract) 부분의 전자공여능이 높게 나타났으며 특히, 점액질의 경우 양성대조물질로 사용한 ascorbic acid 보다 높은 79%의 전자공여능을 나타내었다. 밤나무 겨우살이 추출물 분획들은 전자공여능이 40% 미만으로 항산화활성을 보이지 않았으나 그 중 에틸아세테이트용성 분획물이 37%의 전자공여능을 나타냈다.

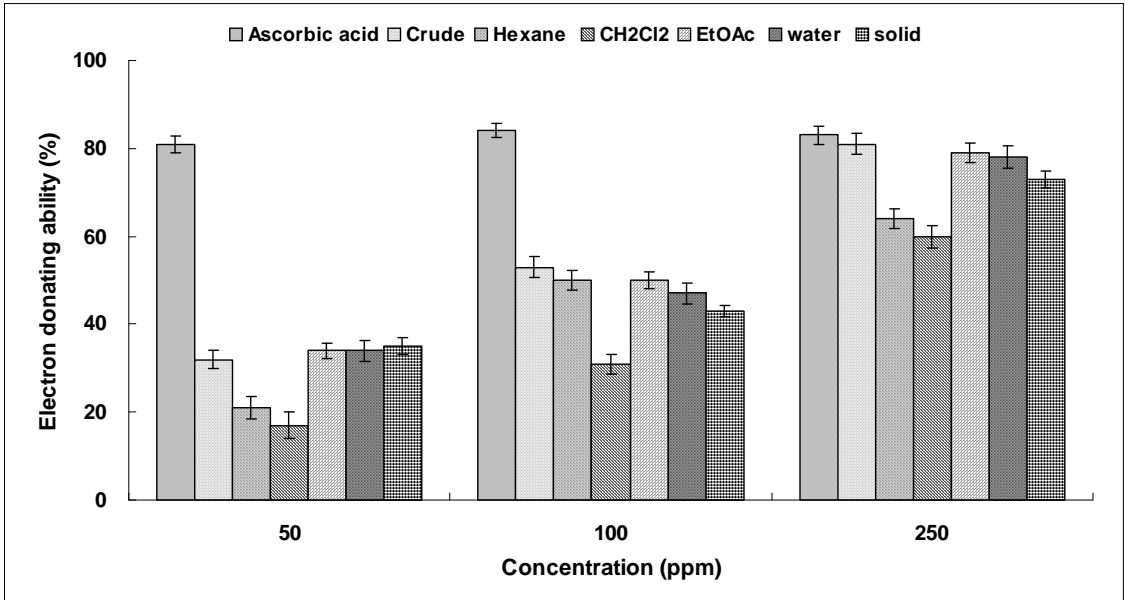


Fig. 17. 느릅나무 수피 추출물 분획들의 전자공여능.

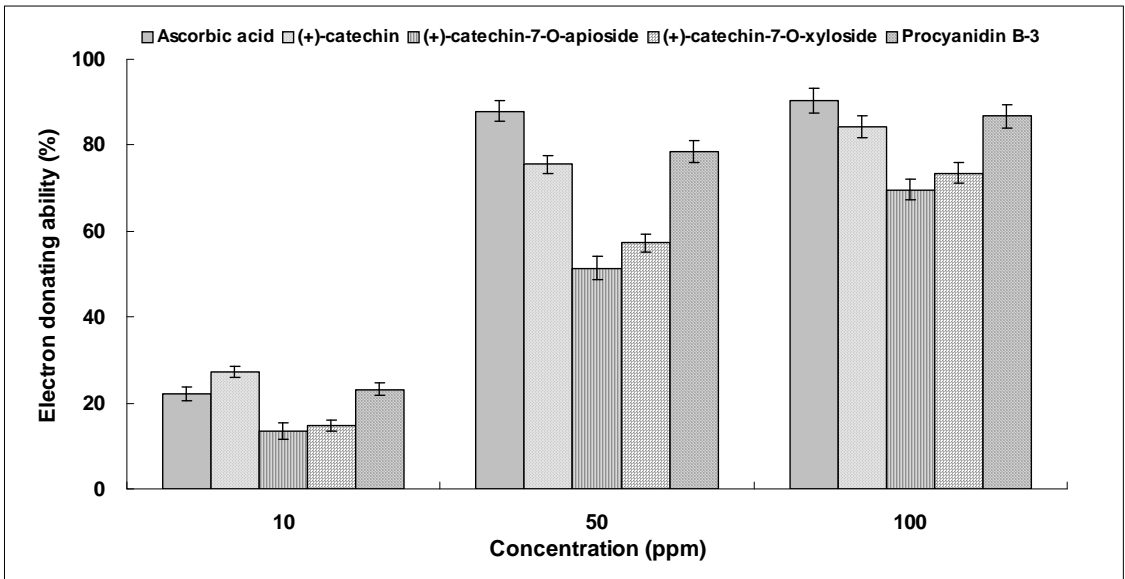


Fig. 18. 느릅나무 수피에서 분리된 화합물의 전자공여능.

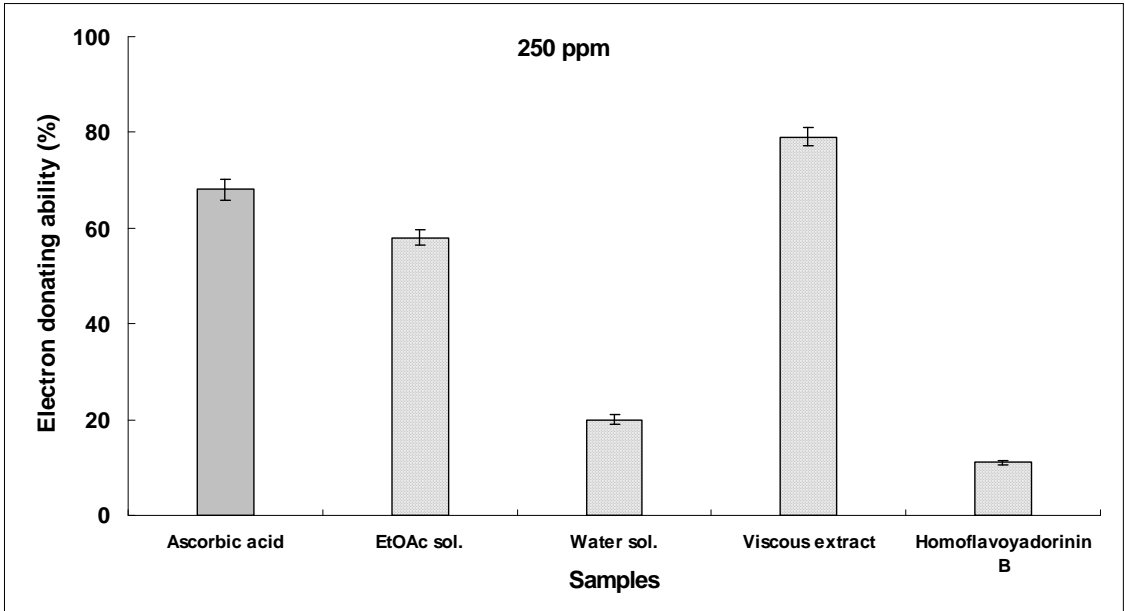


Fig. 19. 신갈나무 겨우살이 추출물 분획과 homoflavoyadorinin B의 전자공여능.

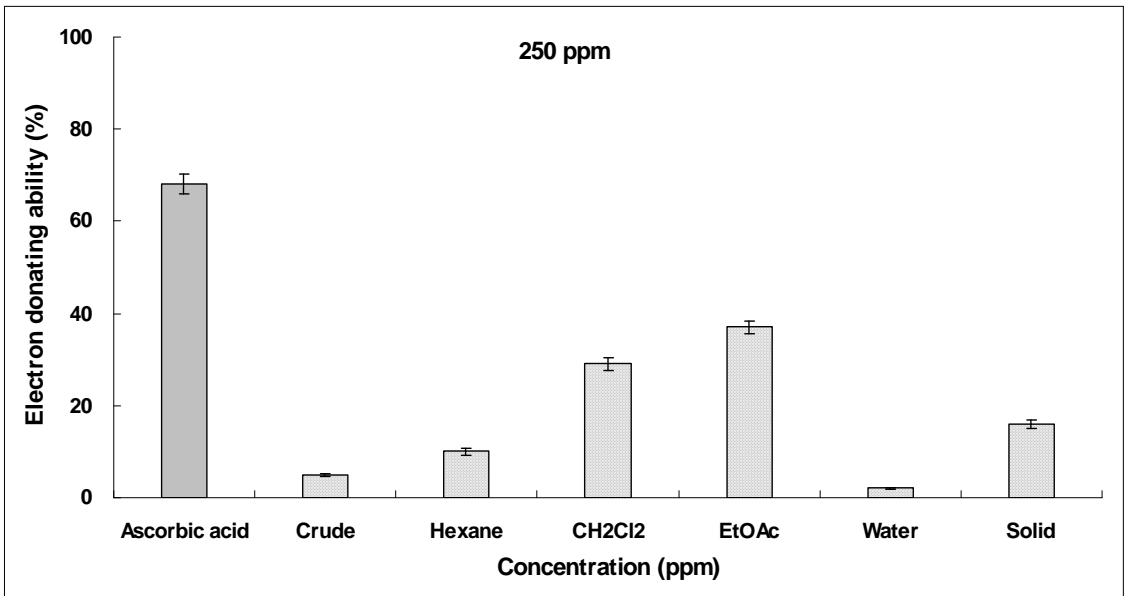


Fig. 20. 밤나무 겨우살이 추출물 분획들의 전자공여능.

(3) SOD 유사활성능

SOD는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical(O_2^-)과 반응하여 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 생성하는 효소로서, 산소를 이용하는 모든 생물체에 존재하여 생체 내에서 활성산소종에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. 체내의 산화적 손상으로부터 세포를 방어하는데 중요한 역할을 하는 SOD의 유사활성을 살펴본 결과 느릅나무 수피 추출물 분획은 Fig. 21과 같이 100 ppm에서 약 80~90%의 높은 유사활성을 나타내었으며 동일 농도(100 ppm)의 양성대조구인 L-ascorbic acid의 유사활성인 20%에 비하여 약 4~4.5배의 효능을 나타내었고 250 ppm의 농도에서도 역시 ascorbic acid의 유사활성인 60%보다 높은 90% 이상의 활성을 나타내어 SOD유사활성이 우수한 것을 알 수 있었다.

겨우살이 추출물의 경우 Fig. 22, 23과 같이 250 ppm에서 신갈나무 에틸아세테이트용성 분획물, 신갈나무 점액질, 밤나무 메틸렌클로라이드용성 및 에틸아세테이트 용성분획물에서 L-ascorbic acid(58.4%)보다 높은 68.7%, 71.4%, 68.6%, 81.2%의 free radical 소거능을 나타내었다. 특히 신갈나무 점액질 같은 경우, 서로 다른 항산화 mechanisms를 가진 DPPH와 SOD assay 모두에서 높은 항산화 효과를 나타내었다.

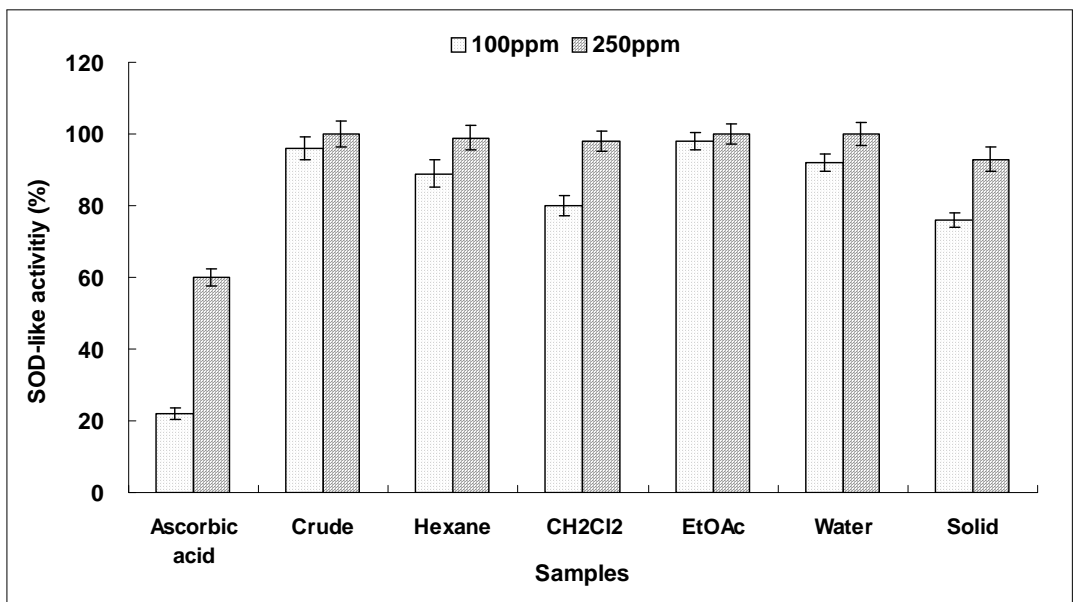


Fig. 21. 느릅나무 수피 추출물 분획의 SOD 유사활성능.

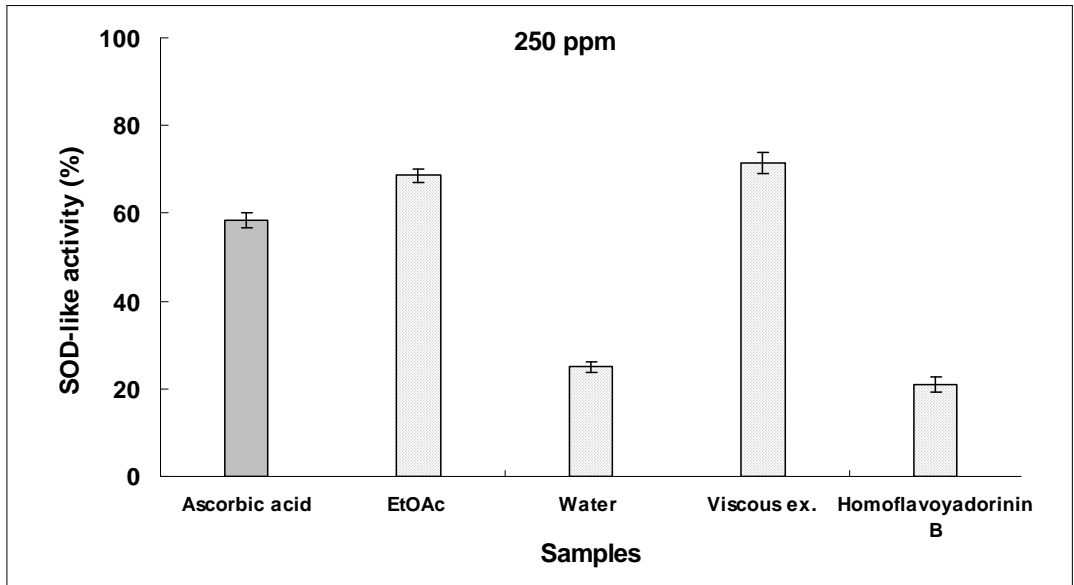


Fig. 22. 신갈나무 겨우살이 추출물 분획과 homoflavoyadorinin B의 SOD 유사활성능.

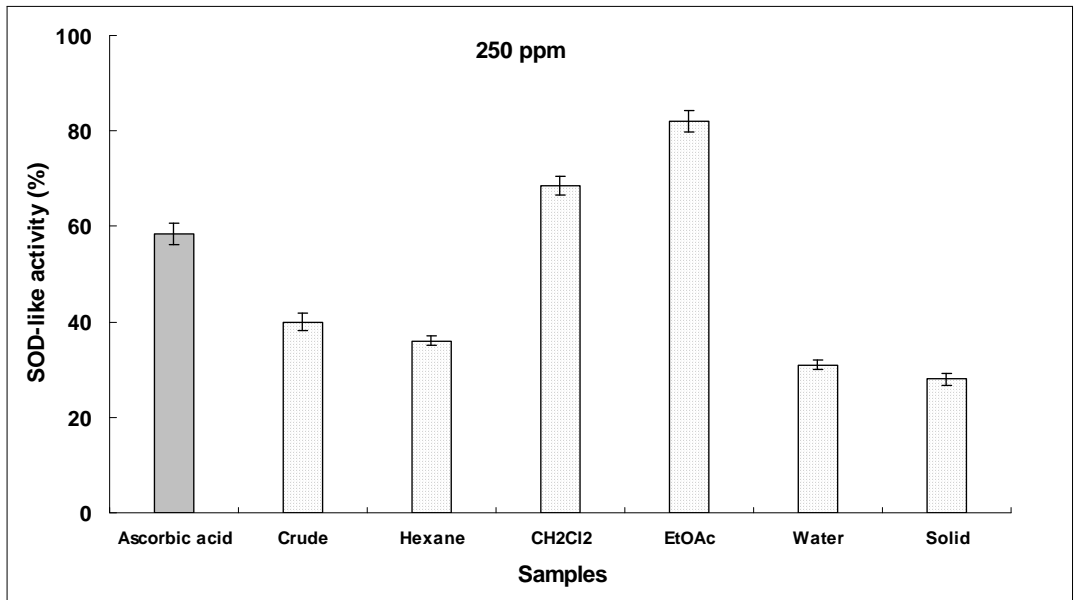


Fig. 23. 밤나무 겨우살이 추출물 분획들의 SOD 유사활성능.

(4) 지방산 자동산화 억제 효과

지방산 산화는 자유 라디칼과 과산화물질에 의해 촉매된다. 과산화물질은 식품의 변패 뿐 아니라 생체막의 산화도 촉진 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 과산화물의 생성억제에 효과적인 것으로 알려진 것은 vitamin E, C같은 항산화제이다.

피부 membrane의 구성성분인 지방산의 산화 손상을 억제하는 효과를 측정한 결과는 Fig. 24와 같다. 느릅나무 수피의 조추출물과 수용성 및 에틸아세테이트용성 분획물이 100 ppm의 농도에서 약 60% 내외의 억제효과를 나타내었으며 이는 동일 농도의 BHT가 나타낸 약 95%의 활성보다는 낮으나 역시 동일 농도에서 측정된 BHA의 활성인 약 30%보다는 높은 억제효과를 나타내어 합성물질인 BHA와 BHT의 대체효과를 가질 수 있으리라 판단되었다.

겨우살이 추출 분획 시료의 과산화물의 생성 억제 정도를 측정한 결과, Fig. 25, 26과 같이 신갈나무 점액질, 밤나무 고형물, 밤나무 메틸렌클로라이드용성 분획물, 밤나무 헥산용성 분획물의 경우는 양성대조물질인, α -tocopherol, BHA보다 우수한 77.0%, 95.7%, 80.2%, 95.9%의 억제효과를 나타내었다. 특히 신갈나무 점액질 시료의 경우, DPPH, SOD assay, 지질산패 실험 모두에서 양성물질군보다 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

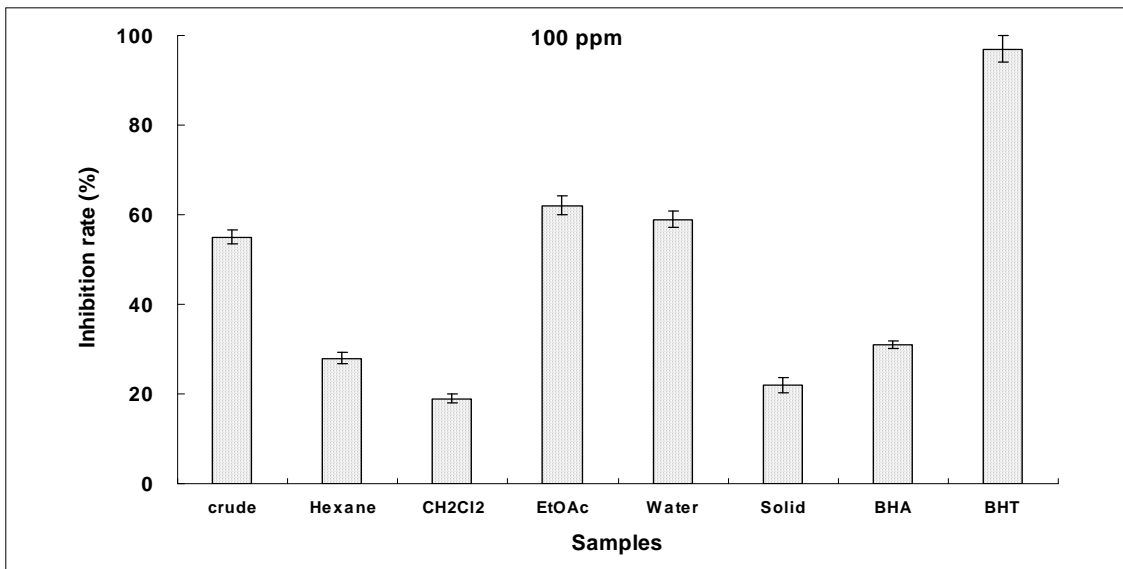


Fig. 24. 느릅나무 수피 추출물 분획의 지방산 자동산화 억제율.

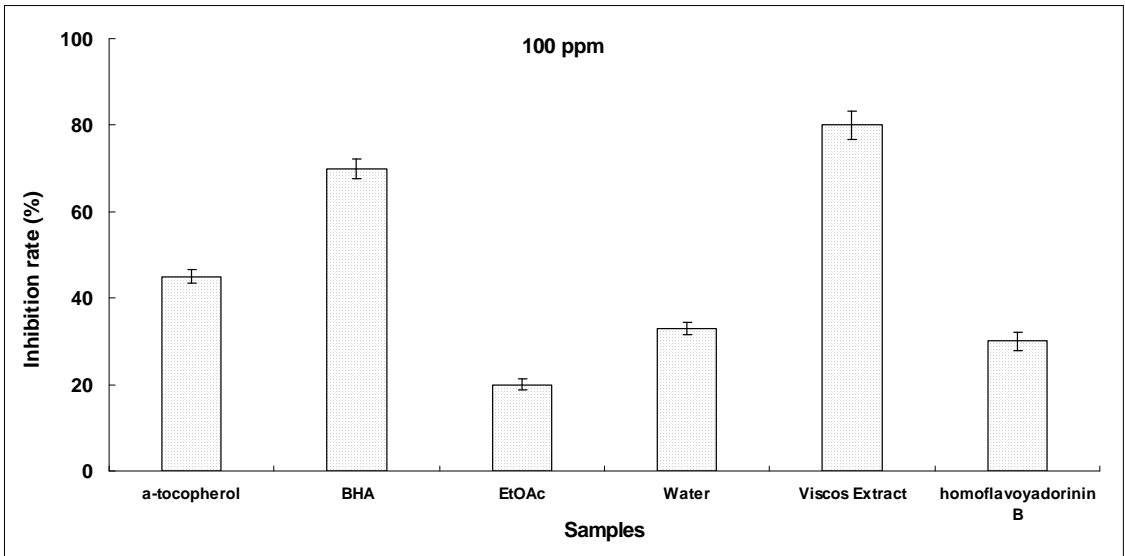


Fig. 25. 신갈나무 겨우살이 추출물 분획과 homoflavoyadorinin B의 지방산 자동산화 억제율.

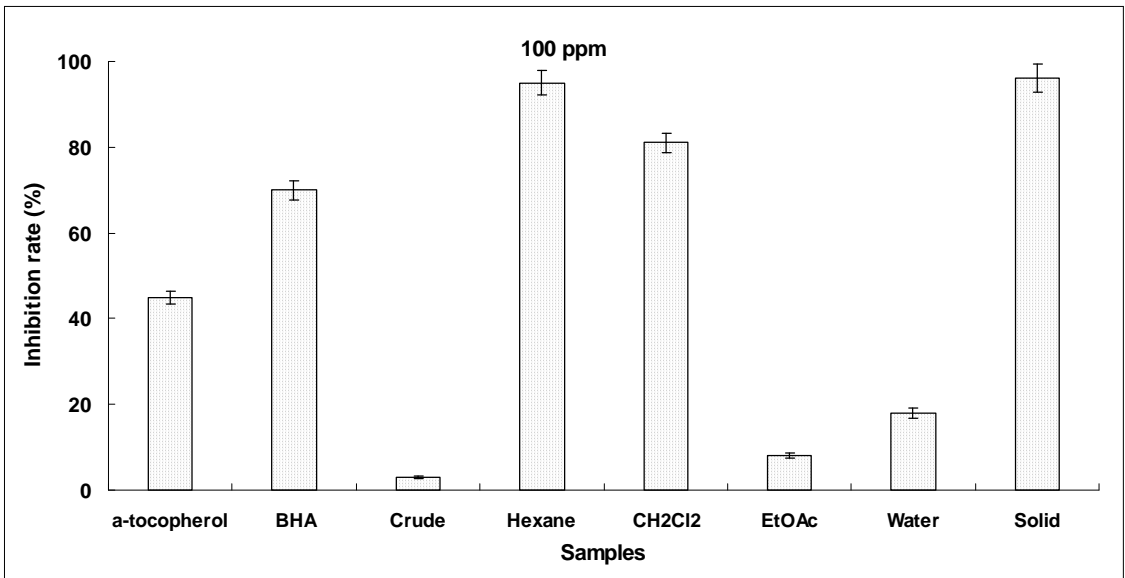


Fig. 26. 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 지방산 자동산화 억제율.

(5) 과산화물에 의한 세포 손상 억제 효과

세포의 산화 및 노화에 영향을 주는 과산화물을 피부 세포에 적용한 뒤, 이로 인해 나타나는 세포 손상을 억제시키는가를 측정하였다. Fig. 27에서와 같이 느릅나무 수피로부터 추출물 분획물 중 수용성 분획물이 100 ppm에서 과산화물 적용 blank와 비교시 약 40% 정도 높은 세포 증식율을 나타내어 과산화물로부터의 세포 손상을 억제하는 결과를 보였으나 비교구인 ascorbic acid가 나타내는 효과와는 큰 차를 나타내었다.

세포에 높은 독성을 보이는 시료를 제외한 homoflavoyadorinin B, 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물 및 밤나무 겨우살이 조추출물, 핵산용성 분획물, 에틸아세테이트용성 분획물, 수용성 분획물 및 고형분 시료를 세포에 독성을 나타내지 않는 78 ppm정도 농도로 세포에 대한 항산화 실험을 진행하였다. 먼저, 세포에 H₂O₂로 oxidative stress를 유도하고, 각각의 겨우살이 추출물을 첨가하였을 때, oxidative stress를 감소하여 세포 proliferation을 향상시키는 정도를 비교한 결과, 일차적으로 세포는 H₂O₂에 의한 oxidative stress에 의해서 45% 정도 세포 proliferation이 감소하는 경향을 보였으며, 겨우살이 추출물을 첨가하지 않은 처리구(H₂O₂만 처리)와 세포 proliferation을 비교한 결과, 밤나무 겨우살이 고형분, 핵산용성 분획물, 에틸아세테이트용성 분획물 처리구에서는 세포 proliferation 향상효과가 없었으며, 밤나무 겨우살이 조추출물, 수용성 분획물, homoflavoyadorinin B 및 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물에서는 각각 27%, 24%, 34%, 41%의 세포 proliferation 향상효과가 있었다(Fig. 28).

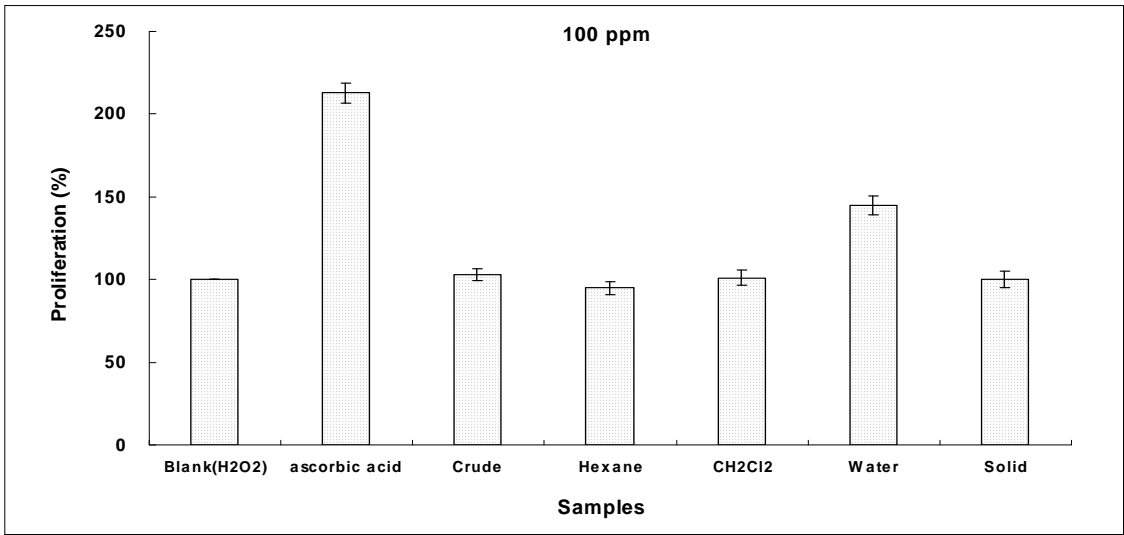
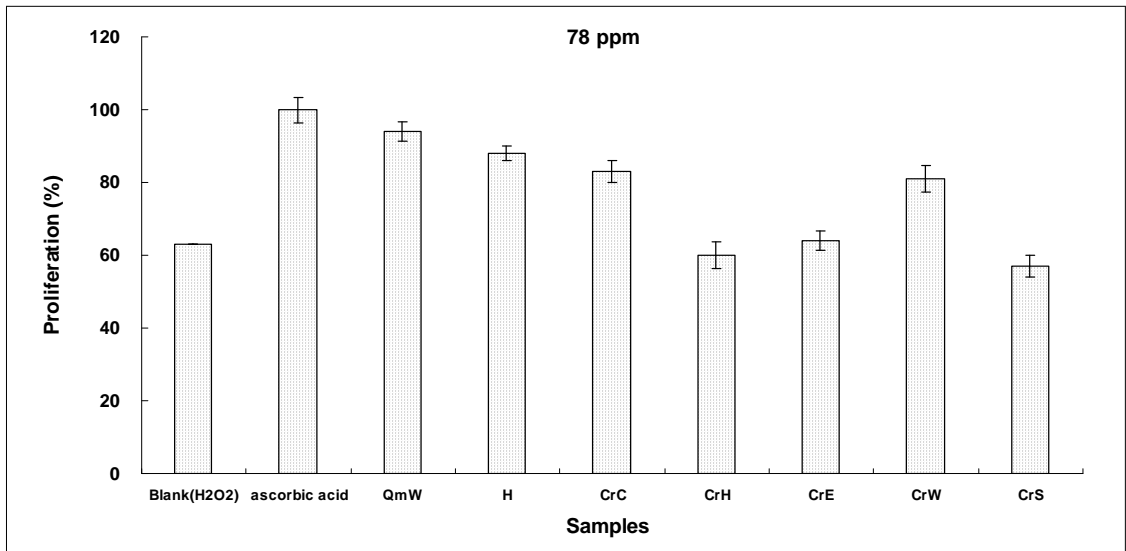


Fig. 27. 느릅나무 수피 추출물 분획물 처리 시 과산화물(H₂O₂)에 의한 손상 된 세포의 증식율.



(QmW : *Q. mongolica* Water Sol., H : homoflavoyadorinin B, CrC : *C. crenata* Crude, CrH : *C. crenata* Hexane Sol., CrE : *C. crenata* EtOAc Sol., CrW : *C. crenata* Water Sol., CrS : *C. crenata* Solid)

Fig. 28. 신갈나무 겨우살이와 밤나무 겨우살이 추출물 분획 처리 시 과산화물(H₂O₂)에 의한 손상 된 세포의 증식율.

3) 추출물 분획의 미백활성 시험

미백활성 시험은 Tyrosinase 및 Tyrosine, Arbutin, Theophylline은 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였으며, B16F10 멜라노마 배양을 위한 배지로서 0.2% Antibiotic-Antimycotic & 10% FBS-MEME를 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기로는 CO₂ incubator(Sanyo, Japan), 도립현미경(Leica DMI 4000B, German), Waterbath(Taitec, Japan), 원심분리기(ALC, Italy), Clean bench(Jeio tech, Korea), Microplate reader(Bio-Rad 680, USA) 등이 사용되었다.

가) 세포독성 시험

(1) 세포 배양

본 실험에 이용한 B16F10 (mouse melanoma)는 Korean Cell Line Bank(KCLB 80008)로부터 구입하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 Antibiotic-Antimycotic을 0.2%를 첨가한 MEME 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다.

(2) 세포 독성 실험

느릅나무 수피, 신갈나무 겨우살이 및 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 B16F10에 대한 세포독성 측정은 neutral red assay를 실시하였다. 즉, B16F10 (mouse melanoma)을 10% FBS-MEME에 배양한 후 이를 취하여 세포농도를 5×10^4 cell/ml로 조정된 세포액을 조제한 후 이를 96 well-plate에 200 μ l씩 분주하고 이를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 24시간 배양 후 배지를 제거한 후 10% FBS-MEME로 조제한 200 μ g/ml 농도의 느릅나무 수피 분획추출물 100 μ l과 10% FBS-MEME 100 μ l를 다시 첨가하여 동일 조건에서 7일간 배양시켰다. 이 때 10% FBS-MEME만을 사용한 실험구를 대조구로 사용하였다.

7일간 배양한 후 배지 및 용액을 제거하고 50 μ g/ml neutral red (in 10%

FBS-MEME)를 200 μl 씩 넣은 후 37°C incubator에서 2시간 반응시켰다. Neutral red 용액을 제거한 후 1% CaCl_2 , 1% Formaldehyde (in D.W) 용액을 100 μl 씩 넣고 1분간 교반시킨 후 용액을 제거하고 이에 1% Acetic acid, 50% EtOH (in D.W)을 다시 100 μl 씩 넣고 15분간 교반시킨 후 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 결 과

B16F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 느릅나무 수피의 핵산용성 분획물, 메틸렌클로라이드용성 분획물 및 고형분이 최종 농도 100 ppm에서 세포 독성을 나타내어 B16F10 melanoma 세포 내 melanin 생합성 억제 실험에서는 제외시켰으며 따라서 느릅나무 수피 조추출물과 수용성 분획물만을 B16F10 melanoma cell 내 melanin 생합성 억제 실험에 적용하였고 핵산용성 분획물과 메틸렌클로라이드용성 분획물 및 고형분의 경우 tyrosinase 활성억제 실험을 실시하였다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 경우 100 ppm의 농도에서 신갈나무 겨우살이에서 분리한 homoflavoyadorinin B, 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물 및 밤나무 겨우살이 조추출물, 핵산용성 분획물, 에틸아세테이트용성 분획물, 수용성 분획물 및 고형분은 세포독성을 나타내지 않았다.

나) 미백활성 시험

(1) B16F10 mouse melanoma 내 melanin 생합성 억제 실험

마우스 유래 B16F10 melanoma 내 melanin 생합성을 억제하는 효과를 측정하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. B16F10 (melanoma)을 10% FBS-MEME에 배양한 후 이를 취하여 세포농도를 $5.0 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ 로 조정된 세포액을 조제한 후 이를 지름 60 mm의 plate에 5 ml씩 분주하고 이를 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양시켰다. 24시간 배양 후 배지를 제거한 후 10% FBS-MEME로 조제한 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 시료 1 ml과 5% Theophylline (0.05 M) in 10% FBS-MEME 4 ml를 다시 첨가하여 동일 조건에서 72시간 배양시켰다. 이 때 10% FBS-MEME만을 사용한 실험구를 대조구로 사용하였으며 양성대조구는 동일 농도의 arbutin을 사용하였다.

72시간 배양한 후 각 plate 내의 용액 내 melanin 생성량을 측정하기 위하여 용액을 1 ml씩 microtube에 옮기고 이를 200 μ l씩 취하여 96 well plate에 분주한 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 세포 내 melanin 생성량을 측정하기 위하여 우선 plate 내 나머지 배지를 제거하고 1×PBS(-)로 1회 세척하였다. 다시 0.85 N KOH용액을 0.5 ml씩 넣은 후 30분~1시간가량 반응시켜 세포 내 melanin을 취하여 microtube에 옮기고 다시 1×PBS(-) 0.5 ml을 넣고 잔량의 melanin을 취하여 혼합한 뒤 역시 이로부터 200 μ l씩 취하여 96 well plate에 옮겨 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등(1986)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응구는 96 well plate 내 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 110 μ l에 1.5 mM L-Tyrosine 용액(in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5) 40 μ l 및 농도별 시료용액 10 μ l을 넣은 후 mushroom tyrosinase (2000 unit/ml) 10 μ l을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정하였다(Yoo 등, 2005). 또한, 시험결과와의 비교를 위해 양성대조구로 동일 농도의 Arbutin을 사용하였다.

3) 미백활성 결과

(1) B16F10 mouse melanoma 내 melanin 생합성 억제

느릅나무 수피 추출물중 세포독성을 나타나지 않은 조추출물과 수용성 분획물에 대한 melanin 생합성을 억제하는 효과에 대하여 대조구와 유의차를 나타내지 않아 효과를 확인할 수 없었다. 양성대조구의 arbutin (100 ppm의 농도에서 40%의 저해율)과 비교하였을 경우 현저한 효과의 차이를 확인할 수 있었다. 따라서 피부 미백에는 그다지 좋은 효과를 나타내지 않음을 알 수 있었다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획 7개 시료를 100 ppm으로 멜라닌 생성 억제 실험을 진행하였다. 세포내부의 생성된 멜라닌 양을 측정한 결과, 양성대조물질인

arbutin보다 우수한 효과를 보이는 시료가 없었으며, 외부로 분비된 멜라닌의 양을 측정된 결과 역시, 양성대조물질인 arbutin보다 우수한 효과를 보이는 시료가 없었다.

(2) Tyrosinase 저해활성

느릅나무 수피 추출물 중 헥산용성 분획물과 메틸렌클로라이드용성 분획물 및 고형분에 대한 mushroom tyrosinase의 활성 저해를 확인해 본 결과 대조구와 유의차를 나타내지 않아 활성 억제 효과가 없음을 확인하였다. 그러나 양성대조구로 사용된 arbutin은 100 ppm에서 90%의 억제율을 나타내었다.

겨우살이 추출물에 대한 tyrosinase 활성억제 실험에는 신갈나무 겨우살이에서 분리한 homoflavoyadorinin B, 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물 및 밤나무 겨우살이 조추출물, 헥산용성 분획물, 에틸아세테이트용성 분획물, 수용성 분획물 및 고형분을 100 ppm의 농도로 실험을 진행하였으며 양성대조물질인 arbutin 역시 100 ppm으로 동일하게 실험을 진행하였다. Tyrosinase 활성억제 효과를 측정된 결과, 밤나무 겨우살이 에틸아세테이트용성 분획물이 tyrosinase 활성을 억제하는 효과를 보였으나 양성대조구인 arbutin과 비교해 볼 때 효과가 미약하였다. 기타 시료들은 tyrosinase 활성억제 효과가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획들은 미백에 도움을 주는 활성을 갖지 못한 것으로 판단되었다.

4) 단리 화합물의 미백활성 시험

본 실험에 이용한 B16F10 mouse melanoma는 Korean Cell Line Bank(KCLB 80008)로부터 구입하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 1×Antibiotic-Antimycotic로 조제한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하여 사용하였다.

가) 미백활성 시험

(1) B16F10 melanoma를 이용한 melanin 생합성 억제 효과 측정 및 세포독성 실험

느릅나무 수피에서 분리한 화합물의 B16F10에 대한 melanin 생합성 억제 효과 및 세포독성은 MTT assay로 측정하였다. B16F10 (mouse 유래 melanoma)을 10% FBS-DMEM에 배양한 후 이를 취하여 세포농도를 2×10^4 cells/ml로 조정된 세포액을 조제한 후 이를 12 well plate 각 2 plates에 1 ml씩 분주하고 이를 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 24시간 배양 후 배지를 제거한 후 10% FBS-DMEM로 조제한 1000 µg/ml 농도의 느릅나무 수피 분리 단일물질 100 µl과 0.34 µg/ml α-MSH in 10% FBS-DMEM 900 µl를 다시 첨가하여 동일 조건에서 96시간 배양시켰다. 이 때 10% FBS-DMEM만을 사용한 실험구를 대조구, 동일 농도의 arbutin을 양성대조구로 사용하였다. 또한 동일 조건으로 나머지 한 개의 plate에 적용하여 세포 독성 측정용으로 배양을 진행하였다.

배양 완료 3시간 전 첫 번째 plate를 꺼내어 5 mg/ml MTT solution을 20 µl씩 각 well에 넣은 후 완료시까지 다시 배양시켰다. MTT solution이 첨가된 plate은 완료 후 배양액을 제거하고 1 ml DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 5분간 가볍게 흔들어 준 뒤 96 well plate로 200 µl씩 옮기어 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배지 및 용액을 제거하고 50 µg/ml neutral red (in 10% FBS-MEME)를 200 µl씩 넣은 후 37°C incubator에서 2시간 반응시켰다. Neutral red 용액을 제거한 후 1% CaCl₂, 1% Formaldehyde (in D.W) 용액을 100 µl씩 넣고 1분간 교반시킨 후 용액을 제거하고 이에 1% Acetic acid, 50% EtOH (in D.W)을 다시 100 µl씩 넣고 15분간 교반시킨 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 나머지 한 개의 plate

는 B16F10 mouse melanoma 내 melanin 생합성 억제 효과를 측정하기 위해 96시간 배양 완료 후, 1×PBS(-)로 1회 세척한 뒤 0.25% Trypsin +0.02% EDTA solution을 100 μ l씩 처리한 후 5분간 반응시키고 10% FBS-DMEM 0.5 ml을 넣어 1.7 ml microtube에 회수한 뒤 다시 한 번 FBS-DMEM 0.5 ml을 넣어 완전히 회수하도록 하였다. 회수된 microtube를 3000 rpm \times 30 m 조건으로 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 1N NaOH 0.2 ml을 넣어 1 시간동안 sonicator를 이용하여 용해시켰다. 이를 다시 96well plate에 옮긴 뒤 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Tyrosinase 저해활성 측정

앞서 설명한 tyrosinase 저해활성과 동일한 방법으로 수행하였다.

나) 미백활성 결과

(1) B16F10 melanoma를 이용한 melanin 생합성 억제 및 세포독성

B16F10 mouse melanoma에 대한 세포 독성을 측정한 결과, Fig. 29에서와 같이 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apioside, (+)-catechin-7-O-xyloside 및 procyanidin B-3 모두 적용 농도인 100 ppm에서 세포 독성을 나타내지 않았다. 따라서, 동일 조건으로 진행한 나머지 plate를 이용하여 측정한 B16F10 melanoma내 melanin 생합성 억제 실험은 시료의 세포독성에 의한 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 Fig. 30에서와 같이 느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apioside, (+)-catechin-7-O-xyloside, procyanidin B-3 중 (+)-catechin의 경우, 양성대조구로 사용된 arbutin과 동일 농도인 100 ppm에서 유사한 melanin 생합성 억제 효과를 보였으며 또한, (+)-catechin-7-O-xyloside 역시 arbutin보다는 낮지만 일정부분의 melanin 생합성 억제 효과가 있다는 결과를 나타내었다. 따라서, melanin 생합성 억제 효과의 기작을 밝혀내기 위해 우선 tyrosinase 활성억제 작용이 있는지 실험을 실시하였다.

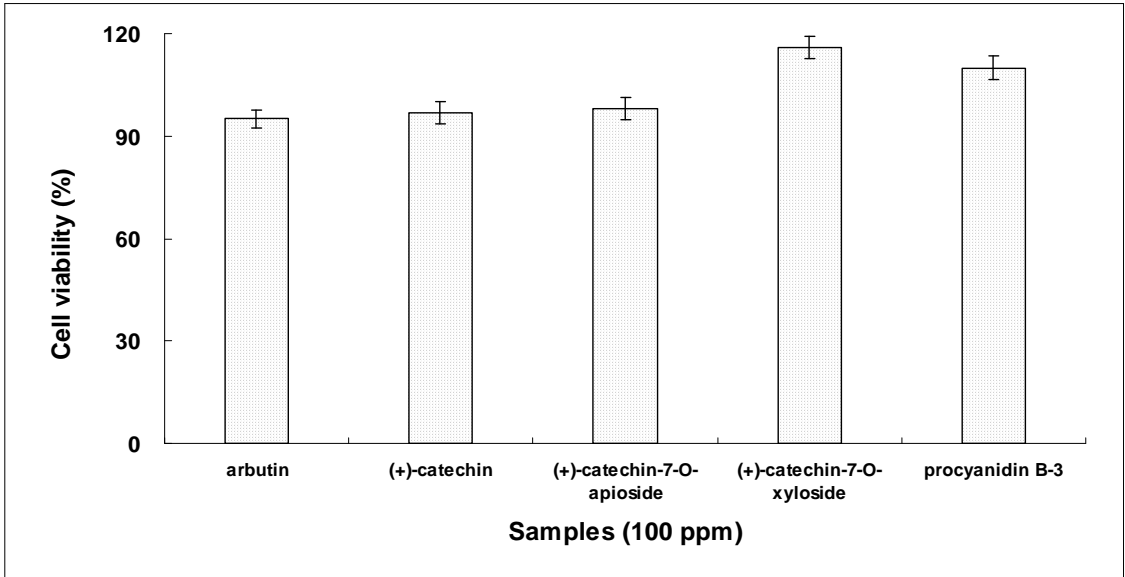


Fig. 29. 느릅나무 수피에서 분리한 화합물의 세포생존율.

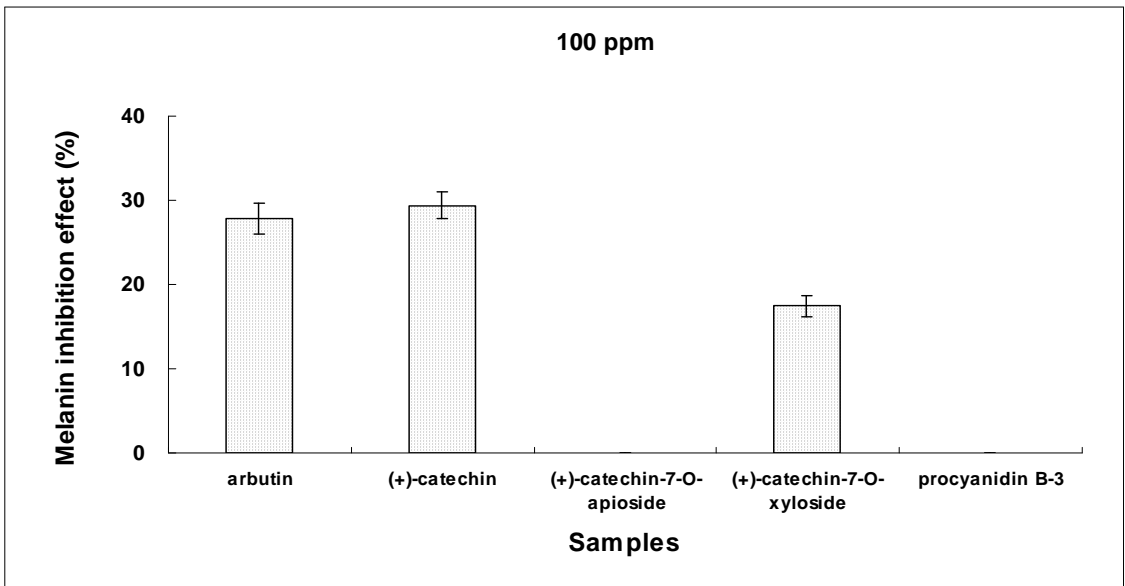


Fig. 30. 느릅나무 수피에서 분리한 화합물의 melanin 생합성 억제율.

(2) Tyrosinase 저해활성

느릅나무 수피 분리 단일물질인 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apioside, (+)-catechin-7-O-xyloside, procyanidin B-3에 대한 tyrosinase 활성 억제 효과를 측정할 결과 유효한 결과를 얻을 수 없었으며 따라서 (+)-catechin 및 (+)-catechin-7-O-xyloside에서 나타나는 melanin 생합성 억제 효과는 tyrosinase 억제에 의한 것이 아님을 알 수 있었으나 추후 tyrosinase 발현 및 발현에 관여하는 mRNA에 관한 연구는 진행하지 못하였다. 이 실험에서 양성대조구로 역시 사용되었던 arbutin은 100 ppm에서 재현성 있는 결과를 나타내었다.

5) 항균활성 시험

가) 항균활성 실험

10% DMSO에 stock되어 -70℃에 보관되어 있는 균주를 백금이를 이용하여 agar plate에 streaking하여 균주 활성화를 위해 37℃에서 48시간 배양한다. 생성된 colony 하나를 백금이를 이용하여 broth배지 (Sabouraud-2% Dextrose broth (Merck, Germany))에 접종하고 37℃에서 200 rpm으로 48시간동안 shaking incubator에서 전배양 하고, 멸균 면봉을 이용하여 균 현탁액을 충분히 흡수하게 한 후, tube 벽에 여액을 짜내고 agar plate에 균일하게 도말하여 준다.

Agar 배지 (Sabouraud-4% Dextrose agar (Merck, Germany))에 균을 도말하여 5분간 정치하고, 멸균된 8mm paper disk를 올려놓은 후, 단리된 화합물과 각각의 분획물들을 100% DMSO에 용해하여 0.05% 농도로 제조하여 disk에 50 μ l씩 loading한다. 10분간 정치하여 시료가 모두 배지에 확산되어 흡수된 후, 균의 성장 최적온도인 37℃에서 48시간동안 배양한 후 균의 생장억제환의 직경을 측정하였다.

나) 항균활성 결과

(1) 호기성 균주 6종에 대한 항균활성

느릅나무 수피의 추출물 분획들과 단리 화합물의 호기성 균주에 대한 항균활성을 평가하였다. Table 3은 성장 억제환을 측정된 결과로 느릅나무 고형분이 병원성 포도상 구균인 *S. aureus*에 19 mm의 성장 억제환을 보여 항균활성을 가장 우수하였으며, *S. epidermidis*(병원성 포도상 구균)는 화합물 3이 항균활성이 가장 높게 나타났다. 느릅나무 수피 추출물 분획들은 병원성 포도상 구균인 *S.aureus*와 *S. epidermidis*에 항균활성을 보이는 것으로 나타났다, *E. coli* (대장균)과 *P. aeruginosa* (녹농균)에 대하여는 항균활성이 없는 것으로 나타났다.

Table 3. 느릅나무 수피 추출물 분획과 단리 화합물의 호기성 균에 대한 성장 억제환

(growth inhibition zone : mm)

Samples	Germ	Gram (+) bacteria				Gram(-) bacteria	
		<i>B.cereus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Fractions	Crude extract	8.0	11.0	18.0	12.0	9.0	9.5
	Hexane sol. fr.	8.0	8.5	9.0	9.5	8.5	8.0
	CH ₂ Cl ₂ sol. fr.	8.5	10.0	12.0	12.0	8.0	8.0
	EtOAc sol. fr.	8.0	11.0	17.0	9.0	8.0	8.0
	H ₂ O sol. fr.	8.0	9.0	12.0	13.0	8.0	8.0
	Precipitate	9.5	11.0	19.0	10.0	8.0	10.0
Isolated compounds	Compound 1	8.0	8.5	8.0	9.0	8.0	8.0
	Compound 2	8.0	9.0	11.0	8.0	8.0	9.0
	Compound 3	8.0	8.0	8.0	17.0	8.0	8.0

(**Compound 1** : (+)-catechin, **Compound 2** : (+)-catechin-7-O-apioside, **Compound 3** : procyanidin B-3)

(2) 혐기성 균주 및 효모균의 항균 활성

느릅나무 수피의 추출물 분획들과 단리 화합물의 혐기성 균주와 효모균에 대한 항균활성을 평가하였다. Table 4에서와 같이 수용성 분획은 여드름균인 *P. acnes*에 대해 14 mm의 성장 억제환을 보여 항균력이 있는 것으로 나타났으며, 화합물 3도 항균활성을 나타냈다. 효모균인 *M. furfu* (비듬균)에 대하여 메틸렌클로라이드용성 분획이 23 mm의 성장 억제환을 보여 항균활성이 가장 우수 한 것으로 나타났으며, 조추출물, 에틸아세테이트용성, 고형분도 항균력을 나타냈다.

Table 4. 느릅나무 수피 추출물 분획과 단리 화합물의 혐기성 균과 효모 균에 대한 성장 억제환

(growth inhibition zone : mm)

Samples	Germ	Anaerobic bacteria			Yeast	
		<i>P.acnes</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>M.furfur</i>		
Fractions	Crude extract	11.0	9.0	14.0		
	Hexane sol. fr.	8.0	8.0	11.0		
	CH ₂ Cl ₂ sol. fr.	11.0	9.5	23.0		
	EtOAc sol. fr.	8.0	8.0	11.0		
	H ₂ O sol. fr.	14.0	9.0	13.0		
	Precipitate	8.0	8.5	12.0		
Isolated compounds	Compound 1	8.0	8.0	8.0		
	Compound 2	8.0	8.0	8.0		
	Compound 3	12.0	8.0	8.0		

(**Compound 1** : (+)-catechin, **Compound 2** : (+)-catechin-7-O-apioside, **Compound 3** : procyanidin B-3)

6) 주름개선 효과

주름개선효과 관련 실험으로서 Collagen assay kit는 Biocolor Ltd에서 구입하여 사용하였으며, Elastase (Type 3), N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 또한 Human Skin dermal Fibroblast 배양을 위한 시

약으로서 MEME (Minimum Essential Medium Eagle), Fetal bovine serum (Difco), Antibiotic-Antimycotic (10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate and 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B in 0.85% saline, Gibco), Trypsin 250 (Difco), Trypan blue solution (0.4%, Sigma), Neutral red (Sigma)를 사용하였으며 기타 CaCl_2 , Formaldehyde, Acetic acid 등은 특급시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기로는 CO_2 incubator(Sanyo, Japan), 도립현미경(Leica DMI 4000B, German), Waterbath(Taitec, Japan), 원심분리기(ALC, Italy), Clean bench(Jeio tech, Korea), Microplate reader(Bio-Rad 680, USA) 등이 사용되었다.

가) 주름개선효과 실험

(1) Elastase 활성 억제 효과 측정

Elastase 활성 저해실험은 사람의 백혈구 엘라스타제 대신 porcine pancreatic elastase(PPE)를 이용하여 억제율에 대한 시험을 하였다. PPE가 기질인 N-Succ-(Ala)3-p-nitroanilide를 분해하면 p-nitroaniline을 만드는데 이것이 노란색으로 발색하게 한다. 이 발색 정도를 흡광도로 측정하여 PPE 저해율을 계산하였다. 추출물에 대한 PPE 저해율을 측정하기 위하여 1 $\mu\text{g/assay}$ elastase in 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)과 농도별로 조제한 시료 20 μl , 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 10 μl 를 각각 96 well microplate에 넣은 뒤, 25°C, 15분간 pre-incubation 시킨 후 기질인 125 mM N-Succ-(Ala)3-p-nitroanilide 160 μl 을 투입하고 다시 37°C, 20분 반응시킨다. 이를 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Cho 등, 2000).

$$\text{PPE-inhibiting activity (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A : 저해제 무첨가군의 흡광도

B : 저해제 첨가군의 흡광도

(2) Collagen 생성 촉진 효과 측정

이 실험은 Human skin dermal fibroblast 활성화에 의하여 콜라겐 생성을 변화시켜 주름 개선효과가 있는지 여부를 확인하는 시험이다. 이 실험에서 사용된 Human skin dermal fibroblast CCD-986sk의 배양 방법은 느릅나무 수피 추출물의 세포 독성 측정 실험과 동일하게 진행되었으며 실험방법은 전배양된 fibroblast으로 1.5×10^5 cells/ml 세포액을 조제한 뒤 이를 35×10 mm의 plate에 2 ml씩 넣고 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 0.5% FBS-MEME 배지를 1 ml 넣고 미리 준비한 농도별 시료를 1 ml씩 넣은 후, 다시 CO₂ incubator(동일 조건)에서 24시간 배양한다. 배양이 끝나면 각각의 plate로부터 0.5 ml씩 취하여 microtube로 옮긴 뒤 Collagen assay kit (Biocolor Ltd) 내 DYE REAGENT를 1 ml씩 넣고 상온에서 30분간 vortex 처리하며 염색시킨다. 염색이 끝난 뒤, 원심분리(15,000 rpm, 30분)하고 상등액과 DYE REAGENT를 완전히 제거시킨다. 여기에 Collagen assay kit (Biocolor Ltd) 내 ALKALI REAGENT를 100 µl씩 넣은 후 상온에서 5분간 vortex 처리한다. 이를 96 well microplate로 옮기고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 콜라겐의 양은 collagen assay kit 내 standard collagen를 이용하여 흡광도 540 nm에서 값을 측정하여 합성된 콜라겐 양을 계산하였고, 그 값은 단백질 양으로 보정하였다(Kim 등, 2004).

나) 주름개선효과 결과

(1) Elastase 활성 억제 효과

느릅나무 수피 추출물 분획에 대한 각질층의 엘라스틴을 분해하는 효소인 엘라스타제 활성을 저해하는 효과 측정은 fibroblast에 대한 세포독성 측정 결과는 Fig. 31에 나타났다. 100 ppm 농도에서 느릅나무 수피 추출물 분획별 농도에 따른 엘라스타제 활성 저해능은 크게 유의차를 보이지 않으며 낮은 활성을 나타내었으며 고형물 분획추출물이 약 15% 정도의 효과를 나타내었다. 그러나 양성대조구로 사용된 ursolic acid나 oleanolic acid에 비해 낮은 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

느릅나무 수피에서 분리한 화합물에 대한 엘라스타제 활성을 저해하는 효과 측정은 두개의 농도(500 ppm, 50 ppm)로 실시하였으며 결과는 Fig. 32와 같다. 실험 결과 500 ppm 농도에서 procyanidin B-3을 제외하고는 크게 유의차를 보이지 않아 낮은 활성을 보이는 것으로 나타났다. Procyanidin B-3은 약 50%의 엘라스타제 저해효과를 나타냈으나 이 역시 양성대조구로 사용된 ursolic acid에 비해 낮은 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획에 대한 엘라스타제 활성 저해 효과는 100 ppm으로 실시하였으며 결과는 Fig. 33과 같다. 실험 결과 측정 농도인 100 ppm에서 신갈나무 겨우살이에서 분리한 화합물인 homoflavoyadorinin B만이 약 15%의 낮은 활성을 보였을 뿐 기타 시료에서는 엘라스타제 활성을 저해하지 못 하는 것으로 나타났다.

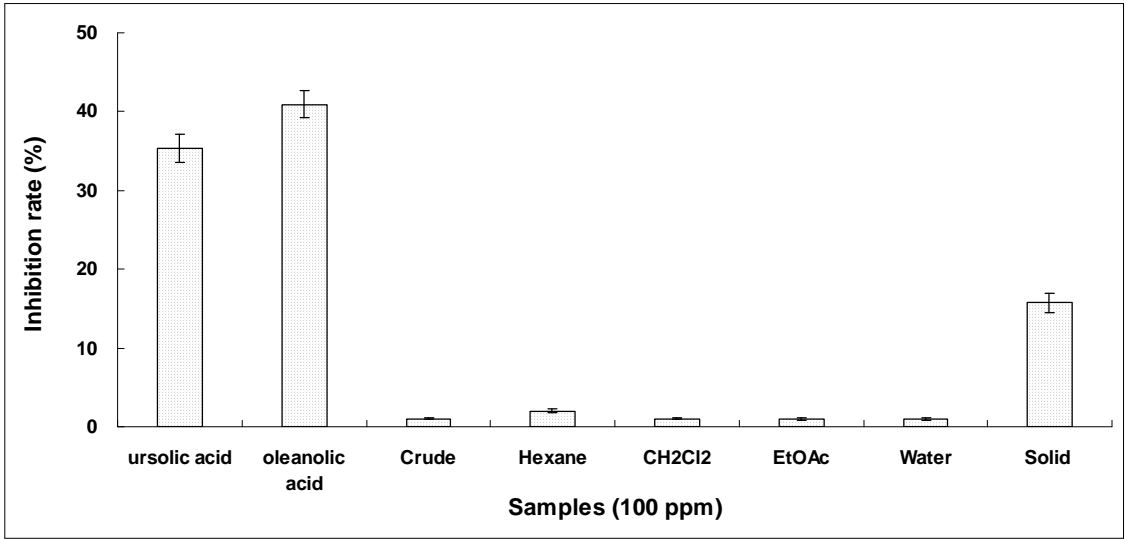


Fig. 31. 느릅나무 수피 추출물 분획들의 엘라스타제 생성 저해율.

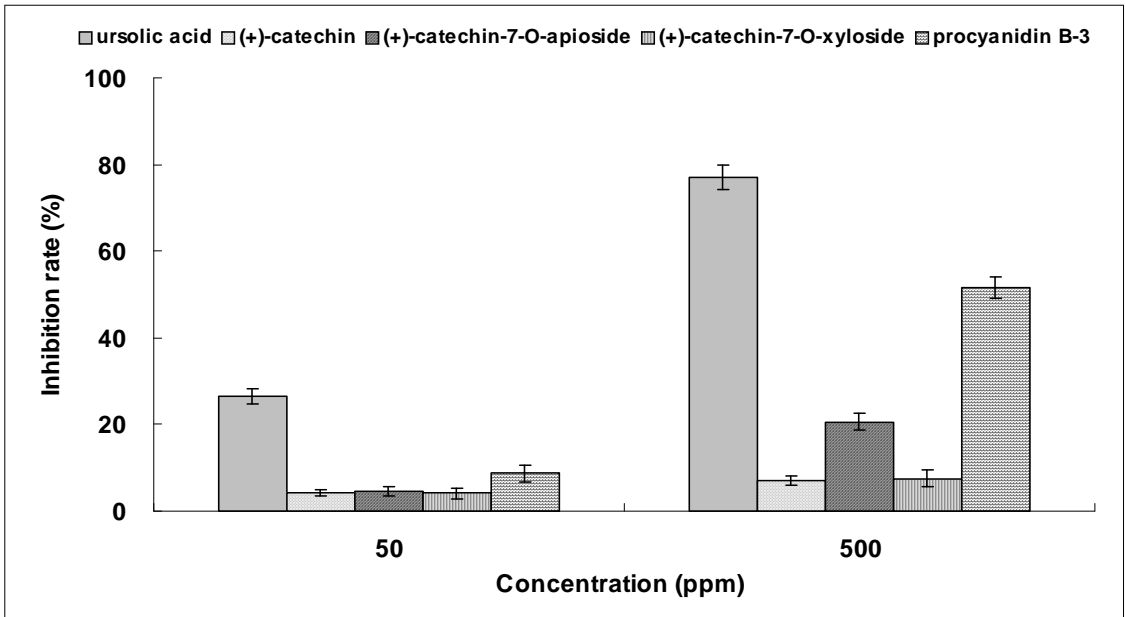
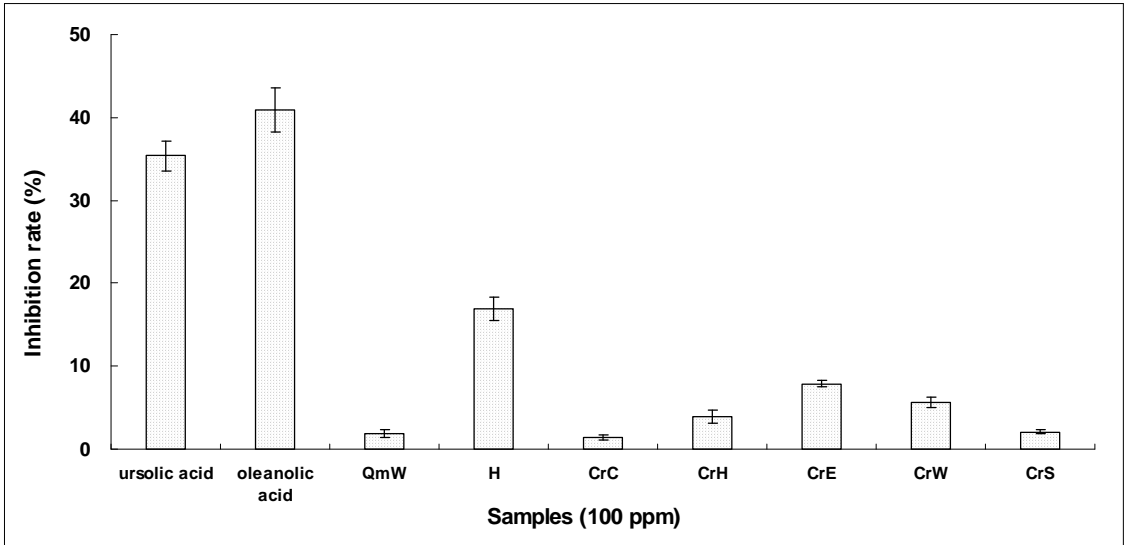


Fig. 32. 느릅나무 수피에서 분리한 화합물의 엘라스타제 생성 저해율.



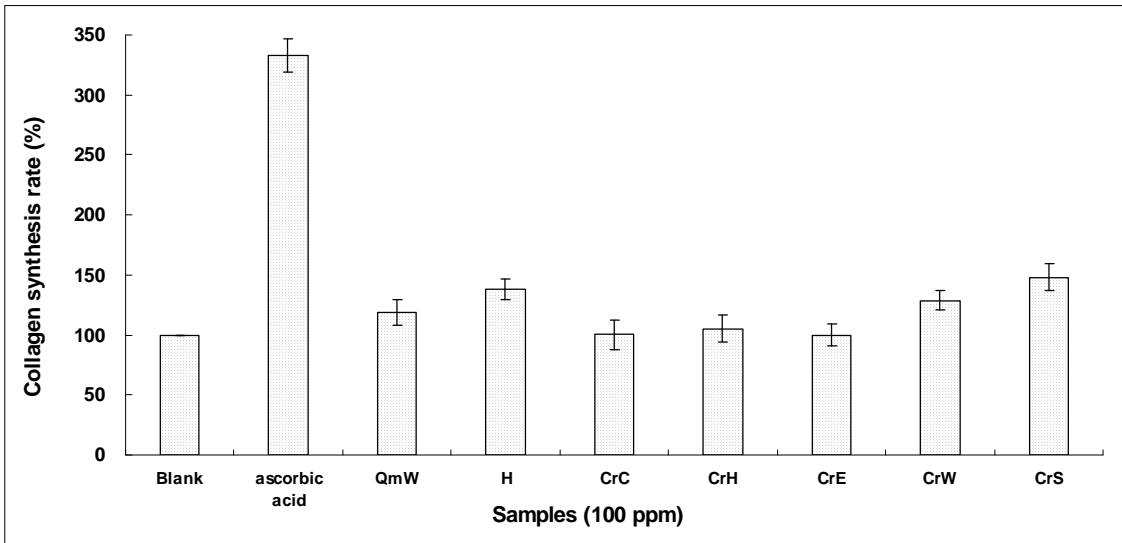
(QmW : *Q. mongolica* Water Sol., H : homoflavoyadorinin B, CrC : *C. crenata* Crude, CrH : *C. crenata* Hexane Sol., CrE : *C. crenata* EtOAc Sol., CrW : *C. crenata* Water Sol., CrS : *C. crenata* Solid)

Fig. 33. 신갈나무 겨우살이와 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 엘라스타제 생성 저해율.

(2) Collagen 생성 촉진 효과

느릅나무 수피 추출물 분획들과 분리한 화합물 4종에 대한 collagen 생성 촉진 효과 측정 결과 Human skin dermal fibroblast CCD-986sk에 대하여 collagen 생성을 촉진시키지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 낮은 elastase 활성 억제 효과 및 collagen 생성촉진효과가 없는 것으로 판단하여 주름 개선에 도움을 주지 못하는 것으로 판단되었다.

신갈나무와 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 collagen 생성 촉진 효과를 측정한 결과는 Fig 34와 같다. 신갈나무 겨우살이에서 분리한 homoflavoyadorinin B와 밤나무 겨우살이 고형분만이 약간의 collagen 생성 촉진 효과를 보였으나 양성대조군으로 사용된 동일 농도의 ascorbic acid와는 현격한 결과를 보였다. 겨우살이 추출물 분획 역시 elastase 활성 억제 효과를 나타내지 못하였으며 collagen 생성촉진효과가 없는 것으로 판단하여 주름 개선에 도움을 주지 못하는 것으로 판단되었다.



(QmW : *Q. mongolica* Water Sol., H : homoflavoyadorinin B, CrC : *C. crenata* Crude, CrH : *C. crenata* Hexane Sol., CrE : *C. crenata* EtOAc Sol., CrW : *C. crenata* Water Sol., CrS : *C. crenata* Solid)

Fig. 34. 신갈나무 겨우살이와 밤나무 겨우살이 추출물 분획의 collagen 생성율.

7) 항염증활성 시험

가) 항염증활성 실험 (NO assay)

쥐유래의 Raw 264.7 (Mouse Macrophage) 세포를 10% FBS (fetal bovine serum), penicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium)를 이용하여 5% CO₂, 37°C 항온기에서 배양한 후, 6 well plate에 well당 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 세포가 들어있는 세포 부유액 1 ml씩을 넣어주고 24시간 추가 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고, 혈청이 포함되지 않은 배지를 90 μl 씩 첨가한다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 희석한 시료들을 최종 농도 20, 50, 100 ppm이 되도록 처리 후 LPS (Lipopolysaccharide) 100 ng/ml이 되도록 처리하여 준다. 양성 대조군 L-NMMA (N^G-monomethyl-L-arginin)는 50 uM이 되도록 처리하여 주고 같은 조건으로 실험을 수행하였다. 20시간 추가 배양 후 배지를 이용하여 NO assay를 수행한다. NO assay는 96 well

plate에 세포배양액 50 μl 와 Griess 시약 50 μl 를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광값을 측정하였다.

나) 항염증활성 결과

LPS에 의해 활성화 된 Raw 264.7 세포에 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O-apioside, procyanidin B-3을 처리하여 20시간 배양 후 Griess 시약을 사용하여 NO 생성 저해율을 측정하였다. NO 저해제로 알려진 양성대조구인 L-NMMA는 100ppm 농도에서 약 60%의 NO 저해율을 나타내는 반면 3개의 화합물 모두 90% 이상의 NO 저해율을 보여 항염증 효능이 매우 우수한 것으로 나타났다(Fig. 35).

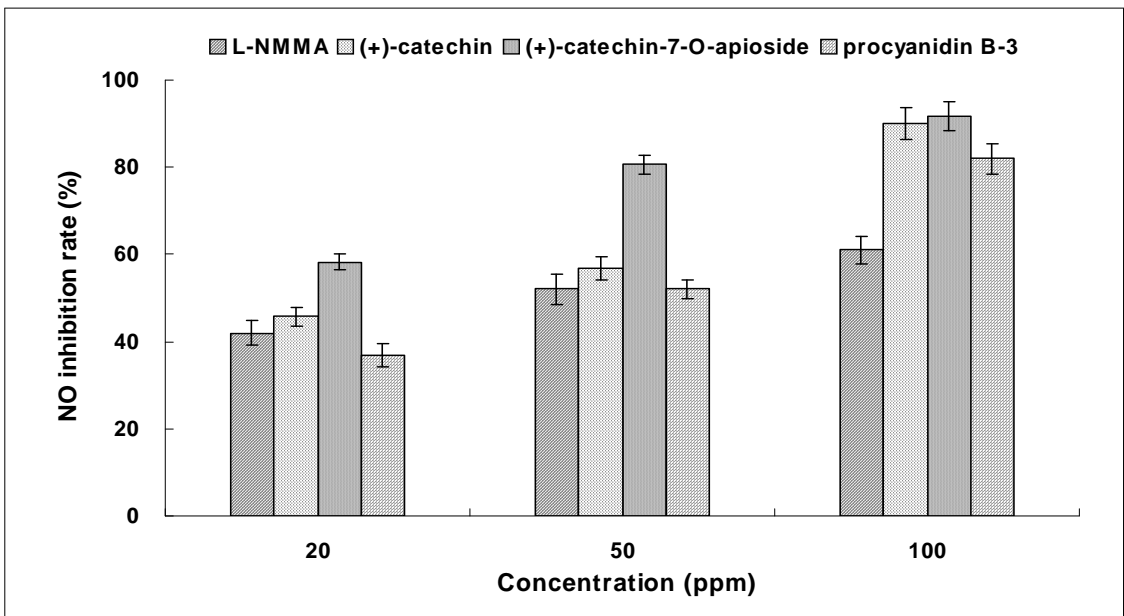


Fig. 35. 느릅나무 수피에서 분리한 화합물의 NO 저해율.

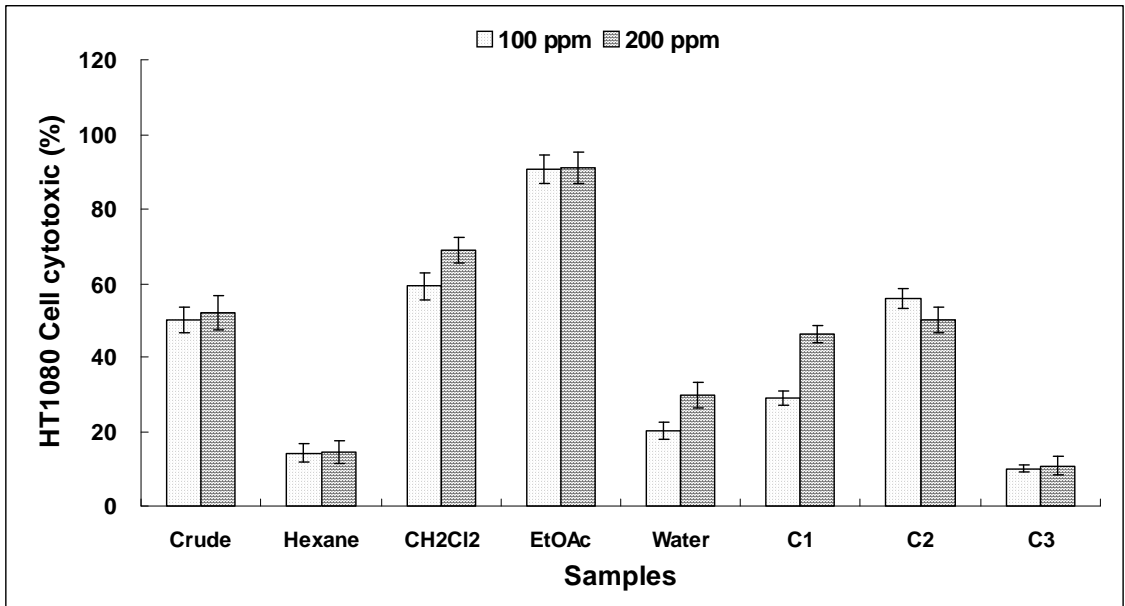
8) 항암활성 시험

가) 항암활성 실험 (MTT assay)

섬유육종 암세포인 HT1080 (human fibrosarcoma), 피부암세포인 B16F10, 자궁경부암 세포인 HeLa cell 및 간암세포 HepG2 등의 암세포주를 이용하여 느릅나무 수피 추출물 분획과 단리 화합물에 대한 독성평가를 실시하였다. 세포들을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 에서 24시간 배양한 후, 96 well plate에 well당 1×10^5 /ml의 세포가 들어 있는 세포 부유액 100 μ l를 넣어 주고 24시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지를 90 μ l씩 첨가한다. 혈청이 포함되지 않은 배지로 희석한 시료들을 최종 농도 100 ppm, 200 ppm 가 되도록 처리 후 24시간 배양한다. 배양 후 PBS buffer에 5 mg/ml의 농도로 녹여져 있는 MTT 시약을 각 well에 첨가(최종농도 1mg/ml)하고, 4시간 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거한다. 각 well에 100 μ l acid iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30분간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광값을 측정하였다.

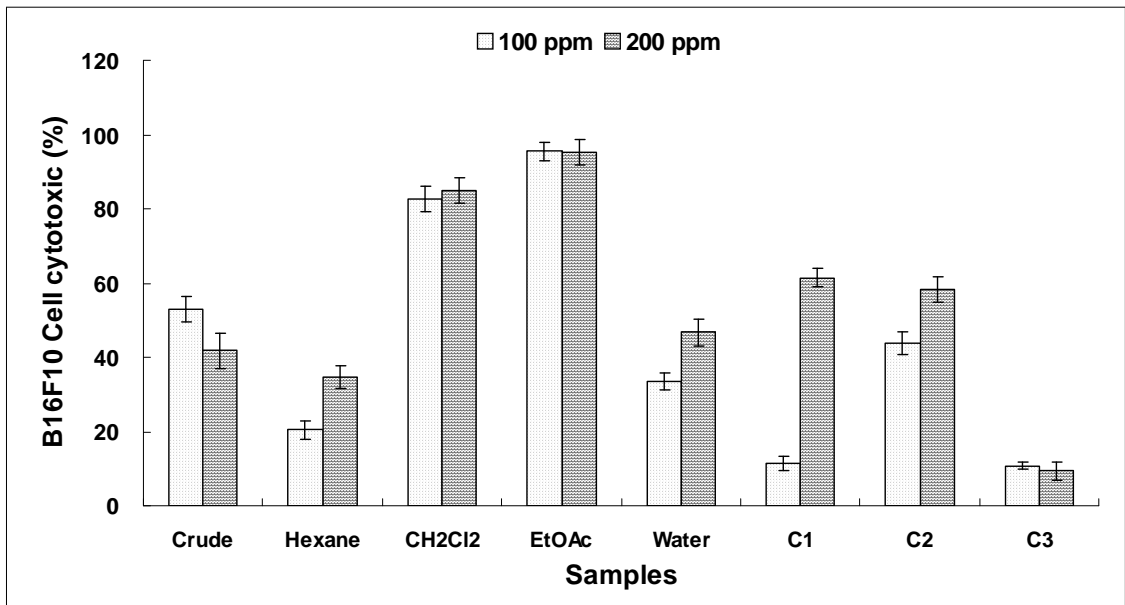
나) 항암활성 결과

HT1080 (섬유육종암), B16F10 (피부암), HeLa cell (자궁경부암) 및 HepG2 (간암) 등의 여러 암세포주에 대한 세포독성은 MTT assay로 측정하였다. 느릅나무 수피 에틸아세테이트용성 분획물과 메틸렌클로라이드용성 분획물, (+)-catechin은 4가지 암세포주에 대한 세포독성이 높은 것으로 나타났으며, (+)-catechin-7-O-apioside의 경우 간암세포인 HepG2을 제외한 나머지 세포주에서 세포독성을 나타낸 것으로 보아 느릅나무 수피의 추출성분이 항암활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.



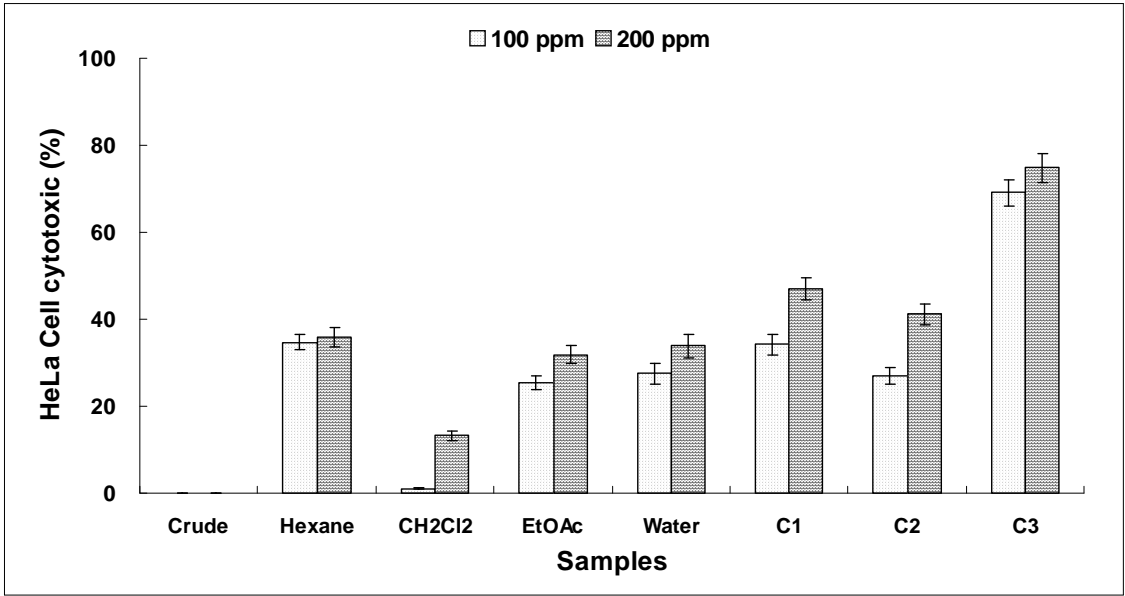
(C1 : (+)-catechin, C2 : (+)-catechin-7-O-apioside, C3 : procyanidin B-3)

Fig. 36. 느릅나무 수피 추출물 분획과 화합물의 HT1080 세포에 대한 독성.



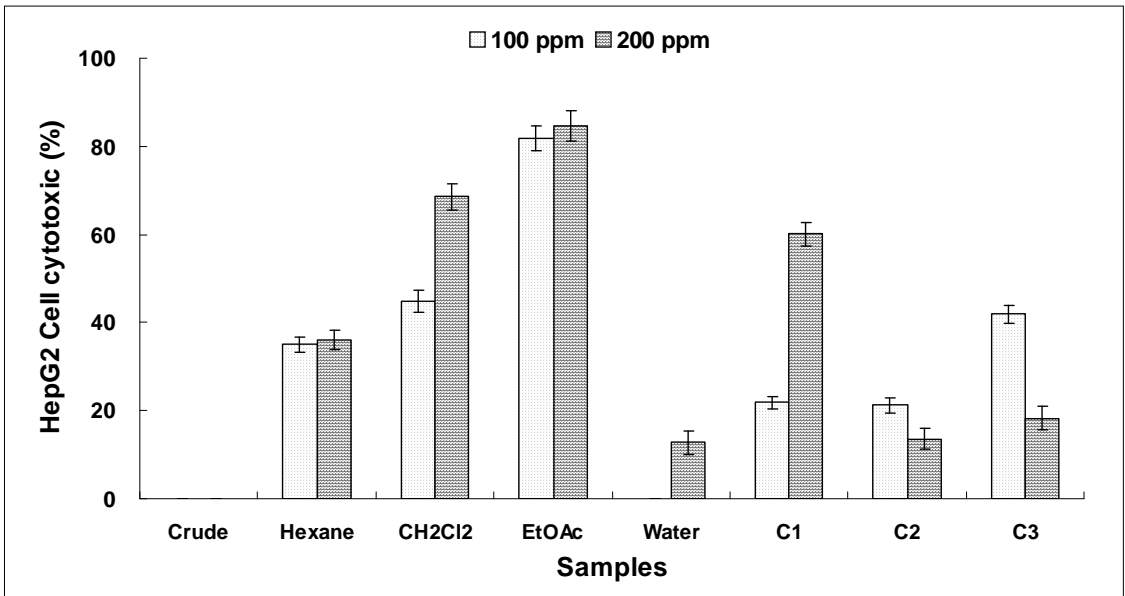
(C1 : (+)-catechin, C2 : (+)-catechin-7-O-apioside, C3 : procyanidin B-3)

Fig. 37. 느릅나무 수피 추출물 분획과 화합물의 B16F10 세포에 대한 독성.



(C1 : (+)-catechin, C2 : (+)-catechin-7-O-apioside, C3 : procyanidin B-3)

Fig. 38. 느릅나무 수피 추출물 분획과 화합물의 HeLa 세포에 대한 독성.



(C1 : (+)-catechin, C2 : (+)-catechin-7-O-apioside, C3 : procyanidin B-3)

Fig. 39. 느릅나무 수피 추출물 분획과 화합물의 HepG2 세포에 대한 독성.

라. 추출물의 제형안정화 및 Pilot 제조

1) 안정화 실험

가) 제형 안정도 실험

느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin을 최대 함량 0.05%로 하여 안정화제 A와 B를 첨가한 원료에 대한 제형실험 및 제형 내의 안정도 실험을 하였다(Table 5). 제형 내 안정도 실험은 우선 기능성 미백화장품의 제품 경향을 고려하여 에센스, 크림제형으로 진행하였으며, 각 온도별(5℃, 25℃, 40℃, 50℃, cycle)로 일정기간 성상의 변화를 확인하였다.

또한 안정도 실험에서 진행하였던 각 제형의 처방은 Table 6, 7에서 각각 나타내었다. 제형실험 후 일정기간의 안정도를 확인한 결과, 고온에서 변색 및 성상의 분리현상이 발견됨을 확인할 수 있었다. 따라서 제형 내 안정화제(유화제, 향산화제 등) 함량을 조절하는 실험을 추가적으로 진행하여 제형의 안정도를 다시 확인하였다. 그 결과, 일정기간 동안 안정한 제형을 확보할 수 있었다(Table 8).

Table 5. 안정화제에 따른 원료의 안정화 실험

	온도	성상	1일	1주일	1개월	2개월	3개월
안정화제 A	5℃	pH	5.00	4.98	4.98	4.96	4.97
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.00	5.00	4.99	4.95	4.96
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.00	5.00	4.97	4.94	4.89
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
	50℃	pH	5.00	4.99	4.96	4.90	-
		성상	양호	양호	양호	미변색	변색
	CYCLE	pH	5.00	4.98	4.99	4.93	4.89
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
안정화제 B	5℃	pH	5.55	5.58	5.60	5.62	5.61
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.55	5.57	5.58	5.61	5.61
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.55	5.57	5.63	5.71	5.74
		성상	양호	양호	양호	미변색	변색
	50℃	pH	5.55	5.58	5.70	5.72	5.74
		성상	양호	양호	변색	변색	변색
	CYCLE	pH	5.55	5.60	5.63	5.63	5.62
		성상	양호	양호	양호	양호	미변색
안정화제 C	5℃	pH	5.58	5.55	5.57	5.60	5.58
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.58	5.56	5.52	5.69	5.74
		성상	양호	양호	양호	미변색	미변색
	40℃	pH	5.58	5.59	5.77	5.88	6.05
		성상	양호	미변색	변색	변색	변색
	50℃	pH	5.58	5.81	6.00	-	-
		성상	양호	변색	변색	-	-
	CYCLE	pH	5.58	5.54	5.57	5.61	5.73
		성상	양호	양호	양호	미변색	변색
안정화제 A+B	5℃	pH	5.10	5.11	5.15	5.14	5.17
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	pH	5.10	5.13	5.16	5.17	5.23
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	pH	5.10	5.16	5.24	5.41	5.50
		성상	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	pH	5.10	5.23	5.46	5.68	5.88
		성상	양호	양호	양호	미변색	미변색
	CYCLE	pH	5.10	5.18	5.24	5.33	5.38
		성상	양호	양호	양호	양호	양호

Table 6. 에센스 제형의 처방

성 분	합 량(중 량%)
(+)-catechin	0.05
글리세린	5.0
1,3-부틸렌 글리콜	2.0
폴리에틸렌 글리콜	2.0
카보머	1.0
소듐히아루로네이트	0.1
글리신	3.0
암모늄 아크릴로일 디메틸타우레이트	2.0
히드록시에틸셀룰로오스	0.2
에탄올	3.0
폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
항산화제	0.3
트리에탄올아민	1.0
EDTA-2Na	0.05
방부제	적량
정제수	잔량

Table 7. 크림 제형의 처방

성 분	합 량(중 량%)
(+)-catechin	0.05
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	3.0
하이드로제네이티드 레시친	2.0
옥틸도데카놀	5.0
트리옥타노인	3.0
스테아릭에씨드	1.5
스쿠알란	2.0
세토스테아릴알콜	2.5
폴리솔베이트 60	1.5
소르비탄세스퀴올레이트	2.0
디메치콘	3.0
항산화제	0.3
산탄검	0.2
트리에탄올아민	0.1
EDTA-2Na	0.05
방부제	적량
정제수	잔량

Table 8. 제형별 안정도 실험

제형	온도	성 상				
		1일	1주일	1개월	2개월	3개월
에센스	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	미변색
	50℃	양호	양호	양호	미변색	미변색
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호
크림	5℃	양호	양호	양호	양호	양호
	25℃	양호	양호	양호	양호	양호
	40℃	양호	양호	양호	양호	양호
	50℃	양호	양호	양호	양호	미변색
	CYCLE	양호	양호	양호	양호	양호

2) Pilot 제조 실험

제형 안정도 실험을 통하여 확보한 안정한 제형 처방을 바탕으로 Pilot 제조를 실시하였다. 제조는 에센스, 크림에 대하여 각각 실시하였으며 제조 설비는 한국콜마(주) 내 CGMP 생산설비를 이용하였다. 또한 이를 이용하여 시제품 및 제품의 효능 평가용 제품을 제조하여 제품 효능 평가에 대한 추가 실험 및 품평을 실시하였다(시제품 2종).

다. 제품의 효능 평가

1) 피시험자 선정 및 제품 적용

피부 미백 효과를 측정하기 위해 Mexameter (색차계)를 이용하여 추출물 0.05%를 함유한 크림제형의 미백 효과를 측정하였으며 전문가의 육안판정을 통해 실험 결과를 보정하였다. 실험은 총 지원자 중 자체 선정기준에 의해 본 실험에 적합하다고 판정된 30세에서 50세까지의 여성 24명에게 이루어졌으며 각각 12명, 12명의 두 그룹(A, B)으로 나누고 A와 B 그룹 모두에게 일정량(1차 조사시 - UVB intensity 1.0 mJ/sec, 조사시간 7분, 전체 자외선 조사량 420 mJ / 2차 조사시 - UVB intensity 1.1 mJ/sec, 조사시간 11분, 전체 자외선 조사량 726 mJ)의 자외선을 2.5 cm × 2.5 cm 크기로 2회 조사하여 피부 흑화를 유도하였다. 그리고 조사 부위에 각각 A 그룹은 대조제품을 도포하였으며, B 그룹에는 시험제품을 도포하였다. 도포는 하루에 2회 적정량을 피시험자가 바르도록 유도하였다.

시험기간은 총 8주로 2006년 10월 9일부터 12월 1일까지 진행하였다. 피시험자는 시험기간 중 총 5회(시험 시작 전, 조사 처리 후, 3일 경과, 1주 경과, 4주 경과, 8주 경과) 피부 상태를 측정하였으며 시험기간 내 시험결과에 영향을 줄 수 있는 미백 화장품 및 에센스, 영양크림의 사용 등을 금지하였으며, 팩이나 피부 마사지 등도 금지하였다.

가) Mexameter 분석을 통한 피부 미백 평가

피시험자의 방문시 UV 조사를 통한 흑화 유도 부위에 측정장비를 이용하여 미백효과를 측정하였다. 측정장비로는 mexameter (Courage-Khazaka, Germany)를 사용하였으며 동일 부위를 3회 연속 측정하여 측정된 melanin index (0~200)의 평균값을 산정하였다.

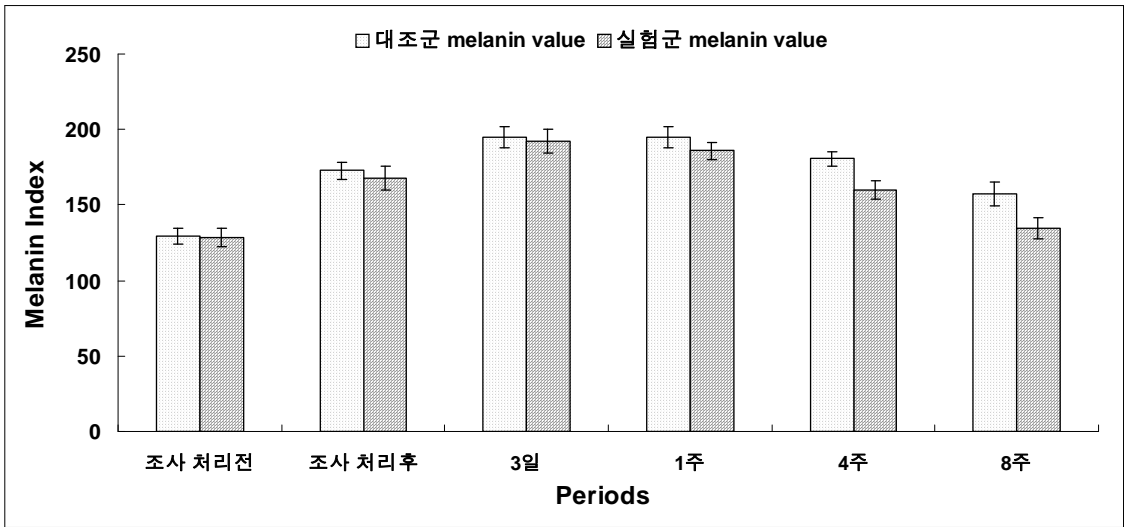


Fig. 40. 느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin을 함유한 화장품의 미백 평가.

Fig. 40.에서와 같이 자외선을 조사 후 melanin 지수가 현저하게 증가하였다. Melanin 지수는 대조제품과 시험제품을 도포 한 3일 후 최고로 증가하였으며 시간이 지날수록 감소하는 경향이 나타났다. 대조제품을 도포한 그룹보다는 시험제품을 도포한 그룹의 melanin 지수가 더 낮게 나타났으며 8주 후 시험제품을 도포한 그룹은 자외선 조사 전 melanin 지수와 유사한 수치를 나타내는 것으로 보아 느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin을 함유한 시험제품의 미백 효과가 우수한 것으로 나타났다.

2) 사용감 설문 평가

제품 사용 4주, 8주 후에 각각 피시험자를 대상으로 대조제품과 시험제품의 사용감 평가와 미백 평가, 화장품 적합성 평가, 안전성 평가 및 제품에 대한 호감도 등을 설문 조사하였다. 설문은 제품 사용 후부터 직접 방문하여 실시하였으며 결과는 8주 사용시의 대조제품과 시험제품 간의 사용감 조사를 Table 9와 10에 나타내었다.

Table 9. 대조제품을 사용한 그룹의 사용감 8주차 설문

피시험자	대 조 제 품						피부표면 변화	피부미백 개선효과	피부미백 개선시기
	부드러움	매끄러움	윤기	밝고 생기있음	촉촉함	탄력감			
1	****	***	***	***	***	*	***	*	-
2	****	****	**	**	**	**	**	**	8주
3	****	***	****	**	**	**	**	*	-
4	***	***	****	***	***	**	**	*	-
5	***	***	***	***	***	***	**	*	-
6	****	**	***	**	**	***	***	**	8주
7	****	***	***	***	***	***	*	**	8주
8	***	***	***	***	***	***	***	***	6주
9	****	***	****	****	***	*	***	**	8주
10	***	***	****	***	**	*	**	**	8주
11	****	****	***	**	***	***	***	***	8주
12	***	****	**	**	**	**	**	*	-

* : 그렇지 않다. ** : 별로 그렇지 않다. *** : 그런 편이다. **** : 그렇다.

Table 10. 시험제품을 사용한 그룹의 사용감 8주차 설문

피시험자	시 험 제 품						피부표면 변화	피부미백 개선효과	피부미백 개선시기
	부드러움	매끄러움	윤기	밝고 생기있음	촉촉함	탄력감			
1	***	***	**	****	**	***	***	***	6주
2	****	**	***	***	**	**	***	*	-
3	****	**	**	****	***	***	***	***	8주
4	***	***	****	***	***	***	***	***	8주
5	***	***	***	***	***	***	**	***	6주
6	****	****	***	***	**	***	**	***	8주
7	****	****	****	***	***	***	***	*	-
8	***	***	***	***	***	****	***	***	8주
9	****	***	****	***	****	**	***	****	6주
10	***	****	**	****	**	****	**	**	8주
11	****	***	**	****	**	**	**	**	8주
12	****	**	****	**	**	**	****	**	8주

* : 그렇지 않다. ** : 별로 그렇지 않다. *** : 그런 편이다. **** : 그렇다.

8주차 피시험자의 사용감 설문 조사를 바탕으로 한 결과는 다음과 같다.

<질문 1. 피부가 부드러워졌습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	58.3%	41.7%	0	0
시험제품	58.3%	41.7%	0	0

<질문 2. 피부가 매끄러워 졌습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	25.0%	66.7%	8.3%	0
시험제품	25.0%	58.3%	16.7%	0

<질문 3. 피부 윤기가 증가하였습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	33.3%	50.0%	16.7%	0
시험제품	33.3%	41.7%	25.0%	0

<질문 4. 얼굴을 밝고 생기 있게 해줍니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	8.3%	50.0%	41.7%	0
시험제품	33.3%	66.7%	0	0

<질문 5. 피부가 촉촉해 지셨습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	0	58.3%	41.7%	0
시험제품	8.3%	58.3%	33.3%	0

<질문 6. 피부 탄력감에 대한 변화는 느끼셨습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	0	33.3%	41.7%	25.0%
시험제품	16.7%	66.6%	16.7%	0

<질문 7. 피부 표면에 대한 변화를 느끼셨습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	0	41.7%	50.0%	8.3%
시험제품	8.3%	75.0%	16.7%	0

<질문 8. 피부 미백에 대한 효과는 느끼셨습니까?>

	그렇다	그런 편이다	별로 그렇지 않다	그렇지 않다
대조제품	0	16.6%	41.7%	41.7%
시험제품	0	38.1%	57.1%	4.8%

<질문 9. 피부 미백에 대한 효과를 느꼈다면 이를 처음 느낀 시기는?>

	사용후 1주 이내	사용후 1주~4주	사용후 4주~6주	사용후 6주~이후
대조제품	0	0	2명	5명
시험제품	0	0	3명	7명

이상의 설문조사를 종합해 본 결과 시험제품을 사용한 그룹이 질문 4 (얼굴을 밝고 생기 있게 해줍니까?), 질문 5 (피부가 촉촉해 지셨습니까?), 질문 6 (피부 탄력감에 대한 변화는 느끼셨습니까?) 및 질문 7 (피부 표면에 대한 변화를 느끼셨습니까?)에서 긍정적인 답변이 높게 나타났다. 피부 미백에 대한 설문조사 결과 대조제품을 사용한 그룹보다 시험제품을 사용한 그룹이 미백 효능이 우수하다고 답변을 하였으나 비전문가인 피시험자의 주관적인 판단에 근거하여 설문에 답하였기 때문에 시험제품과 대조제품 간의 효과의 차이를 정확히 판단하기는 무리가 있다고 사료되나 mexameter 분석을 통한 피부 미백 평가와 설문조사 결과 시험제품의 미백 효능이 대조제품보다는 우수하다는 결론을 얻을 수 있었다.

3) 보습효과

피부 보습 효과는 Corneometer CM825를 이용하여 느릅나무 수피에서 단리된 (+)-catechin 0.05%를 함유한 크림제형의 보습력을 측정하였다.

시료 처리 전 보습력은 72.98이고, 시료처리 1시간 후 대조군은 127.58, 실험군은 132.81

로 각각 74.8%, 81.8% 증가하였다. 하지만, 시간이 지남에 따라 보습력은 많이 낮아졌으며, 시료처리 6시간 경과 후 실험군의 보습력은 17.38% 대조군은 15.94%으로 실험군의 보습력이 대조군보다는 다소 증가되었다. 그러나 느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin을 함유한 크림제형과 대조군 간의 보습효과에 있어서 큰 유의차를 나타내지 않아 제형 base에 의한 효과일 것으로 추측되었다.

4) 피부 자극성 TEST

가) 시 료

선행되었던 생리활성 평가를 바탕으로 하여 느릅나무 수피에서 분리한 (+)-catechin에 대한 피부 자극성 test를 진행하였다.

나) 인체 첩포 시험

추출물이 인체에 자극이 있는지 여부를 확인하기 위하여 인체 첩포실험을 통하여 피부자극 여부를 확인하였다. 우선 시험을 위해 Finn Chambers on Scanpor(Epitest Ltd Oy, Finland)를 이용하였으며 보다 상세히는 8 mm finn chamber에 disk (7.5 mm)를 얹은 후 세포독성 실험 결과에 따라 적용 가능 최대 농도인 500 ppm부터 250 ppm, 100 ppm 별로 (+)-catechin 용액을 제조하고 이를 15 μ l씩 점종하여 5개의 실험구로 실시하였다. Micropore tape가 부착된 첩포를 시험참가자의 전박부에 24시간 동안 부착하고, 첩포 제거 1시간 안정 후 자극여부를 판독하였고, 2차 첩포시험은 48시간 부착한 후 제거하여 판독을 하였다. 피부자극 판정기준은 Table 11에 나타내었다.

Table 11. 피부자극 판정 기준

반응 정도	판정 기준
-	반응 없음
±	미세한 홍반 생성
+	약한 홍반, 부종 및 구진 생성
++	홍반, 구진 및 수포 생성
+++	대수포 생성

다) 결 과

피 시험자 20명의 전박부에 시행한 (+)-catechin에 대한 농도별 인체 첩포 시험의 결과, (+)-catechin에 대한 농도 의존적 알러지 반응이나 기타 다른 자극은 거의 관찰되지 않았으며, Table 12에 그 결과를 나타내었으며 250 ppm과 500 ppm에서 각각 1명씩 미세한 홍반이 생성된 것을 확인하였으나 시험제품이 피부에 대한 자극은 없는 것으로 판단되었다.

Table 12. 느릅나무 수피 분리 물질 (+)-catechin에 대한 인체 첩포시험 결과

농도	50 ppm					250 ppm					500 ppm				
	24hrs / 48hrs					24hrs / 48hrs					24hrs / 48hrs				
자극정도	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
반응결과 (명)	20	0	0	0	0	19	1	0	0	0	19	1	0	0	0

바. 결 론

신갈나무, 밤나무 겨우살이와 느릅나무 수피를 95% EtOH 용액으로 추출하여 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 수용성으로 분획한 후 동결건조하였다. 신갈나무 겨우살이 수용성 분획물로부터 노란색 결정의 homoflavoyadorinin B를 단리하였고, 느릅나무 수피 에틸아세테이트용성과 수용성 분획물로부터 (+)-catechin, (+)-catechin-7-O- apiofuranoside, (+)-catechin-7-O-xylopyranoside 및 (+)-catechin(4 α - \rightarrow 8)-(+)-catechin (procyanidin B-3)을 단리하여 ^1H 과 ^{13}C -NMR과 MS 스펙트럼을 분석하여 화합물의 구조를 동정하였다. 겨우살이 추출물은 비극성용매에 주로 용해되는 고분자성 당단백질성분으로 존재하였으며 느릅나무 수피는 flavan-3-ol 화합물인 (+)-catechin 유도체 화합물이 주요 구성성분이었으며 그 중 (+)-catechin 배당체 화합물인 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside가 가장 많이 단리된 것으로 보아 느릅나무 수피 추출물의 주요 성분임을 알 수 있었으며 (+)-catechin 이량체 화합물인 procyanidin B-3도 단리하였다.

세포독성 측정 결과 느릅나무 수피 추출물 분획은 312 ppm 이상의 고농도에서 세포독성을 보였으나 에틸아세테이트용성 분획물은 78 ppm에서 20% 이상의 세포독성을 나타냈다. 단리 화합물의 경우 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside를 제외한 화합물들은 625 ppm의 고농도에서도 세포독성을 나타내지 않았다. 겨우살이 추출물 분획들은 대부분 78 ppm 이상부터는 세포독성이 높게 나타났다.

느릅나무 수피 추출물의 항산화활성은 서로 다른 메카니즘 실험에서 대부분 활성이 우수한 것으로 나타났다. DPPH, 전자공여능, SOD 유사활성의 경우 추출물 분획 모두 활성이 우수하였으나 특히 SOD 유사활성에서 양성대조구인 ascorbic acid 보다 3~4배 높은 활성을 나타냈다. 지방산 자동산화 억제 효과는 에틸아세테이트용 분획물이 과산화물에 의한 세포 손상 억제 효과는 수용성 분획물이 가장 우수한 활성을 보였다. 겨우살이 추출물의 경우 대부분 신갈나무와 밤나무 에틸아세테이트용성 분획물이 활성이 높게 나타났으며 당단백질 성분인 점액질 역시 활성이 높게 나타났다. 세포내 항산화 실험에서는 신갈나무 수용성 분획물, homoflavoyadorinin B, 밤나무 조추출물 및 수용성 분획물이 과산화물에 의해 손상된 세포를 약 30~40% 증식효과가 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 느릅나무 수피와 신갈나무, 밤나무 겨우살이는 항산화 활성이 우수한 것으로 사료된다.

미백효과를 측정하기 위한 B16F10을 이용한 melanin 생합성 억제와 tyrosinase 활성 저해 실험 결과 느릅나무 수피에서 단리한 (+)-catechin의 경우 양성대조구로 사용한 arbutin과 유사한 melanin 생합성 억제 효과를 나타내어 미백효과가 있는 것으로 나타났으며 (+)-catechin-7-O-xyloside 역시 arbutin보다는 낮지만 일정부분의 melanin 생합성 억제 효과가 있다는 결과를 나타내었다. 신갈나무, 밤나무 겨우살이 추출물 분획들은 미백활성을 보였으나 arbutin과 비교해 볼 때 효과가 미약하였다.

느릅나무 수피 추출물 분획들과 단리 화합물에 대한 항균활성 결과 병원성 포도상 구균인 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 추출물 분획들이 항균력을 보였으며 또한, 비듬균인 *M. furfu*에 대하여도 항균활성을 나타냈다. 단리 화합물보다는 추출물 분획들이 항균력이 우수한 것으로 나타났으며 메틸렌클로라이드용성 분획은 *M. furfu*에 23 mm의 성장 억제환을 보여 항균활성이 가장 우수했다.

주름개선 효과를 알아보기 위한 elastase 활성 억제 효과는 느릅나무 수피 고형분, procyanidin B-3 및 homoflavoyadorinin B가 대조구의 약 50% 정도의 elastase 활성 저해 효과를 보였다. Collagen 생성 촉진 효과 실험 결과 추출물 분획들과 화합물 모두 유효한 활성을 보이지 않아 주름 개선에는 효과가 없는 것으로 판단되었다.

항염증활성 측정 결과 느릅나무 수피에서 단리 된 화합물 모두 대조군보다 높은 NO 저해율을 보여 활성이 우수한 것으로 나타났으며 특히 100 ppm에서 (+)-catechin과 (+)-catechin-7-O-apiofuranoside는 90% 이상의 NO 저해율을 나타냈다.

HT1080 (섬유육종암), B16F10 (피부암), HeLa cell (자궁경부암) 및 HepG2 (간암) 등의 여러 암세포주에 대한 항암활성을 측정한 결과 느릅나무 에틸아세테이트용성, 메틸렌클로라이드용성 분획물 및 (+)-catechin은 4가지 암세포주에 대해 높은 항암활성이 나타난 것으로 보아 느릅나무 수피의 추출성분이 항암활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

(+)-catechin을 최대 함량 0.05%을 첨가한 에센스, 크림에 대한 제형실험 및 제형 내의 안정도 실험을 실시하여 일정기간의 안정도를 확인한 결과, 고온에서 변색 및 성상의 분리 현상이 발견됨을 확인할 수 있었으며 제형 내 안정화제(유화제, 항산화제 등) 함량을 조절하는 추가 실험을 진행하여 안정한 제형을 확보할 수 있었다. Pilot 제조는 에센스, 크림에 대하여 각각 실시하였으며 시제품 및 제품의 효능 평가용 제품을 제조하여 제품 효능 평가에 대한 추가 실험 및 품평을 실시하였다.

Mexameter 분석을 통한 피부 미백 평가와 설문조사 결과 시험제품의 미백 효능이 대조 제품보다는 우수하였으며 보습 효과는 시험제품이 대조제품보다 다소 높게 나타났으나 큰 유의차를 확인할 수는 없었다. 인체 첩포 실험을 통한 피부 자극 여부를 확인한 결과 피부에 대한 특별한 자극성은 없는 것으로 나타났다.

제 2 절 겨우살이와 느릅나무의 형태적·생태적 조사, 번식법 개발 및 유전 분석

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표 및 내용

- 겨우살이류 및 느릅나무류의 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명- 각 식물 종의 분포 지역을 문헌에 의하여 조사하고 현지 답사하여 해당되는 유사종의 형태적 특징, 생태적·입지환경의 차이와 유전적 식별과 종판별을 위해 분자지표를 활용
- 겨우살이는 기주식물이 다양하므로 기주식물에 따른 형태적, 생태적 및 유전적 특성의 구명- 겨우살이에 있어서는 기주식물에 따른 집단 간 형태적 특징, 생태적·입지환경의 차이와 유전적 식별과 종판별을 위해 분자지표를 활용
- 겨우살이의 번식을 위한 기주식물별 번식법과 느릅나무의 번식법 개발- 유·무성번식법 개발 및 개선에 의한 집단조성법 개발
- 겨우살이와 느릅나무의 기내증식 기술 개발- 잎/동아/종자 등을 이용한 기내배양에 의한 번식법의 확립
- 증식법 개발을 통하여 기술을 농가에 보급함으로써 안정적인 원료수급과 농산촌의 소득 증대에 기여하고자 함

나. 연차별 연구개발 및 목표와 내용

구분	1차년도(2005)
연구개발 목표	1. 겨우살이류 및 느릅나무류의 형태적 및 생태적 특성 조사 2. 기주식물에 따른 겨우살이의 형태적 및 생태적 특성 조사
연구개발 내용 및 범위	잎, 개화기 및 결실기, 화기, 종자, 수피, 자생지의 토양, 자생지의 식생 조사, DNA 추출 및 중합반응 조건 구명
연구개발 결과	겨우살이 자생지 식생구조 및 환경분석, 유·무성번식, 화기 및 화분조사 느릅나무 무성번식
구분	2차년도(2006)
연구개발 목표	1. 겨우살이와 느릅나무의 기내증식기술개발(조직배양) 2. 기내배양과 유·무성번식에 의한 식물체의 비교

연구개발 내용 및 범위	잎, 동아, 종자를 이용한 기내배양법 개발 우량 가계/개체의 기내배양 시도 -> 장기적으로는 품종화 도모 및 품종 등록 기내배양체의 순화조건 구명 기내배양과 유·무성번식에 의한 식물체의 성장, 형태·유전적 비교
연구개발 결과	느릅나무 유·무성번식, 겨우살이 화기, 흡기, 화분구조 조사

구분	3차년도(2007)
연구개발 목표	1. 겨우살이와 느릅나무의 기내증식기술개발(조직배양)및 겨우살이 종자 번식법 개발 2. 기내배양과 유·무성번식에 의한 식물체의비교 3. 느릅나무 및 겨우살이 유전분석
연구개발 내용 및 범위	잎, 동아, 종자를 이용한 기내배양법 개발 우량 가계/개체의 기내배양 시도 -> 장기적으로는 품종화 도모 및 품종 등록 기내배양체의 순화조건 구명 겨우살이 종자 번식법 개발 시도 기내배양과 유·무성번식에 의한 식물체의 성장, 형태적, 유전적 비교 느릅나무 및 겨우살이 산지 및 기주식물별 유전분석 비교
연구개발 결과	느릅나무의 유·무성번식, 조직배양 겨우살이 종자번식 및 겨우살이의 기주식물별 유전분석

다. 연구개발방법 및 설계

1)겨우살이

2005년

가) 겨우살이 자생지의 식생구조 및 환경 분석

자생지의 식생조사는 2004년 6월부터 2004년 9월까지 홍천군 북방면, 인제군 기린면 현리, 원주시 호저면 옥산리 및 강원대학교 산림과학대학 부속 학술림 내에 위치한 구절산에서 자생하는 겨우살이를 재료로 사용하였다.

겨우살이 자생지 식생구조 및 피도는 Braun-Blanquet의 방법(Zrich-Montpellier School)

을 따랐다. 이 방법은 식물 사회의 종 구성을 크게 강조하는 연구방식이다(Becking, 1958 ; Braun-Blanquet, 1964).

조사방법은 겨우살이가 기생하는 기주식물을 포함하며, 비교적 인간의 간섭을 받지 않고, 식생이 균일하게 발달한 지점을 선정하여 각 조사지마다 1-2개씩의 10m×10m 방형구를 설치하였다. 각 방형구 내에 출현하는 식물을 대상으로 상층(교목층, 수고 8m이상), 중층(관목층, 수고 2-8m) 및 하층(초본층, 0.8m이하) 별로 각각 구성종군의 우점도와 피도를 조사하였다. 또한 자생지의 환경을 알아보기 위해 해발고, 방위 및 경사를 조사하였다.

나) 겨우살이 유, 무성번식

(가) 무성번식

① 줄기삽목

줄기삽목의 재료는 2004년 6월 11일 원주시 호저면 옥산리와 당년 당월 13일에 강원대학교 학술림내 구절산에서 겨우살이를 채취하여 엽이 부착되어 있는 1년지와 2년지만을 사용하였다.

원주시 호저면 옥산리의 재료는 상토를 모래 : 펄라이트 = 1 : 1을 사용하였으며, 겨우살이 줄기의 하단을 45°로 절단한 뒤 삽목하였다. 생장조절제 처리는 무처리를 포함하여 IBA 300, 500, 1,000ppm과 NAA 300, 500, 1,000ppm으로 각 처리당 10개씩 채취 당일 삽목하였다. 또한, 구절산의 재료도 같은 처리를 하였다.

② 조직배양

조직배양의 재료는 2004년 6월 11일 원주시 호저면 옥산리와 당년 당월 13일에 강원대학교 학술림내 구절산에서 겨우살이를 채취하여 엽이 부착되어 있는 1년지와 2년지만을 사용하였다.

옥산리의 재료는 2×11 cm 크기의 시험관 하단에 배지 7ml를 분주한 후 겨우살이의 줄기가 2/3 가량 담길 수 있도록 멸균지로 지지대를 만들어 식물체를 고정시켰다(그림 1). 배지는 액체배지(1/2 MS(Murashige and Skoog, 1962) + 2% sucrose)와 고체배지(1/2 MS) + 2% sucrose + 0.3% gelrite)를 사용하였으며, 배양은 광도는 40 μ mol/m²/sec와 온도 25±2°C

로 조절되는 배양실에서 1일 광배양 16시간 암배양 8시간으로 하였다. 또한 각 배지당 10개씩 2반복하였으며, 구절산의 재료도 같은 처리를 하였다.



Fig 41. 시험관 속 지지대의 모습과 액체배지에서의 겨우살이.

(나) 유성번식

① 인공재배를 위한 실내실험

종자 채취는 2004년 11월 20일 강원도 홍천군 내면 창촌리에서 채취하여 사용하였다. 채취장소의 해발고는 730m - 808m, 방위는 SE 160°이었다. 채취한 종자는 4℃의 냉장고에 넣어 약 1개월 이상 후숙한 후 종자를 용기에 담고 세척제를 넣어 끈적한 과육이 없어질 때까지 세척하여 종자만 남겼다. 다시 종자를 락스에 5분간 살균한 후 그림 2와 같은 네모난 사각플라스틱 용기에 물을 채운 후 신갈나무 토막을 길이 40cm로 잘라 넣고 종자를 접종하였다.



Fig 42. 플라스틱 용기 안 신갈나무에 접종된 종자.

② 인공접종

종자 채취는 2004년 11월 20일 강원도 홍천군 내면 창촌리에서 채취하여 사용하였다. 채취장소의 해발고는 730m - 808m, 방위는 SE 160°이었다. 채취한 종자는 4℃의 냉장고에 넣어 약 1개월 이상 후숙한 후 산사나무에 직접 접종하였다. 접종방은 과피와 과육을 모두 제거한 후 종자만 접종하는 방법과 과피만 제거한 후 과육채로 접종한 2가지 방법으로 하였다. 접종방법은 그림 3과 같다.





Fig 43. 과육과 함께 접종 한 방법(위)과 종자만 접종한 방법(아래).

2006년

가) 겨우살이 화기조사

겨우살이의 암꽃은 2005년 3월 23일부터 강원도 홍천군 화촌면 구성포리에 위치한 국유림에서 겨우살이를 기주식물(신갈나무)에 부착되어 있는 상태로 채취하여 사각용기에 물을 채운 후 꽃이 피기를 기다려 시간대별로 조사하였다. 실험방법은 그림 1과 같다.

수꽃은 2005년 4월 1일부터 강원도 춘천시 봉명리 소재 강원대학교 산림과학대학 부속 학술림과 강원도 홍천군 내면 창촌리 운두령 소재 국유림 내에 자생하는 겨우살이 수꽃을 1주일 간격으로 수집 조사하였다.



Fig 44. 채취한 겨우살이의 모습과 용기에 담긴 모습.

나) 겨우살이 흡기 구조 조사

상기 가)의 조사가 끝난 후 채취한 겨우살이의 흡기 구조를 분해·조사하였다.

다) 겨우살이 화분구조 조사

강원도 춘천시 봉명리 소재 강원대학교 산림과학대학 부속 학술림과 강원도 홍천군 내면 창촌리 운두령 소재 국유림 내에 자생하는 겨우살이 수꽃에서 화분이 날리기 직전 채취하여 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

라) 겨우살이와 느릅나무의 유전분석

2005년 3월말에서 4월초경 겨우살이와 느릅나무의 신엽이 발생할 때 신엽을 채취하여 DNA 분석 후 유전분석을 실시할 것이다.

2007년

가) 겨우살이 유성번식

종자 채취는 2007년 3월 2일 강원도 인제군 하남면에서 채취하여 사용하였다. 채취한 종자는 4℃의 냉장고에 넣어 약 1개월 이상 후숙 한 후 강원대학교 학술림에서 굴취해온 뽕나무에 직접 접종하였다. 접종방은 과피와 과육을 모두 제거한 후 종자만 접종하는 방법과 과피만 제거한 후 과육체로 접종한 2가지 방법으로 하였다. 접종방법은 그림 1과 같다.



Fig 45. 뽕나무에 접종한 사진

나) 겨우살이 유전분석

(1) 시료채취

국내에서 자생하는 겨우살이의 잎을 기주식물별로(돌배나무, 귀룽나무, 굴참나무, 모과나무, 배나무, 개살구나무, 밤나무) 채취하였다.

(2) DNA 분리 및 I-SSR PCR

채취한 시료는 멸균수로 세척한 후, FastDNA Kit를 이용 total DNA를 추출하였다.

I-SSR PCR은 PCR MASTER MIX를 사용하여 반응용액 25ul당 15ng template DNA, 1.5μM I-SSR primer, 1x pcr master mix 가 포함 되도록 하였으며 분석에 사용된 primer 는 『UBC #818(5'-CACACACACACACACAG-3'), #826(5'ACACACACACACACA CC-3'), #830(5'-TGTGTGTGTGTGTGTGG-3'), #855(5'-ACACACACACACACACYT-3')』을 사용하였다. PCR 증폭 반응은 UNOⅡ-Biometra를 이용하여 94℃에서 5분의 전처리 후 94℃(30초), 52℃(30초), 72℃(1분)의 과정을 45회 반복한 뒤 72℃에서 10분간 최종증폭 시켰다. PCR 증폭산물은 0.5μM의 Ethidium bromide가 포함된 2.0% agarose gel에서 전기영동 시킨 후(0.5×TBE, pH8.0) UV trans-illuminator에서 촬영한 DNA 밴드사진을 통해 관찰하였으며, 100bp DNA marker를 기준으로 특정 bp에서 증폭산물의 유무에 따라 '1' 과 '0'으로 data를 입력하였다.

(3) 자료의 분석

8개 기주식물별 I-SSR 변이체의 다양성을 추정하기 위해 POPGENE 1.31 program을 이용하여 Shannon's information Index를 구하였다

2) 느릅나무

2005년

가) 느릅나무 무성번식

2005년 3월 11일 강원도 춘천시 신북읍 산천리 소재 강원도 산림개발연구원 시험포지에 인공 식재한 느릅나무에서 시료를 채취하여 당일 삼목하였다. 발근촉진제의 처리는 무처리를 포함하여 IBA 50, 100, 300, 500, 1000ppm 과 NAA 50, 100, 300, 500, 1000ppm을 60초간 침지하였다. 상토는 모래상토에 액아를 한개만 포함시켜 하단부를 비스듬히 절단한 후 수직 삼목 하였다. 성적조사는 3개월 후 6월 11일 실시할 예정이다.



Fig 46. 삼목된 느릅나무.

2006년

가) 느릅나무의 유성번식(느릅나무와 당느릅나무의 종자 채취 시기별 발아율과 묘목성장)

2005년 4월 28일부터 5월 28일까지 약 일주일 간격으로 강원도 평창군 오대산의 당느릅나무와 정선군 임계면의 느릅나무에서 종자를 채취하여 사용하였다. 채취된 종자는 날개를 포함한 과실의 크기와 날개를 제거한 종자의 크기를 디지털 버니어캘리퍼스로 측정하고 다음 흡습지를 깐 패트리디쉬에 총 100립의 종자를 치상하였으며, $25 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 로 유지되는 발아상에서 발아를 유도하였다. 발아는 유근이 2mm이상 나온 것으로 하였으며, 발아된 종자는 모래와 펄라이트를 1:1로 혼합한 유리온실의 포트에 이식하였다. 또한 모래와 펄라이트를 1:1로 혼합한 포트에 50립의 종자를 과종하여 온실에서의 발아율을 비교 조사하였다.

패트리디쉬에서 발아하여 포트에 이식한 종자와 직접 상토에 직파한 종자는 일주일간 발아종자의 개수가 변하지 않을 때 발아가 완료된 것으로 간주하고 묘고를 측정하였다.

나) 느릅나무 무성번식

2005년 3월 12일 느릅나무 춘기 숙지삽을 실시하였다. 시료는 강원도 정선군 임계면에 자생하는 느릅나무에서 채취하여 사용하였다. 발근촉진제는 IBA, NAA, Kinetin 300, 500, 1000 및 2000mg/l와 Rootone을 처리하였고, 10개씩 3반복으로 하였다. 상토는 모래로 하였다.

2007년

가) 느릅나무 유성번식

본 실험의 재료는 강원도 평창군 오대산 국립공원 안에 자생하고 있는 당느릅나무와 정선군 임계면에 인공 식재된 느릅나무에서 2006년 5월 13일과 5월 22일에 종자를 채취하여 사용하였다.

5월 13일에 채취한 종자는 오대산 당느릅나무는 10립씩 5반복, 정선 느릅나무는 20립씩 10반복으로 유리온실의 모래 포트에 파종하였으며, 5월 22일에 채취한 종자는 오대산과 정선 모두 23일 10립씩 10반복으로 유리온실의 모래 포트에 파종하고, 오대산 당느릅나무는 10립씩 10반복으로, 정선 느릅나무는 20립씩 10반복으로 petridish에 치상하여 $24\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 로 유지되는 incubator에 넣은 후 발아율과 발아세를 조사하였다.

petridish에 치상한 종자는 유근이 2mm이상 나온 것을 발아된 것으로 하였으며, 유리온실에 파종한 종자는 자엽이 지면 밖으로 나온 것을 발아된 것으로 하였다. 발아세는 발아가 시작된 시점의 발아수와 전체 종자의 비율로 하였다. 그 후 2006년 10월 20일에 생존본수와 묘고를 측정하였다.

나) 느릅나무 기내번식

(1) 식물재료 및 살균방법

당느릅나무(*Ulmus davidiana* Planch) 종자는 강원도 평창군 오대산에서 5월에 수확한 것

을 사용하였다. 종자는 70% EtOH 30초, 2% sodium hypochlorite에 20분간 소독하여 멸균수로 3회 세척 후 종자를 발아 배지에 옮겨 발아 시켰다. 발아 배지는 1/2 MS배지에 2% sucrose, 0.3% gerlite를 사용하였으며, petri dish (15×100 mm) 당 각각 200개의 종자를 과종하여 발아를 유도하였다. 배지의 산도는 pH 5.7로 조절하고 100×15 mm petri dish에 20 ml씩 분주 하였다. 배양은 1일 16시간 조명($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 냉백색 형광등), 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 수행하였다.

(2) 기내 유묘의 뿌리를 이용한 부정근 유도

부정근 유도를 위해 기내에서 5-8 주간 성장한 당느릅나무 유묘의 뿌리를 절편으로 사용하였다. 각 뿌리절편은 약 1.0 cm 크기로 절단하여 각각의 부정근 유도 배지에 치상하였다. 부정근 유도 배지는 1/2 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)배지에 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L IBA를 첨가하고, 이전 예비실험에서 2% sucrose처리 시 부정근 유도를 위해 적절하다는 결과를 얻었으므로, 2% sucrose, 0.3% gerlite 를 첨가하여 부정근을 유도하였다. 배양 6주후 부정근의 절편 당 뿌리수, 뿌리길이와 캘러스의 크기 정도를 조사하였다.

(3) 기내 유묘의 뿌리를 이용한 부정아 유도

부정아 유도 역시 위에서 언급한 부정근을 절편으로 사용하였다. 각 뿌리 절편은 약 1.0 cm으로 절단하여 부정아 유도 배지에 치상하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본으로 4종류의 사이토키닌 (각 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/L zeatin, 2-iP, BA, kinetin) 과 사이토키닌과 옥신 혼합 배지(2.5 mg/L IBA + 각 2.0 mg/L zeatin, 2-iP, BA, kinetin) 에, 이전 예비 실험결과 3% sucrose는 부정아유도를 위한 적절한 농도라는 결과를 얻었으므로, 3% sucrose, 0.3% gerlite 를 첨가하여 부정아를 유도하였다. 각 petri dish 당 절편은 16개씩 치상하였으며, 4반복으로 수행하였다. 배양은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 부정근 유도는 암배양, 부정아유도는 명배양 에서 수행하였다. 치상 6주후 부정아의 형성 빈도, 절편 당 줄기수와 캘러스 크기 정도를 조사하였다.

(4) 배지에 따른 줄기 생장 및 발근

부정아 유도를 통해 형성된 식물체 중 줄기길이 1 cm 정도의 균일한 개체를 선발하여 배지염류에 따른 줄기 생장 및 발근을 유도하기 위한 실험을 수행하였다. 증식 배지는 각각 WPM (Lloyd and McCown Medium, 1981), 1/2 WPM, 1/3 WPM, 1/4 WPM 배지에 2% sucrose, 0.3% gelite를 첨가하여, pH를 5.6 - 5.7로 조정하고 121°C에서 20분간 고압멸균한 후 petri dish (100×15 mm)에 25 mL씩 분주해서 사용하였다. 실험은 petri dish당 25개 절편을 치상하고 3반복으로 수행하였다. 배양은 1일 16시간 조명($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 냉백색 형광등), 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 조절되는 배양실에서 수행하였다. 줄기 증식과 발근은 배지에 치상한 후 4주 후에 조사하였다.

기외 순화를 위해 줄기증식하고 발근된 재분화 식물체는 플라스틱 용기안의 인공배양토 (vermiculite와 perlite를 1 : 1의 비율로 혼합)에 이식하였다. 이식 후 플라스틱 용기는 70% 이상의 고습도를 유지하였고, 배양실 환경 하에서 식물체를 순화하였다.

2. 연구결과

가. 겨우살이

2005년

1) 겨우살이 자생지의 식생구조 및 환경 분석

겨우살이 자생지의 환경을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 해발고는 207~920m까지 매우 다양하게 나타났으나 옥산리를 제외하면 모두 해발 400m 이상에서 출현하였다. 사면방향은 남서사면(4개), 남동사면(2개), 북동사면(1개) 및 북서사면(1개)으로 나타났다. 조사지의 경사는 $10 \sim 20^\circ$ 이하 4곳, $20 \sim 30^\circ$ 이하 3곳, 30° 이상은 1곳 이었다.

Table 13. Environmental characteristics of mistletoe native regions.

Location	Altitude(m)	Direction	Slope(°)
Hongcheon-Gun, Bukbang 1	400	SW190	12
Hongcheon-Gun, Bukbang 2	403	NW340	25
InJe-Gun, Hyun-ri 1	920	SE220	15
InJe-Gun, Hyun-ri 2	910	SW170	10
Chuncheon-City Mt. Gujeul 1	585	SE120	35
Chuncheon-City Mt. Gujeul 2	580	NE30	25
Chuncheon-City Mt. Gujeul 3	483	SW30	24
Wonju-City Oksan-ri	207	SW207	18

박충현 등(2003)은 강원 정선, 충북 청원 및 전북 정읍 등 우리나라 겨우살이 자생지 3곳을 조사한 결과 해발고는 150~800m, 기생고도는 5~10m로 본 연구와 유사한 결과를 보였으나, 기주목은 감나무, 벗나무, 상수리나무, 굴참나무 및 버드나무로 기주목의 종류가 더 다양하였으며, 방위는 북향, 평지지형, 북동사면으로 나타나 본 연구의 결과와 같이 보면 겨우살이는 방위를 가리지 않고 모든 방위에서 착생하는 것으로 사료된다.

Table 14. The dominant species and host trees of mistletoe native regions.

Location	Upper layer	Middle layer	Lower layer	Host tree
Hongcheon-Gun, Bukbang-myeon 1	<i>Quercus mongolica</i>	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>	<i>Disporum smilacinum</i>	<i>Quercus mongolica</i>
Hongcheon-Gun, Bukbang-myeon 2	<i>Quercus mongolica</i> / <i>Betula schmidtii</i>	<i>Rhododendron schlippenbachii</i>	<i>Carex humilis</i> / <i>Disporum smilacinum</i>	<i>Betula schmidtii</i>
Inje-Gun, Hyeon-ri 1	<i>Quercus mongolica</i>	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	<i>Carex siderosticta</i> / <i>Veratrum maackii</i> var. <i>japonicum</i>	<i>Quercus mongolica</i>
Inje-Gun, Hyeon-ri 2	<i>Quercus mongolica</i>	<i>Lespedeza maximowiczii</i>	<i>Atractylodes japonica</i> / <i>Codonopsis lanceolata</i>	<i>Quercus mongolica</i>
Chuncheon-City, Mt. Gujeul 1	<i>Quercus mongolica</i>	<i>Lindera obtusiloba</i>	<i>Carex siderosticta</i> / <i>Atractylodes japonica</i>	<i>Quercus mongolica</i>
Chuncheon-City, Mt. Gujeul 2	<i>Quercus variabilis</i>	<i>Lindera obtusiloba</i> / <i>Lespedeza maximowiczii</i>	<i>Artemisia keiskeana</i> / <i>Rubus crataegifolius</i>	<i>Quercus variabilis</i>
Chuncheon-City, Mt. Gujeul 3	<i>Quercus variabilis</i>	<i>Lindera obtusiloba</i>	<i>Carex humilis</i>	<i>Quercus acutissima</i>
Wonju-City, Oksan-ri	<i>Quercus acutissima</i> / <i>Quercus aliena</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Fallopia dumetora</i>	<i>Quercus acutissima</i> / <i>Quercus aliena</i>

북방면1에서는 상층에서 신갈나무가, 중층에서는 철쭉이, 하층에서는 애기나리가 우점종으

로, 북방면2에서는 상층에서 신갈나무와 박달나무가, 중층에서는 철쭉이, 하층에서는 산겨울과 애기나리가 우점종으로 나타났다. 또한 북방면1에서는 신갈나무가, 북방면2에서 신갈나무와 박달나무가 겨우살이 출현 수종이었다.

현리1에서는 상층에서 신갈나무가, 중층에서는 조록싸리가, 하층에서는 대사초와 여로가 우점종으로, 현리2에서는 상층에서 신갈나무가, 중층에서는 조록싸리가, 하층에서는 삼주와 더덕이 우점종으로 나타났다. 또한 현리1과 2에서 겨우살이가 출현한 수종은 신갈나무였다.

구절산1에서는 상층에서 신갈나무가, 중층에서는 생강나무가, 하층에서는 대사초와 삼주가 우점종으로, 구절산2에서는 상층에서 굴참나무가, 중층에서는 생강나무와 조록싸리가, 하층에서는 맑은대쭉과 산딸기가 우점종으로, 구절산3에서는 상층에서 굴참나무가, 중층에서는 생강나무가, 하층에서는 산겨울이 우점종으로 나타났다. 또한 구절산1, 2, 3에서 겨우살이가 출현한 수종은 각각 신갈, 굴참, 갈참나무였다.

옥산리에서는 상층에서 상수리나무와 갈참나무가, 중층에서는 아카시나무가, 하층에서는 닭의덩굴이 우점종으로 나타났다. 또한 옥산리에서 겨우살이가 출현한 수종은 갈참나무와 상수리나무였다.

북방면2의 박달나무를 제외하면 본 연구에서 조사한 모든 조사지에서 상층의 우점종이 참나무과(신갈, 갈참, 굴참, 상수리나무)로 나타났으며, 겨우살이가 출현한 수종 또한 북방면2의 박달나무를 제외하면 모두 참나무과 수종이었다.

국내에서 보고 되고 있는 겨우살이의 기주식물들은 대개 신갈, 상수리, 굴참 등의 참나무과 수종과 더불어 밤나무, 박달나무, 감나무, 버드나무 및 자작나무 등의 낙엽활엽수로 아주 드물게는 소나무와 같은 침엽수종에서도 발견되었다는 말이 있기는 하지만 본 연구에서는 찾을 수 없었다. 또한 겨우살이 번식의 매개체 역할을 하는 조류의 서식 및 생태 그리고 참나무과와 같은 낙엽활엽수에 주로 번식하는 이유에 대한 연구가 병행되어야 할 것이다.

2) 겨우살이 유·무성번식

(1) 무성번식

① 줄기삽목

옥산리와 구절산에서 채취하여 실시한 줄기 삽목은 1일 1회 또는 필요시 2회까지 충분한 관수를 하였지만 1-2주 사이에 모든 삽수가 갈변 고사하였다. 이는 삽수의 절단면을 통해 수분이 흡수되지 못한 것으로 사료되며, 처음 1주일까지는 삽수의 자체양분으로 생존하였으나, 이 후 자체양분이 소실되고 수분과 양분을 흡수하지 못하고 고사한 것으로 생각된다.

앞으로 안개분무 시설이나 양액상태에서의 실험이 필요할 것이나, 삽수의 생존기간이 너무 짧아 흡기의 유도에 많은 어려움이 있을 것으로 사료된다.

② 조직배양

고체배지(1/2 MS + 2% sucrose + 0.3% gelrite)의 경우 삼목실험과 유사한 결과를 나타내었는데, 역시 1주 ~ 2주 사이에 갈변과 함께 엽이 탈락하며 모두 고사하였다.

또한 목본류의 조직배양 특히 활엽수종의 액아 배양 시 흔히 나타나는, 절편의 기부에서 페놀성 물질이 분비되는 현상이 나타났다. 페놀성 물질은 절편의 기부와 배지를 검게 만들고 이로 인해 잎의 갈변화 현상과 줄기가 생장억제 되는 현상이 나타나 결국 고사하게 된다. 이러한 페놀물질의 억제를 위해 절편을 액체배지에서 전처리 하는 것이다.

액체배지(1/2 MS + 2% sucrose)의 경우 다경 유도 과정에서 절편의 기부로부터 페놀성 물질이 분비하였지만 유동성이 있어서 고체배지와는 달리 미약하였다. 페놀성 물질이 분비된 절편의 기부를 절단한 뒤, 다시 액체배지로 옮겨주는 계대배양 후 액아의 미세한 생장이 나타났다. 그러나 GA₃ 0.5mg/L을 첨가한 액체배지에 옮긴 후 액아가 부풀어 오르는 현상을 보인 다음 탈락하여 모두 고사하였다. 액체배지의 경우 계대배양을 4주에 한번 주기로 하였으므로 약 8주이상을 생존한 것이다. 이는 절편의 절단면에서 수분과 양분의 흡수가 있었음을 알 수 있으며, 절편의 생존기간을 연장할 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 유성번식

① 인공재배를 위한 실내실험

현재 실험이 계속 진행 중이며 아직 특이할만한 가시적인 변화를 보이지 않고 있다. 원래 비립 종자일 것으로 사료되는 일부 종자만이 고사하였고 나머지 종자들은 아직 접종 초기의 상태를 유지하고 있다. 차후 경과를 지켜본 후 성적 조사를 실시할 것이다.

② 인공접종

현재 실험이 계속 진행 중이며 아직 특이할만한 가시적인 변화를 보이지 않고 있다. 원래 비립 종자일 것으로 사료되는 일부 종자만이 고사하였고 나머지 종자들은 아직 접종 초기의 상태를 유지하고 있다. 차후 경과를 지켜본 후 성적 조사를 실시할 것이다.

2006년

1) 겨우살이 화기조사

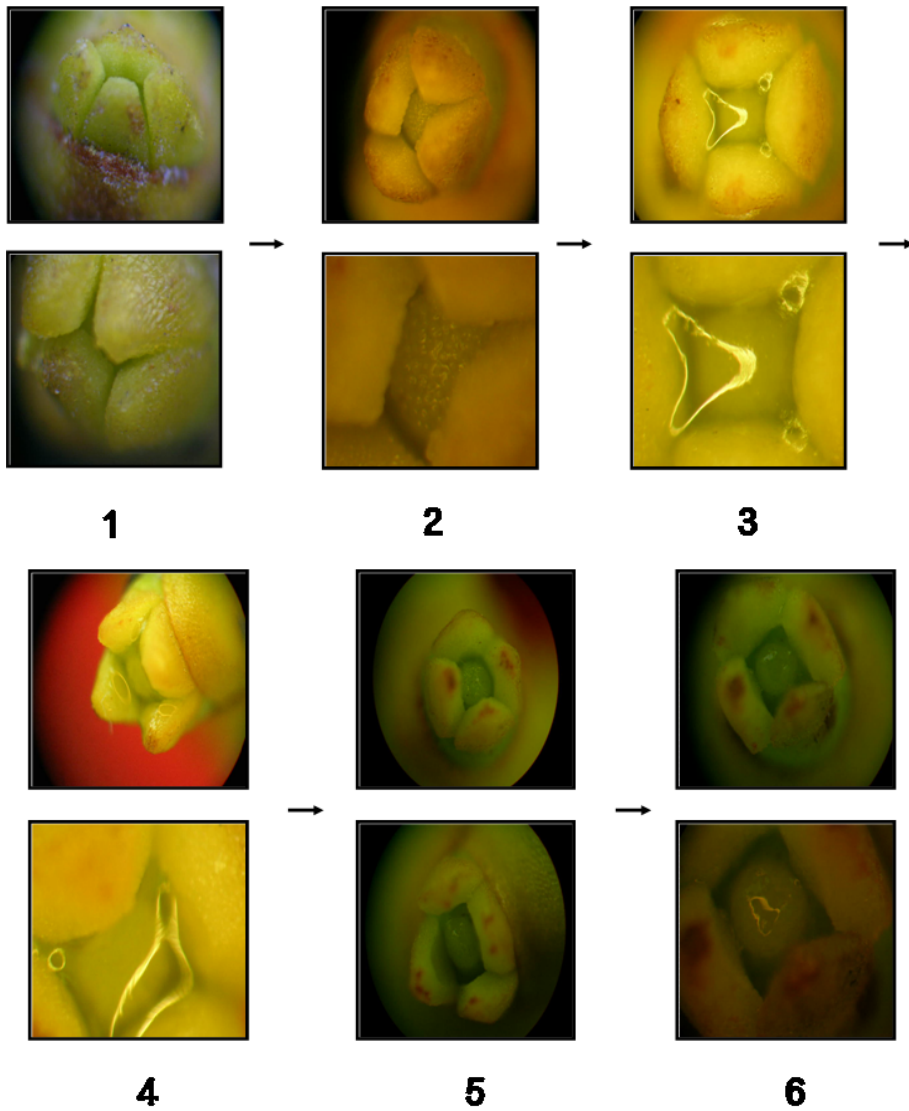


Fig 47. 시기별 암꽃의 모습

겨우살이의 암꽃은 최초 꽃잎이 벌어지기 시작하여(1번) 시간이 지남에 따라 점점 더 벌어져 자방이 보이기 시작한다(2번). 이 후 수꽃의 화분이 날리기 직전에 꽃잎이 완전히 벌어지고 점성을 가진 물질이 분비되는데(3번, 4번) 이는 화분의 점착을 쉽게하고 수분이 잘 이루어지기 위함이라 사료된다. 수분이 이루어지면 점성물질이 사라지고(5번), 종자가 성숙하기 위해 준비한다(6번).

이렇게 겨우살이의 암꽃은 약 6단계의 발달단계를 거치는 것으로 생각된다. 그러나 본 조

사가 날짜별로 이루어지지 않고 그냥 단계만 나타낸 것은 겨우살이가 개체별로 매우 큰 성숙단계의 차이를 보여주었기 때문인데, 조사시기별로 같은시간, 같은장소에서도 1, 2, 3번, 2, 3, 4번 및 3, 4, 5번 등의 단계가 같이 발견되었다.

겨우살이의 수꽃은 최초 부풀어 오르듯 크기가 커지고(1번), 이 후 시간이 지남에 따라 절개선이 보이기 시작한 후(2번) 절개선을 따라 4갈래로 벌어진다(3번). 최초 화분의 색은 흰색에 가깝다가 성숙하기 시작하면 노랑색으로 변하여(4번) 성숙이 모두 끝나면 바람에 따라 비산한다(5번).

수꽃은 약 5단계를 거쳐 비산하게 되는데 암꽃과 마찬가지로 개체별로 매우 큰 차이의 성숙단계를 보여주었다.

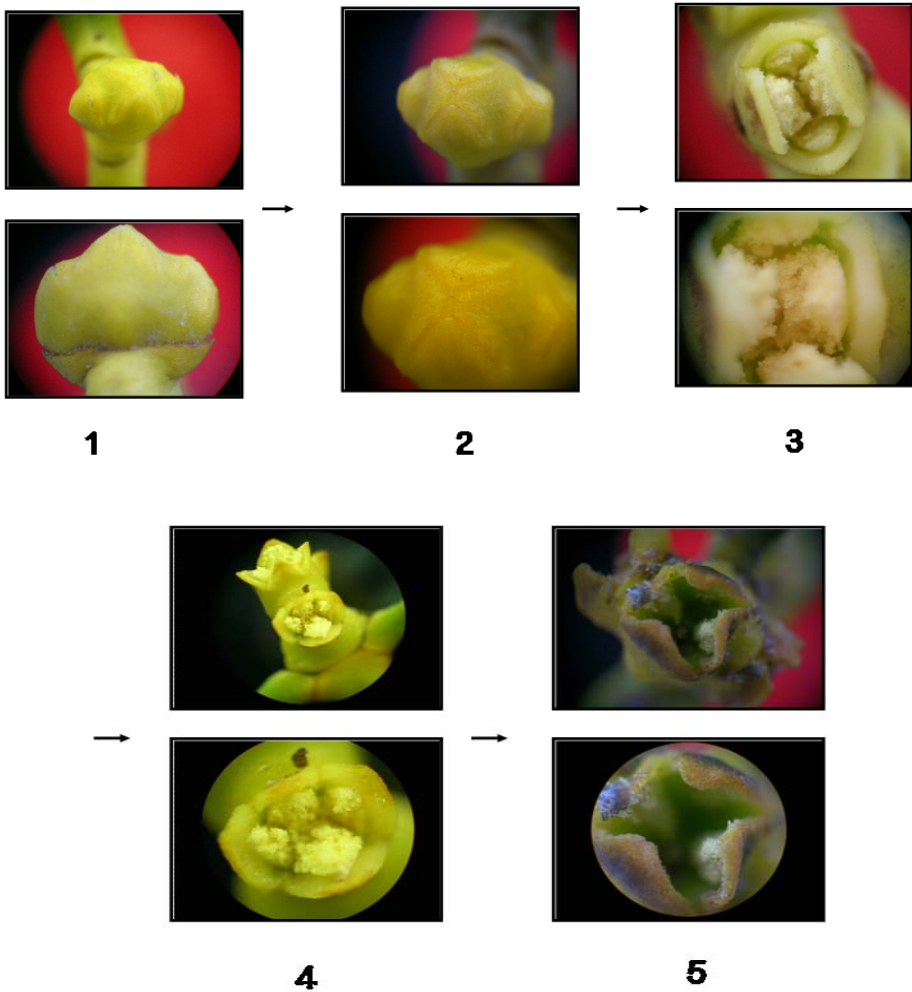


Fig 48. 시기별 수꽃의 모습

2) 겨우살이 흡기 구조 조사

겨우살이의 흡기는 기주식물의 수체에 침투하여 식물체를 지지하고 물과 무기양분을 흡수하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 기생식물의 종류는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 기주식물에 물과 양분을 전적으로 의존하는 완전기생식물과 기주식물에 물과 양분을 의존하기는 하지만 광합성 능력을 가지고 있는 반기생식물이다.

겨우살이 흡기의 구조를 살펴보면, 식물체의 지지와 지탱을 위해 큰 몇 개의 흡기가 기주목의 중앙부까지 침투하고, 이렇게 깊숙이 침투한 흡기에서 중앙부와 반대쪽으로 흡기가 뻗은 후 여기에서 다시 중앙부 쪽으로 조그맣고 가는 여러 개의 흡기가 발생하여 기주목의 형성층을 중심으로 원형으로 배열된 복잡한 구조를 가지고 있었다. 형성층을 중심으로 둥글게 뻗은 흡기가 물과 무기양분을 흡수하는 주 임무를 가진 것으로 사료된다.

이는 단순히 중앙을 향해 일자로 침투하는 쐐기형의 흡기를 가진 현삼과, 열당과 및 새삼속의 기생식물과는 차이를 보인다.

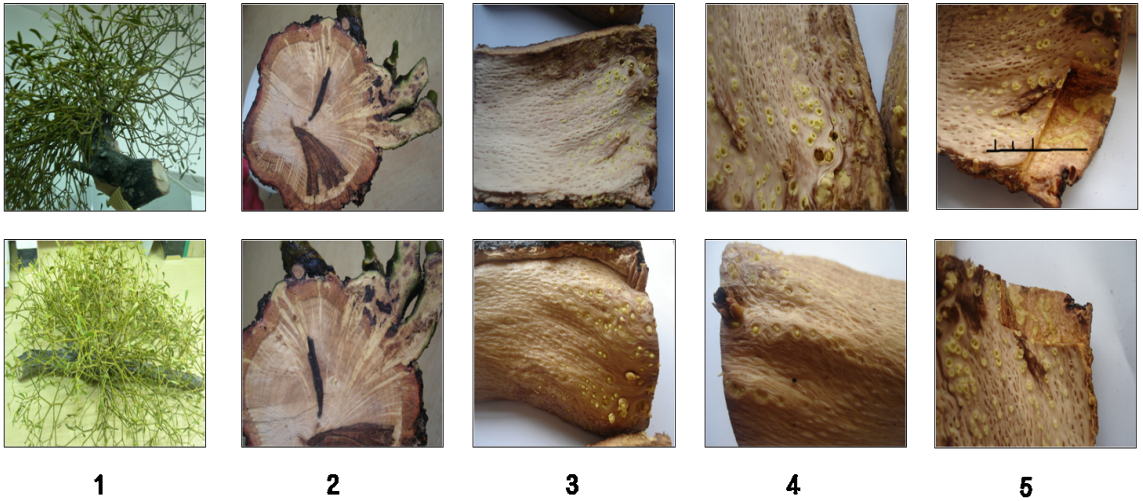


Fig 49. 겨우살이 흡기의 구조와 배열

3) 겨우살이 화분구조 조사

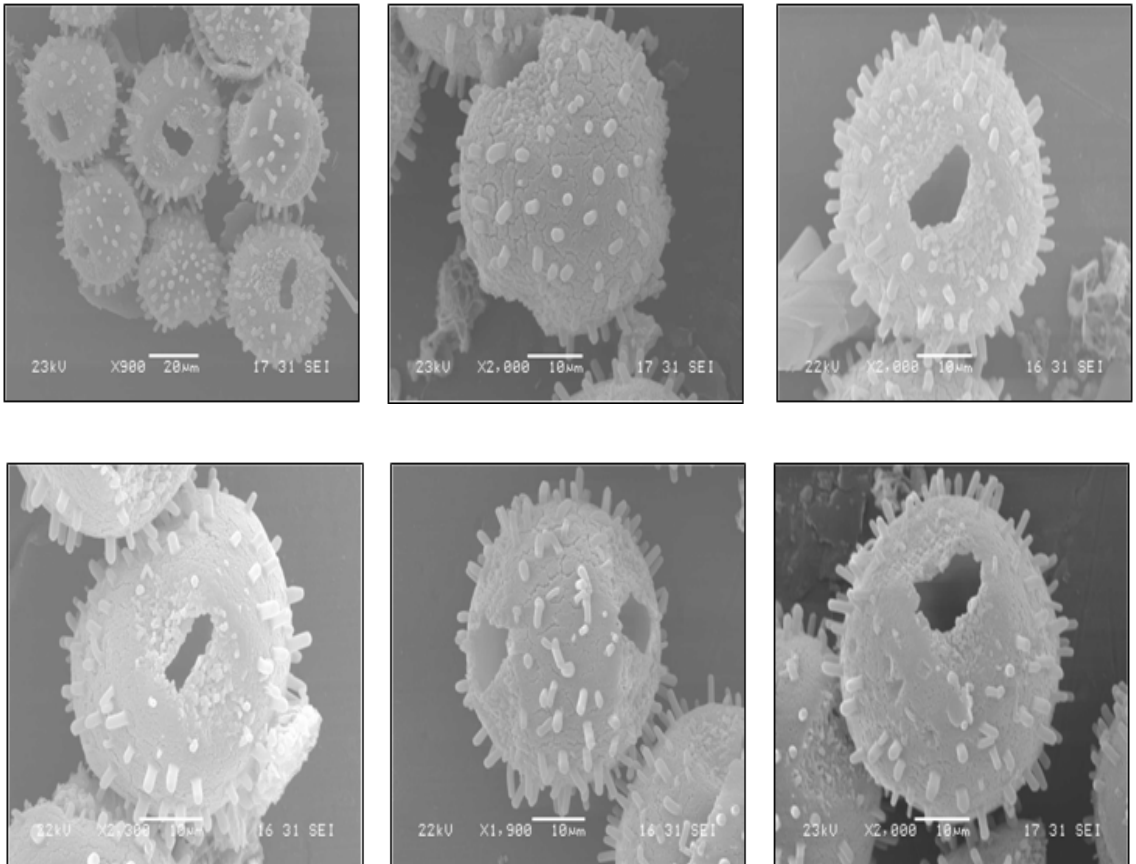


Fig 50. 겨우살이 화분의 전체적 모양

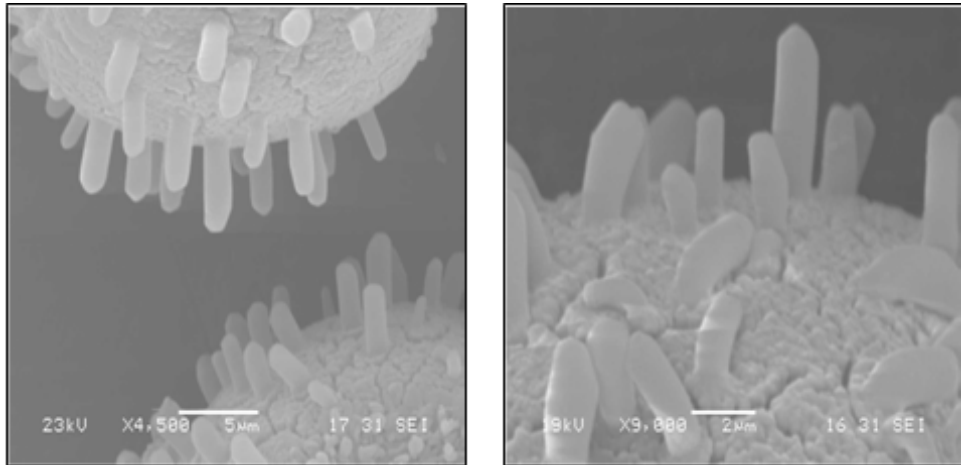


Fig 51. 돌기와 화분표면의 모양

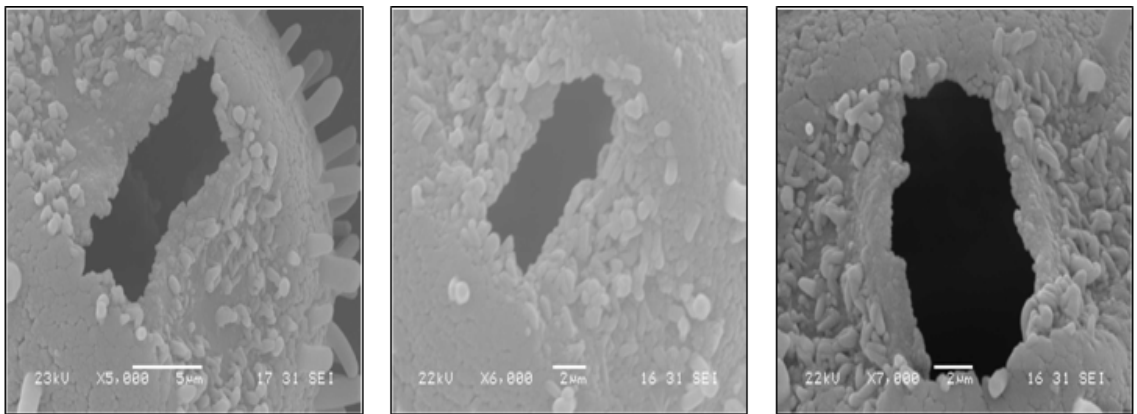


Fig 52. 발아공의 모양

겨우살이의 화분이 성숙하여 비산하기 직전 채취하여 전처리 후 주사전자현미경으로 관찰한 겨우살이 화분의 모양은 아래의 그림과 같다.

겨우살이 화분의 모양은 전체적으로 원형이며, 입상은 단립이고, 표면무늬는 난선상이다. 또한 극성은 등극성이고, 발아구의 형태는 3공구형이며, 층상구조(피복성)는 전피복성으로 나타났다.

2007년

1) 겨우살이 유성번식

뽕나무에 접종한 총 65개의 종자 중 60개의 종자에서 흡기가 발생하였으며, 흡기가 발생한 사진은 Fig 53과 같다.



Fig 53. 겨우살이 종자의 흡기 발생사진

1, 2년차 종자실험에서 보다 더 나은 흡기 발생을 유도하였지만, 아직 활착이 되어진 것은 아니므로 기간이 더 필요할 것으로 사료된다.

3) 겨우살이 유전분석

가) 유전적다양성

겨우살이 유전변이 분석에 사용된 4개의 I-SSR primer(#818, 826, 830, 855)에서 총 32개의 증폭 산물을 관찰 하였으며, primer당 평균 8개의 다형성 증폭 산물을 얻을 수 있었다 (Fig 54).

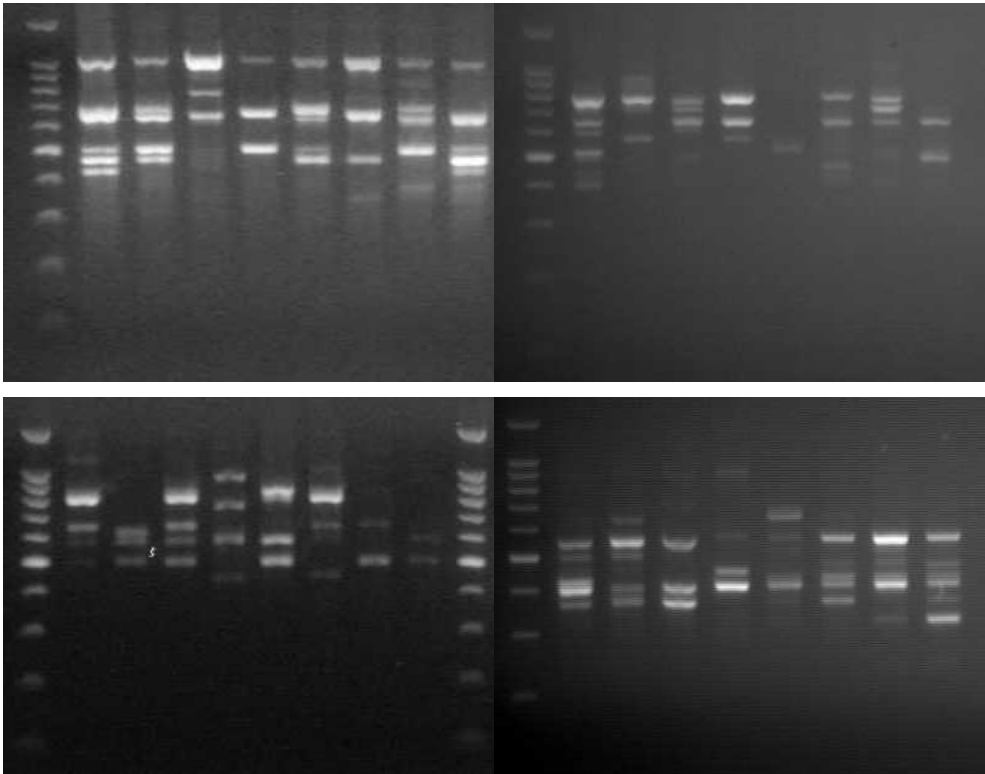


Fig 54. UBC I-SSR primer #818, 826, 830, 855를 이용한 증폭산물

다형성 I-SSR 표지자의 비율은 전체평균 90.6%으로 나타났으며, 4개의 I-SSR primer에서 총 32개의 증폭산물을 초대로 shannon의 유전다양성지수를 계산한 결과 평균 0.4579로 비자나무(S.I.=0.353;Hong et al., 2000), 은행나무(S.I.=0.388;Hong et al., 2001) 보다는 다소 높은 유전다양도를 나타냈으며 구상나무(S.I.=0.492;강, 200), 주목(S.I.=0.478;Kwon, 2002)보다는 낮았다.

나. 느 립 나 무

2005년

1) 느릅나무 무성번식

3개월 후 성적조사를 실시하였으나 결과를 얻지 못하였다.

2006년

1) 느릅나무의 유성번식(느릅나무와 당느릅나무의 종자 채취 시기별 발아율과 묘목생장)

정선의 느릅나무와 평창의 당느릅나무의 시기별 과실의 크기와 종자의 크기 및 종자의 충실율을 조사한 결과는 표 1과 같다. 과실크기는 종자에 날개가 부착되어 있는 채로 측정하였고, 종자크기는 날개를 제거한 후 측정하였다. 당느릅나무와 느릅나무의 종자를 비교해 보면 과실길이, 폭, 종자길이 및 폭 모두 느릅나무가 당느릅나무 보다 크게 나타났으며, 과실의 길이와 폭의 비율은 느릅나무는 최대 0.90으로 원형에 가까웠으나 당느릅나무는 0.73으로 타원형에 가까워 과실의 형태 또한 차이가 있었다. 과실의 색깔은 밝은 녹색 또는 진한 녹색을 띠고 있다가 과실이 낙과하기 시작하면 탈색되어 노랑색을 띠기 시작한다. 이 후 낙과가 더욱 진행되면 노랑 또는 흰색에 가까운 밝은 노랑을 띠게 된다. 종자의 충실율은 느릅나무가 71.3%로 당느릅나무의 47.7%보다 높게 나타났다. 이는 화분의 양과 관련이 있는 것으로 생각되는데, 정선의 느릅나무는 약 80-100본 정도의 느릅나무가 균락을 이루고 있어 개체수가 많고, 화분의 양도 충분한데 비해, 평창의 당느릅나무는 8-10본 정도에 불과해 개체수가 적고, 개화기 화분의 양이 부족한 것이 충실율의 차이로 나타난 것이라 사료된다.

과실과 종자의 외형적 성장을 살펴보면, 느릅나무는 종자가 모두 낙과하기 직전에 성장이 완료되었으나, 당느릅나무는 종자가 모두 낙과하기 약 2주전에 외형적 성장이 완료되는 것으로 나타났다.

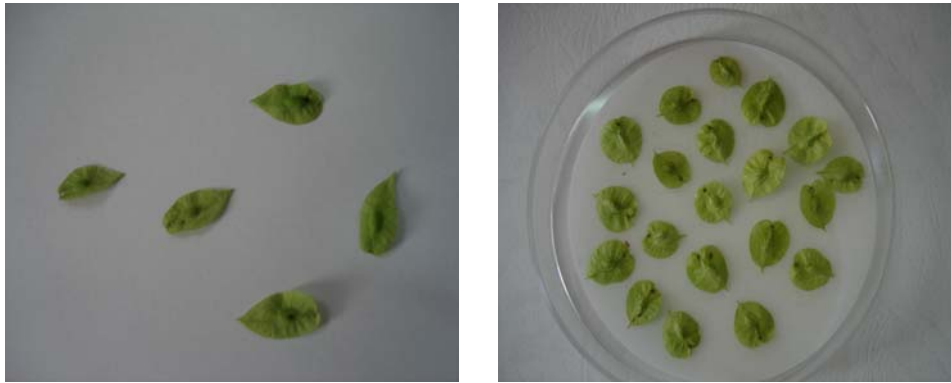


Fig 55. 당느릅나무(좌)와 느릅나무(우) 과실

Table 15. The characteristics of fruit and seed by collecting date. (Unit : mm)

Source	Date	Color	Fruit			Seed		
			Length**	Width**	W/ L	Length**	Width	full seed(%)
Jeong -seon	4/28	G	11.7±1.07(A)	9.9±1.06(A)	0.8 5	4.6±0.68(A)	3.2±0.42	-
(<i>Ulmus davidiana</i>	5/7	G	14.6±1.14(B)	13.2±1.10(B)	0.9 0	4.5±0.43(A)	3.2±0.36	-
var. <i>japonica</i>	5/13	G, Y	15.2±1.57(C)	13.6±1.00(C)	0.8 9	5.1±0.49(B)	3.3±0.36	71.3
NAK.)	5/22	L Y	No fruits available					
Source	Date	Color	Fruit			Seed		
			Length*	Width**	W/ L	Length**	Width*	full seed(%)
Pyeong -chang (<i>Ulmus davidiana</i> PLANCH)	5/7	G	14.4±1.83(AB)	8.3±1.18(A)	0.5 8	4.0±0.63(A)	2.8±0.54(AB)	-
	5/13	G	14.1±1.81(A)	8.5±0.71(A)	0.6 0	4.1±0.43(A)	2.6±1.16(A)	-
	5/22	G	14.9±1.63(B)	10.9±0.52(B)	0.7 3	4.3±0.72(B)	2.9±0.75(AB)	-
	5/28	G, Y	15.1±1.61(B)	11.0±0.94(B)	0.7 3	4.4±0.54(B)	3.1±0.32(B)	47.7
	6/3	L Y	No fruits available					

** and * : Significantly different at 1% and 5% level, respectively.
G - green ; Y - yellow ; L Y - light yellow

정선과 평창에서 자생하는 느릅나무와 당느릅나무의 종자를 1주일 간격으로 채취하여 페트리디쉬에 치상한 후 발아율을 조사한 결과는 표 2와 같다.

느릅나무는 종자가 모두 낙과하기 약 2주전에 채취한 종자의 발아율이 78%, 약 1주전에 채취한 종자의 발아율이 84%로 나타났다. 치상 4일째 발아종자의 80%이상이 발아하였고, 1주일 안에 발아가 종료하였다. 발아세는 치상 후 2일 후부터 약 2일 동안이라 하겠다. 당느릅나무는 종자가 모두 낙과하기 약 2주전에 채취한 종자의 발아율이 34%, 약 1주전에 채취한 종자의 발아율이 91%로 나타났다. 느릅나무와 같이 치상 4일째 발아종자의 80%이상이 발아하였고, 1주일 안에 발아가 종료하였다. 발아세는 치상 후 2일 후부터 약 2일 동안이라 하겠다. 느릅나무와 당느릅나무 모두 종자가 낙과하기 전 약 2주 동안 종자의 발아력이 있었으나, 낙과 전 약 1주일 동안의 발아율이 높게 나타났다. 이것은 당느릅나무에서 특히 강하게 나타났는데, 결과로 보아 느릅나무와 당느릅나무는 종자의 채취시기가 발아에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

본 조사에서 가장 발아력이 높았던 시기는 느릅나무가 5월 중순, 당느릅나무가 5월 하순으로 나타났으나, 이것은 매년, 지역, 온도 및 해발고 등에 따라 달라질 수 있으므로 느릅나무류와 같이 종자의 성숙기간이 짧은 수종은 종자의 채취시기를 날짜로 규정짓기 보다 매년 일정한 지표자(indicator)를 찾는 것이 필요하다고 사료된다.

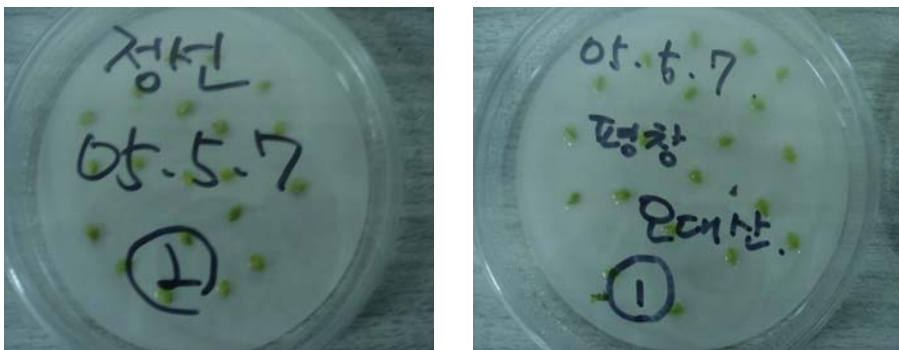


Fig 56. 페트리디쉬에 치상된 종자들

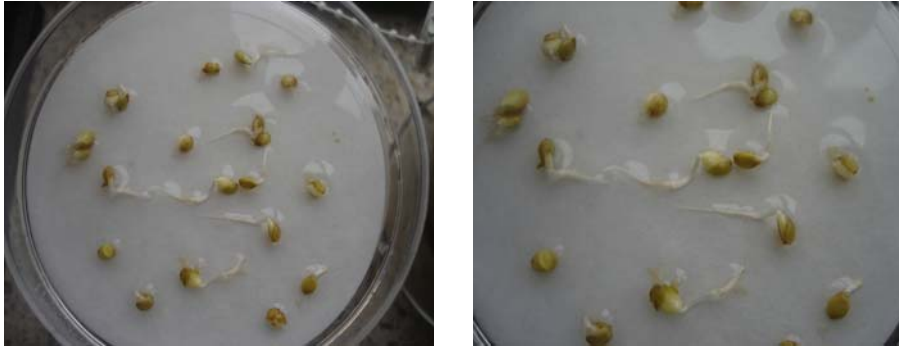


Fig 57. 발아된 종자들

Table 16. The germination rate of *Ulmus davidiana* and *Ulmus davidiana* var. *japonica* in petridish by collecting date.

Source	Collecting Date	Germination rate(%)
Jeong-seon (<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> NAK.)	4/28	0
	5/7	78
	5/13	84
	5/22	No fruits available
Pyeong-chang (<i>Ulmus davidiana</i> PLANCH)	4/28	0
	5/7	0
	5/13	0
	5/22	34
	5/28	91
	6/3	No fruits available

표 16의 페트리디쉬에서 유근이 2mm 정도 자란 종자는 즉시 유리온실의 포트에 이식하였다. 이 후 복토된 상토를 뚫고 유경이 출현한 것을 진정한 발아로 보고 결과를 조사하였다. 그 결과는 표 17에 나타내었다.

느릅나무는 상토 이식 후 4-5일이 지나면서 유경이 출현하기 시작되었고, 5월 7일 채취하

여 패트리디쉬에서 발아시킨 78개 중 36개가 유경이 출현하여 46.2%, 5월 13일 채취하여 패트리디쉬에서 발아시킨 84개 중 79개가 유경이 출현하여 94.1%의 유경출현율을 나타내었다.

Table 17. Germination percentage after transplant of germinated seed in petri-dish.

Source	Collecting Date	Transplantin g Date	Transplantin g No.	Survival No.	Survival rate(%)
Jeong-seon (<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> NAK.)	5/7	5/8	78	36	46.2
	5/13	5/14	84	79	94.1
Pyeong -chang (<i>Ulmus davidiana</i> PLANCH)	5/22	5/27	34	24	70.6
	5/28	5/30	91	91	100.0

당느릅나무는 상토 이식 후 2-3일이 지나면서 발아가 시작되었고, 5월 22일 채취하여 패트리디쉬에서 발아시킨 34개 중 24개가 유경이 출현하여 70.6%, 5월 28일 채취하여 패트리디쉬에서 발아시킨 91개 중 91개 모두 유경이 출현하여 100.0%의 유경출현율을 나타내었다.

느릅나무와 당느릅나무 모두 과실이 낙과하기 1주일 전에 채취한 것이 더 높은 발아율을 나타내었으나, 성숙시기는 약 2주정도의 차이를 나타내었다.

느릅나무와 당느릅나무 모두 낙과 2주전에 채취한 종자에서 발아 종자의 형질이 불량하여 발아가 완료되기 전 일부 묘목이 고사하는 현상이 나타났다.



Fig 58. 포트에 이식된 종자들

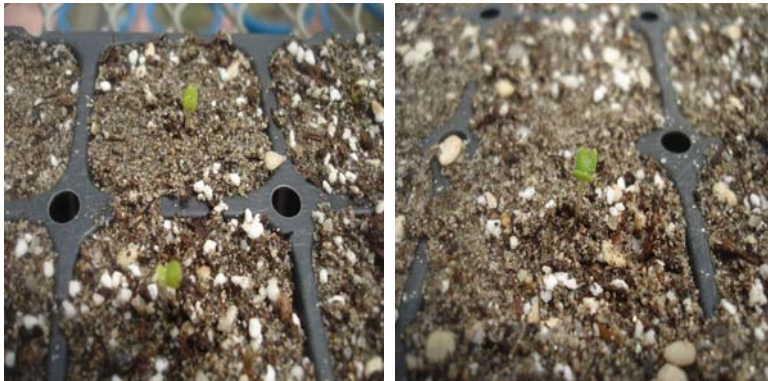


Fig 59. 이식 후 유경이 나오기 시작한 종자들

같은 시기에 채취한 종자를 상토에 직접 직파한 종자의 발아율 결과는 표 4에 나타내었다. 발아는 4-7일 후부터 시작되었고 10일 안에 대부분의 종자가 발아하였다.

느릅나무는 5월 7일 채취한 종자의 발아율이 66.0%, 5월 13일 채취한 종자의 발아율이 82.0%를 나타내었고, 당느릅나무는 5월 28일 채취한 종자의 발아율이 88.0%를 나타내 같은 채취시기의 표3의 결과와 비교해 보면, 각각 36.0%, 79.0% 및 91.0%로 같은 경향을 나타냈지만 전체적으로 직접 파종한 종자의 발아율이 높게 나타났다. 당느릅나무는 시료의 문제로 5월 22일의 실험을 수행하지 못하였으나 같은 경향을 나타내었을 것으로 사료된다.

Table 18. Germination percentage of direct seeding.

Source	Collecting Date	Germination rate(%)
Jeong-seon (<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> NAK.)	5/7	66.0
	5/13	82.0
Pyeong-chang (<i>Ulmus davidiana</i> PLANCH)	5/28	88.0

패트리디쉬에서 발아한 종자를 포트에 이식한 것과 직접 상토에 직파한 종자의 발아는 일주일간 발아종자의 개수가 변하지 않을 때 발아가 완료된 것으로 간주하고 묘고를 측정하였다. 각 실험의 묘고를 측정한 결과는 표 5에 나타내었다. 느릅나무는 5월 13일 채취하여 직파한 종자의 묘고가 3.68cm로 가장 크게 나타났으며, 발아 일수 또한 14일로 가장 작게 나타났다. 당느릅나무는 5월 28일 채취하여 직파한 종자의 묘고가 3.37cm로 가장 크게 나타났으며, 발아일수 또한 13일로 가장 작게 나타났다. 채취 시기별 묘고의 차이는 낙과 1주전에 채취한 종자의 묘고가 더 크게 나타났다.



Fig 60. 묘고를 측정하기 전 당느릅나무



Fig 61. 묘고를 측정하기 전 느릅나무

Table 19. Seedling height by treatment.

Source	Collecting Date	Transplanting	※	Direct Seeding	※
Jeong-seon** (<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> NAK.)	5/7	2.33cm±0.89(A)	20	2.84cm±0.80(B)	16
	5/13	3.18cm±1.09(B)	14	3.68cm±0.88(C)	14
Pyeong-chang** (<i>Ulmus davidiana</i> PLANCH)	5/22	1.89cm±0.76(A)	15	No test	-
	5/28	3.26cm±0.53(B)	15	3.37cm±0.49(B)	13

※ : The number of days from germination to measurement.

** : Significantly different at 1% level, respectively.

2007년

1) 느릅나무 유성번식

정선군 임계면의 느릅나무와 평창군 오대산 국립공원 내의 당느릅나무의 종자의 발아 특성은 채취시기와 파종시기별로 차이를 나타냈다(Table 20).

Table 20. The germination number and rate of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.).

		Germination number												rate		
		5/14	5/15	5/16	5/17	5/18	5/19	5/20	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	
Ohdae Mt.		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	9	9	9	9	46.0
greenhouse		5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9		
(Total 50)		9	22	22	22	22	22	22	23	23	23	23	23	23		
Jeongseon		0	0	0	0	0	0	63	108	164	165	168	171	171	85.5	
greenhouse		5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9		
(Total 200)		171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171		
Ohdae Mt.		0	0	0	0	1	1	61	61	61	61	61	67	67	70.0	
greenhouse		6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15					
(Total 100)		70	70	70	70	70	70	70	70	70	70					
Jeongseon		0	0	0	0	85	86	95	98	98	98	98	98	98	98.0	
greenhouse		6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	6/15					
(Total 100)		98	98	98	98	98	98	98	98	98	98					
Ohdae Mt.		0	0	0	1	7	14	29	29	29	29	29	29	29	14.5	
petridish																
(Total 200)																
Jeongseon		14	21	65	115	126	129	143	145	145	145	145	145	145	72.5	
petridish																
(Total 200)																

온실 파종은 발아율이 5월 14일과 5월 23일 각각에서 파종했을 때 정선군 임계면의 느릅나무가 발아율이 높았다(Figure 62, 63). 채취시기별로 보면 5월 22일에 채취한 종자의 발아율이 높게 나타났다. 또한 5월 13일 채취한 종자보다 5월 22일 채

취한 종자가 초기 발아가 더 빨리 나타났다. 5월 22일은 외형적으로 거의 성숙 단계에 이른 시기였다. 일반적으로 종자는 성숙도에 따라 유숙기, 황숙기, 과숙기로 구분하는데 유숙기는 종피의 색깔이 녹색을 띠며, 황숙기는 종피의 색깔이 황색 내지 갈색을 띠고 종자의 내용이 충만하게 응고되어있다. 과숙기는 과도한 건조로 인하여 종피 내의 성분에 변화가 생겨 수분의 침투 작용이 곤란해져서 발아력이 저하된 때를 가리킨다 (임업연구원, 1994).

정선군 임계면의 경우 5월 13일은 종피가 녹색을 띠는 유숙기 였으며 5%정도의 종자는 황숙기 형태인 것도 보였으며, 5월 22일은 종피의 색이 황색을 띠는 황숙기 말 무렵이었다. 평창군 오대산의 경우는 5월 13일은 종피가 확연한 녹색을 띠는 유숙기였으며, 5월 22일의 경우도 유숙기를 완전히 벗어나지는 못했으며 확실히 황숙기로 접어든 상태도 아니었기 때문에 정선군 임계면의 경우에 비해 종자의 충실도가 떨어졌다. 이는 느릅나무와 당느릅나무의 수종간에 시기별로 종자의 성숙기가 다른 것과 지역차로 인한 것이다.

당느릅나무의 발아율에 관한 다른 연구는 4월 21일과 28일에는 전혀 발아하지 않았고 외형적으로 거의 성숙 단계에 이른 시기인 5월 5일에 채취한 종자는 89.5%로 가장 높은 발아율을 나타내었고 이후 점차 감소하였다는 결과가 있다. 또 이 연구에서는 5월 5일에 채취한 종자의 경우 3.46일 이후 발아를 시작했고 5월 26일 채취한 종자는 2.93일에 발아가 시작해 감소했다. 이는 늦게 채취한 종자일수록 발아기간이 짧았다는 것을 나타낸다(김태수 등). 또 느릅나무 종자를 정선, 평창, 포천 지역에서 채취하여 발아율을 조사한 연구에서 정선지역은 집단적으로 느릅나무 군락을 형성하고 있기 때문에 정선의 종자가 발아율이 높았다는 연구결과가 있다(김태수 등).

5월 22일에 채취한 종자의 경우 온실 파종과 petridish에 치상하여 incubator에 넣어 발아율을 측정 한 것을 비교하면 초기 발아율은 petridish에 치상하여 incubator에 넣은 것이 높았으나, 온실 파종이 한번 발아가 시작되면 높은 발아율을 나타내었다 (Figure 63, 64).

incubator의 온도가 발아에 온실에 비해 적합한 환경을 제공했으므로 초기 발아율은 높으나 수분부족으로 인해 발아율이 초기발아율 이상으로 크게 상승하지는 못

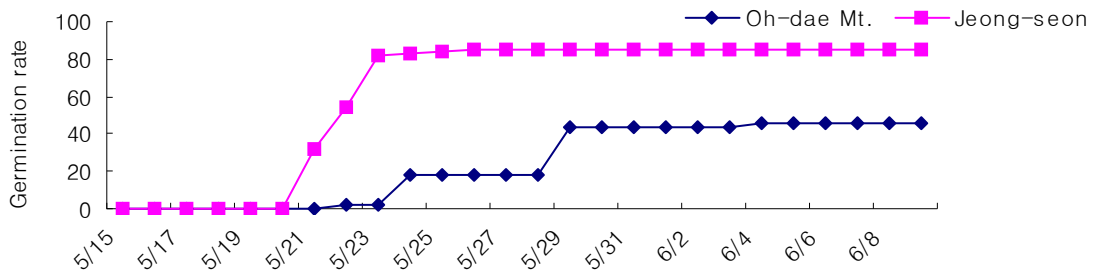


Fig 62. The germination number of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.) in greenhouse by collecting 13. May as being seeding by 14. May.

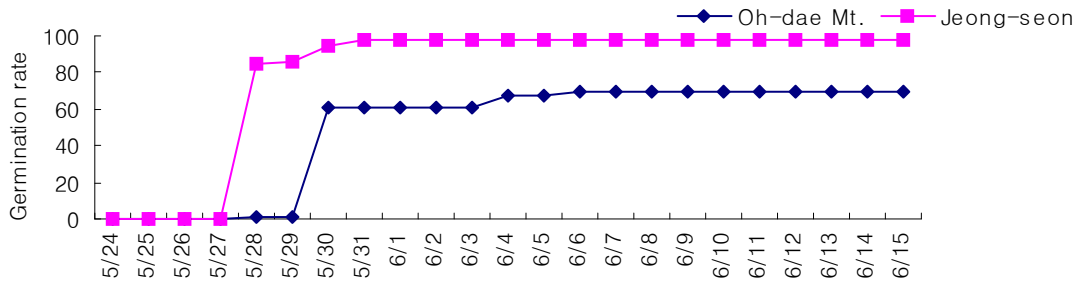


Fig 63. The germination number of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.) in greenhouse by collecting 22. May as being seeding by 23. May.

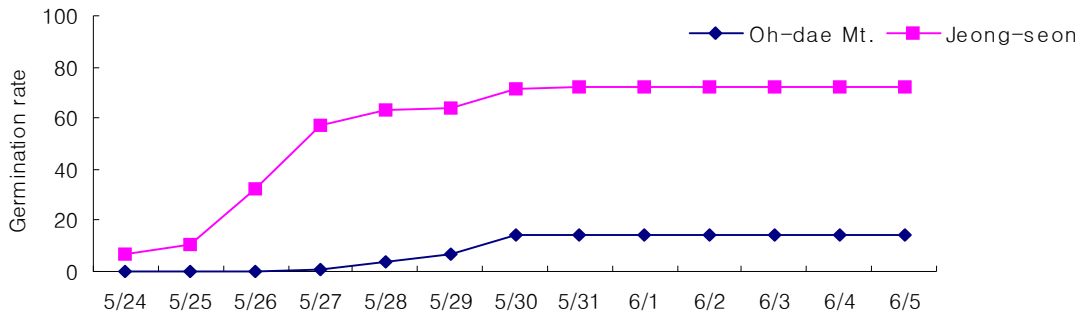


Fig 64. The germination number of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.) in petridish by collecting 22. May as being setting by 23. May.

한 것으로 생각된다. 온실의 경우 종자가 발아온도가 incubator에 비해 상대적으로 낮기 때문에 초기 발아에는 시간이 걸렸지만 포트와 유리온실이 수분과 온도에 있어서 적당한 온도차를 조성해주었기 때문이라 생각된다.

발아세는 5월 14일에 온실에 파종한 것은 평창군 오대산은 0.44, 정선군 임계면은 0.82를 나타냈다. 5월 23일에 파종한 평창군 오대산 종자는 온실파종이 0.61, petridish 치상이 0.145였으며, 정선군 임계면 종자의 경우 온실파종이 0.85, petridish 치상이 0.515를 나타냈다(Table 22).

Table 22. The germination speed of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.). The germination speed calculated seeding or setting number and sprout up seeds.

	Oh-dae Mt.		Jeong-seon	
	greenhouse	petridish	greenhouse	petridish
14. May	0.44	-	0.82	-
23. May	0.61	0.29	0.85	0.57

Table 23. The last germination rate of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.) in greenhouse by seeding date.

	Oh-dae Mt.		Jeong-seon	
	greenhouse	petridish	greenhouse	petridish
14. May	46	-	85.5	-
23. May	70	14.5	98	72.5

Table 20은 파종후 발아 종자수를 나타내는 표이며, Table 21와 23은 각각 발아율과 발아세를 나타내는 표이다. Figure 62, 63, 64은 각 실험에 대한 발아율을 나타내는 그래프이다.

온실에 파종한 종자의 경우 2006년 10월 20일에 생존본수를 조사한 결과 5월 14일에 파종한 오대산 당느릅나무의 경우 50립을 파종하였으나 생존한 본수는 2분에 불과하였고 정선 느릅나무의 경우 200립을 파종하여 103본이 생존하였다. 5월 23일 파종한 오대산 당느릅나무의 경우 100립을 파종하여 36본이 생존하였고 정선 느릅나무의 경우 100립을 파종하여 77본의 생존본수를 얻었다. 결과적으로 오대산 당느릅은 5월 14일 파종한 종자의 경우 2%의 잔존율이 나타났고 5월 23일 파종한 종자의 경우 36%의 잔존율을 나타내어 잔존율이 큰 폭으로 증가하였다. 정선 느릅나무는 5월 14일 파종한 종자의 경우 51.5%의 잔존율을 나타내었고 5월 23일 파종한 종자의 경우 77%의 잔존율을 나타내어 5월 14일 파종한 종자보다 잔존율이 증가하였다.

이러한 현상은 당느릅나무와 느릅나무의 종자의 성숙기가 다른 것으로 사료된다. 정선의 느릅나무 종자의 경우 5월 13일 채취당시 종자는 유숙기에서 황숙기로 접어드는 사이에 있었으나 오대산의 당느릅나무의 경우 완전한 유숙기 상태였다. 5월 22일의 경우 정선의 느릅나무는 황숙기 말에 접어드는 시기였으나 오대산의 경우 유숙기에서 황숙기로 접어드는 초기상태를 나타냈다. 따라서 오대산의 종자의 경우 발아율 상승과 동시에 오랜기간 생존한 본수도 늘어났던 것이며, 정선의 경우 발아율은 소폭 상승했지만 생존한 본수는 줄어들었다. 평균 묘고는 5월 14일과 23일 모두 정선의 느릅나무가 높았다. 5월 14일에 파종한 종자보다 23일에 파종한 종자의 묘고 차가 줄었다(Figure 65).

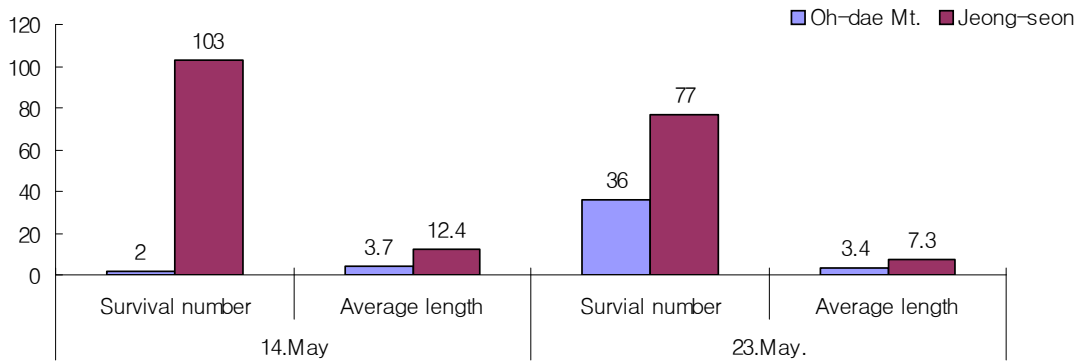


Fig 65. The survival number and Average length of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (collecting area is Jeong-seon) and *Ulmus davidiana* (collecting area is Oh-dae Mt.). This figure checked 20. Oct.

2) 느릅나무 기내번식

가) 기내 유묘의 뿌리를 이용한 부정근 유도

예비 실험에서 당느릅나무의 종자 파종 후 발아된 기내유묘의 뿌리절편을 이용하여 부정근을 유도 한 결과 1/2 SH 배지에서 가장 생장이 적당한 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 1/2 SH배지를 기본배지로 IBA농도별 부정근 유도 실험을 수행하였다. 당느릅나무 종자에서 발아된 유묘의 뿌리절편을 1 cm 정도의 크기로 잘라 5가지 농도(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L)의 IBA가 첨가된 배지에 배양하였다. 배양 2주후부터 절편의 양 절단면에서 부정근이 형성되었으며, 그 후 6주째 까지 부정근의 길이 신장이 이루어 졌다.

Table 24. Effect of IBA concentrations on adventitious root formation from root explants after 6 weeks of culture.

Conc. of IBA (mg/L)	Root number/explant	Root growth(mm)
Control	2.5±0.43 ^{d*}	7.2±0.67 ^{cd}
IBA 0.1	4.6±0.25 ^c	16.3±1.23 ^b
IBA 0.2	5.8±0.56 ^b	28.4±3.55 ^a
IBA 0.5	13.2±1.12 ^a	8.5±0.24 ^c
IBA 1.0	3.7±0.45 ^c	4.6±0.37 ^d

*Values represent means±SE. Values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

뿌리의 길이는 0.2 mg/L IBA에서 다른 처리(0, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/L IBA)와 비교해 약 3 배 이상의 길이 신장을 보였다(Table 24). 부정근 유도 형태는 절단면 한쪽은 캘러스가 형성되었고, 다른 한쪽 절단면에서 새로운 부정근이 유도되어 자연상태의 뿌리에서 발달되는 측근(lateral root) 형성과 동일한 형태의 일반적인 뿌리형태를 나타냈다(Figure 66 b). 또한 0.1 mg/L IBA에서도 절편의 한쪽 절단면에서는 캘러스가 형성되고, 나머지 절단면에서는 위에서 설명했던 것과 같은 측근과 동일한 형태의 뿌리가 형성 됐다(Figure 66 a). 따라서 이것은 0.2 mg/L IBA이하의 농도는 배양절편의 극성을 교란 시키지 않는 것으로 판단된다. 한편, 절편 당 부정아의 수는 0.5 mg/L IBA에서는 다른 처리(0, 0.1, 0.2 및 1.0 mg/L IBA)와 비교해서 약 3배 정도 높은 부정근수를 보였으나, 부정근의 유도 형태가 캘러스와 함께 짧고 굵은 모양이며, 길이생장이 제대로 이루어지지 않아 부정근 유도를 위한 조건으론 적당하지 않았다(Figure 66 c).

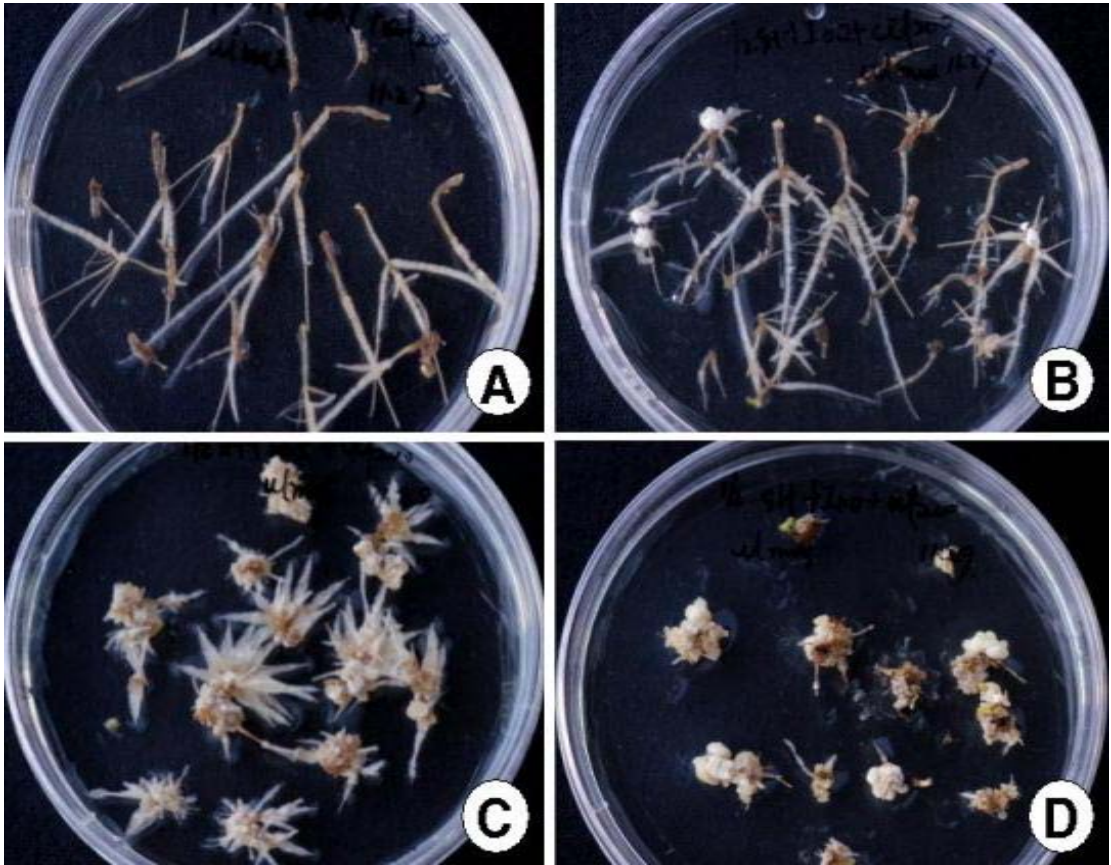


Fig 66. Adventitious roots induction from roots segments of *U. davidiana* seedling after 6 weeks of culture. A: IBA 0.1 mg/L, B: IBA 0.2 mg/L, C: IBA 0.5 mg/L and D: IBA 1.0 mg/L.

따라서 부정근 유도를 위한 목적으로는 0.2 mg/L IBA가 적합할 것으로 생각되어 진다. Han 등(2006)은 산삼의 뿌리절편을 이용하여 1/2 MS에 NH_4^+ 가 제거된 배지에 0.3 mg/L IBA에서 91%의 높은 부정근 유도율을 보여주었고, 뿌리절편에서 직접 부정근을 유도하였다. 이 실험에서 사용한 1/2 SH 배지 역시 NH_4^+ 가 첨가되지 않은 배지이다. 따라서 당느릅나무의 부정근 유도시 NH_4^+ 에 영향을 받는 것으로 생각되어진다.

부정근의 증식 및 유지는 부정근 증식에 적당한 배지의 조건만 갖추어지면 매우 간단하여 이러한 시스템이 인삼 배양근 같은 대량탱크배양으로 산업화 되었다(Han et al., 2006). 따라

서 부정근 배양은 생산비 절감, 연속적인 증식과 안정적인 공급이 가능한 배양 재료 (Bourgaud, 2001)로써 이차 대사물 생산 등에 적합한 재료로 인식 되었고, 대용량 생물반응기의 대량 배양을 통한 산업화가 가능한 장점이 있다.

나) 기내에서 유도된 부정근 절편을 이용한 부정아 유도

당느릅나무의 종자발아를 통해 유도된 유묘의 뿌리에서 증식된 부정근 절편을 약 1 cm로 절단하여 4가지 사이토키닌 및 옥신과 사이토키닌이 첨가된 1/2 SH 배지에 배양하였다. 부정아 유도 결과 2.0 mg/L kinetin에서 가장 높은 95%의 부정아 유도율과 8.4개의 절편당 부정아 유도수를 얻었으며(Table 2), 부정아 유도 형태는 절편체 절단부 양면에서 직접 다수의 부정아가 형성되었고, 형성된 부정아는 녹색을 띄었으며, 녹색의 눈 주변에 많은 모용을 형성하였다. 또한 약간 유리화된 듯한 눈을 형성하였는데, 이것은 나중에 정상적인 잎으로 분화되었다(Figure 67 a, b). 그 외 사이토키닌으로 4.0 mg/L zeatin에서는 73%의 부정아 유도율을 얻었지만 절편 당 부정아 수가 평균 2.5개로 효율이 높지 않았으며, 캘러스 부위에서 부정아가 드문드문 형성되었다. 2-ip와 BA에서는 각각 2.0 mg/L에서 56%정도의 부정아 유도율을 보였고, 평균 5개의 절편당 부정아수로 낮은 효율을 보였다(Table 2). 2.0 mg/L BA에서는 한쪽 절단면에서 몇 개의 부정아가 형성되었고, 다른 쪽 절단면에서는 발근과 뿌리신장이 이루어졌고, 2.0 mg/L 2-ip에서는 절단면 양쪽 면에서 캘러스가 형성되었다(Figure 67 c, d, e, f). 사이토키닌과 옥신의 혼합처리 역시 대조구보다도 부정아 유도율과 부정아 수가 높지 않았다. 결과적으로 MS 배지에 2.0 mg/L kinetin을 첨가한 배지에서 부정아를 형성하기에 가장 적당한 배지라는 것을 알 수 있었고, 옥신과 사이토키닌의 조합처리가 이 부정아 유도에 그다지 영향을 주지 않는다는 것을 관찰 할 수 있었다.

느릅나무 부정아 형성은 다른 몇 개의 외국 논문에서 보고 된 바 있는데 절편은 달랐으나, 주로 BA를 이용하여 부정아를 유도하였다. Ben 등 (1998)은 Dutch elm hybrid 'Commelin'에서 특이하게도 기외 줄기(basal diameter ≥ 1 cm)의 외피와 내피를 제거한 형성층, 물관과 체관을 포함한 부분의 절편을 가지고, MS배지에 0.1 - 5 mg/L BA 를 첨가한 배지에서 부정아를 유도하였으며, Ann 등(1997)은 *Ulmus americana*의 종자를 이용한 기내 발아묘의 잎, 줄기, 뿌리와 기외 성숙목의 뿌리를 IBA에 담가 줄기를 유도하여 유도된 줄기

부위를 소독 후 기내 절편으로 사용하여 MS 배지에 2.2 mg/L BA를 첨가한배지에서 부정아를 유도하였다. Bolyard 등 (1991), Fenning 등 (1993) 그리고 George 와 Tripepi (1994)는 잎 절편을 이용하여, BA 단독 혹은 TDZ와 혼합처리한 배지에서 부정아를 유도하였다.

이 연구에서는 보고 된 다른 논문과 달리 BA처리는 평균 50%정도의 부정아 유도율과 낮은 절편 당 줄기수를 보였으며, kinetin처리 시에는 평균 95%이상의 높은 줄기 유도율과 절편 당 줄기 수를 보여주었다. 한편, 옥신과 사이토키닌 혼합처리는 부정아 형성에 큰 영향을 주지 못했다(Table 25). 결과적으로 이 연구에서 부정아 형성율에 가장 영향을 미치는 호르몬은 kinetin 단독 처리가 가장 효과적이라고 할 수 있다.

아직 까지 모든 느릅나무 재분화에 있어서 부정근을 절편으로 재분화한 것이 보고 된 바 없다. 부정근을 재료로한 식물체 재분화는 잎이나 줄기를 절편으로 사용하는 것 보다 장점을 가지고 있다. 먼저 부정근들의 높은 성장율로 인해 풍부한 양의 재료를 빠르고 쉽게 얻을 수 있으며, 따라서 많은 노동력이 필요치 않고 경제적이다. 또한 잎이나 절간 조직과 달리 배양재료의 증식이 쉽고, 절편을 배지에 치상 할 때도 절편을 놓는 방향등을 고려하지 않아도 된다(Hubstenberger *et al.* 1992). 또한 외국에서 보고 된 느릅나무 재분화에 사용된 재료는 주로 잎과 줄기부분이다. 그러나 이렇게 잎이나 줄기부위를 절편체로 사용하게 되면 식물체 전체를 희생시켜 재료로 사용하여야 하지만, 뿌리를 재료로 사용할 경우 소량의 뿌리만을 채취하여 증식 후 재분화 실험의 재료로 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

다) 배지에 따른 줄기 성장과 발근 및 기외순화

부정아 유도를 통해 유도된 4-5 cm 정도의 균일한 크기의 줄기를 WPM배지의 농도를 달리하여 성장 및 발근유도에 관한 실험을 실시하였다. 줄기 길이는 1/2 WPM 배지에서 평균 2.1 cm 로 좋았으며(Figure 67 a, 68), 뿌리길이는 1/4 WPM 배지에서 가장 길게 나타났다. 줄기길이는 배지 처리 간 큰 차이를 보이지는 않았으나, 뿌리길이는 배지 간 큰 차이를 보였다. WPM배지의 경우 배지 농도가 감소 할 수 록 뿌리의 길이가 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 69).

Table 25. Effect of cytokinin and cytokinin + auxin on adventitious shoot formation from the culture of root segments after 6 weeks of culture.

Cytokinin and Auxin (mg/L)		Frequency of adventitious shoot or bud formation (%)	No. of shoots/explant	Callus growth
Control	0	25.3± 2.34 ^{g*}	2.4± 0.23 ^{jk}	-
Zeatin	1.0	4.8± 3.12 ^{ij}	1.2 ± 0.24 ^m	±
	2.0	12.5± 1.36 ^{hij}	1.6± 0.01 ^{lm}	±
	4.0	73.7 ± 8.69 ^c	2.5± 0.28 ^{jk}	-
	8.0	48.0± 5.12 ^f	2.7± 0.35 ^{jk}	-
2-ip	1.0	21.7 ± 2.11 ^g	2.3± 0.56 ^{jk}	++
	2.0	56.5± 4.33 ^{de}	4.5± 0.23 ^{ef}	+++
	4.0	20.8± 3.45 ^{gh}	5.7± 0.37 ^c	++++
	8.0	19.1± 1.12 ^{gh}	2.1± 0.17 ^{kl}	+++++
BA	1.0	51.5± 2.35 ^{ef}	3.9± 0.33 ^{gh}	±
	2.0	57.9± 3.89 ^{de}	5.3± 0.56 ^{cd}	++
	4.0	53.3± 4.78 ^{ef}	3.4± 0.45 ^{hi}	±
	8.0	12.5± 1.67 ^{hij}	2.7± 0.12 ^{jk}	+
Kinetin	1.0	76.9± 5.32 ^c	4.2± 0.34 ^{fg}	+
	2.0	95.8 ±9.96 ^a	8.4± 0.76 ^a	+
	4.0	87.0± 5.78 ^b	6.5± 0.14 ^b	++
	8.0	63.6± 7.76 ^d	4.6± 0.34 ^{ef}	+++
IBA	ZT 2.0	7.4± 1.01 ^{ij}	1.5± 0.09 ^{lm}	+
	2-ip 2.0	20.0± 3.33 ^{gh}	2.8± 0.13 ^j	+
	BA 2.0	13.0± 0.97 ⁱ	4.9± 0.33 ^{de}	++
	KT 2.0	4.5± 0.31 ^j	2.5± 0.37 ^{jk}	++

*Values represent means±SE. Values followed by the same letter are not significantly different at $P<0.05$ according to Duncan's multiple range test.

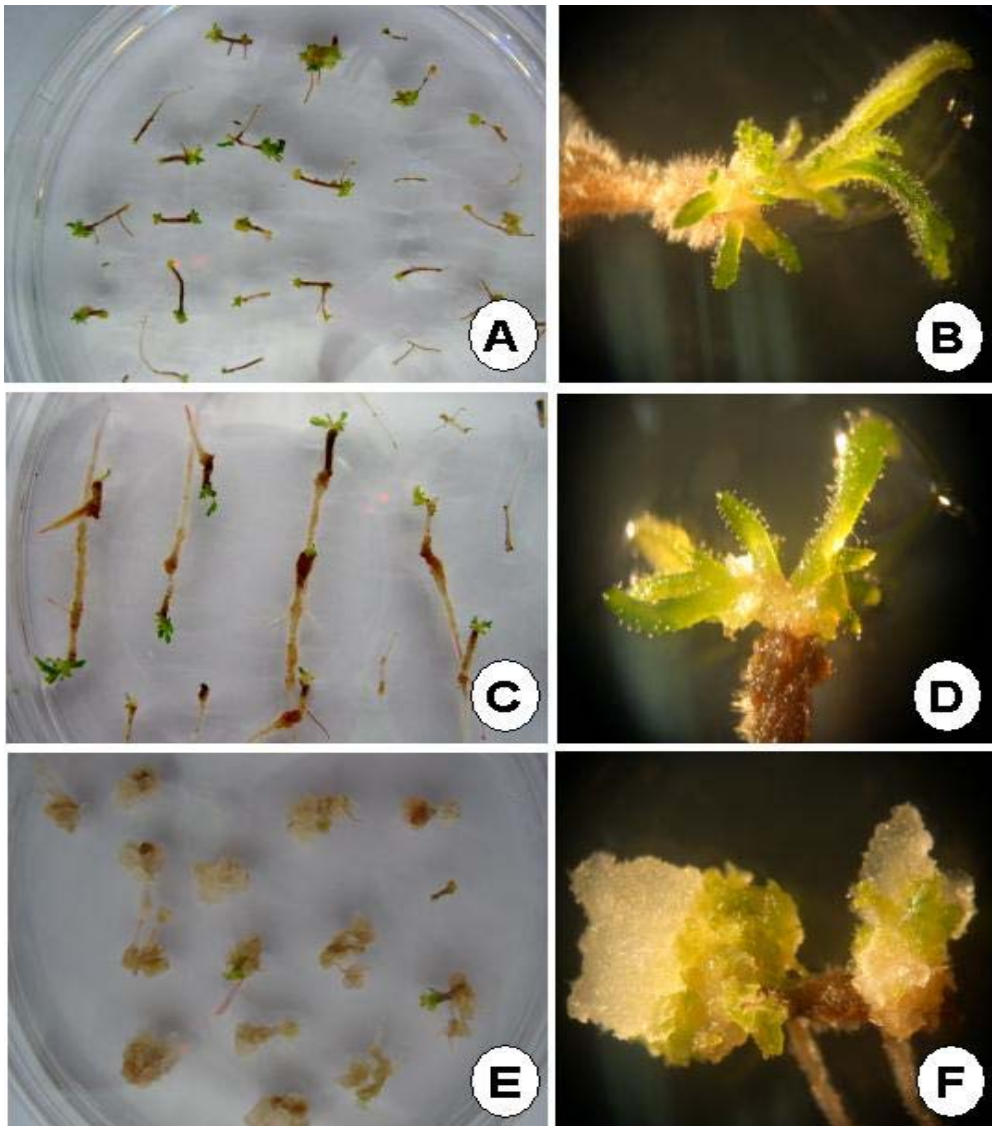


Fig 67. Adventitious shoots formation from adventitious roots segments of *U. davidiana* seedling after 6 weeks of culture. A-B: 2.0 mg/L kinetin, C-D: 2.0 mg/L BA and E-F: 8.0 mg/L 2-ip .



Fig 68. Rooting of adventitious shoots and acclimatization in artificial soils after 4 weeks. A: Rooting of adventitious shoots on 1/2 WPM medium after 4 weeks of culture, B: Acclimatization in pot containing vermiculite +peatmoss 1: 1.

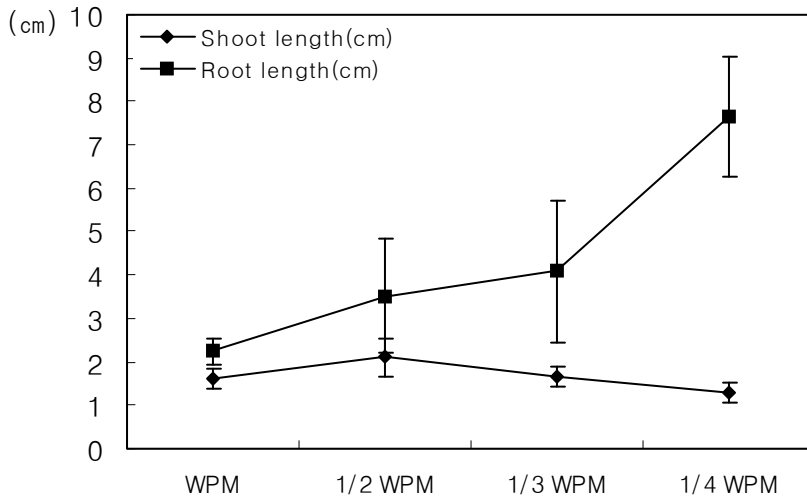


Fig 69. Effect of WPM medium strengths on rooting and shoot growth of adventitious shoots after 4 weeks of culture.

결과적으로 줄기생장은 배지의 농도보다는 외생 호르몬 처리에 의해 더 영향을 받을 것 이라고 추측되어진다. 뿌리길이는 줄기생장보다 확실한 차이를 보였는데, 배지의 농도가 감소할 수 록 뿌리길이가 증가하였다. WPM 배지는 일반적인 배양에서 가장 많이 쓰이는 MS배지보다 발근과 관련된 질산 암모늄 (NH_4NO_3)의 양이 1/4정도의 수준이다. 따라서 당느릅나무 기내 식물체의 발근은 질산 암모늄(NH_4NO_3)에 의해 영향을 받는 것으로 생각되어진다.

기내에서 재분화 된 식물체는 기외순화를 위해 인공상토(vermiculite+peatmoss 1:1)가 담긴 플라스틱 박스에 이식하였다(Figure 68 b). 인공상토로 이식 4주 후 100%의 생존율을 보여주었다.

3. 결 론

겨우살이의 자생지의 해발고는 207~920m까지 매우 다양하게 나타났고, 사면방향은 남서사면(4개), 남동사면(2개), 북동사면(1개)과 북서사면(1개)으로 나타났으며, 조사지의 경사는 10~20° 이하 4곳, 20~30° 이하 3곳, 30° 이상은 1곳이었다.

자생지의 식생구조는 북방면2의 박달나무를 제외한 모든 상층의 우점종이 참나무과(신갈, 갈참, 굴참, 상수리나무)로 나타났으며, 겨우살이가 출현한 수종 또한 북방면2의 박달나무를 제외하면 모두 참나무과 수종이었다.

겨우살이의 무성번식 및 기내번식에서 실험 결과를 얻지 못하였으나 유성번식에서 겨우살이의 흡기가 90%이상 발생하였다. 이는 겨우살이의 유성번식의 가능성을 보여준다.

느릅나무의 과실은 원형, 당느릅나무의 과실은 타원형의 형태를 나타냈으며, 느릅나무는 과실이 낙과하기 약 1주 전, 당느릅나무는 이보다 다소 이른 종자가 모두 낙과하기 약 2주 전에 외형적 성장이 완료되었다. 과실의 색깔은 밝은 녹색 또는 진한 녹색을 띄고 있다가 과실이 낙과하기 시작하면 탈색되어 노랑색을 띄기 시작한다. 이 후 낙과가 더욱 진행되면 노랑 또는 흰색에 가까운 밝은 노랑을 띄게 된다.

2년차 3년차 느릅나무와 당느릅나무의 발아율 실험에서 모두 과실이 낙과하기 전 약 1주일 동안 채취한 종자의 발아율이 가장 높았다. 느릅나무와 당느릅나무 모두 과실이 낙과하기 전 약 1주일 동안 채취한 종자에서 발아한 묘목의 생장이 가장 좋았다.

느릅나무와 당느릅나무의 종자를 시기별로 채취하여 발아율과 묘목의 생장을 실험한 결과 두 수종 모두 종자의 낙과가 이루어지기 전 약 1주일 동안의 발아력이 가장 높았다. 느릅나무류와 같이 개화기와 종자의 성숙기가 짧은 수종의 번식은 종자의 채취시기가 매우 중요한데 이 시기에 종자를 채취한다면 높은 발아율과 우수한 묘목을 얻을 수 있을 것이다.

당느릅나무(*Ulmus davidiana* Planch) 기내번식 방법을 개발하기 위해 유식물의 뿌리로부터 부정근을 유도 한 후 이들 부정근 절편으로부터 부정아 유도과정을 거쳐 식물체를 재생 시켰다. 기내발아 식물체의 뿌리 절편을 0.2 mg/L IBA 처리한 1/2 SH 배지에 배양한 결과 다수의 부정근을 유도할 수 있었다. 유도된 부정근으로 부터 절편을 만들어 부정아 유도를 위해 MS배지에 4가지 종류의 cytokinin (zeatin, 2-iP, BA, kinetin)을 첨가한 결과, 0.2 mg/L kinetin 을 첨가한 배지에서 가장 높은 부정아 유도율과 절편 당 부정아수를 얻었다.

유도된 부정아로부터 줄기생장 및 뿌리유도를 위한 실험에서 줄기 생장은 1/2 WPM배지에서 가장 양호하였고, 뿌리유도는 1/4 WPM배지에서 가장 양호하였다. 또한 기내 재분화묘를 기외로 순화시킨 결과 4주후 100%의 식물체 생존율을 얻었다. 이 연구에서는 느릅나무의 부정근을 사용하여 새롭고 효과적인 재분화 체계를 확립하였다. 뿌리에서 직접 부정아를 유도 하기 때문에 줄기나 잎 절편과 같이 부정아를 유도한 다음 별도의 발근 과정이 필요없기 때문에 보다 효율적이고 신속한 식물체를 얻을 수 있는 장점을 지닌다. 따라서 이 재분화 방법은 다른 느릅나무 종의 재분화에 적용 시킬 수 있을 것이며, 또한 형질전환 연구를 위한 기본적인 토대로도 사용될 수 있을 것이다.

겨우살이 유전변이 분석에 사용된 4개의 I-SSR primer(#818, 826, 830, 855)에서 총 32개의 증폭 산물을 관찰 하였으며, primer당 평균 8개의 다형성 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 다형성 I-SSR 표지자의 비율은 전체평균 90.6%으로 나타났으며, 4개의 I-SSR primer에서 총 32개의 증폭산물을 초대로 Shannon의 유전다양성지수를 계산한 결과 평균 0.4579로 비자나무(S.I.=0.353;Hong et al., 2000), 은행나무(S.I.=0.388;Hong et al., 2001) 보다는 다소 높은 유전다양도를 나타냈으며 구상나무(S.I.=0.492;강, 200), 주목(S.I.=0.478;Kwon, 2002)보다는 낮았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

겨우살이에서 Homoflavoyadorinin B을 단리하였다. 추출분획물은 우수한 항산화활성을 보였으며, 미백활성은 미비하였다.

(+)-catechin 유도체 화합물 대량 확보하였으며, 항산화활성이 우수하였으며 미백활성은 (+)-catechin이 대조구와 유사한 활성을 보였다. 제형화 실험을 통해 확보한 제형의 임상실험 결과 미백효과가 있는 것으로 판단되었다.

안정도 실험을 통하여 확보한 안정한 제형 처방을 바탕으로 시제품 Pilot 제조를 실시하였으며 산업화, 상용화하기 위한 추출물의 미백 기능성 물질들의 사용상 안전성 문제점에 대한 해결방안 및 개선방안을 강구하고 있다.

겨우살이 자생지 식생구조 및 환경분석, 유·무성번식, 겨우살이 화기, 흡기, 화분구조 조사 및 느릅나무의 유·무성번식, 조직배양을 실시하였으며, 느릅나무는 유성번식 및 기내번식에서 대량번식의 기초적인 방안을 제시 하였으나, 겨우살이에서는 만족한 결과를 얻지 못하였다.

겨우살이, 느릅나무 유전분석을 실시하였으나, 충분한 결과를 얻기 위해서는 기간이 더욱 필요하다.

2. 관련분야에의 기여도

가) 국내외 전문학술지 게재

김지아, 유헌령, 안창호, 이재선, 최용의. 2007 당느릅나무 부정근 절편으로부터 부정아 유도를 통한 식물체 생산. 한국임학회지 96:83-88.

느릅나무 수피 추출물의 생리활성(I) (목재공학 투고 중)

나) 국내외 학술회의

이재선, 송재모, 김철우. 2005. 겨우살이의 외부형태학적 특성. 한국임학회 학술연구 발표논문

문집.

김진규, 권동주, 사진령, 함연호, 배영수, 2006. 느릅나무 수피 추출성분의 생리활성, 한국목재공학회, 2006년 학술발표 요지집, pp. 314~315.

김진규, 권동주, 함연호, 배영수, 2007, 느릅나무 수피의 카테킨 유도체의 생리활성, 2007년 한국임학회 학술연구 발표논문집, pp. 250~251.

김진규, 권동주, 사진령, 함연호, 배영수, 2007, 느릅나무 수피 추출물의 항균활성, 한국목재공학회, 2007년 학술발표 요지집, pp. 343~344.

권동주, 김진규, 사진령, 함연호, 배영수, 2007, Homoflavoyadorinin B의 암세포주에 대한 세포독성 평가(I), 한국목재공학회, 2007년 학술발표 요지집, pp. 341~342.

Biological Activities of Bark Extractives of *Ulmus davidiana* (2007년 7월 발표예정 - 2nd International Conference of ESES (The Role of Genetics and Biotechnology in Conservation of Natural Resources, 이집트 환경과학회))

겨우살이 추출물의 항산화활성 (2007년 8월 발표예정- 한국임학회)

느릅나무 수피 추출물의 NO 생성 억제효과 (2007년 8월 발표예정 - 한국임학회)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

화장품산업은 건강(Health)과 미(Beauty)라는 이중의 기준을 가지고 있는 산업으로서 현재 그동안 치우쳐왔던 미적 기준에서 차차 그 기능과 안전성이 더해지고 있는 실정이다. 따라서 기존의 많은 인공적인 합성화합물들로 채워져 있던 화장품의 원료부분이 상당부분 천연유래물질로 대체되고 있으며 이에 따라 각국의 많은 화장품업체는 이에 대한 많은 투자와 연구를 진행하고 있다. 또한 기능성화장품법의 실행으로 단순한 미적 기준을 두고 개발하는 형태에서 벗어나 주름개선, 미백, 자외선차단 뿐만 아니라 항여드름, 항염, 보습, 각질제거, 항아토피, 두피개선 등 다양한 형태의 효능에 대하여도 연구가 촉진되었다고 할 수 있다. 또한 우리나라는 식물 자원이 풍부하며 이런 부분에서 많은 장점이 있다고 할 수 있는데 이런 천연물에 대한 기대와 관심 속에서 국내에 사용되지 않고 버려져있는 천연물을 사용하여 이의 기능적인 측면과 산업적인 측면을 밝혀내어 이를 이용하는 측면은 상당히 고무적이라 할 수 있다. 그 동안 수행된 많은 연구 결과에서 알 수 있듯이 기존의 합성화합물인 ascorbic acid나 arbutin, kojic acid, hydroquinone 등의 미백 기능성 물질들은 사용상의 안전성 및 안정성의 문제점을 안고 있으며 아직도 그 해결방안 및 개선방안에 대하여 연구가 진행되고 있는 실정이다. 따라서 이번 느릅나무 및 신갈나무, 밤나무 겨우살이로부터 추출한 물질을 이용하여 피부에 대한 효능 평가 및 물질분석을 통하여 화장품에 적용하고 이를 안정화시켜 산업화하기 위한 이런 일련의 연구들은 앞으로도 계속 진행 되어야 한다고 생각한다. 이번 연구를 통하여 느릅나무로 분리한 물질에 대하여 어느 정도 피부의 미백에 효과를 가지고 있는 것으로 밝혀짐으로서 이를 바탕으로 앞으로 이를 좀더 피부에 효과적인 원료로 개선하기 위한 연구가 필요하며 효능을 나타내는 단일물질의 추출공정 개선 및 안전성 실험 등 이의 화장품 제형에 응용시 발생하는 문제점 등 해결해야할 과제들을 지속적으로 추진해야할 필요가 있겠다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Coletica사(프랑스)는 피부의 노출도가 증가하는 계절을 맞아 기존의 항산화제 연구 데이터에 더해 항 셀룰라이트의 *In Vivo* 연구 데이터를 마련하여 플라보노이드 소재 Flavenger를 개발하였다. Flavenger는 분자회합기술에 의해 회화나무에서 유래한 quercetin의 측쇄 하이드키신기에 지방산 C8 : 카프릴산을 에스테르 결합시켜 얻어진 quercetin 유도체로 화장품제제 중에서 색조 안정성을 확보하고 특히 항산화작용이 우수하다.

일본 케라텍(Keratec)회사는 뉴질랜드 양모위원회와 공동 연구를 통해 IFP-HMW라는 새로운 소재를 개발하였다. IFP-HMW는 가수분해에 의한 저분자량화를 하지 않는 천연의 단백질로 분자량 40,000~60,000 달톤으로 순수한 케라틴을 5% 함유하며 반응성 황화염으로 화학적 환원상태에서 시스틴으로 변화되어 모발 등 다른 케라틴 기질과 가교 된다. 이 물질은 모발의 보호 및 집중 트리트먼트에 효력을 발휘하며 막형성이 우수하고 모발 섬유상에서 막을 조성함으로써 큐티클 층을 밀착시킨다.

니무리 프리킷드는 인도 전통의학에 있어 만병통치약으로 알려진 백단향과의 나무(인도 백단향) *Melia azadirachta*의 잎 추출물이다. 나무는 인도와 스리랑카 등에서 자생·재배하는 나무로 잎 뿐만 아니라 수피, 종자, 가지, 수액 등 모든 부위를 이용하는 것으로 알려져 있다. 니무리 프리킷드에는 항염증 작용(히스타민 유리 억제작용, 항접촉피부염작용) 및 미백작용(B16 멜라노마 배양계)이 알려지고 있으며 최근에는 사이크로옥시게나제의 저해작용이 확인되었다. 사이크로옥시게나제는 자외선 장해를 받은 각질세포와 항원 자극을 받아 탈과립 후의 비만세포의 세포막에서 아라키돈산을 거쳐 프로스타그란딘 E2가 만들어지는 아라키돈산 가스킷의 주요한 효소인데, 염증반응에 깊게 관여되어 있다. 사이크로옥시게나제는 2종류(COX I, COX II 최근에는 COX III도 알려지고 있다)가 있는데, 염증에 의해 유도되는 것은 주로 COX II로 알려지고 있다. 니무리 프리킷드는 2종류의 사이크로옥시게나제를 저해하지만 그 작용은 COX II에 대하여 더 강하고, 자외선에 의해 각질세포에서 유도된 멜라노사이트 자극물질 프로스타그란딘 E2의 생성을 효율적으로 억제한다.

살구씨에서 얻어진 DADA (Diisopropylamine dichloroacetate), 합성식물호르몬(싸이토키닌의 일종)의 일종인 카이네틴(Kinetin), 생약을 포함한 식물체에 광범위하게 분포되어 있는

우루솔산(Ursolic acid), 생체의 필수 미량성분인 규산, 동식물 또는 미생물에 널리 분포되어 있는 당지질의 일종인 스펅고신(Sphingosine) 유도체, 합성물질인 NMS (n-methyl-L-serine), 보조소 Q10, 미생물에 의해 생산되는 메발로놀락톤(Mevalonolactone) 등이 피부주름 개선제로서 관심을 끌고 있다.

현재 자외선 차단제로 등록되어 있는 것은 대부분 자외선 흡수제인데 벤조페논계, 계피산계, 살리실산계, PABA(Para-aminobenzoic acid)계 등과 같은 유기화합물 계통이다. 스틸벤 유도체, Benzotriazol substituted polyorganosiloxane 등 사용성과 피부 안전성을 향상시킨 새로운 자외선 흡수물질의 개발이 연구되고 있다.

미국의 화장품 업체들은 화장품과 화장품 원료에 대하여 시판 전에 FDA에 허가를 얻지 않아도 된다. 다만 화장품에 사용되는 Red #3, Yello #5 등과 같은 칼라 첨가물과 CFR (Code of Federal Regulations) XXI 항의 Part 250.250과 700.1에서 700.23사이에 언급된 Hexachlorophene, Mercury compounds 등의 몇 가지 금지된 물질에 대해서만 규제하고 있다. 또한 미국 향장협회(Cosmetic Toiletry and Fragrance Association)에서는 화장품 첨가물에 대한 전문가 패널을 운영하고 있는데 이 전문가 패널에서는 안전하지 못하거나 발암 가능성이 있는 Chloroacetanide, p-Hydroxyanisole, Pyrocatechol 등의 몇 가지 첨가물을 사용하지 말 것을 권고하고 있다. 결론적으로 미국 FDA에서는 우리나라의 기능성 화장품에 해당하는 코스메슈티칼스의 제품들이 시장에서 유통되고 있는 사실을 인식하고 있으면서도 이 용어를 공식적으로는 인정하고 있지 않다.

제 7 장 참고문헌

김영찬, 2006, 화장품 소재 시장분석 및 유망화장품 소재 개발전략 수립, 한국보건산업진흥원

문관심, 1984, 약초의 성분과 이용, 일월서각.

배영수, 김진규, 2000, 약용 활엽수종인 물푸레나무와 느릅나무 수피의 추출성분, 목재공학, 28(3) : 62~69.

박원봉, 1998, 한국산 겨우살이의 채취시기에 따른 고분자성분 및 생리활성의 변화, 과학기술부

서지희, 최연희, 김정숙, 김성기, 최상운, 김영섭, 김영균, 김성훈, 유시용, 2004, 한국산 겨우살이 전초의 Methanol 추출물로부터 암세포증식 저해성분의 분리, 생약학회지, 35(2) : 134~138.

설수연, 2006, 향산화 기능을 가진 천연물유래 화장품 소재 개발, 한국과학기술정보연구원

손은수, 2003, 천연물유래 화장품 소재의 개발 동향, 한국과학기술정보연구원.

이유미, 1995, 우리가 정말 알아야 할 우리 나무 백 가지, 현암사, pp. 289~292.

이상필, 손은수, 박창걸, 2002, 기능성 화장품, 한국과학기술정보연구원.

이창복. 1993. 대한 식물 도감. 향문사. 서울. pp. 280-281.

이태완, 김상년, 지용길, 황성주, 2004, 유백피 추출물을 함유한 하이드로겔 패치의 주름 억제 효과, 약제학회지, 34(3) : 193~199.

임제빈, 1979, 느릅나무근 점액에 관한 연구 - 점질물의 Amino Acid 분석 -, 공학연구(전북대학교 공학연구원), 9 : 41~45.

육창수, 1981, 한국약품식물자원도감, 진명출판사.

윤택준, 유영춘, 홍은경, 조영호, 이석원, Azuma I., 유보림, 김종배, 1994, 마우스 Macrophage IL-1 및 TNF- α 의 분비유도에 있어서 한국산 겨우살이 추출물이 미치는 영향, 생화학회지, 25(2) : 132~139.

장일식, 2003, 동양의학과학대전, 학술편수관.

탁우식, 최충호, 김태수. 2006. 채취 시기에 따른 느릅나무의 종자형질 및 발아특성 변화. 한국 임학회지 95(3): 316-322.

한국기술은행, 2005, 천연화장품 기술.

한국보건산업진흥원, 2004, 화장품 특허 동향.

Agrawal, P. K., 1989, Carbon ^{13}C -NMR of flavonoids, Elsevier Science Publishing Company INC : 96~123.

Ann Chanon, M., Joseph Kamalay, C. and Pablo Jourdan. 1997. Micropropagation of juvenile and mature American elms from stem nodal sections. pp. 242-250. 11th Central Hardwood Forest Conference. University of Missouri Columbia. Missouri, U.S.A.

Ben Jouira, H., Hassairi, A., Bigot, C. and Dorion, N. 1998. Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid 'Commelin': plantlet regeneration and neomycin sensitivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 153-160.

Biroscikova, M., Spisakova, K., Liptak, S., Pichler, V. and Durkovic, J. 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell Reports* 22: 640-644.

Bolksma, N., HV. Dijk, P. Korst and JM. Willers, 1979, Cellular and humoral abjuvant activity of a mistletoe extract, *Immunology*, 156 : 309~319.

Bolyard, M. G., Srinivasan, C., Cheng, J. and Sticklen, M. 1991. Shoot regeneration from leaf explants of American and Chinese elm. *Hortscience* 26: 1554-1555.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites; a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.

Cheng, Z. and Shi N. 1995. Micropropagation of mature Siberian elm in two steps. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 197-199.

Cho Hyun-Yeoul, Jong-Seok Yoon, Bo-Myung Seo, Sea-Youn Lee, Sung-Woong Kim, Jung-Han Baek, Chi-Sang Park, Jeong-Chul Seo, Sang-Won Han, 2003, The scavenging effect on NO, DPPH and inhibitory effect on IL-4 in *Schizandrae* fructus herbal-acupuncture solution, *The Korean journal of meridian and acupoint.*, 20(1) : 45~55.

Cho Jung-Jae, Kun-Kook Lee, Byung-Kee Jo, Jung-Do Choi, 2000, Isolation and characterization of elastase inhibitor from *Areca catechu*, *J. Soc. Cosmet. Scientists*

Korea, 26(1) : 163~173.

Corchete, M.P., Diez, J.J., and Valle, T. 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. *Plant Cell Reports* 12: 534-536.

Corredoira, E., Vieitez and A.M., Ballester, A. 2002. Somatic embryogenesis in elm. *Annals of Botany* 89: 637-644.

Evans, M. R. and A. W. Preece, 1973, *Viscum album* - A possible treatment for cancer?, *Bristol Med. Chir. J.*, 88 : 17~20.

Fenning, T.M., Gartland, K.M.A. and Brasier, C.M. 1993. Micropropagation and regeneration of English elm, *Ulmus procera* Salisbury. *Journal of Experimental Botany* 44: 1211-1217.

Foo, L. Y. and L. J. Porter, 1982, Leucocyanidin: Synthesis and properties of (2R, 3S, 4R)-(+)-3,4,5,7,3',4'-hexahydroxyflavan, *Phytochemistry*, 21(12) : 2947~2952.

Franz, H., P. Ziska and A. Kindt, 1981, Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.), *Biochem. J.*, 195 : 481~484.

George, M. W. and Tripepi, R. R. 1994. Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 27-36.

Hemingway, R. W., J. J. Karchesy, G. W. McGraw and R. A. Wielesek, 1983, Heterogeneity of interflavanoid bond location in loblolly pine bark procyanidins, *Phytochemistry*, 22(1) : 275~281.

Hajto, T., K. Hostanska and HS. Gabius, 1989, Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vitro* in rabbits and patients, *Cancer Res.*, 49 : 4803~4808.

Ham, Y. H. and Y. S. Bae, 1995, Flavonoid Extractives of *Populus albaglandulosa*. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 23(2) : 94~99.

Han, J. Y., Jung, S. J., Kim, S. W., Kwon, Y. S., Yi, M. J., Yi, J. S. and Choi, Y. E. 2006. Induction of adventitious roots and analysis of ginsenoside content and the genes involved in triterpene biosynthesis in *Panax ginseng*. *Journal of plant biology* 49(1): 26-33.

Ho, R.H. 1985. Micropropagation of American elm. pp. 78-82. In : Caron, E., Corriveau, A. G and Boyle T. J. B., ed. *New Ways in Forest Genetics*. Proceedings 20th Canadian Tree Improvement Association. August 9-22. Quebec City, Quebec.

Harborne, J. B. and T. J. Mabry, 1982, *The flavonoids: Advances in research*, Chapman and Hall.

Hubstenberger, J.F., Clayton, P.W. and Phillips, G.C. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). pp. 49-68. In: Bajaj, Y.P.S., ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer Verlag, Berlin.

Imperato, F., 1996, Kaempferol 3-O-(5''-Feruloyl)apside) from *Pteridium Aquilinum*. *Phytochemistry*, 13(6) : 1421~1423.

Ishii, T., T. Hiroi and J. R. Thomas, 1990, Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylanoligosaccharides from bamboo shoot cell-walls, *Phytochemistry*, 13(6) : 199

9~2003.

Karchesy, J. J. and R. W. Hemingway, 1980, Loblolly pine bark polyflavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 28 : 222~228.

Karnosky, D.E, Mickler R.A. and Lange D.D. 1982. Hormonal control of shoot and root induction in hypocotyl callus cultures of American elm. *In Vitro* 18: 275.

Kim In-Young, Sung-Won Jung, Hee-Chang Ryoo, Choon-Koo Zhoh, 2004, Anti-aging effects of the leaf, stem, fruit and seed of Yew(*Taxus cuspidata* Sieb) by solvent extraction Method, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 30(2) : 211~219.

Kim, K.S., Lee, S.D., Kim, K.H., Kil, S.Y., Chung, K.H. and Kim, C.H. 2005. Suppressive effects of a water extract of *Ulmus davidiana* Planch (Ulmaceae) on collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Ethno-pharmacology* 97: 65-71.

Kolodziej, H., 1985, The First 2,3-*trans*-3,4-*cis* procyanidin. *Phytochemistry*, 24(10) : 2460~2462.

Lee, S.J. 1996. Korean Folk Medicine. pp. 39. Monographs Series No 3. Publishing Center of Seoul National University. Seoul, South Korea.

Lloyd, C. and McCown, B.H. 1981. A revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hortscience* 16: 453.

Mannel, D. N., H. Becker, A. Gundt, A. Kist and H. Franz, 1991, Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*, *Cancer Immuno Immunother*, 33(3) : 177~182.

Mizuno, M., Y. Kanie, M. Inuma, T. Tanaka and F. A. Lang, 1991, Two flavonol glycosides C and D, from the underground parts of *Vancouveria hexandra*, *Phytochemistry*, 30(8) : 2765~2768.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Ratty, A. K., J. Sunamoto, N. P. Das, 1988, Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1, *Biochemical Pharmacology*, 37(6) : 989~995.

Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.

Watanabe, M., 1999, Antioxidant phenolic compounds from Japanese barnyard millet (*Echinochloa utilis*) grains, *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 4500~4505.

Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N., 1986, *Planta Medica*, 39(8), 517.

Yoo Yung-Geun, Min-Seok Joung, Jong-Wan Choi, Joong-Hoi Kim, 2005, The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 31(2) : 153~159.

Zarkovic, N., K. Zarkovic, S. Granica, D. Kissel and M. Jurin, 1997, The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumor-host relationship, *Anticancer Drugs* S17~22.

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.