

최 종
연구보고서

목련과 수목자원에 대한 기능성 천연물질의 산업적 이용기술 개발

Studies on Industrialization of Functional Natural
Products from Magnoliaceae

연구기관

주관기관 : 충북대학교

협동기관 : 국립산림과학원, 전남대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “목련과 수목자원에 대한 기능성 천연물질의 산업적 이용기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄 및 제1세부연구책임자 : 산림과학부 박 재 인

제1세부과제 연구원: 김홍은, 조남석, 최태호, 연방희, V. Ramesh Anbazhagan,
이은정, 김태동, 임선희, 박승영, 이일로, 최윤정, 이미경

제2세부연구책임자 : 약학과 이 명 구

연구원: (약대) 이종길, 이재준, 윤수옥, 신정수, 김유미, 김춘매
(생명공학연구원) 김환묵

(식물의학과(구 농생물학과) 차병진, 김길하, 이재춘

제1협동연구기관명 : 국립산림과학원 (전 임업연구원)

협동연구책임자 : 화학미생물과 이 학 주

연구원: (산림과학원)최돈하, 이성숙, 이병천, 김윤근, 박영기, 윤순영
(강원대)이현용, 이진하, 김영길

제2협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자: 생명과학부 황 백

연구원: 홍민희, 김옥대

위탁연구기관명 : 동신대학교

위탁연구책임자: 식물생물공학과 황 성 진

참여기업 1 : (주)피앤에프바이오텍 대표자: 김근환(1년차), 민영범

2 : 에프앤피 대표자: 김신제(2-3년차), 김군보, 강은주

요 약 문

I. 제 목

목련과 수목자원에 대한 기능성 천연물질의 산업적 이용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

화합적인 합성에 의해 생산된 의약품이나 식품 등은 생산의 용이성이나 가격이 저렴한 장점이 있는 반면, 천연물에서 분리한 물질보다 인체에 미치는 부작용이 커서 현 추세를 고려해볼 때 천연물질에서 물질탐색 및 기능성의 연구가 필요하다.

우리나라의 목련과 수종으로는 목련, 백목련, 오미자 백합나무 등 10여 수종이 있는데, 백목련에는 진통작용이나, 항균작용 등이 있고, 목련의 꽃봉오리에는 비염치료 효과, 일본목련의 나무껍질 부분에는 소화, 해수, 천식에 좋은 성분이 있다고 알려져 있다. 이외에도 한약재로도 잘 알려진 오미자의 열매에는 갈증과 피로를 풀어주는 성분이 있어 실제로 자양강장제로 사용하기도 한다. 그러나 전통적으로 사용되어져 온 이러한 문헌자료는 과학적인 검정이 이루어지지 않았거나 어떠한 성분이 그 작용을 하는지에 대한 자세한 연구가 이루어지지 않아 그 사용이 제한되고 있는 것이 현 실정이다.

목련과 수목들에 대한 생리활성 및 성분연구는 국외의 경우 비교적 많이 진행되고 있으나, 국내에서는 이들 수목들에 대한 체계적인 연구는 아직 미비한 실정인바, 이에 대한 체계적인 연구와 아울러 이것을 이용한 의약품, 농약, 염료 등 상품개발이 필요하며 수목의 조기 증식뿐만 아니라 유용물질의 기내 생산과 생물공학적인 방법을 이용한 물질생산의 연구가 절실하다.

따라서 본 연구에서는 목련의 의약활성, 생리활성 구명으로 의약품, 기능성 식품 등의 개발을 위한 연구를 수행하였다. 의약활성 검정에서 성인병의 검색 범위는 항암작용, 고지혈증, 당뇨병, 퇴행성중추신경계 질환 등이며, 목련과 수목으로부터 활성엑스, 분획 및 활성 단일성분을 분리하여 검색을 진행하고 이를 의약품, 기능성 식품으로 개발하기 위한 것이다. 또한 활용을 위해서는 자원의 확보가 절실히 필요하므로 재래적인 방법과 생물공학적 방법을 적용하는 증식방법을 확립하고자 하였다. 유전자 연구도 실시하였고, 유전자의 삽입에 의한 형질전환연구와 아울러 액아배양, 체세포배양, 세포배양에 의한 증식법확립에 대해서도 연구하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 목련과 수목의 활용성을 높이고자 다음과 같은 연구를 수행하였다.

- 국내 목련과 수종의 기능성 물질 탐색
- 항암, 고지혈증, 당뇨, 퇴행성질환 등 성인병 치료 물질 개발
 - 퇴행성 중추신경계 질환 기능개선 작용검정
 - 항당뇨 작용 및 면역기능 조절작용검정
 - 항암작용: Sulforhodamine B assay, Murine mouse tumor model 이용.
 - 고지혈증: 고지혈증 유발 및 실험동물, 혈액 및 지방조직내 지방대사에 미치는 영향 측정.
 - 살충활성, 살비활성, 살균활성 물질의 탐색: 실험곤충 및 균주의 확보 유지, 실내 생물검정법 개발, 해충과 응애 및 병균에 대한 활성물질 탐색, 작용
- 천연물 농약개발을 위한 살충, 살비, 살균효과 검정
- 유효수종 대량 증식 기술 개발
 - 기관배양을 통한 대량증식
 - 체세포배유도 및 발아에 의한 증식법 확립
 - 삽목에 의한 증식법확립
- 생물공학적인 기법을 이용한 천연물질 생산 기술 개발
 - < 형질전환법 개발 >
 - 목련과 수종에 대한 형질전환 유도
 - 형질전환된 조직의 배양조건 규명
 - 형질전환된 조직으로부터 유용성분 생산성 검정
 - < 세포배양에 의한 증식법 개발 >
 - 목련과 수종으로부터 캘러스 유기 및 배양
 - 현탁배양조건 규명
 - 현탁배양을 통한 유용물질 생산성 검정
 - 생물반응기를 이용한 대량배양 시스템 확보
- 화아분화와 관련한 유전자를 분석하고 조직특이적 유전자 기능 분석
- 천연염색성시험 : 각 수종별 부위별 염색성과 견뢰도 시험으로 실용성여부 시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 수종별 연구수행 내용 개괄표(○표는 시험한 수종을 나타냄)

수종 \ 분야	추출	구조동정	항균활성	항산화활성	시제품제작	의약활성검정	농약활성검정		유전자연구	형질전환	증식시험				염색		염색시제품
							곤충	병원균			세포배양	체세포배양	눈(절)배양	삼목시험	옷감	종이	
목련	○	○	○	○	○	○	○	○	○						○	○	○
함박꽃나무	○	○	○	○		○	○	○			○		○				○
백목련	○			○	○	○		○							○	○	
일본목련	○		○	○		○	○	○				○			○	○	○
자목련	○			○		○		○									○
태산목	○		○	○		○	○	○									
백합나무	○	○	○	○		○	○	○							○		○
초령목	○				○	○		○					○				
오미자	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○				
흑오미자	○				○	○		○						○			
남오미자	○					○		○					○	○			

2. 주요결과

- 목련과 수목의 자원 파악
- 오미자 성숙배에서 체세포배 유도 및 식물체 생산법 확립
- 오미자 기내발아묘의 자엽을 배양 줄기증식 및 발근유도를 통해 증식법 확립
- 남오미자 삼목에 의한 증식법 확립

○ 염색성시험 및 시제품제작

실크와 소창에 목련과 수목으로 염색이 가능함을 확인하고 견뢰도를 시험한 바 대체로 양호함을 보였으며, 실크 염색으로 한복, 손수건, 스카프를 광목으로 한복의 시제품을 만들어 활용이 가능함을 보임. 깃발에 주로 쓰이는 천인 폴리에스터에는 염색이 되지 않음

한지와 화선지등 종이에 염색보조제로 콩즙, 키토산, 탈지분유를 쓰고, 매염제로 알루미늄, 구리, 철을 사용하여 일본복련, 백목련, 자목련, 목련의 수피와 꽃잎을 염재로 염색을 한 결과 대체로 황색에서 주황색 계열의 색상을 나타냈으며 화선지가 순지보다 염색성이 양호하였다. 촉진노화 처리에 따라 염색보조제의 색상견뢰도를 비교한 결과 염색성이 가장 양호하였던 콩즙의 견뢰도감소가 가장 컸으며 키토산 처리 염색한지의 견뢰도 감소 또한 큰 것으로 나타났다.

백목련 및 자목련의 꽃잎 추출물로 염색한 한지의 경우 백목련 꽃잎에서 유래된 향기성분이 상당기간 지속되어 색지 및 향지로서의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

o 유전자분석

화기조직과 수피조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 찾기 위하여, 다양한 조직으로부터 RNA를 추출한 후, 각각의 RNA pool에 조직특이 표지를 넣어 작성한 프라이머를 이용하여 tagged-cDNA library를 제작하고, 고밀도로 나일론 멤브레인에 집적시켜서 여러조직에서 특이적 발현되는 유전자 1,536개 클론을 differential screening을 통해 찾아내었으며, 이 중에서 동아와 수피 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자들의 양적발현을 상대적으로 비교하여 20개의 조직특이 클론을 찾아내었다. 이 중에서 10개의 유전자는 기존에 알려진 화기분화 및 발달과 방향성분인 terpene의 대사에 관여하는 것으로 추정되는 유전자이다. 본 연구 결과가 그러한 분자생물학적 연구의 시작점이 될 수 있으며, 본 연구를 통해 목련의 약리성분중 중요한 것으로 여겨지는 이차대사물질의 대사와 관련된 것으로 추정되는 유전자가 발견되었으므로 이들의 기능 구명과 산업적 개발에 대해 여유 있는 지원이 필요하다고 생각된다.

o 약리활성 검정

1) Dopamine 생합성 조절 작용 생리활성 물질의 분리 및 생리활성 검색

MB-1-1 화합물(20 mg/ml, 2-5 μ l)은 pc12 세포중의 130-160%의 dopamine 함량 증가 작용을 나타냈으며, dopamine 생합성 효소 TH의 활성을 105-115% 증가 작용을 나타내었다.

2) Neurite outgrowth 유도작용 및 작용기전

MB-1-1(20 mg/ml, 5-10 μ l) 및 MKB-2-5(20 mg/ml, 2-5 μ l) 화합물은 neurite outgrowth 유도작용을 나타내었으며, NGF와의 병용투여시 현저한 증가작용을 나타내었다. MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물의 neurite outgrowth 유도작용은 PKA, PKC 및 MAPK 저해제에 의하여 억제작용을 나타내었다.

3) 항당뇨 효능 및 면역조절 작용 검색

검색시료를 이용하여 α -glucosidase 및 α -amylase에 대한 저해활성 검색을 시행한 결과 198W 및 4W(자목련 시료)가 α -glucosidase 특이 저해작용을 나타내어 당뇨병 치료제 개발의 선도물질 확보의 가능성을 나타내었다.

209W 분획은 Raw 264.7 세포로부터 분화된 macrophage의 nitric oxide 생성 유도작용 및 TNF- α 사이토카인 분비 촉진작용을 나타내어 강력한 암세포 분화 유도 효과 및 면역증강효과를 보여주었다.

4) 항암작용 검색

Cancer cell에 대한 세포독성의 측정에 의한 항암작용을 측정한 결과 목련과 수피자원은 유의적인 생리활성을 나타내지 않았다.

5) 고지혈증에 대한 활성검색

목련과 검색시료에 대하여 고지혈증 감소작용(mouse 사용)을 검색한 결과 유의성 있는 저해작용을 나타내지 않았다.

6) 연구 성과의 활용 및 건의

MB-1-1 화합물은 저용량에서는 dopamine 함량 증가작용, 고용량에서는 neurite outgrowth 유도작용을 나타내며, MKB-2-5 화합물은 neurite outgrowth 유도작용을 나타내고 있음을 밝혔다. 이는 MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물이 퇴행성 중추신경계 질환(파킨슨씨 질환 등), 스트레스 등의 치료제 및 기능개선제 개발에의 응용 가능성을 나타내고 있음을 제시하고 있다.

MKB-2-5 화합물은 국내 특허출원(출원번호: 2004-0036492, -0036493; 2004.5.21)하였고, MB-1-1 화합물은 특허출원 준비 중에 있다.

따라서, 생리활성 물질(MB-1-1/MKB-2-5)의 in vitro 작용기전 및 in vivo 응용연구(퇴행성 중추신경계 질환 모델)를 진행하고자 하며, 이 연구결과를 종합 평가하여 질환 증상개선을 위한 제품화연구를 추진하고자 한다. 또한, MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물의 화학구조를 lead compound(s)로 하여 유도체 합성하고 생리활성 검색을 진행하여, 독성이 낮고 효능이 증가된 새로운 생리활성 물질의 도출 연구에 응용하고자 한다.

o 기능성 활성 물질의 분리·동정

백합나무 목부, 수피로부터 후라보노이드 화합물인 taxifolin를 비롯하여 5종의 화합물, 목련 수피로부터는 리그난 화합물인 (+)-sesamin를 포함한 6종의 화합물, 함박꽃나무 수피에서 세스키테르펜인 coustunolide와 리그난인 syringin, 목부로부터 vanillic acid 및 xanthone, 그리고 오미자 열매로부터는 dibenzocyclooctadien 구조의 리그난 화합물 6개등 모두 21개의 화합물을 분리하였다.

또한 기능성 활성물질의 탐색에 있어서는 목련과 수종의 조추출물에 대해서

항균활성, 항산화 활성, 항암활성, 면역세포 생육도 및 cytokines량, microphysiometer를 이용한 세포면역 활성, 신경세포 생육증진 및 신경세포 활성화, 세포분화도등을 측정하여 활성물질에 대한 결과를 도출였다.

기능성 활성 물질의 시제품으로는 위의 활성 결과에 따라 목련추출물의 pouch, 흑오미자 줄기는 과립, 초령목은추출물 환, 오미자 열매로부터는 tablet등을 만들었다.

o 형질전환

오미자(*Schisandra chinensis*)의 형질전환은 4종의 *Agrobacterium rhizogenes* 을 사용한 결과 ATCC15834 균주에서 형질전환이 이루어졌다. 기내(*in vitro*) 유묘조직 절편에 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834.를 이용하여 식물호르몬 생합성조절 유전자를 전이시켰으며, 2주 후 오미자 조직절편으로부터 형질전환된 부정근이 유기 되었다. PCR 기법과 opine 분석을 통해서 형질전환을 확인 하였으며, 최적 배양조건하에서 형질전환된 근을 배양하고 생리활성물질인 gomisin-J의 생산성을 확인하고자 하였다. 형질전환된 근의 배양에 적합한 배지를 선발하기 위하여 MS배지를 포함한 성분이 다른 6종의 배지를 조사한 결과 WPM(Lloyd and McCown, 1980) 배지에 탄소원으로 5% sucrose를 첨가할 경우 8주 후 6.2 (g D.W/flask)을 수확할 수 있었으며, gomisin J의 함량은 $1.56 (X10^{-3} \text{ ug/g D.W})$ 으로 나타났다. 액체배양 시 초기접종 농도는 건물중량의 증가와 관련성을 보여주었으나, gomisin J의 함량에는 영향을 주지않았다. 초기 탄소원의 농도를 7% 까지 높여주었을 때 gomisin J의 생산성의 증가가 이루어졌으며, 교반속도는 120과 140 rpm에서 성장률과 물질생산성에 영향을 주었다.

o 세포배양에 의한 유용물질 생산

목련과 수종으로부터 유기한 탈분화된 체세포의 효율적인 배양조건과 이들 배양체로부터 고부가가치의 약리물질을 얻기 위한 연구를 수행하였으며, 생물반응기 시스템을 활용한 대량배양을 시도 하였다.

1) 오미자(*Schisandra chinensis*)의 배발생세포는 기내(*in vitro*)에서 발아된 잎절편 조직을 1 mg/L NAA가 포함된 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지에서 유기 하였다. 배발생세포는 성분이 다양한 6종의 배지에 접종하여 성장률과 물질의 생산성을 비교 하였다. 건물중과 gomisin-J의 생산성 비교에서는 건물중량은 초기접종 농도를 0.5 g(FCW)으로 하고 8주간 배양 하였을 때 1 mg/L NAA와 3% sucrose가 포함된 MB5

배지에서 2.23 g DCW/flask으로 가장 높았으며, gomisin-J의 생산성은 1 mg/L NAA와 5% sucrose가 포함된 WPM (Lloyd and McCown, 1980)배지에서 가장 좋았다. 한편, 교반속도는 건물중량과 물질생산성에 있어서 100과 140 rpm으로 배양하는게 적절한 것으로 나타났다..

2) 생물반응기 배양을 통한 세포의 대량배양은 공기주입식 기동형 반응기(1.5 L)에서 수행하였다. 오미자 체세포의 대량배양시 탄소원은 sucrose가 glucose 보다 건물중량과 물질의 생산성에 효과적이었다. 광주기를 16/8로 상온에서 5% sucrose가 첨가된 MB5배지에서 8주 배양 시 건물중량은 3.8 g/L, 그리고 gomisin-J의 생산성은 0.72×10^{-3} ug/g DCW로 나타났다.

여 백

SUMMARY

(영문 요약문)

For the industrialization of functional natural products from Magnoliaceae trees, a series of several projects were conducted such as an evaluation of pharmaceutical value and physiological characteristics of extracts from different parts of each trees, establishment of propagation method by cutting, axillary bud culture, somatic embryogenesis and cell culture. transformation by *Agrobacterium rhizogenes*, natural dyeing.

Various functional substances were isolated and identified from either xylem, bark, or fruits of four woody species (i.e. *Liriodendron tulipifera*, *Magnolia kobus*, *Magnolia sieboldii*, *Schizandra chinensis*). Five flavonoid compounds including taxifolin were isolated from both the xylem and bark of *Liriodendron tulipifera*. Six lignan compounds including (+)-sesamin were identified from the bark of *Magnolia kobus*. Coustunolide, a seskiterpenoids and syringin, a lignan were isolated from the bark while vanillic acid and xanthone were found from the xylem of *Magnolia sieboldii*. Six lignan compounds with dibenzocyclooctadien structure were isolated from the fruit of *Schizandra chinensis*. In summary, twenty one compounds were isolated and identified from various parts of four woody species.

In order to investigate functional substances, anti-fungal activity, anti-oxidation activity, anti-cancer activity, the growth of immune cells, the amount of cytokines, cell-immune activity, the growth improvement of neural cell, the activity of neural cells, and the degree of cell divisions were determined for the extracted compounds.

Based on the results of physiological activity examination, samples of marketable products with different types were manufactured. For example, liquid samples packed in a pouch were produced using the extracted compounds of *Magnolia kobus*, a granulated sample was prepared using the

xylem of *Schizandra nigra*, a round sample with ball shape was produced using the fruit of *Schizandra chinensis*.

The effects on neurodegenerative disorders, diabetes, neoplastic disorders, hyperlipidemia and pesticides were investigated for the new bioactive components from the various plants of Magnoliaceae. The bioactive components from the plants of Magnoliaceae were isolated routinely using the active-guided fractionation methods and determined by the various instrumental analyses.

Among the various bioactive components, MB-1-1 compound (20 mg/ml, 2-5 μ l), a coumarin derivative, increased dopamine content to 130-160% compared with the control level by enhancing tyrosine hydroxylase activity in PC12 cells. Furthermore, addition of MB-1-1 (20 mg/ml, 5-10 μ l) and a lignan derivative MKB-2-5 (20 mg/ml, 2-5 μ l) induced neurite outgrowth. The both compounds also enhanced nerve growth factor (NGF)-mediated neurite outgrowth and NGF-induced neurite bearing cells from PC12 cells significantly. However, the neurite bearing ability induced by the both compounds were significantly inhibited by treatment of PKA (H89, 0.1 μ M), PKC (GF1092034, 0.1 μ M) and MAPK (PD98059, 20 μ M) inhibitors, respectively. These results indicate that MB-1-1 and MKB-2-5 have a neurotogenic activity in PC12 cells.

Bioactive fractions of 198W and 4W from *Magnolia liliflora* showed an inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase activities, suggesting that fractions of 198W and 4W have a possibility to apply for the diabetes. In addition, 209W fraction induced the formation of NO and stimulated the secretion of TNF- α in differentiated macrophage cells. These results suggest that 209W fraction has an immune modulatory activity.

In contrast, the various bioactive fractions from the plants of Magnoliaceae did not show anti-neoplastic, anti-hyperlipidemic and pesticidal activities.

Taken together as described above, MB-1-1 and MKB-2-5 compounds found to have a NGF-like neurotogenic activity. The intracellular mechanisms and the behavior pharmacological action sing MB-1-1 and MKB-2-4 need to

be studied further for the development of the bioactive compounds for the care or protection of the neurodegenerative disorders.

To isolate the potential candidate genes producing medicinal chemicals, subtractive cDNA differential screening was performed. To achieve a tissue specific comparison, cDNA library was constructed using tissue specific sequence tagged primers. And high density colony array of 40,060 cDNA clones were screened with 2 stage screening strategy, the first was with subtracted cDNA probes and the second was unbiased first strand cDNA probes. Total of 20 cDNA clones which expressed specifically in flower bud and in bark were screened out. Among them 4 from flower bud were estimated to have functions related to flower development, and 1 from flower bud and 4 from bark were estimated to be related to secondary metabolism, especially terpenoids biosynthesis.

For production of useful metabolites from transformed tissue cultures of *Magnolia* spp, transformed roots of *Schisandra chinensis* were obtained following co-cultivation of *in vitro* cultivated plantlet segments with *Agrobacterium rhizogens* ATCC15834. This root was examined for its growth and gomisin-J contents under various culture conditions. Among the six basal culture media tested, WPM(Lloyd and McCown, 1980) medium supplemented with 5% sucrose was the best roots growth 6.2 (g D.W/flask) and gomisin J accumulation 1.56 ($\times 10^{-3}$ ug/g D.W). Initial inoculum size correlated with the yield of biomass while gomisin J contents was not affect. Gomisin J production was influenced by the initial sucrose concentration and the highest production yield was achieved at the concentration of 7%. The optimal shaking speeds for roots growth and gomisin J production was 120 and 140 rpm, respectively.

For the production of useful biochemicals from suspension cell cultures of *Magnolia* spp, plant cell cultures are an attractive source to whole plant from the production of high-value secondary metabolites. In this projects, we investigated the optimal conditions for useful metabolites production of the cultured cells in *Magnolia* spp. The results of production of useful compounds

from cell suspension cultures of *Magnolia* spp. were follows;

1) In case of *Schisandra chinensis*, embryogenic calli were induced from *in vitro* cultivated leaf segments on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1 mg/L NAA. Cell growth and gomisins-J production by suspension cultures of *S. chinensis* were investigated under various culture media, initial sucrose concentrations, shaking speeds, and inoculum sizes. The maximum dry cell weight (DCW) of 2.23 was obtained at inoculum size of 0.5 g fresh cell weight (FCW) and in MB5 medium supplemented with 1 mg/L NAA, 3% sucrose after 8 weeks. The production of gomisins-J in suspension cell cultures was maximized in WPM medium (Lloyd and McCown, 1980) containing 5% sucrose. The optimal shaking speed for dry weight was 100 rpm while the best shaking speed for gomisins J accumulation was 140 rpm.

2) Plant cell culture in bioreactors has been considered as an alternative technology to obtain natural compounds of use in the pharmaceuticals. In order to gain a better understanding of the behaviour of the cells in scale-up culture and to improve the mass production of useful chemicals, we initiated investigations on cell suspension cultures in air-lift type bioreactors. The growth of cells and gomisins-J production were found to be better with sucrose than with glucose as the medium carbon source. The maximum DCW (3.8 g/L) and gomisins-J production (0.72×10^{-3} ug/g DCW) obtained in MB5 basal medium containing 5% sucrose with light/dark regime, which were lower than in flask process.

For propagation, protocols of *Schizandra chinensis* have been developed using regenerated shoots from axillary bud explants, somatic embryogenesis using mature seeds

Rooting of cuttings were successful in *Schizandra nigra*.

In order to establish a dyeing method with Magnoliaceae tree species dyeing of silk was examined with 4 different parts; leaf, stem bark, root, flower of 4 Magnoliaceae species; *Magnolia kobus* Dc., *Magnolia denudata* Desr., *Magnolia obovata* Thunb., *Liriodendron tulipifera* L. Mordants used were chemicals ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. All four species showed

similar coloring among four different parts. Leaves and petals showed dark yellow; stem bark, grayish yellow; root bark, dark red or yellow. Al mordant made more brighter colour than Fe mordant. Stem bark showed less difference in color by mordants, whereas petals did the biggest.

여 백

CONTENTS

(영 문 목 차)

CHAPTER 1. INTRODUCTION	21
Section 1. Objectives	21
Section 2. Justification	25
Section 3. Scope	28
CHAPTER 2. STATE OF THE ART	29
CHAPTER 3. RESEARCH METHODOLOGY AND RESULTS	33
Project 1. Investigation of Magnoliaceae Resources	34
Project 2. Detection of functional substances with physiological activity from major species	36
1. Materials and Methods	36
2. Results and Discussion	47
Project 3. Evaluation of Extracts on Pharmaceutical Value	100
1. Introduction	100
2. Materials and Methods	100
3. Results and Discussion	103
4. Conclusion	142
Project 4. Gene Analysis of Flower Buds and Barks	144
1. Introduction	144
2. Materials and Methods	144
3. Results and Discussion	148
4. Conclusion	154
Project 5. Production of useful metabolites from transformed tissue cultures (<i>Schisandra chinensis</i>)	155
1. Introduction	155
2. Materials and Methods	156
3. Results and Discussion	158

Project 6. Mass production of useful biochemicals from suspension cell cultures (<i>Schisandra chinensis</i> , <i>Magnolia sieboldii</i>)	164
1. Introduction	164
2. Materials and Methods	165
3. Results and Discussion	167
4. Conclusion	174
Project 7. Propagation Method Deveolpment of Magnoliaceae Trees	175
1. Introduction	175
2. Bud Culture(<i>Schisandra chinensis</i>)	176
3. Somatic Embryogenesis(<i>S. chinensis</i>)	182
4. Rooting of Cuttings(<i>Katsura japonica</i>)	207
Project 8. Natural Dyeing of Fabric and Papers with Magnoliaceae Trees ...	
.....	209
1. Dyeing characteristics of Silks	209
2. Test of Fastness	217
3. Dyeing characteristics of Sochang	219
4. Making of Trial Goods	227
5. Dyeing Characteristics of Papers	230
 CHAPTER 4. ACHIEVEMENT OF THE PROJECT and ITS CONTRIBUTION TO RELATED AREA	 251
 CHAPTER 5. APPLICATION PLAN OF PROJECTS RESULTS	 257
 CHAPTER 6. TECHNOLOGICAL INFORMATION OBTAINED DURING THE PROJECT PERIOD	 259
 CHAPTER 7. LITERATURE CITED	 261
 APPENDICES(Dyeing Plates)	 281

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	21
제1절	연구개발의 목적	21
제2절	연구개발의 필요성	25
제3절	연구개발의 범위	28
제 2 장	국내외 기술개발 현황	29
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	33
제1절	목련과 수목의 자원조사	34
제2절	생리활성이 있는 주요수종의 기능성 천연물질 탐색	36
1.	재료 및 방법	36
2.	결과 및 고찰	47
가.	화합물의 구조동정(47) 나. 항균활성(67) 다.항산화활성(68)	
라.	항암활성(70) 마. 면역세포생육도 및 cytokines분비(81)	
바.	microphysiometer를 이용한 면역활성측정(88)	
사.	신경세포 생육촉진및신경세포활성화(88)	
아.	세포분화도(92) 자. 활성물질의 시제품생산(94)	
제3절	의약활성물질탐색	100
1.	서론	100
2.	재료 및 방법	100
3.	결과 및 고찰	103
가.	퇴행성 중추신경계질환(103) 나. 항당뇨 효과(125) 다. 면역조절효능(130)	
라.	항암작용 검색(132) 마. 고지혈증에 대한 활성 검색(135)	
바.	병원균에 대한 활성검정(136) 사. 살충 살비 활성물질 탐색(138)	
4.	결론	142
제4절	유전자분석(목련)	144
1.	서론	144
2.	재료 및 방법	144
3.	결과 및 고찰	148
가.	cDNA library 작성(148) 나. 조직특이 발현유전자 스크리닝(150)	
4.	결론	154

제5절 형질전환에 의한 유용물질의 생산(오미자)	155
1. 서론	155
2. 재료 및 방법	156
3. 결과 및 고찰	158
제6절 세포배양에 의한 유용물질의 대량생산(오미자, 함박꽃나무)	164
1. 서론	164
2. 재료 및 방법	165
3. 결과 및 고찰	167
제7절 증식법 개발	175
1. 서론	175
2. 액아배양 (오미자)	176
3. 체세포배배양(오미자)	182
4. 삼목(남오미자 등)	207
제8절 목련을 이용한 천연염색성 시험	209
1. 실크의 염색성	209
2. 견뢰도 검사	217
3. 소창의 염색성	219
4. 염색물의 시제품제작	227
5. 종이의 염색성	230
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	251
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	257
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	259
제 7 장 참고문헌	261
부록(염색사진)	281

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

국내에 자생하고 있는 목련과 수목에 대한 기능성 생리활성 물질을 탐색하여 이러한 물질의 구조를 구명하고 의약품, 농약, 염료로 물질의 상품화를 실현하여 고부가가치를 창출하고자한다. 또한 유용물질을 생산하는 수목을 급속증식하고 아울러 첨단기술을 이용한 물질의 단기 대량생산을 도모함으로써 이 분야에 대한 국가경쟁력 향상을 목표로 하고 있다.

가. 기술개발 목표 및 내용

(1) 기술개발 최종 목표

- 목련과 수목으로부터 생리활성에 근거한 항암, 고지혈증, 당뇨병 퇴행성질환 등에의 의약품과 살충, 살비, 살균에 유효한 농약 및 종이, 옷감에 염료개발 등에 대한 database 구축으로 기능별 유효 수목의 활용체계 확립
- 고부가가의 목련과 수목의 산림자원을 선발·증식하는 기술과 첨단기술을 이용한 유용물질의 생산 기법을 확립

(2) 단계별 목표 및 내용

- 1단계 : 국내산 수목의 유용물질 개발 및 생산 기반 조성기술 향상
- 2단계 : 개발 유용물질의 활용기술 확립
- 3단계 : 수목류의 특수성분의 산업화

(3) 기술개발 내용

- 국내 수종의 기능성 물질 탐색
- 개발물질을 이용한 항암, 고지혈증, 당뇨, 퇴행성질환 등 성인병 치료 물질 개발
- 천연물 농약개발을 위한 살충, 살비, 살균효과 검정 및 염료 개발
- 유효수종 대량 증식 기술 개발
- 생물공학적 기법을 이용한 천연물질 생산 기술 개발
- 목련과 수목자원으로부터 살충, 살비, 및 살균활성 물질의 탐색을 위한 생물검정
- 목련의 화아분화, 배 발생, 그리고 종자 발달에 관련된 유전자 자원의 확보
- 꽃의 조직특이적 유전자 기능 분석

나. 연차별 연구개발사업 목표 및 내용

연차	기관	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도 (20 01)	제1세부 (충북대)	- 기관배양을 통한 대량증식 - 체세포배유도 - 천연염색성시험	- 줄기발생 배지 및 조건 구명 - 줄기증식 배지 및 조건 구명 - 체세포배유도 배지 및 조건 구명 - 시료채취, 가공, 추출
	제2세부 (충북대)	- 생리활성 물질의 활성 검색 - Human cancer cell에 대한 세포 독성 검색 - α -glucosidase inhibitor의 탐색 - 살충, 살비활성물 질의 탐색 - 살균활성물질의 탐색 - 생물검정법 개발	1. 항암작용 - Sulphorhodamine B 분석법에 의한 검색 2. 고지혈증 - 혈액내 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 및 중성지방 함량 분석 - 간 및 지방조직의 지질분석에 의한 검색 - GOT, GPT 및 γ -GTP 측정 3. 당뇨병 - α -glucosidase inhibitor의 탐색 4. 퇴행성 중추신경계 질환 - Catecholamine 생합성 과정에 대한 작용기전: PKA/PKC/ Ca^{++} 농도 변화 - Catecholamine 생합성/대사 효소활성 - Neurite outgrowth 유도작용에 대한 작용기전: Neurite outgrowth 측정 - 실험곤충의 확보 유지 - 해충과 응애에 대한 활성물질 탐색 - 주요 식물병원균주의 분리동정 및 계대배양 - 병원균 생육억제물질의 탐색 (in vitro) - 실내 생물검정법 개발
	제1협동 (임업연구 원)	- 기능성활성 물질 탐색	- 목련과 수목의 채취 및 추출 - 기능성 생리활성 탐색 - 기능성활성물질의 분리·구조동정 I
	제2협동 (전남대)	- 형질전환 기술 개발	- <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 에 의한 목련과 수종의 형질전환 - 형질전환 효율을 증대시키기 위한 기법 개발

2 차 년 도 (20 02)	제1세 부 (충북 대)	<ul style="list-style-type: none"> -기관배양 -체세포배배양 -인공종자 개발 -천연염색성시험 -유전자분석 	<ul style="list-style-type: none"> -발근유도법 구명 -순화처리조건 구명 -체세포배유도배지 및 조건 구명 -발아촉진방법 구명 -경화조건 구명 -encapsulation 방법 확립 -수종별 부위별 시험 - 목련 수종의 잎, 화아 분화, 배 발생, 종자 발달 단계별 시료의 채취 - 시료로부터 RNA 분리 및 cDNA library 작성 - 기 알려진 유전자의 degenerate oligomer를 이용한 PCR 및 염기서열의 분석
	제2세 부 (충북 대)	<ul style="list-style-type: none"> -생리활성 물질의 작용기전 -Murine tumor 모델에서의 효능평가 및 급성독성평가 -α-glucosidase inhibitor의 분리 정제 및 구조의 규명 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 당뇨병 <ul style="list-style-type: none"> -α-glucosidase inhibitor의 분리 정제 및 구조의 규명 2. 퇴행성 중추신경계 질환 <ul style="list-style-type: none"> -Catecholamine 생합성 과정에 대한 작용기전 -Catecholamine 생합성 효소 gene 조절작용 -Neurite outgrowth 유도작용에 대한 작용기전: NGF 수용체 친화성 L-DOPA-induced apoptosis
	제1협 동 (임업연 구원)	<ul style="list-style-type: none"> - 2차 생물검정 및 활성물질의 분리 정제 	<ul style="list-style-type: none"> -활성분획물에 대한 생리활성 탐색 -기능성활성물질의 분리·구조동정 II -활성물질에 대한 2차 생물검정
	제2협 동 (전남 대)	<ul style="list-style-type: none"> -형질전환조직의 배양 	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환조직의 배양을 위한 최적 조건 규명 - 물질생산 효율 증대를 위한 배양조건 규명

3차 년도 (2003)	제1세 부 (충북 대)	-우량체세포배 선발 -생물반응기를 이용한 규격묘 생산 -천연염색성시험 -유전자연구	-유도된 체세포배로부터 우량배를 선발 -순화 및 토양이식 -염색법확립 - Differential Screening을 통한 조직 특이유 전자의 확보 - 선발 유전자의 조직 특이 발현을 Northern blot을 통한 분석 - 조직 특이유전자 10개 이상의 기능 분석 후보 선발
	제2세 부 (충북 대)	-생리활성 물질의 제 품화 및 활성 검색 : 독성시험검색 -Human tumor xenograft 모델에서의 효능평가 - α -glucosidase inhibitor의 항당뇨 효능 측정	1. 당뇨병 - α -glucosidase inhibitor의 항당뇨 효능 측정 독성시험 : 치사량 검사 2. 퇴행성 중추신경계 질환 -동물모델의 혈액/뇌중의 dopamine 함량: In situ brain perfusion 방법 Microdialysis -BBB transport: MBEC4 cells
	제1협 동 (임업 연구원)	-기능성활성물질의 제 품화	-기능성활성물질의 분리·구조동정 III -생리활성 물질의 제품화 공정확립 및 시제품생산
	제2협 동 (전남 대)	-형질전환 기술 개발	- <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 에 의한 목련과 수종의 형질전환 -형질전환 효율을 증대시키기 위한 기법 개발

제2절 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

임산자원의 생리활성 물질 구명으로 유효 산림자원의 체계적 관리방안 필요
임업의 경제성 향상을 위한 고부가가치의 천연물질 생산용 산림자원 개발이 요구됨

고부가가치성 임산자원의 대량재배로 유휴 임지의 효율적 이용과 산촌의 소득 증대

국내의 임산자원으로부터 의약품, 기능성 식품 등의 개발을 위한 연구는 매우 미진하다. 따라서목련과 수목으로부터 성인병 치료물질을 개발하기 위한 연구가 절실하다. 성인병의 검색 범위는 항암작용, 고지혈증, 당뇨병, 퇴행성중추신경계 질환 등이며, 목련과 수목으로부터 활성엑스, 분획 및 활성 단일성분을 분리하여 검색을 진행하고 이를 의약품, 기능성 식품으로 개발하기 위한 것이다. 선진국에서는 항암활성평가기술을 국가연구기관 및 제약관련 대기업 등에서 보유하고 있으며 더욱 진보된 평가시스템에 대한 개발을 지속적으로 추진하고 있으며, 이 분야의 기술개발이 요구되고 있다.

생활 수준의 향상과 더불어 당뇨병 및 고지혈혈증의 발병율이 점차 증가하고 있다. 우리 나라의 당뇨병 유발율은 1970년도에는 0.9%로 추정되나, 1990년대 초에는 약 3%로, 그리고 1990년대 후반에는 약 7%에 이른 것으로 조사되고 있다. 당뇨병은 인슐린 의존형 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)과 인슐린 비의존형 (noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)으로 분류되고 있다.

당뇨병으로 인한 합병증의 원인을 차단하기 위해서는 혈중 glucose의 농도를 낮추어 주어야 한다. 이러한 목적으로 현재 개발되어 있는 혈당 저하 방법에는 인슐린 분비를 증가시키는 방법, 인슐린에 대한 세포의 반응성을 증가시키는 방법 및 외부에서 유전자 재조합 방법으로 생산된 인슐린을 투여하는 방법 등이 있다. 그러나, 이들 방법들도 당뇨병으로 인한 합병증을 효과적으로 치료할 수 없는 경우가 많은 실정이다.

당뇨병 치료제의 세계 시장규모가 약 14억 달러에 이른다는 점 및 이당류 가수분해효소 저해제는 당뇨병뿐만이 아니라 비만의 치료제로서 개발될 수 있다는 점에서 대단히 부가가치가 높은 의약품 개발의 선도물질을 제공할 것으로 기대된다.

퇴행성 중추신경계의 질환에는 Parkinson씨 질환, Alzheimer 질환, 알코올 중독 등이 있으며, 이 질환들의 치료 및 발병에는 중추신경계의 monoamine 함량

(catecholamines, serotonin)이 중요한 역할을 하고 있다.

신경증식(nerve growth) 작용에는 neurotrophic factor 및 neurite outgrowth 유도작용을 가진 물질로 나누며, neurite outgrowth 유도 물질 또는 neurotrophic factor(s)는 중추 및 말초 신경계의 퇴행성 질환인 Parkinson씨 질환, Alzheimer 질환, ischemia, Huntington 질환, 기억장애 등의 연구 및 치료에 응용될 수 있다.

Catecholamine 생합성 조절작용에는: 1) dopamine 함량 증가작용과 2) dopamine 함량 감소작용으로 구분할 수 있으며, 조절작용을 가진 생리활성 물질은 catecholamine과 관련한 각종 신경계 질환의 연구/작용기전 및 치료제 개발의 연구에 응용될 수 있다.

퇴행성 중추신경계 질환 치료제 개발을 위한 검색법 및 작용기전의 연구 방법, 퇴행성 질환 동물모델을 이용한 치료제의 개발 연구 방법의 도입 및 기술의 개발이 필요하다.

새로운 신물질의 분리분석 기술, 생리활성 물질의 drug design에 의한 새로운 유도체의 합성 등에 의한 신물질의 개발 등에 응용될 수 있다.

국외에서 목련과 식물의 약리활성에 대한 관심이 높아지고 있는 이 시점에서 이들 분야에 대하여 취약한 국내의 연구상황에서 앞으로 체계적인 연구를 통하여 물질탐색 및 약리활성을 밝혀 의약품 개발의 초석이 되는 연구가 필요하다. 전세계 유기합성 농약시장은 1999년도 297억불이었으며, 국내 농약시장은 1995년 6,500억원이었으나, 1999년에는 9,500억원으로 크게 증가하였다. 농약사용량은 계속 증가할 것으로 예상되므로 인류의 건강과 환경을 위하여 새로운 저독성 농약의 개발이 시급히 요청되고 있다.

선진국에서는 산림자원으로부터 농약, 의약 및 식품의 기능성소재로서 집중적으로 연구하고 있으나 국내 연구는 미비한 실정이다.

병해충의 효율적인 방제법을 확립함은 물론 합성농약의 과용으로 인한 생태계의 파괴 및 자연환경에 대한 피해를 최소화할 수 있는 천연물로부터 유래된 환경 친화적 또는 저독성 살충제의 새로운 선도물질의 창출이 기대된다.

살충 및 살균활성물질의 작용특성 연구는 관련 기초학문 발전에 기여 산림자원으로부터 병해충의 방제제 개발을 통한 자원관리, 해충사육법, 생물검정법, 정밀분석 기술을 확립함으로써 국내 농약산업의 국제 경쟁력 강화 유용물질이 밝혀지면 이를 공급할 수 있는 수목의 대량공급이 요구되며 또한 첨단 기술을 이용한 물질의 대량생산기술의 확립이 필요하다

우량 유전자 자원의 확보는 곧 국력이므로 국내 자원식물의 유전자 확보가 필

수적으로 요구됨.

2) 경제산업적 측면

국내 자원을 이용한 의약품, 기능성식품 및 천연물농약 등 유효물질 개발로 원료약제 수입대체

성인병 치료물질(항암작용, 고지혈증, 당뇨병, 퇴행성 중추신경계 질환 등)의 개발은 고부가성의 잠재력을 지니고 있으며, 의약품, 식품 산업의 획기적인 발전을 기대할 수 있다.

생리활성에 근거하여 기능별 유효 식물자원의 활용체계를 확립하며, 산림자원의 농가보급으로 인한 농가소득의 확보에 기여할 수 있다.

산림자원으로부터 살충제와 살균제를 개발하여 산업화함으로써 국제수지 향상에 기여할 수 있다

저독성 살충 살균 활성물질을 이용한 병해충의 방제로 각종 작물의 고부가가치화 및 국제 경쟁력 강화

환경친화적 병해충방제제의 생산원으로서 산림자원의 부가가치 제고

3) 사회문화적 측면

· 유효물질 생산을 통한 고용창출 확대

· 각종 성인병은 경제적 선진-산업화에 따라 노령인구의 증가와 함께 증가하며, 사회적 문제가 되기 때문에 이와 관련된 치료제 및 연구방법의 개발/기술확보는 국민복지 차원에서 국가가 투자해야 할 주요 기술분야이다. 성인병 치료물질의 개발, 원인과 예방에 대한 연구는 국가사회/가족 문화 정서면에서 매우 중요하다.

· 기존 유기합성 농약은 대상 병원균이나 해충에 대한 독성 뿐 아니라, 인축 독성, 잔류독 및 환경독성 등 커다란 사회적 문제를 야기하고 있으나, 저독성 살충제와 살균제의 개발은 이러한 유기합성 농약의 부작용을 줄여 인류환경과 생태계보전에 기여할 수 있다.

· 새로운 유형의 살충제와 살균제 개발에 대한 경험 축적 및 선진국과의 경쟁에 대한 자신감 고취

제3절 연구개발의 범위

1. 국내 수종의 기능성 물질 탐색 및 구조동정
2. 개발물질을 이용한 항암, 고지혈증, 당뇨, 퇴행성질환 등 성인병 치료 물질 개발
3. 천연물 농약개발을 위한 살충, 살비, 살균효과 검정
4. 유효수종 대량 증식 기술 개발
기내배양, 삼목
5. 생물공학적인 기법을 이용한 천연물질 생산 기술 개발
형질전환, 세포배양
6. 목련의 화아분화에 관련된 유전자 자원의 확보
7. 유전자를 분석하고 조직특이적 유전자 기능 분석
8. 천연염색성시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

(1) 우리 나라의 기술개발 현황 및 개발 수준

의·약학 및 식품분야를 중심으로 천연 약리성분 탐색 및 개발에 관한 연구가 추진중이나 원료의 대부분을 공급하는 산림자원 분야에서는 연구가 매우 미진함 최근 일부 수목류로부터 천연물농약 개발을 위한 유효 수종 탐색 중 천연물 및 그 가공품을 이용한 기능성 식품의 제조기술 수준이 매우 낮고 현재 일부 임산자원을 이용한 식음료 제품이 민방수준에서 소량씩 생산 선진국에서는 항암활성평가기술을 국가연구기관 및 제약관련 대기업 등에서 보유하고 있으며 더욱 진보된 평가시스템에 대한 개발을 지속적으로 추진하고 있다. 또한 일부 전문기업에서는 평가시스템을 보유하여 외부시료에 대한 평가만을 전담하는 경우도 있다. 항암 활성 평가기술의 경우를 살펴보면 미국의 NIH 산하의 National Cancer Institute (NCI)에서는 암 치료진단 연구부를 중심으로 항암제의 실용화단계의 활성평가시스템을 구축하여 여러 산학연에서 개발된 미지물질에 대한 약효평가를 시행하고 있다.

국내의 경우는 항암제 개발 연구가 수십 년 동안 진행되었지만 신약으로 등록된 경우는 극히 미약하다. 우리나라의 경우는 생약, 미생물 등 천연물질과 분자생물학적인 방법에 의해 많은 항암후보약물을 도출하고 있지만 이를 항암제로 인정할 수 있는 활성평가시스템이 부족한 상태이다.

생활 수준의 향상과 더불어 당뇨병 및 고지혈증의 발병율이 점차 증가하고 있다. 우리 나라의 당뇨병 유발율은 1970년도에는 0.9%로 추정되나, 1990년대 초에는 약 3%로, 그리고 1990년대 후반에는 약 7%에 이른 것으로 조사되고 있다.

당뇨병 상태가 지속되는 경우, 고혈당 상태로 인하여 여러 가지 합병증이 수반되는 데, 당뇨병성 미세혈관합병증 microangiopathy, 대혈관합병증 macroangiopathy, 망막증 retinopathy 및 신증 nephropathy 등으로 나타나게 된다.

당뇨병으로 인한 합병증의 원인을 차단하기 위해서는 혈중 glucose의 농도를 낮추어 주어야 한다. 이러한 목적으로 현재 개발되어 있는 혈당 저하 방법에는 인슐린 분비를 증가시키는 방법, 인슐린에 대한 세포의 반응성을 증가시키는 방법 및 외부에서 유전자 재조합 방법으로 생산된 인슐린을 투여하는 방법 등이 있다. 그러나, 이들 방법들도 당뇨병으로 인한 합병증을 효과적으로 치료

할 수 없는 경우가 많은 실정이다.

본 연구에서 계획하고 있는 혈당저하 방법은 기존에 개발되어 상용화되고 있는 치료 방법과는 달리 탄수화물 가수분해효소를 선택적으로 저해하여 혈당 상승을 억제하려는 것이다. 즉, 탄수화물 소화의 최종 단계에서 작용하는 maltase와 같은 소장 점막 이당류 가수분해효소 만을 선택적으로 억제하는 활성을 갖고 있는 물질을 탐색하고자 한다.

Neurotrophic factor/neurite outgrowth 유도작용을 가진 물질은 NGF가 대표적이며, staurosporine, K252a, K252b, simvastatin, AIT-802 등도 PC12 cells 중에서 neurite outgrowth 유도작용을 나타내고 있으며, 연구용으로 사용되고 있으나, 임상적 실용화는 되고 있지 않다.

최근, 본 연구팀은 전통 약용식물 중에서 PC12 cells 중의 dopamine 생합성 조절작용을 나타내는 생리활성 물질, neurite outgrowth 유도작용을 나타내는 생리활성 물질을 분리하고 있다. 이 전통 약물식물은 생약으로서 자주 사용되고 있으며, 비교적 독성이 적다.

국내에서는 목련과 식물들이 한방약제로 옛날부터 사용되어 왔다. 그러나 어떠한 성분이 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구는 거의 없었다. 최근에 목련과 식물 11종중에서 일본목련과 함박꽃나무에서 물질탐색과 항암성분이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직 목련과 수목에 대한 기능성 성분 및 생리활성 물질에 관한 체계적인 연구는 미미한 상태이다.

산림자원으로부터 저독성 농약 개발연구는 일부 대학과 연구소에서 이루어져 왔으나 아직 선진국은 물론 가까운 일본에 비해서도 초보단계에 있다.

충북대학교 농생물학과 살충제 생물검정실과 나무병학연구실에서는 우리나라 실정에 맞는 생물검정 체계를 확립하고, 생물검정용 실험충 및 병원균과 기주 식물을 확보, 유지하고 있다.

(2) 외국의 기술개발 현황 및 개발 수준

선진국의 경우 퇴행성 질환 치료용 천연 의약품 개발을 국책사업으로 추진 주목 항암물질인 택솔과 편백으로부터 MRSA 살균물질인 히노키치올을 개발하여 상품화

미국은 식물자원으로부터 천연물 농약 개발을 위한 연구를 추진 중

목련과 수목자원을 이용한 성인병 치료물질의 개발에 대한 신소재의 창출은 새로운 생리활성 물질의 작용기전 및 질환 모델을 이용한 연구결과에 의하여 의약품, 기능성 식품으로의 응용 개발이 제시될 수 있다.

의약품, 기능성 식품으로의 응용(제품화)이 이루어지면 국내/국제시장에서 상당한 주목을 받을 수 있으며, 시장성은 매우 크다고 사료된다.

국외에서는 많은 수종의 목련과 식물에 대한 물질분석과 약리효과에 대하여 연구되어 왔다. 일본의 경우, 태산목, 백목련, 후박나무 및 그 이외 수종의 목련과 식물들에 대한 물질탐색 연구가 이루어졌다. 특히, *Magnolia fargesii*의 꽃눈은 비염치료제로 사용되고, 이와 관련하여 이뇨 촉진, 항균작용, 골격근 수축효과 등의 약리학적 연구가 이루어지고 있다. 한편, 백목련, 자목련, 함박꽃나무의 경우에는 리그난 물질들이 많이 포함되어 있고 이들 물질들은 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 밝혀져 기능성 식품 및 의약품 개발 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이상적인 연구순서

본 연구과제는 유용물질을 탐색하여 유용성을 검정하고 증식하고자 하는 연구로 아래 단계별로 순차적으로 이루어져야 하나, 모든 연구가 동시에 시작하여 동시에 끝내야 하기 때문에 순서에 따라 할 수 없었음

단계	연구내용	담당세부과제	비고
1	자원의 파악, 수집	제1세부, 제1협동	
2	물질추출 및 구조동정	제1협동	
3	활성검정	제2세부 제1협동	
4	관련유전자검색	제1세부	
5	유전자 추출	제1세부	
6	유전자 삽입-형질전환	제2협동	
7	세포배양-식물체유도	제2협동위탁	
8	대량생산 - 공급	제1세부	

따라서 보고서에서는 연구계획서의 순서와 달리 위 순서에 따라 구성하였음

제1절 목련과 수목의 자원조사(제1세부, 충북대 산림과학부)

목련과(Magnoliaceae) 수목은 아시아 아프리카 12속 250여종이 있으며 한반도에
는 3속 5종이 자생하고 있다. 목련속(*Magnolia*)은 국내종은 목련(*M. kobus*)이
제주원산으로 남한에 식재되고 있고 함박꽃나무(*M. sieboldii*)는 산간지역에만 자
라고 식재는 거의 이루어지지 않고 있다. 외국종으로는 조경용으로 심겨지는 태
산목(*M. grandiflora*), 백목련(*M. denudata*), 일본목련(*M. obovata*)이 들어
와 있고, 자목련(*M. liliflora*)도 식재되고 있다. 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)는
생장이 양호 하여 가장 자원이 풍부하다고 할 수 있으며 산림청에서 조림 수종으
로 권장되고 있다. 초령목(*Michelia compressa*)은 일본 산으로 알려져 있었으나
최근 국내에서 자생하는 것으로 밝혀졌고 난대에서 자란다. 오미자나무류는 목련
과에 포함시키기도 하고 오미자나무과로 독립시키기도 하는데 오미자(*Schizandra
chinensis*)가 전국적으로 분포하여 가장 널리 분포해 자라며 흑오미자(*Schizandra
nigra*)와 남오미자(*Kadsura japonica*)는 남부에만 자란다. 충남 태안의 천리포수
목원에는 목련속 400여종 (품종)을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다.

목련과 수목의 자원중 국내에서 자라고 있는 수종에 대해 표 1에 정리했다.

표 1. 목련과 수목의 특성과 자원확보 용이성

수종 \ 구분	원산지/ 식재지	생 태 형	용 도	자 원 확 보 가 능 성	비 고
목련	제주도/ 남한	낙엽교목	조경용	집단재배는 안되고 있음	
함박꽃나무	한국/ 전국	낙엽소교목	식재 거의 없음	분포범위가 넓으나 낮은 지역에는 분포하지 않음	북한의 국화
백목련	중국	낙엽소교목	조경용	집단재배는 안되고 있음	
일본목련	일본	낙엽교목	조경용	집단재배는 안되고 있음	
자목련	중국	낙엽소교목	조경용	집단재배는 안되고 있음	
태산목	북미/ 남부	상록교목	조경용	집단재배는 안되고 있음	
백합나무	북미/ 남한	낙엽교목	목재용	생장이 양호하여 조림수종으로 권장하고 있으므로 자원확보 용이	

초령목	제주도/ 일본	낙엽교목	불전에 장식용	자원확보 어려움	
오미자	한국/ 전국,백 두산	낙엽덩굴	과실생산	가장 많이 재배되고 있음	
흑오미자	제주도	낙엽덩굴	과실생산	자원확보 어려움	
남오미자	제주도	상록덩굴	과실생산	자원확보 어려움	

제2절 생리활성이 있는 주요수종의 기능성 천연물질 탐색
(제1협동과제, 국립산림과학원, 구 임업연구원)

1. 재료 및 방법

1) 목련과 수목의 채취 및 추출

수종명	부위	채취장소 및 시기
백합나무 (<i>Liriodendron tulipifera</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	어천시험림(수원), 2001.6.
목련 (<i>Magnolia kobus</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	가좌시험림(진주), 2001.7.
태산목 (<i>Magnolia grandiflora</i>)	잎, 줄기(목부, 수피)	가좌시험림(진주), 2001.7.
함박꽃나무 (<i>Magnolia sieboldii</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	가좌시험림(진주), 2001.7.
일본목련 (<i>Magnolia obovata</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	가좌시험림(진주), 2001.7.
자목련 (<i>Magnolia liliflora</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	월하시험림(진주), 2001.11.
백목련 (<i>Magnolia denudata</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	월하시험림(진주), 2001.7.
오미자 (<i>Schizandra chinensis</i>)	줄기, 열매	구입(무주), 2002.9.
흑오미자 (<i>Schizandra nigra</i>)	줄기, 열매	제주시험림, 2002.6
남오미자 (<i>Kadsura japonica</i>)	줄기, 열매, 잎	제주시험림, 2002.6
초령목 (<i>Michelia compressa</i>)	잎, 줄기(수피, 목부)	제주시험림, 2002.6

나. 용매 분획

1) 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)

가) 백합나무 목부

백합나무는 박피하여 목부와 수피로 구분하고 목분은 에탄올 용출용매로 사용하여 실온에서 120시간 동안 침적시켜 추출하였으며, 이 조작을 2회 반복 하여 얻어진 조추출물을 석유에테르(LPE)와 에칠아세테이트(EtOAC) 로 분획하였다.

나) 백합나무 수피

백합나무 수피는 메탄올을 용출용매로 사용하여 실온에서 120시간 동안 침적시켜 추출하였으며, 이 조작을 2회 반복 하였다. 여기서 얻어진 조추출물은 여과 및 감압농축 하여 LPE, Et₂O, EtOAc 및 부탄올로 연속 용매 추출을 행하여 분획하였다.

2) 목련(*Magnolia kobus*)

가)수피

목련을 박피하여 수피를 음건시키고, 잘게 썰은 후 분쇄기로 분쇄하여 분말화하였으며, 분말은 에탄올(ethanol, EtOH)을 사용하여 실온에서 3일 동안 침적시켜 추출하였고, 이 조작을 3회 실시하였다. 여기서 얻어진 EtOH 조추출물은 석유에테르(petroleum ether), 에테르(ether, Et₂O), 에칠아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(Buthanol)를 사용하여 순차 연속추출하여 분획 하였다.

3) 함박꽃나무(*Magnolia sieboldii*)

가)수피

함박꽃나무를 박피하여 얻은 수피를 음건시킨 후, 분쇄기로 분쇄하여 분말시료로 하였으며, 시료는 95% EtOH를 사용하여 실온에서 72시간동안 침적시켜 3회 추출하였으며, 여기서 얻어진 EtOH 조추출물은 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(dichloromethane) 및 에칠아세테이트(EtOAc)등의 용매를 사용 순차 연속추출하여 분획하였다.

나) 목부

목부는 음건시킨 후, 분말시료로 하였으며, 시료는 95% EtOH로 72시간 침적시켜 3회 추출하였으며, 여기서 얻어진 EtOH 조추출물은 LPE, Et₂O 및 E채Ac 등의 용매를 사용 순차 연속추출하여 분획하였다.

4)오미자(*Schizandra chinensis*)

가)열매

오미자 열매(15 kg)는 음건시킨 후, 분말화 하였으며, 분말은 95% 에탄올(ethanol, EtOH)에 72시간 동안 실온에서 침적시켜 3회 추출하여 감압·농축하였다. 여기서 얻어진 EtOH 조추출물은 석유에테르(petroleum ether), 에테르(ether, Et₂O) 및 에칠아세테이트(ethyl acetate, EtOAc) 등의 용매를 사용하여 순차연속추출하여 분획 하였다.

다. 화합물의 분리·정제

1) 백합나무

가) 목부

(1) 화합물 1

목부의 ethyl acetate 가용부(63.49 g)에 대해 MeOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(50×7.5 cm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 110개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 박층크로마토그래피(TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5:4:1, v/v/v)에 전개시킨 후, UV (254 nm) 램프에서 관찰하고, 발색제(50% H₂SO₄)를 분무하여 120℃에서 20초간 가열하여 확인한 뒤, 7개의 분획물(MEA-1~MEA-7)로 나누었다. 분획물 양이 부족하여 다시 용매분획을 실시하여 얻은 ethyl acetate 가용부(95.07 g)에 대해 MeOH-EtOH (1:1, v/v)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(60×7.0 cm)를 이용하여 75 ml씩 분취하여 90개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 박층크로마토그래피에 위와 같은 방법으로 검색하여 7개의 분획물(MEAⅡ-1~MEAⅡ-7)로 나누었다.

MEA-5 분획물(5.55 g)을 methylene chloride-MeOH (24:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(5.0×34 cm)를 이용하여 7 ml씩 분취하여 330개의 분취물을 얻었으며, UV검색 결과 4개의 분획물(MEA-5-1~MEA-5-4)를 얻었다. 다시 MEA-5-2 분획물(170 mg)를 methylene chloride-MeOH (28:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(3.0×20 cm)를 사용하여 3 ml씩 323개의 분취물을 얻었으며, UV 검색에 의해 3개의 분획물(MEA-5-2-①~MEA-5-2-③)를 얻었다. 이 중 MEA-5-2-② 분획물로부터 화합물 1(30 mg)을 단리하였다.

(2) 화합물 2

MEA-7 분획물(4.48 g)을 methylene chloride-MeOH (24:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(4.5×40 cm)를 이용하여 5 ml씩 319개의 분취물을 얻었으며, TLC상에서 UV검색에 의해 5개의 분획물(MEA-7-1~MEA-7-5)로 나누었다. 이 중 MEA-7-2 분획물로부터 화합물 2 (16 mg)를 얻었다.

(3) 화합물 3

MEAⅡ-6 분획물(1.85 g)을 chloroform-MeOH (20:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(5.0×30 cm)를 이용하여 10 ml씩 분취하여 310개의 분취물을 얻었으며, TLC상에서 UV검색에 의해 5개의 분획물(MEAⅡ-6-①~

MEAⅡ-6-⑤)로 나누었다. 이 중 MEAⅡ-6-③ 분획물로부터 노란색 분말의 화합물 3 (30 mg)을 얻었다.

나)수피

(1) 화합물 4

수피의 Et₂O 가용부의 분획물(154 g)로부터 MeOH-EtOH (7:3, v/v)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피(6.5×50 cm)를 이용하여 60 ml 씩 80개의 분취물을 얻었으며, TLC상에서 UV검색에 의해 3개의 분획물(MBEt-1~MBEt-3)로 나누었다. 이 중 MBEt-2 분획물(38.70 g)을 benzene-EtOAc (5:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(7.0×40 cm)를 이용하여 50 ml씩 분취하여 160개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 6개의 분획물(MBEt-2-①~MBEt-2-⑥)로 나누었으며, 이 중 MBEt-2-④ 분획물로부터 화합물 4 (30 mg)를 얻었다.

(2) 화합물 5

MBEt-2-⑥의 분획물(1.47 g)을 chloroform-MeOH (300:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(5.5×28 cm)를 이용하여 20 ml씩 분취하여 500개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 3개의 분획물(MBEt-2-6-①~MBEt-2-6-③)로 나누었다. 다시 MBEt-2-6-②의 분획물(400 mg)을 chloroform-MeOH (200:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(3×25 cm)를 이용하여 20 ml씩 분취하여 300개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 3개의 분획물(MBEt-2-6-2-①~MBEt-2-6-2-③)로 나누었다. 다시 MBEt-2-6-2-① 분획물(300 mg)을 hexane-acetone (3:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피(3.5×20 cm)를 이용하여 3.5 ml씩 분취하여 300개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 2개의 분획물(MBEt-2-6-2-1-①~MBEt-2-6-2-1-②)로 나누었다. 이 중 MBEt-2-6-2-1-②의 분획물로부터 화합물 5 (240 mg)를 얻었다.

2)목련

가)수피

(1) 화합물 6

목련 수피의 Et₂O 가용부(85.0 g)에 대해 MeOH-EtOH (3:7, v/v)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼(60×4.5 cm) 크로마토그래피를 이용하여 75 ml씩 분취하여 12개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 박층크로마토그래피(TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5:4:1, v/v/v)에 전개시킨

후, UV (254 nm) 램프 및 발색제(50% H₂SO₄)로 검색하여 2개의 분획물(MKBE-1~MKBE-2)으로 나누었다.

MKBE-2의 분획물(81.15 g)을 benzene-EtOAc (8:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼(27.5×7.0 cm) 크로마토그래피를 이용하여 15 ml 씩 용출시켜 230 개로 분취하였으며 UV로 검색하여 8개의 분획물(MKBE-2-1~MKBE-2-8)을 얻었다. MKBE-2-2 분획물로부터 화합물 6 (500 mg)을 분리하였다.

(2) 화합물 7

MKBE-2-5 분획물(3.3 g)을 MeOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼(50×4.5 cm) 크로마토그래피를 이용하여 5 ml씩 분취하여 40개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 UV검색 결과 4개의 분획물(MKBE-2-5-1~MKBE-2-5-4)로 나누었으며, 이 중 MKBE-2-5-2 분획물로부터 화합물 7 (120 mg)를 단리 하였다.

(3) 화합물 8

MKBE-2-4 분획물(7.0 g)을 hexane-EtOAc (2:1, v/v)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼(225×4.5cm) 크로마토그래피를 이용하여 10 ml씩 분취하여 140개의 분취물을 얻었으며 5개의 분획물(MKBE-2-4-1~MKBE-2-4-5)로 나누었다. MKBE-2-4-2 분획물로부터 화합물 8 (1.25 g)을 단리 하였다.

(4) 화합물 9

MKBE-2-6 분획물(20.07 g)을 hexane-EtOAc (2: 1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼(19.5 × 6.0 cm) 크로마토그래피를 이용하여 100 ml씩 분취하여 40 개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 UV검색 결과 3개의 분획물(MKBE-2-6-1~MKBE-2-6-3)으로 나누었다. 다시 MKBE-2-6-3 분획물(15.26 g)을 EtOH을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼(60×4.5 cm)을 이용하여 50 ml 씩 분취하여 30개의 분취물을 얻었으며, UV검색 결과 3개의 분획물(MKBE-2-6-3-1~MKBE-2-6-3-3)로 나누었다. 이 중 MKBE-2-6-3-1 분획물(1.0 g)로부터 CHCl₃-MeOH (100:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼(40 × 3.5 cm)를 이용하여 2.5 ml 씩 용출시켜 300개로 분취 한 후, 6개의 분획물(MKBE-2-6-3-1-1~MKBE-2-6-3-1-6)으로 나누었다. 또 다시 MKBE-2-6-3-1-5 분획물(250 mg)을 CHCl₃-MeOH (80:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼(40 × 2.5 cm)를 이용하여 2.5 ml 씩 용출시킨 후, 화합물 9 (25 mg)를 단리 하였다.

(5) 화합물 10

MKBE-2-6-3-1-4 분획물(240 mg)을 CHCl_3 -MeOH (80:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼(40 × 2.5 cm)를 이용하여 2.5 ml 씩 용출시킨 후, 화합물 10 (30 mg)를 단리 하였다.

(6) 화합물 11

MKBE-2-6-3-1-5 분획물(250 mg)을 CHCl_3 -MeOH (80:1, v/v)을 용출용매로 한 silica gel 칼럼(40 × 2.5 cm)를 이용하여 2.5 ml 씩 용출시킨 후, 화합물 11 (30 mg)을 단리 하였다.

3) 함박꽃나무

가) 수피

(1) 화합물 12

함박꽃나무 수피의 DCM 가용부(77.1 g)에 대해 n-hexane-EtOAc (ethyl acetate) (9:1, v/v)을 용출 용매로 silica gel 60 (쇄상) open column chromatography (30.0 × 7.0 cm)를 이용하여 100 ml씩 90개의 분취물을 얻었다. 이들 분취물들은 TLC (전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5:4:1, v/v/v)에 전개시킨 후, UV (254 nm) 램프로 검색하여 6개의 분획물(MSBD I-1 ~ MSBD I-6)을 얻었다. 분취물 중 MSBD I-2에서 화합물 12 (4.2 g)을 단리하였다.

(2) 화합물 13

수피의 EtOAc 가용부(8.2 g)에 대해 CHCl_3 (chloroform)-MeOH (6:1 v/v)를 용출 용매로 하여 구상 silica gel 60 open column chromatography (54.0 × 4.5 cm)를 이용하여 50 ml씩 83개의 분취물을 얻었다, 이들 분취물들은 다시 TLC (전개용매: EtOAc-acetone- H_2O = 10:10:1, v/v/v)에 전개시킨 후, UV (254 nm) 램프로 검색하여 8개의 분획물(MSBE I-1 ~ MSBE I-8)을 얻었다. 분취물 중 MSE I-4 (690 mg)에 대해 CHCl_3 -acetone-MeOH (4:3:1, v/v)를 용출 용매로 구상 silica gel 60 open column chromatography (31.0 × 4.5 cm)를 이용하여 3 mg씩 분취, 670개의 분취물을 얻었다. 이들 분취물에 대해 TLC 및 UV 램프로 검색하여 7개의 분획물(MSBE-II-1 ~ MSBE-II-7)을 얻었고, 분취물중 MSBE-II-6에 대해 preparative TLC (silica gel 60 F₂₅₄ Merk)를 이용하여 화합물 13 (49.3 mg)를 단리하였다.

나)목부

(1) 화합물 14

목부의 Et₂O (diethyl ether) 가용부(47.3 g)에 대해 MeOH-EtOH (7:3, v/v)을 용출용매로 Sephadex-LH 20 open column chromatography (54.0 × 6.5 cm)를 이용하여 50 ml씩 모두 68개의 분취물을 얻었다. 이들 분취물들은 TLC (전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5:4:1, v/v/v)에 전개시킨 후 UV 램프로 검색하여 4개의 분획물(MSWE I-1~MSWE I-4)로 나누었다. 이들 분획물 중 MSWE I-2 (31.5 g)에 대해 EtOAc-MeOH (2:1, v/v)를 용출 용매로 구상 silica gel 60 open column chromatography (35.0 × 6.5 cm)를 이용하여 50 ml씩 75개의 분취물을 얻었으며 TLC (전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 3:6:1, v/v/v)에 전개시킨후 UV 램프로 검색하여 6개의 분획물(MSWE II-1~MSWE II-6)을 얻었다. 여기서 얻어진 분획물 중 MSWE II-1 (1.3 g)에 대해 benzene-EtOAc (5:1, v/v)을 용출용매로 구상 silica gel 60 open column chromatography (30.0 × 4.5 cm)를 이용하여 시료분취기를 사용하여 5 g씩 모두 336개의 분취물을 얻었으며 TLC (전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 3:6:1, v/v/v)에 전개시킨후 UV 램프로 검색하여 모두 8개의 분획물 (MSWE III-1~MSWE III-8)로 나누었다. 다시 MSWE III-3에 대하여 preparative TLC (silica gel 60 F₂₅₄, Merk, 전개용매: DCM (dichloromethane, CHCl₂)-MeOH = 5:1, v/v)를 이용하여 화합물 14 (7.7 mg)를 분리하였다.

(2) 화합물 15

MSWE III-8 (980 mg)에 대하여 benzene-EtOAc-CHCl₃ (2:2:1, v/v)를 용출용매로 구상 silica gel 60 open column chromatography (23.0 × 3.0 cm)를 이용하여 시료분취기로 6 ml씩 463개의 분취물로 나누었다. 이들 분취물들은 TLC (전개용매: toluene-ethyl formate-formic acid = 5:4:1, v/v/v)에 전개시킨 후 UV 램프로 검색하여 모두 9개의 분획물(MSWE IV-1~MSWE IV-9)을 얻었다. 이 분획물 중에서 MSWE IV-4에 대하여 preparative TLC (전개용매: EtOAc-CH₂Cl₂ = 5:1, v/v)를 이용하여 화합물 15를 분리 하였다.

4)오미자

가)열매

(1) 화합물 16

오미자 열매의 Et₂O 가용부(195 g)에 대해 benzene-EtOAc (20:1)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 10 ml씩 분취하여 300개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물들은 박층크로마토그래피(TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 전개용매: toluene-ethyl

formate-formic acid = 5:4:1)에 전개시킨 후, UV (254 nm) 램프 및 발색제(50% H₂SO₄)로 검색하여 6개의 분획물(SCE-1~SCE-6)로 나누었다. 이중, SCE-3 분획물(356 mg)을 hexane-Et₂O (4:1)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼을 이용하여 2개의 분획물로 나누었다. 두 번째 분획물로 부터 화합물 16 (270 mg)을 단리하였다.

(2) 화합물 17

SCE-2 분획물(654 mg)을 benzene-Et₂O (40:1)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼으로 4개의 분획물로 나누었다. 다시 세번째 분획물(220 mg)을 hexane-Et₂O (3:1) 및 benzene-EtOAc (30:1)를 전개용매로 한 prep. TLC를 사용하여 화합물 17 (20 mg)을 분리하였다.

(3) 화합물 18

SCE-5 분획물(20.8 g)로 부터 benzene-EtOAc (10:1)를 용출용매로 한 silica gel 칼럼을 이용하여 4개의 분획물로 나누었다. 다시 SCE-5-1 분획물(296 mg)을 hexane-CH₃CN-EtOAc-H₂O (8:7:5:1)을 용출용매로 한 centrifugal partition chromatography (CPC)를 이용하여 3개의 분획물로 나누었다. 이중 첫 번째 분획물(51 mg)을 hexane-MeOH-EtOAc-H₂O (10:5:5:1)을 용매로 한 CPC를 이용하여 3개의 분획물로 나누는 후, 이중 첫번째 분획물로 부터 화합물 18 (3 mg)을 분리하였다.

(4) 화합물 19

SCE-5-3 분획물(2.4 g)을 MeOH-EtOH (3:7)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼으로 3개의 분획물로 나누었다. 이중 첫번째 분획물(1.3 g)을 MeOH-H₂O (7:3)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼을 이용하여 5개의 분획물로 나누었다. 다시 두번째 분획물(52 mg)을 MeOH-H₂O (7:3)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼으로 2개의 분획물로 나누는 후, 첫 번째 분획물로 부터 화합물 19 (3 mg)을 단리하였다.

(5) 화합물 20

EtO₂ 가용부의 SCE-5-3-2 분획물(650 mg)을 MeOH-H₂O (1:1, v/v)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼으로 3개의 분획물로 나누었다. 이중 두 번째 분획물로 부터 화합물 20 (103 mg)을 단리하였다.

(6) 화합물 21

SCE-5-4 분획물(15.4 g)을 MeOH-H₂O (1:1, v/v)를 용출용매로 한 Sephadex LH-20 (4.5×70 cm)를 이용하여 8 ml씩 분취하여 300개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 5개의 분획물(SCE-5-4-1~SCE-5-4-5)로 나누었다. 다시 SCE-5-4-2 분획물(870 mg)을

MeOH를 용출용매로 한 Sephadex LH-20 (3.0×68.0 cm) column를 사용하여 화합물 21 (726.6 mg)를 분리하였다.

라. 항균활성측정

1) 공시균주

항균활성용 공시균으로는 식물병원균인 *Glomerella cingulata* (탄저병균), *Fusarium oxysporium* (채소류 시들음병균), *Fusarium subglutinans* f. sp. *pin i* (후사리움 가지마름병균), *Cryphonectria parasitica* (밤나무 동고병균)를, 표고해균인 *Libertella betulina* (주홍꼬리버섯), *Trichoderma viride* (표면오염균), *Trichoderma harzianum* (표면오염균)을, 그리고 목재부후균인 *Trametes versicolor* (백색부후균), *Tyromyces palustris* (갈색부후균)를 사용하였다.

2) 항균활성 검정

항균활성검정방법으로는 배지점적법을 사용하여 검정하였다. 즉, potato dextrose agar배지에 1000 μ g/ml 농도가 되도록 에탄올추출물을 혼합하여 만든 평판배지에 미리 배양해둔 각 공시균의 균사선단부를 직경 8mm의 cork borer로 떼어내어 접종하였다. 배양온도 27 $^{\circ}$ C에서 소정기간 배양한 후 자란 균사환의 직경을 측정하여 균사생장억제율(hyphal growth inhibition ratio)로 항균활성을 나타내었다(식 1).

$$\text{균사생장억제율(\%)} = \left[\frac{(\text{무첨가 배지상의균사생장직경}) - (\text{첨가배지상의균사생장직경})}{(\text{무첨가 배지상의균사생장직경})} \right] \times 100$$

마. 항산화활성 측정

안정한 프리라디칼을 생성하는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 산화에 의하여 생성되는 hydroperoxide (ROOH)가 유리시 발생하는 라디칼을 DPPH 라디칼이 포착함에 따라 DPPH 라디칼 본래의 흑자색을 잃게된다. 이러한 점을 이용하여 Blois (1958)는 DPPH의 퇴색 정도를 흡광도로 측정하여 항산화활성을 검토하였다. 측정방법은 Yoshida 등(1989)의 방법을 변형하여 시험관에 소정 농도의 시료를 포함한 MeOH 용액 4 ml 및 0.5 mM의 DPPH · MeOH 1 ml를 가하여 총 5 ml가 되도록 하고, vortex mixer로 잘 섞어서 30분간 상온에서 반응시킨 다음, 반응액을 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 프리라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도를 사용하여 다음과 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{프리라디칼소거능(\%)} = \left[\frac{(\text{무첨가구의 흡광도}) - (\text{첨가구의 흡광도})}{(\text{무첨가구의 흡광도})} \right] \times 100$$

바. 항암활성 측정

1) 정상세포에 대한 세포독성과 암세포에 대한 억제 및 selectivity 측정

SRB (sulforhodamine B) assay^{1), 2)}는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 이를 이용하여 인간 정상 폐세포(HEL299)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성과, 각각의 암세포[간암세포 : Hep3B, 유방암 세포 : MCF-7 (10% FBS, DMEM 배지)와 폐암세포 : A549, 위암세포 : AGS (10% FBS, RPMI 1640 배지)]의 생육 억제 활성을 각 농도별로 측정하여 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다³⁾. 세포 배양에 사용된 기본배지는 RPMI1640 (GIBCO, USA)에서 10%를 첨가하여 배양하였다. 실험에 사용한 세포의 초기 농도는 4×10^4 cells/ml 의 농도로 조절하여 96well tissue culture microplate에 $100 \mu\text{l/well}$ 씩 접종하여 사용하였다. 실험 대상 세포를 $2-3 \times 10^4$ cell/ml의 농도로 조절 후 96 well tissue culture microplate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 의 세포를 포함하는 배지를 분주하여 37.5°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후 각 추출물들을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 최종 농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L로 되도록 한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 차가운 TCA (trichloroacetic acid) $100 \mu\text{l}$ 를 가하여 4°C 에서 1시간동안 놓아둔 뒤 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하였다. 다시 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB용액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가, 상온에서 30분동안 염색한 후 1% acetic acid로 남은 염색액을 충분히 세척, 건조하였다. 건조된 well에 10 mM Tris buffer $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

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

사. 면역세포 생육 측정 및 Cytokines (Interlukin-6와 Tumor Necrosis Factor- α) 분비량 측정

면역기능 증강효과는 인간 면역세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay⁴⁾를 이용하여 검증하였다. 또한 면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Tumor necrosis factor- α 와 Interleukine-6의 양은 ELISA kit (genzyme, USA)를 이용하여 측정되어졌다. 우선 배양배지를 원심분리하여 상층액을 취한 다음 다양한 농도의 표준물질들과 함께 37°C 에서 30분간 배양 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하고 이에 시료에서 얻어진 O.D값을 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

아. Microphysiometer를 이용한 세포의 면역 활성 측정

세포의 추출물들에 대한 대사(산화)활성도의 영향을 측정하기 위하여 Microphysiometer(Molecular Devices, USA)를 사용하였다. Microphysiometer는 약물에 대한 세포의 산도변화를 측정하는 장비로 1회용 capsule 안쪽의 다공성 여과 막 사이에 세포를 놓고 실험하려는 samples를 cell chamber안에 유입시키면서 제한된 시간 내에 배양한다. 이때 세포의 대사활성도의 변화는 산성물질의 방출속도 변화의 결과를 반영하며, 이 신호를 silicon sensor는 전기신호로 바꾸어 해석한다. 또한, samples에 대한 세포의 영향을 측정하는 일반적 방법인 MTT assay, SRB assay는 실험에 소요되는 시간이 3일이나 걸리는 반면에 Microphysiometer로 측정하게 되면 samples 투여 후 세포의 변화를 즉시 초(sec)단위 혹은 분(min)단위로 곧바로 나타내기 때문에 시간절약 면에서 효율적이며, 3일 동안 일어날 수 있는 세포오염이나 세포 염색을 하기 전 상등액 제거 시에 세포의 유실에서 오는 실험오차도 극복할 수 있어서 보다 정확한 실험결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이러한 장점 면에서 Microphysiometer는 MTT assay, SRB assay를 측정 할 때 비교 값으로 필요로 하게된다.

이에 따라, Microphysiometer의 측정은 항암 활성 및 면역증강, 신경세포의 일반적인 측정의 결과와 비교되어졌으며, 세포의 추출물에 대한 시간별 활성도 변화를 측정하였다.

자. 신경세포 생육 촉진 및 신경세포활성화 측정

1) 신경세포 생육 촉진활성 측정

10% FBS를 함유한 RPMI 1640의 기본배지에서 배양된 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 배양 flask로부터 떼어낸 후 1×10^4 viable cells/well의 농도로 24 well plate에 접종하였다. 접종 24시간 후에 배지 2 ml를 새 배지로 교체한 후 즉각적으로 sample 시료들을 1.0 g/L의 농도로 0, 100 μ l를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 전 배양 기간 중 매일 매일 무작위 적으로 채택한 fields의 현미경사진(OLYMPUS: IMT2-RFC)을 찍었다. 이것을 바탕으로 sample 시료들에 관한 신경돌기의 연장길이를 측정하여 신경세포의 생육 촉진활성을 측정하였다^{8), 9), 10)}.

2) 세포 생육활성 측정

T-flask 상에서 10%의 혈청배지에서 생육시킨 pheochromocytoma (PC12) 신경세포주를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 flask바닥에서 떨어뜨린 후 PBS (Ca²⁺, Mg²⁺-free)로 두 번 세척하였다. 그리고 24 well plate에 4×10^4 viable cells /well의 농도로 접종하여 10% 혈청배지를 이용하여 최종부피를 2 ml로 하였

다. 그 후 sample 시료들을 1.0 g/L의 농도로 100 μ l를 첨가하였으며, 대조군으로서 PBS를 100 μ l를 첨가하였다. 그 후 매일 매일 총 세포수를 측정하였으며 trypan blue dye exclusion 방법으로 생세포수를 측정하였다. 각각은 3개 well에서 반복 실험을 수행하였다¹¹⁾. 세포의 생존활성은 세포들이 사멸기에 접어든 시료 투여 8일 후 측정된 세포 생존율을 기초로 하였다.

3) 신경돌기의 연장길이 및 신경돌기를 지나는 세포수의 측정

T-flask 상에서 10%의 혈청배지에서 생육시킨 PC12 신경세포주를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 flask바닥에서 떨어뜨린 후 PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free)로 두 번 세척하였다. 그리고 24 well plate에 0.5×10^4 viable cells/well의 농도로 접종한 후 sample 시료들을 1.0 g/L의 농도로 0, 100 μ l를 첨가하여 매일 매일 $\times 100$ 의 배율로 사진 촬영을 하였다. 이 현미경 사진을 이용하여 신경돌기의 길이를 측정하여 본래의 길이로 환산하여 신경돌기의 길이로 하였다. 각각의 사진에서 신경돌기의 길이가 가장 길게 연장된 세포를 기초로 하여 본 실험에 이용하였다. 신경돌기를 지나는 세포는 현미경상에서 측정하였다. 신경돌기가 세포동체와 같거나 보다 큰 세포를 신경돌기를 지나는 세포로 하였다. 본 실험에서는 100개 이상의 세포를 측정하여 평균치를 구하였다¹²⁾.

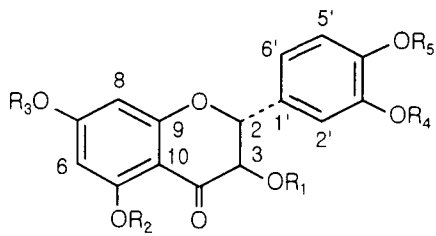
차. 세포 분화도 측정

HL-60 (human promyelocytic leukemia) 세포는 5% heat-inactivated fetal bovine serum과 RPMI 1640 medium을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 continuous suspension culture로 유지한다. 세포를 4×10^5 cells/ml의 농도로 24 well plate에 1ml 접종하여 전 배양한다. 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 세포를 수확하여 320 x g에서 10분간 원심분리하여 침전시킨 다음, 200 μ l의 0.1% Triton X-100을 넣어 37°C에서 30분간 lysis시켰다. 일정량의 lysate와 0.1% Triton X-100을 20 μ l되게 96 well plate에 옮기고, 3 mg/ml의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer(pH 0.5)를 100 μ l넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 0.1 N NaOH 100 μ l를 첨가한 후 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다^{13), 14)}.

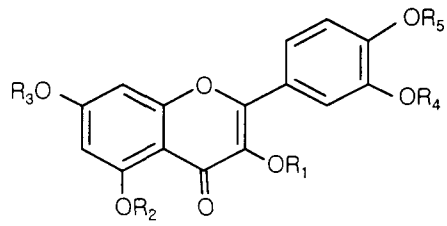
2. 결과 및 고찰

가. 화합물의 구조동정

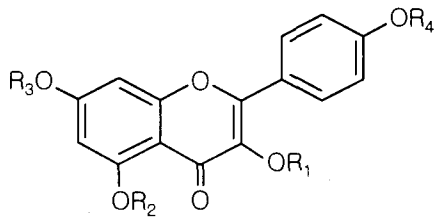
1) 백합나무



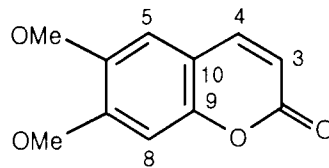
$R_1=R_2=R_3=R_4=R_5 = H$: taxifolin (I)
 $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5 = Ac$: (Ia)



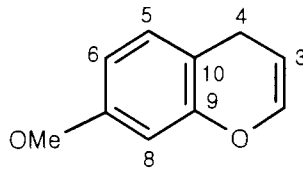
$R_1=R_2=R_3=R_4=R_5 = H$: quercetin (II)
 $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5 = Ac$: (II a)



$R_1=R_2=R_3=R_4 = H$: kaempferol (III)
 $R_1=R_2=R_3=R_4 = Ac$: (IIIa)



6, 7-dimethoxycoumarin (IV)



7—methoxybenzopyran (v)

Fig. 1. Compounds isolated from wood and bark of *L. tulipifera*

가)목부

(1)화합물 1 (taxifolin)

EI-MS m/z (rel. int., %) : 304 (M^+ , 88.8), 286 (25.1), 275 (99.8), 182 (11.8), 153 (100, base ion), 150 (41.1), 137 (9.8), 123 (93), 69 (13.2). 1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) : δ 4.59 (1H, d , $J = 11.4$ Hz, H-3), 5.01 (1H, d , $J = 11.4$ Hz, H-2), 5.94 (1H, d , $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.98 (1H, d , $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.86 (1H, d , $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.90 (1H, dd , $J = 2.0, 8.1$ Hz, H-6'), 7.06 (1H, d , $J = 2.0$ Hz, H-2'). ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) : δ 73.11 (C-3), 84.50 (C-2), 96.02 (C-8), 96.98 (C-6), 101.46 (C-10), 115.72 (C-2'), 115.82 (C-5'), 120.80 (C-6'), 129.77 (C-1'), 145.71 (C-3'), 146.52 (C-4'), 164.16 (C-9), 164.76

(C-5), 167.88 (C-7), 98.12 (C-4). ^1H - ^1H COSY correlations : H-6 \leftrightarrow H-8, H-5' \leftrightarrow H-6'/H-2'. HMBC correlations : H-8 \rightarrow C-6/C-7/C-9/C-10. H-6 \rightarrow C-5/C-7/C-8/C-10. H-2' \rightarrow C-2/C-4/C-6', H-2 \rightarrow C-4/C-1'/C-2, H-3 \rightarrow C-1'/C-2/C-4.

화합물 1은 노란색 분말로 단리하였으며, toluene : ethyl formate : formic acid = 5 : 4 : 1, v/v/v에서의 R_f 값이 0.17이었고, EI-MS 스펙트럼에서는 m/z 304 [M^+]에 분자이온 peak를 보였으며, 주요 ion peak는 286, 275, 182, 153, 150, 137, 123, 69이었고, base ion peak는 m/z 153으로 나타났다. 또한 정색반응, UV 스펙트럼으로부터 페놀성수산화기 뿐만아니라 방향족 C=C 및 C=O 등의 구조를 가진 화합물임을 알 수 있었다.

화합물 1의 ^1H -NMR 스펙트럼에서는 총 7개의 proton signal이 나타나 있으며, 그 중 δ 4.59 (1H, *d*, J = 11.4 Hz, H-3)와 δ 5.01 (1H, *d*, J = 11.4 Hz, H-2)에서의 두 개의 doublet signal은 dihydro 부분구조에 유래하는 H-2, H-3번에 각각 귀속하였고, δ 5.94 (1H, *d*, J = 2.1 Hz, H-8)와 δ 5.98 (1H, *d*, J = 2.1 Hz, H-6)의 두 개의 doublet signal은 H-6, H-8번에 각각 귀속하였다. 이를 2D NMR 인 ^1H - ^1H COSY에서 이들 proton사이의 교차 peak의 존재를 확인 할 수 있었다.

^{13}C -NMR 에 의한 탄소의 귀속은 DEPT, HMQC 및 HMBC를 측정함으로써 알 수 있었으며, 그 중 C-2로 귀속한 84.50의 signal은 HMBC에서 H-2', H-6'번과의 교차 peak를 확인할 수 있었고, C-1'로 귀속한 δ 129.77의 signal은 H-3번과의 교차 peak를 확인하였다. 이상의 결과 화합물 1은 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavanone, 즉 taxifolin으로 동정하였다.

(2)화합물 2 (quercetin)

EI-MS m/z (rel. int., %) : 302 (M^+ , 100), 275 (26.4), 165 (11.1), 153 (45.0), 137 (9.5), 123 (12.5). ^1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) : δ 6.26 (1H, *d*, J = 2.0 Hz, H-6), 6.51 (1H, *d*, J = 2.0 Hz, H-8), 6.99 (1H, *d*, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.69 (1H, *dd*, J = 2.1, 8.5 Hz, H-6'), 7.80 (1H, *d*, J = 2.1 Hz, H-2'). ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) : δ 94.47 (C-8), 99.12 (C-6), 104.04 (C-10), 115.68 (C-2'), 116.16 (C-5'), 121.45 (C-6'), 123.72 (C-1'), 136.68 (C-3), 145.82 (C-3'), 146.94 (C-2), 148.33 (C-4'), 157.80 (C-9), 162.09 (C-5), 165.10 (C-7), 176.51 (C-4). ^1H - ^1H COSY correlations : H-6 \leftrightarrow H-8, H-5' \leftrightarrow H-6'. HMBC correlations : H-8 \rightarrow C-6/C-7/C-9/C-10. H-6 \rightarrow C-5/C-7/C-8/C-10. H-2' \rightarrow C-1'/C-3'/C-6', H-5' \rightarrow C-1'/C-3'/C-4'. H-6' \rightarrow C-2/C-4.

화합물 2는 노란색 분말로 단리되었으며, EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온

peak가 m/z 302 [M^+]에서 나타났으며, 주요 ion peak는 275, 165, 153, 137, 123이었다. 또한 m/z 165 및 153의 fragment ion peak는 RDA (Retio-Diels-Alder) 계열에 의한 것으로 이로부터 화합물 II의 구조가 flavonoid임을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 6.99 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-5')와 δ 7.80 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-2')에서 두 개의 doublet signal과 δ 7.69 (1H, *dd*, $J = 2.1, 8.5$ Hz, H-6')에서의 double doublet signal은 B환의 2', 5', 6'의 ^1H 에 각각 귀속하였다.

이는 전형적인 1', 3', 4'의 3치환 벤젠핵의 존재를 알 수 있었다. 또 δ 2.0의 signal은 acetone에 기인하는 용매 peak이다. 화합물 I의 2D NMR인 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서는 H-5'번과 H-6'번 사이의 상관 peak와 6번 proton과 H-8번 사이의 상관 peak를 각각 확인하였다. 화합물 2의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서의 δ 29와 δ 206의 signal은 용매 peak이며, 총 15개의 carbon signal이 나타났다. 그 중 δ 176.51 (C-4)의 signal은 C환의 carbonyl기에 기인하는 carbon이 있다. 화합물 II의 DEPT 135°에서 측정된 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 44.7~ δ 121.4사이의 5개의 signal은 5', 6', 2', 8, 6번의 메틴(CH) 탄소를 나타내고, HMBC와 HMQC를 측정함으로써 탄소의 귀속을 알 수 있었다.

HMBC 스펙트럼에서는 2', 6'의 proton과 2번 탄소와의 교차 peak를 확인하였으며, 6번 proton과 5번, 7번 및 10번 탄소, 그리고 8번 proton과 9번, 7번 탄소와의 교차 peak를 확인할 수 있었다. 이상의 결과 화합물 2는 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone인 quercetin으로 동정하였다.

(3) 화합물 3 (kaempferol)

EI-MS m/z (rel. int., %) : 286 (M^+ , 88.8), 259 (13), 230 (6), 154 (4), 121 (25), 93 (12). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 8.15 (2H, *dd*, $J = 2.5, 9.5$ Hz, H-2', 6'), 7.03 (2H, *dd*, $J = 2.5, 9.5$ Hz, H-3', 5'), 6.29 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) : δ 94.01 (C-8), 98.77 (C-6), 103.08 (C-10), 115.66 (C-3', 5'), 122.63 (C-1'), 129.72 (C-2', 6'), 135.91 (C-3), 146.19 (C-2), 157.25 (C-9), 159.60 (C-4'), 161.31 (C-5), 165.42 (C-7), 175.84 (C-4). $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY correlations : H-2', 6' \leftrightarrow 3', 5'. HMBC correlations : H-2', 6' \rightarrow C-2/C-4'. H-3', 5' \rightarrow C-1'/C-4'. H-6' \rightarrow C-5/C-7/C-8/C-10.

화합물 3의 EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온 peak로 m/z 302 [M^+]를 나타냈으며, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서의 δ 6.29 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-6)의 singlet signal은 A환의 H-6번에 귀속하였으며, δ 6.55 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-8)의 doublet signal은 그 결합상수($J = 1.5$ Hz)로부터 meta관계에 기인하는 것으로 역시 A환의 H-8번에 귀속하였다. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서는 H-2', H-6'과 H-3', H-5'사이의 상관 peak의 존재를 확인할 수 있었다.

화합물 3의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 총 15개의 탄소 signal이 나타났다. 그 중 δ 175.8의 signal은 dihydro 부분구조에 유래하는 것으로 C환의 카보닐기에 기인하는 탄소이고, δ 98.77의 signal은 6번 탄소에 귀속하였다. 이것은 HMBC 스펙트럼에서 그 귀속을 확인하였으며, 또한 H-6번과 8, 10, 5, 7번 탄소와의 교차 peak를 확인하였다.

이상의 결과 화합물 3은 3, 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone인 kaemferol로 동정하였다.

나)수피

(1)화합물 4 (6, 7-dimethoxycoumarin)

EI-MS m/z (rel. int., %) : 207 (M^+). ^1H -NMR (500 MHz, chloroform- d) : δ 3.93 (3H, s, OMe-6), 3.96 (3H, s, OMe-7), 6.29 (1H, d , $J = 9.5$ Hz, H-3), 6.84 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, s, H-5), 7.63 (1H, d , $J = 9.5$ Hz, H-4). ^{13}C -NMR (125 MHz, chloroform- d) : δ 56.60 (OMe-6), 56.62 (OMe-7), 100.28 (C-8), 108.34 (C-5), 111.69 (C-9), 113.77 (C-3), 143.50 (C-4), 146.63 (C-6), 150.29 (C-10), 153.14 (C-7), 161.60 (C-2). ^1H - ^1H COSY correlations : H-4 \leftrightarrow H-3. HMBC correlations : H-3 \rightarrow C-2/C-9, H-4 \rightarrow C-2/C-5/C-10, H-5 \rightarrow C-4/C-6/C-7/C-9/C-10, H-8 \rightarrow C-6/C-7/C-9/C-10, OMe-6 \rightarrow C-6, OMe-7 \rightarrow C-7.

화합물 4는 백색 결정으로 단리하였으며, EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온 peak로 m/z 304 [M^+]를 나타냈다. ^1H -NMR 스펙트럼에서는 총 7개의 proton signal이 나타나있으며, 그 중 δ 6.29 (1H, d , $J = 9.5$ Hz, H-3)와 δ 7.63 (1H, d , $J = 9.5$ Hz, H-4)에서 두 개의 doublet signal은 결합정수가 9.5로 ortho관계에 있으며 H-3, H-4번에 각각 귀속하였다. 이를 2D NMR 인 ^1H - ^1H COSY 스펙트럼에서는 총 11개의 탄소 signal이 나타났으며, 탄소의 귀속은 DEPT, HMQC 및 HMBC를 측정함으로써 알 수 있었다. 그 중 δ 56.60 (OMe-6)의 signal은 메톡실기에 기인하는 peak이고, δ 77.0의 signal은 용매 peak이며, δ 161.6 (C-2)의 signal은 카보닐기에 기인하는 탄소를 귀속하였다.

화합물 4의 Dept 135°에서 측정한 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 δ 100.3~143.5 사이의 4개의 signal은 3, 4, 5, 8번에 메틴(CH) 탄소를 나타내고 있으며, δ 56.6의 signal은 메틸(CH₃) 탄소를 나타내고 있다.

HMBC 스펙트럼에서는 메톡실기에 기인하는 H-6번과 6번 탄소와의 교차 peak 그리고 H-7번과 7번 탄소와의 교차 peak를 확인할 수 있었으며, H-4번과 2, 5, 10번 탄소와의 교차 peak, H-8번과 7, 10번 탄소와의 교차 peak를 각각 확인함으로써 화합물 4는 6, 7-dimethoxycoumarin으로 동정하였다.

(2) 화합물 5 (7-methoxybenzopyran)

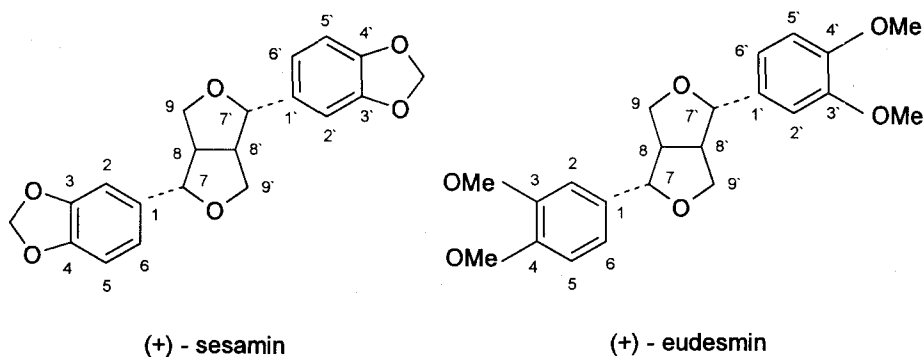
EI-MS m/z (rel. int., %) : 162 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4) : δ 3.11 (1H, d , $J = 1.5$ Hz, H-3), 3.81 (1H, s , H-4'), 4.21 (1H, s , H-4), 4.22 (1H, d , $J = 2.5$ Hz, H-2), 6.78 (1H, dd , $J = 2.5, 8.5$ Hz, H-6), 6.81 (1H, dd , $J = 1.5, 10$ Hz, H-8), 6.94 (1H, d , $J = 1.5$, Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, methanol- d_4) : δ 54.19 (C-3), 55.30 (OMe-7), 71.46 (C-4, 4'), 86.32 (C-2), 109.87 (C-5), 114.98 (C-8), 118.92 (C-6), 132.69 (C-7), 146.15 (C-10), 147.96 (C-9). $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY correlations : H-2 \leftrightarrow H-3. HMBC correlations : H-2 \rightarrow C-3/C-4, 4', H-5 \rightarrow C-4/C-6/C-10, OMe-7 \rightarrow C-7.

화합물 5는 백색 결정으로 단리하였으며, EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온 peak로 m/z 162 [M^+]를 나타냈다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 3.11 (1H, d , $J = 1.5$ Hz, H-3)와 δ 4.22 (1H, d , $J = 2.5$ Hz, H-2)에서 두 개의 doublet signal과 δ 4.21 (1H, s , H-4)에서의 singlet signal은 B환의 H-2, H-3, H-4번에 각각 귀속하였으며, 이를 2D NMR인 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 이들 ^1H 사이의 교차 peak의 존재를 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 총 10개의 탄소 signal이 나타나있으며, 탄소의 귀속은 DEPT, HMQC 및 HMBC를 측정함으로써 알 수 있었으며, 그 중 δ 55.3 (OMe-7)의 signal은 메톡실기에 기인하는 탄소에 귀속하였다.

Dept 45°, 135°에서 측정한 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 54.1~118.9사이의 7개의 signal이 나타나 있으며, δ 71.4의 signal은 메틸렌(CH_2) 탄소를 나타내고있다. HMBC 스펙트럼에서는 H-2번과 3번, 4번 탄소와의 교차 peak를 확인하였으며, H-4, H-4'번과 2번, 3번 탄소와의 교차 peak를 각각 확인함으로써 화합물 5는 7-methoxybenzopyran으로 동정하였다.

2) 목련

가)수피



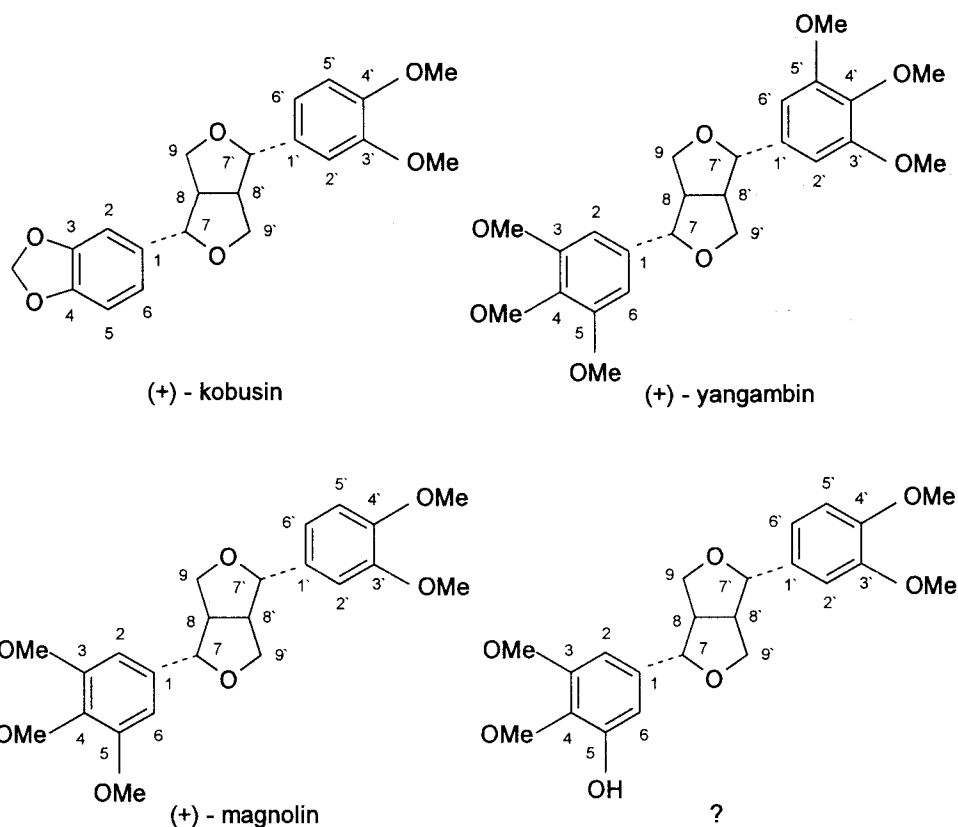


Fig. 2. Compounds isolated from bark of *M. kobus*

(1) 화합물 6 ((+)-sesamin)

EI-MS m/z : 354 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 3.04-3.07 (2H, m , H-8, H-8'), 3.81-3.84 (2H, dd , J = 4, 9, H-9b, H-9b'), 4.19-4.23 (2H, dd , J = 6.5, 9, H-9a, H-9a'), 4.68 (2H, d , J = 4, H-7, H-7'), 5.97 (4H, s , $\text{OCH}_2\text{O} \times 2$), 6.80 (2H, d , J = 8.0, H=5, 5'), 6.86-6.88 (2H, dd , J = 1.5, 8.5, H-6, H-6'), 6.90 (2H, d , J = 2, H-2, H-2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) : δ 54.74 (C-8, 8'), 71.64 (C-9, 9'), 85.78 (C-7, 7'), 101.32 (C- OCH_2O), 106.65 (C-2, 2'), 108.05 (C-5, 5'), 119.51 (C-6, 6'), 136.30 (C-1, 1'), 147.21 (C-4, 4'), 148.16 (C-3, 3'). sesamin

화합물 6은 무정형 결정으로 얻어졌다. EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 354 (M^+)를 나타냈으며, 주요 이온 피크로는 m/z 354 (M^+), 307, 289, 233, 203, 176, 161, 154, 149, 135 등을 나타냈다. m/z 135와 149의 fragment 이온피크는

3,4,-dioxymethylenephenyl 양이온을 시사한다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 5.97 (4H, s, $\text{OCH}_2\text{O}\times 2$)의 1개의 signal은 방향핵에 치환되어 있는 dioxymethylene 부분구조의 proton에 기인한다. 저자장의 δ 6.80(2H, *d*, $J = 8.0$, H=5, 5'), 6.86-6.88 (2H, *dd*, $J = 1.5$, 8.5, H-6, H-6'), 6.90 (2H, *d*, $J = 2$, H-2, H-2')의 6H에 해당하는 시그날은 방향핵 프로톤에 유래한다. δ 3.04-3.07 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.81-3.84 (2H, *dd*, $J = 4$, 9, H-9b, H-9b'), 4.19-4.23 (2H, *dd*, $J = 6.5$, 9, H-9a, H-9a'), 4.68 (2H, *d*, $J = 4$, H-7, H-7')의 8H에 해당하는 시그날은 furofuran구조에서 기인한다. H-7/7', H-8/8', H-9a/9a', H-9b/9b'의 시그날이 겹쳐서 나타나는 것으로 보아 diequatorial 함을 알 수 있다. δ 6.80(2H, *d*, $J = 8.0$, H=5, 5')은 ortho, 6.86-6.88 (2H, *dd*, $J = 1.5$, 8.5, H-6, H-6')는 ortho, meta, 6.90 (2H, *d*, $J = 2$, H-2, H-2')은 meta임을 알 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 10개의 시그날이 나타났다. DEPT에서 quaternary 탄소 시그날이 3개, secondary 탄소 시그날이 2개, 그리고 primary 탄소 시그날이 5개 존재함을 확인 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 dioxymethylene 프로톤과 δ 147.21 (C-4, 4'), 148.16 (C-3, 3')의 교차피크를 확인 하였다. HMQC 스펙트럼에서 carbon의 수는 20개로 확인되었다. 이상의 기기분석 및 문헌등과 비교한 결과 수소 18개 탄소 20개를 갖는 (+)-sesamin으로 동정하였다.

(2) 화합물 7 ((+)-eudesmin)

EI-MS m/z : 386 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) : δ 3.10- 3.14(2H, *m*, H-8, H-8'), 3.82 (6H, s, 4, 4'-OMe), 3.84 (6H, s, 3, 3'-OMe), 3.84-3.87 (2H, *dd*, $J = 4$, 11, H-9b, H-9b'), 4.23-4.26 (2H, *dd*, $J = 5.5$, 8, H-9a, H-9a'), 4.73 (2H, *d*, $J = 4.5$, H-7, H-7'), 6.92 (2H, *d*, $J = 8.5$, H-5, H-5'), 6.94 (2H, *dd*, $J = 2$, 6, H-6, H-6'), 7.02 (2H, *d*, $J = 1$, H-2, H-2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) : δ 54. 63 (C-8, 8'), 55.56 (C-OMe $\times 4$), 71.67 (C-9, 9'), 85.85 (C-7, 7'), 110.46 (C-2, 2'), 112.11 (C-5, 5'), 118.46 (C-6, 6'), 134.81 (C-1, 1'), 149.21 (C-4, 4'), 149.86 (C-3, 3'). eudesmin

EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 386 (M^+)를 나타냈으며, 주요 이온 피크로는 m/z 386 (M^+), 249, 219, 189, 177, 165, 151, 137, 115, 91, 77 등을 나타냈다. m/z 165와 151의 fragment 이온피크는 3,4,-dimethoxyphenyl 양이온을 시사한다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 저자장의 δ 6.92 (2H, *d*, $J = 8.5$, H-5, H-5')은 ortho, δ 6.94 (2H, *dd*, $J = 2$, 6, H-6, H-6')은 ortho와 meta, δ 7.02 (2H, *d*, $J = 1$, H-2, H-2')는 meta를 시사한다. δ 3.82 (6H, s, 4, 4'-OMe)와 3.84 (6H, s, 3, 3'-OMe)는 methoxyl기가 4개 존재함을 시사한다. 이상의 기기분석 및 문헌등과 비교한 결과 수소 18개 탄소 20개를 갖는 (+)-eudesmin으로 동정하였다.

(3) 화합물 8 ((+)-kobusin)

EI-MS m/z : 370 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : 3.06-3.14 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.89 (3H, *s*, 4'-OMe), 3.92 (3H, *s*, 3'-OMe), 3.88-3.92 (2, *m*, H-9b, H-9b'), 4.25-4.29 (2H, *m*, H-9a, H-9a'), 4.75 (2H, *d*, $J = 5$, H-7, H-7'), 5.97 (2H, *s*, OCH_2O), 6.80 (1H, *d*, $J = 7.5$, H-5), 6.83 (1H, *dd*, $J = 1.5, 8$, H-6), 6.86 (1H, *d*, $J = 8.5$, H-5'), 6.88 (1H, *d*, $J = 1.5$, H-2), 6.89 (1H, *dd*, $J = 1.5, 8$, H-6'), 6.92 (1H, *d*, $J = 2$, H-2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : δ 54.50 (C-8, 8'), 56.20 (C-OMe \times 2), 71.94 (C-9, 9'), 86.02 (C-7), 101.31 (C- OCH_2O), 106.75 (C-2), 108.43 (C-5), 109.56 (C-2'), 111.40 (C-5'), 118.52 (C-6'), 119.58 (C-6), 133.83 (C-1'), 135.39 (C-1), 147.36 (C-4), 148.23 (C-3), 148.94 (C-4'), 149.51 (C-3'). kobusin

EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 370 (M^+)를 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 저자장의 δ 6.80 (1H, *d*, $J = 7.5$, H-5), 6.83 (1H, *dd*, $J = 1.5, 8$, H-6), 6.86 (1H, *d*, $J = 8.5$, H-5'), 6.88 (1H, *d*, $J = 1.5$, H-2), 6.89 (1H, *dd*, $J = 1.5, 8$, H-6'), 6.92 (1H, *d*, $J = 2$, H-2')는 방향핵의 프로톤에 귀속하였다. δ 3.89 (3H, *s*, 4'-OMe), 3.92 (3H, *s*, 3'-OMe)은 방향핵에 치환되어 있는 methoxyl에 각각 유래하며 δ 5.97 (2H, *s*, OCH_2O)은 방향핵에 치환된 dioxymethylene을 시사한다. 이상의 기기분석 및 문헌등과 비교한 결과 수소 18개 탄소 20개를 갖는 (+)-kobusin으로 동정하였다.

(4) 화합물 9 ((+)-yangambin)

EI-MS m/z : 446 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 3.10-3.12 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.84 (6H, *s*, 4, 4'-OMe), 3.88 (12H, *s*, 3, 3', 5, 5'-OMe), 3.93-3.96 (2H, *m*, H-9b, H-9b'), 4.30-4.33 (2H, *m*, H-9a, H-9a'), 4.75 (2H, *m*, H-7, H-7'), 6.58 (4H, *s*, H-2, 2', 6, 6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : δ 54.33 (C-8, 8'), 56.14 (C-OMe \times 4), 60.87 (C-OMe \times 2), 71.96 (C-9, 9'), 85.93 (C-7, 7'), 102.59 (C-2, 2', 6, 6'), 136.69 (C-1, 1'), 137.27 (C-4, 4'), 153.39 (C-3, 3', 5, 5'). yangambin

화합물 9는 판상결정으로 얻어졌다. EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 446 (M^+)를 나타냈으며, 주요 이온 피크로는 m/z 416 ($M^+ - 30$), 386, 347, 249, 224, 207, 181, 125, 81 등을 나타냈다. m/z 181의 fragment 이온피크는 3,4,5-trimethoxyphenyl 양이온을 시사한다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 3.84 (6H, *s*, 4, 4'-OMe)은 방향핵에 치환되어있는 4개의 methoxyl에 각각 유래한다. 저자장의 δ 6.58 (4H, *s*, H-2, 2', 6, 6')의 singlet signal은 방향핵 프로톤에 각각 유래한다. δ 3.10-3.12 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.84 (6H, *s*, 4, 4'-OMe), 3.88 (12H, *s*, 3, 3', 5, 5'-OMe)

5'-OMe), 3.93-3.96 (2H, *m*, H-9b, H-9b'), 4.30-4.33 (2H, *m*, H-9a, H-9a'), 4.75 (2H, *m*, H-7, H-7')의 signal은 furofuran 구조의 프로톤에 기인하는 것으로 H-7/7', H-8/8', H-9a/9a', H-9b/9b'는 각각 equivalence하고, ¹H-¹H COSY에서 δ 4.75 (2H, *m*, H-7, H-7')와 6.58 (4H, *s*, H-2, 2', 6, 6')의 상관피크는 이들이 근접해 있으며 H-7/7'이 각각 아릴기를 결합하고 있고, diequatorial 함을 알 수 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 9개의 시그날이 나타났다. DEPT에서 quaternary 탄소 시그날이 3개, tertiary 탄소 시그날이 2개, secondary 탄소 시그날이 1개, 그리고 primary 탄소 시그날이 3개 존재함을 확인 할 수 있었다. HMQC 스펙트럼에서 탄소 δ 54.33 (C-8, 8')는 H-8/8'과의 교차피크, 탄소 δ 56.14 는 수소 δ 3.88 (12H, *s*, 3, 3', 5, 5'-OMe)과 탄소 δ 60.87은 수소 δ 3.84 (6H, *s*, 4, 4'-OMe)와 교차피크를 나타냈다. 탄소 δ 71.96은 H-9a/9a'/9b/9b'와 δ 85.93 은 H-7/7', δ 102.59 는 H-2/2'/6/6' 과 교차피크를 나타냈다. HMBC에서 H-2/6과 δ 85.93 (C-7, 7'), 136.69 (C-1, 1'), 153.39 (C-3, 3', 5, 5') 과의 교차피크를 확인하였다. H-7과 δ 136.69 (C-1, 1')과의 교차피크를 확인하였다. 이상의 기기분석 및 문헌등과 비교한 결과 수소 30개 탄소 24개를 갖는 (+)-yangambin 으로 동정하였다.

(5) 화합물 10 ((+)-magnolin)

EI-MS *m/z* : 416 (M⁺). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 3.11 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.83 (3H, *s*, 4-OMe), 3.87 (9H, *s*, 3, 5, 4'-OMe), 3.91 (3H, *s*, 3'-OMe), 3.92 (2H, *m*, H-9b, H-9b'), 4.28 (2H, *m*, H-9a, H-9a'), 4.74 (2H, *m*, H-7, H-7'), 6.58 (4H, *s*, H-2, 2', 6, 6'). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ 54.33 (C-8, 8'), 56.14 (C-OMe×4), 60.87 (C-OMe×2), 71.96 (C-9, 9'), 85.93 (C-7, 7'), 102.59 (C-2, 2', 6, 6'), 136.69 (C-1, 1'), 137.27 (C-4, 4'), 153.39 (C-3, 3', 5, 5').
magnolin

EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M⁺) peak가 *m/z* 416 (M⁺)를 나타냈다. *m/z* 151와 165의 fragment 이온피크는 3,4-dimethoxyphenyl 양이온을, *m/z* 181, 195의 fragment 이온피크는 3,4,5-trimethoxyphenyl 양이온을 시사한다. ¹H-NMR에서 δ 3.83 (3H, *s*, OMe), 3.87 (9H, *s*, OMe), 3.91 (3H, *s*, OMe)는 방향핵에 치환된 methoxyl기가 5개의 존재를 시사한다. δ 6.58 (4H, *s*, H-2, 6), 6.84 (1H, *d*, *J* = 8.5, H-5'), 6.89 (1H, *dd*, *J* = 2, 8, H-6), 6.91 (1H, *d*, *J* = 1.5, H-2')은 방향핵의 프로톤에 유래한다. 기기분석과 문헌 비교로 (+)-magnolin으로 동정하였다.

(6) 화합물 11

EI-MS *m/z* : 402 (M⁺). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 3.10 (2H, *m*, H-8, H-8'), 3.87 (6H, *s*, OMe×2), 3.89 (3H, *s*, OMe×1), 3.91 (3H, *s*, OMe×1), 3.92

(2H, *m*, H-9b, H-9b'), 4.26 (2H, *m*, H-9a, H-9a'), 4.73 (2H, H-7, H-7'), 6.51 (1H, *d*, *J* = 1.5, H-2), 6.57 (1H, *d*, *J* = 2, H-6), 6.84 (1H, *d*, *J* = 7.5, H-5'), 6.87 (1H, *dd*, *J* = 2, 8, H-6'), 6.90 (1H, *d*, *J* = 1.5, H-2'). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ 54.17 (C-8, 8'), 56.00 (C-OMe×3), 60.95 (C-OMe×1), 71.80 (C-9, 9'), 85.80 (C-7, 7'), 101.84 (C-2), 105.54 (C-6), 109.36 (C-2'), 111.19 (C-5'), 118.32 (C-6'), 133.59 (C-1'), 134.93 (C-4), 137.50 (C-1), 148.74 (C-4'), 149.30 (C-3'), 149.38 (C-5), 152.56 (C-3).

EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M⁺) peak가 *m/z* 402 (M⁺)를 나타냈다. *m/z* 151와 165의 fragment 이온피크는 3,4-dimethoxyphenyl 양이온을, *m/z* 167, 181의 fragment 이온피크는 3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl 양이온을 시사한다. ¹H-NMR에서 δ 3.87 (6H, *s*, OMe×2), 3.89 (3H, *s*, OMe×1), 3.91 (3H, *s*, OMe×1)는 methoxyl 기 4개를 시사한다. 방향핵 프로톤인 저자장의 δ 6.51 (1H, *d*, *J* = 1.5, H-6)은 meta, 6.57 (1H, *d*, *J* = 2, H-2)은 meta, 6.84 (1H, *d*, *J* = 7.5, H-5')는 meta, 6.87 (1H, *dd*, *J* = 2, 8, H-6')는 meta와 ortho, 6.90 (1H, *d*, *J* = 1.5, H-2')는 meta임을 알 수 있다. HMBC 스펙트럼에서 δ 5.81 (1H, *s*, OH)과 C-2, C-3, C-4의 교차피크를 확인하였다. 이상의 기기분석 및 문헌등과 비교하고 있으며 구조동정 중에 있다.

3) 함박꽃나무

가)수피

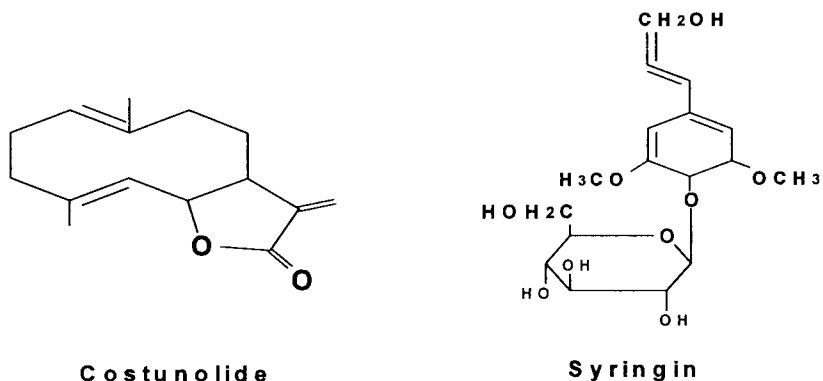


Fig 3. Compounds from the bark of *M. sieboldii*

(1) 화합물 12 (costunolide)

Colorless needle: EI-MS *m/z* : 232 (M⁺, base ion), 217, 204, 189, 175, 161, 150, 135, 123, 109, 81. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 1.44 (3H, *s*, Me-14), 1.71 (3H, *s*, Me-15), 1.76 (1H, *m*, Ha-8), 2.04 (1H, *m*, Ha-3), 2.14 (3H, *m*,

Hb-2, 8, 9), 2.33 (2H, *m*, Ha-2, 3), 2.42 (1H, *dd*, $J = 6.2, 13.2$ Hz, Ha-9), 2.64 (1H, *m*, H-7), 4.70 (1H, *dd*, $J = 8.5, 10.0$ Hz, H-6), 4.78 (1H, *d*, $J = 10.0$ Hz, H-5), 4.87 (1H, *dd*, $J = 4.5, 10.0$ Hz, H-1), 5.62 (1H, *d*, $J = 3.5$ Hz, H-13a), 6.16 (1H, *d*, $J = 3.5$ Hz, H-13b). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) : δ 16.40 (*q*, C-14), 17.52 (*q*, C-15), 27.14 (*t*, C-2), 29.07 (*t*, C-8), 40.38 (*t*, C-3), 42.10 (*t*, C-9), 51.64 (*d*, C-7), 83.87 (*d*, C-6), 120.21 (*d*, C-13), 127.92 (*d*, C-1), 128.66 (*d*, C-5), 138.41 (*s*, C-10), 142.10 (*s*, C-12), 142.10 (*s*, C-12), 142.74 (*s*, C-4), 172.86 (*s*, C-11).

$^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY correlations : H-5 \leftrightarrow H-6, H-7 \leftrightarrow H-6/H-8a/H-13ab, H-1 \leftrightarrow H-3-14, H-2ab \leftrightarrow H-1/H-3ab. HMBC correlations : H-2 \rightarrow C-1, H-3 \rightarrow C-1/C-2/C-4/C-5/C-15, H-8 \rightarrow C-7/C-10, H-9 \rightarrow C-7/C-10/C-14, H-13 \rightarrow C-7/C-11/C-12, H-14 \rightarrow C-1/C-9/C-10, H-15 \rightarrow C-3/C-4/C-5. NOESY correlations : H-5 \leftrightarrow H-3/H-7, Ha-13 \leftrightarrow Hb-8, H-15 \leftrightarrow Hb-6/H-6.

화합물 12는 무색의 침상결정으로 단리가 되었으며, EI-MS스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 232에서 나타났다. 주요 이온 peak 로서는 m/z 217, 204, 189, 175, 161, 150, 135, 123, 109, 81이었다. 화합물 12의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 총 16개의 proton이 있는 것을 확인하였다. δ 1.44 (3H, *s*, Me-14), 1.71 (3H, *s*, Me-15)에서 나타나는 2개의 singlet 시그널은 H-14, H-15에 귀속시켰으며, δ 5.62 (1H, *d*, $J = 3.5$ Hz, H-13a), 6.16 (1H, *d*, $J = 3.5$ Hz, H-13b)의 두개의 doublet 시그널은 H-13위의 methylen proton에 기인하는 것이다. 이는 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 H-13 번 methylen의 proton과 H-7위 methin proton과의 상관 peak, 그리고 H-14, H-15위의 methyl proton과 H-1, H-5위의 methin proton과의 상관 peak로 확인 할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 모두 15개의 탄소가 있는 것을 확인하였고 δ 172.86 과 δ 82.02 시그널은 lactone 구분구조의 carbonyl기 및 methin carbon에 각각 귀속하였다.

DEPT 135° $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼과, HSQC 스펙트럼에서 5개의 methylen carbon을 확인 하였다. HMBC 스펙트럼으로 H-14위 proton과 C-9위 carbon, H-15위 proton과 C-3위 carbon과의 교차 peak를 확인함으로써 14, 15위 methyl 기의 결합위치를, 그리고 lactone구분구조의 H-13위 proton과 C-11위 carbon과의 교차 peak를 확인함으로써 sesquiterpene lactone 구조의 costunolide로 동정하였다.

(2) 화합물 13 (syringin)

Colorless needle: EI-MS m/z : 372 (M^+ , base ion), 358, 342, 327, 311, 293,

283, 258, 238, 223, 210, 197,182, 167, 161, 154, 137, 121, 107, 91, 73, 61.
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) : δ 3.20 (1H, *m*, H-5'), 3.40 (1H, *m*, H-3'), 3.42 (1H, *m*, H-4'), 3.46 (1H, *m*, H-2'), 3.65 (1H, *dd*, *J* = 5.0, 12.0 Hz, Ha-6'), 3.77 (1H, *dd*, *J* = 2.5, 12.0 Hz, Hb-6'), 3.85 (6H, *s*, OMe-3, 5), 4.21 (2H, *dd*, *J* = 1.5, 5.5 Hz, H-9), 4.87 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 6.32 (1H, *dt*, *J* = 5.5, 16.0 Hz, H-8), 6.53 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-7), 6.74 (2H, *s*, H-2, 6).
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ 57.06 (*q*, OMe-3, 5), 62.60 (*t*, C-6'), 63.61 (*t*, C-9), 71.37 (*d*, C-3'), 75.76 (*d*, C-2'), 77.86 (*d*, C-4'), 78.40 (*d*, C-5'), 105.37 (*d*, C-1'), 105.48 (*d*, C-2, 6), 130.08 (*d*, C-7), 131.30 (*d*, C-8), 135.30 (*s*, C-1), 135.91 (*s*, C-4), 154.39 (*s*, C-3, 5). HMBC correlations : H-2,6→C-1/C-3/C-4/C-5/C-7. OMe-3,5→C-3/C-5. H-7→C-2/C-6/C-9, H-8→C-1/C-9, H-9→C-7/C-8, H-2'→C-4', H-3'→C-2'/C-4', H-4'→C-3', H-5'→C-3'/C-4', H-6'→C-5'.

화합물 13은 무색의 침상결정으로 단리되었다. EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M⁺) peak가 *m/z* 372에서 나타났으며 주요 이온 peak는 358, 342, 327, 311, 293, 283, 258, 238, 223, 210, 197,182, 167, 161, 154, 137, 121, 107, 91, 73, 61이었다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 3.85 (6H, *s*, OMe-3, 5)의 6개의 proton에 상응하는 시그널은 methoxyl기에서 기인하는 것으로 각각 methoxyl기의 3, 5번에 귀속하였으며, δ 4.87 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-1')의 doublet 시그널은 당에서 기인하는 anomeric proton으로 1'에 귀속하였다. 그리고 δ 6.32 (1H, *dt*, *J* = 5.5, 16.0 Hz, H-8), δ 6.53 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-7)의 두 개의 doublet 시그널은 그 결합 정수가 16 Hz로서 *trans* 형태인 것을 확인하였다.

¹³C-NMR스펙트럼에서 모두 17개의 carbon을 확인하였고 δ 7.06의 시그널은 methoxyl 기의 시그널이며 이 것은 C-3, C-5위에 귀속하였다. 그리고 δ 105.37의 시그널은 당에서 유래하는 anomeric carbon으로 C-1'에 귀속하였고 60~80 ppm 사이에서 보이는 시그널은 당에서 기인하는 것을 확인하였다. DEPT 135° ¹³C-NMR 스펙트럼에서 methylen 를 나타내는 두개의 carbon을 확인하였고 이들은 C-9, C-6'위에 귀속하였다. 그 밖의 methyn carbon이 9개 있다는 것을 알 수 있었다.

TOCSY 스펙트럼으로 당 구조의 H-2, H-3, H-4, H-5, H-6위 proton이 연결되어 있는 것을 확인 하였고, HMBC 스펙트럼으로는 당에서 유래하는 anomeric proton H-1'과 aglicon의 C-4위 carbon과의 교차 peak, 그리고 methoxyl기에 기인하는 C-3, C-5위 carbon의 교차 peak를 확인함으로써 이 화합물은 당이 4위 위치에 glycoside 결합한 syringin으로 동정하였다.

나)목부

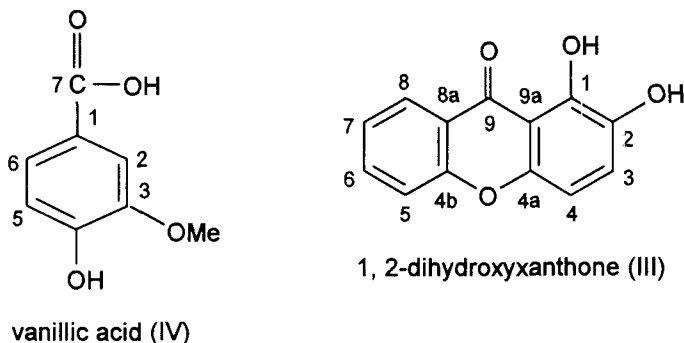


Fig 4. Compounds from the wood of *M. sieboldii*

(1) 화합물 14 (1,2-dihydroxyxanthone)

EI-MS m/z : 228 (M^+ , base ion), 211, 166, 145, 97, 57. 1H -NMR(500 MHz, CD_3OD) : δ 7.20 (1H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-4), 7.42 (1H, *m*, H-7), 7.49 (1H, *m*, H-6), 7.74 (1H, *dd*, $J = 0.5, 8.5$ Hz, H-5), 7.89 (1H, *d*, $J = 8.5$, H-3), 8.29 (1H, *dd*, $J = 1.0, 8.5$ Hz, H-8). ^{13}C -NMR(125 MHz, CD_3OD) : δ 111.89 (*s*, C-9a), 116.38 (*d*, C-4), 123.15 (*d*, C-4), 124.30 (*d*, C-8), 125.44 (*s*, C-8a), 126.69 (*d*, C-3), 127.14 (*d*, C-5), 127.32 (*d*, C-6), 136.77 (*s*, C-4a), 159.84 (*s*, C-1), 160.29 (*s*, C-2), 169.22 (*s*, C-4b), 175.80 (*s*, C-9). 1H - 1H COSY correlations: H-3 \leftrightarrow H-4, H-5 \leftrightarrow H-6, H-6 \leftrightarrow H-7, H-7 \leftrightarrow H-8. HMBC correlations: H-3 \rightarrow C-1/C-4a, H-4 \rightarrow C-9a/C-3, H-5 \rightarrow C-7, H-7 \rightarrow C-8a, H-8 \rightarrow C-6.

화합물 14는 EI-MS 스펙트럼에서 molecular ion (M^+) peak가 m/z 228에서 나타났다 주요 이온 peak로는 211, 166, 145, 97, 57이었다.

1H -NMR 스펙트럼에서 6개의 proton이 있는 것을 확인하였다. δ 7.42 (1H, *m*, H-7), 8.29 (1H, *dd*, $J = 1.0, 8.5$ Hz, H-8)의 두개의 doublet 시그널은 각각 H-7, H-8위에 귀속하였고, δ 7.89 (1H, *d*, $J = 8.5$, H-3), 7.20 (1H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-4)의 doublet 시그널은 H-3, H-4위에 귀속하였다. 이는 1H - 1H COSY 스펙트럼에서 H-7위 proton과 H-8위 proton 그리고 H-3위 proton과 H-4위 proton과의 상관 peak로 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 모두 12개의 carbon을 확인하였고 δ 175.80, δ 169.22, δ 160.29, δ 159.84, δ 111.89, δ 125.44 그리고 δ 136.77 의 시그널은 quaternary carbon이며 DEPT 90° ^{13}C -NMR 스펙트럼과 HMQC 스펙트럼에서 6개의 methine carbon을 확인하였다. HMBC스펙트럼으로 C-4a와 C-1위의 carbon과 H-3위 proton과의 교차 peak, 그리고 C-3, C-9a carbon과 H-4위 proton과의 교차 peak를 확인함으로써 이 화합물은 1,2-dihydroxyxanthone으로 동정하였다.

(2) 화합물 15 (vanillic acid)

Yellow powder: EI-MS m/z : 168 (M^+ , base ion), 153, 151, 124, 109, 97, 81, 69, 55. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 3.88 (3H, s, OMe-3), 6.71 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.48 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz H-6). 7.57 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) : δ 55.04 (s OMe-4), 112.83 (d, C-2), 114.87 (d, C-5), 123.37 (d, C-6), 127.46 (s, C-1), 147.78 (s, C-3), 152.03 (s, C-4), 174.95 (s, C-7). HMBC correlation : $\text{CH}_3 \rightarrow \text{C-3}, \text{H-2} \rightarrow \text{C-6/C-3/C-4/C-7}, \text{H-5} \rightarrow \text{C-1/C-3}, \text{H-6} \rightarrow \text{C-2/C-4}$

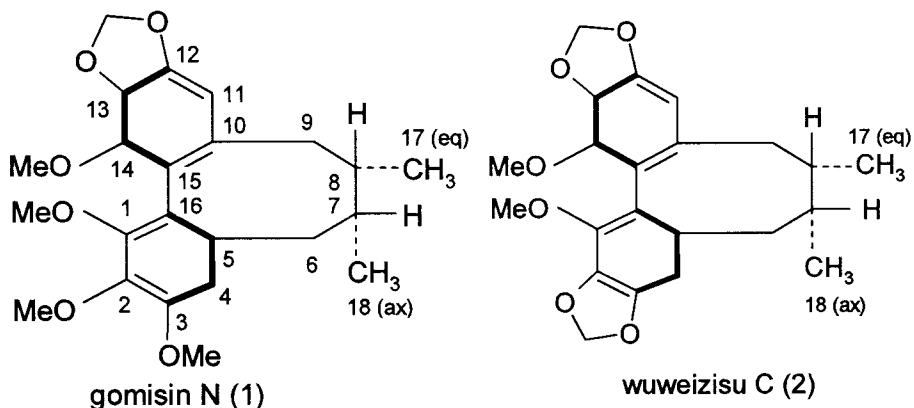
화합물 15의 EI-MS 스펙트럼에서 molecular ion (M^+) peak가 m/z 168에서 나타났으며 주요 이온 peak로는 153, 151, 124, 109, 97, 81, 69, 55이었다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 3.88 (3H, s, OMe-3)의 세 개의 proton에 상응하는 시그널은 methoxyl기에서 기인하는 것으로 H-3위에 귀속하였으며 δ 6.71의 doublet 시그널은 결합정수가 8.5 Hz로서 *ortho* 결합을 하고 있으며 δ 7.48의 double doublet 시그널은 그 결합정수가 2.0과 8.5 Hz로서 *ortho*와 *meta* 결합을 하고 있는 것을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 55.04의 시그널은 methoxyl기이며 모두 7개의 carbon을 확인할 수 있었다.

HMQC 스펙트럼으로 δ 114.8, δ 127.4 그리고 δ 152 의 methine carbon 확인하였고 각각 C-5, C-1, C-4위에 귀속하였다. HMBC 스펙트럼에서 H-2위 proton과 C-3, C-4, C-6, C-7위 carbon의 교차 peak와 H-6위 proton과 C-4위 carbon의 교차 peak, 그리고 H-5위 proton과 C-1, C-3위 carbon의 교차 peak를 확인함으로써 이 화합물은 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid인 vanillic acid로 동정하였다.

4)오미자

가)열매



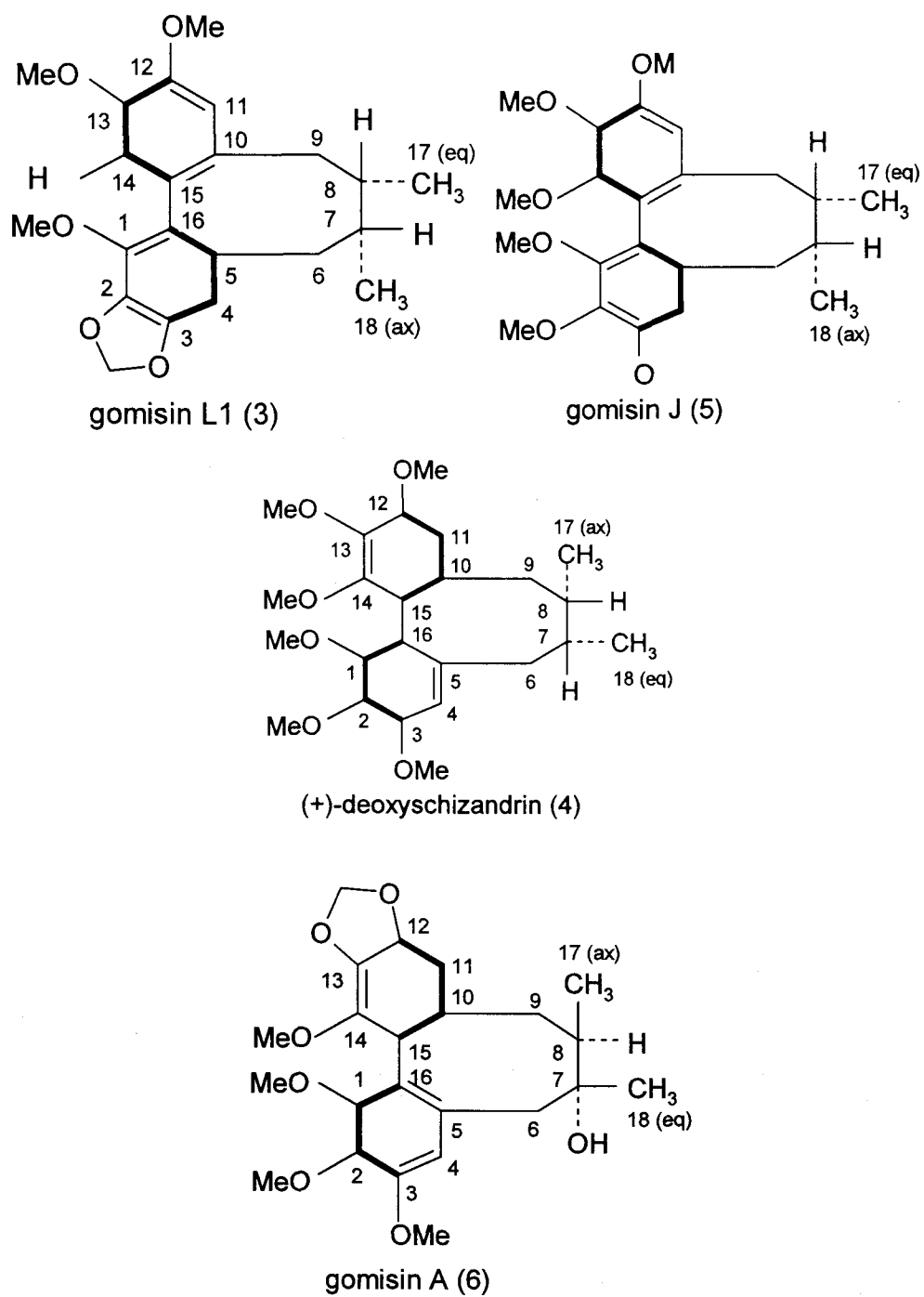


Fig. 5. Compounds isolated from fruits of *S. chinensis*

(1) 화합물 16 (gomisin N)

Pale yellow oil. EI-MS m/z : 400 (M^+ , base ion), 344 (M-56), 312, 235 (M-165), 219 (M-181), 181, 165, 56. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 0.73 (3H, d, $J = 7.5$, CH₃-18), 0.97 (3H, d, $J = 7.5$, CH₃-17), 1.76 (1H, m, H-8), 1.89 (1H, m, H-7), 2.05 (1H, m, H-9a), 2.22 (1H, dd, $J = 9.0, 13.5$, H-9b), 2.44 (1H, dd, $J = 2.5, 13.5$, H-6a), 2.60 (1H, dd, $J = 8.5, 13.5$, H-6b), 3.48 (3H, s, OMe-3), 3.76 (3H, s, OMe-14), 3.80 (3H, s, OMe-2), 3.86 (3H, s, OMe-1), 5.96 (2H, s, OCH₂O), 6.53 (1H, s, H-11), 6.68 (1H, s, H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) : δ 12.37 (q, CH₃-18), 21.10 (q, CH₃-17), 33.83 (d, C-7), 35.36 (t, C-9), 38.94 (t, C-6), 41.11 (d, C-8), 55.59 (q, OMe-1), 58.88 (q, OMe-14), 59.96 (q, OMe-3), 60.23 (q, OMe-2), 101.03 (t, OCH₂O), 102.84 (d, C-11), 111.13 (d, C-4), 123.59 (s, C-16), 31.88 (s, C-15), 34.04 (s, C-5), 134.89 (s, C-13), 137.91 (s, C-10), 140.59 (s, C-2), 141.47 (s, C-14), 149.02 (s, C-12), 152.02 (s, C-3), 152.21 (s, C-1).

화합물 16은 오미자 열매의 주요한 성분의 하나로 여겨지며 노란색 유상으로 단리되었다. EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 400 (M^+)를 나타냈으며, 주요 이온 피크로는 m/z 344 ($M^+ - 56$), 312, 235($M^+ - 165$), 219($M^+ - 181$), 181, 165 등을 나타냈다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 3.48 (3H, OMe-3), δ 3.76 (3H, OMe-14), δ 3.80 (3H, OMe-2), δ 3.86 (3H, OMe-1)에 나타나는 4개의 singlet 시그널은 방향핵에 치환되어 있는 methoxyl에 각각 귀속하였다. δ 2.44 (2H, $J = 2.5, 13.5$ Hz, H-6), δ 2.60 (2H, $J = 8.5, 13.5$ Hz, H-6) 및 δ 2.22 (2H, $J = 9.0, 13.5$ Hz, H-9)의 6H에 해당하는 3개의 double doublet와 δ 2.05 (2H, m , H-9)에서 나타나는 1개의 multiplet의 시그널은 cyclootadiene 부분구조의 H-6, H-9의 benzylic methylene proton에 기인한다. δ 0.97 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, CH₃-17), δ 0.73 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, CH₃-18)의 6H에 해당하는 2개의 doublet 시그널은 equatorial methyl기의 CH₃-17 및 axial methyl기인 CH₃-18에 각각 귀속하였다(Yukinobu *et al.*, 1979; 1980). DEPT법에 의한 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 모두 23개의 탄소 시그널이 나타났다. 이중 quaternary 탄소가 10개, tertiary 탄소가 4개, secondary 탄소가 3개, 그리고 primary 탄소가 6개 존재함을 확인할 수 있었다. δ 102.84, δ 111.13은 방향핵에 기인하는 C-11 및 C-4의 methine 탄소에 귀속하였다. 화합물 1의 HMBC 스펙트럼에서는 dioxymethylene proton과 C-12, C-13 탄소와의 교차피크, 그리고 H-11 proton과 C-13, C-15 및 C-9 탄소와의 교차피크의 존재를 각각 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 NOESY 스펙트럼에서 CH₃-17 proton과 dioxymethylene proton과의 교차피크로부터 이들 구조를 지지하고 있다. 이상의 기기분석 결과, 화합물 16은 gomisin N으로 동정하였다.

(2) 화합물 17 (wuweizisu C)

Colorless solid. EI-MS m/z : 384 (M^+ , base ion), 328 (M-56), 219 (M-165), 165, 56. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 0.73 (3H, d, $J = 7.0$, CH₃-18), 0.97 (3H, d, J

= 7.0, CH3-17), 1.75 (1H, m, H-8), 1.87 (1H, m, H-7), 2.01 (1H, d, J = 13.5, H-9a), 2.21 (1H, d, J = 9.5, 13.5, H-9b), 2.44 (1H, dd, J = 2.0, 13.5, H-6a), 2.60 (1H, dd, J = 7.5, 13.5, H-6b), 3.76 (3H, s, OMe-14), 3.78 (3H, s, OMe-1), 5.96×2 (4H, s, OCH₂O), 6.53 (1H, s, H-4), 6.52 (1H, s, H-11)
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : δ 12.14 (q, CH₃-18), 21.19 (q, CH₃-17), 33.86 (d, C-7), 35.17 (t, C-9), 38.70 (t, C-6), 41.07 (d, C-8), 55.93 (q, OMe-1), 58.94 (q, OMe-14), 101.01×2 (t, OCH₂O), 102.85 (d, C-11), 105.88 (d, C-4), 121.52 (s, C-15), 122.66 (s, C-16), 132.74 (s, C-5), 134.69 (s, C-13), 135.03 (s, C-2), 138.22 (s, C-10), 141.44 (s, C-14), 141.69 (s, C-1), 147.99 (s, C-3), 149.05 (s, C-12).

화합물 17은 무색의 solid로 단리되었으며, EI-MS에서 molecular ion (M⁺) peak가 *m/z* 384을 나타냈다. ¹H-NMR 스펙트럼의 고자장측에 나타나는 δ 0.97 (3H, d, J = 7.5 Hz, CH₃-17), δ 0.73 (3H, d, J = 7.5 Hz, CH₃-18)의 6H에 해당하는 2개의 doublet 시그널은 cyclootadiene 지환구조에 결합하고 있는 axial, equatorial methyl기에 기인하는 것으로 CH₃-17 및 CH₃-18에 각각 귀속하였다. δ 5.96 (4H, OCH₂O)의 4H에 해당하는 시그널은 2개의 dioxymethylene의 proton의 존재를 시사하고 있다. δ 3.76 (3H, OMe-14), δ 3.78 (3H, OMe-1)에서의 2개의 singlet은 methoxyl기 proton에 유래한다. 이들 proton들은 ¹H-¹H COSY 및 NOESY 스펙트럼에서도 각각의 상관 및 교차피크를 보여줌으로서, 이들 proton이 서로 근접한 구조의 화합물임을 알 수 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 총 22개의 탄소 시그널이 나타났으며, 이중 δ 101.01은 dioxymethylene 탄소에 기인한다. δ 132.74, δ 138.22, δ 121.52, δ 122.66은 C-5, C-10, C-15 및 C-16의 methine 탄소에 각각 귀속하였다. 그밖의 2D-NMR(¹H-¹H COSY, NOESY 및 HMBC)의 분석결과, 화합물 17은 wuweizisu C로 동정하였다.

(3) 화합물 18 (gomisin L1)

Colorless solid. EI-MS *m/z* : 386 (M⁺, base ion). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 0.73 (3H, d, J = 7.0, CH₃-18), 1.01 (3H, d, J = 7.0, CH₃-17), 1.80 (1H, m, H-8), 1.90 (1H, m, H-7), 2.05 (1H, d, J = 13.5, H-9a), 2.32 (1H, dd, J = 10.0, 13.5, H-9b), 2.45 (1H, dd, J = 2.0, 13.5, H-6a), 2.57 (1H, dd, J = 7.5, 13.5, H-6b), 3.89 (3H, s, OMe-1), 3.91 (3H, s, OMe-12), 3.92 (3H, s, OMe-13), 5.96 (2H, s, J = 12.0, OCH₂O), 6.38 (1H, s, H-11), 6.53 (1H, s, H-4) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ 13.16 (q, CH₃-18), 22.19 (q, CH₃-17), 34.08 (d, C-7), 35.63 (t, C-9), 39.17 (t, C-6), 41.03 (d, C-8), 55.92 (q, OMe-12), 60.00 (q, OMe-1), 61.24 (q, OMe-13), 101.04 (t, OCH₂O), 104.13 (d, C-11), 106.72 (d, C-4), 115.95 (s, C-15), 121.57 (s, C-16), 133.34 (s, C-13), 134.76 (s, C-5), 135.20 (s, C-2), 140.15 (s, C-10), 141.41 (s, C-1), 146.95 (s, C-14), 148.07 (s,

C-3), 151.91 (s, C-12).

화합물 18의 EI-MS에서 molecular ion (M^+) peak가 m/z 386를 나타냈다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 3.89 (3H, OMe-1), δ 3.91 (3H, OMe-12), δ 3.92 (3H, OMe-13)에 나타난 12H에 상당하는 시그널로 부터 분자구조 중에 3개의 메틸기가 존재함을 시사하고 있다. δ 5.96 (2H, s)의 1개의 signal은 dioxymethylene 부분구조의 proton에 기인한다. 화합물 3의 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 H-7의 proton과 CH_3 -18의 proton 과의 상관피크, H-8과 CH_3 -17 proton과의 상관피크를 각각 확인할 수 있었다. 또한 NOESY 스펙트럼의 H-6 proton과 H-4 및 CH_3 -18의 proton, H-11과 OCH_3 -12 proton과의 상관피크의 존재로부터 메톡실기의 결합위치를 확인 할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 모두 22개의 탄소 시그널이 나타났다. 이중 δ 39.19, δ 34.08, δ 41.03, δ 35.63의 시그널은 C-6, C-7, C-8 및 C-9의 탄소에, δ 135.20, δ 148.07은 C-2, C-3의 탄소에 각각 귀속하였다. HMBC 스펙트럼에서 H-4 proton과 C-2, C-3, C-6, C-16 탄소와의 교차피크와 H-11 proton과 C-9, C-10, C-12, C-13, C-15 탄소와의 교차피크를 각각 확인할 수 있었다. 이외의 2D-NMR 결과, 화합물 18은 gomisin L1으로 동정하였다.

(4) 화합물 19 ((+)-deoxyschizandrin)

Colorless solid. EI-MS m/z : 416 (M^+ , base ion). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.73 (3H, d, $J = 7.0$, CH_3 -18), 1.01 (3H, d, $J = 7.0$, CH_3 -17), 1.80 (1H, m, H-8), 1.90 (1H, m, H-7), 2.05 (1H, d, $J = 13.5$, H-9a), 2.32 (1H, dd, $J = 10.0$, 13.5, H-9b), 2.45 (1H, dd, $J = 2.0$, 13.5, H-6a), 2.57 (1H, dd, $J = 7.5$, 13.5, H-6b), 3.89 (3H, s, OMe-1), 3.91 (3H, s, OMe-12), 3.92 (3H, s, OMe-13), 5.96 (3H, s, $J = 12.0$, OCH_2O), 6.38 (1H, s, H-11), 6.53 (1H, s, H-4) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : δ 12.88 (q, CH_3 -17), 21.99 (q, CH_3 -18), 33.98 (d, C-8), 35.82 (t, C-6), 39.37 (t, C-9), 41.00 (d, C-7), 56.12 (q, OMe-3), 56.12 (q, OMe-12), 60.74 (q, OMe-14), 60.74 (q, OMe-1), 61.17 (q, OMe-2), 61.17 (q, OMe-13), 107.43 (d, C-4), 110.74 (d, C-11), 122.57 (s, C-16), 123.62 (s, C-15), 134.17 (s, C-10), 139.40 (s C-5), 139.97 (s, C-13), 140.32 (s, C-2), 151.62 (s, C-14), 151.75 (s, C-1), 153.09 (s, C-3), 153.09 (s, C-12).

화합물 19의 EI-MS에서 molecular ion (M^+)이 m/z 416에 나타났다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 δ 2.28 (2H, $J = 10.0$, 13.5 Hz, H-6), δ 2.50 (2H, $J = 2.0$, 13.5 Hz, H-9) 및 δ 2.59 (2H, $J = 7.0$, 13.5 Hz, H-9)의 6H에 해당하는 3개의 double doublet 시그널과 δ 2.06 (2H, d, $J = 13.5$ Hz, H-6)에서 나타나는 1개의 doublet의 시그널은 cyclootadiene 부분구조의 H-6, H-9의 methylene proton에 유래한다. δ 0.73 (3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -17), δ 1.01 (3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -18)의 6H에 해당하는 2개의 doublet 시그널은 axial, equatorial methyl기의 CH_3 -17, CH_3 -18에 각각 귀속하였다(Yukinobu *et al.*, 1979; 1980). 또한 δ 3.48 (6H, OMe-13, 2), δ 3.84 (6H, OMe-12, 3), δ 3.58 (3H, OMe-1) 및 δ 3.59 (3H, OMe-14)에 나

타나는 18H에 상당하는 시그널은 분자구조 중에 6개의 methoxy기의 존재를 시사하고 있다. 화합물 4의 ^{13}C -NMR에서는 총 24개의 탄소 시그널이 나타났다. 이중 quaternary 탄소가 10개, tertiary 탄소가 4개, secondary 탄소가 2개, 그리고 primary 탄소가 8개 존재함을 확인할 수 있었다. δ 110.74, δ 1107.43은 방향핵에 기인하는 C-11 및 C-4의 methine 탄소에, δ 35.82, δ 41.00, δ 33.98, δ 39.37은 C-6, C-7, C-8, C-9의 탄소에 각각 귀속하였다. 그밖의 ^1H - ^1H COSY, NOESY 및 HMQC등의 결과, 화합물 19는 (+)-deoxyschizandrin으로 동정하였다.

(5) 화합물 20 (gomisin J)

EI-MS m/z : 388(M^+ , base ion). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.74 (3H, *d*, J = 7.5 Hz, CH_3 -18), 0.98 (3H, *d*, J = 7.5 Hz, CH_3 -17), 1.80 (1H, *m*, H-8), 1.90 (1H, *m*, H-7), 2.03 (1H, *d*, J = 13.5 Hz, H-9a), 2.03 (1H, *d*, J = 13.5 Hz, H-9a), 2.26 (1H, *dd*, J = 9.5, 13.5 Hz, H-9b), 2.47 (1H, *dd*, J = 2.0, 13.5 Hz, H-6a), 2.55 (1H, *dd*, J = 7.5, 13.5 Hz, H-6b), 3.53 (3H, *s*, OMe-14), 3.54 (3H, *s*, OMe-1), 3.94 (3H, *s*, OMe-13), 3.95 (3H, *s*, OMe-2), 6.64 (2H, *s*, H-4, 11). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ 12.77 (*q*, CH_3 -18), 21.93 (*q*, CH_3 -17), 31.13 (*d*, C-7), 33.98 (*t*, C-9), 39.08 (*t*, C-6), 31.13 (*d*, C-7), 41.18 (*d*, C-8), 60.28 (*s*, OMe-1, 14), 61.23 (*d*, OMe-2, 13), 110.34 (*d*, C-11), 113.41 (*d*, C-4), 121.66 (*s*, C-15), 122.69 (*s*, C-16), 135.11 (*t*, C-5), 137.64 (*s*, C-13), 137.93 (*s*, C-2), 140.43 (*s*, C-10), 147.77 (*s*, C-3), 148.96 (*s*, C-12), 150.48 (*s*, C-14), 150.60 (*s*, C-1).
Gomisin J

화합물 20의 EI-MS에서 molecular ion (M^+)이 m/z 388를 나타냈다. ^1H -NMR 스펙트럼의 δ 0.74, 0.98의 2개의 doublet 시그널은 axial, equatorial methyl기인 CH_3 -18, CH_3 -18에 각각 귀속하였다. δ 3.53, 3.54, 3.94 및 3.95에 나타나는 12H의 시그널은 methoxy기의 존재를 시사하고 있다. ^{13}C -NMR에서는 총 21개의 탄소 시그널이 나타났다. HMBC 스펙트럼에서 OMe-2, 13의 proton과 C-2, C-13, OMe-1, 14의 proton과 C-1, C-14 탄소와의 교차피크를 확인하였다. 분석결과 및 문헌¹³⁾과 비교 함으로서, 화합물 20는 gomisin J로 동정하였다(Fig 1).

(6) 화합물 21 (gomisin A)

colorless crystals. EI-MS m/z : 416 (M^+ , base ion), 345 (M-71), 314, H-NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 0.84 (3H, *d*, J = 7.0, CH_3 -17), 1.27 (3H, *s*, CH_3 -18), 1.86 (1H, *m*, H-8), 2.34 (1H, *d*, J = 7.5, H-9a), 2.37 (1H, *dd*, J = 3.5, 11.5, H-6b), 2.60 (1H, *dd*, J = 1.5, 14.0, H-9b), 2.70 (1H, *d*, J = 13.5, H-6a), 3.53 (3H, *s*, OMe-1), 3.92 (3H, *s*, OMe-2), 3.92 (3H, *s*, OMe-3), 3.85 (3H, *s*, OMe-1) 5.976 (3H, *dd*, J = 1.5, 6.0, OCH_2O), 6.49 (1H, *s*, H-11), 6.64 (1H, *s*, H-4) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ 16.03 (*q*, CH_3 -17), 30.32 (*q*, CH_3 -18), 33.98

(t, C-9), 40.78 (t, C-6), 42.28 (t, C-8), 56.21 (q, OMe-3), 59.89 (q, OMe-14), 60.83 (q, OMe-1) 61.25 (q, OMe-2), 71.87 (d, C-7), 101.57 (d, C-4), 1.6.81 (d, C-11), 122.12 (s, C-15), 124.40 (s, C-16), 132.27 (s, C-5), 132.75 (s C-5), 139.97 (s, C-13), 140.32 (s, C-2), 151.62 (s, C-14), 151.75 (s, C-1), 153.09 (s, C-3), 153.09 (s, C-12). Gomisin A

화합물 21은 무색결정으로 단리 되었다. EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion (M^+) peak가 m/z 416을 나타냈다. 화합물 2의 1H -NMR 스펙트럼에서 δ 0.84 (3H, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -17) 및 δ 1.27 (3H, CH_3 -18)의 시그널은 axial methyl기의 CH_3 -17 및 equatorial methyl기인 CH_3 -18에 각각 귀속하였다. δ 1.86 (1H, m , H-8)에서 나타나는 1개의 multiplet의 시그널은 cyclootadiene 부분구조의 H-8에 기인한다. 저자장측에 나타나는 δ 6.64 (1H, s , H-4), δ 6.49 (1H, s , H-11)의 2개의 singlet 시그널은 방향핵의 methine proton에 각각 귀속하였다. 또한 δ 5.97 (2H, $J = 1.5, 6.0$ Hz, OCH_2O)의 2H에 해당하는 시그널은 1개의 dioxymethylene proton의 존재를 시사하고 있으며, 화합물 2의 HMBC 스펙트럼에서는 C-12와 C-13 carbon과의 교차피크를 확인하였다. δ 3.53 (3H, OMe-1), δ 3.92 (3H, OMe-2), δ 3.92 (3H, OMe-3) 및 δ 3.85 (3H, OMe-14)에 나타나는 4개의 singlet 시그널은 방향핵에 치환되어 있는 methoxy에 각각 유래하며, HMBC에서 C-1, C-2, C-3, C-14 carbon과의 교차피크를 확인하였다. 그리고 화합물 2의 NOESY 스펙트럼에서는 δ 3.92 (3H)의 OMe-3 proton과 δ 6.64 (1H)의 H-4 proton과의 교차피크를 확인할 수 있었다. 이상의 기기분석 및 참고문헌(Yukinobu *et al.*, 1980)등과 비교한 결과 화합물 21은 gomisin A로 동정하였다

나. 항균활성

목련과 식물중 백합나무, 목련, 태산목, 남오미자, 오미자, 함박꽃나무, 일본목련 에탄올 조추출물을 1000 μ g/ml로 조제하여 항균활성을 조사한 결과, 일본목련 수피가 백색부후균인 *T. versicolor*를 제외한 모든 공시균주에 대하여 50% 이상의 균사생장억제율을 나타내어 항균활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 그 다음이 일본목련 목부로 탄저병균인 *G. cingulata*와 목재부후균인 *T. versicolor*, *T. palustris*를 제외한 공시균주에 대하여 50%이상의 균사생장억제율을 나타내었다.

수중별로는 일본목련이 가장 항균활성이 우수하였으며 그 다음이 목련, 함박꽃나무 순으로 나타났으며 태산목이 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 부위별로는 수피가 가장 활성이 우수하였으며 그 다음이 목부, 잎의 순이었다. 이상의 결과 항균활성이 우수한 것으로 나타난 일본목련 수피와 목부로부터 금후 항균물질을 분리하고자 한다.

Table 1. 목련과 식물의 항균활성

시 료 명	균 사 생 장 억 제 율 (%)								
	<i>G. cingulata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. subglutinans</i> f. sp. <i>pini</i>	<i>C. parasitica</i>	<i>L. betulina</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>T. palustris</i>	<i>T. viride</i>	<i>T. harzianum</i>
백합나무 수피	16.6	13.1	16.6	16.6	16.6	0	10.7	16.6	2.4
백합나무 잎	19.0	17.8	16.7	40.4	25.0	19.0	28.6	7.1	0
백합나무 목부	22.6	13.1	10.7	14.2	36.9	0	10.7	20.2	17.8
목련 수피	28.6	34.5	33.3	54.8	54.8	46.4	47.6	40.4	40.4
목련 목부	14.2	13.1	16.6	0	67.8	0	9.5	22.6	19.0
태산목 수피	14.2	16.7	19.0	16.7	32.1	16.7	26.2	0	0
태산목 잎	9.0	11.9	21.4	20.2	40.4	22.6	19.0	0	0
태산목 목부	21.4	9.5	14.2	0	32.1	8.0	9.5	0	0
남오미자 잎+줄기	25.0	7.1	16.6	9.5	11.9	0	5.9	25.0	4.7
오미자 줄기	30.9	20.2	9.5	31.0	17.9	22.6	27.4	20.2	20.2
함박꽃나무 수피	26.1	28.6	40.4	44.0	53.5	16.6	35.7	28.5	30.9
함박꽃나무 잎	29.7	23.8	20.2	40.4	39.3	35.7	46.4	16.7	10.7
함박꽃나무 목부	10.7	19.0	25.0	13.0	25.0	0	9.5	20.2	26.1
일본목련 수피	67.8	72.6	64.3	51.2	78.6	15.5	72.6	76.2	82.1
일본목련 잎	46.4	33.3	22.6	22.6	66.7	2.4	45.2	45.2	56.0
일본목련 목부	14.2	57.1	61.9	51.1	66.7	0	8.0	85.7	84.5

다. 항산화활성

목련과 수목 중 목련, 일본 목련, 자목련, 백목련, 백합나무, 함박꽃나무, 태산목 그리고 오미자의 각 부위별 시료 총 26점의 에탄올 추출물을 100 µg/ml의 농도로 조제하여 프리라디칼소거능을 측정하여 항산화활성을 검정하였다. 그 결과, 태산목 잎과 수피가 각각 93.3%와 96.6%의 프리라디칼소거능을 나타내어 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT) 및 천연항산화제인 tocopherol과 비교해도 활성이 우수한 것으로 나타났다 (Table 2). 일본목련 수피도 86.0%의 소거능을 나타내어 합성항산화제보다는 높으나 천연항산화제보다는 낮은 소거능을 나타내어 활성이 있는 것으로 판단되었다.

Table 2. Antioxidative activity 목련과 수종의 항산화활성

시 료 명	프리라디칼 소거능 (%)
목련 잎	28.7
목련 수피	21.9
목련 목부	44.1
일본목련 잎	70.0
일본목련 수피	86.0
일본목련 목부	64.8
자목련 잎	53.4
자목련 수피	53.4
자목련 목부	35.7
자목련 꽃	43.4
백목련 잎	40.8
백목련 수피	64.9
백목련 목부	54.0
백목련 꽃	33.2
백합나무 잎	50.6
백합나무 수피	24.5
백합나무 목부	71.9
함박꽃나무 잎	32.1
함박꽃나무 수피	17.6
함박꽃나무 목부	43.8
태산목 잎	93.3
태산목 수피	96.6
태산목 목부	32.8
태산목 꽃	59.7
오미자 줄기	48.3
오미자 열매	14.3
BHT(합성항산화제)	63.5
Tocopherol(천연항산화제)	96.6

라. 항암활성

1) 암세포의 생육억제실험

가) 암세포의 생육억제

목련과 수종의 폐암 암세포(A549)에 대한 생육억제 결과는 Table 3과 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 폐암세포에 대한 생육억제 효과는 함박꽃나무의 목부 추출물에서 1.0 mg/ml의 농도에서 76.7%로 가장 높게 나타났으며, 목련의 경우 잎 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 65.6%로 수피(55.65%), 목부(43.5%)에 비하여 높은 생육억제 효과를 나타내었다. 백합나무의 경우 전반적으로는 수피 추출물 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 60% 이상의 암세포 생육억제활성을 나타내었다. 태산목의 경우에도 수피 추출물이 0.6 mg/ml 이상의 농도에서 60% 이상의 생육억제활성을 나타내었다. 일본목련은 1.0 mg/ml의 농도에서 52.4%, 오미자의 경우 1.0 mg/ml이상의 농도에서 65.4%의 암세포 생육억제 활성을 나타내었다. 전반적으로 폐암세포(A549)에 대한 목련과 나무들의 생육억제활성은 함박꽃나무를 제외하고 수피와 잎의 활성이 뛰어난 것을 확인하였다(Fig 1.).

Table 3. Inhibition ratio of growth of A549 (Lung carcinoma, human) in adding the extracts from Magnoliaceae.

Samples			concentrate(mg/ml)				
			0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<i>Magnolia kobus</i>	Wood	118W	21.5	23.1	25.7	32.7	43.5
	Bark	118B	27.3	39.3	42.7	45.9	55.6
	Leaf	118L	43.9	46.3	50.3	59.6	71.0
<i>Liriodendron tulipifera L.</i>	Wood	114W	34.9	38.4	42.2	45.3	51.2
	Bark	114B	25.4	39.3	59.1	62.3	65.1
	Leaf	114L	35.6	46.3	52.1	59.6	65.6
<i>Magnolia grandiflora</i>	Wood	150W	18.8	23.1	25.0	32.7	42.3
	Bark	150B	21.3	39.3	60.9	65.4	73.3
<i>Magnolia sieboldii</i>	Wood	198W	14.8	23.1	64.3	67.2	76.7
<i>Magnolia obovata</i> Thunb	Wood	209W	23.8	29.4	39.4	45.9	52.4
<i>Schizandra chinensis</i>	branch	43D	42.7	44.3	46.3	59.6	65.4

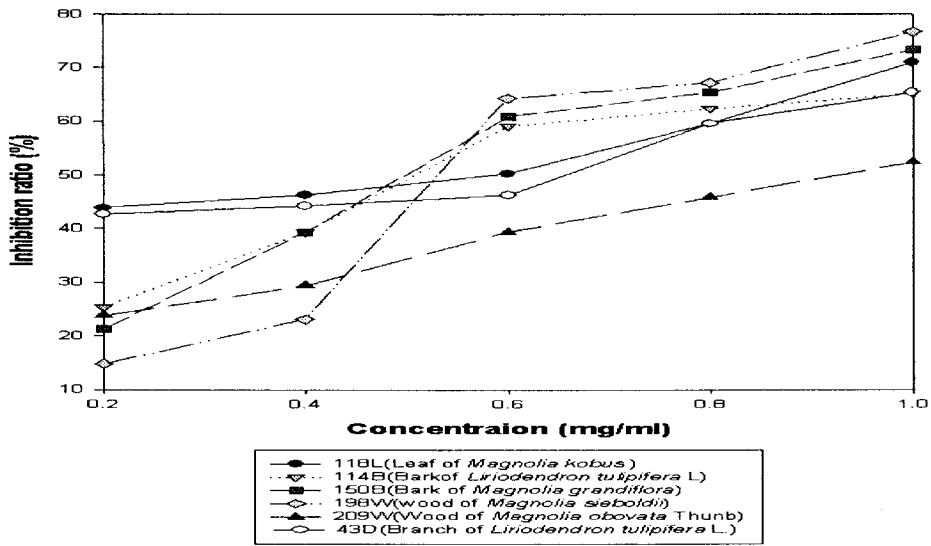


Fig. 1. Inhibition ratio of growth of A549 (Lung carcinomara, human) in adding the extracts from *Magnoliaceae*.

또한 위암세포(AGS)에 대한 생육 억제 효과는 Table 4와 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 위암 세포에 대한 생육 억제효과는 태산목의 수피 추출물이 1 mg/ml의 농도에서 96.2%로 가장 높게 나타났으며, 목련의 경우 수피 추출물이 0.6 mg/ml 이상의 농도에서 암세포의 생육을 80%이상 억제하였으며, 목백합의 경우 잎 추출물은 0.8 mg/ml이상에서, 수피 추출물은 1.0 mg/ml이상의 농도에서 암세포의 생육을 90%이상 억제하였다. 태산목과 일본 목련의 경우 0.8 mg/ml 이상의 농도에서 75%이상의 암세포 생육 억제활성을 나타내었다. 또한 오미자의 줄기 추출물도 1.0 mg/ml의 농도에서 93.9%의 높은 생육 억제율을 나타내었다. 전반적으로 목련과 나무추출물들은 위암 세포에 대하여 0.6 mg/ml이상의 농도에서 60%이상의 세포 생육 억제 활성을 나타내었다.

Table 4. Inhibition ratio of growth of AGS(Stomach adenocarcinoma, human) in adding the extracts from Magnoliaceae.

Samples			concentrate (mg/ml)				
			0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
<i>Magnolia kobus</i>	Wood	118W	35.9	45.6	67.2	75.2	84.8
	Bark	118B	42.0	59.3	84.4	88.4	95.3
	Leaf	118L	45.5	56.1	71.7	79.6	93.4
<i>Liriodendron tulipifera L.</i>	Wood	114W	61.1	65.3	72.3	75.4	85.3
	Bark	114B	56.3	68.2	75.2	86.3	95.1
	Leaf	114L	45.9	64.2	83.2	91.3	95.8
<i>Magnolia grandiflora</i>	Wood	150W	28.4	34.6	44.5	65.4	75.1
	Bark	150B	39.4	65.1	73.8	89.6	96.2
<i>Magnolia sieboldii</i>	Wood	198W	42.3	52.7	63.1	76.3	85.2
<i>Magnolia obovata</i> Thunb	Wood	209W	45.8	53.6	61.4	82.5	86.3
<i>Schizandra chinensis</i>	branch	43D	46.5	59.6	71.6	79.8	93.9

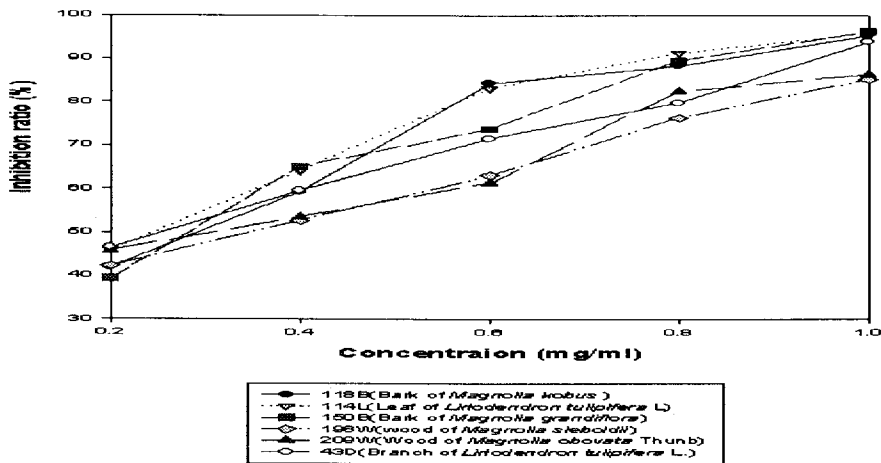


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of AGS (stomach adenocarcinoma, human) in adding the extracts from *Magnoliaceae*.

2) 정상세포에 대한 세포독성과 암세포에 대한 억제 및 selectivity 측정실험

가) 정상 세포에 대한 세포독성

Fig. 3부터 Fig. 5까지는 각 시료의 농도별로 인간 정상 폐세포인 HEL299에 대한 세포독성을 나타낸 것이다. 시료 중 가장 높은 농도인 1.0 g/L의 농도에서 30%미만의 세포독성을 나타내었다. 그 중에서 가장 낮은 세포 독성을 나타낸

sample은 1.0 g/L의 농도에서 백목련(*M. denudata*)의 목부(6W)와 수피(6B) 부분으로 10.6%와 13.8%의 세포 독성을 나타내었다. 반면 가장 높은 세포 독성을 나타낸 것은 남오미자(*K. japonica*) 줄기와 목련(*M. kobus*) 잎 부분으로 27.3%와 27.7%의 세포 독성을 나타내었다. 또한 모든 sample의 농도가 증가하면서 세포 독성이 높아지는 것을 관찰 할 수 있었다.

Fig. 6부터 Fig. 7까지는 각 sample의 농도별로 인간 정상 폐세포인 HEL299에 대한 세포독성을 나타낸 것이다. 모든 sample이 가장 높은 농도인 1.0 g/L의 농도에서 30%미만의 세포독성을 나타내었다.

sample중에서 가장 낮은 세포 독성을 나타낸 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 단리 물질인 SCF-1과 SCF-3으로 1.0 g/L의 농도에서 17%와 18%의 세포 독성을 나타내었다. 그에 반해 가장 높은 세포 독성을 나타낸 sample은 목련(*M. kobus*)수피 추출물의 단리 물질인 MKB-3과 MKB-4로 각각 31%와 26.6%의 세포 독성을 나타내었다. 또한 모든 sample의 농도가 증가하면서 세포 독성이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 가장 낮은 농도인 0.2 g/L의 농도에서 모든 sample이 15%미만의 낮은 독성을 나타내었다.

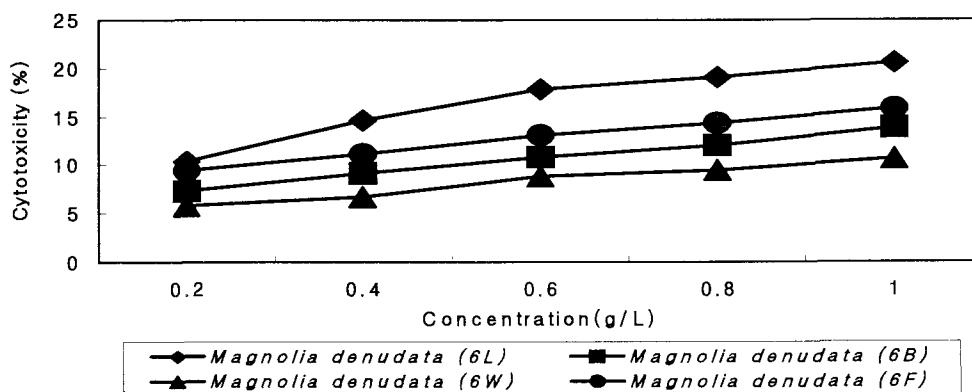


Fig. 3. Cytotoxicity of the crude extracts from *M. denudata* on the HEL299.

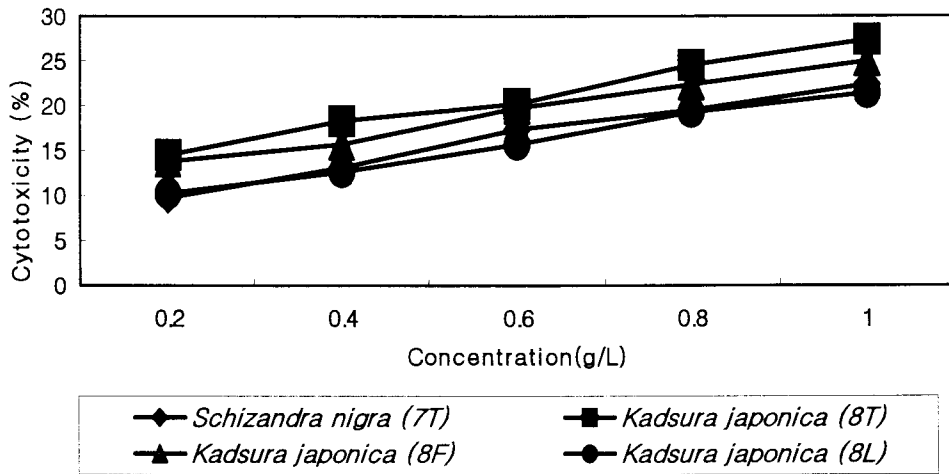


Fig. 4. Cytotoxicity of the crude extracts from *S. nigra* and *K. japonica* on the HEL299.

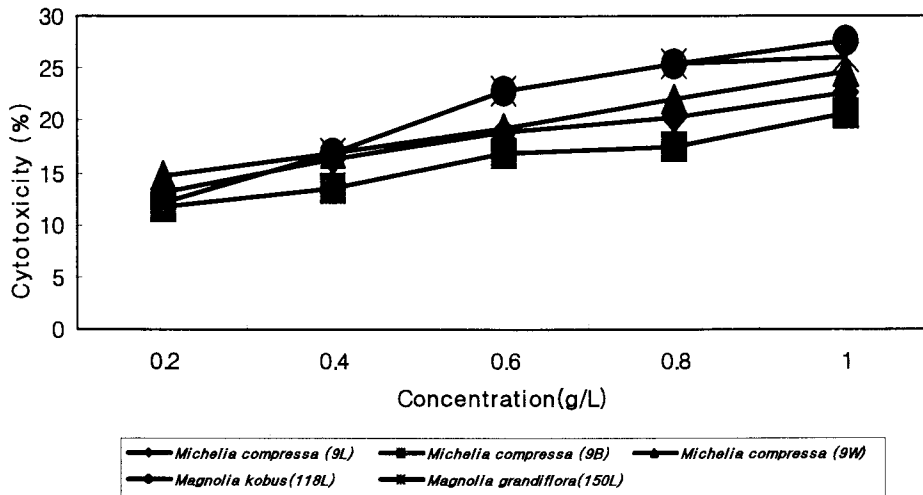


Fig. 5. Cytotoxicity of the crude extracts from *M. compressa*, *M. kobus* and *M. grandiflora* on the HEL299.

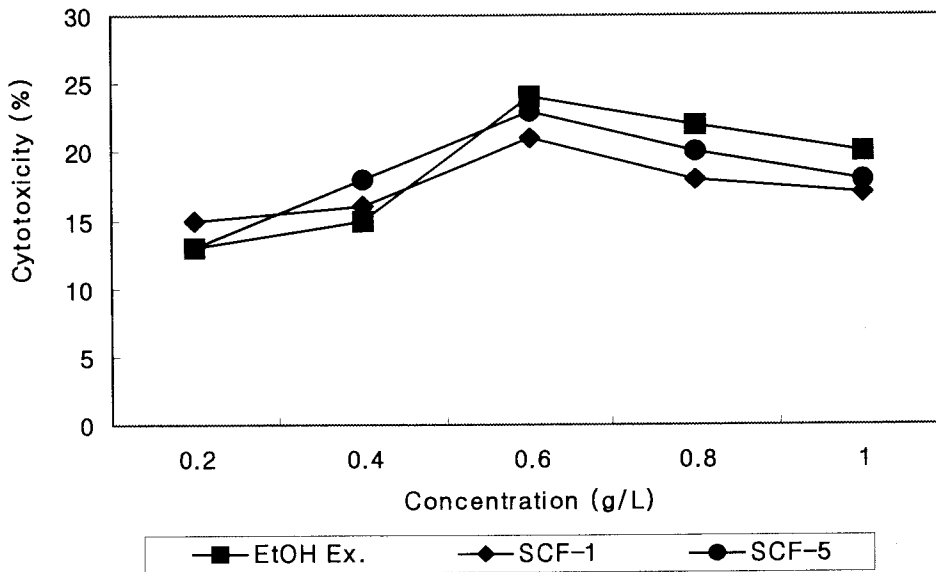


Fig. 6. Cytotoxicity of the extracts from *S. chinensis* on the HEL299.

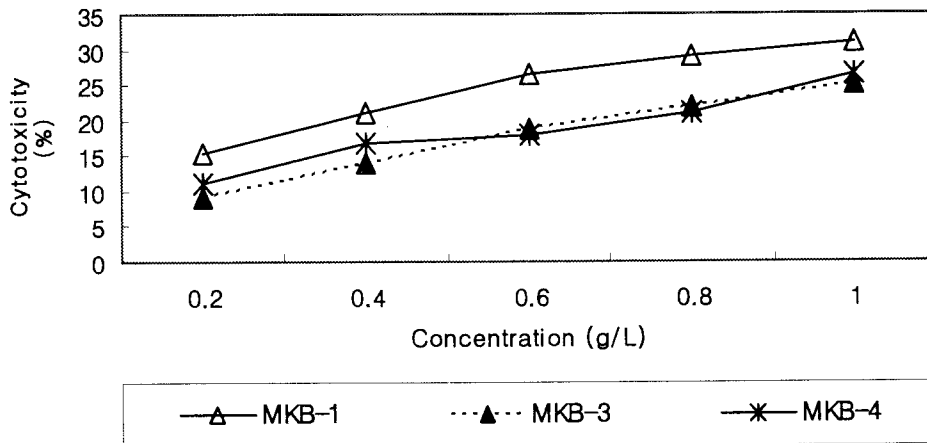


Fig. 7. Cytotoxicity of the extracts from *M. kobus* on the HEL299.

나) 암세포의 생육 억제 및 Selectivity

Fig. 8는 각 sample의 위암세포인 AGS에 대한 생육억제와 암세포에 대한 선택적 사멸도인 selectivity를 나타낸 것이다. 1.0g/L의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 sample은 남오미자(*K. japonica*) 잎과 초령목(*M. compressa*) 수피로

87.7%와 87.9%의 높은 억제율을 나타내었고, selectivity 또한 3.3으로 가장 높았다. 또한 초령목(*M. compressa*) 수피는 0.2 g/L의 농도에서도 74.5%의 높은 억제율을 나타내었다.

Fig. 9는 각 sample의 유방암 세포인 MCF-7에 대한 생육억제와 selectivity를 나타낸 것이다. 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 sample은 흑오미자(*S. nigra*) 줄기와 초령목(*M. compressa*) 수피로 86.2%와 86.4%의 억제율을 나타내었다. Selectivity에서는 1.0 g/L의 농도에서 3.2의 높은 선택적 사멸도를 보였다. 초령목(*M. compressa*) 수피는 0.2 g/L의 농도에서도 75.2%의 높은 억제율을 나타내었다.

Fig. 10은 폐암 세포인 A549에 대한 각 sample의 억제율과 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 1.0 g/L의 농도에서 높은 억제율은 나타낸 sample은 남오미자(*K. japonica*) 줄기와 열매·꽃으로 각 86.2%와 85.2%의 억제율을 보였다. 그렇지만 selectivity는 2.2와 2.4로 초령목(*M. compressa*) 수피와 흑오미자(*S. nigra*) 줄기의 3.1과 2.7에 비하여 낮은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 11은 간암세포인 Hep3B에 대한 각 시료의 억제율과 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 가장 높은 억제율을 나타낸 것은 초령목(*M. compressa*) 수피와 남오미자(*K. japonica*) 잎으로 각 92.%와 89.7%로 선택적 사멸도는 3.5와 3.2로 높은 활성을 나타내었다.

Fig. 12는 각 sample의 위암세포인 AGS에 대한 생육억제와 암세포에 대한 선택적 사멸도인 selectivity를 나타낸 것이다. 모든 sample 중 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 것은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물로 91.2%의 높은 억제율을 나타내었고, selectivity 또한 4.6으로 가장 높았다. 하지만 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 단리 물질인 SCF-1과 목련(*M. kobus* DC.) 수피 추출물의 단리 물질인 MKB-1은 최고 농도인 1.0 g/L의 농도에서 58%와 59.3%로 60%보다 낮은 억제율을 보였다.

Fig. 13는 각 sample의 폐암세포인 A549에 대한 생육억제와 selectivity를 나타낸 것이다. 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 sample은 오미자(*S. chinensis* Baillon) 열매 EtOH 추출물과 목련(*M. kobus*) 수피 추출물의 단리 물질인 MKB-3로 75.4%와 65.3%의 억제율을 나타내었다. Selectivity에서는 1.0 g/L의 농도에서 3.8과 2.6의 선택적 사멸도를 나타내어 목련 수피 추출물은 다른 sample들에 비해 낮은 선택적 사멸도를 보였다.

Fig. 14는 유방암 세포인 MCF-7에 대한 각 sample의 억제율과 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 억제율은 나타낸 sample은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물로 88.7%의 억제율을 보였다. 또한 selectivity도 4.4로 아주 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 15에서는 간암세포인 Hep3B에서의 각 sample 억제율과 선택적 사멸도를 나타내었다. 마찬가지로 1.0 g/L의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 sample 은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물로 85.1%로 선택적 사멸도는 4.3으로 아주 높은 활성을 나타내었다.

각 sample별로 암세포에 대한 억제율을 살펴보면 최고 농도인 1.0 g/L의 농도에서 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물은 위암세포인 AGS에 대한 억제율이 91.2%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 단리 물질인 SCF-1과 SCF-5는 간암세포인 Hep3B에 대한 억제율이 62.5%와 74.1%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고 다른 암세포들에 대하여서는 60%이하의 낮은 활성을 나타내었다.

목련(*M. kobus* DC.) 수피 추출물인 단리 물질들의 암세포에 대한 억제율을 살펴보면 1.0 g/L의 농도에서 유방암세포인 MCF-7에서 MKB-1과 MKB-3가 각각 62.3%와 69.1%의 억제율을 보였으며, MKB-4는 간암세포인 Hep3B에서 72.1%의 억제율을 나타내었다. 거의 모든 sample이 농도 의존적으로 농도가 높아질수록 억제율이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 선택적 사멸도에서는 모든 sample이 2.0이상의 높은 선택성을 나타내었다.

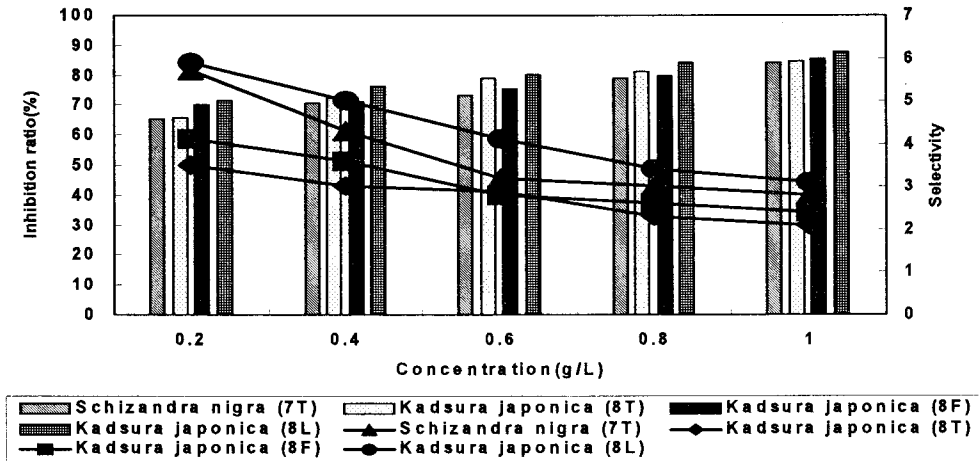


Fig. 8. Inhibition ratio of growth of AGS(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

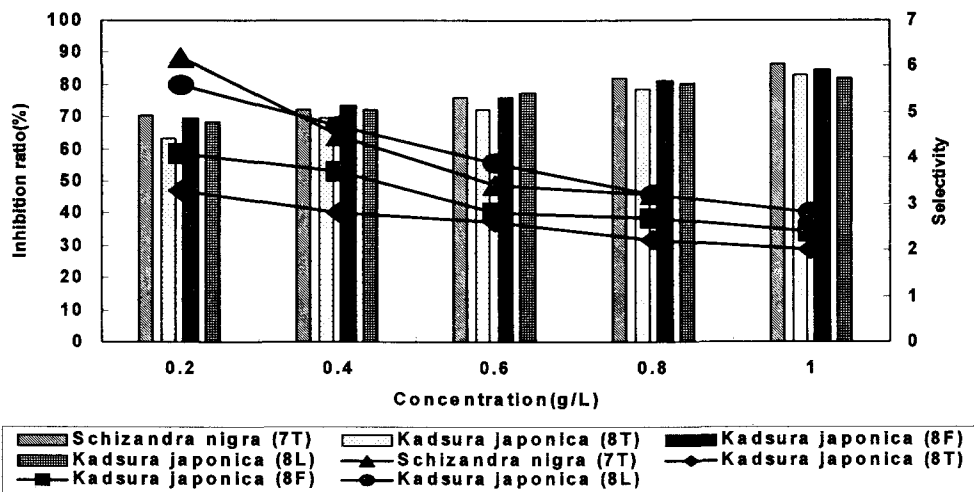


Fig. 9. Inhibition ratio of growth of MCF-7(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

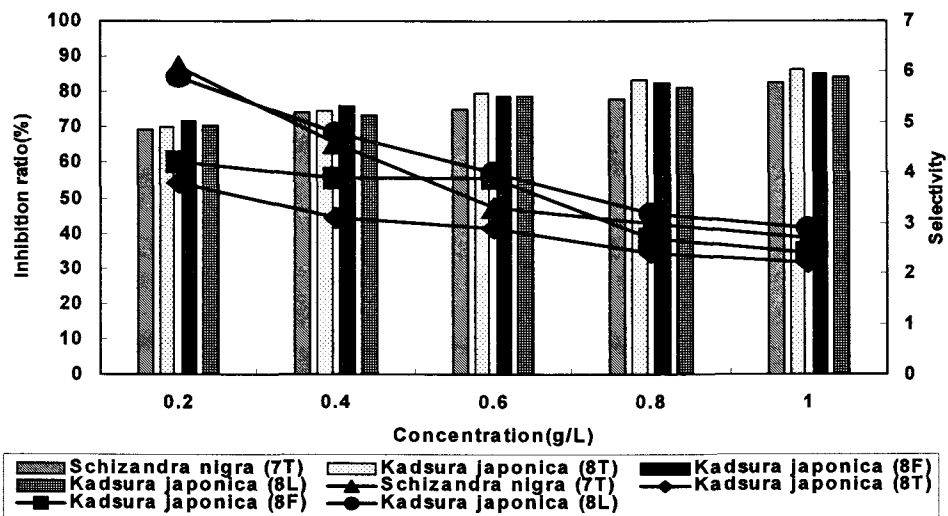


Fig. 10. Inhibition ratio of growth of A549(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

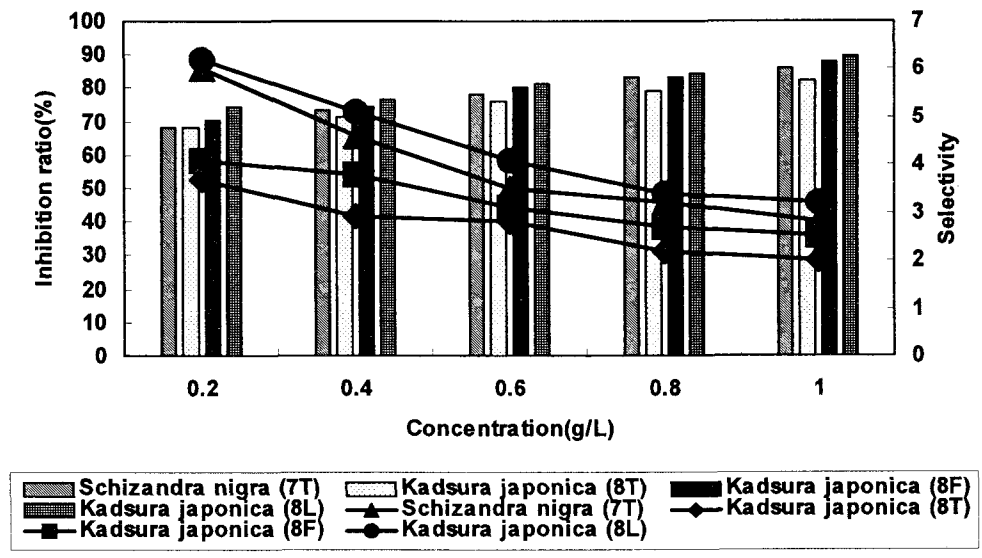


Fig. 11. Inhibition ratio of growth of Hep3B(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

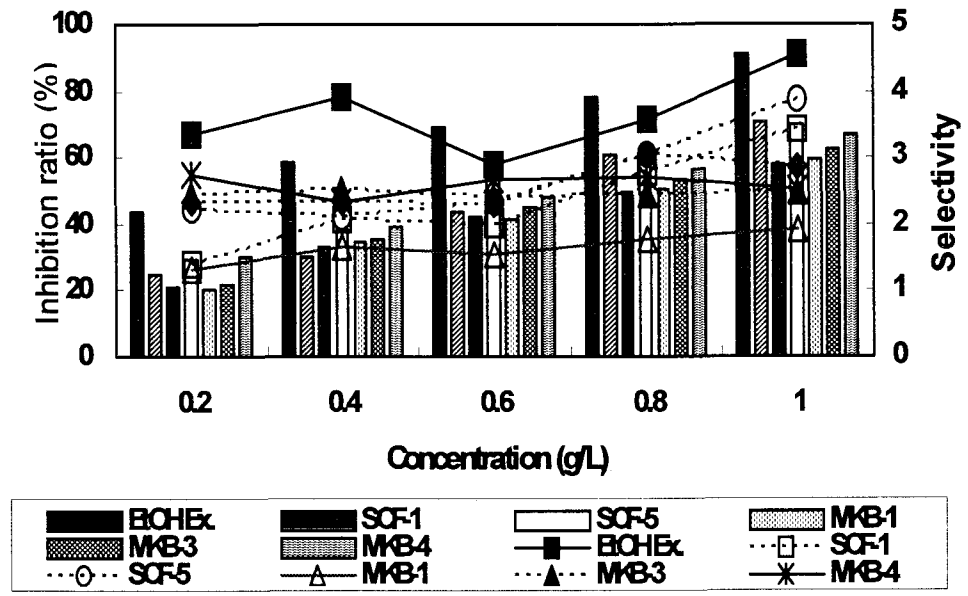


Fig. 12. Inhibition ratio of growth of AGS(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

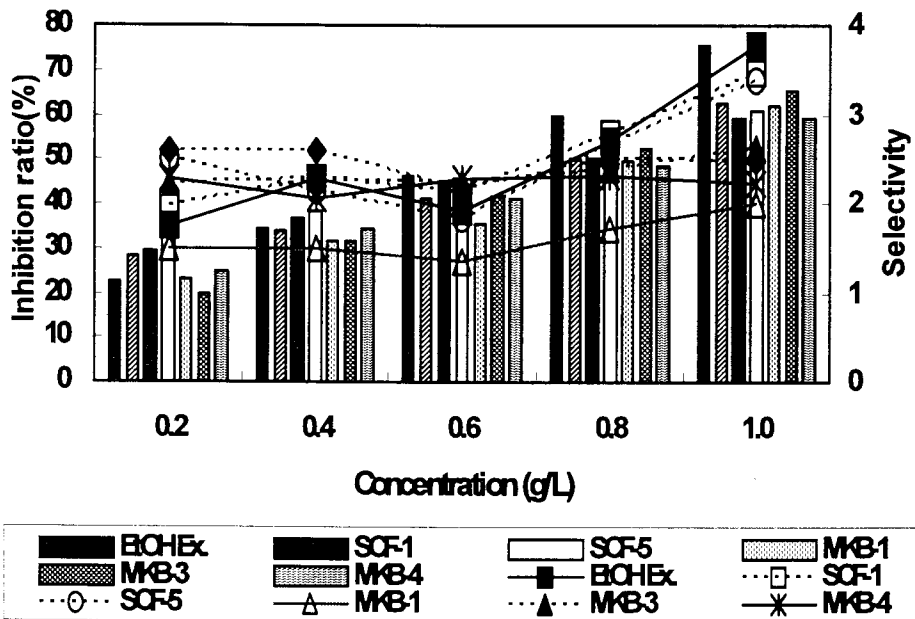


Fig. 13. Inhibition ratio of growth of A549(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

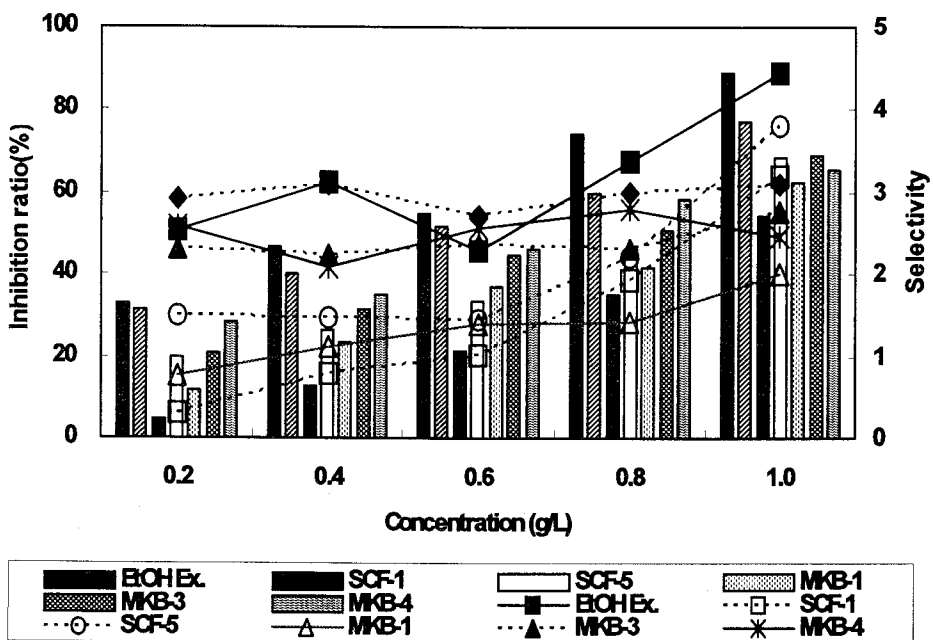


Fig. 14. Inhibition ratio of growth of MCF-7(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

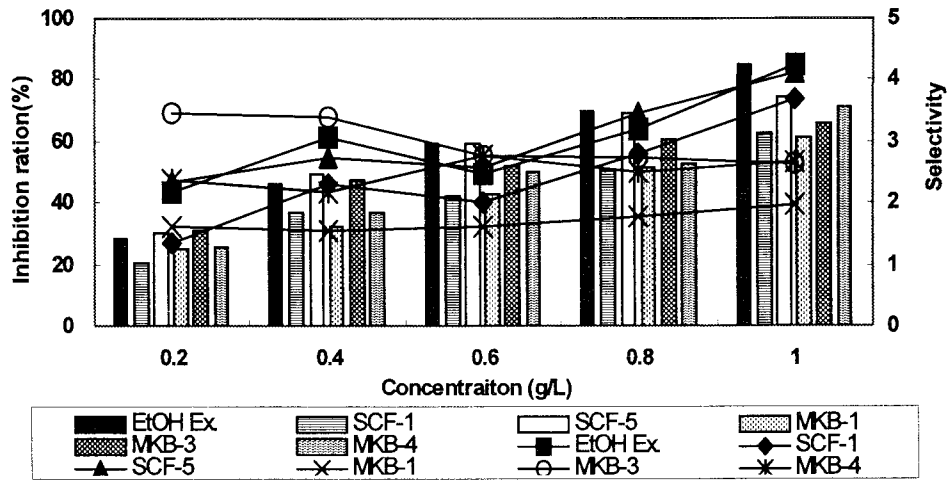


Fig. 15. Inhibition ratio of growth of Hep3B(bar chart) and selectivity(line) in adding the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

마. 면역세포 생육도 및 Cytokines (INterlukin-6와 Tumor Necrosis Factor- α) 분비

1) 면역세포 생육도

Fig. 16에서 Fig. 17까지는 인간 면역세포 중 하나인 B세포의 각 sample에 대한 생육도를 측정 한 것이다. 남오미자(*K. japonica*) 잎(8T), 초령목(*M. compressa*) 수피(9B) 그리고 흑오미자(*S. nigra*) 줄기(7T)가 각 1.31, 1.29, 1.26배의 B세포의 생육을 증진시키는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 남오미자(*K. japonica*) 잎은 0.2g/L의 농도에서도 1.20배의 생육이 증진되었다.

Fig. 18.부터 Fig. 20까지는 인간 면역 세포 중 하나인 T세포의 각 sample에 대한 생육도를 나타낸 것이다. 흑오미자(*S. nigra*) 줄기와 태산목(*M. grandiflora*) 잎 부분이 1.38배의 T세포의 생육을 증진 시켜 가장 좋은 활성을 나타내었다.

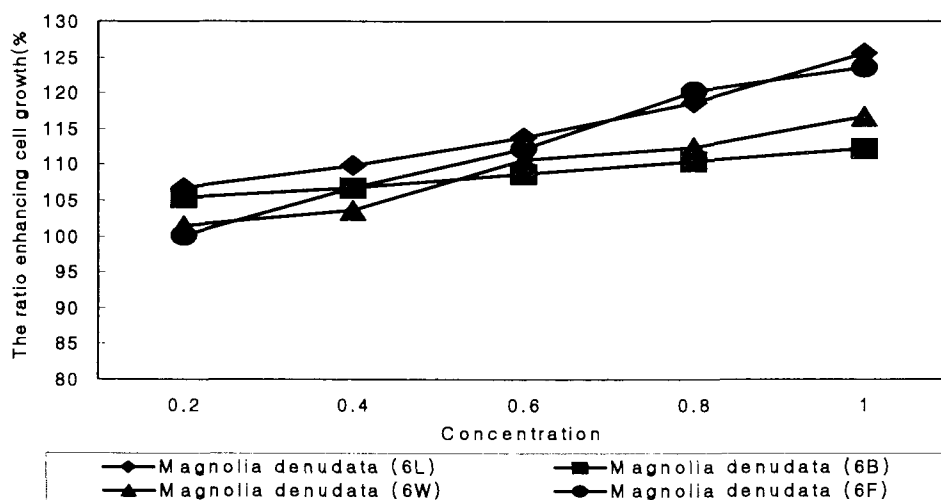


Fig. 16. The growth of human B cell(Raji) in adding the extracts from *M. denudata*.

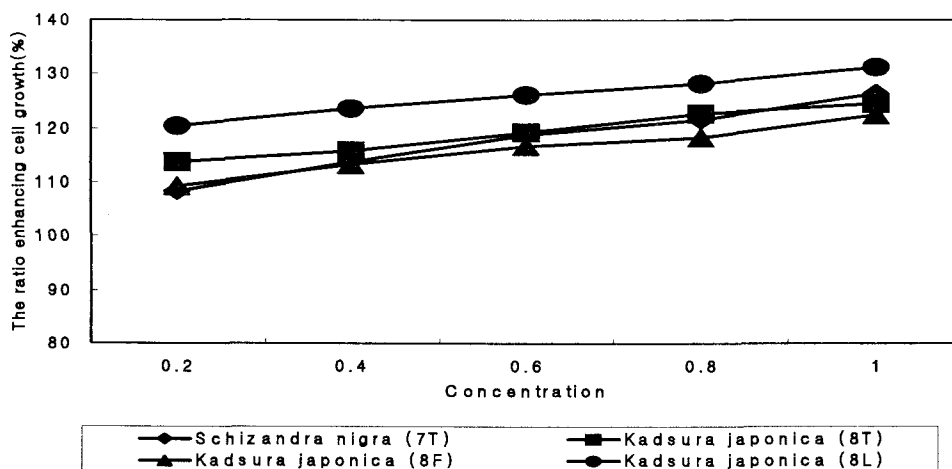


Fig. 17. The growth of human B cell(Raji) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

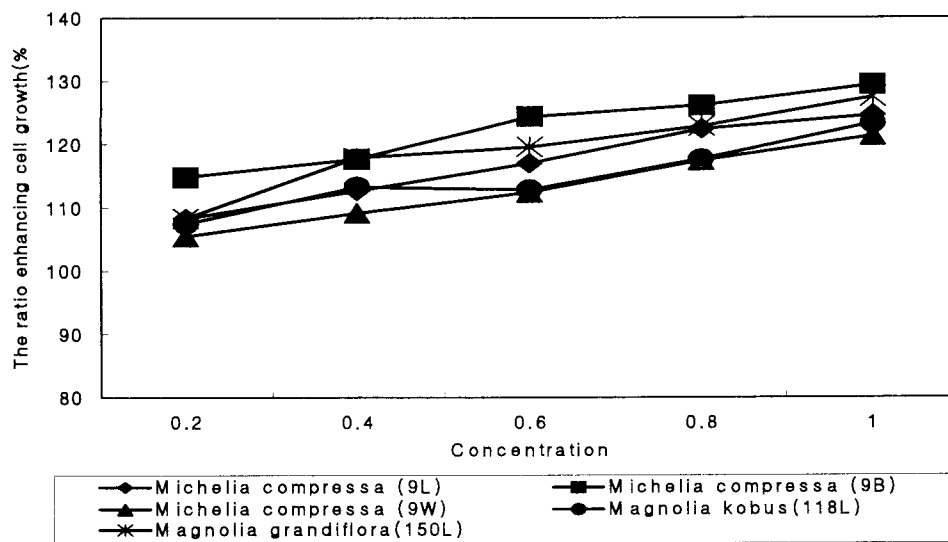


Fig. 18. The growth of human B cell(Raji) in adding the extracts from *M. compressa*, *M. kobus* and *M. grandiflora*.

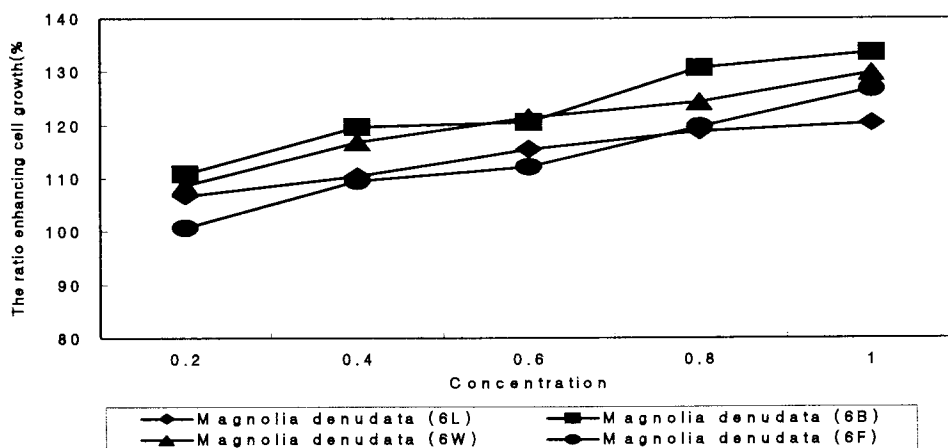


Fig. 19. The growth of human T cell(Jurkat) in adding the extracts from *M. denudata*.

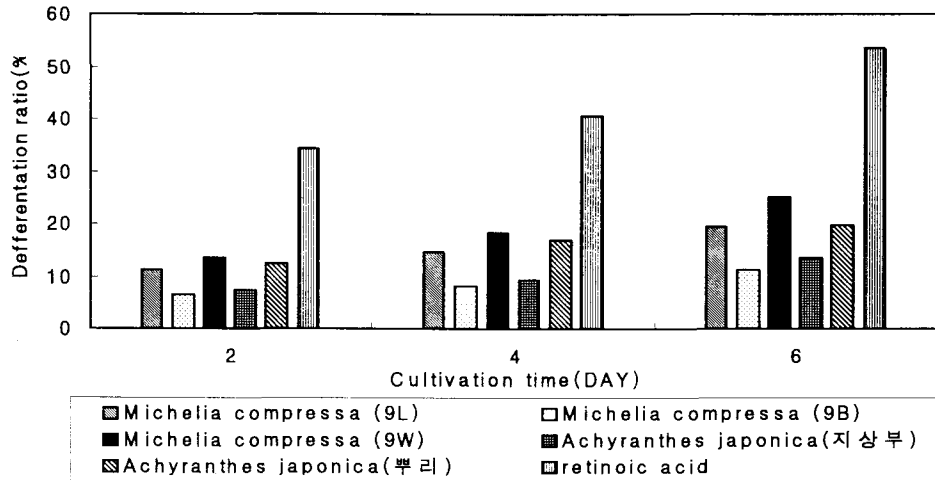


Fig. 20. The growth of human T cell(Jurkat) in adding the extracts from *S. nigra* and *K. japonica*.

2) Cytokines (Interlukin-6와 Tumor Necrosis Factor- α) 분비

인간 면역세포 중 하나인 B세포의 각 sample에 대한 생육도를 측정하여 나타낸 것이 Table 5이다. 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물은 0.2g/L의 농도에서도 1.16배의 생육이 증진되었다. 실험에 사용한 오미자 EtOH 추출물과 목련의 단리 물질인 MKB-3와 MKB-4는 모두 B세포의 생육을 농도 의존적으로 증진시켰다. 그 중에서 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-4가 1.0 g/L의 농도에서 1.29배로 가장 낮은 생육 활성을 보였다.

Fig. 21은 인간 면역 세포 중 하나인 T세포의 각 sample에 대한 생육도를 나타낸 것이다. 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물이 1.0 g/L의 농도에서 1.57배의 T세포의 생육을 증진 시켜 가장 좋은 활성을 나타내었다. 그리고 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-3와 MKB-4가 1.0 g/L의 농도에서 각각 1.34, 1.32배로 T세포의 생육이 증진되는 것을 관찰할 수 있었다.

오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 인간 면역 세포 중 하나인 B세포에 대한 생육 증진도를 살펴보면 1.0 g/L의 농도에서 1.38배의 증진도를 나타내었다. T세포에 대하여서는 1.0 g/L의 농도에서 1.57배의 농도를 나타내어, T세포에 대한 세포 생육 증진도가 B세포에 비하여 높았다.

목련(*M. kobus*)수피의 단리 물질인 MKB-3는 T세포에 대하여 0.2 g/L~1.0 g/L의 농도에서 1.15~1.34배의 비교적 낮은 활성을 나타내었으며, B세포에 대하여서는 0.2 g/L~1.0 g/L의 농도에서 1.12~1.30배의 활성을 나타내었어 비교적 높은

활성을 나타내었다.

목련(*M. kobus*)수피의 단리 물질인 MKB-4는 T세포에 대하여 저 농도인 0.2 g/L의 농도에서 1.13배의 낮은 활성을 나타낸 반면에 0.6 g/L~1.0 g/L의 농도에서 1.25~1.32배의 높은 활성을 나타내었다. B세포에 대하여서는 0.2 g/L~1.0 g/L 농도에서 1.17~1.30배의 높은 활성을 나타내었다.

Table 6와 Fig. 22은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물과 단리 물질인 SCF-1과 SCF-5 이 6일 동안 B세포와 T세포에 대하여 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물은 B세포에 대하여 배양 1일째부터 3일째까지는 IL-6는 3.1 pg/cell~7.1 pg/cell, TNF- α 는 3.3 pg/cell~6.9 pg/cell의 분비량을 보이다가 배양 4일째 IL-6와 TNF- α 의 분비량이 9.5 pg/cell, 9.7 pg/cell로 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. T세포에 대하여서는 배양 1일째부터 3일째까지는 IL-6는 3.5 pg/cell~7.0 pg/cell, TNF- α 는 2.6 pg/cell~6.7 pg/cell의 분비량을 보이다가 배양 4일째 IL-6와 TNF- α 의 분비량이 9.9 pg/cell, 8.9 pg/cell로 높은 증가량을 보였다. 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 단리 물질인 SCF-1과 SCF-5는 비슷한 분비량을 보였다. SCF-1은 배양 1일째부터 3일째까지의 B세포에 대한 IL-6의 분비량은 2.8 pg/cell~5.2 pg/cell의 분비량을 보이다가 배양 4일째 분비량이 7.1 pg/cell로 급격히 증가하였고, SCF-5는 배양 1일째부터 6일째까지 2.1 pg/cell~7.8 pg/cell로 분비량이 서서히 증가되었다. TNF- α 의 분비량은 SCF-1과 SCF-5가 비슷한 경향을 보였는데, 배양 1일째부터 배양 6일째까지 각각 2.0 pg/cell~7.5 pg/cell, 2.8 pg/cell~7.6 pg/cell로 서서히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. T세포에 대하여서도 마찬가지로 배양 1일째부터 배양 6일째까지 SCF-1과 SCF-5가 각각 2.1 pg/cell~8.0 pg/cell, 2.8~8.7 pg/cell로 분비량이 서서히 증가되었다.

Table. 5. The growth of human B cell(Raji) in adding the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

Sample	Dose(g/L)	cell growth (%)
<i>Schizandra chinensis</i> (EtOH Ex.)	0.2	116.9
	0.4	124.1
	0.6	129.4
	0.8	134.1
	1.0	138.4
<i>Magnolia kobus</i> (MKB-3)	0.2	112
	0.4	118.3
	0.6	120
	0.8	123.8
	1.0	129.5
<i>Magnolia kobus</i> (MKB-4)	0.2	116.6
	0.4	119
	0.6	121.2
	0.8	125.7
	1.0	129.4

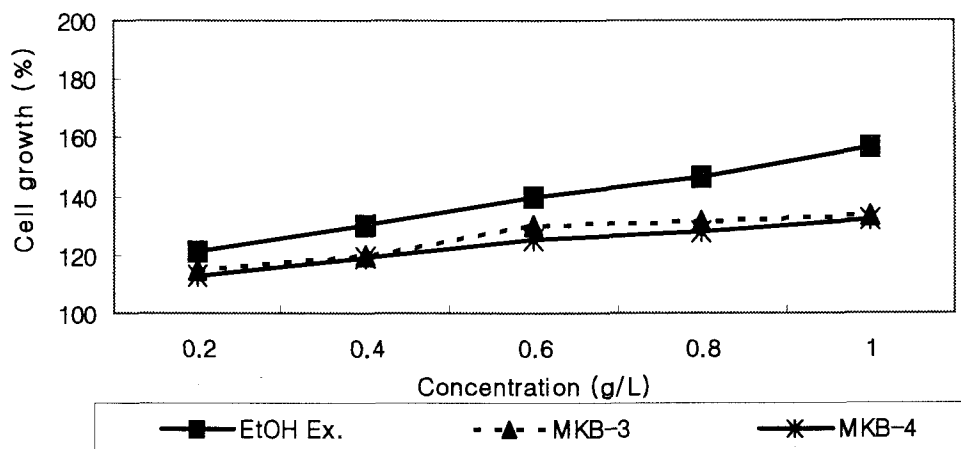


Fig. 21. The growth of human T cell(Jurkat) in adding the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

Table 6. The kinetics of secretion of IL-6 and TNF- α from B cell (Raji) cultured in the extracts from the *S. chinensis* (1.0g/L).

Sample	time (day)	Cell line	
		B cel l(pg/mL)	
		IL-6	TNF- α
<i>Schizandra chinensis</i> (EtOH Ex.)	1	3.1	3.3
	2	4.8	4.6
	3	7.5	6.9
	4	9.5	9.7
	5	11.3	10.9
	6	12.7	12.2
<i>Schizandra chinensis</i> (SCF-1)	1	2.8	2
	2	4	3.9
	3	5.2	5
	4	7.1	6.7
	5	7.7	7.1
	6	8.1	7.5
<i>Schizandra chinensis</i> (SCF-5)	1	2.1	2.8
	2	3.6	4.3
	3	4.9	5.3
	4	5.8	6
	5	6.6	6.8
	6	7.8	7.6

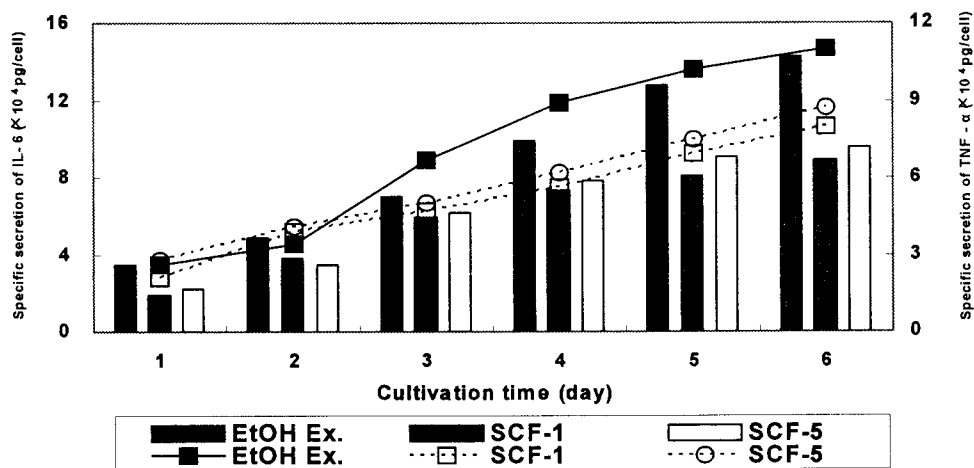


Fig. 22. The kinetic of secretion of IL-6 and TNF- α from T cell (Jurkat) cultured in the extracts from the *S. chinensis* (1.0g/L).

바. Microphysiometer를 이용한 세포의 면역 활성 측정

Fig. 23는 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물과 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-3를 T세포(Jurkat)로 Microphysiometer를 이용하여 측정한 결과로, MKB-3는 시료를 투여한 후, 120분까지 세포의 대사활성도가 점차적으로 증가하다가 120분 이후에는 세포의 대사활성도가 변화 없이 거의 일정한 수치를 기록하였다. 반면 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물은 시료를 투여한 후, 20분이 지나자 세포의 대사활성도가 급격히 증가하였고, 시료를 투여한지 160분이 지나자 오미자 열매 EtOH 추출물은 그 이후도 서서히 증가하는 것을 나타내었다.

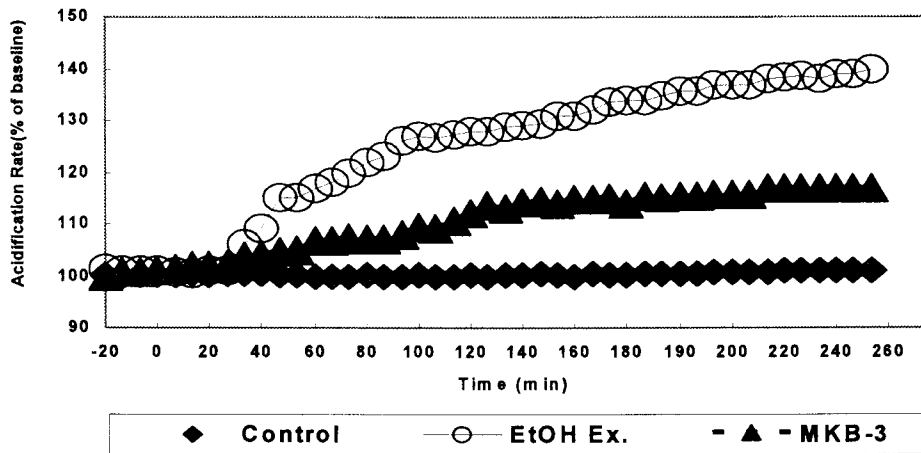


Fig. 23. The results of measuring cellular activity of T cells(Jurkat) by adding the extracts from *S. chinensis* and *M. kobus* for 4 hours using a microphysiometer.

사. 신경세포 생육 촉진 및 신경세포활성화

1)신경세포 생육증진

목련과 수중의 추출물의 pheochromocytoma (PC12)세포의 생육증진 결과는 Fig. 24~27과 같다. Fig. 24은 목련의 신경세포의 생육 증진 결과로서 수피추출물이 1mg/ml의 농도에서 10×10^4 cells/ml이상의 세포생육을 나타냄으로서, 목부, 잎 추출물에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 목백합의 추출물인 Fig 25는 추출물들이 대부분 목련에 비하여 높은 활성을 나타내었으며, 1.0 mg/ml의 농도에서 PC12세포의 수가 10×10^4 cells/ml이상까지 증가하였다. Fig 26는 태산목 추출물의 신경세포 생육증진 결과로서 수피 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 8×10^4 cells/ml의 생육도를 나타내었다. Fig. 27은 함박꽃나무 목부(198), 일본목련의 목부(209),

오미자의 줄기(43D) 추출물의 신경세포 생육증진 결과로서 함박꽃나무는 1 mg/ml의 농도에서 10×10^4 cells/ml의 세포 생육도를 나타내었다. 신경세포생육증진 실험에서도 목련과 나무 추출물들 중에서 수피 추출물들의 활성이 목부 및 잎 추출물에 비하여 높은 활성을 나타내었으며, 특히 목련의 수피 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 11×10^4 cells/ml의 가장 높은 세포 생육 증진 활성을 나타내었다.

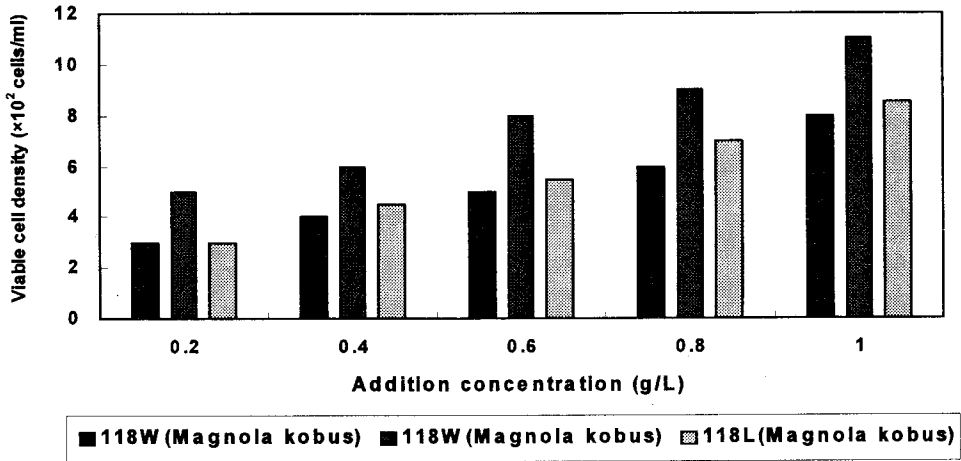


Fig. 24. The growth of viable cell density of PC 12 nerve cells in adding the extracts from *M. kobus*.

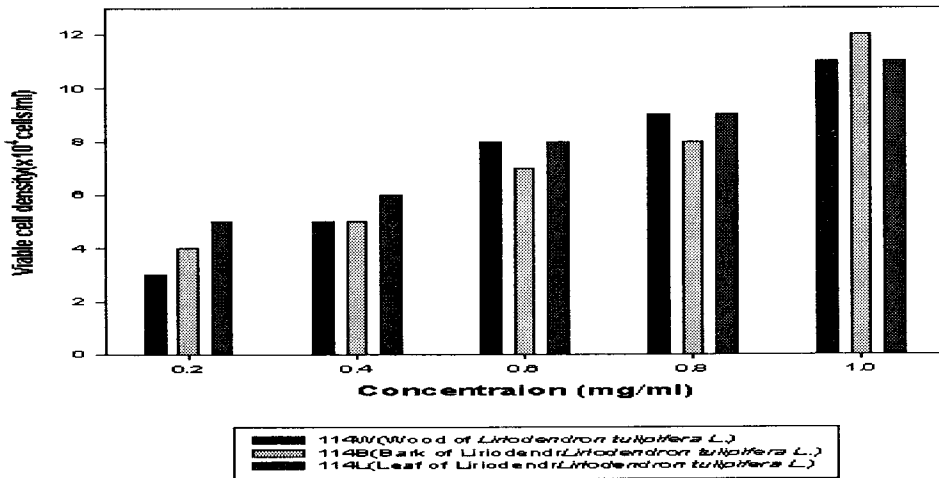


Fig. 25. The growth of viable cell density of PC 12 nerve cells in adding the extracts from *L. tulipifera L.*

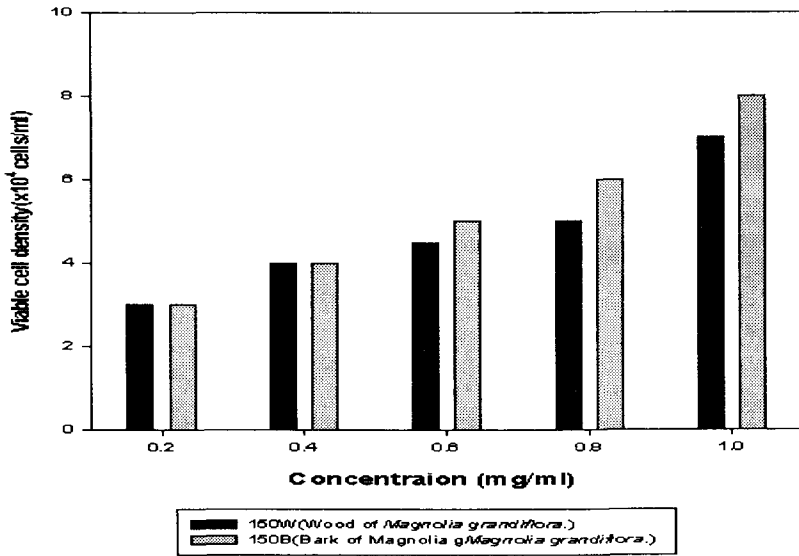


Fig. 26. The growth of viable cell density; of PC 12 nerve cells in adding the extracts from *M. grand iflora*.

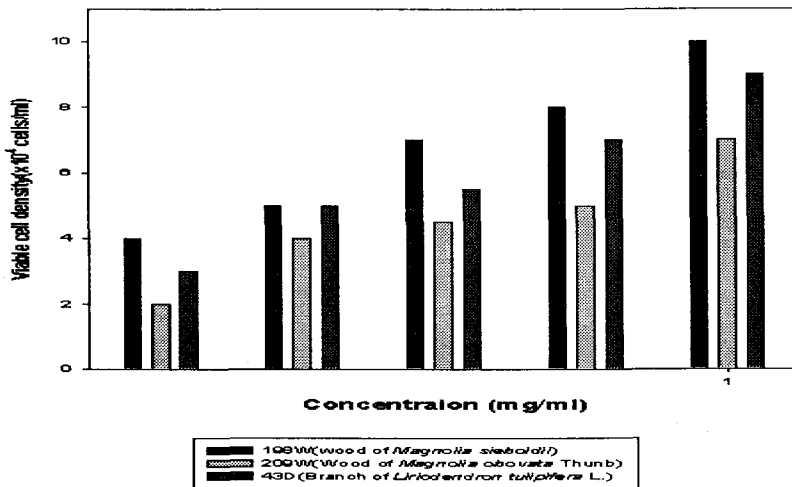


Fig. 27. The growth of viable cell density of PC 12 nerve cells in adding the extracts from *Magnoliaceae*.

2) 신경세포 생육 촉진 및 신경세포활성화

Fig. 28과 Fig. 29은 신경세포의 신경돌기 연장 실험과 viable cell density 측정 실험 및 신경돌기가 형성되는 세포수 측정 실험의 결과를 나타낸 것이다.

신경돌기 연장 실험에서는 모든 sample이 배양 4일째 가장 높은 활성을 갖는

것을 알 수 있었다. 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물이 249.6 μm 로 가장 길게 신경세포(pheochromocytoma, PC12)의 신경돌기를 연장시키는 높은 활성을 나타내었다. 반면 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-3와 MKB-4는 각 199.3 μm , 202.3 μm 의 신경돌기가 형성되어 비교적 낮은 활성을 나타내었다.

Viable cell density 측정 실험에서는 배양 4일째까지 점차로 증가하다가 배양 5일째부터 세포수가 줄어들었다. 가장 좋은 활성을 나타낸 sample은 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon) 열매 EtOH 추출물로 17×10^4 cells/mL의 세포 생육 증진 활성을 나타내었다. 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 단리 물질인 SCF-5와 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-4는 11×10^4 cells/mL의 세포 생육 증진 활성을 나타내었다.

신경돌기 형성 실험에서는 대체로 배양 4일째 가장 높은 활성을 나타내었다가 배양 5일째 활성이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 목련(*M. kobus*) 수피의 단리 물질인 MKB-3와 MKB-4는 배양 5일째 가장 높은 활성을 나타내었다. 가장 좋은 활성을 나타낸 sample은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물로 배양 4일째 PC-12세포에서 신경돌기가 형성되는 것을 80.2%로 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 낮은 활성을 나타낸 sample은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 단리 물질인 SCF-5로 세포에서 61.2%의 신경돌기가 형성되어 낮은 활성을 나타내었다.

Fig. 30.는 각 sample중에서 가장 활성이 높은 sample인 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물의 배양 4일째 0.4 g/L의 농도에서 찍은 사진이다.

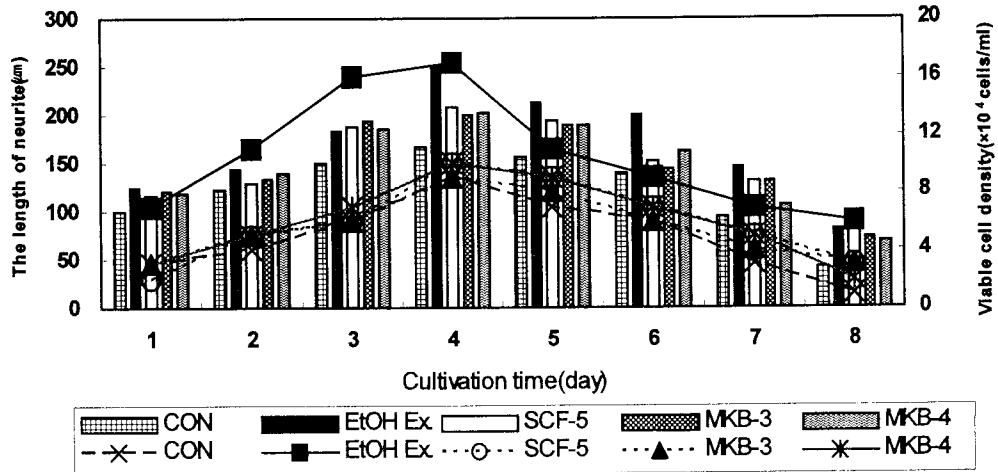


Fig. 28. The growth of viable cell density(scatter line) and neurite's extension(bar chart) of PC-12 nerve cell in adding *S. chinensis* and *M. kobus* or without any samples. (1.0 g/L)

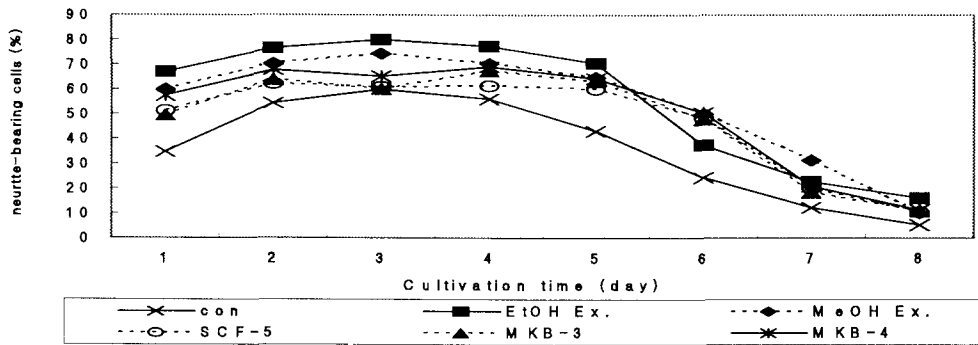


Fig. 29. Comparison of number of neurite-bearing cells in adding *S. chinensis* and *M. kobus* or without any samples.(1.0 g/L)

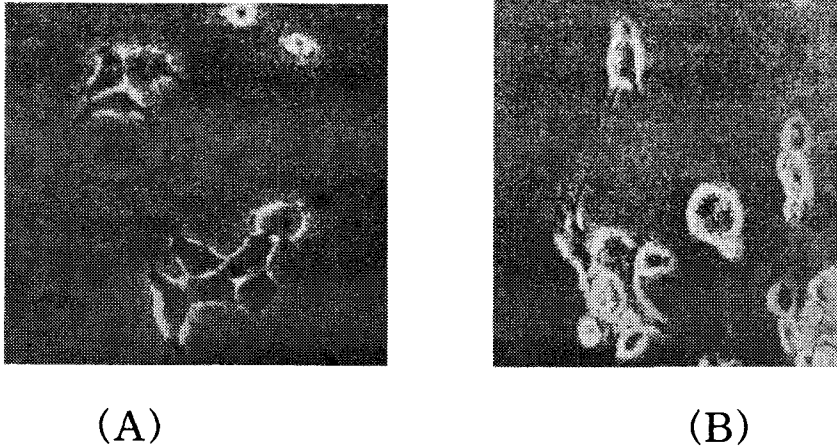


Fig. 30. The morphology of PC12 cells cultivation in without the control (A) or adding of 0.4 g/L of *S. chinensis* EtOH Ex.(B) after 4days of cultivation.

아. 세포 분화도

1) HL-60세포의 분화도

Fig. 31는 HL-60세포(4×10^4 cell/ml)에 각 sample를 1.0 g/L의 농도로 배양 5일 동안에 대한 분화도 측정 실험의 결과이다. sample 중에서 가장 높은 활성을 나타낸 sample은 오미자(*S. chinensis*) 열매 EtOH 추출물로 1.66배로 증가하였다. 나머지 sample들은 1.44배미만의 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 보아 오미자 열매 추출물이 단리 물질들보다 분화유도 물질의 양이 더 많을 것으로 사료

되어지고, 물질 분리를 통해 분화유도 물질의 손실을 가져와 족제비싸리와 오미자 열매 추출물들이 분화 유도 물질을 더 많이 포함하고 있어 세포의 신호전달 체계가 신속하게 이루어질 수 있도록 한 것으로 사료되어진다.

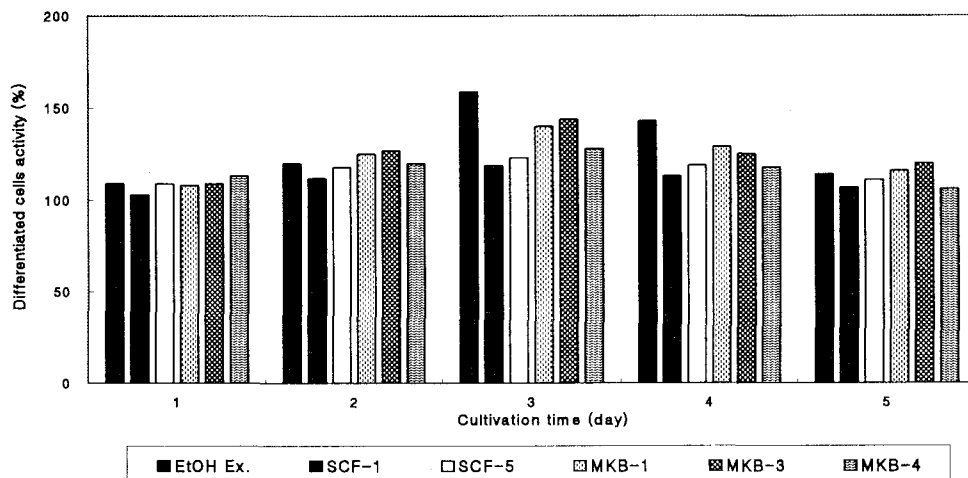


Fig. 31. Comparison of the differentiation of HL-60 cells by adding (1.0 g/L) of the extracts from *S. chinensis*, *M. kobus*.

자 활성물질의 시제품 생산

1. 백목련의 분말화

목련의 분말은 제품화시킨 5 가지 제품 중 2번째로 선호도가 좋은 제품으로 30명을 대로 한 관능검사의 결과를 나타내었다. 주로 단맛의 선호도가 가장 좋은 것으로 나타났으며 이러한 당도를 가진 백목련의 분말을 단독으로 제품화시키는 것보다는 다른 식품이나 분말과 혼합하여 제품화를 한다면 좋을 것이라는 결론을 얻었다.

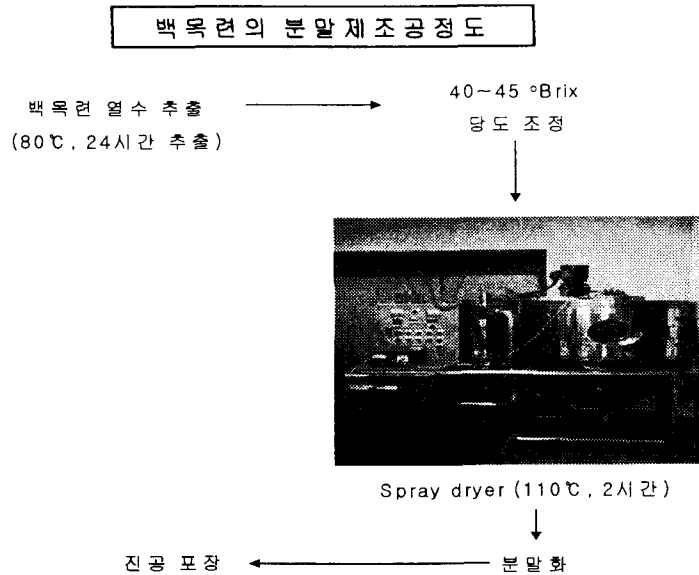


Fig. 32. 백목련의 분말화 공정도



Fig. 33. 복분자의 추출액을 분무 건조하여 만들어진 분말 시제품

2. 목련 농축액을 이용한 액상 기능성 파우치의 제조

목련을 이용한 액상 기능성 파우치 제품은 시제품 중에 가장 기호도가 좋은 제품으로 30명을 대상으로 한 관능검사에서 제일 좋은 점수를 받은 제품이다. 목련 농축액의 특징적인 단맛에 감미제인 올리고당을 첨가하여 만든 이 목련 농축액을 이용한 파우치는 감압과 열의 가열이 없는 것이 특징으로 목련이 추출 될 때의 모든 기능성성분들이 파괴가 되지 않고 그대로 농축액 중에 존재하는 것이 큰 특징이며, 특히 관능검사에서 가장 좋은 점수를 받을 수 있었던 점은 부담 없이 음료처럼 마실 수 있다는 장점 때문인 것으로 생각된다. 이러한 장점을 이용하여 목련의 기능성을 갖는 음료의 개발을 시도한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 본다.

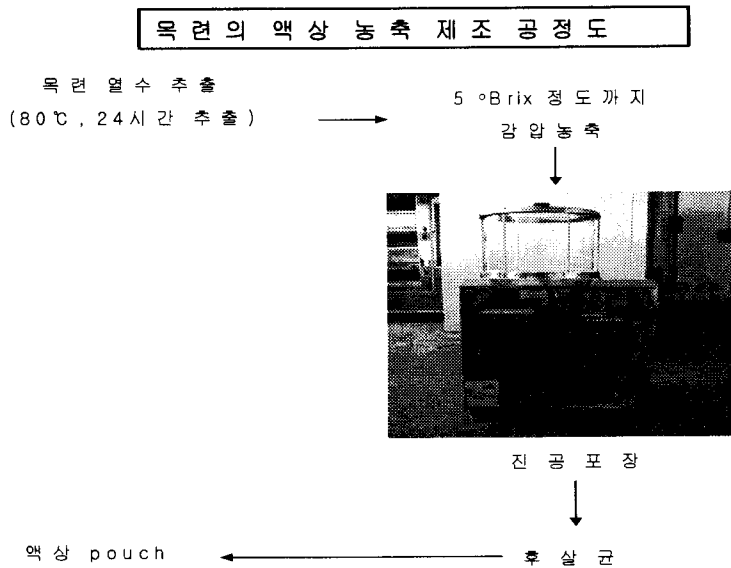


Fig. 34. 목련을 이용한 액상의 기능성 pouch제조

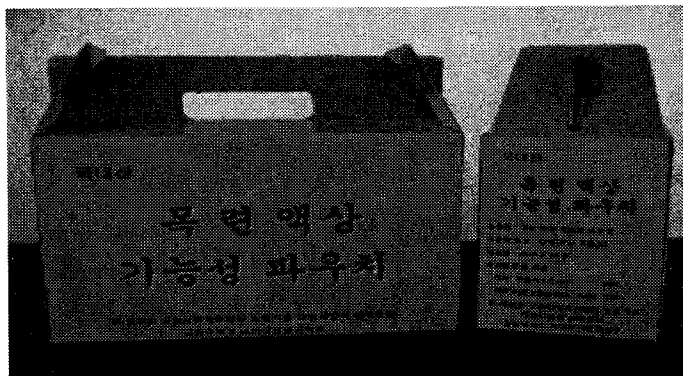


Fig. 35. 목련 농축액을 이용하여 제조된 액상 기능성 파우치의 모습

(3) 초령목 농축액을 이용한 환의 제조

제품 중에 관능검사를 통해서 가장 선호도가 낮은 제품으로 선택된 초령목 환은 그 선호도가 낮은 반면 가장 기능성이 뛰어날 것으로 판단된다. 선호도가 낮게 나온 것은 관능검사에 참여한 인원들의 평균연령이 대학생 기준으로 젊은 연령층이기 때문인 것으로 판단되며 맛을 느낄 수 있는 다른 식품과는 다르게 기능성식품, 즉 약처럼 먹어야 된다는 선입견 때문에 이런 결과가 나온 것으로 보인다. 다만 초령목 환의 어두운 색깔과 환이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 없애 버릴 수 있는 제품화 방법을 만든다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다. 초령목 환은 어두운 색과 특유의 질감이 단점으로 보인다.

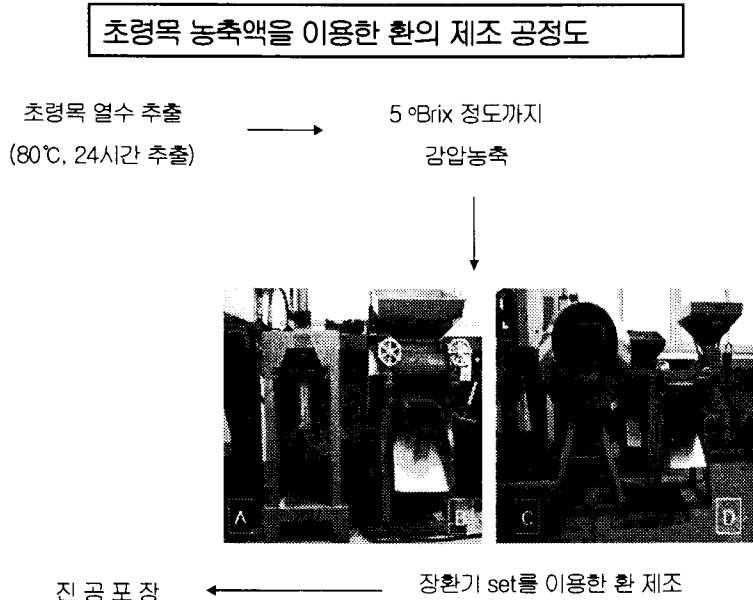


Fig. 36. 초령목 농축액을 이용한 환의 제조공정 (A)장환기, (B)분쇄기, (C)정환기, (D)제환기

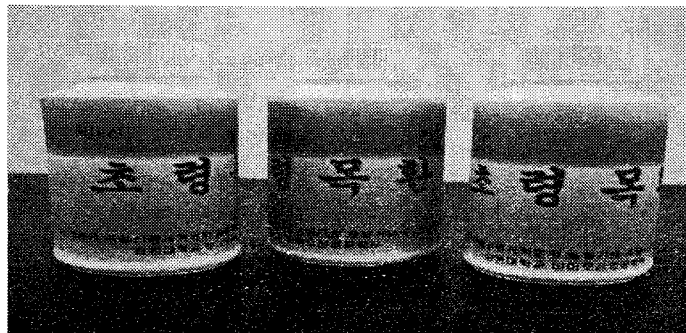


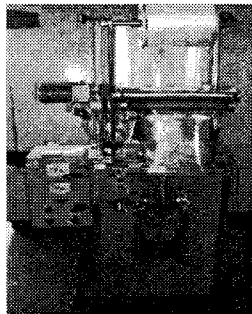
Fig. 37. 초령목 농축액을 이용해서 제조된 환의 모습

4. 오미자를 이용한 과립차제조

제품 중에 관능검사를 통해서 선호도가 비교적 높은 제품으로 선택된 오미자 과립차는 그 선호도가 높은 만큼 기능성 또한 뛰어날 것으로 판단된다. 선호도가 높게 나온 것은 음용이 쉽고 간단히 맛을 느낄 수 있어 이런 결과가 나온 것으로 보인다. 다른 환이나 파우치등과 같이 음용할 수 있다는 것이 가장 큰 장점이라고 할 수 있으며 이를 통한 기능성의 synergy효과를 가져올 것으로 사료되어 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다.

오미자를 이용한 과립차 제조 공정도

오미자 열수 추출 (80℃, 24시간 추출) → 5 °Brix 정도까지 감압농축 → 농축액과 분말을 이용한 반죽



과립상면포장기를 이용한 진공포장



과립기를 이용한 과립제조

Fig. 38. 오미자 농축액을 이용한 과립차의 제조공정도

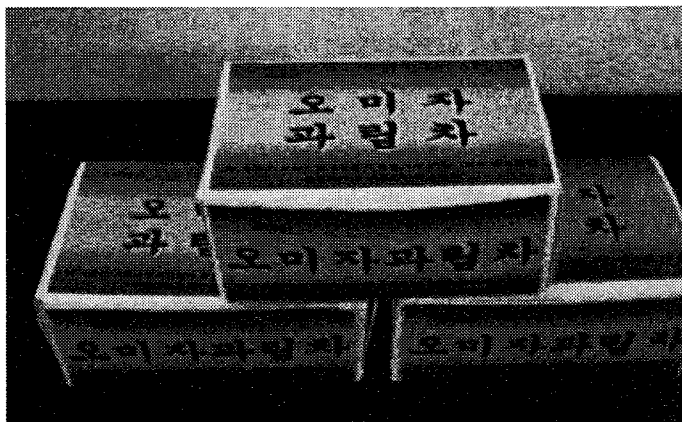


Fig. 39. 오미자 농축액을 이용해서 제조된 과립차의 모습

5. 흑오미자를 이용한 Tablet 제조

흑오미자를 이용하여 만든 제품으로 관능검사를 통해서 3번째의 선호도가 매겨진 제품으로 선택된 흑오미자 Tablet은 그 선호도가 비교적 높았다. 게다가 초령 목 환 제품과 더불어 가장 기능성이 뛰어날 것으로 판단된다. 선호도가 비교적 낮게 나온 것은 환 제품에서와 같이 관능검사에 참여한 인원들의 평균연령이 대학생 기준으로 젊은 연령층이기 때문인 것으로 판단되며 맛을 느낄 수 있는 다른 식품과는 다르게 기능성식품, 즉 약처럼 먹어야 된다는 선입견 때문에 이런 결과가 나온 것으로 보인다. 다만 흑오미자 Tablet의 알록달록한 색깔과 Tablet이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 없애버릴 수 있는 제품화 방법을 만든다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다. 흑오미자 Tablet은 알록달록한 색과 특유의 질감이 단점으로 보인다.

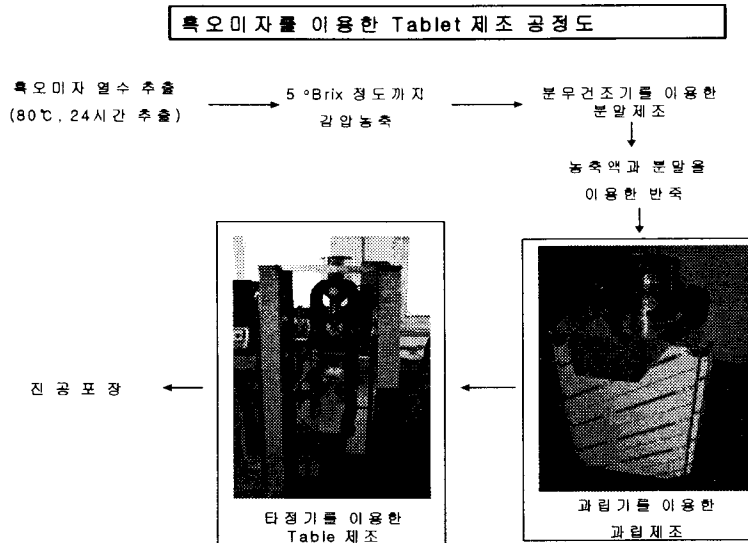


Fig. 40. 흑오미자 Tablet 제조공정

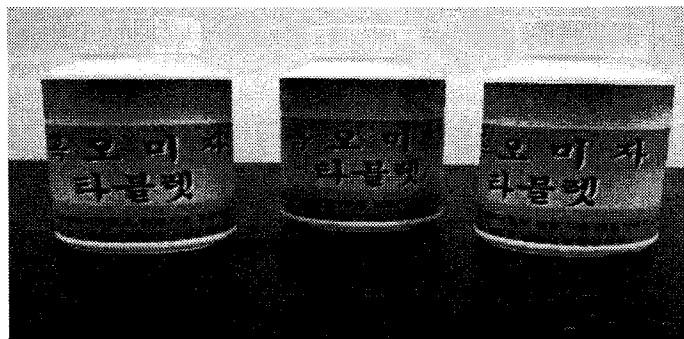


Fig. 41. 흑오미자를 이용하여 제조한 Tablet의 모습

Table. 7. 생약재를 이용한 5가지 제품의 관능검사 결과

종 류	선 호 도			합계(명)
	상	중	하	
초령목 환	*10±0.3	14±0.4	6±0.2	30
목련 파우치	15±0.5	11±0.3	4±0.1	30
흑오미자 Tablet	11±0.3	13±0.4	6±0.2	30
백목련 건조 분말	10±0.3	15±0.5	5±0.1	30
오미자 과립차	12±0.4	14±0.3	4±0.2	30

* : Data represents mean±S.E. of three independent experiment

제3절 의약활성 물질탐색(제2세부, 충북대 약학대학)

1. 서 론

국내에 자생하고 있는 목련과 수목에 대한 기능성 생리활성 물질을 탐색하여 이러한 물질의 구조를 구명하고 의약품, 농약, 염료로 물질의 상품화를 실현하여 고부가가치를 창출하고자 한다. 또한 유용물질을 생산하는 수목을 급속증식하고 아울러 첨단기술을 이용한 물질의 단기 대량생산을 도모함으로써 이 분야에 대한 국가경쟁력 향상을 목표로 하고 있다.

가. 기술개발 최종 목표

- 목련과 수목으로부터 생리활성에 근거한 퇴행성 중추신경질환, 당뇨병, 항암, 고지혈증 등에서의 의약품과 살충, 살비, 살균에 유효한 농약 등에 대한 database 구축으로 기능별 유효 수목의 활용체계를 확립하고자 하였음.

나. 기술개발 내용

- 국내 수종의 기능성 물질 탐색 및 작용기전의 연구
- 개발물질을 이용한 퇴행성 중추신경계 질환, 당뇨, 항암, 고지혈증 등 성인병 치료 물질 개발
- 천연물 농약개발을 위한 살충, 살비, 살균효과 검정 및 염료 개발

2. 재료 및 방법

- 목련과 수목으로부터 성인병 치료물질을 검색하여 의약품, 기능성 식품으로 개발하기 위한 주요 연구개발 방법은 다음과 같다.

1) 퇴행성 중추신경계 질환

- 가) 목련과 수목으로부터 dopamine 생합성 증가 작용에 대한 작용기전 및 그의 응용[16-19]
- Dopamine 함량 증가 작용 및 작용기전에 대한 연구: Dopamine 함량 및 분비(secretion), 생합성 효소 TH 및 AADC 활성, Time-course, Ca⁺⁺ 농도, THmRNA 함량.
 - PC12 cells 중의 신경독성/신경독성 유도작용(L-DOPA-induced apoptosis)에 대한 영향: LDH 활성, MTT 실험, TUNEL 방법, Dopamine 함량, Flow

cytometry 분석법.

- Catecholamine 생합성 효소(TH, AADC, DBH) 및 대사 효소(MAO) 활성.
- 나) 목련과 수목으로부터 neurite outgrowth 유도작용에 대한 작용기전 및 그의 응용[5-11]
- Neurite outgrowth 유도작용: neurite outgrowth의 측정, 세포독성/apoptosis의 검토, DNA 단편화법, TUNEL법, LDH 활성, c-AMP와의 상관관계 고찰, PKA/PKC/Ca²⁺ 농도 측정, tPA 유리 검토, NGF 수용체(TrkA, p75^{NGFR})와의 친화성 검토, NGF 수용체(TrkA, p75^{NGFR})의 인산화(autophosphorylation) 반응 검토 등을 진행함.
 - PC12 cells 중의 neurite outgrowth가 dopamine의 생합성에 미치는 영향: dopamine 함량/TH/AADC 활성 변화 검토.
- 다) BBB transport에 대한 연구
- 목련과 생리활성 물질의 뇌중으로의 transport(uptake)
 - 생리활성 물질의 뇌중으로의 통과에 대한 약물 동태학적 연구.

2) 당뇨병

- 1) α -Glucosidase inhibitor의 탐색: 엑스 및 분획에 대하여 α -glucosidase 저해 효능을 일차 검색한 후, 효소 저해 효능이 있는 시료에 대하여 α -amylase, β -glucosidase 및 amyloglucosidase 등을 대상으로 작용 특이성을 조사함.
- 2) α -Glucosidase inhibitor의 분리 정제 및 구조 규명: α -glucosidase 특이 저해 효능을 나타내는 물질의 이화학적 특성을 유기용매에 의한 추출성, 이온성, pH 및 가온에 의한 안정성 등을 조사한 다음, 이에 근거하여 물질을 순수분리하고, 기기적 분석 방법에 의하여 그 구조를 규명함.
- 3) α -Glucosidase inhibitor의 항당뇨 효능 측정: α -glucosidase 특이 저해제의 동물실험에서의 당 흡수 저해효과를 정상쥐 및 streptozitocin으로 유발된 고혈당쥐를 이용하여 starch, sucrose 및 maltose를 투여한 후 혈당을 측정하는 방법으로 측정함.

3) 항암작용

- 가) 1단계에는 human cancer cell에 대한 세포독성을 측정하며, 2단계로 murine tumor를 이용하여 in vivo 활성을 측정하며, 3단계로 nude mouse를 이용한 human tumor xenograft model에서의 활성을 측정한다.
- 나) Sulforhodamine B assay: 세포독성의 측정은 미국 NCI에서 개발한 sulforhodamine B assay (SRB)를 이용하여 측정한다. 인체의 9장기에서 유래한 47종의 human cancer cell을 이용하여 panel을 구성하여 활용한다.

- 다) Murine mouse tumor model: 실험동물로는 특정병원체부재(specific pathogene free) BDF1 마우스(우, 18~21 g)를 사용한다. Day 0에 B16F10 melanoma(1×10^5 cells/animal)을 복강으로 0.2 ml/ animal씩 이식한 뒤 시료 및 용매를 독성이 없는 용량으로 적절한 기간동안 0.2 ml/20 g body weight로 주사한다. 결과는 하루에 두 번 사망 여부를 관찰하며 day 30-60에 mortality를 측정하였다.
- 라) Human tumor xenograft model: 실험동물로는 Balb/c female nude mice를 사용하며, 주령은 5-6주, 체중은 20-22 g 범위를 사용하였다. 실험동물은 1주일 이상 무병원균 동물실에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. Initiation model에서는 인체암세포를 day 0에 1×10^7 cells/ml의 농도로 mouse 당 0.2 ml 씩 피하로 이식한 뒤 다음날부터 약물 투여를 시작하였다. 암세포 이식 후 측정 가능한 종양이 형성되었을 때 개체별로 일정한 간격을 두고 종양의 크기 변화를 측정하였다.

4) 고지혈증

- 가) 1단계에는 실험동물에게 고지혈증을 유발하여 기초적인 혈액 및 조직검사를 실시하고, 이 결과를 바탕으로 2단계에서는 고지혈증 동물을 모델로 고지방 식이를 급여한 후 혈액성상을 검토하고, 고지혈증 유발과 관련된 중성지방 대사에 관여하는 효소활성 측정 및 고지단백질(lipoprotein)대사에 관여하는 중요 효소인 LPL 활성 및 유전자 발현을 구명하고자 하였다.
- 나) 고지혈증 유발 및 실험동물: 실험동물로는 체중 200g정도 되는 Sprague-Dawley 계통 수컷 쥐를 사용한다. 1주간 적응기간을 두고 고지방식이(전체 에너지의 45%)를 급여하여 고지혈증을 유발시킨 다음 실험에 사용한다. 실험군으로는 negative control(normal diet), positive control (high fat diet+식염수만 경구 투여) 및 실험군(high fat diet+엑스/분획/단일성분 투여, normal diet+엑스/분획/단일성분 투여)으로 나누어 4주간 실시하였다
- 다) 혈액, 반 및 지방조직내 지방대사에 미치는 영향 측정: 혈액내 total cholesterol, HDL- 및 LDL-cholesterol, 중성지방 함량 분석, 간 및 지방조직의 총지질, total cholesterol, 중성지방 및 인지질 함량 분석, 고지방 식이로 인한 간손상 검사: 혈액내 GOT, GPT 및 γ -GTP 측정.
- 라) 혈액성상 및 혈소판 응집에 미치는 영향 구명: 혈구와 혈소판수의 측정, 프로트롬빈 타임 측정, 혈소판 응집의 측정.
- 마) 고지혈증유발과 관련된 중성지방대사 및 지단백질 대사에 관여하는 효소 활성 측정: 간조직의 lipogenic enzyme(malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase)의 측정, 말초조직의 중성지방 제거를 평가하기 위해 지방조

직내 LPL(lipoprotein lipase) 활성 측정.

5). 목련과 수목자원에서부터 살충활성, 살비활성, 살균활성 물질의 탐색: 생물검정 과정

가) 실험군충 및 균주의 확보 유지

나) 실내 생물검정법 개발: 살충 활성검색(벼멸구, 배추종나방, 멸강나방, 진딧물, 점박이 응애)

다) 해충과 응애 및 병균에 대한 활성물질 탐색: 식물병원균에 대한 생육억제 효과 검정, 곰팡이 8종, 세균 7종에 대하여 평판 배지법에 의하여 활성검색)

라) 작용특성 시험

마) 제형별 야외 적용 시험

3. 결과 및 고찰

가. 퇴행성 중추신경계 질환: dopamine

1) 퇴행성 중추신경계 질환(I): dopamine 생합성 조절작용(함량 증가/감소)

가) 목련과 수목 자원에서의 검색시료 조제:

(1) 제1협동과제(국립산림과학원 이학주 박사)로부터 검색시료를 제공 받음.

(2) 검색시료(제1차): 오미자(43), 목백합(114), 일본목련(209), 함박꽃나무(198), 목련(118), 태산목(150)

(3) 검색시료(제2차): 오미자, 일본목련, 함박꽃나무, 자목련(4), 백목련(6), 태산목

(4) 검색시료(제3차): 흑오미자, 남오미자, 초령목, 쇠무릎, 단일성분(Costunolide), 목련(목부)

나) 목련과 수목으로부터 dopamine 생합성 조절 작용 검색

(1) 검색시료에 대하여 PC12 cells 중의 dopamine 함량변화 및 neurite outgrowth 유도작용에 미치는 영향을 검색함.

(2) 검색결과는 <Table 1>에 활성별로 정리하였으며, 세부적인 연구결과는 <Table 2, 3, 4>에 나타내었음.

(3) PC12 세포중의 dopamine 함량증가 작용을 나타낸 시료는 오미자(43D, 43F), 흑오미자(7T), 목백합(114L) 임.

(4) Dopamine 감소작용을 나타낸 시료는 목백합(114W), 목련(118L, 118W), 자목련, 백목련, 함박꽃나무(198W, 198L, 198B), 초령목 임.

(5) 상기 다), 라) 항목의 활성분획에 대하여 생리활성 물질(단일성분)의 분리가

필요함.

- (6) 태산목 및 일본목련(209L)의 분획은 세포독성 작용을 나타냄.
- (7) 목련(118B)는 neurite outgrowth 유도작용을 나타냄(Table 1).
- (8) 목련(목부 단일성분)은 저농도에는 dopamine 함량 증가작용을, 고농도에서는 세포분화(neurite-like outgrowth) 유도작용을 나타냄(Table 1, 4). 목련 목부 단일성분은 세포분화 유도작용으로 인하여 고농도에서는 dopamine 함량 감소작용을 나타내는 것으로 사료됨(apoptosis 유도와의 관련성이 추측되고 있음).

Table 1. Summary of bioactivity obtained from various fractions

제1차 검색 시료	Dopamine 함량 증가작용	오미자(43D) 목백합(114L)	
	Dopamine 함량 감소작용	목백합(114W) 함박꽃나무(198W) 목련(118L, 118W)	
	Neurite outgrowth 유도작용	목련(118B)	
제2차 검색 시료	Dopamine 함량 증가작용	오미자(43F)	
	Dopamine 함량 감소작용	태산목(150B)** 함박꽃나무(198L, 198B) 일본목련(209B) 자목련(4L, 4B, 4W, 4F) 백목련(6L, 6B, 6W, 6F)	*, 일부 독성
제3차 검색 시료	Dopamine 함량 증가작용	흑오미자(7T) 쇠무릎(지상부, 뿌리)	
	Dopamine 함량 감소작용	초령목(9L, 9B, 9W)	
단일성 분	Dopamine 함량 증가작용	목련(목부)*	*, 고용량: 세포분화 유도 (Neurite-like outgrowth)

Table 2. Effects of various fractions on dopamine biosynthesis in PC12 cells

Fractions (Concentration)			Dopamine content (% of control) *	Bioactivity
Control			100 (3.50±0.21 mg protein)	
오미자	43D	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	104.9	Dopamine 함량 증가
		160	134.8	
		240	84.7	Toxic
일본목련	209W	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	5.8	
		160	-	Toxic
		240	-	
함박꽃 나무	198W	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	12.1	
		160	8.9	Dopamine 함량 감소
		240	5.8	
목련	118L	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	84.1	
		160	81.5	
		240	18.5	
	118B	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	91.7	Neurite outgrowth (++)
		160	86.6	
		240	81.5	
	118W	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	17.5	
		160	14.1	Dopamine 함량 감소
		240	7.2	
태산목	150L	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	58.8	
		160	44.9	
		240	-	Toxic
	150W	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	44.7	
		160	39.6	
		240	34.7	

* The results represent means of 3-4 dishes.

Table 3. Effects of various fractions on dopamine biosynthesis in PC12 cells

Fractions (Concentrations)			Dopamine content (% of control) *	Bioactivity
Control			100 (3.54±0.28 mg protein)	
오미자	43F	80 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	134.9	Dopamine 함량 증가
		160	160.8	
		240	121.4	
일본목련	209L	8 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	50.2	Toxic
		20	38.6	
		40	-	
		80	-	
	209B	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	57.1	Dopamine 함량 감소
		40	45.5	
		80	25.2	
목백합	114L	4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	113.6	Dopamine 함량 증가
		8	129.1	
		12	104.2	
	114B	10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	120.1	
		20	95.3	
		40	85.6	
114W	50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10.8	Dopamine 함량 감소	
	160	11.2		
	240	7.7		
함박꽃 나무	198L	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	32.1	Dopamine 함량 감소
		40	17.5	
		80	5.4	
	198B	8 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	104.7	Dopamine 함량 감소
20	83.2			
		40	65.4	

자목련	4L	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	4.6 3.2 2.6	
	4B	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 40 80	44.8 36.1 28.8	Dopamine 함량 감소
	4W	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	14.2 9.0 4.9	
	4F	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	36.8 37.7 8.8	Dopamine 함량 감소
태산목	150B	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 40 80	33.4 17.4 6.9	Dopamine 함량 감소 Toxic
	150F	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 40 80	87.9 73.9 17.5	Toxic
백목련	6L	16 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 32 64	8.9 5.6 3.2	Dopamine 함량 감소
	6B	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	70.8 45.2 38.1	Dopamine 함량 감소
	6W	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	28.4 17.4 8.1	Dopamine 함량 감소
	6F	40 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 80 160	34.1 13.2 12.9	Dopamine 함량 감소
기타 (단일 성분)	EBE	16 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 32 64	120.5 113.6 103.5	
	ELE	16 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 32 64	105.7 104.2 73.6	
	ERE	16 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 32	104.9 95.8	

* The results represent means of 3-4 dishes.

Table 4. Effects of various fractions on dopamine biosynthesis in PC12 cells

Fractions (Concentrations)			Dopamine content (% of control) *	Bioactivity
Control			100 (3.48±0.23 mg protein)	
흑오미자	7T	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	128.7	Dopamine 함량 증가
		40	126.8	
		80	144.1	
남오미자	8T	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	111.9	
		40	92.3	
		80	110.2	
	8F	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	123.9	
		40	109.1	
		80	93.2	
8L	20 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	81.0		
	40	108.8		
	80	87.7		
초령목	9L	4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	52.1	Dopamine 함량 감소
		10	41.2	
		20	18.1	
	9B	4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	51.6	Dopamine 함량 감소
		10	36.0	
		20	30.1	
9W	10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	14.2	Dopamine 함량 감소	
	20	8.6		
	40	4.3		
기타 (단일성분)	목련 (목부)	4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	143.1	Dopamine 함량 증가
		10	129.6	
		20	102.3	
		40	48.6	
		80	22.1	
	Costu- nolide	4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	106.8	Toxic
		8	109.3	
		10	117.6	
		15	49.7	
		20	46.8	

* The results represent means of 3-4 dishes.

2) 퇴행성 증추신경계 질환(II): dopamine 생합성 조절작용 및 neurite outgrowth 유도 작용

1) 목련과 수목 자원에서의 검색시료 조제:

가) 제1협동과제(국립산림과학원)팀으로부터 검색시료를 제공 받음.

나) 검색시료: 오미자(열매; SCF-1-5, SCF-2-5, SCF-3-5),
목련(수피; MKB-1-5, MKB-2-5),
백합나무(목부; MW-2-5, MW-3-3, JL-9-1), 백합나무(수피;
MB-1-1)

다) 단일 시료: (JL-1-5, JL-2-3, JL-6-4, JL-7-5, JL-10-2, JL-11-4);
(KH-1-5, KH-2-5, KH-4-5), (ACH-1-1, ACH-2-4, ACH-4-1),
(SBB-1-2, SBB-2-5), (HjSA-1-1, HjIL-1-1, HjAR-1-4)

2) Dopamine 생합성 조절작용 및 neurite outgrowth 유도 작용

가) 검색시료에 대하여 PC12 cells 중의 dopamine 함량변화 및 neurite outgrowth 유도작용에 미치는 영향을 검색함(표 참조).

나) Dopamine 함량 증가작용: 백합나무(수피: MB-1-1) 및 단일시료(HjSA-1-1, HjIL-1-1, HjAR-1-4)에서 PC12 세포중의 dopamine 함량 증가작용을 나타냄(Table 5 및 6).

다) Dopamine 함량 감소작용: 오미자(SCF-2-5, SCF-3-5), 백합나무(목부: MW-2-5, MW-3-3), 목련(수피: MKB-2-5) 화합물은 용량 4-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 대조군에 비하여 11-43%의 농도 의존적으로 PC12 세포중의 dopamine 함량 감소작용을 나타냄(Table 5 및 7).

라) Neurite outgrowth 유도작용: 목련(MKB-2-5), 백합나무(목부, JL-9-1), 백합나무(수피, MB-1-1) 화합물은 용량 4-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 현저한 neurite outgrowth 유도작용을 나타내었으며, MKB-2-5와 NGF를 병용 처치하였을 경우 NGF의 neurite outgrowth 유도 작용에 대하여 증가작용을 나타냄(Fig. 1-2).

마) MKB-2-5의 neurite outgrowth 유도작용은 PD98059(MAPK 저해제), GF109203X(PKC 저해제), H89(PKA 저해제)에 의하여 저해되었음(Fig. 3-5).

Table 5. Summary of bioactivity obtained from various fractions.

활성 검색	활성 분획 및 물질	비 고
Dopamine 함량 증가작용	백합나무(수피) (MB-1-1) 단일시료 (HjSA-1-1, HjIL-1-1, HjAR-1-4)	용량: 5-40 µg 용량: 4-20 µg
Dopamine 함량 감소작용	오미자(열매) (SCF-2-5, SCF-3-5) 백합나무(목부) (MW-2-5, MW-3-3) 목련(수피) (MKB-2-5) 단일시료 (JL-6-4, KH-4-5, ACH-4-1)	용량: 4-20 µg 용량: 4-20 µg 용량: 4-20 µg 용량: 4-20 µg
Neurite outgrowth 유도작용	백합나무(목부) (JL-9-1) 백합나무(수피) (MB-1-1) 단일시료 (HjSA-1-1, HjIL-1-1, HjAR-1-4) 목련(수피) (MKB-2-5)	- * DA 증가작용 * Neurite bearing activity, DA 증가작용 용량: 4-20 µg

Table 6. Effects of bioactive component(s) on dopamine content in PC12 cells

Component	Dopamine content (nmol/mg protein) (% of control)
Control	3.54 ± 0.23 (100)
MB-1-1 2 µg/ml	3.92 ± 0.34 (111)
5 µg/ml	4.36 ± 0.45 (123)*

PC12 cells were treated with bioactive components and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS and dopamine content was measured by an HPLC method. Results represent the means±SEM of 5-7 dishes. Significantly different from the control value: *, p<0.05 (Student's t-test).

Table 7. Inhibitory effects of bioactive component(s) on dopamine content in PC12 cells

		Dopamine content (nmol/mg protein) (% of control)	IC ₅₀ value (μ g/ml)
Control		3.54 \pm 0.23 (100)	
SCF-2-5	5 μ g/ml	3.04 \pm 0.31 (86.0)*	12.8
	10 μ g/ml	2.31 \pm 0.24 (65.3)**	

PC12 cells were treated with bioactive components and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS and dopamine content was measured by an HPLC method. Results represent the means \pm SEM of 5-7 dishes. Significantly different from the control value: *, p<0.05; **, p<0.01 (Student's t-test).

(A) MKB-2-5



(B) NGF

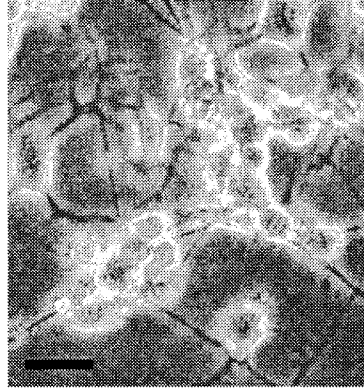


Fig. 1. Effects of MKB-2-5 on neurite outgrowth in PC12 cells. A; MKB-2-5 (20 $\mu\text{g/ml}$ for 7 days): B; NGF (50 ng/ml for 4days). Scale bar, 50 μm .

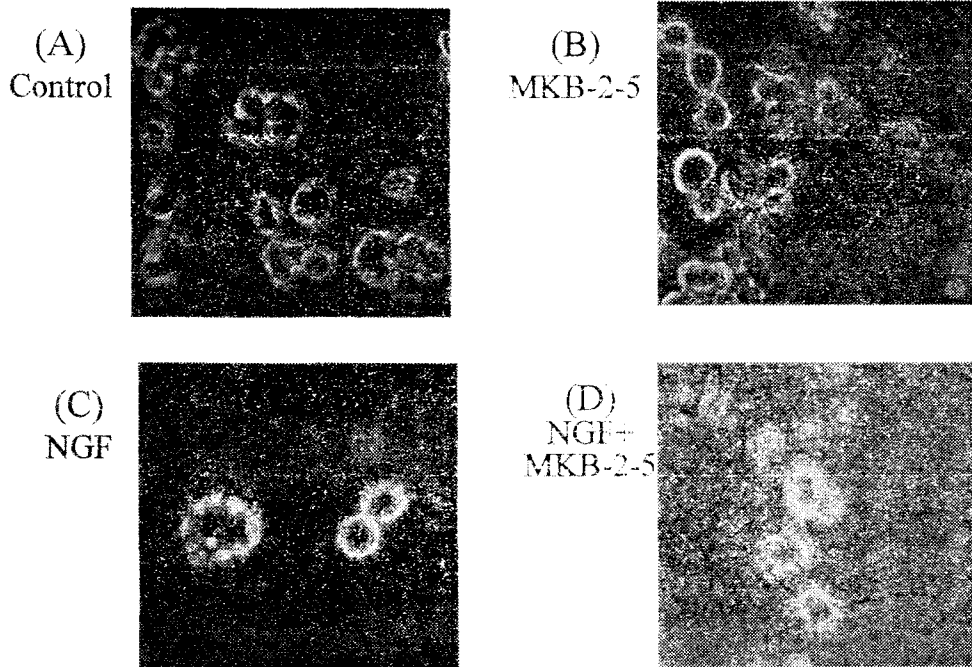


Fig. 2. Effects of MKB-2-5 and NGF on the morphology of PC12 cells. The cells were treated for 4 days without (A, C) or with (B, D) MKB-2-5 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and in the absence (A, B) or presence (C, D) of NGF (2 ng/ml). Scale bar, 50 μm .

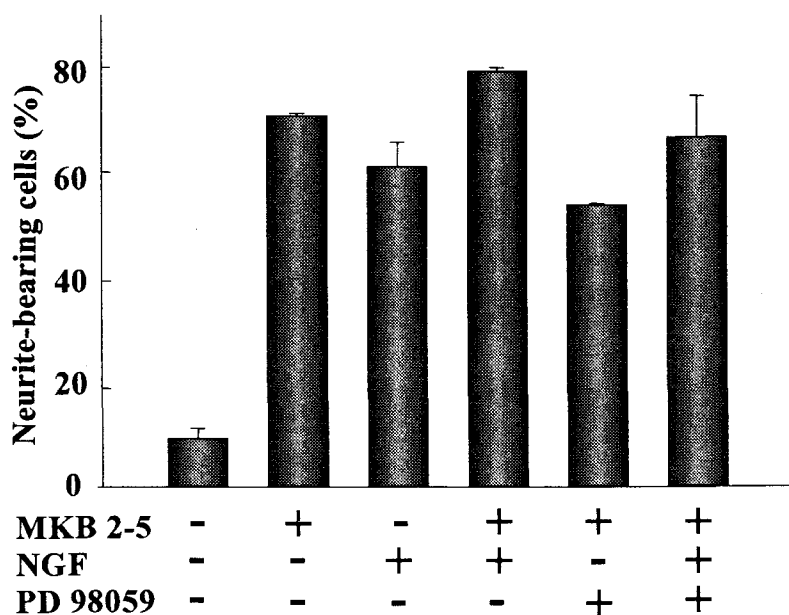


Fig. 3. Effects of PD98059, a MAPK inhibitor, on the MKB-2-5-induced enhancement of neurite outgrowth by NGF. The number of neurite-bearing cells is expressed as a percentage of maximum number in response to NGF (30 ng/ml, 100%) in the absence of MKB-2-5. The concentrations of NGF, MKB-2-5 and PD98059 are 2 ng/ml, 20 μ g/ml and 3 mM, respectively. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

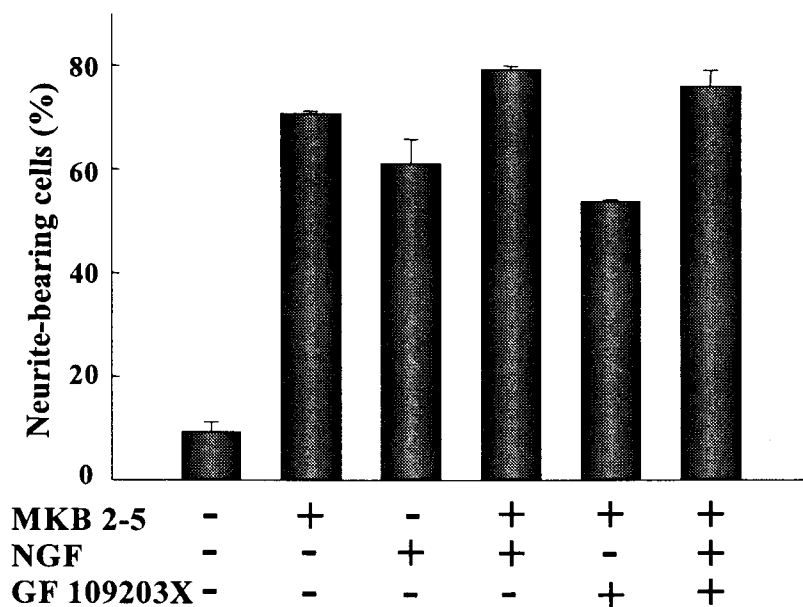


Fig. 4. Effects of GF109203X, a PKC inhibitor, on the MKB-2-5-induced enhancement of neurite outgrowth by NGF. The number of neurite-bearing cells is expressed as a percentage of maximum number in response to NGF (30 ng/ml, 100%) in the absence of MKB-2-5. The concentrations of NGF, MKB-2-5 and GF109203X are 2 ng/ml, 20 μ g/ml and 100 nM, respectively. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

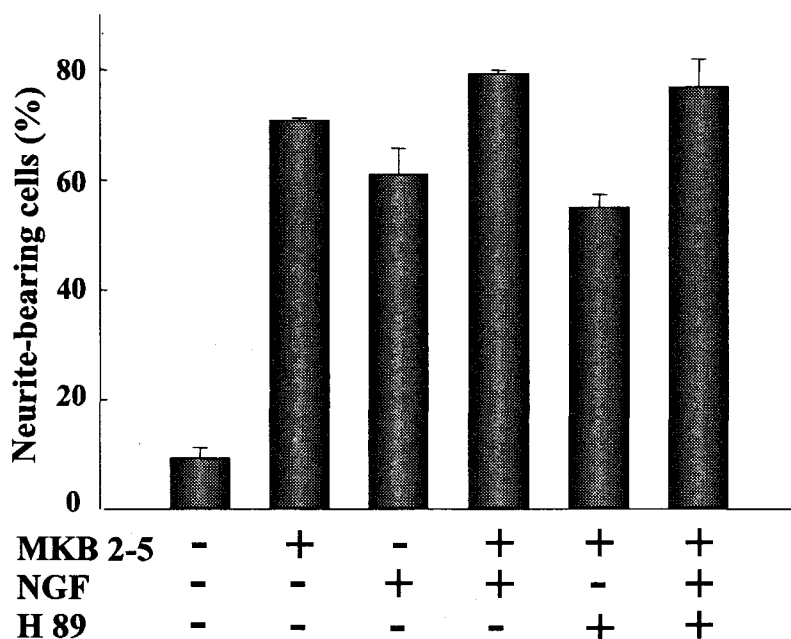


Fig. 5. Effects of H89, a PKA inhibitor, on the MKB-2-5-induced enhancement of neurite outgrowth by NGF. The number of neurite-bearing cells is expressed as a percentage of maximum number in response to NGF (30 ng/ml, 100%) in the absence of MKB-2-5. The concentrations of NGF, MKB-2-5 and H89 are 2 ng/ml, 20 μ g/ml and 100 nM, respectively. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

3) 퇴행성 중추신경계 질환(III): dopamine 생합성 조절작용 및 neurite outgrowth 유도 작용

1) Dopamine 함량 증가작용: 작용기전

- 가) 화합물 GB-3-3(시료 이학주 박사 제공)은 PC12 세포중의 dopamine 함량 증가작용을 나타냄. GB-3-3은 처치용량(0.5 - 2.0 $\mu\text{g/ml}$)에서 대조군에 비하여 110-132%의 dopamine 함량 증가작용을 나타냄.
- 나) MB-1-1 화합물(백합나무 목부 coumarin 계열 화합물)은 PC12 세포중의 dopamine 함량 증가작용을 나타냄: 20 mg/ml 10 μl 용량에서 130-160%의 dopamine 함량 증가(Fig. 6A)
- 다) MB-1-1 화합물의 dopamine 함량 증가작용에 대한 작용기전: dopamine 생합성 효소 tyrosine hydroxylase (TH) 활성 변화가 대조군에 비해 105-115%의 증가작용을 나타냄(Fig. 6B)

2) Neurite outgrowth 유도작용: 작용기전

가) MB-1-1의 neurite outgrowth 유도작용 연구

- MB-1-1(20 mg/ml, 10 μl 용량) 전처치 72-96 시간 후에 PC12 세포는 현저한 neurite outgrowth 유도작용을 나타냄(100 μm , contrast to scale bar 50 μm).
- Neurite-형성 세포수는 MB-1-1 화합물(20 mg/ml, 2-10 μl 용량)에 의하여 농도 의존적으로 증가함.
- MB-1-1 화합물과 NGF와 병용 투여하였을 경우 NGF 단독 투여군(Fig. 7)에 비하여 현저한 neurite outgrowth 유도 작용을 나타냄(Fig. 7).
- Neurite outgrowth 유도작용에 대한 PKA, PKC 및 MAPK 저해제의 영향: MAPK 저해제인 PD98059(20 μM) 전처치에 의하여 MB-1-1(20 mg/ml, 10 μl)의 neurite outgrowth 유도작용은 저해되었으며, NGF+MB-1-1 병용 투여군에 PD98059를 처치할 경우 NGF 단독 처리군과 비교하여 neurite-형성 세포수가 현저히 감소함(Fig. 8).
- PKC 저해제인 GF109203X(0.1 μM)전처치에 의하여 MB-1-1(20 mg/ml, 10 μl)의 neurite outgrowth 유도작용은 저해되었으며, NGF+MB-1-1 병용 투여시 증가한 neurite-형성 세포수는 GF109203X 처치에 의하여 감소함(Fig. 9).
- PKA 저해제인 H89(0.1 μM)전처치에 의하여 MB-1-1(20 mg/ml, 10 μl)의 neurite outgrowth 유도작용은 저해되었으며, NGF+MB-1-1 병용 투여시 증가한 neurite-형성 세포수는 H89 처치에 의하여 감소함(Fig. 10).

- 상기의 결과를 종합하면, MB-1-1의 neurite outgrowth 유도작용은 세포내 NGF 수용체의 신호전달 과정에 관여하고 있을 것으로 사료됨.

나) MKB-2-5의 구조확인 및 neurite outgrowth 유도작용 연구

- MKB-2-5는 lignan 화합물인 3,3',4,4'-tetramethoxy-7,9',7',9-diepoxy lignan(epiudesmin)으로 확인함.
- MKB-2-5 계열 화합물인 단일 성분(MKBE 6, 7, 8 화합물)도 PC12 세포중의 neurite outgrowth 유도작용을 나타냄(Fig. 11). 이는 MKB lignan 계열 화합물이 neurite outgrowth 유도작용의 기본 모형을 가진 화합물임을 나타내고 있음.

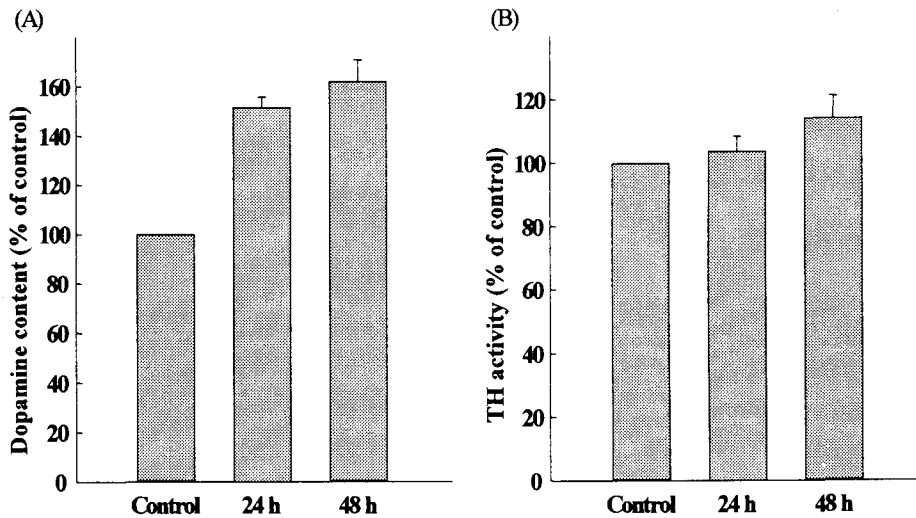


Fig. 6. Effects of MB-1-1 on the intracellular dopamine content (A) and TH activity (B) in PC12 cells. PC12 cells were treated with MB-1-1 (20 mg/ml, 10 μ l), and then incubated at 37°C for 24 h or 48 h. The cells were harvested and dopamine content was measured by an HPLC method. Dopamine content and TH activity of the control were 3.48 ± 0.29 nmol/mg protein and 4.01 ± 0.16 nmol/min/mg protein, respectively.

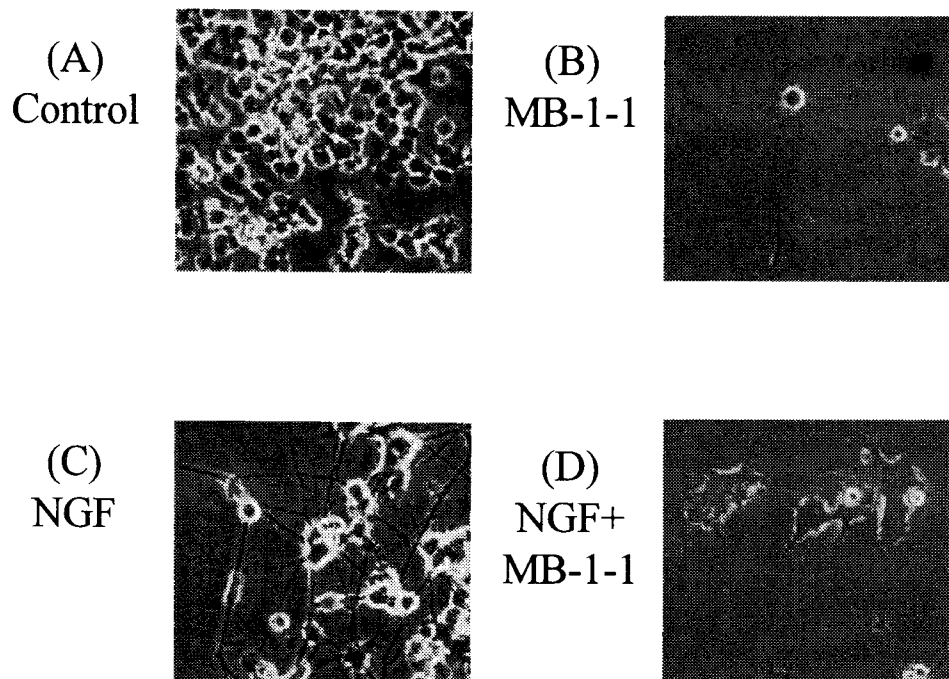


Fig. 7. Effects of MB-1-1 and NGF on the morphology of PC12 cells. The cells were treated for 6 days without (A, C) or with (B, D) MB-1-1 (20 mg/ml, 10 μ l), and in the absence (A, B) or presence (C, D) of NGF (30 ng/ml, 2 ng/ml). Scale bar, 50 μ m.

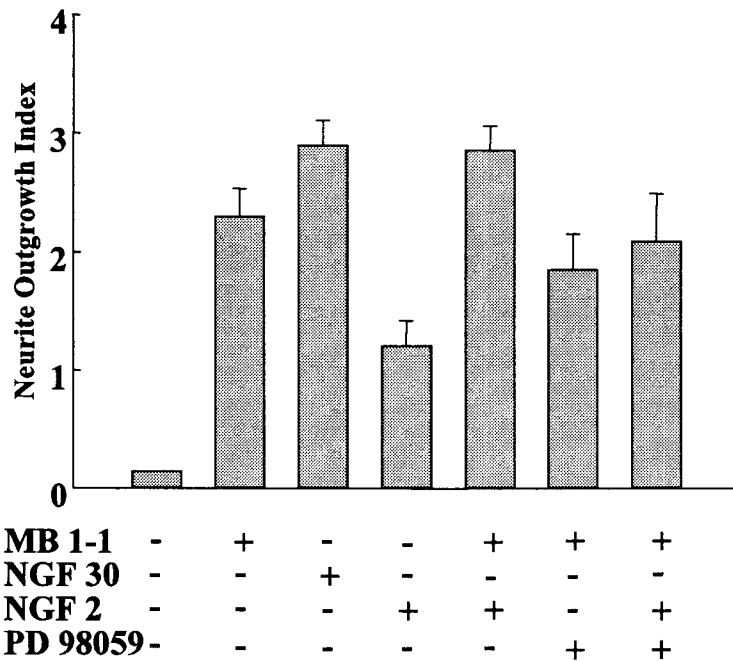


Fig. 8. Effects of PD98059 (MAPK inhibitor, 3 mM), on the MB-1-1-induced (20 mg/ml, 10 μ l) enhancement of neurite outgrowth by NGF (30 or 2 ng/ml). Neurite outgrowth index refers to the extent of differentiation characteristic of the cells, with 0 being the least outgrowth, and 4 being the most extensive outgrowth. An average was calculated with about 200 cells for each treatment, and data presented are the average of triplicate samples. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

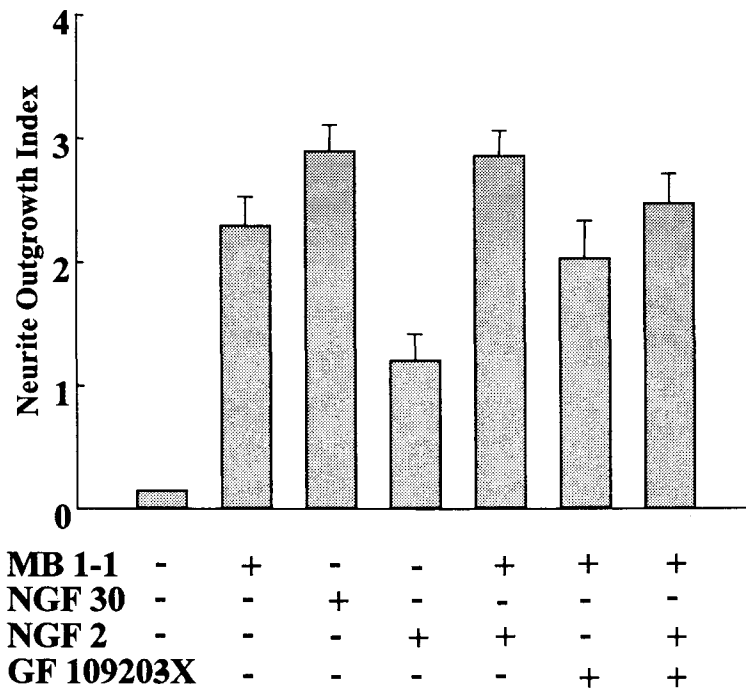


Fig. 9. Effects of GF109203X (PKC inhibitor, 100 nM) on the MB-1-1-induced (20 mg/ml, 10 μ l) enhancement of neurite outgrowth by NGF (30 or 2 ng/ml). Neurite outgrowth index refers to the extent of differentiation characteristic of the cells, with 0 being the least outgrowth, and 4 being the most extensive outgrowth. An average was calculated with about 200 cells for each treatment, and data presented are the average of triplicate samples. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

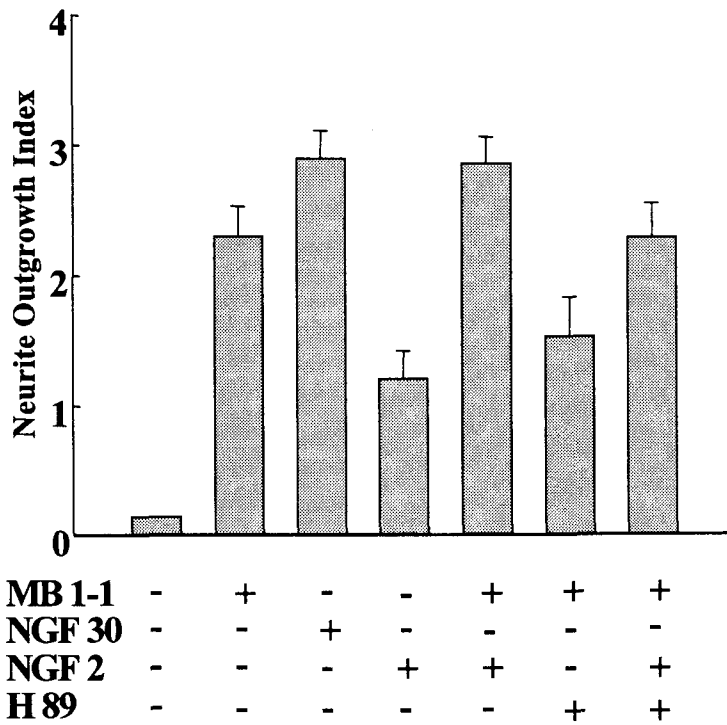


Fig. 10. Effects of H89 (PKC inhibitor, 100 nM) on the MB-1-1-induced (20 mg/ml, 10 μ l) enhancement of neurite outgrowth by NGF (30 or 2 ng/ml). Neurite outgrowth index refers to the extent of differentiation characteristic of the cells, with 0 being the least outgrowth, and 4 being the most extensive outgrowth. An average was calculated with about 200 cells for each treatment, and data presented are the average of triplicate samples. Each point represents the mean \pm SEM from three experiments. Statistically significant difference is indicated in the figure: *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

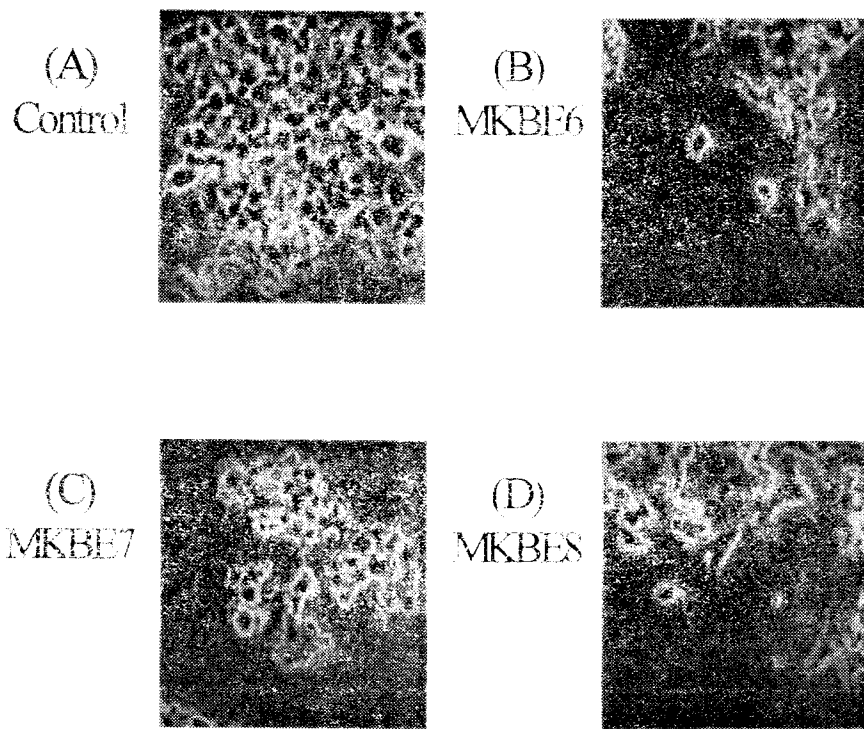


Fig. 11. Effects of MKBE components (6, 7 and 8) on the morphology of PC12 cells. The cells were treated for 4 days without (A) with MKBE 6 (B), MKBE 7 (C), and MKBE 8 (D) (20 mg/ml, 10 μ l). Scale bar, 50 μ m.

나. 목련과 수목으로부터 항당뇨 효능 검색

1) 목련과 수목으로부터 항당뇨 효능 검색(I): α -glucosidase 및 α -amylase에 대한 저해활성 탐색

- 1) α -Glucosidase 저해활성을 보이는 시료(6개)를 선별하여 α -amylase 저해활성을 조사하였음(Table 8).
- 2) α -Glucosidase 저해활성을 보이는 6개 시료 모두 α -amylase에 대해서는 저해활성을 나타내지 않았음. 이러한 결과는 α -glucosidase에 대해서 특이적인 저해활성을 나타낸다는 점에서 아주 흥미로우며, 앞으로의 진행은 43D, 118W, 198W 및 209W를 일차 대상으로 해야할 것임.
- 3) 114L은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 α -glucosidase 저해활성을 보였으나, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 저해활성이 거의 없었음.
- 4) 시료 209W는 면역증강 작용을 나타냄.

Table 8. Effects of various fractions on α -glucosidase and α -amylase activities

Samples	α -Glucosidase			α -Amylase
	% of inhibition			% of inhibition
	500 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
43D	-	88	26	0
114L	-	82	0	0
114B	-	0	0	NT
114W	-	66	NT	0
118L	-	0	0	NT
118B	-	0	0	NT
118W	-	80	50	0
150L	-	0	0	NT
150W	50	0	0	NT
198W	-	83	69	0
209W	85	85	63	0

* NT : not tested.

2) 목련과 수목의 항당뇨 효능 검색(II): 인슐린 비의존성 당뇨병 (NIDDM) 치료제

1) 연구배경

가) α -Glucosidase(α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.2.20)은 소장 점막 용모막에 존재하는 효소로서 탄수화물의 소화 흡수에 필수적인 효소이다. α

-Glucosidase 특이 저해제는 α -amylase 저해제와는 달리 탄수화물 소화의 최종단계에만 작용함으로써 α -amylase 저해제를 투여했을 경우에 보이는 음식물의 소화 불량, 복통 및 췌장에서 α -amylase의 생성이 유도되는 역작용 등의 부작용이 없는 것으로 나타나고 있다.

- 나) 따라서, α -glucosidase에만 특이하게 작용하며, α -amylase를 비롯한 다른 효소에는 저해 활성이 없거나 아주 적은 물질은 당뇨병 및 비만의 치료제 또는 치료보조제로 사용될 수 있는 가능성이 아주 높다.
- 다) 이러한 사실에 기초하여, 식물 엑스 및 분획에 대하여 α -glucosidase 저해 효능이 우수하면서도 α -amylase, β -glucosidase 및 amyloglucosidase 등과 같은 다른 탄수화물 가수분해 효소에 대해서는 저해 활성이 없거나 아주 낮은 것을 탐색한 후, 순수 분리 및 구조의 규명을 통하여 그 정체를 밝히고, 정상쥐 및 streptozitocin으로 유발된 고혈당쥐에서 starch, sucrose 및 maltose를 투여한 후 혈당을 측정하는 방법으로 생체내 당 흡수 저해효능을 측정하는 접근법으로 신약개발의 후보물질을 도출하고자 한다.

2) 연구방법

- 가) α -Glucosidase inhibitor의 탐색 및 2. α -glucosidase inhibitor의 작용 특이성의 규명.
- 나) 일차 탐색에서 선정된 시료에 대하여 α -amylase, β -amylase, dextranase, cellulase, β -glucosidase, amyloglucosidase, invertase, pullunase, β -galactosidase, α -galactosidase 등을 대상으로 효소 저해 특이성 및 활성을 조사하였다.

3) 연구결과

- 가) α -Glucosidase 저해활성을 보이는 시료를 선별하여 α -amylase 저해활성, β -amylase 저해활성, dextranase 저해 활성, cellulase 저해 활성, β -glucosidase 저해 활성, amyloglucosidase 저해 활성, invertase 저해 활성, pullunase 저해 활성, β -galactosidase 저해 활성, α -galactosidase 저해 활성 등을 각각 조사한 결과는 <Table 9 및 10>에 보인 바와 같다.
- 나) 가장 주목할 만한 시료는 198W(함박꽃나무 목부) 및 4W(자목련 목부) 시료이다. 이들 시료는 α -glucosidase에 대하여 각각 66% 및 73%의 높은 저해활성을 나타내는 농도에서 다른 당 분해 효소들에 대해서는 전혀 억제하지 않을 정도로 α -glucosidase에 대해서만 특이한 효소 저해 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

다) 따라서, 198W 및 4W(자목련 시료에 함유되어 있는 α -glucosidase 특이 저해물질의 정체 규명으로 이어져야할 것으로 생각되며, 이러한 연구는 당뇨병 치료제 개발의 선도물질 확보에 크게 기여할 것으로 기대된다.

Table 9. Specificity of the α -glucosidase inhibitors on various carbohydrases.

Carbohydrase	43D	114L	114W	118W	198W	209W	209L
<u>α-amylase</u>	-	20	-	-	-	21	-
<u>β-amylase</u>	11	-	-	-	-	19	17
<u>Dextranase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>Cellulase</u>	-	-	25	27	-	25	-
<u>β-glucosidase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>Amyloglucosidase</u>	-	48	-	-	-	38	-
<u>Invertase</u>	-	-	35	-	-	29	-
<u>Pullulanase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>β-galactosidase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>α-galactosidase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>α-glucosidase</u>	65	16	39	52	66	70	57

Table 10. Specificity of the α -glucosidase inhibitors on various carbohydrases.

Carbohydrase	209B	6W	4L	4W	ELE	EBE	ERE
<u>α-amylase</u>	24	24	-	-	-	-	-
<u>β-amylase</u>	14	10	-	-	-	-	-
<u>Dextranase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>Cellulase</u>	-	-	-	-	32	42	46
<u>β-glucosidase</u>	-	-	-	-	28	30	28
<u>Amyloglucosidase</u>	-	-	-	-	53	66	68
<u>Invertase</u>	-	-	-	-	-	48	69
<u>Pullulanase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>β-galactosidase</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>α-galactosidase</u>	-	-	-	-	-	-	19
<u>α-glucosidase</u>	78	76	8	73	76	37	85

다. 면역조절효능 규명

1) 연구방법

- 가) 세포 분화 유도효과가 가장 큰 것으로 확인된 시료인 209W에 대하여 백혈병 암세포에 대한 증식 억제효능을 생쥐 myeloid계 암세포인 Raw 264.7 세포를 이용하여 조사하였고, 분화된 macrophage에 의하여 생성되는 nitric oxide 및 TNF- α 양을 측정하는 방법으로 면역조절활성을 조사하였다.
- 나) 시료인 209W를 Raw 264.7 세포주 배양액에 첨가하여 배양하면서 암세포주의 분화에 따른 형태학적 변화를 역상현미경 하에서 관찰하였고, 분화에 따른 암세포의 증식 억제 정도는 96-well microtiter plate의 각 well에 50 μ l의 3 H-thymidine (1 μ Ci/well)을 가하고, 계속해서 6시간을 더 배양한 후 automatic cell harvester를 이용하여 glass filter 상에 수확, 건조한 후, 세포가 수확된 부분의 glass filter를 96-well microtiter plate에 옮겨 scintillation cocktail을 첨가하여 Microbeta Liquid Scintillation Counter를 이용하여 측정하였다.
- 다) Raw 264.7 세포주에 시료를 첨가하여 배양하여 얻은 배양 여액에 대하여 nitric oxide 생성 정도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였고, TNF- α 생성 정도를 TNF- α 에 대한 단클론 항체를 이용한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

2) 연구결과

- 가) 시료인 209W(일본목련목부)는 myeloid계 암세포인 Raw 264.7의 분화를 촉진하여 그 모양이 섬유아세포(fibroblast) 유사 모양으로 변하고, 플라스틱 표면에 대한 부착성이 강력해지며, 많은 액포들이 생성되게 하는 것을 관찰할 수 있었고, 분화 유도 정도에 비례하여 Raw 264.7 세포의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 12).
- 나) 시료인 209W는 Raw 264.7 세포로부터 분화된 macrophage로 하여금 nitric oxide의 생성을 강력히 유도할 뿐만이 아니라(Fig. 13), TNF- α 와 같은 사이토카인의 분비를 강력히 촉진시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 14).
- 다) 이러한 결과는 시료인 209W의 강력한 암세포 분화 유도 효과 및 면역증강 효과를 보여주는 것이며, 정상 macrophage에 대해서는 더욱 강력한 분화 유도 및 기능 활성화 효능을 나타낼 것임을 예측하게 하는 결과이다.
- 라) 차년도 연구에서는 정상 macrophage에 대한 면역증강효능의 규명 및 암세포 분화 유도 및 면역증강효능을 나타내는 209W의 정체 규명에 관한 연구로 이어져야 할 것이라 생각된다.

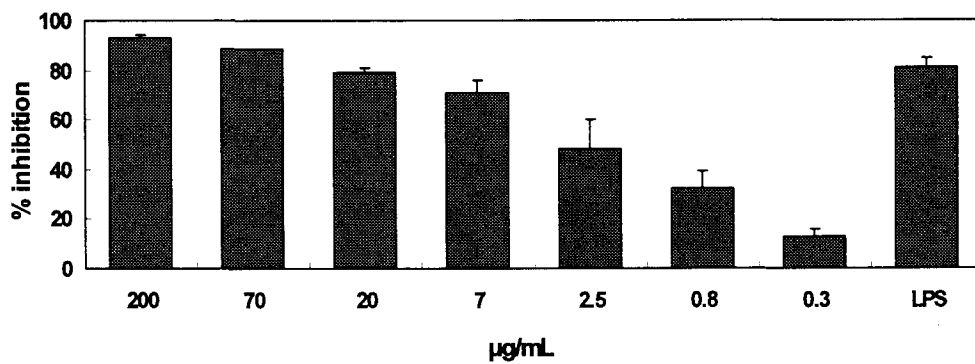


Fig. 12. Inhibitory effects of fraction 209W on cell proliferation in Raw 264.7 cells.

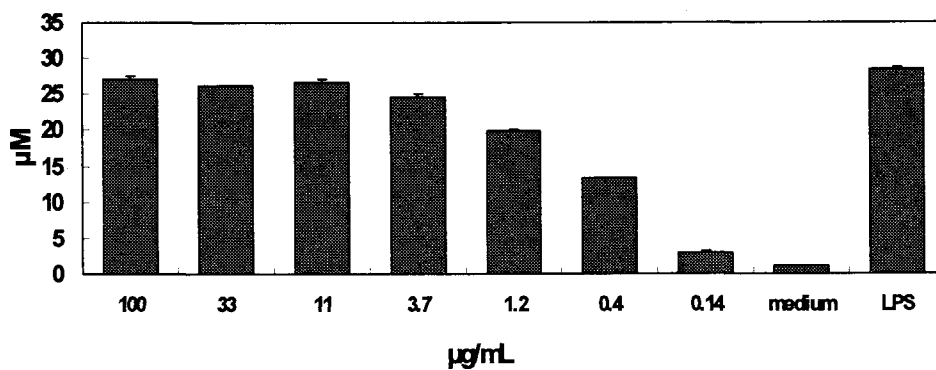


Fig. 13. Enhancing effects of fraction 209W on the formation of nitric oxide.

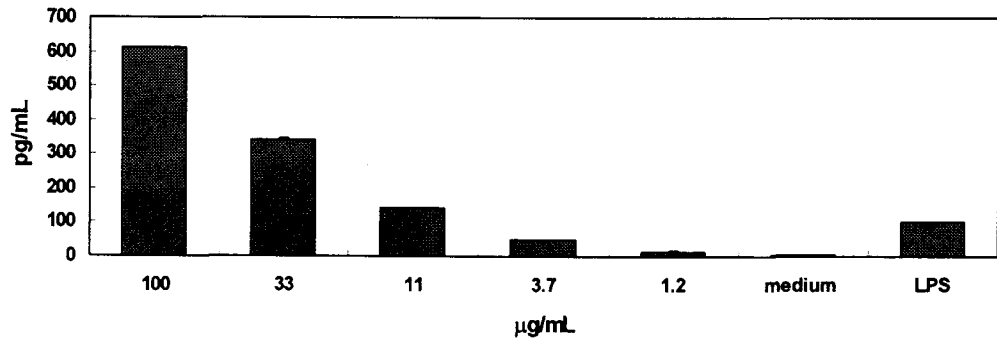


Fig. 14. Enhancing effects of fraction 209W on the formation of TNF- α .

라. 목련과 수목으로부터 항암작용의 검색

1) 목련과 수목으로부터 항암작용의 검색(I): Cancer cell에 대한 세포 독성

- 1) 세포주는 미국의 NCI에서 제공받아 사용하였으며, 모든 세포주는 10 Passage 내에서 사용함.
- 2) 세포주는 RPMI1640 과 10%의 송아지 혈청을 함유한 배양액을 사용하였음.
- 3) 세포독성의 측정: 세포독성의 측정은 NCI의 방법에 따라서 시행하였음. 세포주의 loading하는 농도는 세포주의 성장속도에 따라서 다르게 하며, 약물은 5 가지 dose로 나누어 희석하여 용매의 최종농도가 ug/ml가 되도록 처리함.
- 4) 48 시간후에 약물을 처리한 plate를 50% TCA로 50 μ l/well씩을 넣어서 고정하고, 고정한 plate는 4 $^{\circ}$ C에서 60 분간 방치한 뒤 tap water로 4~5번 정도 세척함.
- 5) 세척한 plate는 건조한 후 plate는 0.4% SRB(Sulforhodamine B)(0.1% acetic acid로 용해한 용액; 단백질의 염색시약, 100 μ l/well)을 가하고, 30분 정도를 방치한 후에 0.1% acetic acid로 세척을 하여 결합하지 않은 염색시약을 세척함.
- 6) 다시 건조를 한 후에 10 mM Tris Base(pH 10.5)를 100 μ l/well를 가하여 염색시약을 용해시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정함.
- 7) 세포주: A549, PC-3(Prostate), HCT 15, SW620(Colon)
- 8) 목련과 시료에 대하여 항암작용(세포독성)을 검색한 결과 대부분의 시료가 실험한 세포주중에서는 효과가 없는 것으로 나타났음(Table 11).
- 9) 시료 114(L)에서는 실험한 농도 30 μ g/ml에서 약간의 세포독성이 나타났음.

Table 11. Effects of various fractions on cytotoxicity in human cancer cell lines.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	43D	114L	114B	114W	118B	118W
A549	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
PC-3	> 30	9.742	> 30	> 30	> 30	> 30
HCT 15	> 30	17.36	> 30	> 30	> 30	> 30
SW620	> 30	9.827	> 30	> 30	> 30	> 30
Mean GI ₅₀	> 30	> 16.73	> 30	> 30	> 30	> 30
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	118L	150L	150W	198W	209W	ADR
A549	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	0.248
PC-3	> 30	> 30	> 30	19.34	> 30	0.226
HCT 15	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	1.908
SW620	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	0.126
Mean GI ₅₀	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	0.630

2) 목련과 수목으로부터 항암작용의 검색(II): Cancer cell에 대한 세포독성

- 1) 세포독성의 측정은 NCI의 방법에 준하여 3가지 세포주에 대해 SRB assay 법으로 시행함.
- 2) 세포주(human cancer cell line): PC-3 (Prostate), LOX-IMVI(Melanoma), SW620(Colon)
- 3) 18 종의 시료에 대하여 cytotoxicity를 측정하였으며(Table 12), 이결과에 의하면 Costunolide (COST)가 0.715 $\mu\text{g/ml}$ 의 GI50를 보여 세포독성 항암제로의 개발 가능성을 나타냄.
- 4) Costunolide는 면역억제 및 in vitro cancer cell에 대한 cytotoxicity가 일부 알려져 있으며, in vivo model에서 항암효과를 규명한 후 항암제로 개발할 것인지에 대해서는 문헌조사를 실시한 후 토의를 해야 할 것으로 사료됨.
- 5) 기타 복합물질의 경우 함박꽃나무에서 분리한 198B 시료가 약한 효과를 나타냄.
- 6) 상기를 결과를 종합하여 보면, 목련과 수목자원은 특이할 만한 항암작용을 나타내지 않은 것으로 사료됨.

Table 12. Effects of various fractions on cytotoxicity in human cancer cell lines.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	6B	6L	6F	6W	4B	4L	4F
PC-3	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
LOX-IMVI	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
SW620	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
Mean GI ₅₀	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	4W	150B	150F	198B	198L	43F	209B
PC-3	> 30	> 30	22.74	> 30	> 30	> 30	> 30
LOX-IMVI	> 30	> 30	> 30	12.35	> 30	> 30	> 30
SW620	> 30	> 30	25.65	13.90	> 30	> 30	> 30
Mean GI ₅₀	> 30	> 30	> 26.13	> 18.75	> 30	> 30	> 30
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	209L	EBE	ELE	ERE	Cost	ADR	
PC-3	> 30	> 30	20.05	> 30	0.764	0.192	
LOX-IMVI	> 30	> 30	29.87	> 30	0.666	0.062	
SW620	> 30	> 30	20.71	> 30	0.714	0.049	
Mean GI ₅₀	> 30	> 30	23.54	> 30	0.715	0.101	

마. 목련과 수목으로부터 고지혈증에 대한 활성검색:

- 1) 검색시료[오미자(43), 목백합(114), 일본목련(209), 함박꽃나무(198), 목련(118), 태산목(150)]에 대하여 고지혈증(혈액내 중성지방, total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 및 중성지방 함량 분석)에 미치는 영향을 검색함(Table 13).
- 2) 고지혈증 유발: 음성대조군(정상식이 급여)를 제외한 고지방식이(사료내 총지방 함량 30%로 고정하고, 총 에너지의 50%를 지방으로 급여)를 2주간 급여한 다음 일부 쥐를 임의 선택하여 혈액을 채취하여 혈장내 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량을 측정하여 고지혈증이 유발되었음을 확인하였음
- 3) 고지방식이와 더불어 증류수에 녹인 시료 (6종류)을 2주간 체중 kg당 250mg을 매일 경구투여 하였음.
- 4) 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 총 콜레스테롤 함량 분석: 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤함량 분석은 Auto dry chemistry analyzer를 사용하여 분석하였고, LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald 등(1972)의 방정식에 의거하여 구하였음.

$$\text{LDL-콜레스테롤함량} = \text{총콜레스테롤} - (\text{HDL-콜레스테롤} + \text{TG}/5)$$
- 5) 검색결과: 검색결과는 <Table 13>에 나타냈으며, 양성 대조군에 비해 일본목련(209)과 태산목(150)만이 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤함량이 저하되었으나 현저한 차이를 보이지 않았음. 그 외 다른 시료는 고지혈증 감소작용을 나타내지 않았음.

Table 13. Effects of various fractions on serum total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride concentrations in rats.

Group	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)
(-) control	31.86±4.18	53.43±1.81	15.14±1.72	34.91±1.24
(+) control	41.67±3.36	61.17±2.30	13.33±1.38	39.50±2.29
오미자(43)	45.67±2.99	59.00±3.61	12.50±1.23	37.37±6.37
일본목련(209)	33.17±3.31	51.50±2.54	13.83±1.42	31.03±0.93
목련(118)	39.33±3.46	56.83±1.76	12.83±0.54	36.33±2.31
함박꽃(198)	43.83±5.71	58.17±2.19	12.67±1.52	36.73±1.17
태산목(150)	36.50±3.92	53.00±1.41	13.60±0.74	32.08±1.03
목백합(114)	41.17±6.17	60.50±3.56	14.33±1.80	37.93±2.81

* The results represent means±SE (n=6).

바. 병원균에 대한 활성검정(충북대 농생물학과)

1) 목적: 목련나무 추출물의 병원균 생육 억제 효과 검정

2) 재료

1) 생리활성물질: 임업연구원에서 분양 받은 목련과 수종으로부터의 추출물 11종

2) 대상 병원균: 곰팡이 8종, 세균 7종

- a) 곰팡이: *Phytophthora nicotiana* (담배 역병),
Botrytis cinerea (잿빛곰팡이병),
Monilinia fructicola (복숭아 잿빛무늬병),
Pyricularia oryzae (벼 도열병),
Colletotrichum gloeosporioides (고추 탄저병),
P. capsici (고추 역병),
Rhizoctonia solani (벼 잎집무늬마름병),
Cryphonectria parasitica (밤나무 줄기마름병)

- b) 세균: *Bulkhoderia gladioli*(세균성벼알마름병),
Pseudomonas marginalis(채소 무름병),
Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (감자 흑각병),
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*(토마토 궤양병),
Agrobacterium tumefaciens (뿌리혹병),
Ralstonia solanacearum (토마토 꽃마름병),
Xanthomonas campestris pv. *campestris* (배추 검은썩음병)

3) 방법

- 평판배지 검정법: 임업연구원으로부터 받은 추출물 농축액을 absolute ethanol로 녹여서 감자한천배지(PDA)에 적정량을 섞어서 곰팡이의 경우 추출물 10, 100, 1000, 2500, 5000 ppm으로 조정된 배지에 일정한 크기의 대상 곰팡이 균사조각을 올려놓고 72 시간 배양한 뒤 균총의 크기 측정. 세균의 경우 추출물 농도를 5000 ppm으로 맞춘 PDA에 대상 세균을 streaking한 다음 24 시간 및 48 시간 뒤에 균총의 형성 여부 조사. 대조구로는 추출물 배지의 absolute ethanol과 같은 양의 ethanol을 첨가한 PDA 사용.
- 억제율(%)은 곰팡이의 경우 추출물 배지의 균총 크기를 대조구의 균총 크기로 나누어서 구하고, 세균의 경우에는 균총의 출현 여부로 결정함

4) 결과

가) 곰팡이

- 비교식물인 쇠무를 추출물은 기준 농도인 1000 ppm에서 *M. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. parasitica*, *P. oryzae* 등의 생육을 90% 이상 억제하여, 검정 추출물 중 가장 좋은 항균성을 보였음
- 추출물의 농도 1000 ppm 이하에서는 모든 처리 조합에서 아무런 억제 효과도 나타나지 않았으며, 일부 처리에서는 오히려 곰팡이의 생육이 증가하기도 하였음. 단, 추출물 150-L이 *P. capsici*와 *B. cinerea*의 생육을 아주 조금 억제하는 것이 보였음.
- 2500 ppm에서 대조구 대비 60% 이상의 생장억제율을 보인 것은 114-L이 *P. capsici*에 대해서 69.9%, 114-B가 *B. cinerea*에 대해 61.0%, *R. solani*에 대해 60.6%, 그리고 118-L이 *P. capsici*에 대해 64.1%와 *R. solani*에 대해 78.0%이었음.
- 추출물의 농도를 2500 ppm으로 높이면 흑오미자(줄기), 초령목(잎) 등이 *M. fructicola* 등 4종 이상의 병원균의 생육을 90% 이상 억제하였음
- 5000 ppm에서는 좀 더 많은 처리 조합에서 대조구 대비 60% 이상의 생장억제율이 나타나, 114-L은 *P. capsici*의 균사생육을 73.9%, 억제하였으며, 43-D는 *C. gloeosporioides*를 65.0%, *R. solani*를 67.8% 억제하였고, 114-B는 *P. capsici*를 75.3%, *B. cinerea*를 64.1%, *R. solani*를 76.8% 억제하였음. 또, 114-W는 *C. gloeosporioides*를 60.1%, *R. solani*를 73.5% 억제하였고, 118-L은 *P. capsici*를 69.2%, *R. solani*를 78.5% 억제하였음. 118-B, 118-W, 150-L, 198-W는 모두 *R. solani*에 대해서만 각각 62.5%, 76.5%, 70.0%, 74.8%의 억제효과를 보였음.
- 오미자(꽃), 태산목(수피, 꽃), 함박꽃(수피), 일본목련(잎, 수피), 백목련(잎) 등은 1000 ppm에서 3가지 이상의 병원균에 대하여 90% 이상의 항균력을 보였음.

나) 세균(5000 ppm)

- 세균 Bg와 Xcc는 어떤 처리 조합에서도 다 잘 자랐으며, Pm에 대해서는 150-L만이 억제력을 보였음.
- 43-D와 114-B는 Ecc의 생육을 억제하였으나, 118-B와 209-W는 Ecc의 생육을 초기에만 약간 억제하여, 48 시간 뒤에는 세균들이 대조구와 다름없이 자랐음.
- 세균성 벼알마름병균에 대해서만 남오미자(잎, 줄기), 초령목(목부)만이 항균성

을 보였으며, 나머지 세균에 대한 항균성은 없었음.

- At와 Rs는 43-D, 114-B, 118-L, 118-W, 및 198-W에 의하여 생육이 억제되었음. 118-B는 Rs의 생육을, 114-L은 At의 생육을 억제하였음.
- 150-L을 제외한 모든 추출물은 Cmm의 생육을 억제하였음.
- 벼알마름병균에 대한 항균성도 추출물 농도 1000 ppm에서는 하루 이상 지속되지 않았음.

4) 결과요약 (1년차로 종결)

- 대부분의 추출물들이 곰팡이 *R. solani*와 세균 Cmm의 생육을 억제하고 있었음.
- 추출물들은 곰팡이보다는 세균에 대하여 작용 범위가 더 넓었음.
- 몇 종의 추출물만이 일부의 병원균에 대하여 생육 억제 효과를 보이고 있었음.
- 일반적으로 생장 억제력의 검정에서 대조구 대비 억제력 80%를 얻을 수 있는 조사물질의 농도가 1000 ppm을 넘으면 실용성이 없는 것으로 간주함.
- 따라서, 본 조사에서 특별히 주목할 만한 억제 효과를 보이는 추출물은 없었음.

사. 살충·살비활성물질 탐색(충북대 농생물학과)

1) 실험곤충의 확보 및 유지

스크리닝을 신속하고 원활하게 수행하기 위해서는 지속적인 스크리닝용 공시충의 확보 및 유지 실내사육이 대단히 중요하다. 이러한 요구에 발맞추어 본 실험실에서는 현재 4개목 5종을 사육하고 있다. 표 1은 1차 스크리닝 사용되고 있는 해충들과 그 사육방법을 간단하게 나타내고 있다.

Table 14. Rearing and maintenance method of test insects used in primary screening.

Korean name Dommon name Scientific name	Rearing cage (W×D×H)	Temperature(℃) & moisture(%RH)	Diet	Generation period(Days)
벼멸구 Brown planthopper <i>Nilaparvata lugens</i>	26×20×30 Acrylic Cage	27±2 50-60	Rice seedling	18-23
멸강나방 Rice armyworm <i>Pseudaletia separata</i>	26×29×30 Acrylic Cage	25±2 60-70	Silkworm artificial diet	40-45
배추좀나방 Diamond-backmoth <i>Plutella xylostella</i>	26×29×25 Acrylic Cage	27±2 50-60	Chinese cabbage	20-23
목화진딧물 Cotten aphid <i>Aphis gossypii</i>	40×45×55 Acrylic Cage	24±2 50-60	Cucumber	19-21
점박이용애 Two-spotted spider mite <i>Tetranychus urticae</i>	40×35×5 Acrylic Cage	24±2 50-60	Kidney bean	10-2

2) 실내 생물검정법 개발

가) 살충활성 검정

(1)벼멸구

과중 후 7-8일 된 동진벼 유묘 5 본의 뿌리 부분을 탈지면 띠로 감아 직경 3 × 길이 15cm의 유리 시험관의 바닥에 끼워 넣는다. 흡충기가 장착된 펌프를 이용하여 우화 후 3-5일 된 벼멸구 성충 10마리를 사육케이지로부터 채집하여 벼 유묘가 삽입되어 있는 시험관에 넣는다.

준비된 약액을 미세 살포기로 시험관의 입구 쪽에서 벼 유묘에 부착하고 있는 벼멸구를 향하여 직접 살포한다. 처리 후 시험관의 입구는 나이론 망사로 덮어 벼멸구의 탈출을 방지한다. 접종 후 25℃, 60% RH 조건에 보관하면서 공기 중의 살충율을 처리 후 24시간, 48시간에 조사한다.

(2)배추좀나방

직경 5cm의 원형으로 자른 신선한 양배추 잎 디스크(cabbage leaf disk)를 준비된 약액에 30초간 충분히 침적한 뒤 후드 내에서 건조한다. 깨끗이 건조한 후 디스크를 직경 5cm의 1회용 페트리 디쉬에 넣고 미세한 붓으로 10마리의 배추좀나방 3령 유충을 접한 후 뚜껑으로 꼭 밀폐하여 탈출을 방지한다.

접종 후 25℃, 60% RH 조건에 보관하면서 처리 후 24시간, 48시간의 살충율을 조사한다. 곤충 생육 저해 효과의 조사는 48시간 검정 후 신선한 먹이로 교체한 뒤 약액 처리 후 96, 120시간에서의 비정상적인 발육 및 살충율을 조사한다.

(3)멸강나방

직경 5.5cm, 또는 10cm의 원형으로 자른 신선한 양배추 잎 디스크를 준비된 약액에 30초간 충분히 침적한 뒤 후드 내에서 건조한다. 깨끗이 건조한 후 디스크를 직경 5.5cm, 또는 12cm의 1회용 페트리 디쉬에 넣고 끝이 날카롭지 않은 편셋으로 5 또는 1마리의 멸강나방 3령 유충을 접종한 후 뚜껑으로 꼭 밀폐하여 탈출을 방지한다.

접종 후 25℃, 60% RH 조건에 보관하면서 처리 후 24, 48 시간의 살충율을 조사한다. 곤충 생육 저해 효과의 조사는 48 시간 검정 후 신선한 먹이로 교체한 뒤 약액 처리 후 96, 120 시간에서의 비정상적인 발육 및 살충율을 조사한다.

(4)목화진딧물

직경 5.5cm의 원형으로 자른 신선한 오이 잎 디스크(cucumber leaf disk)를 준비된 약액에 30초간 충분히 침적한 뒤 후드 내에서 건조한다. 깨끗이 건조한 후 디스크를 직경 5.5cm의 1회용 페트리 디쉬에 넣고 미세한 붓으로 10마리의 목화진딧물 암컷 성충을 접종한 후 뚜껑으로 꼭 밀폐하여 탈출을 방지한다.

접종 후 25℃, 60% RH 조건에 보관하면서 처리 후 24, 48시간의 살충율을 조사한다.

(5)점박이용애

직경 2.5cm로 자른 강낭콩 잎 디스크를 직경 5.5cm의 페트리 디쉬 내에 놓여 있는 물을 충분히 적신 탈지면 위에 올려 놓고, 미세한 붓을 점박이용애 성충 암컷 30마리를 접종한다. 그 후 후드 내에서 소형 스프레이로 엽면이 충분히 젖을 정도로 살포한 후 건조시킨다. 처리 후 25℃, 60% RH 조건에 보관하면서 처리 후 24, 48 시간의 살충율을 조사한다.

살란 효과의 검정을 위하여 처리일 하루 전 약제 처리시에 준비되는 동일한 형태의 디스크에 암컷 성충 10마리를 접종하여 일정 시간 산란을 받은 후 성충을 제거한 뒤 약액을 처리하고 처리 후 7일까지의 살란율을 조사한다.

3) 살충·살비활성물질 탐색

1차스크리닝 19개의 화합물중 43D화합물이 멸강나방에 대해서 1250ppm에서 73.3%의 활성을 나타내어 계속해서 분리 및 활성검정이 요구된다.

Table 15. Primary screening

CHEMICAL REF.	SOLVENT	CONC. (ppm)	MOTILITY(%)					
			DBM ^{a)}	CA ^{b)}	TSSM ^{c)}	RAW ^{d)}		BPH ^{e)}
						48h	72h	
43D	Ethanol	5000	0	50	30.8	95	100	0
114L	Ethanol	5000	0	30	5.7	0	0	0
114B	Ethanol	5000	0	10	5.4	10	10	0
114W	Ethanol	5000	0	10	26.9	25	45	0
118L	Ethanol	5000	5	20	15.8	20	70	0
118B	Ethanol	5000	0	45	47.5	50	65	0
118W	Ethanol	5000	0	10	18.7	20	20	0
150L	Ethanol	5000	0	50	18.1	0	0	0
150W	Ethanol	5000	0	0	67.5	0	0	10
198W	Ethanol	5000	0	60	65.3	60	60	0
209W	Ethanol	5000	0	35	15.0	0	0	0
7T	Ethanol	5000	5	5	46.4	0	0	0
8T	Ethanol	5000	0	5	30.8	0	5	5
8F	Ethanol	5000	0	0	9.1	0	5	5
8L	Ethanol	5000	0	0	12.9	0	5	5
9B	Ethanol	5000	0	5	23.6	5	0	0
9W	Ethanol	5000	0	0	22.5	10	0	0
10A	Ethanol	5000	0	5	25.9	0	5	5
10R	Ethanol	5000	0	0	7.0	0	0	0

a) Diamondback moth(배추좀나방)

b) Cotton aphid(목화진딧물)

- c) Two-spotted spider mite(점박이응애)
- d) Rice armyworm(멸강나방)
- e) Brown planthopper(벼멸구)

Table 16. Selection screening

CHEMICAL REF.	SOLVENT	CONC. (ppm)	MOTILITY(%)	
			RAW	
			24h	48h
43D	Ethanol	5000	86.5	100
		2500	83.3	86.7
		1250	16.7	73.3

4) 고찰 및 결론(1년차로 종결)

본 연구에서는 목련과 수목으로부터 성인병 치료물질(o) 및 살충/살비에 미치는 활성 물질의 분리 및 활성 검색을 수행하였다.

목련과 수목으로부터 생리활성 분획 및 단일성분의 분리, 화학구조 동정은 임업연구원(이학주 박사팀)에서 수행하였다.

목련과 수목의 생리활성 분획에 대한 dopamine 생합성 조절 작용을 검토한 결과, 수종의 엑스에서 PC12 세포중의 dopamine 감소작용을 나타내었으며, 이중 단일성분 MB-1-1 화합물(20 mg/ml, 2-5 μ l)이 PC12 세포중의 dopamine 함량 증가 작용(130-160%)을 나타냈으며, dopamine 생합성 효소 TH의 활성을 105-115% 증가 작용을 나타내었으며, MB-1-1 화합물은 저용량에서는 dopamine 함량 증가작용, 고용량에서는 neurite outgrowth 유도작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

MB-1-1(20 mg/ml, 5-10 μ l, coumarin 유도체) 및 MKB-2-5(20 mg/ml, 2-5 μ l, lignan 유도체) 화합물은 PC12 세포중의 neurite outgrowth 유도작용을 나타내었으며, neurite outgrowth 유도작용은 NGF와의 병용 투여시 현저한 증가작용을 나타내었다. 또한, MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물의 neurite outgrowth 유도작용은 PKA, PKC 및 MAPK 저해제에 의하여 억제작용을 나타내었다. 이는 MB-1-1 및 MKB-2-5의 neurite outgrowth 유도작용은 NGF 수용체를 매개로하여 생리활성을 나타내는 것으로 사료되며, 이와 관련한 연구를 진행 중에 있다. 따라서, MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물은 퇴행성 중추신경계 질환(파킨슨씨 질환 등), 스트레스 등의 치료제/기능 개선제 개발에의 응용 가능성을 나타낸 것으로

사료되며, 이와 관련한 추가연구를 진행할 계획이다.

목련과 수목의 엑스에 대한 항당뇨 효능 검색(α -glucosidase 및 α -amylase에 대한 저해활성 검색)을 시행한 결과 198W 및 4W 분획(자목련 분획시료)이 α -glucosidase 특이 저해작용을 나타내어 당뇨병 치료제 개발의 선도물질 확보의 가능성을 나타내었다. 또한, 209W 분획(일본 목련 분획시료)은 Raw 264.7 세포로부터 분화된 macrophage의 nitric oxide 생성 유도작용 및 TNF- α 사이토카인 분비 촉진작용을 나타내어 강력한 암세포 분화 유도 효과 및 면역증강효과를 보여주고 있다. 그러나, 생리활성 물질의 분리, 연구시간 등의 어려움으로 인하여 1-2 차년도까지 연구를 수행하였으며, 향후 이 분야는 추가연구의 필요성이 있다고 사료된다.

Cancer cell에 대한 세포독성의 측정에 의한 항암작용을 측정된 결과 목련과 수목자원은 유의적인 생리활성을 나타내지 않았다(1차년도). 또한, 목련과 검색 엑스시료를 이용하여 고지혈증에 대한 활성검색을 수행한 결과 유의성 있는 저해작용을 나타내지 않았다(1차년도). 따라서 이 2개 분야는 1 차년도에서 연구사업을 중단하였다.

본 연구를 종합하면 MB-1-1 화합물은 저용량에서는 dopamine 함량 증가작용, 고용량에서는 neurite outgrowth 유도작용을 나타내며, MKB-2-5 화합물은 neurite outgrowth 유도작용을 나타내고 있음을 밝혔다. 이는 MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물이 퇴행성 중추신경계 질환(파킨슨씨 질환 등), 스트레스 등의 치료제 및 기능개선제 개발에의 응용 가능성을 나타내고 있음을 제시하고 있다.

MKB-2-5 화합물은 국내 특허출원(출원번호: 2004-0036492, -0036493; 2004.5.21) 하였고, MB-1-1 화합물은 특허출원 준비 중에 있으며, 생리활성 물질(MB-1-1/MKB-2-5)의 in vitro 작용기전 및 in vivo 응용연구(퇴행성 중추신경계 질환 모델)를 진행하고자 하며, 이 연구결과를 종합평가하여 질환 증상개선을 위한 제품화연구를 추진하고자 한다. 또한, MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물의 화학구조를 lead compound(s)로 하여 유도체 합성하고 생리활성 검색을 진행하여, 독성이 낮고 효능이 증가된 새로운 생리활성 물질의 도출 연구에 응용하고자 한다.

제4절 유전자분석(충북대 산림과학부)

1. 서론

한방의학에서 목련은 코 질환에 최고의 치료제로 처방되고 있으며, 꽃봉우리와 열매, 줄기, 뿌리를 모두 약으로 쓴다. 특히 목련의 꽃봉우리인 신이(辛夷)는 한의 약 재료로서 오랜 이용 역사를 갖고 있으며, 신이, 신이산, 신이교, 백지, 방풍, 승마, 천궁, 세신 등의 비염계통 질환에 대한 처방에 주재료로 사용되어 왔다. 동의 보감에는 신이쾌비환이라는 축농증 및 비염 처방이 기재되어 있다.

본 연구에서 목적하는 바는 화기발달과정에서 발현되는 유전자와 약리성분 함유 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 탐색하는 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

한국 자생수종인 목련(*Magnolia kobus*)을 공시수종으로 삼았다. 공시개체는 경기도 수원시 서둔동 소재 구 서울대학교 농업생명과학대학 구내에 심겨져 있는 약 30-40년 수령의 단일 개체로서, 2002년부터 2004년까지 동아와 꽃, 열매, 잎, 수피 등을 채취하여 초저온보관하여 필요에 따라 사용하였다.

나. cDNA library 제작

단일 cDNA library에서 clone 유래 조직을 확인할 수 있도록 조직특이 태그를 붙여 cDNA를 합성한 후, 이를 합쳐서 단일한 library로 제작하였다. cDNA library construction kit로는 ZAP Express cDNA Synthesis Kit and ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit(Stratagene, USA)를 제조사의 지시를 따라 필요한 수정을 가하여 사용하였다. first strand cDNA synthesis에는 조직마다 개별적으로 sequence tag를 붙여 합성하고, 이를 합친 후 second strand cDNA synthesis부터는 지시와 동일하게 수행하였다(Stratagene Instruction Manual #200403-12). 기본적인 실험방법은 Sambrook and Russel(2001)과 Fernandez 등(2003)을 따라 수행하였다.

1) Linker primer의 sequece tag 설계

ZAP Express cDNA Synthesis Kit 내용물 중 first strand cDNA synthesis에

사용되는 oligo-dT 프라이머는 5'-(GA)₁₀ACTAGTCTCGAG(T)₁₈의 염기서열로 구성되어 있다. *XhoI* 제한효소자리(C'TCGA_G)를 삽입한 ACTAGTCTCGAG와 (T)₁₉의 사이에 4개의 염기로 구성된 조직특이 서열태그를 삽입하여 5'-(GA)₁₀ACTAGTCTCGAG tagx (T)₁₉의 구조로 된 8개의 *XhoI*-linker oligo-dT primer를 제작하였다(Table 1).

Table 1. Tissues and their specific sequence tags used in cDNA library construction.

Tissue	Tissue Code	Tag Code	Tag sequence
Flower bud, Summer	SFB	XL1	ACTG
Flower bud, Winter	WFB	XL2	CTGA
Flower, Closed	CFL	XL3	TGAC
Flower, Opened	OFL	XL4	GACT
Fruit, Green	GFR	XL5	TCAG
Bark, Summer	SBK	XL6	GTCA
Leaf, Summer	SLE	XL7	AGTC
(Spare)	-	XL8	CAGT

2) RNA 추출과 정제

2002년부터 2003년까지 수집된 화아(겨울), 화아(여름), 꽃(개화), 꽃(폐쇄), 열매, 수피, 잎을 조직별로 나누어 Tri-reagent(Sigma, USA), 또는 Guanidine-silica column(Quiagen, USA) 방법으로 total RNA를 200~1000ug 추출하고, PolyAtract mRNA isolation kit(Promega, USA)를 사용하여 2-5ug의 mRNA로 정제하여 cDNA 합성에 사용하였다.

3) cDNA library 작성

우선 각 7개의 mRNA를 해당 Tag가 붙은 *XhoI*-Linker 프라이머로 first strand cDNA를 합성하였다. 이때 필요한 5'-methyl dCTP는 Roche에서 별도로 구매하여 적정농도로 조제하여 사용하였고, RNase Block은 Ambion(USA)의 SUPERaseIn으로 대체하였다. 42℃에서 1시간 StrataScript reverse transcriptase(Stratagene, USA)로 역전사한 후, 7개의 반응액을 모두 모아 Phenol/Chloroform 정제한 후, 1/7으로 부피를 줄여 second strand cDNA를 합성하였다. Size fractioning은 500bp 길이를 기준으로 용출하고, 300~1500ng/ul 농도

의 10개의 프랙션을 모아 ZAP vector에 결합시킨 후, *E.coli* XL1-Blue MRF'과 XL0LR를 기주로 mass excision시켜 pBK-CMV 형태의 plasmid 풀로 변환시켰다. cDNA library plasmid 풀을 *E.coli* DH10B에 electroporation시켜 얻은 colony를 120개의 384well microwell plate에 picking하고 -80°C 초저온에 보관하였다(총 콜로니 : 120x384=46,080).

4) 고밀도 cDNA colony array 제작

384well microplate에 피킹한 colony는 MicroGrid II TAS arrayer(BioRobotics, UK)를 사용하여 222x222mm²의 PerForma II positive charged nylon membrane(Genetix, UK)에 double spot으로 9,216colony/sheet의 밀도로 집적하여 alkali-lysis시키고 UV-cross linking(XL-1500, Spectronic Corporation, UK)시켰다. 한세트당 4장의 멤브레인, 총 3세트를 제작하였다.

다. Differential Screening

1) 2 Types of screening probe

일반적으로 고밀도 colony array(High Density Colony Array, HDCA)의 differential screening은 검색에 사용하는 탐침의 성질에 따라 결과가 좌우된다. 본 연구처럼 모든 transcripts를 탐침으로 삼아야 하는 경우, mRNA pool 중 본 연구에 유의미한 transcripts의 발현을 감지하기 위해서는, 그 transcripts의 농도가 일정수준 이상 되어야 하며, 동시에 다른 transcripts의 농도는 일정수준 이하로 억제되어야 신호대잡음비가 높은 시그널을 감지할 수 있다. 이런 목적에 subtractive hybridization, suppression subtractive hybridization, PCR-select subtractive hybridization 등의 subtraction에 의해서 발현의 유무와 정도가 차이가 있는 transcripts를 걸러내는 방법이 사용되고 있으며, 본 연구에서는 PCR-select subtractive hybridization으로 탐침을 만들어 사용하였다.

한편, 부위 조직별(또는 발달단계에 따른 시계열 조직별) 유전자의 발현양의 상대적인 비교를 위해서는, 탐침의 transcripts pool 속에 들어있는 각 transcripts간의 상대적인 양이 편향되지 않아야 하므로, subtraction을 하지 않은 mRNA pool 전체를 탐침으로 사용하는 것이 좋다. 이를 위해서 각 시험조직간에 양적으로 표준화시킨 mRNA pool에서 직접 역전사시켜 표지시킨 first strand cDNA pool을 또다른 탐침으로 사용하였다.

2) RNA 추출과 mRNA 정제

각 조직으로부터 Tri-reagent(Sigma, USA)를 사용하여 각각 200ug가량의 total

RNA를 추출하고, 여기서 PolyAtract mRNA isolation kit(Promega, USA)를 사용하여 각각 22-25ug mRNA를 정제하였다. A260/A280(Hitachi U2001 spectrophotometer, Japan) 값으로 측정된 순도는 모두 6.06~8.12로 매우 높았다.

3) 1차 스크리닝

1차 스크리닝은 PCR-select subtractive hybridization(Clontech, USA)으로 탐침을 만들어 실시하였다. 수피(SBK), 동아(WFB), 꽃(OFL), 열매(GFR) 등 4종의 조직으로부터 얻은 mRNA를 tester로, 잎(SLE)에서 얻은 mRNA를 driver로 사용하여, 4종류의 subtraction 반응을 시켰다. 각각에서 얻은 double stranded cDNA 100ng씩을 ³²P로 표지하여(RediPrime random priming kit, Amersham) HDCA 멤브레인 필터에 증합시켰다.

hybridization은 50ml 부피의 Aqueous hybridization buffer(5X SSPE, 5X Denhardt's sol'n, 0.5% SDS, 100ug/ml herring sperm DNA)에 65°C, 16시간 반응 후, 2X washing buffer(2X SSC, 0.1% SDS)로 1시간씩 2회, 1X 1시간, 0.5X 1시간, 마지막으로 0.2X 1시간 반응시켰다. 이 필터를 blue intensifying screen과 X-ray film에 끼워 -80도로 적절한 시간이 지난 후 현상하였다.

여기서 시그널이 감지된 clone들은 한데 모아 별도의 384well microplate로 rearray하여 2차 스크리닝을 위한 멤브레인 필터를 앞서와 동일한 방법으로 제작하였다.

4) 2차 스크리닝

더 세밀하게 기관조직에 따른 상대적 발현을 비교하기 위해서, 탐침 RNA를 10개로 세분화시킨 조직에서 추출하여 화기조직별, 영양조직별, 과실부위별 발현을 스크리닝하였다.

1차 때와 비교하여, 필터의 면적이 크게 줄어들었기 때문에(1/20 이하), 소량의 탐침으로도 스크리닝이 가능하게 되었다. 발현의 여부를 판정하는 것이 주 목적인 1차 스크리닝과 달리, 대략적인 정량 비교를 가능하게 하기 위하여 별도의 비편향 탐침을 제작하였다.

이 목적을 위해서, mRNA로부터 직접 ³²P로 표지된 first-strand cDNA 탐침을 제작하였다. 화기 중에서 anther, stigma, petal(sepal), floral base, winter flower bud, 영양조직 주에서 winter leaf bud, leaf, bark, 열매 중에서 과피와 종실 등 모두 10개의 조직으로부터 RNA를 추출하였다. 각각의 mRNA 0.5ug 씩을 ³²P-dCTP와 oligo-dT / random hexamer 혼합 프라이머를 사용하여 HotScribe first strand cDNA labeling kit(Amersham)로 표지시켰다. membrane hybridization은 1차 스크리닝과 동일한 방법으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. cDNA library 작성

RNA추출 조건을 잡기 위하여 Guanidine-silica based column(Quiagen, RNAEasy Plant)방법과 Tri-reagent(Sigma)를 사용한 방법을 각기 시험한 결과, RNAEasy 컬럼은 GLT lysis buffer와 50mg sample/column의 조건을 사용하였을 때, 조직당 5-20ug의 total RNA를 얻을 수 있었다. 이것은 필요량을 충족시킬 수 없어 Tri-reagent를 사용하여 1-2g 규모로 늘여 조건을 잡았다. 잎, 꽃, 동아의 경우는 제조사의 지시에 따라 충분한 양(>500ug)과 품질의 RNA를 얻었으나, 수피와 열매에서는 적합하지 않아 RNAEasy 컬럼을 병행사용하여 필요량을 추출하였다. 이를 Oligo-dT Streptavidin-magnetic bead(Promega, USA)로 mRNA를 분리시켜 품질을 높여 사용하였다(Figure 1).

이렇게 해서 작성된 Tagged cDNA library 클론의 길이 분포는 250bp~4000bp, 평균 1.1kb로서(Figure 2), EST library 작성에 충분한 길이였다.

384well microplate로 피킹된 콜로니 수는 46,080개였으나, plasmid로 변환시켜 pool로 보관한 라이브러리는 향후 규모를 늘일 필요성을 대비하여 3×10^4 cfu/ul titer로 400ul 부피, 총 10^7 cfu이상의 플라스미드 풀을 확보해 두었다.

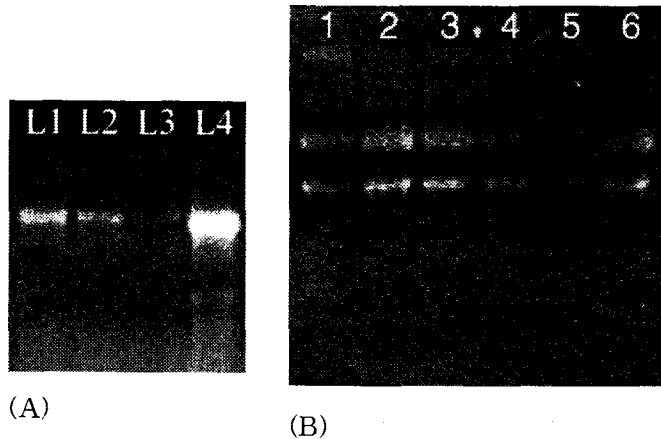
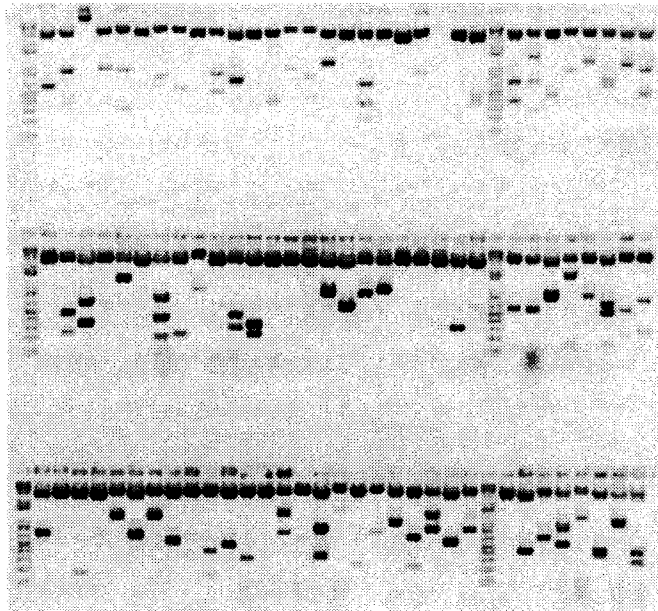
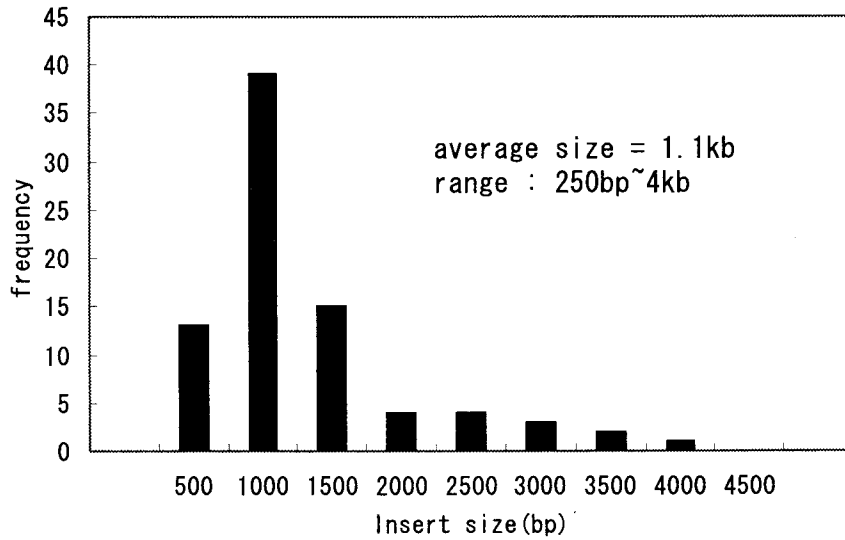


Figure 1. Optimization for RNA extraction(A) and integrity of RNA sample from various tissues(B). (A) L1 : GLC buffer with 30mg sample, L2 : GLC buffer with 50mg, L3 : GLT buffer with 30mg, L4 : GLT buffer with 50mg. (B) SFB(1), WFB(2), CFL(3), OFL(4,5), SLE(6).



(A)

Size distribution



(B)

Figure 2. Size distribution of *Magnolia kobus* tagged cDNA library. 200 clones from the library were digested by *EcoRI/XhoI* and runned on 1.5% agarose gel(A). Their length distribution was skewed to left hand centering near 1kb size(B).

나. 조직특이 발현 유전자 스크리닝

1) 1차 screening

수피, 동아, 꽃, 과실을 tester로 1차 스크리닝한 결과의 예시는 Figure 3과 같다. 모두 2,409clone의 시그널이 감지되었고, 이중 중복되는 것을 제외하면 총 1,536clone이 선발되어 2차 스크리닝에 사용되었다(Table 2). 조직별 발현 클론 수는 꽃, 동아, 열매, 수피의 순으로 많았고, 동아와 꽃은 중복되는 클론이 많았다.

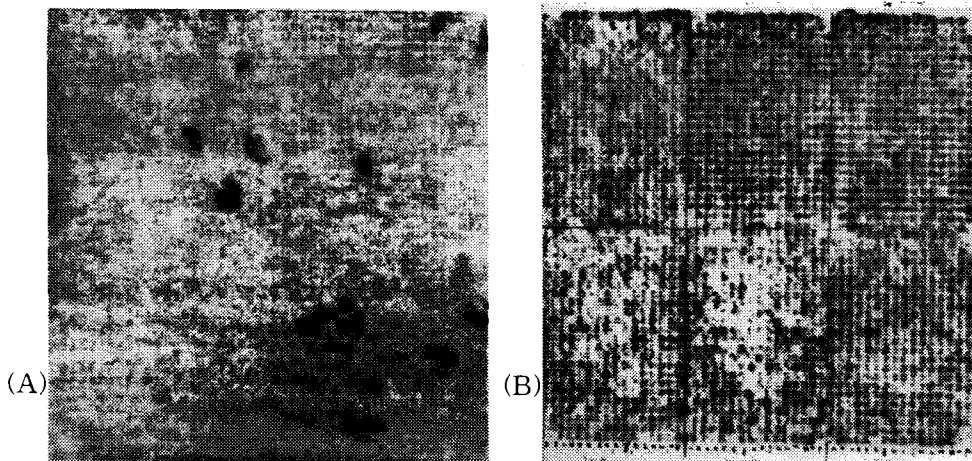


Figure 3. Subtractive differential screening of *Magnolia kobus* HDCA. Subtracted probe of SBK as tester(A), and WFB as tester(B).

Table 2. Number of positive clones screened with PCR-select subtracted cDNA pool as probes.

Tester*	High intensity**	Low intensity	Total
SBK	57	113	170
WFB	441	505	946
OFL	320	690	1,010
GFR	84	199	283
Total number			2,409
Total number of unique clones			1,536

* 3 lettered abbreviation for tissue : SBK, summer bakr; WFB, winter flower bud; OFL, opened flower; GFR, green fruit. Each tester mRNA pool was

subtracted to mRNA pool from leaf tissue. ** High intensity, readily distinguishable after 16 hour-exposure; Low intensity, distinguishable after 48hour-exposure.

2) 2차 스크리닝

1차 스크리닝에서 걸러진 1,536개의 클론을 4개의 384well microplate로 옮기고, 이것을 다시 나일론 멤브레인에 집적하여 2차 스크리닝에 사용하였다. 그 결과 잎(Figure 3-C)에서 가장 많은 유전자가 강하게 발현되고 있었으며, 동아(Figure 3-F)와 엽아(Figure 3-E)에서도 많은 수의 유전자가 강하게 발현되고 있었다. 이와 달리 수피(Figure 3-D)에서는 매우 적은 수의 유전자가 약하게 발현되고 있음이 관찰되었다. 꽃과 동아에서는 대부분이 중복되어 발현되고 있었다.

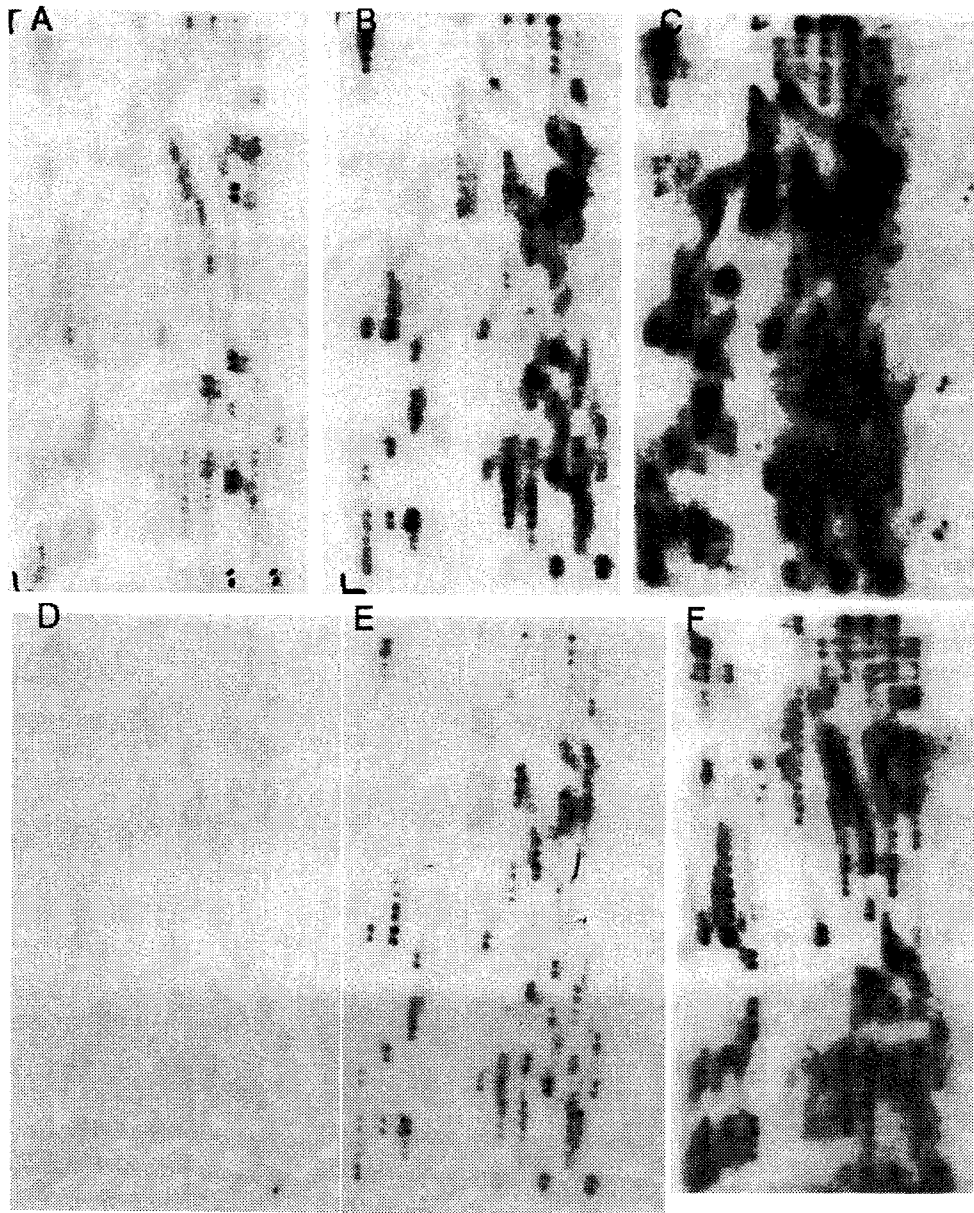


Figure 4. 2nd screening of rearranged *Magnolia kobus* tagged-cDNA library. Probe : anther(A), sepal(B), leaf(C), bark(D), leaf bud(E), winter flower bud(F).

3) Blastx 기능예측

2차 스크리닝에서 걸러진 cDNA 클론 중에서 조직별로 중복되어 발현되는 클론을 제외하여 특이적으로 발현되는 것으로 관찰된 클론 중 200개를 모아 염기서열을 분석하고, 이중 화아와 수피에서 특이적으로 발현되는 클론 중 sequence tag가 화아와 수피의 것과 일치하는 클론 각 10개씩에 대해 blastx로 검색한 결과를 Table 3에 나타내었다. FPMK001~FPMK005까지 5개의 클론은 잘 알려진 화기발달 관여 유전자들이었으며, FPMK012~FPMK015까지 4개는 이차대사와 관련이 있는 유전자들이었다.

Table 3. EST clones which were supposed to be expressed different in winter flower bud and bark tissues, and it's blastx results.

Clone#	Tissue*	Blast:GenBank	Putative function	E-value
FPMK001	WFB	gi3688588	MADS box transcription factor[<i>Triticum aestivum</i>]	4.00E-02
FPMK002	WFB	gi32478069	euFul FRUITFULL-like MADS-box[<i>Petunia x hybrida</i>]	2.00E-39
FPMK003	WFB	gi1005203222	alpha nascent polypeptide associated complex(NAC)-like protein [<i>Rosa chinensis</i>]	2.00E-01
FPMK004	WFB	gi34907685	putative ovule development protein aintegumenta-like protein[<i>Oryza sativa</i>]	1.00E-11
FPMK005	WFB	gi1944513	Homologous to the Myb class of transcription factors	
FPMK006	WFB	gi21326759	chalcone synthase [<i>Lilium hybrid division I</i>]	2.00E-04
FPMK012	SBK	gi49659441	gamma-terpinene synthase	8.00E-66
FPMK013	SBK	gi38092203	geraniol synthase[<i>Cinnamomum tenuipilum</i>]	1.00E-60
FPMK014	SBK	gi3108342	sesquiterpene cyclase [<i>Capsicum annum</i>]	1.00E-03

FPMK0 15	SBK	gi4808126	phenylalanine-ammonia lyase [<i>Citrus sp.</i>]	8.00E-3 4
-------------	-----	-----------	--	--------------

* WFB : winter flower bud; SBK : summer bark

특히 FPMK012, 013, 014는 모두 terpene 대사와 관계가 있는 유전자들과 유사도가 매우 높았다. 목련의 화아와 수피의 약리적 성질은 “쓰며(辛) 맵다”로 풀이되는 데, 이러한 성질에 관여하는 화학적 성분은 terpene류와 phenol류로 여겨지며, 목련(*Magnolia kobus*), (자목련)*M. liliflora*의 신이(辛夷)는 terpene류가 주 약효성분인 것으로 추정되었고, 수피를 사용하는 당후박(*M. officinalis*)과 일본목련(*M. obovata*)의 경우는 eudesmol등의 triterpen류와 magnolol과 honokiol등의 biphenol류가 주 약효성분인 것으로 알려져 있다.

terpenoid 중에서 분자생물학적으로 연구가 되어 있는 식물은 박하류(*Mentha*)와 레몬이다(Joost Lucker 등,2002). 가장 많이 분리된 유전자는 limonene synthase이고, β -pinene과 ν -terpene 합성에 관여하는 다수의 유전자가 보고되어 있다. 이중 limonene synthase등은 유전자 재조합기술을 이용하여 향기성분의 대량생산에 이용될 수 있음이 보고되어 있다(Tamer, 2002).

4. 결론

한국 자생수종인 목련(*Magnolia kobus*)에서 동아, 수피, 꽃, 열매에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 걸러서, 이중에서 동아(辛夷)와 수피에서 특이적으로 발현되는 유전자를 검색한 결과 동아와 수피에서 특이적으로 발현되는 유전자 각 10개씩을 발견하였고, 이중 10개가 알려져있는 유전자 서열과 유의한 유사성을 갖고 있었다. 동아에서 발견된 유전자 중 4개는 화기의 분화와 발달에 관계된 유전자, 나머지 하나는 chalcone synthase였다. 수피에서 발견된 유전자 5개는 모두 이차대사와 관련된 것이었다. 나머지 10개는 알려진 유전자들과 유의한 유사성을 보이지 않았다. 수피에서 특이적으로 많이 발현되는 유전자 5개는 이차대사의 기본경로 효소인 PAL외에는 4개가 모두 terpene 대사와 관련이 있는 것이었다. 이것은 “맵고 쓰다”는 목련의 생약 성질과 잘 부합하는 결과라고 판단되며, 이 유전자들의 개발 가능성이 큼을 암시하고 있다.

제5절 형질전환에 의한 유용물질의 생산 (제2협동, 전남대)

1. 서론

오미자(*Schisandra chinensis*)는 중국, 대만, 일본, 그리고 한국에 자생하는 자원식물로 관상용 또는 약용을 목적으로 널리 재배되어지고 있다. 민가나 한방에서는 주로 열매를 음경(陰莖), 해수(咳嗽), 단독(丹毒), 자양(滋養), 수검(收斂), 수체(瘦體) 등의 약제로 사용하고 있다. 오미자에서 생합성되는 주요 약리성분으로는 citrol, schizandrin, schizandrol, r-schizandrin, gomisin A-H, gomisin J, gomisin K, gomisin O, angeoylgomisin Q, pregomisin 등이 있으며, 이들은 항산화작용, 간장해 억제작용, 항암작용, 항균작용, 그리고 중추신경계에 있어서의 작용을 하는 것으로 알려지고 있다(Hancke et al., 1999).

다양한 형질전환 기술과 분자생물학적 기법, 식물조직배양기술등을 이용하여 자원식물로부터 고부가치의 약리물질을 생산하려는 연구전략은 생태환경에 의존적인 기존의 노지재배나 인위적인 유기합성등의 한계점을 극복할 수 있을뿐만 아니라 생물변환(biotransformation)을 통한 특정 물질의 획득이나 식물조직 자체를 일종의 생체반응시스템으로 활용하여 저비용으로 고부가가치 약리물질을 생산해내는 산업화기반기술로써 인식되어지고 있다. *Agrobacterium rhizogenes*는 토양에 서식하는 그램음성세균으로 식물호르몬과 아미노산유도체의 생합성에 관련된 유전자를 포함하는 T-DNA를 숙주식물의 게놈내로 전이시켜 부정근(일명 모상근이라 부름)을 유도하는 것으로 알려지고 있다(Chilton et al., 1982; Brillanceau et al., 1989). *A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 부정근은 세포내 호르몬의 생합성량의 급격한 증가로 인해 형태적으로 매우 가늘고 분지화가 급속히 이루어지는 특징을 보여준다. 이와같이 정상적인 뿌리에 비해 빠른 성장속도는 배양과정에서 배가시간(doubling time)을 현저하게 단축 시키게 됨은 물론 세대간 유전적인 안정성이 유지되고, 이차대사물질의 생합성능 또한 탈분화된 배양세포에 비해 매우 높기 때문에 약용자원식물로부터 유용물질을 얻는데 널리 활용되어지고 있다(Chilton et al., 1982; Hamill et al., 1987; Maldonado-Mendoza et al., 1993; Arellano et al., 1996). 형질전환된 뿌리의 배양을 통한 천연약리소재의 생산은 탈분화된 체세포조직을 이용할 때와 달리 배지내에 합성호르몬을 첨가할 필요는 없지만 물질의 생산성을 극대화 하기 위해서는 기본적으로 다양한 물리화학적 배양조건들 가령, 배지성분, 초기 pH, 온도조건, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조건에 대한 검토가 필요하다.

본 연구에서는 국내에 자생하는 오미자에 대한 형질전환을 통하여 부정근을 유도하고, 이를 배양하여 약리효과가 입증된 단리물질인 gomosin J의 생합성을 검정함으로써 오미자로부터 생합성되는 특정 약리소재의 대량생산을 위한 기초

자료를 얻고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 형질전환

기내(*in vitro*)에서 무균발아 후 8주 정도 자란 오미자(*S. chinensis* Baill)의 유묘의 각 부위를 절취한 후 감자추출물배지에서 24시간 동안 배양된 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834와 36시간 암소(25±1℃)에서 공조배양하였다. 균이 감염된 조직절편은 무균수에서 2회 세척 후 300 mg^l-1 cefotaxime sodium(Claforan, Handok Pharm., Korea)이 첨가된 1/2MS배지에 치상 하였다(Hwang et al, 2002).

나. 형질전환근의 증식

공조배양된 조직절편으로부터 유기된 부정근은 절취하여 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2MS배지에 300 mg^l-1 cefotaxime sodium이 첨가한 기본배지에 치상한 후 4주 동안 배양하면서 균을 완전히 제거한 후 정단부위로부터 1.5 cm 가량을 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 MS(Murashige and Skoog, 1962)고형배지로 옮겨 증식 시켰다. 한편, 숙주식물의 조직절편으로부터 유기된 부정근에 대한 형질전환 유무는 opine분석과 PCR 방법을 이용하여 확인하였다.

다. 형질전환근의 배양

형질전환된 뿌리의 성장과 물질의 생산성을 극대화 할 수 있는 배양조건을 찾기 위해서 기본배지로는 MS배지, 1/2MS배지, MS배지의 미량원소를 B₅배지의 성분으로 교체한 MB₅배지, WPM(Lloyd and McCown주, 1980)배지, B₅(Gamberg et al., 1968)배지, 그리고 N6배지(Chu et al., 1972)를 사용하였으며, 배지내 탄소원의 농도는 1%부터 7%까지 처리 하였다. 또한 초기점종 농도에 의한 영향을 확인하기 위하여 정단부위를 중심으로 0.1, 0.5, 1, 2 g (F.W)을 각각 절취하여 40 ml 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 모든 배양은 80, 100, 120, 140 rpm 속도로 진탕배양기(26±1℃) 내에서 수행하였으며, 2주간격으로 1/3 가량을 새로운 배지로 교환해주었다.

라. 세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 8주 동안 배양된 형질전환근을 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량(F.W)과 냉동건조기에서 48시간 건조한 후 측정된 건물중량(D.W)으로 나타내었다.

마. 물질분석

오미자의 형질전환근으로부터 리그난 성분의 분석은 8주 배양된 뿌리를 수집하여 냉동건조 후 막자사발에서 마쇄한 다음 분말시료 0.5 g에 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 가열하여 추출하였다. 3회 연속 같은 방법으로 얻은 메탄올 추출물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 Table1)과 같은 조건하에서 HPLC(Shimazu, Tyokyo, JAPAN)를 이용하여 분석하였다. 이때 gomisins J의 표준시료는 임업연구원에서 단리한 것을 분양 받아 사용하였다.

Table 1. Operational conditions of HPLC for analysis of gomisins-J in suspension
cell cultures of *Schisandra chinensis*

Instrument	HPLC (Shimazu, Tokyo, Japan)
Column	Cellpak C18
Mobile phase	Acetonitrile : water (1:1)
Flow rate	1 ml/min
Detection	UV 252 nm
Sensitivity	0.05 AUFS

바. 통계처리

통계처리는 SAS(Statistical analysis system) package를 이용하여 ANOVA test를 시행한 후 유의수준 $p < 0.05$ 범위에서 결과들의 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

기내(*in vitro*)에서 발아된 유묘는 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에서 8주간 배양한 다음 뿌리를 제외한 줄기와 잎을 절취하여 Ri-plasmid를 갖는 *A. rhizogenes* ATCC15834를 처리하였다. 균과의 동조배양 시간을 24시간에서부터 72시간까지 늘려가면서 처리하였을 때 36시간 동조배양한 실험구에서 부정근이 유기되었다. 동조배양 시간이 48시간 이상 주어질 경우 식물조직의 괴사현상이 심하게 나타나 상처부위의 재생능력이 크게 감퇴하였다. *Agrobacterium* spp.에 의한 형질전환율은 접종방법, 박테리아의 종류, 숙주식물체의 유전적 특성이나 조직의 상태, 배양조건과 같은 다양한 요인들에 의해 차이를 나타낸다(Failla et al., 1990). 오미자의 조직절편으로부터 부정근의 유기율은 10% 이하로 매우 낮았으나 형성된 부정근의 90% 이상에서 opine의 생합성과 계놈내 T-DNA의 삽입을 확인할 수 있었다(data not shown). 조직절편으로부터 유기된 부정근은 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/2MS배지로 옮겨 초기 배양을 행하였다. 야생형 *A. rhizogenes* 균주에 의해 형질전환된 부정근의 경우 대부분 성장속도가 매우 빠르고 분지화가 지속적으로 이루어지기 때문에 형태상으로 뿌리의 굵기가 매우 가늘며 배가시간이 1일에서 일주일 정도로 나타나는 게 일반적인 특징이다(Maldonado-Mendoza et al, 1993; Arellano et al., 1996). 그러나, 오미자의 형질전환된 부정근의 경우에는 성장속도가 매우 느리고 분지화가 활발하지 않은 반면 성장부의 직경은 1 mm 가량으로 비대한 편이었다(Fig. 1). 형질전환근의 성장과 이차대사물질의 생산성을 극대화하기 위해서는 세포의 현탁배양에서 처럼 적절한 배지의 선택이 무엇보다도 중요하다(Sakato and Misawa, 1974; Giri et al., 1997; Giri and Narasu, 2000). Nussbaumer등(1998)은 *D. candida* X *D. aurea*의 형질전환근의 배양에서 3종의 기본배지들 중 무기염의 농도가 MS배지에 비해 낮은 B5배지에서 alkaloids의 생산성과 최적 성장을 유도한 바 있다. 오미자의 경우 고형배지에서 일차적으로 증식된 형질전환근을 근단 부위로부터 1.5 cm 가량 절취하여 MS배지, 1/2MS배지, MB5배지, WPM배지, B₅ (Gamberg et al., 1968)배지, 그리고 N6배지의 성분이 들어있는 액체배지에 0.5 g(F.W) 씩을 각각 접종하였다. 암소에서 8주동안 배양한 후 건물중량을 조사한 결과 6종의 배지들 중 WPM배지에서 flask당 6.2 g(D.W)으로 성장률이 가장 좋았다(Fig. 2). 그러나, gomisins J의 함량은 MS배지와 WPM배지 모두에서 유사한 결과를 보여주었다(Fig. 3). 한편, 초기 접종농도에 의한 형질전환근의 성장곡선 변화에 따른 생중량의 차이를 확인하기 위해 40 ml 배지에 0.1 g(F.W)에서부터 2 g(F.W)까지 접종하였다. 0.1 g을 접종한 실험구를 제외하고 모든 실험구에서 8주 후 생중량의 비교에서 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 또한, 초기 접종 농도가 물질의 생산성에 있어서 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(data not shown). 세포현탁배

양에서는 초기접종 농도가 생중량이나 물질의 생산성에 영향을 미치는 경우가 많으나(van Gulit et al., 1994; Zhong et al., 1993), 형질전환근의 경우 초기접종에 사용하는 부정근의 수나 배지의 양 보다는 정단부위를 포함한 부정근의 길이에 의해 건물중의 차이를 가져오기도 한다(Bhadra and Shanks, 1993).

배지에 다량으로 첨가하는 탄소원은 광합성능이 거의 없는 세포나 뿌리와 같은 기관배양에 있어서 중요한 에너지원인 동시에 삼투조절에 관여하기 때문에 세포의 증식은 물론 이차대사물질의 생합성에 영향을 주게 된다(Do and Cormier, 1990; Mukherjee et al., 1991; Srinivasan et al., 1995). 오미자의 경우 WPM 기본 배지에 sucrose의 농도를 1%부터 7%까지 처리 한 결과 건물중은 5%에서 gomisin J는 7%에서 각각 가장 높게 나타났다(Fig 4, 5). 현탁배양시 배지에 첨가하는 탄소원의 농도는 배양조직의 상태나 배양목적에 따라 1%에서부터 12%까지 매우 다양하다(Misawa, 1985; Knobloch and Berlin, 1980; Berlin et al., 1983). Nussbaumer등(1998)은 *D. candida* X *D. aurea*의 형질전환근 배양에서 5% 농도로 sucrose를 처리할 경우 3% 처리구에 비해 건물중량이 두배이상 증가하기도 하였으나, 물질의 생산성에 있어서는 유의적인 차이를 확인하지 못했다. Nin등(1997)은 *Artemisia absinthium*의 형질전환근의 배양에서 4% sucrose 처리가 형질전환근의 성장에 최적임을 확인한 바 있었으나, sucrose의 농도를 3% 이상 높였을 때 오히려 형질전환근의 성장이 저하되거나 분지화가 억제 되면서 켈러스화 되는 현상을 보이는 경우도 있다(Hamill et al., 1986; Nguyen et al., 1992).

액체배양에 있어서 교반속도는 산소의 공급을 원활하게 하여 세포조직의 성장을 촉진시켜주는 물론 시료와 배양용기 사이에 마찰(shear stress)에 의한 자극으로 이차대사물질의 생합성을 촉진 시키는 효과를 주게된다(Zhong et al., 1992). Wu등(2003)은 세포의 현탁배양에서 물질 생산성을 위해 150 rpm까지 교반속도를 높여줄 필요가 있다고 한 바 있다. 오미자의 형질전환근의 성장과 gomisin J의 생산성은 140 rpm이상에서 감소하는 경향을 보여주었으며, 초기성장을 위해서는 80-100 rpm의 속도로 유지하고 물질의 생산성을 높이기 위해 130 rpm 까지 점차 속도를 높여주는게 바람직 할것으로 보였다(Fig. 6, 7).

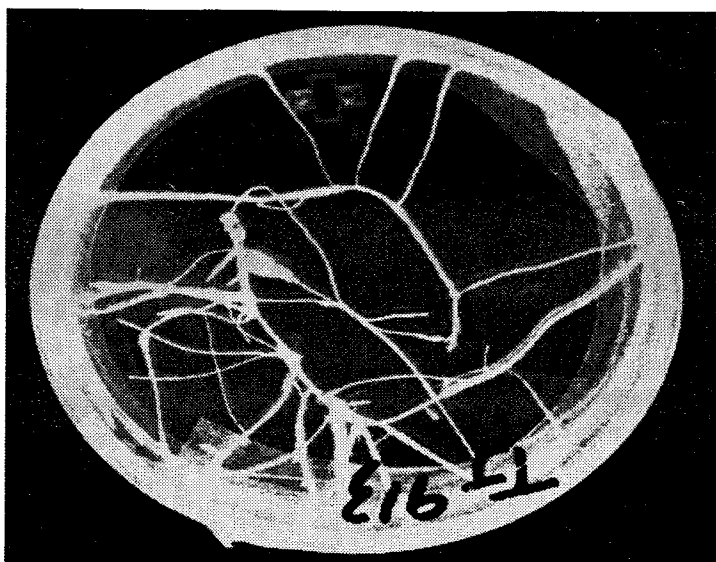


Fig. 1. Transformed root cultures of *S. chinensis* cultured on hormone-free WPM medium

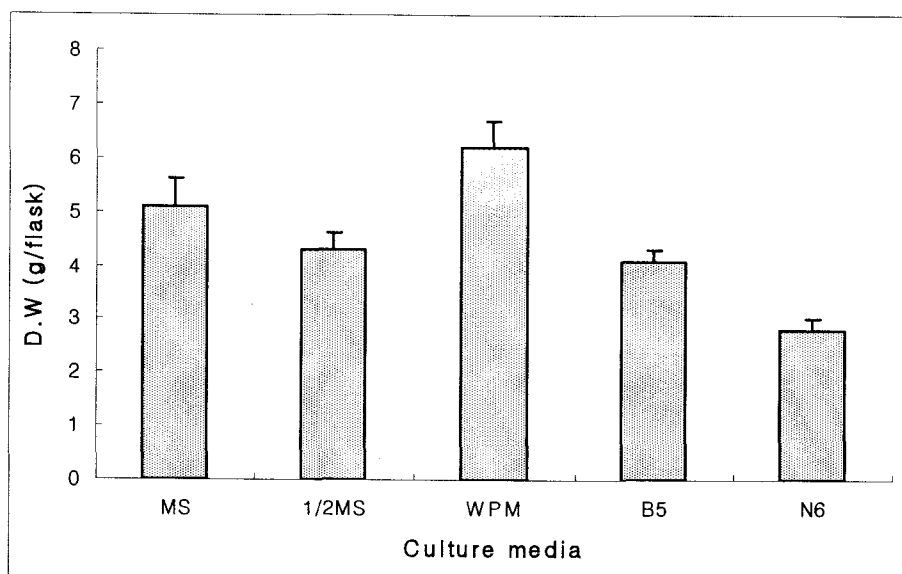


Fig. 2. Effects of culture media on growth of transformed root in shake flask cultures of *S. chinensis*

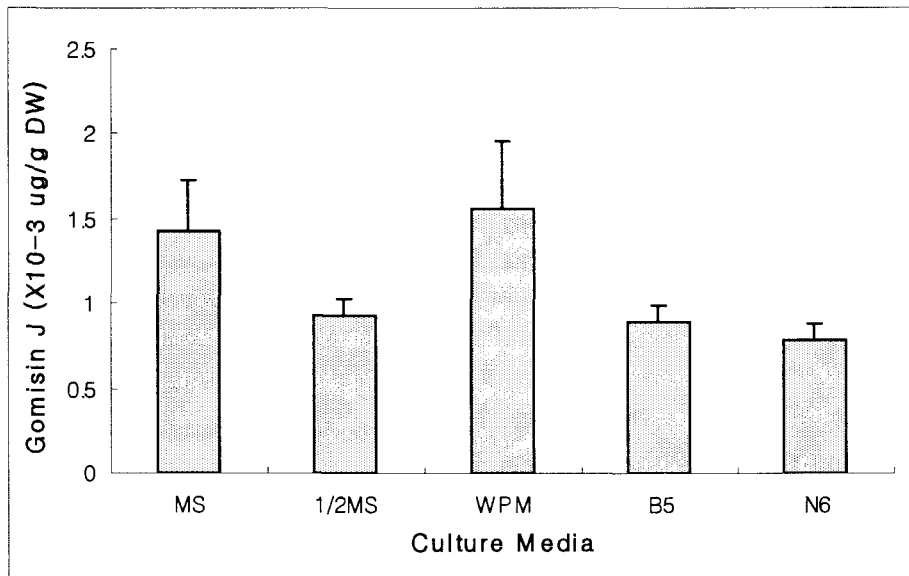


Fig. 3. Effects of culture media on gomisins J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots

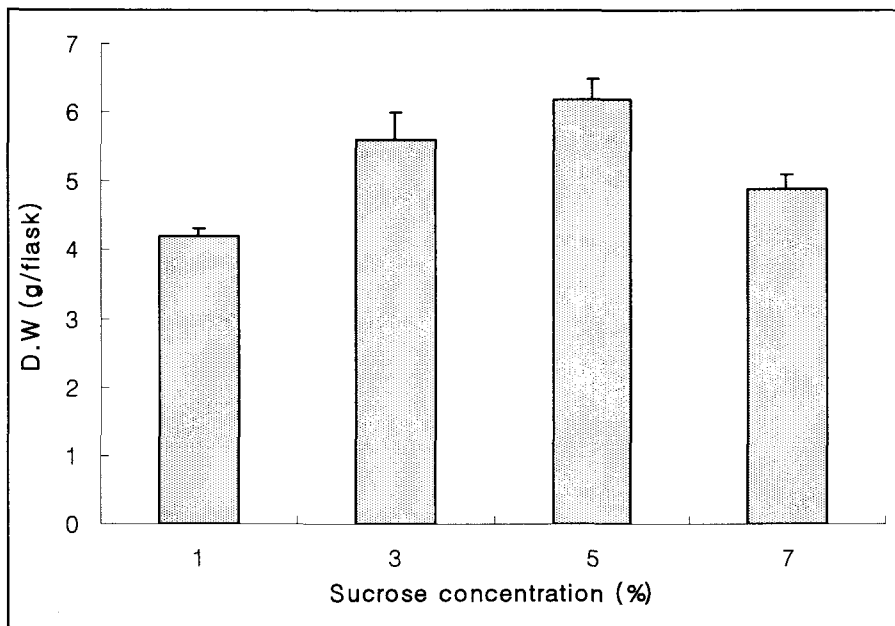


Fig. 4. Effects of sucrose concentration on transformed root growth in shake flask cultures of *S. chinensis*

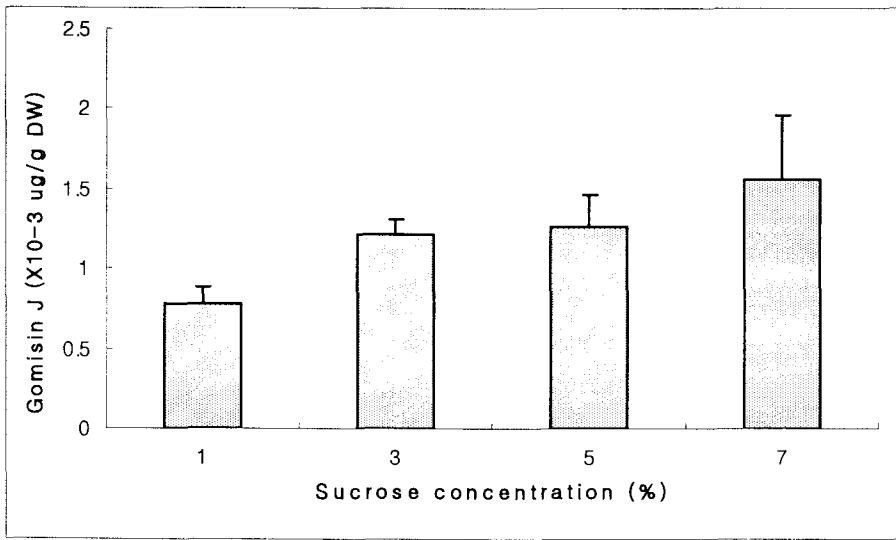


Fig. 5. Effects of culture media on gomisin J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots

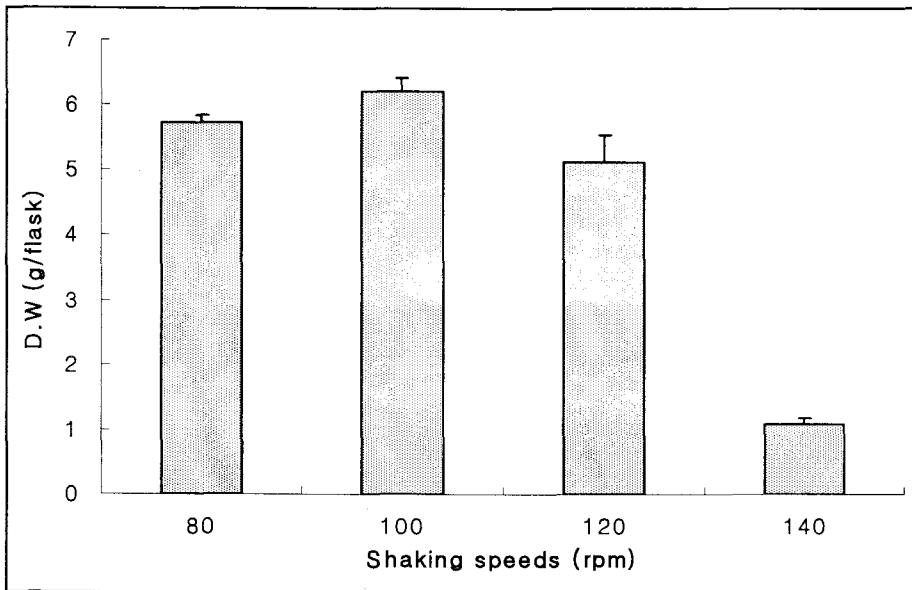


Fig. 6. Effects of shaking speeds on transformed root growth in shake flask cultures of *S. chinensis*

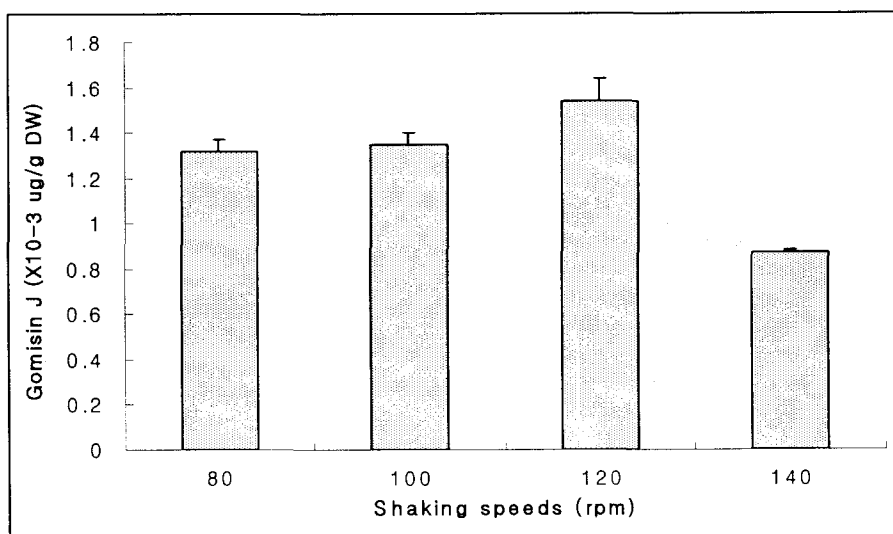


Fig. 7. Effects of shaking speeds on gomisin J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots

제6절 세포배양에 의한 유용물질 대량생산 (제2협동위탁, 동신대)

1. 서론

지금까지 전세계적으로 분리 동정된 약 30,000 종류 이상의 천연물질들 중 80%가 자생식물로부터 유래하고 있으며(Phillipson, 1990; Balandrin and Klocke, 1988; Fowler and Scragg, 1988), 인구의 75%가 이와같은 자생식물 유래 천연물질을 오랫동안 약리적으로 이용하고 있다. 그러나, 자생식물로부터 약리효능을 갖는 천연물질의 획득에 있어서 자생지에서 직접 채취를 하거나 노지에서 재배하는 전래적인 방식은 고부가가치의 약리물질의 대량생산과 같은 산업화를 위해서는 커다란 장애요인이 되고 있다. 가령, 재배지의 생태환경의 변화에 따라 물질 생산성의 차이를 보이기 때문에 균질화가 어렵고, 특정 물질의 생산성을 높이기 위한 생합성의 조절 또한 불가능하다고 볼 수 있기 때문이다.

식물조직배양 기술은 제어된 환경하에서 식물세포나 조직, 기관등을 배양할 수 있기 때문에 자연조건에 크게 좌우되는 기존의 재배방식에 의한 물질생산의 한계점을 극복할 수 있는 새로운 형태의 기술로 받아들여지고 있다(Brain, 1976; DiCosmo et al. 1989; DiCosmo and Towers, 1984; Fontanel and Tabata, 1987; Morris et al. 1986). 일반적으로 기내(*in vitro*)에서 배양되는 탈분화된 체세포조직이 모식물체에 비해 이차대사물질의 생산성이 매우 낮게 나타나는 문제점이 있으나(Endress, 1994; Dornenburg and Knorr, 1995), 배지성분의 변화, 다양한 식물성장조절물질의 처리, pH의 변화, 온도조건의 변화, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조건과 같은 다양한 물리화학적 조건들을 최적화 함으로써 오히려 모식물체보다 물질의 생산성을 높인 경우도 많다(Matsubara et al., 1989; Ulbrich et al., 1985; DiCosmo and Towers, 1984).

오미자(*Schisandra chinensis*)는 낙엽 활엽 만목으로 충청지역을 제외한 전국에 걸쳐 표고 200-1,600 m에 자생하며, 지리적으로는 한국, 일본, 사할린, 만주, 중국에 분포한다. 민가와 한방에서는 오미자의 열매를 수렴제, 자양제, 강장제, 진해, 구갈(口渴)이나 주독(酒毒)을 푸는데 주로 이용한다. 오미자에서 추출 분리된 주요 성분으로는 citrol, schizandrin, schizandrol, r-schizandrin, gomisins A-H, gomisins J, gomisins K, gomisins O, angeoylgomisin Q, pregomisin 등이 있으며, 이들의 약리효과로는 항산화작용, 간장해 억제작용, 항암작용, 항균작용, 그리고 중추신경계에 작용하는 것으로 알려지고 있다(Hancke et al., 1999).

리그난 화합물은 오미자를 비롯한 많은 자원수종의 수피나 종자등에서 발견되어지며, 이와같은 물질은 항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려지고 있다(Hancke et al., 1999; Kvasnickova et al., 2001; Sladkovsky et al., 2001). 세포배양에 통하여 리그난 화합물을 생산하려는 연구는 *Ipomoea*

cairrica(Paska et al., 1999), *Linum album*(Smollny et al., 1998; Seidel et al., 2002; Empt et al., 2000), *Callitris drummondii*(Van Uden et al., 1990c), *Podophyllum hexandrum*(Van Uden et al., 1989), 그리고 *Podophyllum peltatum*(Petersen and Alfermann, 2001)등과 같은 다양한 수종에서 이루어 졌 으며, 일부 연구결과에서는 배양조직으로부터 모식물체와 비슷한 수준의 리그난 이 생합성되기도 하였다.

본 연구에서는 국내에 자생하는 오미자의 발아 유묘조직으로부터 켈러스의 유기 및 현탁배양을 위한 최적조건을 탐색하고, 이들 현탁배양세포로부터 약리효과가 우수한 리그난계 화합물질인 gomosin J의 생산성을 검정하고자 하였다. 아울러 플라스크배양단계로부터 생물반응기로의 scale-up을 통해 공정화시스템으로의 진행을 위한 기반기술을 확보하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 종자발아

오미자(*Schisandra chinensis* Baillon)의 종자는 동신대 종자은행에서 분양받아 종피를 제거한 후 70% ethanol과 0.1% sodium hypochlorite 용액에서 각각 2분 간 침지 시키고, 무균수로 3회 세척하였다. 이와같이 표면살균 처리된 종자는 멸 균된 여과지에서 수분을 제거한 후 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 치상하여 항온배양실 (광주기 16:8 ; 26±1℃) 내에서 발아 시켰다. 켈러스 유기를 위하여 발아 후 8주 이상 기내(*in vitro*)에서 배양된 유묘의 잎과 줄기를 절취하여 2,4-D, IAA, NAA를 각기 0.5, 1, 2, 3 mg^l⁻¹ 농도로 첨가한 MS고형배지(3% sucrose, pH 5.7)에 치상하고, 암소에서 배양(26±1℃) 하였으며, 유기된 켈러스는 4주 간격으로 새로운 배지로 계대배양 하여 주었다.

나. 현탁배양

현탁배양에 사용된 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지, MS배지의 미량원소를 B₅배지의 성분으로 교체한 MB5배지, WPM (Lloyd and McCown주, 1980)배지, B₅ (Gamberg et al., 1968)배지를 사용하였으며, 탄소원의 농도는 1-7%까지 처리 하였다. 유묘의 조직절편으로부터 유기된 켈러스는 4주간격으 로 2회 이상 계대배양한 후 0.1, 0.5, 1, 2 g (FCW)을 각각 취하여 40 ml MB5 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 모든 현탁배양은 60, 80, 100, 120, 140 rpm 속도로 진탕배양기(26±1℃) 내에서 수행하였으며, 2주간 격으로 1/3 가량을 새로운 배지로 교환해주었다. 현탁배양세포의 균질화를 위해

초기 계대배양 과정에서 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μ m)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군 만을 수집하여 새로운 배지로 옮겨 배양 하였다.

다. 세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 8주 동안 배양된 현탁배양세포를 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량(FCW)과 냉동건조기에서 48시간 건조한 후 측정된 건물중량(DCW)으로 나타내었다.

라. 생물반응기 배양

플라스크배양 단계에서 확보된 자료를 바탕으로 공기주입형(1.5 L) 생물반응기(EYLAR, JAPAN)에서 scale-up을 진행 하였다. 대량배양시 탄소원으로 sucrose와 glucose를 사용하였으며, 암조건과 16/8 (light/dark regime) 광주기로 광조건을 달리하여 배양 하였다. 모든 실험의 초기접종 농도는 1.5 g DCW/L로 맞추어 항온실(25 \pm 1 $^{\circ}$ C)에서 8주간 배양 후 시료를 회수 하였다.

마. 물질분석

오미자의 현탁배양세포로부터 리그난 성분의 분석은 8주 배양된 세포를 수집하여 냉동건조 후 막자사발에서 마쇄한 다음 분말시료 0.5 g에 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 가열하여 추출하였다. 3회 연속 같은 방법으로 얻은 메탄올 추출물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상징액을 Table1)과 같은 조건 하에서 HPLC(Shimazu, Tyokyo, JAPAN)를 이용하여 분석하였다. 이때 gomisin J의 표준시료는 국립산림과학원(구 임업연구원)에서 단리한 것을 분양 받아 사용하였다.

Table 1. Operational conditions of HPLC for analysis of gomisin-J in suspension cell cultures of *Schisandra chinensis*

Instrument	HPLC (Shimazu, Tokyo, Japan)
Column	Cellpak C18
Mobile phase	Acetonitrile : water (1:1)
Flow rate	1 ml/min
Detection	UV 252 nm
Sensitivity	0.05 AUFS

5. 통계처리

통계처리는 SAS(Statistical analysis system) package를 이용하여 ANOVA test를 시행한 후 유의수준 $p < 0.05$ 범위에서 결과들의 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

가. 켈러스 배양

오미자의 유묘 조직절편으로부터 켈러스를 유기하기 위하여 MS 기본배지에 오옥신류를 농도별로 단독 처리하였을 때 3 mg/L 이상의 농도로 오옥신을 처리하였을 경우와 2,4-D 처리구, 그리고 IAA의 단독 처리구에서는 켈러스의 유기가 거의 이루어지지 않았으며, 유기된 켈러스 또한 3주 후부터 갈변화되는 현상을 보여주었다. 오옥신에 BA를 혼합하여 처리했을 경우에는 오옥신을 단독으로 첨가한 것과 별다른 차이점을 확인할 수 없었다(data not shown). 이에비해 NAA의 처리구에서는 뿌리를 제외한 잎과 줄기의 조직절편에서 켈러스가 형성 되었다(Table 1). 켈러스 유기율은 1 mg l^{-1} NAA를 단독으로 처리한 실험구에서 98.2%로 가장 높았으나 3 mg l^{-1} 이상에서는 부정근이 분화 되기도 하였다. 일주일 후 모식물의 조직절편으로부터 켈러스를 분리하여 동일조성의 배지로 옮겼을 때 지속적으로 켈러스의 증식을 확인할 수 있었다. 모식물의 조직절편으로부터 탈분화를 유도하는데 있어서 가장 중요한 요인은 내재된 오옥신과 시토키닌의 함량, 그리고 배지에 첨가하는 식물성장조절물질의 농도의 비율로 보고 있다. 오옥신을 배지에 단독처리할 경우 조직절편에서 부정근이 형성되는 현상을 볼 수 있기도 하지만 내재호르몬의 함량에 따라 2,4-D의 단독 처리만으로 켈러스가 유기되기도 한다. 오미자의 경우 잎과 줄기에서 그리고 줄기의 방향에 따라서 켈러스의 형성에 있어서 약간의 차이가 나타남을 확인할 수 있었다. 그러나, 배지내에 첨가하는 sucrose의 농도(1-5%)나 pH(5.2-6.0)에 의해서는 켈러스의 유기에 크게 영향을 주지 않는 것으로 보였다(data not shown).

나. 현탁배양

고형배지에서 증식된 켈러스를 4주간격으로 2회 이상 계대배양한 후 2 g (F.W)을 취하여 40 ml MS배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 현탁배양된 세포의 균질화를 위해서 계대배양 과정에서 stainless steel filtration chamber (pore size 50, 100 μm)를 이용하여 새로 형성된 동일한 크기의 세포군

만을 수집하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). 켈러스배양은 물론 현탁배양에서 세포의 성장과 물질의 생산에 영향을 주는 가장 기본적인 요인중의 하나가 배지의 성분이다(Stuatr and Street, 1969; Sakato and Misawa, 1974; Mori et al., 1994; Sakurai and Mori, 1996). 오미자 현탁배양시 세포의 성장과 물질의 생합성에 적합한 배지를 선별하기 위하여 1 mg/L NAA가 첨가된 MS배지와 MS배지의 미량 원소를 B₅배지의 성분으로 교체한 MB5배지, WPM배지, 그리고 B5배지 각각을 100 ml Erlenmyer flask에 40 ml 씩 넣고 켈러스 0.5g (D.W)씩을 접종하여 교반형 배양기에서 진탕배양 하였다. 배양 8주 후 성장률은 MS배지 보다 무기염의 조성을 변화시킨 MB5배지가 가장 좋은 것으로 나타났으며, 물질의 생산성은 WPM배지에서 가장 높게 나타났다(Fig. 2, 3). 한편, 초기접종 농도에 의한 세포의 증식은 0.1 g (D.W)이하의 양을 접종시 성장기의 진입 속도가 0.5 g 이상으로 시작하였을 때 보다 1-2주 늦어지는 양상을 보여주었으며, 2 g 이상을 접종할 경우에는 4주 후 세포의 성장이 정체되는 양상을 보여주었다(Fig. 4). 세포의 현탁배양 시 초기접종 농도는 세포의 초기 성장곡선의 변화와 물질의 생산성에 있어서 매우 중요한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. van Gulik등(1994)은 *Catharanthus roseus*의 현탁배양에서 초기 접종 농도가 낮을 경우 세포의 성장이 크게 지연되었으며, Zhong등(1995)과 Su와 Lei(1993)는 *Perilla frutescens*와 *Anchusa officinalis* 현탁배양에서 적정 수준의 초기 접종 농도가 물질의 생산성에 중요한 요인으로 작용함을 확인한 바 있다.

다. 탄소원

현탁배양세포는 타가영양적 성장을 하기 때문에 세포의 성장과 물질의 생합성은 배지에 첨가하는 탄소원의 농도에 크게 좌우되는 경우가 많으며, 탄소원의 농도에 의해 배양세포의 삼투가 조절되기 때문에 배양과정에서 적정 수준의 탄소원을 반드시 첨가해 줄 필요가 있다(Do and Cormier, 1990; Mukherjee et al., 1991). 오미자 현탁배양세포의 경우 기본배지내 탄소원의 농도를 1%에서 7%까지 높여 주면서 8주 동안 배양 하였을 때 세포의 성장은 3%에서 2.23 g DCW , 물질의 생산성은 5%에서 0.78×10^{-3} ug/g DCW 으로 각각 가장 높게 나타났다(Fig. 5). 현탁세포배양 시 물질의 생산성을 극대화 시키기 위해서 7%-12% 까지 배지내에 첨가하는 경우도 있으나(Misawa, 1985; Knobloch and Berlin, 1980; Berlin et al., 1983), 일부 식물종에서는 5% 이상에서 물질의 생산성이 저하현상을 나타내는 경우도 있다(Sakamoto et al., 1993).

라. 교반속도

식물세포의 현탁배양 시 적정 속도의 교반은 세포의 증식과정에서 침적을 억제하고, 산소 공급을 원활하게 해주기 때문에 세포의 빠른 성장을 위해 반드시 적정 수준이 유지되어야 한다. 유용물질은 대부분 물리화화적인 자극에 대한 방어작용에 관련되는 것들이 많기 때문에 배양과정에서 교반은 세포에 물리적인 자극을 줌으로써 생합성을 촉진 할 수 있다(Zhong et al., 1992). 오미자의 현탁배양 시 100 rpm에서 세포의 성장에 적정한 속도로 보였으며, 물질의 생산성을 높이기 위해서는 140 rpm을 유지해야 할 것으로 생각되었다(Fig. 6). 이는 Wu 등(2003)이 *Rhodiola sachalinensis*의 세포의 현탁배양 과정에서 건물중량은 교반속도 100 rpm에서 그리고, 물질의 생산성은 150 rpm에서 최적임을 확인한 보고와 같은 결과로 생물반응기에서의 연속배양 시 고려되어야 할 사항으로 사료 되었다.

마. 생물반응기 배양

생물반응기 배양을 통한 세포의 대량배양은 공기주입식 기동형 반응기(1.5 L)에서 수행하였다. 플라스크 배양단계에 비해 성장기 진입이 늦은 편이었으며, 물질의 생산성은 배지내 탄소원의 고갈을 보인 5주 후부터 증가 하였다(Fig. 7). 오미자 체세포의 대량배양시 탄소원은 sucrose가 glucose 보다 건물중량과 물질의 생산성에 효과적이었다(Table 2). 광주기를 16/8로 상온에서 5% sucrose가 첨가된 MB5배지에서 8주 배양 시 건물중량은 3.8 g/L, 그리고 gomisin-J의 생산성은 0.72×10^{-3} ug/g DCW로 나타났다(Table 3). 그러나, 이는 플라스크 배양단계에 비해 다소 낮은 수치로 이에대한 조사가 필요할 것 같다(Table 4).

Table 1. Callus formation on MS medium containing various auxins concentration

Auxins (mg l ⁻¹)	Callus formation (%)		
	leaf	stem	root
IAA	0.5	_ND	_ND
	1.0	_ND	_ND
	2.0	11.4 ^R	_ND
	3.0	7.2 ^R	_ND
NAA	0.5	23.1	_ND

	1.0	97.3	32.1	_ND
	2.0	61.4	48.3	_ND
	3.0	18.3 ^R	11.4	_ND
2,4-D	0.5	_ND	_ND	_ND
	1.0	_ND	_ND	_ND
	2.0	_ND	_ND	_ND
	3.0	_ND	_ND	_ND

* Each value represents the mean of three independent determinations

* ^{-ND} not detectable ^R rooting

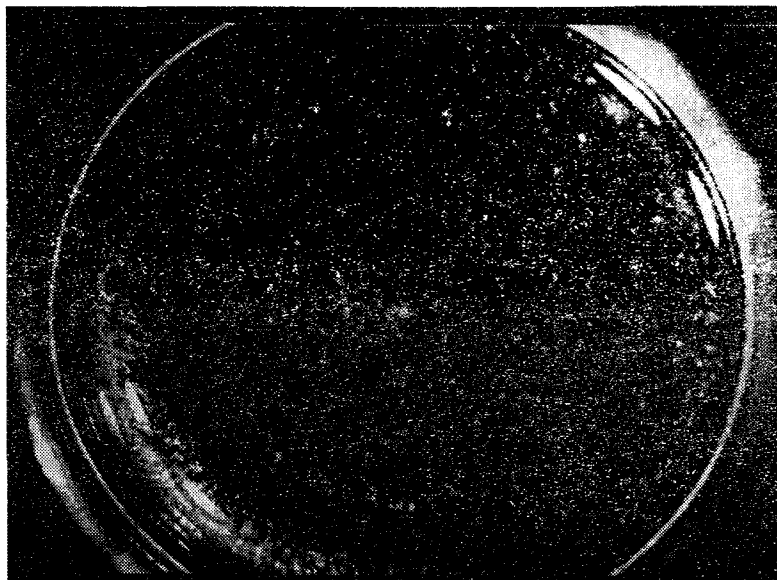


Fig. 1. Embryogenic cell suspension cultures of *S. chinensis*

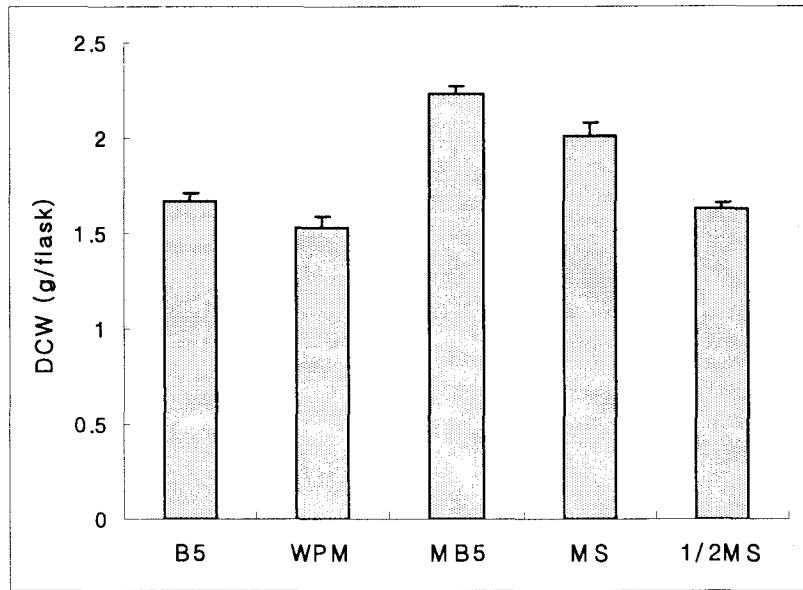


Fig. 2. Effects of various media on dry biomass accumulation in flask cultures of *S. chinensis* cultures

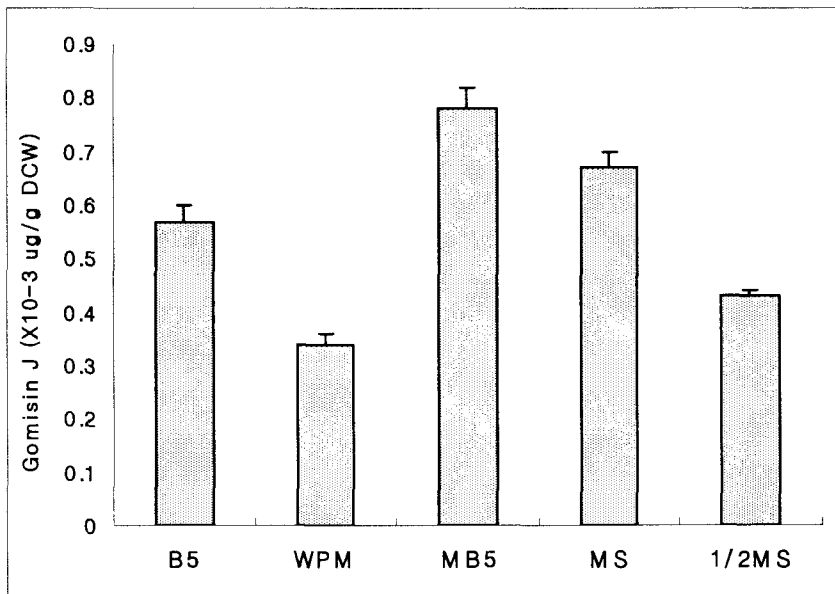


Fig. 3. Effects of various media on gomisins-J contents in flask cultures of *S. chinensis*

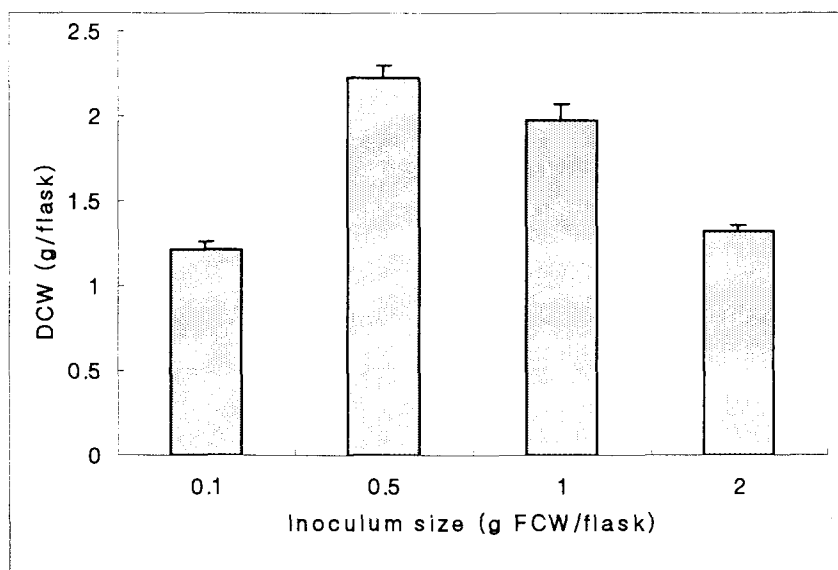


Fig. 4. Effects of inoculum size on dry biomass accumulation in flask cultures of *S. chinensis*

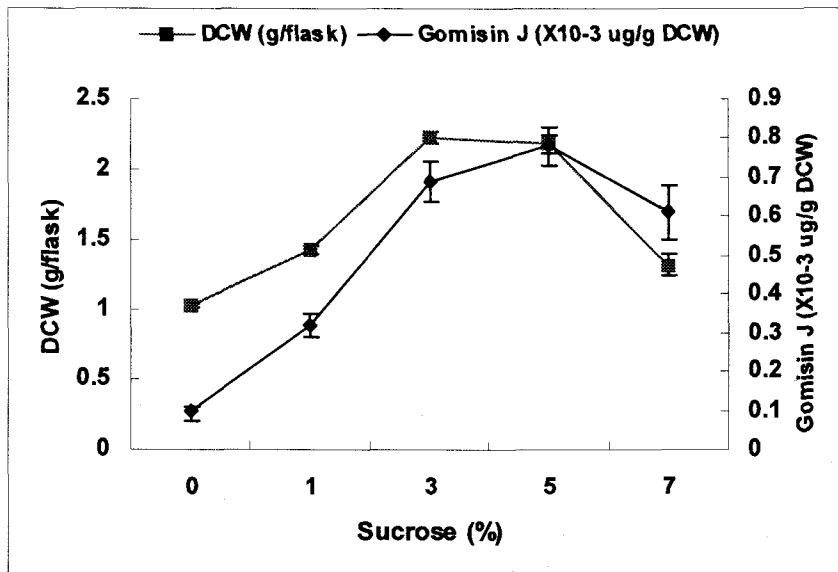


Fig. 5. Effects of sucrose concentration on dry biomass accumulation and gomisin J contents in flask cultures of *S. chinensis*

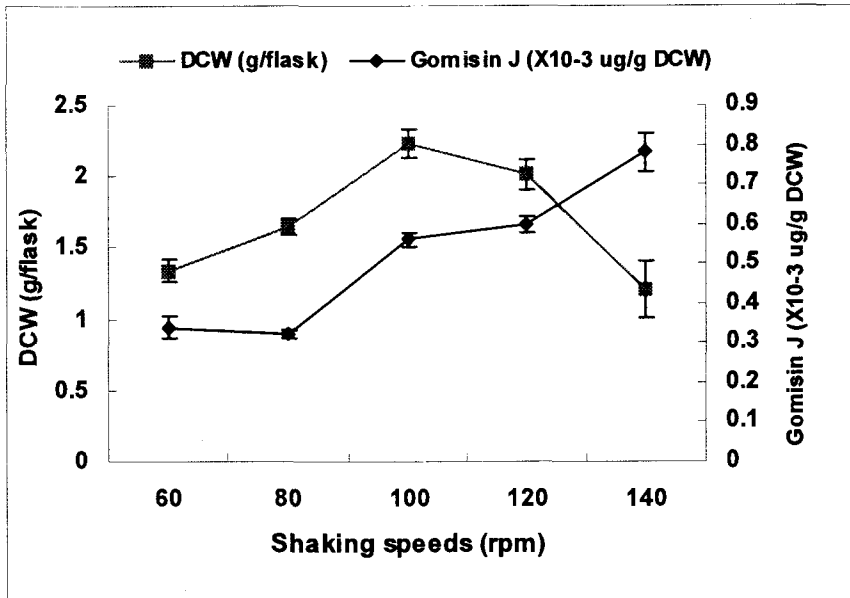


Fig. 6. Effects of shaking speeds on on dry biomass accumulation and gomisin J contents in flask cultures of *S. chinensis*

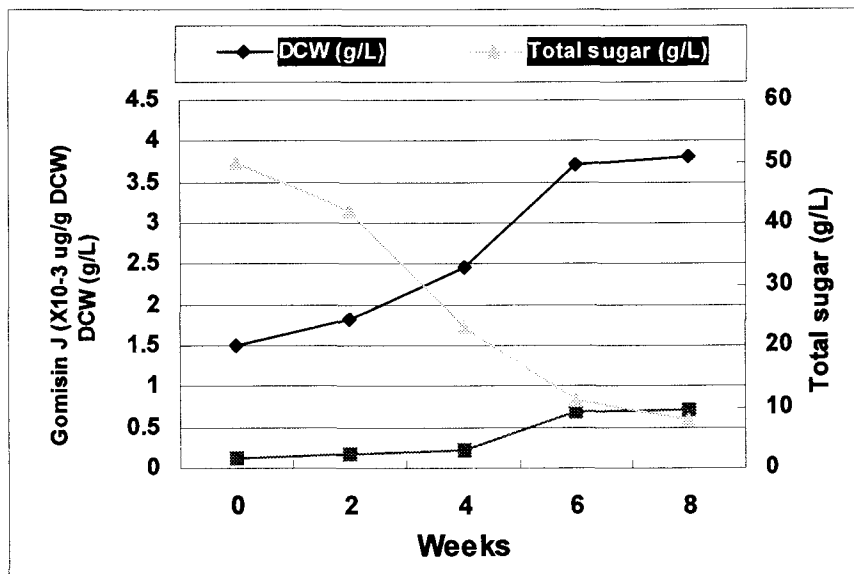


Fig. 7. Growth and product profiles of *S. chinensis* suspension cells.

Table 2. Comparative values of growth and product parameters in *S. chinensis* suspension cell cultures with sucrose and glucose

Carbon sources	DCW (g/L)	Gomisin-J ($\times 10^{-3}$ ug/g DCW)
Sucrose	3.8	0.072
Glucose	2.7	0.061

Table 3. Comparative values of growth and product parameters in *S. chinensis* suspension cell cultures under 16/8 light/dark regime and darkness

Light	DCW (g/L)	Gomisin-J ($\times 10^{-3}$ ug/g DCW)
L/D regime	3.8	0.072
Dark	2.7	0.061

Table 4. Comparative values of growth and product parameters in *S. chinensis* suspension cell cultures in shake flask and in bioreactor

Cultivation type	DCW (g/L)	Gomisin-J ($\times 10^{-3}$ ug/g DCW)
Shake flask	4.1	0.078
Bioreactor	3.8	0.072

제7절 증식법 개발(제1세부, 충북대 산림과학부)

1. 서론

국민의 생활수준 향상과 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라서 한약재 소비량은 매년 증가되고 있으며, 한약자원식물의 생산규모도 대규모 재배체계로 전환되고 있다. 최근 한약자원식물은 한약재료의 소비 이외에 건강식품 및 차 등으로 많이 이용됨에 따라 식품가공용으로 소비가 늘어나면서(김, 1996), 약용작물중 주요약재인 오미자도 그 수요가 점차 확대되고 있으며 종래의 질병치료제로서의 수요보다 오미자차, 오미자쥬스, 오미자화채, 오미자술 등의 건강음료계의 생산을 위한 약재로 농가에서 많이 재배되고 있다(최 등, 1999).

오미자의 번식은 삽목, 실생, 분주, 휘묻이, 접목 등으로 이루어지고 있으나, 우량한 모수에서 삽수를 채취하여 꺾꽂이하어 육묘하는 것이 우수한 묘를 일정하게 많이 얻을 수 있는 방법이다(양, 1996). 그러나 삽목번식은 산(酸)이나 탄닌 등의 발근억제물질이 있어서 발근율이 낮으며, 접목번식은 뿌리 생육이 왕성한 흑오미자 묘에 형질이 좋은 오미자를 접목하여 심는데, 작업과정이 복잡하다(최 등, 1999). 종자과중에 의한 실생번식은 영양번식에 비하여 수확기간이 1년 정도 더 길다(유, 1988). 이러한 재배의 어려움 때문에 오미자에 대한 삽목 및 접목번식법의 개발(김 등, 1998; 이, 2000)은 일부 시도된 바 있으나, 조직배양기술을 이용한 대량증식에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

식물 조직배양을 중심으로 하는 생물공학기술은 최근 비약적으로 발전하여 세포융합이나 유전자 재조합에 의한 신품종 육성 기술로 발전되고 있다. 우량한 F₁ 잡종식물이 1개체 발견되거나 유전자 조작 등으로 우수한 개체가 육성되면 그 개체가 불임이더라도 조직배양에 의해 균일한 묘를 대량으로 증식, 공급하는 것이 가능하게 된다. 또 새로 육성된 이형접합성 작물이나 목본식물과 같이 개화 결실에 오랜 세월을 요하는 경우도 조직배양에 의한 영양계 증식이 유리하다(이, 1996).

특히, 조직배양 기법중 체세포배 유도는 체세포 조직에서 직접 접합자배와 유사한 체세포배(somatic embryo)를 인위적으로 유도하여 식물체로 재생시키는 것으로 배양체계가 확립되면 가장 효율적인 번식기술이 될 수 있다(문 등, 1996).

Steward 등(1958)이 당근의 비대 저장근에서 유래된 캘러스에서 체세포배를 유기시킨 이래, 분화가 어려운 목본류에서도 많은 체세포배 발생이 이루어짐으로써

체세포배는 파종성 작물의 번식에도 이용될 수 있는 가능성을 제시해 주었다(박 등, 1992)

최근 외래 유용유전자 도입에 의한 형질전환 식물체 생산방법에 체세포 배발생이 활용되기도 한다. 즉 배발생캘러스에 유전자총(particle bombardment)을 쏘거나(Bommineni et al, 1993), *Agrobacterium*과 공동배양한(Dandekar et al, 1989; Gall et al, 1994) 후 완전개체를 유도한다.

또한, 체세포배가 종자 대용으로 이용될 수 있다는 사실이 Murashige(1978)에 의해서 처음으로 인식하게 된 이후, 체세포배는 인공종자 개발(정 등, 1994; 김 등, 1996)에 사용되어 왔다. 만일 체세포배를 종자 형태로 개발한다면 종자 번식이 주는 이점을 대부분 그대로 살릴 수 있으며 최초 배양에 조직 절편을 공시한 식물체와 유전적으로 동일한 개체를 손쉽게 대량으로 확보할 수 있게 된다(정 등, 1999).

그러므로, 체세포 배발생은 효율적인 번식에 대한 잠재력을 갖고 있을 뿐만 아니라, 인공종자의 개발 및 형질전환을 통한 신품종 육성을 위한 좋은 재료로 이용될 수 있다는 점에서 여러가지 이점을 지니고 있다. 그리고, 체세포배는 발생초기부터 신초와 뿌리로 분화될 분열조직이 결정되어 있는 양극성(bipolarity) 구조를 가져 줄기, 뿌리 분화를 위해 별도의 식물생장조절물질 처리단계가 필요치 않으며 또한 체세포배는 단세포로부터 유래하므로, 그에서 분화된 식물체는 균일하고 염색체변이가 적다는 장점이 있다(Hanna et al., 1984; Nagmani et al., 1987).

따라서, 본 연구는 오미자의 증식법을 확립하기 위하여 액아배양, 체세포배양을 실시하여 체세포배를 형성할 수 있는 배발생 캘러스(embryogenic callus)의 유지조건을 구명하고, 체세포배 유도를 통한 식물체 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다.

2. 액아배양에 의한 증식

가. 재료 및 방법

1) 식물재료와 발아조건

오미자의 성숙종자와 미숙종자를 2001년 전북 무주농협에서 구입하였다. 이를 4도온도에 3개월간 저장하고 종피를 제거한 다음 소독을 실시하였다. 표면소독은

2% 차아염소산나트륨으로 10분간 실시하고 멸균증류수로 5회 세척하였다. 적정발아조건을 조사하기 위하여 배지를 달리하여 시험하였다. MS, 1/2MS와 WPM배지를 사용하고 sucrose는 3%로 pH는 1N NaOH를 이용하여 조절하였다. 고압멸균후 지베렐린을 첨가하였으며 배양환경은 암상태에서 25온도를 유지하며 배양하였다.

줄기의 증식

종자는 6주후에 발아하였는데 이를 생장조절물질 무첨가 WPM배지로 옮겨 백색형광등 30형광16시간 광주기 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양8주후 유묘가 4-5cm자랐을 때 자엽이 달린 마디를 잘라 유근을 제거하고 자엽이 달린 부위를 100mL 삼각플라스크에 WPM배지에 sucrose 3%, 0.1-5.0mg/L BA와 NAA 0.1-1.0mg/L를 각각 혹은 조합처리한 배지로 이식하였다. 배양 10주후에 새줄기 발생을,과 새줄기의 길이를 조사하였다. 원 자엽은 새줄기를 제거하고 다시 BA가 함유된 줄기증식배지로 계대배양하였다.

2) 다량증식된 줄기의 발근

오미자의 발근은 다른 목본식물에 비하여 개발되지 않았다. 증식된 줄기로부터 발근시험을 실시하였다. 두가지 탄소원과 옥신을 첨가한 WPM배지를 사용하였다. BA 1.0mg/l를 첨가한 WPM배지의 기내에서 1cm이상으로 새로자란 줄기를 잘라 발근연구에 이용하였다. 배지는 100mL삼각플라스크에 WPM배지를 쓰고 3% glucose나 3% sucrose를 첨가하고 0.7% agar로 굳혀 사용하였다. 모든 배지에는 0.1-2.0mg/L NAA와 0.5-1.0m/L IBA를 각각 또는 조합으로 첨가하였다.

3) 기외 순화

발근된 shoot는 삼각플라스크에서 꺼내어 멸균증류수로 세척하고 8cm 직경의 포트에 멸균한 버미큘라이트를 담아 식재하였다. 습도를 높게 유지하기 위해 비닐로 덮어 유지하였다.

환경조건은 배양실 온도를 유지하고 3주에 걸쳐 WPM배지 용액을 3주간에 걸쳐 관수하였다. 그 후 토양과 모래를 1:1로 담은 포트에 다시 옮겼다.

4) 통계분석

종자발아시험을 위해서는 처리당 90개의 종자를 사용하고 데이터는 90개 종자의 평균±표준오차로 나타내었다. 줄기 다량유도를 위해서는 처리당 40점씩 사용하였고 발근처리에는 30점씩 사용하였다. 모든 시험은 3반복으로 하였고 데이터 분석은 one-way analysis법을 사용하였다.

결과 및 고찰

<기내 발아시험>

오미자 종자를 표면살균하여 기내 발아를 시험한 결과는 다음과 같다.

Table 1. Effects of GA3 concentrations and different (1/2MS, MS and WP) media for pre-mature seeds germination of *S. chinensis*.

GA3 concentration (mg/L)	Rates of seed germination (%)		
	1/2 MS	MS	WP
0.0	65±3.7	38 ± 0.5	46 ± 1.7
0.1	68± 2.0	63± 2.0	48± 3.5
0.5	70 ± 6.2	57± 3.3	74± 2.2
1.0	78± 1.3	51± 4.8	85± 3.3
2.0	55± 0.9	31± 0.3	66± 1.2

Data represent mean values standard error of three experiments.

<줄기증식>

Table 2. Effects of BA concentrations on shoot multiplication from cotyledonary nodes of *S. chinensis* on WP medium.

BA concentration (mg/L)	Number of shoots after 8 weeks	Shoot length (cm)
0.0	NR	2.6
0.1	3.4 ± 0.9	3.7
0.5	8.4 ± 1.5	4.5
1.0	11.6 ± 1.8	4.2
2.0	5.7 ± 0.4	3.4
2.8	2.8 ± 0.1	2.8

Data represent mean values standard error of three experiments. NR, no respond.

Table 3. Effects of auxin-cytokinin combinations on shoot multiplication and elongation of *S. chinensis* cotyledonary nodes

Hormones(mg/L)		Number of shoots after 8weeks	Shoot length(cm)
BA	NAA		
0.0	0.5	NR	2.1
0.5	0.5	3.5 ± 0.7	3.8
1.0	0.5	6.3 ± 0.9	5.1
0.0	1.0	NR	1.8
0.5	1.0	3.1 ± 0.2	3.0
1.0	1.0	2.8 ± 0.7	3.2

Data represent mean values standard error of three experiments. NR, no respond.

<발근시험>

Table 4. Effects of IBA and NAA on root induction efficiency from the micropropagated shoots of *S. chinensis* after 6 weeks of cultivation.

Auxins(mg/L)	Rooting(%)	Number of Roots	Root Length(cm)
Control 0.0	NR	NR	NR
IBA 0.5	21± 5.3	2.4	2.2
1.0	25± 5.8	2.8	2.9
NAA 0.5	62± 4.4	5.6	3.7
1.0	52 ± 4.7	4.9	2.6
2.0	45±5.2	4.6	2.6
IBA 0.5+NAA 0.5	43± 3.8	4.2	2.8
IBA 0.5+NAA 1.0	40±3.9	3.9	2.2
IBA 1.0+NAA 0.5	49±3.1	4.5	3.3
IBA 1.0+NAA 1.0	39±4.6	3.7	2.5

As a carbon source, 3% glucose was added to WP medium. Data represent mean values standard error of three experiments. NR, no respond.

오미자 종자식물의 자엽마디로부터 대량증식을 위한 효과적이고, 재현성 있는 방법을 개발하였다. 종자에 따라 오미자의 발아효율이 크게 좌우되는데, 성숙하고

건조된 종자는 0.1~2.0 mg/l GA₃이 포함된 1/2 MS, MS, 그리고 WPM 배지에서 낮은 발아율을 보인 반면에, 미성숙한 종자는 상대적으로 높은 발아율을 나타냈다. 3% 글루코오스, 0.7% agar 그리고 1.0 mg/l GA₃이 포함된 WPM 배지에서 25℃로 어두운 상태에서 발아를 유도했을 때, 오미자의 발아율은 약 85%로 가장 좋은 것으로 나타났다. 약 6주 후, 오미자는 WPM 배지에서 85%, 1/2 MS 배지에서 78%, 그리고 MS 배지에서는 67%의 종자가 발아됨이 관찰되었다. 종자의 발아력은 배지의 종류와 발아촉진제 GA₃의 농도, 그리고 오미자 종자의 휴면타파 정도에 크게 의존적이었다.

오미자의 켈러스를 유도하기 위해, 종자식물은 식물 호르몬이 없는 WPM 배지로 옮겨져 25℃, 16/8 시간의 광주기로 배양되었다. 배양 후 8주가 지나면, 유식물체는 키가 약 5~7 cm, 뿌리는 3 cm, 그리고 4~5개의 잎을 갖는 식물체로 성장한다. 켈러스는 대부분의 호르몬 조합에서 생성되었는데 특히 1.0 mg/l NAA에 1.0 mg/l의 Zeatin이나 0.5 또는 1.0 mg/l BA를 첨가한 WPM 배지를 25℃, 어두운 조건에서 잘 생성되었다. 위 조건으로 만들어진 켈러스는 부서지기 쉬운 흰색을 띠었으며, 0.05 또는 0.1 mg/l 2,4-D와 0.1 또는 0.5 mg/l BA가 포함된 WPM 배지에서 생성된 켈러스 역시 부서지기 쉽고 흰색을 띠었다.

8주 성장한 어린 오미자로부터 얻은 자엽마디가 shoot의 증식에 사용되었다. 식물 성장호르몬이 없는 배지에서 자엽마디의 형태적인 변화는 관찰되지 않았고, BA가 첨가된 배지에서는 새로운 shoot가 형성되는 것으로 보아 BA가 새로운 shoot의 형성에 필수적인 호르몬임을 알 수 있었다. 새로운 shoot 형성을 위한 배지에 0.5~2.0 mg/l의 BA를 첨가하면 8주 내에 약 5~15개의 다경줄기가 형성되었다. BA 1.0 mg/l의 농도에서 가장 많은 수의 다경줄기 (평균 11.6 shoots)가 증식됨이 관찰되었다. 또한 옥신(NAA; 0.1 and 0.5 mg/l)과 cytokinin (BA; 0.5 and 1.0 mg/l)의 조합에서도 shoot의 유도와 길이의 신장이 보였다. 반면에, 높은 옥신 농도 (NAA 1.0 mg/l 이상) 에서 shoot의 증식은 제한적으로 이루어지고, 형성된 줄기의 밑 부위에 녹색의 단단한 켈러스가 형성되었다. 자엽마디로 형성된 최초의 shoot를 반복적으로 계대배양 함으로써 shoot의 증식배양이 확립하였다.

오미자의 다경줄기로부터 발근 효율을 높이기 위해 많은 다양한 조건들이

이용되었다. 적어도 1cm 이상 잘 발달된 shoots가 배양병에서 분리되어 각각 발근을 유도하기 위한 배지로 옮겨졌다. 0.5 mg/l NAA와 3% 글루코오스가 포함된 WPM 배지에서 shoots의 발근효율이 약 62%로 가장 높게 나타났고, 각각의 shoot는 길이가 약 3.7 cm, 평균 5.6개의 뿌리가 생성되었다. 1.0 mg/l IBA와 1.0 mg/l NAA를 동시에 첨가했을 때, 길이 3.5 cm, 4개의 뿌리가 유도됨을 볼 수 있었다. 발근을 위한 탄소원으로 슈크로스를 글루코스로 대체하면, 발근효율 뿐만 아니라 뿌리의 수와 길이도 현저하게 감소됨을 보였다. 또한, 0.5 mg/l NAA와 1.0 mM cyclodextrin 조합의 shoots 역시 약 44%의 발근효율을 나타냈다.

라. 체세포배배양에 의한 증식(충북대 산림과학부)

* 재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험에서 사용한 공시재료는 2001년 11월에 무주군 안성면 장기리에 위치한 흥농종묘사에서 오미자 종자를 구입하여 냉장(4℃)보관하였다가 2002년 5월에 실험을 실시하였다.

성숙한 종자를 500mL 삼각플라스크에 넣고 Tween 20용액을 3-4방울 넣은 다음, 수돗물로 깨끗이 세척하였다. 세척된 종자는 무균대에서 70% 에틸알콜에 1분 30초간 소독한 후 멸균수로 3회 세척한 다음, 2% sodium hypochlorite(NaClO) 용액에 5분동안 살균하고, 멸균수로 3-4회 세척하였다. 표면살균된 종자는 날카로운 칼을 이용하여 해부현미경 하에서 성숙배를 채취하여 배지에 치상하고 배양하였다.

2. 캘러스 유도

캘러스 유도를 위한 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지와 MS II(Merkle and Sommer, 1986) 기본배지를 사용하였다(Table 1). MS II 배지는 Blaydes(Witham et al., 1971)의 major salts, Brown의 minor salts(Sommer and Brown, 1980), Murashige and Skoog의 iron, Gresshoff and Doy의 vitamins을 조합한 배지로서, Merkle과 Sommer(1986)가 목련속 수종의 미숙배를 이용하여 체세포를 유도하기 위해 사용된 배지이다. 이 논문에서는 Merkle과

Sommer(1986)가 사용하였던 배지를 편의상 “MSⅡ배지”라고 명하였다.

식물생장조절물질의 처리는 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1~4.0mg/L 단독처리 및 2,4-D 0.1~4.0mg/L 와 BAP(6-benzylaminopurine) 0.1~1.0mg/L를 농도별로 조합처리하여 MS 배지와 MSⅡ 배지에 각각 첨가하였다. 그리고 켈러스 유기에 미치는 ABA의 효과를 조사하기 위한 실험에서는 2,4-D 0.1~4.0mg/L와 ABA(Absciscic acid) 0.1~1.0mg/L를 농도별로 조합처리하여 MS 배지에 각각 첨가하였다(Table 2).

켈러스 유도배지의 제조는 MS 기본배지에 sucrose 3%를 첨가하고, MSⅡ 기본배지에 casein 1g/L, sucrose 4%를 첨가하였다. pH 5.8로 맞추고, agar 0.8%를 첨가하였으며, 15기압, 121℃로 15분간 고압멸균한 후, 87×15mm 크기의 petri-dish에 20mL씩 분주하였다. 배양조건은 25±2℃의 암소에서 배양하였다

켈러스 유도를 위한 절편체의 치상개체수는 처리구당 5개씩 4반복으로 성숙한 접합자배 조직을 접종하였다. 초대배양 후 4~5주 간격으로 동일 조건의 배지에서 지속적인 계대배양을 통해 증식, 유지시켰다. 배양 8주 후에 각각의 처리구에서 켈러스 색, 배발생능 켈러스 발생을 조사하였다. 조사방법은 켈러스 색은 육안으로 판정하였으며, 배발생능 켈러스로의 판단여부는 물기가 많고 구성세포간에 부착이 적어 쉽게 부서지는 켈러스를 비배발생 켈러스로 간주하고, 조성이 단단한 것을 배발생 켈러스로 판단하여 구분하였다.

3. 체세포배의 형성유도

성숙배에서 유도된 배발생 켈러스로부터 체세포배를 발생시키기 위하여 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS배지와 MSⅡ 배지에 각각 계대배양하여 체세포배를 유도하였다. 배양조건은 25±2℃의 배양실에서 2,600-3,000lux의 냉백색 형광등하에 광주기는 명 16시간, 암 8시간으로 하였다. 배양 후 4~5주 간격으로 절편체에서 유도된 배발생 켈러스는 동일조성의 배지로 계대배양하여 증식 및 유지시켰다. 배양 6주 후에 결과를 조사하였고, 배지별로 체세포배가 형성된 배발생 켈러스의 갯수를 측정하였다.

4. 2차체세포배의 유도

배발생 켈러스로부터 유도된 구상형의 체세포배를 이용하여 2차체세포배 형성

을 시도하였다. 배지는 MS 기본배지, MS 기본배지에 2,4-D 0.1mg/L 단독첨가 및 2,4-D 0.1mg/L와 BAP 0.1, 0.5mg/L를 각각 혼합첨가하여 사용하였다. 배양 6주 후에 이차체세포배가 형성된 절편체의 개수와 성숙된 체세포배의 갯수를 조사하였다.

5. 식물체 재분화 유도

체세포배 발생과정을 거쳐 정상적으로 발달한 어뢰형 및 자엽형 체세포배를 선별하여 MS 기본배지, MS 기본배지에 GA₃ 0.2, 0.5mg/L와 BAP 0.1, 0.5mg/L를 각각 첨가한 배지에서 발아 및 식물체의 재분화를 유도하였다. 배양 8주 후에 발아하여 식물체로 재분화된 체세포배의 갯수를 조사하였다.

Table 1. Composition of the culture media used in this study.

Components	Concentration(mg/L)	
	MS	MS II
References	Murashige and Skoog (1962)	Merkle and Sommer (1986)
Macroelements		
NH ₄ NO ₃	1,650	1,000
Ca(NO ₃) ₄ · 4H ₂ O	-	347
K ₂ SO ₄	-	-
KNO ₃	1,900	1,000
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	35
KH ₂ PO ₄	170	300
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3
KCl	-	65
Microelements		
KI	0.85	0.6
Na ₂ MoO · 2H ₂ O	0.25	0.025
H ₃ BO ₃	6.2	2
MnSO ₄ · H ₂ O	-	6.06
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	4.0
Na ₂ H ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025
Vitamins		
Nicotinic acid	0.5	0.1
Pyridoxine HCl	0.5	0.1
Thiamin HCl	0.1	1.0
Myo-Inositol	100	1.0
Others		
Glycine	2	-
Casein(enzymatic CH ₄)	-	1,000
Sucrose	30,000	30,000
Agar	8,000	8,000
pH	5.8	5.8

Table 2. Various combinations and concentrations of plant growth regulators used for culture medium.

MS and MS II medium		MS medium	
Plant growth regulators(mg/L)		Plant growth regulators(mg/L)	
2,4-D	BAP	2,4-D	ABA
0.1	0.0	0.1	0.1
	0.1		0.25
	0.25		0.5
	0.5		1.0
	1.0		
0.5	0.0	0.5	0.1
	0.1		0.25
	0.25		0.5
	0.5		1.0
	1.0		
1.0	0.0	1.0	0.1
	0.1		0.25
	0.25		0.5
	0.5		1.0
	1.0		
2.0	0.0	2.0	0.1
	0.1		0.25
	0.25		0.5
	0.5		1.0
	1.0		
4.0	0.0	4.0	0.1
	0.1		0.25
	0.25		0.5
	0.5		1.0
	1.0		

IV. 결과 및 고찰

1. 켈러스 유도

오미자의 성숙배를 MS 배지와 MSII 배지에 치상하여 켈러스 및 배발생켈러스 유기에 미치는 성장조절물질 2,4-D와 BAP의 영향을 조사한 결과는 Table 3, 4와 같다.

켈러스는 성숙배를 배양한 2주후부터 약간 부풀어오르면서 형성되기 시작하였고, 켈러스의 색은 MS배지에 2,4-D와 BAP 혼합첨가에서는 담황색, 노란색 그리고 백색이었고, MSII배지에 2,4-D와 BAP 혼합첨가에서는 담황색과 노란색이었다. 또한 MS배지에 2,4-D와 ABA 혼합첨가에서는 백색의 켈러스만이 발생하였다. 배발생 켈러스의 색은 주로 담황색, 노란색을 띠었다.

켈러스 유도는 2,4-D 단독처리의 경우 MS배지에서는 2,4-D의 농도가 2.0mg/L일 때 유도율 25%, MSII배지에서는 2,4-D의 농도가 0.5, 1.0mg/L일 때 각각 45%, 40%의 유도율로 가장 좋았다. 2,4-D와 BAP의 조합처리의 경우 MS배지에서는 2,4-D 0.5mg/L와 BAP 0.25mg/L, 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 각각 25%의 유도율로 다른 처리구에 비해 양호하게 나타났고, MSII배지에서는 2,4-D 1.0mg/L와 BAP 0.25mg/L, 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 각각 55%의 유도율로 다른 처리구에 비해 양호하게 나타났다. 성장조절물질의 처리농도에 있어서는 2,4-D의 농도가 높아질수록 켈러스 유도율은 감소하였으며, 특히 2,4-D 4.0mg/L와 BAP 0.0~1.0mg/L를 혼합첨가한 처리구에서는 켈러스가 유기되지 않았다. 빈 등(1996)은 신나팔나리의 성숙배조직으로부터 배발생 켈러스 유도시 고농도인 5mg/L에서는 켈러스 유도가 억제되는 것으로 나타났다고 보고하였으며, 고 등(1997)은 왕벚나무의 접합자배로부터 배발생 켈러스 유도시 2,4-D의 농도가 높아질수록 켈러스 유도비율은 저조하였다고 하였는데 이는 본 실험과 일치하였다. 또한 BAP의 농도에 있어서는 2,4-D에서와 마찬가지로 BAP의 처리농도가 높아질수록 배발생 켈러스의 유도율은 감소하였다. 박 등(1992)은 배발생 켈러스 유도시 2,4-D 0.5mg/L 단독처리, 또는 2,4-D와 BAP 0.1mg/L가 조합된 배지에서 가장 많이 형성되었다고 보고하였다. 또한 문 등(1994)은 배발생 켈러스 유도를 위해 2,4-D 1.0mg/L에 BAP 0.1mg/L을 첨가하여 사용하였으며, Merkle *et al.*(1990)도 2,4-D 2.0mg/L에 BAP 0.25mg/L를 첨가하여 사용하였다. 따라서 오미자의 접합자배로부터 켈러스의 유기를 위한 성장조절물질의 처리농도에 있어서는 2,4-D의 농도가 낮을수

록, 그리고 BAP의 농도가 낮을수록 효과적인 것으로 생각된다.

배발생 켈러스의 형성률에 있어서, 우선 MS배지에서는 2,4-D 0.5mg/L와 BAP 0.1~1.0mg/L, 2,4-D 1.0mg/L와 BAP 0.1~0.5mg/L 그리고 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 유도되었는데, 그중에서 2,4-D 0.5mg/L에 BAP 0.25mg/L를 첨가한 배지에서 20%의 유도율로 다른 처리구에 비해 가장 양호하였다. MSⅡ배지에서는 2,4-D 0.5mg/L와 BAP 0.1mg/L, 2,4-D 1.0mg/L와 BAP 0.1~1.0mg/L, 그리고 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1, 0.25mg/L를 각각 혼합첨가한 배지에서 유도되었으며, 그중에서 2,4-D 2.0mg/L에 BAP 0.1mg/L를 첨가한 배지에서 45%의 유도율로 다른 처리구에 비해 가장 효과적이었다. 그러나, 2,4-D 0.5~4.0mg/L의 단독처리구에서는 배발생 켈러스가 유기되지 않았다.

그리고, 배발생 켈러스 유기에 미치는 사이토키닌(BAP)의 효과를 조사한 결과, 2,4-D 단독처리구에서는 배발생 켈러스가 유기되지 않았으며, 단지 2,4-D와 BAP의 혼합처리구에서만 배발생 켈러스가 유기되었다. 그러므로 배발생 켈러스를 발생시키기 위해서는 2,4-D의 단독첨가 보다는 BAP와의 혼합첨가가 더 효과적이라고 판단된다.

오미자의 성숙배를 MS 배지에 치상하여 켈러스 및 배발생 켈러스 유기에 미치는 성장조절물질 2,4-D와 ABA의 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다.

배발생 켈러스 유기에 미치는 ABA의 효과는 2,4-D 4.0mg/L에 ABA 1.0mg/L를 제외한 모든 처리구에서 켈러스가 유도되었으나, 물기가 많고 부써지기 쉬운 전형적인 비배발생 켈러스만이 유기되었다. 따라서, ABA처리는 오미자의 성숙배로부터 배발생 켈러스의 유도에 비효과적이었다. 이와는 달리, 이와 소(1993)는 배발생 켈러스를 유도하는데 있어서 2,4-D 1.0mg/L의 단독처리보다 2,4-D 1.0mg/L에 ABA 0.5mg/L를 첨가한 경우가 더 양호하였다는 보고는 본 실험과 일치하지 않았다.

그러므로, 오미자의 성숙배로부터 배발생 켈러스의 유기에 2,4-D 단독첨가, 2,4-D와 ABA와의 혼합첨가보다는 2,4-D와 BAP와의 혼합첨가가 더 효과적이며, MS 기본배지보다는 MSⅡ 기본배지에 첨가하는 것이 더 효과적임을 알 수 있었다. 또한 성장조절물질의 처리농도에 있어서는 고농도보다는 저농도에서 더 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 배발생 켈러스의 형성은 낮은 빈도로 나타났으며, 이는 성숙배조직을 절편으로 사용했기 때문으로 추정된다.

Table 3. Effects of plant growth regulators on callus induction from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* on MS solid medium containing 2,4-D with BAP in various combinations after 8 weeks of culture.

Plant growth regulators (mg/L)		No. of inoculated explants	No. of induced callus (%)	No. of embryogenic callus (%)	No. of non-embryogenic callus	Callus color ^y
2,4-D	BAP					
0.5	0.0	20	3 (15.0 ab ^x)	0	3	LY
	0.1	20	3 (15.0 ab)	3 (15.0)	0	Y, LY
	0.25	20	5 (25.0 a)	4 (20.0)	1	W, LY
	0.5	20	2 (10.0 ab)	1 (5.0)	1	Y
	1.0	20	1 (5.0 ab)	1 (5.0)	0	Y
1.0	0.0	20	2 (10.0 ab)	0	2	LY
	0.1	20	4 (20.0 ab)	2 (10.0)	2	W, Y
	0.25	20	4 (20.0 ab)	1 (5.0)	3	LY,Y
	0.5	20	1 (5.0 ab)	1 (5.0)	1	Y
	1.0	20	0	0	0	-
2.0	0.0	20	5 (25.0 a)	0	5	W
	0.1	20	5 (25.0 a)	1 (5.0)	4	Y
	0.25	20	0	0	0	-
	0.5	20	2 (10.0 ab)	0	2	LY
	1.0	20	2 (10.0 ab)	0	2	Y
4.0	0.0	20	4 (20.0 ab)	0	4	W
	0.1	20	0	0	0	-
	0.25	20	0	0	0	-
	0.5	20	0	0	0	-
	1.0	20	0	0	0	-

^x. Mean separation within columns by Duncan' multiple range test, significant at the 5% level

^y. W: White , Y : Yellow, LY : Light yellow

Table 4. Effects of plant growth regulators on callus induction from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* on MSII solid medium containing 2,4-D with BAP in various combinations after 8 weeks of culture.

Plant growth regulators (mg/L)		No. of inoculated explants	No. of induced callus (%)	No. of embryogenic callus (%)	No. of non-embryogenic callus	Callus color ^y
2,4-D	BAP					
0.5	0.0	20	9 (45.0 ab ^x)	0	9	LY
	0.1	20	7 (35.0 abc)	3 (15.0)	4	Y, LY
	0.25	20	1 (5.0 e)	0	1	LY
	0.5	20	2 (10.0 de)	0	2	Y
	1.0	20	0	0	0	-
1.0	0.0	20	8 (40.0 ab)	0	8	LY
	0.1	20	9 (45.0 ab)	5 (25.0)	4	Y
	0.25	20	11 (55.0 a)	5 (25.0)	6	LY,Y
	0.5	20	6 (30.0 bcd)	3 (15.0)	3	Y
	1.0	20	3 (15.0 cde)	2 (10.0)	1	Y
2.0	0.0	20	3 (15.0 cde)	0	3	LY
	0.1	20	11 (55.0 a)	9 (45.0)	2	Y
	0.25	20	5 (25.0 bcde)	1 (5.0)	4	Y
	0.5	20	0	0	0	-
	1.0	20	0	0	0	-
4.0	0.0	20	1 (5.0 e)	0	1	LY
	0.1	20	0	0	0	-
	0.25	20	0	0	0	-
	0.5	20	0	0	0	-
	1.0	20	0	0	0	-

^x. Mean separation within columns by Duncan' multiple range test, significant at the 5% level

^y. Y : Yellow, LY : Light yellow

Table 5. Effects of plant growth regulators on callus induction from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* on MS solid medium containing 2,4-D with ABA in various combinations after 8 weeks of culture.

Plant growth regulators (mg/L)		No. of inoculated explants	No. of induced callus (%)	No. of embryogenic callus	No. of non-embryogenic callus	Callus color ^y
2,4-D	ABA					
0.5	0.1	20	3 (15.0 ab ^x)	0	3	W
	0.25	20	2 (10.0 ab)	0	2	W
	0.5	20	1 (5.0 ab)	0	1	W
	1.0	20	1 (5.0 ab)	0	1	W
1.0	0.1	20	5 (25.0 ab)	0	5	W
	0.25	20	2 (10.0 ab)	0	2	W
	0.5	20	3 (15.0 ab)	0	3	W
	1.0	20	2 (10.0 ab)	0	2	W
2.0	0.1	20	3 (15.0 ab)	0	3	W
	0.25	20	6 (30.0 a)	0	6	W
	0.5	20	5 (25.0 ab)	0	5	W
	1.0	20	3 (15.0 ab)	0	3	W
4.0	0.1	20	1 (5.0 ab)	0	1	W
	0.25	20	2 (10.0 ab)	0	2	W
	0.5	20	1 (5.0 ab)	0	1	W
	1.0	20	0	0	0	-

^x. Mean separation within columns by Duncan' multiple range test, not significant at the 5% level

^y. W: White

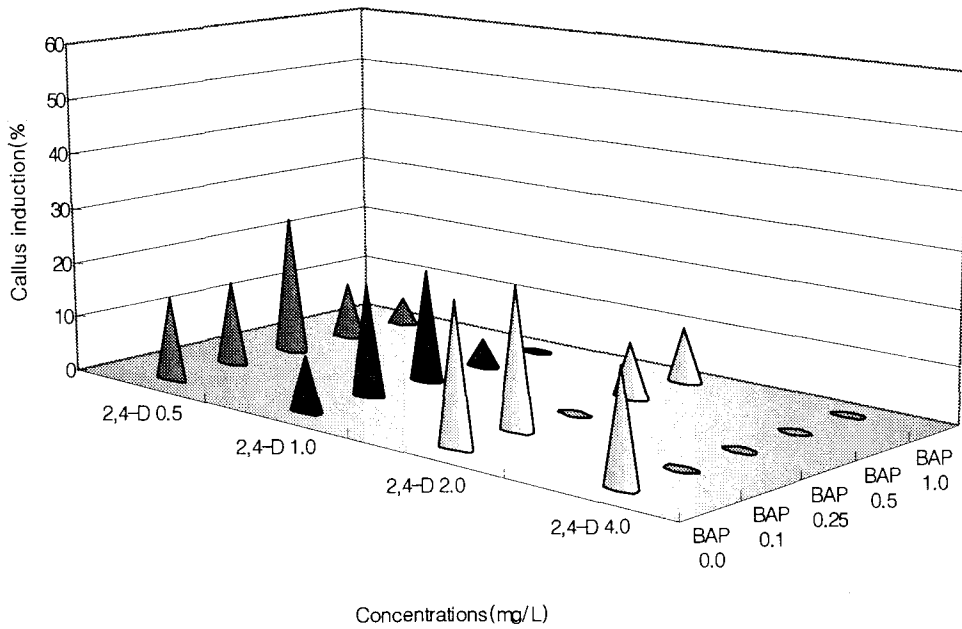


Figure 1. Effects of MS medium containing 2,4-D with BAP in various combinations on callus induction from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* after 8 weeks of culture.

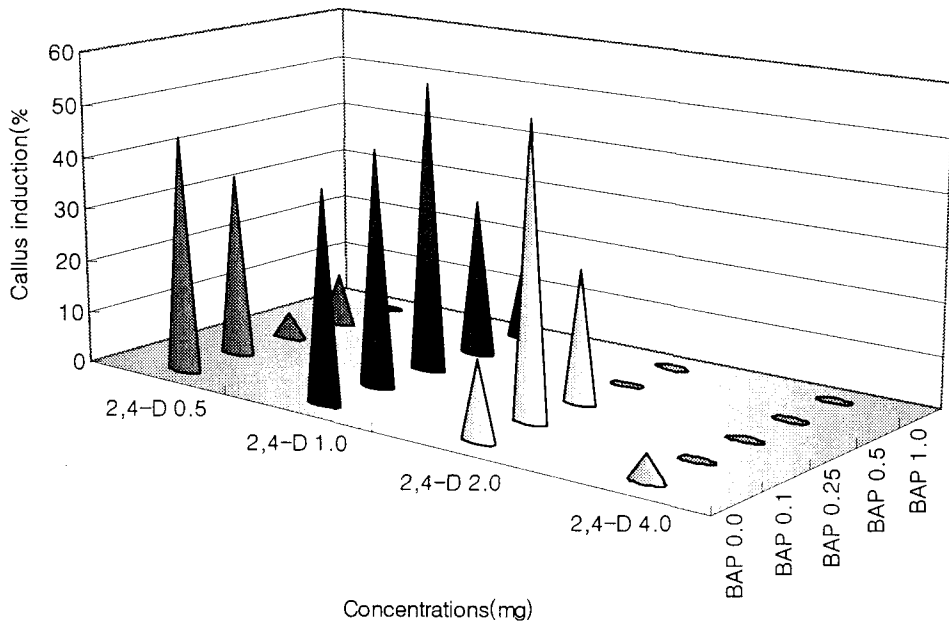


Figure 2. Effects of MSII medium containing 2,4-D with BAP in various combinations on callus induction from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* after 8 weeks of culture.

2. 체세포배의 형성

오미자의 성숙배를 배양하여 얻어진 배발생 캘러스를 체세포배 유도배지에서 배양한 결과는 Table 6과 같다.

MS 배지 및 MSII 배지에 2,4-D가 단독첨가되거나 2,4-D와 BAP가 혼합첨가된 40개 조합의 배지에서 유기된 배발생 캘러스를 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지와 MSII 기본배지에 각각 계대배양하였다. 캘러스는 배양 2주 이내에 갈색, 녹색을 띤 갈색 그리고 녹색으로 변화하였으며, 3주후부터는 캘러스로부터 구상형의 체세포배가 발생하기 시작하였다.

배발생 캘러스를 MS 기본배지에서 배양한 경우는 캘러스가 갈색 또는 녹색을

던 갈색으로 변하였고, 거의 모든 켈러스로부터 체세포배가 형성되었으며, 그 외의 켈러스는 체세포배가 형성되지 않고 배발생 켈러스만이 증식되었다. 체세포배는 켈러스의 상부와 배지 접촉 부위에서 구상형의 체세포배가 형성되었다. 체세포배는 2-3개씩 형성되는 것과 집단적으로 무리를 지어 형성되는 것도 있었다.

배발생 켈러스를 MSⅡ 기본배지에서 배양한 경우는 켈러스가 대부분 녹색으로 변하였고, 소량의 켈러스로부터 체세포배가 형성되었으며, 그 외의 켈러스는 체세포배가 형성되지 않고 생장이 정지된 경우가 많았다. 체세포배는 켈러스와 배지와의 접촉 부위에서 소량의 구상형 체세포배가 형성되었다.

체세포배의 형성률은 MS 기본배지에서 배양한 경우 85.7%의 유도율을 보였으며, MSⅡ 기본배지에서 배양한 경우 10.7%로 MS 기본배지에 비해 낮은 유도율을 보였다.

배발생 켈러스를 체세포배 유도배지에 계대배양한 6주 후에 체세포배의 효과적인 유도배지의 2차 조사를 위해 MSⅡ 기본배지에 배양중인 배발생 켈러스 중에서 체세포배가 발생되지 않은 켈러스를 선발하여 MS 기본배지와 MSⅡ 기본배지에 다시 계대배양한 결과는 Table 7과 같다.

MS 기본배지에서는 계대배양한 2주 후에 켈러스의 상부와 배지 접촉부위에서 구상형의 체세포배가 발생한 반면에, MSⅡ 기본배지에서는 체세포배가 형성되지 않았다. 체세포배의 형성률은 MS 기본배지에서 배양한 경우 22.2%의 유도율을 보였으며, MSⅡ 기본배지에서 배양한 경우 체세포배가 유도되지 않았다.

그러므로, 오미자의 성숙배로부터 유기된 배발생 켈러스에서 체세포배를 유도할 경우 MS 기본배지가 MSⅡ 기본배지보다 더 효과적이라고 할 수 있다.

오미자의 성숙배로부터 유기된 켈러스에서 체세포배의 발생양상은 Figure 3과 같다.

오미자의 배발생 켈러스를 MS 기본배지에 계대배양 하였던 바, 배양 3주 후 백색의 표면이 매끄러운 구상형의 체세포배가 발생하였고(Figure 3C), 배양기간이 경과됨에 따라 체세포배는 심장형(Figure 3D)을 거쳐 어뢰형(Figure 3E)으로 발달한 후 자엽이 벌어진 체세포배(Figure 3F)로 발달하였다. 그러나, 배발생 켈러스를 MSⅡ 기본배지에 계대배양한 경우 구상형의 체세포배가 발생하였지만 대부분 심장형 및 어뢰형으로 발달하지 못하고 구상형의 체세포배로 정지해 있었다.

체세포배 발생과정에서 비정상적인 체세포배의 발생양상은 Figure 4와 같다.

배양 동안 관찰된 비정상적인 체세포배의 종류를 보면, 발달이 더 이상 진행되

지 않는 구형기의 체세포배(Figure 4A), 한 개의 자엽을 갖는 체세포배(Figure 4B)가 관찰되었으며, 보울링핀형의 체세포배(Figure 4C)도 관찰되었다. 그리고 체세포배의 발아과정에서는 체세포배가 조기발아하여 자엽과 배축이 발달하지 않고 뿌리만 발달하는 것(Figure 4D), 배축이 비대성장하는 것(Figure 4E), 그리고 초기 발아단계에 있는 체세포배의 유아에서 2차 체세포배가 발생하는 것(Figure 4F)이 관찰되었다. 고 등(1997)은 체세포배 발달 과정에서 1-3개의 자엽을 갖는 체세포 배와 나팔모양의 체세포배가 관찰되었다고 보고하였다. 또한 두릅나무의 체세포배 발생 과정에서도 보울링핀형이나 나팔형 등 기형(abnormal type)이 많이 나타났다(문 등, 1999). 그리고 초기 체세포배의 배축이나 배병으로부터 2차, 3차 체세포배가 발생하는 경우도 있고(박 등, 1993), 체세포배의 발아과정에서 자엽이 비대성장하거나 배축이 신장하지 못하는 경우도 있다(문 등, 1994).

비정상 체세포배는 식물체로의 재생률과도 밀접한 관계가 있는데 특히, 나팔형의 경우에는 정상적인 체세포에 비하여 재생률이 상당히 떨어진다(Kerns et al., 1986). 최 등(1994)은 체세포배의 자엽형태에 따라 식물체 재생률을 조사하기 위하여 MS 기본배지와 0.1mg/L IAA, 1 mg/L BA, 1mg/L GA₃ 및 0.5% 활성탄을 각각 MS 기본배지에 첨가하여 배양한 결과, 식물체 재생률은 일반적으로 두 개의 자엽을 갖는 정상적인 배가 하나의 자엽을 갖는 배, 나팔형 및 구형기의 체세포배에 비하여 높았다고 보고하였다. 본 실험에서도 보울링핀형의 체세포배와 한 개의 자엽을 갖는 체세포배를 발아배지(MS + GA₃ 0.2mg/L)로 계대하여 배양한 결과, 식물체로 재분화되지 않았다.

Table 6. Effects of MS and MSII basal medium without plant growth regulators on the induction of somatic embryos from embryogenic callus induced from mature zygotic embryos of *Schizandra chinensis* after 6 weeks of culture.

Basal medium	No. of Embryogenic callus inoculated	No. of Embryogenic callus inducing somatic embryos (%)
MS	14	12 (85.7)
MSII	28	3 (10.7)

Table 7. Effects of MS and MSII basal medium without plant growth regulators on the induction of somatic embryos by secondary culture of embryogenic callus of *Schizandra chinensis* on the MSII basal medium after 6 weeks of primary culture.

Basal medium	No. of Embryogenic callus inoculated	No. of Embryogenic callus inducing somatic embryos (%)
MS	9	2 (22.2)
MSII	8	0 (0)

3. 2차체세포배 형성

체세포배의 지속적인 생산을 통해서 발생율을 증대하고자 배발생 캘러스에서 유기된 구상형의 1차체세포배로부터 2차체세포배를 유도한 결과는 Table 8과 같다.

배발생 캘러스로부터 발생한 초기단계의 체세포배들은 계속적으로 발달되어 약한 충격에도 분리되기 쉬운, 완전한 개별성을 갖고 있었다. 백색을 띤 구형단계의 배를 기존의 배발생 캘러스로부터 분리하여 유도배지에 계대배양한 2주 후부터 2차체세포배가 형성되기 시작하였다.

2차체세포배의 형성에 있어서, 우선 MS 기본배지에서 배양한 경우 치상한지 2주 후부터 백색의 구상형 체세포배의 표면으로부터 2차체세포배가 발생하면서 구상형의 원배가 증식하였으며, 색깔은 밝은 노란색으로 변화였다(Figure 5A). 4주 후부터는 일부의 구상형배가 연한 녹색의 어뢰형배로 성숙되면서(Figure 5B), 시간이 경과함에 따라 더욱더 성숙한 체세포배로 발달하였다(Figure 5C). 2,4-D 0.1mg/L 단독첨가 및 2,4-D 0.1mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 배양한 경우 백색을 띤 구상형 체세포배의 표면이 캘러스화되면서 배발생 세포피로 증식하였고, 색깔은 연한 노란색을 띠었다(Figure 5D). 2,4-D 0.1mg/L에 BAP 0.5mg/L첨가한 배지에서 배양한 경우 체세포배는 연한 갈색의 세포피로 변화였다.

2차체세포배의 형성률은 MS 기본배지에서 배양한 경우 90%의 유도율을 보였으며, 다른 처리구에서는 2차체세포배가 발생하지 않았다. 또한 해부현미경하에서 조사한 성숙한 2차체세포배의 개수는 MS 기본배지에서 총 52개, 평균 5.2개였다.

그러므로, 1차체세포배로부터 2차체세포배를 유도할 경우 MS기본배지가 2,4-D 단독첨가 및 2,4-D와 BAP의 혼합첨가보다는 더 효과적이라고 할 수 있겠다. 그리고 2,4-D 단독첨가 및 2,4-D와 BAP의 혼합첨가는 체세포배의 발생을 억제하고, 단순히 세포분열이 이루어지면서 캘러스화되는 것으로 생각된다.

Table 8. Effects of plant growth regulator treatments on the development of secondary somatic embryos from primary somatic embryos of *Schizandra chinensis* after 6 weeks of culture.

Media and treatment (mg/L)	No. of primary somatic embryos clutured	No. of explants developing secondary somatic embryos (%)	Total no. of mature secondary somatic embryos (mean)
MS control	10	9 (90.0)	52 (5.20±2.15)
MS+2,4-D 0.1	11	0	0
MS+2,4-D 0.1+BAP 0.1	11	0	0
MS+2,4-D 0.1+BAP 0.5	10	0	0

3. 식물체 재분화

오미자의 배발생 캘러스로부터 유기된 체세포배중에서 체세포배 발생과정을 거쳐 정상적으로 발달한 어뢰형 체세포배와 자엽형 체세포배를 선별하여 식물체로의 성장을 유도한 결과는 Table 9와 같다.

식물체 분화양상은 MS 배지에 BAP 0.1mg/L를 첨가한 배지에서는 배양 5주후 체세포배의 유아부분에서 shoot가 성장되기 시작하였다. shoot 발생은 한 치상체당 3개 이상의 줄기가 총생적으로 성장되거나(Figure 6A), 2개의 줄기가 성장되

는 것도 있었으나(Figure 6B), 뿌리의 신장은 이루어지지 않았다. 한편, 1/2 MS 배지에서는 체세포배의 유근부분에서 새로운 뿌리가 형성되었으며, 뿌리수는 1개(Figure 6C)또는 2개(Figure 6D)이었다. 그러나 유경은 성장되지 않았다.

처리효과는 우선 shoot 발달의 경우 MS 배지에 BAP 0.1mg/L, GA₃ 0.2mg/L를 첨가한 처리구에서 각각 20%, 10%의 발생율을 보였다. 그리고 뿌리 발달에 있어서는 염류를 반감시킨 1/2MS 배지에서 33.3%의 발생율을 보였다.

그러므로, 오미자의 체세포배로부터 식물체의 재분화에는 MS 기본배지보다는 염류를 반감시킨 1/2 MS 배지와 저농도의 BAP 첨가가 더 효과적임을 관찰할 수 있었다.

이상에서 유근과 유경의 동시 성장유도에 의한 식물체는 얻지 못하였으므로 이에 대한 연구가 계속되어야 한다.

Table 9. Effects of various plant growth regulators supplemented to MS medium on organ induction from somatic embryos of *Schizandra chinensis* after 8 weeks of culture.

Media and treatment (mg/L)	No. of somatic embryos inoculated	% of embryos regenerated	
		shoot formation	root formation
MS control	8	0	0
1/2 MS control	6	0	33.3
MS + BAP 0.1	10	20.0	0
MS + BAP 0.5	10	0	0
MS + GA ₃ 0.2	10	10.0	0
MS + GA ₃ 0.5	10	0	0

*반복실험결과 다시 체세포배형성 캘러스가 형성되어 자람.

체세포배를 인공종피를 씌워 인공종자를 만들었으며 이에서 줄기가 자라기도 하고 뿌리도 발달하였으며 2차배도 발달하고 있음.

2,4-D와 Zeatin을 농도별로 첨가한 배지에서 접합자배를 배양하여 배형성 캘러스를 유도한 결과는 다음 표 10과 같다.

Table 10. Effect of plant growth regulators (PGRs) on induction of embryogenic callus from zygotic embryos of *Schisandra chinensis* after 8-weeks of culture on Merkle and Sommer's (1986) medium and, development of primary somatic embryos from these embryogenic calluses on PGR-free MS basal medium

PGRs (μM)		Embryogenic callus induction (%)	Nature of callus	Zygotic embryo response	Somatic embryos/g of callus*
2,4-D	Zeatin				
9.04	0.04	9.67 \pm 1.44	GWF	E	46.67 \pm 0.72
9.04	0.09	32.00 \pm 1.70	GWF	HE	61.67 \pm 0.72
9.04	0.18	5.67 \pm 0.72	GWF	E	20.00 \pm 0.00

*fresh mass of embryogenic callus

Each value represents mean S.E of three replicates per treatment. GWF: Greenish White and Friable, HE: Highly Embryogenic, E: Embryogenic

Table 11. EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS (PGRs) ON THE INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLUSES FROM ZYGOTIC EMBRYOS OF *S. CHINENSIS*, AFTER 8-WEEKS OF CULTURE ON MERKLE AND SOMMER□S MEDIUM, AND THE DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS FROM THESE EMBRYOGENIC CALLUSES ON PGR-FREE MS BASAL MEDIUM

PGRs (μ M)			Mean no. of zygotic embryos forming embryogenic callus (%)	Nature of callus	Mean no. of somatic embryos / g embryogenic callus			
2-4-D	BA	Zeatin			Globular - stage	Heart-shaped stage	Torpedo-shaped stage	Cotyledonary-shaped stage
0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
2.26			-	YWLF	-	-	-	-
4.52			-	YWLF	-	-	-	-
6.78			-	YWLF	-	-	-	-
9.04	-	-	2.3 ^{ef} \pm 0.27	GWLF	6.7 ^f \pm 0.72	-	-	-
11.30			-	BC	-	-	-	-
13.56			-	BC	-	-	-	-
9.04	0.11	-	2.67 ^e \pm 0.27	GWF	13.67 ^e \pm 0.72	8.4 ^c \pm 0.27	5.0 ^c \pm 0.47	1.7 ^{de} \pm 0.27
9.04	0.22	-	7.0 ^d \pm 0.00	GWF	18.3 ^{de} \pm 0.72	11.5 ^d \pm 0.27	6.7 ^{bc} \pm 0.54	3.4 ^d \pm 0.27
9.04	0.44	-	21.3 ^b \pm 0.27	GWF	30.0 ^c \pm 0.00	21.7 ^c \pm 0.27	11.65 ^b \pm 0.27	8.4 ^c \pm 0.27
9.04	-	0.04	9.7 ^c \pm 1.44	GWF	46.7 ^b \pm 0.72	25.0 ^b \pm 0.47	15.0 ^{ab} \pm 0.47	11.7 ^b \pm 0.27
9.04	-	0.09	32.0 ^a \pm 1.70	GWF	61.7 ^a \pm 0.72	33.4 ^a \pm 0.72	20.0 ^a \pm 0.47	18.4 ^a \pm 0.27
9.04	-	0.18	5.67 ^{de} \pm 0.72	GWF	20.0 ^d \pm 0.00	10.0 ^{de} \pm 0.47	5.0 ^c \pm 0.00	3.4 ^{cd} \pm 0.27

Each value represents the mean \pm S.E of three replicates per treatment. The data were statistically analyzed using DMRT. In the same column, significant differences according to LSD at the $P(0.05)$ level are indicated by different letters. GWLF: Greenish White and Less Friable, GWF: Greenish White and Friable, YWLF: Yellowish white and less friable, BC: Brownish Compact

4. 오미자의 이차체세포배 형성에 미치는 글루타민의 역할

글루타민을 농도별로 첨가한 배지에서 2차체세포배를 유도한 결과 농도에 따른 효과는 그림과 같았다. 250mg/L를 첨가한 배지에서 가장 양호한 성적을 보였다.

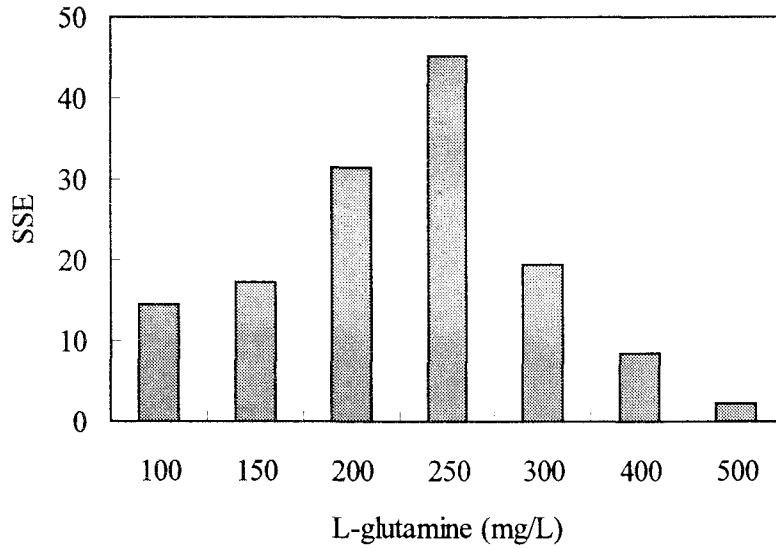


Fig. 3. Effect of L- glutamine on induction of secondary somatic embryos (SSE) from primary somatic embryos formed on MS-PGR free basal medium

5. 체세포배를 통한 식물체 형성과정 및 조직관찰

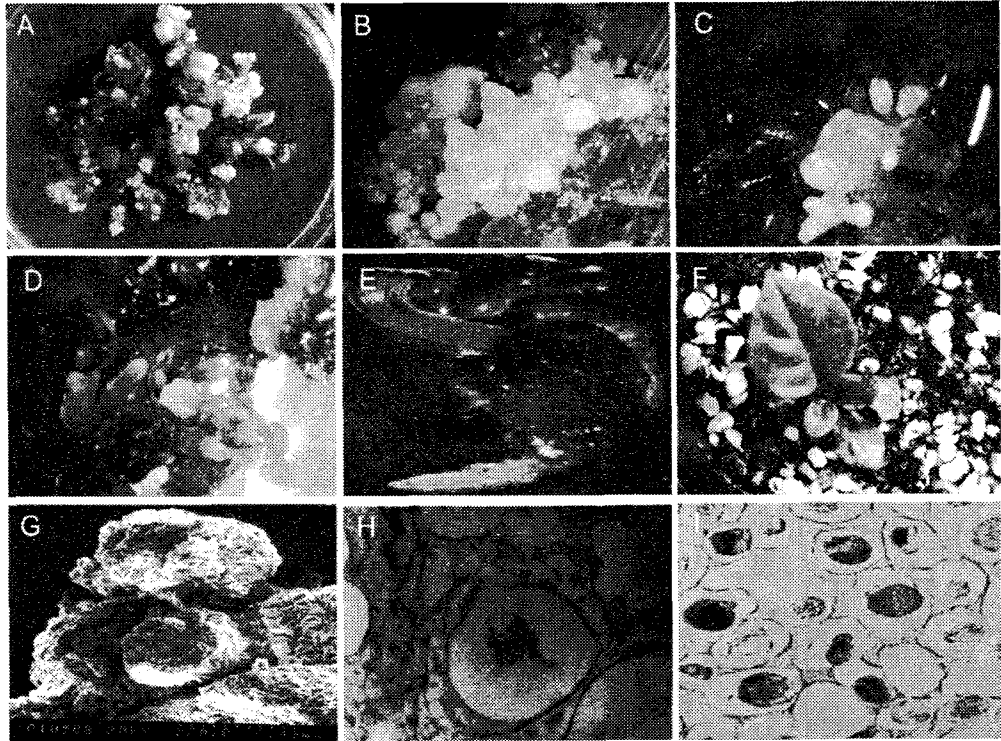


Fig. 4. A) Primary somatic embryos; B-D) Secondary somatic embryo formation; E) Germinated cotyledonary somatic embryos showing shoot and root; F) A hardened plant; G) SEM photograph showing globular stage embryos; H) TEM section of embryogenic cell; I) C.S. of embryogenic callus

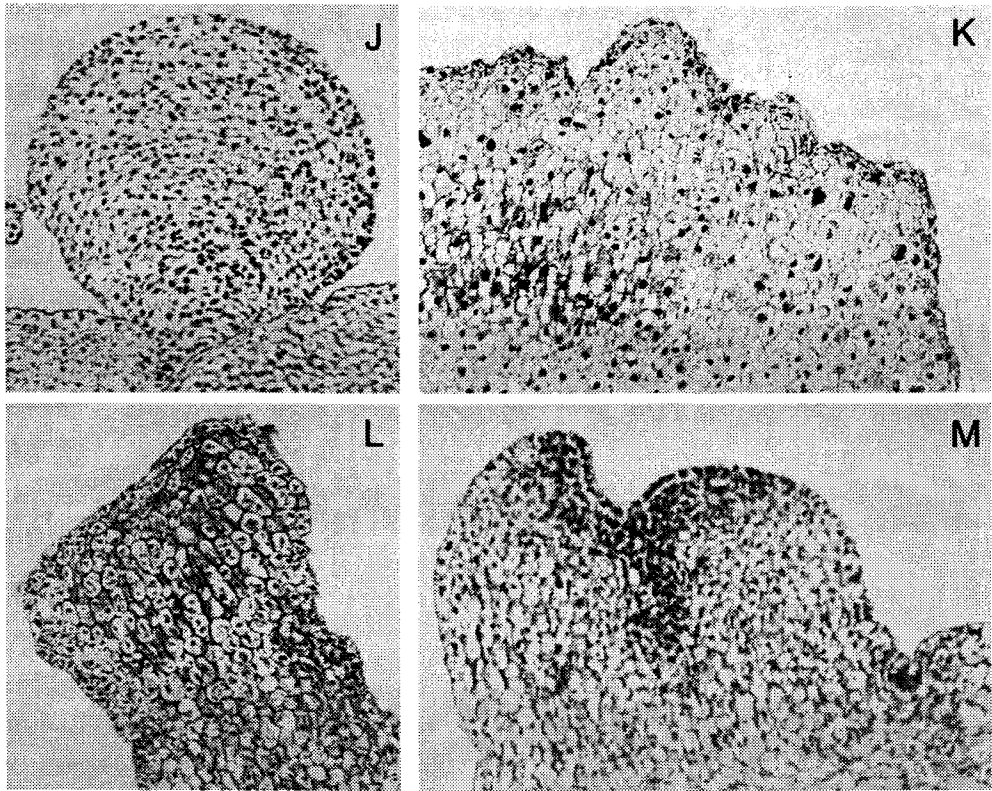


Fig 5. J) L.S. of globular embryo; K) L.S. of torpedo-shaped embryo; M) L.S cotyledonary embryo.

5. 체세포배의 액체배양



Fig.6. 오미자의 배형성켈러스 및 현탁배양중인 진탕배양기

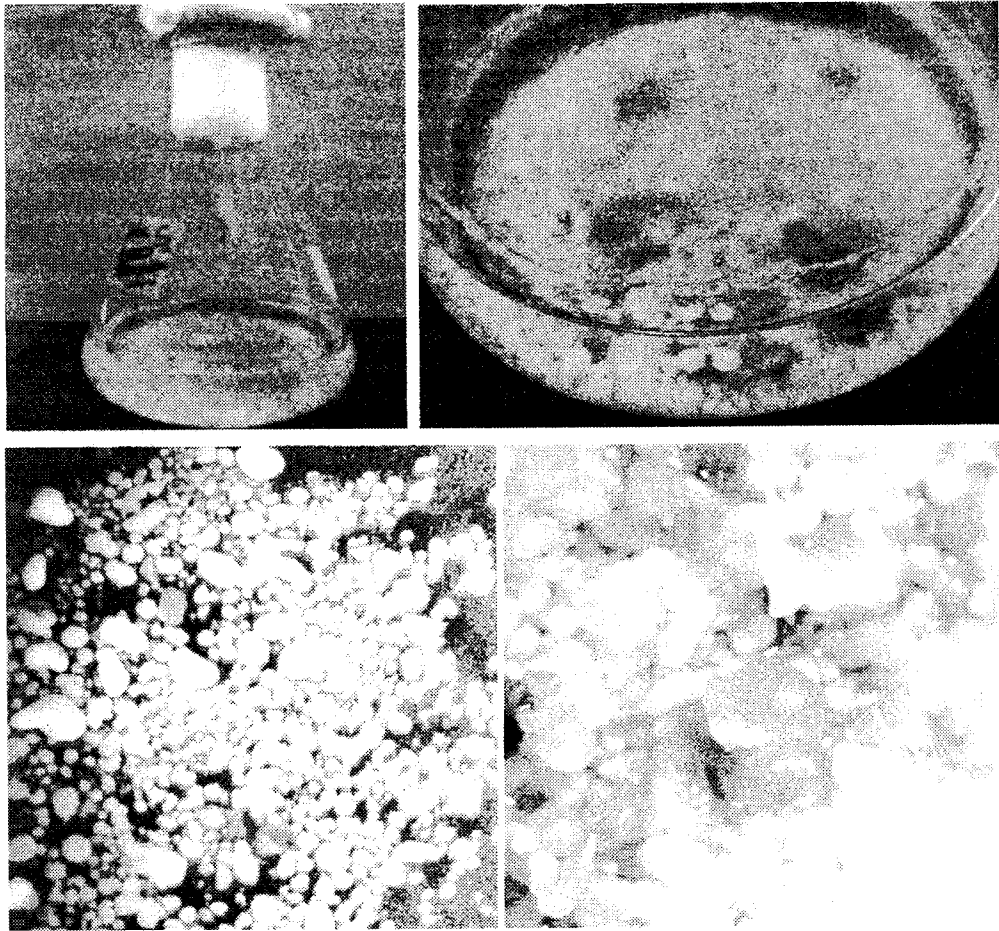


Fig. 7. 오미자 현탁배양에 의한 체세포배의 증식

A:액체배양 B: 현탁배양 중인체세포배 C&D:액체배지에서 자란 체세포배

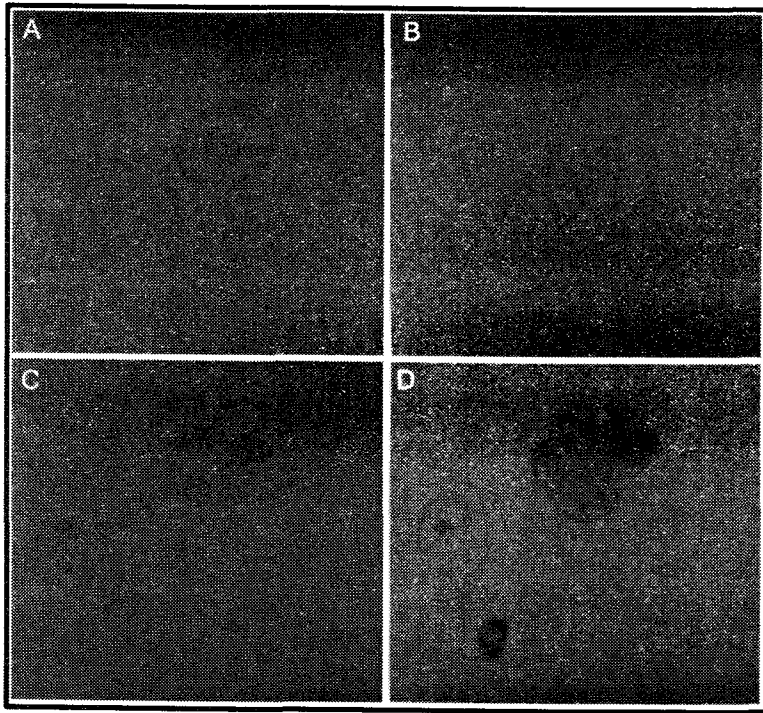


Fig. 8. 세포의 분열관찰

A:구형의세포 B: 2세포단계 C: 4세포단계 D:구형배 전단계

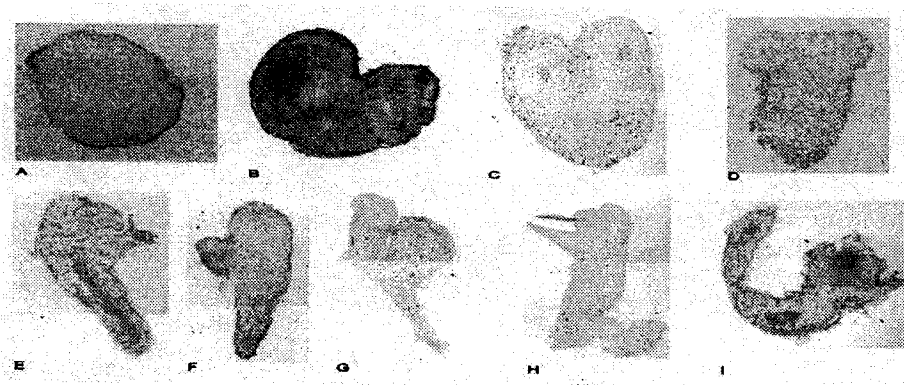


Fig. 9. 체세포배의 발달과정

A:구형배 B: 심장형배 C: 후기 심장형배 D:어뢰형 배 E&F: 후기 어뢰형배
G: 자엽형 배, H:발아중인 배

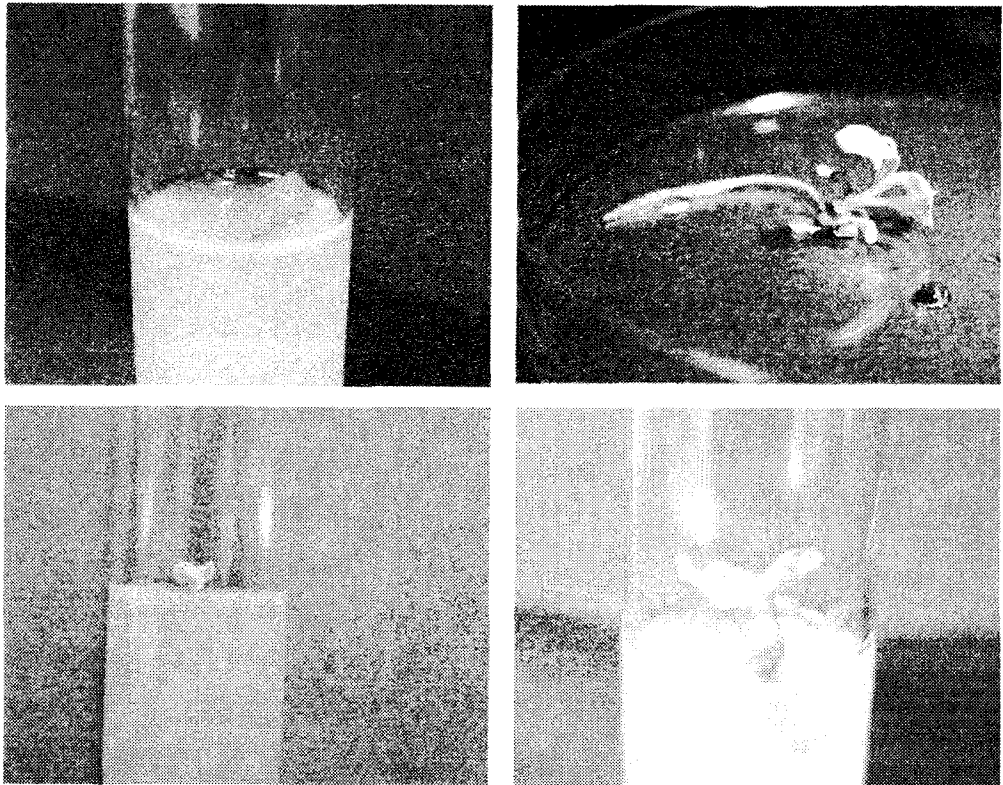


Fig. 10. 체세포배의 발아과정

V. 결론

본 연구는 조직배양 기법중 체세포 배발생을 통하여 효율적인 기내증식법을 개발하고자 오미자의 성숙배로부터 배발생 캘러스를 유기하고, 이들 캘러스로부터 체세포배의 유도 및 식물체 재분화에 미치는 배지 및 식물생장조절물질의 효과에 관하여 조사하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 성숙한 접합자배로부터 캘러스 유도에 미치는 성장조절물질의 영향을 조사한 결과 2,4-D 단독처리의 경우 MS배지에서는 2,4-D의 농도가 2.0mg/L일 때 유도율 25%, MSII 배지에서는 2,4-D의 농도가 0.5, 1.0mg/L일 때 각각 45%, 40%의 유도율로 가장 좋았다. 2,4-D와 BAP의 조합처리의 경우 MS배지에서는 2,4-D 0.5mg/L와 BAP 0.25mg/L, 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합

첨가한 배지에서 각각 25%의 유도율, MSⅡ배지에서는 2,4-D 1.0mg/L와 BAP 0.25mg/L, 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 각각 55%의 유도율로 다른 처리구에 비해 가장 양호하였다. 생장조절물질의 처리 농도에 있어서는 2,4-D와 BAP의 농도가 낮아질수록 캘러스 유도율이 증가하였다.

2. 성숙한 접합자배로부터 유도된 배발생 캘러스의 형성은 MS배지에서는 2,4-D 0.5mg/L와 BAP 0.25mg/L를 혼합첨가한 배지에서 20%의 유도율, MSⅡ배지에서는 2,4-D 2.0mg/L와 BAP 0.1mg/L를 혼합첨가한 배지에서 45%의 유도율로 다른 처리구에 비해 가장 효과적이었다. 그러나, 2,4-D 단독처리구에서는 배발생 캘러스가 유기되지 않았으며, 단지 2,4-D와 BAP의 혼합처리구에서만 배발생 캘러스가 유기되었다.
3. 접합자배에서 유도된 배발생 캘러스를 MS 및 MSⅡ 기본배지로 옮겨 체세포배의 형성을 시도한 결과 MS 기본배지에서 배양한 경우 85.7%의 유도율을 보였으며, MSⅡ 기본배지에서 배양한 경우 10.7%로 MS 기본배지에 비해 낮은 유도율을 보였다. 체세포배의 발생양상은 MS 배지에서는 배양 3주후 구상형의 체세포배가 발생하였고, 배양기간이 경과됨에 따라 심장형을 거쳐 어뢰형으로 발달한 후 초기 자엽형의 체세포배로 발달하였다. 그러나, MSⅡ 배지에서는 구상형의 체세포배가 대부분 심장형 및 어뢰형으로 발달하지 못하고 정지해 있었다.
4. 체세포배의 발생율을 증대하고자 배발생 캘러스에서 유기된 구상형의 1차체세포배로부터 2차체세포배를 유도한 결과 2차체세포배의 형성률은 MS 기본배지에서 90%의 유도율을 보였으며, 다른 처리구에서는 2차체세포배가 발생하지 않았다. 성숙한 이차체세포배의 갯수는 MS 기본배지에서 총 52개, 평균 5.2개였다.
5. 체세포배 발생과정을 거쳐 정상적으로 발달된 어뢰형 체세포배와 자엽형 체세포배로부터 식물체 재분화에 미치는 몇가지 처리효과를 조사한 결과는 shoot 발달의 경우 MS 배지에 BAP 0.1mg/L, GA₃ 0.2mg/L를 첨가한 처리구에서

각각 20%, 10%의 발생율, 그리고 새뿌리 발달에 있어서는 염류를 반감시킨 1/2MS 배지에서 33.3%의 발생율을 보였다.

6. 이차체세포배의 형성에는 L-glutamine 250mg/L에서 45%로 가장 좋았고현탁 배양에의한 증식도 가능하였다.

4. 삼목에 의한 증식시험(남오미자)

가. 재료 및 방법

1) 재료의 확보

제주도에서 2003년 8월19일 채취한 삼수로 8월20일에 삼목을 하였고, 제주도에서 구입해 온 남오미자 분재에서 2003년 9월3일에 온실에서 보관중인 남오미자 줄기, 엽병, 잎을 채취하여 캘러스 유도를 위한 배양재료로 사용하였다.

2) 실험 방법

채취한 삼수를 성장조절제인 IBA를 처리하여 삼목상의 모래에 삼목하고 비닐 터널을 만들어 주었다. 그리고 8주후에 IBA에 농도에 따른 발근율과, 잎수, 삼수 길이, 발근한 뿌리 수를 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

삼목은 무성번식법(無性繁殖法)의 하나로 모수의 소질을 그대로 이어 받을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 남오미자의 삼목을 실시한 결과 25-30일이 경과 되어야 발근이 시작되는 것으로 관찰되었다. IBA 50ppm을 처리한 남오미자(한라수목원)의 발근율82%, IBA3ppm을 처리한 남오미자(돈내코) 77%, IBA200ppm을 처리한 남오미자(한림공원) 67%로 나타났다. 따라서 IBA 50ppm을 처리하였을 때 남오미자의 발근율이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 남오미자(돈내코)의 평균 뿌리수는 12.6 ± 7.6 , 남오미자(한라수목원) 11.0 ± 4.8 남오미자(한림공원) 12.5 ± 5.5 개로 나타났다.

Table 12. 남오미자의 삼목 발근율

채취지역	IBA농도	전 체	발 근 수	뿌리수	발 근 율(%)
돈내코	3ppm	31	24	12.6±7.6	77.0
한라수목원	50ppm	11	9	11.0±4.8	82.0
한림공원	200ppm	3	2	12.5±5.5	67.0

삼목일: 2003. 8. 20, 조사일: 2003. 9. 20

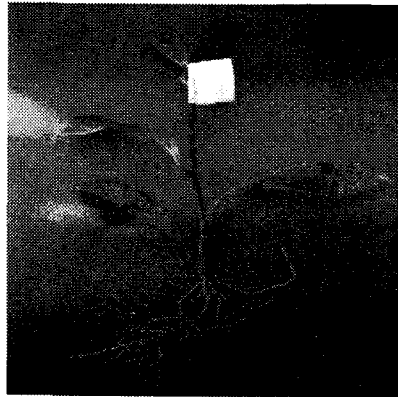


Fig.12. 남오미자 삼목발근묘 (돈내코채취)

제8절 목련을 이용한 천연염색성 시험

(제 1세부, 충북대산림과학부)

1. 실크의 염색성

가. 서 론

천연염색(天然染色)은 자연으로부터 얻어지는 여러 가지 동, 식물 및 광물을 재료로 이용한 염색을 말한다. 이에 속하는 식물염색은 자연의 혜택을 받아 성장한 식물의 잎과 꽃, 열매, 수피, 심재, 뿌리 등에 포함된 색소를 추출하여 염색하는 것을 말하며 동물염색은 동물의 피나 즙, 보라조개, 붉나무에 기생하는 오배자나 선인장에 기생하고 있는 벌레인 코치닐이나 커미즈 등으로 염색하는 것이고 나무에 기생하는 버섯이나 바위나 돌에 생기는 버섯, 암균을 이용해 염색하는 방법도 있다. 광물염색은 광물의 돌가루나 흙을 이용하여 안료를 만들어 염색하는 방법이다.⁹⁾

천연염료는 합성염료가 개발되기 훨씬 이전부터 인류의 긴 역사와 더불어 함께 한 것으로 염색의 기원은 일반적으로 직물이 발명되었다고 생각되는 기원전 5000~6000년 이후로 논의되고 있다.

합성염료가 사용되기 시작한 것은 약 150년 전인 1856년 영국의 화학자 퍼어킨의 연구에 의해 시작되었으며 현재까지 5000여종의 합성염료가 사용되고 있으며 염료 소비의 대부분을 차지하고 있다. 합성염료의 개발은 인간의 의생활에 커다란 변화를 가져왔다. 합성염료는 염색하기가 쉽고 염색물이 쉽게 변색하거나 퇴색하지 않고 대량으로 생산할 수 있게 되었으니 합성염료의 개발은 인류의 삶을 편리하게 해준 사건이었다. 그러나 최근 염색물이 인체에 미치는 악영향과 염색 공정에서 배출되는 염색 폐수가 수질 오염원이 되어 심각한 환경 문제를 야기하면서 천연염료에 대한 관심이 고조되고 있다.¹⁰⁾

오늘날 경제적이고 편리한 여러 종류의 화학적 합성염료가 있음에도 불구하고 천연염료에 관심을 기울이는 이유는 합성염료에 비해 그 자체의 색상이 침착하고 차분하며 퇴색이 되어도 안정된 색감으로 은은한 색상을 나타내며 인체에 무해하고 환경을 오염시키지 않는 환경친화적인 장점을 가지고 있기 때문이다. 이런 천연염색의 특성들이 인위성을 기피하고 자연적인 것을 선호하는 보다 고급화된 소

비자의 욕구에 부합할 수 있으므로 많이 연구되어지고 있는 실정이다.²⁾

오래전부터 천연염색은 이루어져 왔지만 천연염색의 염색성에 관한 구체적인 연구가 이루어진 것은 오래되지 않았다. 1970년 이신덕⁴⁾이 한국의 전통적인 염색공예에 대한 연구를 발표한 이후 김 등¹⁾의 천연염료의 색채에 관한 연구를 비롯한 천연염색에 관련한 많은 연구들이 이루어지고 있는데 최근 들어서는 2000년 이후 한해 평균 15개 이상의 논문들이 발표되고 있는 것으로 보아 천연염색에 관한 활발한 연구들이 이루어지고 있다고 볼 수 있다.

천연염색 중에서도 대표적인 식물염색분야에서는 이 등⁶⁾의 홍화에 의한 전통염색법의 활용방안에 관한 연구나 김³⁾의 천연염료(쪽물)의 염색특성 연구(II)에서와 같이 초본류에서 염료를 얻어 그의 염색특성을 연구하고 활용방안을 찾는 연구와 더불어 목본류를 염료로 이용하는 연구들도 진행되고 있다.

김²⁾은 오리나무 열매 추출물에 의한 견 및 면의 염색성의 연구에서 견이 면보다 염료흡착성이 3~4배 높은 것을 확인하였고 이⁵⁾는 신나무잎 추출물에 의한 염색성의 연구에서 추출온도, 추출시간, 매염농도 등 염색의 적정 조건을 찾는데 그 목적을 두었다. 또한 전⁷⁾은 밤송이를 이용한 천연염색에 관한 연구를 통해 밤송이를 염료로 이용하여 버려지는 밤송이의 자원화에도 의의를 둔 연구를 실행하였다. 이렇듯 많은 식물염료를 이용한 많은 연구가 행해지고 있지만 목본류를 이용한 다양한 연구들은 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 목련, 백목련, 일본목련, 튼릿나무 4가지 수종을 택하여 잎, 수피, 뿌리껍질, 꽃잎의 4가지 부위에서 염재를 채취해 견직물을 염색하고 특성이 다른 3가지 매염제로 매염을 실시해 발색되는 색상들을 비교하였으며 부위에 따른 색상차이를 비교하였다.

II. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에서는 목련과에 속하는 수종 중 목련, 백목련, 일본목련, 튼릿나무의 수피와 뿌리껍질, 잎, 꽃잎을 2001년 5월부터 채취하여 자연건조시킨 염재를 사용하였으며 염재의 양은 잎 200g, 수피 350g, 뿌리껍질 350g, 꽃잎 100g을 평균으로 사용하였다. 직물 시료는 견직물을 사용하였으며 무게는 장당 15~17g으로 하였다. 매염제로는 명반($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$, 알루미늄매염제), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (알칼리매염제), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (철매염제)을 사용하였으며 각각 직물무게의 5%를 사용하여 후매염법으로 매염하였다.

2) 실험방법

(1) 염색

- ① 직물은 물에 담가둔다.
- ② 염료를 20ℓ 물에 끓이는데 끓기 시작한 후부터 30분간 끓여준다.
- ③ 끓인 원액을 염재는 건져서 60℃ 정도로 식힌 후 직물을 담근 후 살살 20분간 교반시킨다.
- ④ 찬물에 2-3번 행군다.
- ⑤ 매염제(직물무게의 3-5%)인 석회(직물1장), 명반(직물 2장)에 10분간 담근 후 살살 교반시킨다.
- ⑥ 찬물에 2-3번 행군다.
- ⑦ 염료원액을 60℃정도로 데운 후 다시 직물을 담구고 40분간 교반시킨다.
- ⑧ 찬물에 2-3번 행군다.
- ⑨ 매염제에 10분간 교반시킨다.
- ⑩ 염료원액을 60℃정도로 데운 후 다시 직물을 담구고 40분간 교반시킨다.
- ⑪ 찬물에 2-3번 행군다.
- ⑫ 매염제에 10분간 교반시킨다. 이때 명반에 담근 직물(1장)은 제2황산철에 담가 원하는 색이 나올 때까지 주물러 준다. 그리고 나서 비눗물에 담가서 철 성분을 제거한 후 깨끗하게 세척해준다.
- ⑬ 매염제에 담근 직물을 깨끗이 세척한 후 말린다

(2) 색의 측정

각각의 염재들로 염색하여 발색된 색상들을 분광광도계(Gretag Macbeth, Color-Eye 7000A)로 분석하여 얻은 x, y 좌표값을 가지고 L, a, b를 산출하였고 Munsell 표색계 H V/C를 얻었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 색상

염색을 통해 발색된 색상들은 다음의 부록 1 과 같다.

2. 색 측정 결과

Table 1은 목련의 각 부위의 염재로 염색한 견직물의 L, a, b 와 H V/C의 값을 나타낸 것이다. 각 부위가 모두 황색계열의 색이 발색되었지만 각 부위별, 매염제별로 명도와 채도, 색상 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 잎은 회노랑, 수피는 밝은 회노랑, 뿌리껍질은 칙칙한 빨강 띠 노랑, 꽃잎은 칙칙한 노랑을 기준으로 명도와 채도에서 차이를 보였다.

Al매염은 명도와 채도가 대체적으로 높아서 가장 밝고 선명한 색을 나타내었으며 Ca 매염에서는 Al매염에 비해 명도와 채도가 조금씩 낮아지는 것으로 나타났다. Fe매염 결과에서 보면 채도가 1.5-2로 낮은 경향을 나타내어 무채색에 가까워짐을 알 수 있었다. Al매염에서 Fe매염쪽으로 갈수록 명도와 채도가 대부분 떨어지는 것으로 보아 색이 어두워지고 탁해지는 것을 알 수 있다.

부위별로 살펴보면 잎과 꽃잎은 채도가 높은 경향을 보였으며 수피의 경우 매염제별 명도, 채도차가 크지 않음을 볼 수 있었다. 뿌리껍질의 경우는 붉은 색을 띠는 것이 특징으로 나타났으며 꽃잎은 매염제에 따른 채도차가 크게 나타났다.

Table 1. L*, a*, b* and Munsell color system of silks dyed with *Magnolia kobus* Dc.

		L*	a*	b*	H V/C
	Blank	88.459	-0.175	2.356	5GY 9/1
leaf	Al	78.004	-0.546	24.589	5Y 8/4
	Ca	69.915	0.482	19.967	5Y 7/3
	Fe	59.359	0.779	12.961	5Y 6/2
bark	Al	78.776	2.428	18.075	2.5Y 8/3
	Ca	73.185	2.705	17.241	5Y 7/3
	Fe	67.669	0.157	9.597	10Y 7/2
root	Al	70.332	4.767	19.342	2.5Y 7/3.5
	Ca	53.485	8.298	20.378	10YR 5/3.5
	Fe	54.899	1.454	9.157	5Y 5/1.5
flower	Al	69.391	2.683	34.447	5Y 7/5.5
	Ca	56.782	5.415	29.564	2.5Y 6/5
	Fe	48.424	0.428	13.443	7.5Y 5/2

Table 2는 백목련의 각 부위의 염재로 염색한 견직물의 L, a, b 와 H V/C의 값을 나타낸 것이다. 각 부위가 모두 황색계열의 색이 발색되었지만 각 부위별, 매염제별로 명도와 채도, 색상에서 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 잎과 꽃잎은 칙칙한 노랑, 수피는 밝은 회노랑, 뿌리껍질은 칙칙한 빨강 띠 노랑을 기준으로 명도와 채도에서 차이를 보였다. 꽃잎의 Al매염의 경우 채도가 7로 가장 높게 측정된 것을 볼 수 있다.

Al매염에서는 목련에 비해 명도는 조금 낮고 채도는 높은 경향을 보였다. Ca매염은 Al매염에 비해 명도와 채도가 조금씩 낮아진 것을 볼 수 있다. Fe매염은 명도와 채도가 가장 낮아 어둡고 칙칙한 색상을 나타내었다.

명도는 뿌리껍질, 꽃잎, 잎, 수피로 갈수록 밝아지는 것을 볼 수 있다. 수피의 경우 매염제별로 비교했을 때 색상이나 명도, 채도에서 큰 차이를 보이지 않아 거의 비슷한 색이라고 말할 수 있다. 뿌리껍질은 목련에서와 마찬가지로 칙칙한 빨강 띠 노랑색이 나타났는데 다른 수종에 비해 a값이 가장 큰 특징을 보였다. 꽃잎의 경우 Al매염은 잎의 결과와 비슷한 수치를 얻어 비슷한 색상을 나타내었다. 그리고 목련의 꽃잎과도 비슷한 경향을 보이고 있으며 채도가 조금 더 높고 매염제별 채도차가 큰 것을 볼 수 있다.

Table 2. L^* , a^* , b^* and Munsell color system of silks dyed with *Magnolia denudata* Desr.

		L^*	a^*	b^*	H V/C
Blank		88.459	-0.175	2.356	5GY 9/1
leaf	Al	69.852	4.063	38.786	5Y 7/6
	Ca	60.642	8.245	26.656	10YR 6/5
	Fe	53.375	-0.173	12.718	7.5Y 5/2
bark	Al	78.984	2.407	13.941	5Y 8/3
	Ca	77.213	3.261	15.501	5Y 8/2.5
	Fe	74.001	2.289	14.096	5Y 7/2.5
root	Al	58.028	12.997	18.55	7.5YR 6/4
	Ca	51.551	12.899	21.86	7.5YR 5/4
	Fe	46.926	4.331	8.786	2.5Y 5/2
flower	Al	68.608	4.066	45.238	5Y 7/7
	Ca	57.238	5.154	31.514	2.5Y 6/5
	Fe	40.118	2.269	17.937	5Y 4/3

Table 3은 일본목련의 각 부위의 염재로 염색한 견직물의 L , a , b 와 H V/C의 값을 나타낸 것이다. 각 부위가 모두 황색계열의 색이 발색되었지만 각 부위별, 매염제별로 명도와 채도, 색상에서 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 잎은 칙칙한 노랑, 수피는 밝은 회노랑, 뿌리껍질은 회노랑, 꽃잎은 칙칙한 노랑을 기준으로 명도와 채도에서 차이를 보였다.

Al매염에서는 목련과 비슷한 경향을 나타내었고 Ca매염은 대부분이 Al매염보다 명도와 채도가 낮은 경향을 보이지만 꽃잎의 경우에는 채도가 더 높게 나타났다. Fe매염도 수피를 제외한 다른 부위에서는 명도와 채도가 낮은 경향을 나타내었다.

잎의 경우에는 다른 수종보다 명도가 낮은 경향을 나타냈으며 다른 수종과는 다르게 Al매염보다 Ca매염의 a 값이 작게 측정된 것을 볼 수 있고 수피는 매염제별 명도와 채도의 차이가 크지 않은 것으로 보아 비슷한 색상이라고 말할 수 있다. 꽃잎은 앞에서와 같이 매염제별 채도변화가 크게 나타났다.

Table 3. L^* , a^* , b^* and Munsell color system of silks dyed with *Magnolia obovata* Thunb.

		L^*	a^*	b^*	H V/C
Blank		88.459	-0.175	2.356	5GY 9/1
leaf	Al	62.033	6.047	31.006	2.5Y 6/5
	Ca	55.87	4.428	21.678	2.5Y 6/4
	Fe	46.705	2.237	14.702	5Y 5/2.5
bark	Al	75.434	4.06	15.209	2.5Y 8/3
	Ca	68.511	4.487	17.327	2.5Y 7/3
	Fe	65.908	1.695	10.969	5Y 7/2
root	Al	68.449	5.964	21.162	2.5Y 7/4
	Ca	55.768	6.144	18.229	2.5Y 6/3.5
	Fe	47.457	1.037	6.335	7.5Y 5/1.5
flower	Al	71.804	5.147	23.08	2.5Y 7/4
	Ca	46.84	13.631	26.856	7.5YR 5/5.5
	Fe	37.99	3.384	7.938	2.5Y 4/1.5

Table 4는 튜립나무의 4부위의 염재로 염색한 견직물의 L , a , b 와 H V/C의 값을 나타낸 것이다. 각 부위가 모두 황색계열의 색이 발색되었지만 각 부위별, 매염제별로 명도와 채도, 색상에서 차이가 나는 것을 볼 수 있다. 잎과 수피, 꽃잎은 칙칙한 노랑, 뿌리껍질은 칙칙한 빨강 띠 노랑을 기준으로 명도와 채도에서 차이를 보였다.

Al매염에서는 각 부위별 명도, 채도차이가 크지 않았으며 Ca매염에서는 꽃잎을 제외한 다른 부위는 Al매염 결과와 거의 비슷한 경향을 보였다. Fe매염은 다른 수종과 비슷하게 명도와 채도가 낮아 어둡고 칙칙한 색을 나타내었다.

잎은 목련과 비슷한 색이 발색되었고 수피는 다른 수종과 마찬가지로 명도와 채도 차이가 크지 않은 것을 보였다. 뿌리껍질은 백목련과 비슷한 경향을 보였으며 꽃잎은 Al 매염의 명도가 가장 높게 나타났으며 다른 수종과 비교했을 때 a 값이 -로 나타나 녹색계열에 가까운 것으로 나타났다.

Table 4. L^* , a^* , b^* and Munsell color system of silks dyed with *Liriodendron tulipifera* L.

		L^*	a^*	b^*	H V/C
	Blank	88.459	-0.175	2.356	5GY 9/1
leaf	Al	74.403	-0.156	27.155	5Y 7/4
	Ca	66.619	1.52	22.228	5Y 7/3.5
	Fe	63.848	1.425	14.827	5Y 6/2.5
bark	Al	71.842	6.159	26.004	2.5Y 7/4
	Ca	67.883	6.282	24.332	2.5Y 7/4
	Fe	68.963	3.802	17.964	2.5Y 7/3
root	Al	62.729	10.679	19.455	7.5YR 6/4
	Ca	55.338	11.446	19.728	7.5YR 6/4
	Fe	52.29	5.245	9.287	10YR 5/2
flower	Al	80.064	-2.468	32.227	7.5Y 8/5
	Ca	64.763	2.907	24.667	5Y 6/4
	Fe	57.426	-0.442	14.01	7.5Y 6/2.5

3. 반사율 스펙트럼

Fig. 2(첨부)는 가시광선의 파장안에서 나타나는 염색포의 반사율을 각 수종의 부위별, 매염제별로 비교한 것이다.

IV. 결 론

목련과에 속하는 수종 중 목련, 백목련, 일본목련, 툴립나무를 선정하여 각각의 잎, 수피, 뿌리껍질, 꽃잎을 염재로 이용하여 견직물을 염색한 결과 발색되어진 색상들을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. 본 연구에 사용된 네 수종들은 부위별로 서로 비슷한 발생경향을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

2. 대부분 잎과 꽃잎은 칙칙한 노랑, 수피는 회노랑, 뿌리껍질은 칙칙한 빨강 띠 노랑계열로 발색하였고 Al매염에서 Fe매염으로 갈수록 명도와 채도가 낮아져 어둡고 칙칙한 색이 발색되었다.

3. 각각의 부위 중에서 매염제별 색상, 명도, 채도 차이가 가장 작은 부위는 수 피이며 차이가 가장 큰 부위는 꽃잎으로 나타났다.

2. 염색 견뢰도 검사결과

염색 견뢰도 검사결과

검사기관: 한국원사직물연구원 원사: 실크

	견뢰도			세탁견뢰도			땀 견뢰도						일광견뢰도	
				변퇴색	오염		산성			알칼리				변색
							변퇴색	오염		변퇴색	오염			
								견	면		견	면		
수종	부위	매염제												
1	일본목련	수피	명반	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3	
2			석회	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	2	
3			황산철	4	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3	
4		뿌리접질	명반	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4	4.5	2	
5			석회	4	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
6			황산철	4.5	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4	4	4.5	3	
7		꽃잎	명반	4	4.5	4.5	3	4.5	4.5	4.5	4	4.5	1	
8			석회	4.5	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
9			황산철	4.5	4.5	4.5	1.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3	
10		잎	명반	4	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	
11			석회	4.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
12			황산철	4.5	4.5	4.5	2	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	1	
13	백목련	수피	명반	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3		
14			석회	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	2		
15			황산철	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	3		
16		뿌리접질	명반	2	4.5	4.5	4	4	4.5	4	4	4.5	2	
17			석회	4	4.5	4.5	3.5	4	4.5	4.5	4	4.5	1	
18			황산철	3	4.5	4.5	2	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	3	
19		꽃잎	명반	4.5	4.5	4.5	4.5	4	4.5	1	4	4.5	2	
20			석회	4	4.5	4.5	3	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	2	
21			황산철	3.5	4.5	4.5	1	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	2	
22		잎	명반	4.5	4.5	4.5	2.5	4	4.5	4	4	4.5	2	
23			석회	4.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	
24			황산철	2	4.5	4.5	1	4.5	4.5	3	4.5	4.5	3	
25	목련(월악산)	수피	명반	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	3		
26			석회	4.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	2		
27			황산철	4	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4	4.5	4.5	3	
28	목련	뿌리접질	석회	3	4.5	4.5	3	4.5	4.5	4.5	4.5	2		
29			명반	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	1		
30		황산철	4	4.5	4.5	1	4.5	4.5	3	4.5	4.5	2		
31		꽃잎	명반	4.5	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	2	
32			석회	3	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	3	4.5	4.5	1	
33			황산철	3	4.5	4.5	1	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	2	
34		잎	석회	4.5	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
35			명반	4.5	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
36			황산철	4.5	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	3	4.5	4.5	2	
37	백합나무	수피	명반	4	4.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4	4.5	1	
38			석회	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	
39			황산철	4	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4	
40		뿌리접질	명반	3	4.5	4.5	4	4.5	4	4.5	4	4.5	1	
41			석회	3.5	4.5	4.5	4	4	4.5	4	4	4.5	1	
42			황산철	4.5	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	

43		꽃잎	명반	4.5	4.5	4.5	2	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
44			석회	3	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
45			황산철	4	4.5	4.5	1	4.5	4.5	3	4.5	4.5	1	
46		잎	명반	4.5	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	1	
47			석회	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
48			황산철	4	4.5	4.5	2	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	2	
49		합박꽃나무	수피	명반	3	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3
50				석회	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3
51				황산철	2.5	4.5	4.5	1.5	4.5	4.5	1.5	4.5	4.5	3
52	잎		명반	3.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	1	
53			석회	4.5	4.5	4.5	2.5	4.5	4.5	4	4.5	4.5	1	
54			황산철	4.5	4.5	4.5	1	4.5	4.5	3.5	4.5	4.5	2	

소수점이 있는 것은 아래 숫자와 윗숫자로 표시된 것을 나타냄(예: 3.5는 3-4)

견뢰도 검사 결과 읽는 법

세탁견뢰도

변퇴색은 의뢰한 시료의 변퇴색 결과이며 4이상이면 양호하다고 볼 수 있고, 오염은 다른 천에 물이 안 드는 정도로써 4-5면 양호한 것으로 물이 잘 안 빠진다는 것을 의미함. 이시험에서는 견과 면을 같이 넣어서 물이 옮겨드는 것을 조사한 결과임.

땀 견뢰도

산성땀과 알칼리성 땀에 대하여 나무어 시험한 것으로써 다른 것은 같은 기준으로 해석하면 됨

일광견뢰도

시험기기에 7805와 700두가지가 있다. 표준협회에서 기준을 제시하고 있다.

무슨 용도로 쓸 것이냐에 따라 합격기준은 달라지며

한복의 경우 세탁 4급이상, 땀 3급이상, 일광 3급이 이상이면 합격으로 본다.

3. 소창의 염색성

가) 방법

1. 직물을 세탁하여 직물의 직조시 오염물을 제거한다.
2. 직물(소창)을 전처리 한다. (전처리의 종류:감물, 오배자)
3. 염색재료를 물에 끓인다. 이때 끓을 때부터 30분간 더 끓인다.
4. 끓인 원액은 재료를 건져낸 후 60℃정도로 식힌 후 직물을 담근 후 30분간 교반시킨다.
5. 찬물에 2-3회 행군다.
6. 매염제(직물 무게의 3-5%)의 석회, 명반에 10분간 담근 후 20분간 교반시킨다.
7. 염료원액을 60℃정도로 데운 후 다시 직물에 담근 후 30분간 교반시킨다.
8. 찬물에 2-3회 행군다.
9. 매염제에 20분간 교반시킨다. 이때 명반에 담근 직물 중에서 일부를 황산철에 눈에 띄는 색의 변화가 일어나지 않을 때까지 교반시켜 준다. 착색이 된 후에는 비눗물에 담가서 철 성분을 제거한 후 깨끗하게 세척해 준다. 나머지 직물은 6번과 동일 하다.
10. 매염제에 담근 직물을 깨끗이 세척해 준다.
11. 착색된 직물을 건조시킨다.

나) 결과

(1)공시수종 : 함박꽃나무

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
잎	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	ltg8 light grayish yellow	off N-10 light grayish reddish yellow	off N-7 light grayish reddish yellow
			석회	ltg6 light grayish yellowish orange	off N-9 light grayish yellowish orange	off N-4 pale reddish yellow
			황산철			sf20 soft violet
			백반-황산철	g22 grayih purple	g20 grayish violet	g24 grayih red purple
			매염안함	FL-5 soft yellowish orange	off N-4 pale reddish yellow	off N-1 pale yellowish orange

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
수피	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	FL-5 soft yellowish orange	Gy-9	off N-1 pale yellowish orange
			석회	FL-6 dull yellowish orange	off N-1 pale yellowish orange	off N-3 dull yellowish orange
			황산철	g4 grayish reddish orange	ltg20 light grayish blueish purple	ltg22 light grayish purple
			백반-황산철	g2 grayish red	g24 light grayish red purple	p22 pale purple
			매염안함	FL-4 pale yellowish orange	off N-1 pale yellowish orange	off N-3 dull orange

(2) 공시수종 :일본목련

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
앞	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	sf8 soft yellow	off N-5 soft yellowish orange	off N-9 light grayish yellowish orange
			석회	FL-5 soft yellowish orange	FL-5 soft yellowish orange	FL-4 pale yellowish orange
			황산철	off N-13 light grayish orange	g4 grayish reddish orange	off N-6 dull yellowish orange
			백반-황산철	g6 grayish yellowish orange	g2 grayish red	off N-11 light grayish orange
			매염안함	9p	off N-4 pale reddish yellow	ltg6 light grayish yellowish orange

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
수피	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	d8 dull yellow	g8 light grayish yellow	off N-10 light grayish reddish yellow
			석회	d8 dull yellow	off N-9 light grayish yellowish orange	off N-2 pale yellow
			황산철	sf20 soft violet	ltg20 light grayish violet	g24 light grayish red purple
			백반-황산철	sf22 soft purple	ltg22 light grayish purple	ltg22 light grayish purple
			매염안함	FL-5 soft yellowish orange	off N-1 pale yellowish orange	off N-1 pale yellowish orange

(3) 공시수종 : 백목련

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
앞	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	BR-4	off N-9 light grayish yellowish orange	off N-10 light grayish reddish yellow
			석회	FL-5 soft yellowish orange	off N-2 pale yellow	off N-8 light grayish orange
			황산철	dkg9 dark grayish greenish yellow	sf20 soft violet	p22+
			백반-황산철	dkg6 dark grayish yellowish orange	g24 grayish red purple	ltg22 light grayish purple
			매염안함	FL-5 soft yellowish orange	off N-2 pale yellow	off N-1 pale yellowish orange

(4) 공시수종 : 목련

사용 부위	시료 사용량	염색 직물량	염색한 직물의 색상			
			전처리 매염제	감물	오배자	전처리안함
앞	150g (물 13ℓ)	소창 12g×15	백반	FL-5 soft yellowish orange	ltg8 light grayish yellow	off N-10 light grayish reddish yellow
			석회	FL-6 dull yellowish orange	off N-9 light grayish yellowish orange	off N-1 pale yellowish orange
			황산철	Gy-2.5	sf20 soft violet	g20 light grayish violet
			백반-황산철	Gy-3.0	g24 lightg rayish red purple	p22-1
			매염안함	FL-6 dull yellowish orange	off N-2 pale yellow	off N-1 pale yellowish orange

5) 견뢰도 검사 결과

일본목련과 백합나무 잎을 염재로 사용한 경우 재료 : 소창

			세탁견뢰도			땀 견뢰도						일광견뢰도
			변퇴색	오염		산성			알칼리			변색
				견	면	변퇴색	오염		변퇴색	오염		
							견	면		견	면	
일본목련 잎	오배자 전처리	명반	4-5	4-5	4-5	3-4	4	4	4	4	4	2
		황산철	4-5	4-5	4-5	2	4-5	4-5	2	4	4	1
		무매염	3	4-5	4-5	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	2
	무전처리	명반	4	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5	4	4-5	4-5	1
		황산철	2	4-5	4-5	2	4	4	2	4	4	1
		무매염	3	4-5	4-5	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	2
백합나무 잎	오배자 전처리	명반	3-4	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5	3	4	4-5	2
		황산철	3	4-5	4-5	2	4	4	2	4	4	1
		무매염	4	4-5	4-5	3-4	3-4	4	3-4	3-4	4	2
	무전처리	명반	3	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5	3-4	4-5	4-5	2
		황산철	3	4-5	4-5	2	4	4	2	4	4	2
		무매염	3	4-5	4-5	3-4	4	4	3-4	4	4	2

4. 직물 염색 시제품제작

가. 서론

이미 목련과 수종을 이용한 소창과 견직물의 천연염색 연구를 통하여 목련과 수종의 발색과 견뢰도의 특성에 관한 결과를 얻어 내었다. 목련과 수종의 천연염색을 이용한 실용화를 위하여 본 연구에서는 목련과 수종을 이용한 견직물과 면직물의 발색에 관한 연구를 바탕으로 한 실용화 가능한 제품을 선정하고 가능성 있는 제품을 생산하였다.

나. 실험재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에서는 목련과에 속하는 수종 일본목련 잎·수피, 목련 꽃잎·수피, 함박꽃나무 잎·수피, 백합나무 잎을 2001년 5월부터 자연 건조시킨 염재를 사용하였으며, 사용량은 제품의 색상, 직물의 종류에 따라 각각 다르게 하여, 잎은 150g~450g, 수피150g~350g, 꽃잎 100g을 사용하였다.

매염제로는 명반, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ <알칼리매염제>, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ <철매염제>를 각각 발색의 필요조건 일 때 사용하였다. 매염제의 양은 직물의 5%를 사용하였으며 후매염으로 2회 매염을 실시하였다.

2) 실험방법

가) 염색

- ① 직물은 물에 담가둔다.
- ② 염료를 20ℓ 물에 끓이는데 끓기 시작한 후부터 30분간 끓여준다.
- ③ 끓인 원액을 염재는 건져서 60℃ 정도로 식힌 후 직물을 담근 후 살살 20분간 교반시켜 준다.
- ④ 찬물에 2~3번 행군다.
- ⑤ 매염제(직물 무게의 3~5%)인 석회(1장), 명반(2장)에 10분간 담근 후 살살 교반 시킨다.
- ⑥ 찬물에 2~3번 행군다.
- ⑦ 염료원액을 60℃정도로 데운 후 다시 직물을 담구고 40분간 교반 시킨다.
- ⑧ 찬물에 2~3번 행군다.

- ⑨ 매염제에 10분간 교반시킨다. 이때 명반에 담근 직물(1장)은 제2황산철에 담가 색이 나올 때 까지 주물러 준다. 그리고 나서 비눗물에 담가서 철 성분을 제거한 후 깨끗하게 세척해준다.
- ⑩ 매염제에 담근 직물을 깨끗이 세척 후 말린다.

나) 제품의 선정과 제품별 요약.

(1) 제품의 선정과 제작된 제품의 수량

제품의 선정에 있어서 견직물과 면직물의 견뢰도의 측정 결과, 와 제품의 스타일, 소비자의 성호 및 가치추구경향, 패션지향, 라이프스타일 등을 적극 반영하여 선호도가 높은 제품인 의복을 중심으로 실용적이며, 자연미, 자연친화감, 전통미가 발휘 될 수 있는 디자인으로 땀 견뢰도와 세탁견뢰도가 높고 일광 견뢰도가 낮은 특성을 감안하여, 작업용 또는 일상복 보다는 외출용의 고급스러운 소재를 이용한 사용에 있어서 광 노출 빈도가 비교적 적은 제품 위주로 선정하였다.

남자 한복 겨울용	1벌	여자 한복 여름용	1벌	손수건	60개
남자 한복 여름용	1벌	T셔츠	3벌	스카프	6개

(2) 제품별 직물과 염제, 매염제

제품		직물	염제	매염제	제품		직물	염제	매염제
남자 한복 여름 용	저 고 리	광목	튤립나무 잎 450g	황산철	남자 한복 여름 용	저 고 리	명주	튤립나무 잎 300g	황산철
	바 지		오배자 전처리 튤립나무 잎 450g			바 지		일본목련 잎 300g	
여 자 한 복 여름 용	저 고 리	실크	일본목련 수피150g	황산철	T셔츠	면	일본목련 잎 300g	백반	
	치 마		목련꽃잎 100g					황산철	석회
손수건	견	일본목련 수피 300g	황산철	스카프	명주	함박꽃나 무 잎 150g	황산철	백반	
			일본목련 잎 300g					석회	
			백반					석회	
			백반					백반	
	명주	함박꽃나 무 잎150g	석회	스카프	명주	함박꽃나 무 수피 150g	황산철	백반	
			석회					석회	
			백반					백반	
			석회					석회	
목련수피 150g	백반	황산철							

3) 시제품 제작 결과

옷감이나 손수건 스카프 등에 물들일 경우 시제품 제작 결과는 실용가치는 있는 것으로 판명되었다(부록 2).

5. 종이의 염색성

1. 서론

천연염색은 동물이나 식물 또는 광물 등에서 얻을 수 있는 자연색소를 이용하여 염색하는 것으로서, 합성염료가 발명되기 전까지 사용된 천연염색의 역사는 인류와 함께 공존하여 왔다. 천연염색 중에서 식물성 염료가 거의 대부분을 차지하고 있으며 사용되는 염재들의 대부분은 같은 종류의 식물이라도 그 식물이 성장한 지리적 배경이나 생육조건에 따라 동일한 중량에서 얻어지는 색소의 함량이 달라질 수 있다. 염재 속에 함유되어 있는 다양한 성분의 차이는 한 번 염색한 색상을 다음의 염색으로 재현하기 힘들다는 천연염색 특유의 상황을 만들어 주는 요인이 되고 있다. 때문에 천연염색은 가장 긴 역사를 가지고 있음에도 불구하고 가장 발전되지 못한 염색법으로 합성염료의 발전에 따라 점차 쇠퇴하여 현재에는 일부 공예 염색가 및 극소수의 전통염색 전수자들에 의해 근근이 그 명맥을 이어 오고 있다.

그러나 합성염료에 의한 염색물의 인체에 미치는 악영향이 나타나면서 아조계 염료 염색물에 대한 선진국들의 수입이 규제되고 있으며, 최근에 들어 염색과정 중에 발생하는 폐수처리 등, 환경 공해 문제가 대두되면서 다시 천연염료에 대한 관심이 높아지고 있다.

천연염료는 합성염료와 비교할 때 다음과 같은 몇 가지 취약한 점을 가지고 있다. 첫째, 색상의 재현성이 떨어진다. 때문에 공업적으로 대량 생산하기에 무리가 있다. 둘째, 염색 후 염색 견뢰도가 합성염료에 비해 떨어진다. 셋째, 염재의 수시 확보, 색소추출 및 보관, 염색방법 등의 비표준화, 비정량화 되어 있다.

그러나 역으로 생각해보면 이와 같은 문제점만 해결된다면 천연염색은 고유한 색상의 미를 가지고 있어 이를 상품화하기에 손색이 없을 것이며, 염색과정이 친환경적이므로 합성염료에 의한 염색을 대체하게 되면 환경보호에도 일조를 하게 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 기존의 염료가 아닌 목련과 수목의 다양한 부위의 추출물을 염료로 하고 염색하기 전 다양한 보조제를 이용하여 전처리를 하고 이에 따

른 색상발현과 염색성 향상을 검토하였다. 또한 천연염색의 가장 큰 문제점인 염색견뢰도에 대한 시험법을 확립하고자 천연염색 한지에 대해 실제 자연환경과 비슷한 상황에서의 촉진노화 실험을 통하여 염색보조제가 및 매염제가 색상의 견뢰도에 미치는 영향에 대해 검토 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

1) 한지 및 화선지의 제조

가) 한지 순지

국산닥 백피를 수산화나트륨으로 자숙한 다음, 차아염소산 나트륨으로 표백하고 쌍발초지법을 이용하여 평량 30g/m² 내외의 한지 순지를 제조하였다.

나) 화선지

순지 제조시와 동일한 방법으로 제조한 닥펄프와 필란드산 가문비 표백 sulfite pulp(SP)를 70:30으로 혼합하여 쌍발초지법으로 평량 30g/m² 내외의 화선지를 제조하였다

2) 염색 보조제

가) 콩즙

대두 100g을 24시간 물에 불린 다음, 증류수 1ℓ를 가하여 믹서를 이용하여 5분간 갈고 200 mesh로 여과하여 전액량을 1ℓ로 한 10%수용액을 만들어 사용하였다.

나) 키토산

분자량이 15000인 키토산을 증류수와 혼합하여 0.1%용액으로 만들어 사용하였다.

다) 탈지분유

시판 탈지분유 20g을 증류수 1ℓ에 용해하여 2%수용액으로 만들어 사용하였다.

3) 염료식물

일본목련(*Magnolia obovata* Thunb.) 및 백목련(*Magnolia denudata* Desr.)은 2001년 10월 하순, 목련(*Magnolia kobus* Dc.)은 8월 하순에 채취하여 박피한 후,

수피를 길이 1cm로 잘라 음건 하였다. 목련(*Magnolia kobus* Dc.)잎은 2001년 8월 하순, 백목련(*Magnolia denudata* Desr.) 꽃잎은 2001년 4월 하순 충북대학교 교내에서, 자목련(*Magnolia liliflora* Desr.) 꽃잎은 2001년 4월 하순 충청북도 산림환경연구소에서 채취하여 음건 하였다.

4) 매염제

매염제는 시약급 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16-18\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 를 0.5% 수용액으로 제조하여 사용하였다.

나. 실험방법

1) 염색 보조제 처리

염색재료인 순지 및 화선지를 염색 보조제인 콩즙, 키토산, 탈지분유에 30분간 침지시킨 다음, 흡수지를 이용 과잉의 염색보조제를 제거하고, 철판에 붙여서 실내에서 건조하였다. 보조제 처리가 끝난 시료는 3일 동안 숙성시킨 다음 염색에 사용하였다.

2) 염료의 제조

목련, 일본목련 및 백목련의 공시재료 100g에 대하여 증류수 1ℓ를 가하고 30분간 침지한 다음, 염료 추출기를 이용하여 90분간 추출하여 염료를 수집하고, 동일한 조작을 반복하여 2회 추출한 염료를 혼합, G3 글라스 필터를 이용 여과하여 염료로 하였다.

3) 한지의 염색

각각의 염색 보조제로 전처리 한 한지를 염색액에 1분간 침지하여 1차 염색을 한 후, 매염제로 1분간 매염처리를 하고, 다시 염색액에 1분간 침지하여 2차 염색을 실시한 다음, 철판에 붙여 실내에서 건조하였다. 전처리하지 않은 공시험 한지도 동일한 방법으로 염색을 하였다.

4) 촉진 노화 처리

QUV/SE 촉진 노화 시험기(Q-Panel Lab Products)를 이용하여 ISO 5630/3에 규정에 의거 온도: 80℃, 상대습도: 60%, 340nm에서 최대 자외선 조사량을 나타

내는 UVA-340 형광램프 사용, 자외선 조사량: 0.67W/m²/nm의 조건에서 천연 염색한 순지와 화선지를 각각 24시간, 48시간, 72시간으로 축진노화 처리를 하였다.

5) 색의 측정

색의 측정은 한국 표준색표집 및 Gretag Macbeth사의 Color-eye 7000A 분광광도계로 분석한 x, y 좌표 값으로 측정하였다. 색차는 다음의 Hunter 색차식에 의거하여 계산하였다.

$$\Delta E = \{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2\}^{1/2}$$

3. 결과 및 고찰

가. 염색 한지의 색상 분석 결과

먼셀계에서는 색상을 빨강(R), 노랑(Y), 녹색(G), 파랑(B), 보라(P)의 5가지와 각각의 중간색, 주황(YR), 연두(GY), 청록(BG), 남색(PB), 자주(RP)를 택하여 총 10가지를 기본색으로 지정하였다. 그리고 명도는 이상적인 검정을 0, 이상적인 흰색을 10으로 하고 그 사이를 밝기 감각에 따라 등간격으로 9단계로 구분하였다. 채도는 무채색을 0로 하여 채도의 시감에 따라 등간격의 증가에 따라 채도 값이 증가하며, 그 색상에서 가장 순수한 색의 채도 값이 최대가 된다. 각 색상의 채도 단계는 색상에 따라 다르게 만들어지며 5R이 14단계로 가장 밝고, 파랑이 8단계로 가장 낮다.

목련과 수목의 잎, 꽃잎 및 수피 추출물을 이용하여 천연염색한 순지 및 화선지의 색상을 한국 표준 색표집과 분광광도계로 분석한 x, y 좌표 값을 이용하여 천연 염색한 한지의 색상을 분석결과를 Table 1, 2, 3, 및 4에 나타냈다.

색상은 부록 3과 같다.

Table 1. 목련과 수목 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 화선지의 색상

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus(L)</i>	Control	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	5YR 5/3.5
	Skim milk	10YR 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5	5YR 5/3.5
	Soybean	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5	5YR 5/3.5
	Chitosan	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 6/3.5	5YR 5/3.5
<i>M. liliflora(F)</i>	Control	10YR 7/3.5	10YR 8/4	2.5Y 7/3	2.5Y 6/3.5
	Skim milk	10YR 7/3.5	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3	2.5Y 6/3.5
	Soybean	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	2.5Y 5/3.5
	Chitosan	2.5Y 7/3	2.5Y 7/3	2.5Y 6/3.5	2.5Y 5/3.5
<i>M. denudata(F)</i>	Control	2.5Y 7/5	2.5Y 7/5	5Y 6/4	2.5Y 6/4
	Skim milk	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	10RY 6/4
	Soybean	2.5Y 6/4	10YR 6/5	2.5Y 5/3.5	10RY 5/3.5
	Chitosan	2.5Y 6/4	2.5Y 7/5	2.5Y 6/3.5	10RY 6/4

*L : leaf , F : flower

Table 1은 목련 잎 및 백목련과 자목련 꽃잎 추출물로 염색한 화선지의 염색결과를 나타낸 것이다. 전반적으로 목련 잎 추출물로 염색한 화선지의 색상은 10YR, 5YR의 주황색 계열이었고, 백목련 및 자목련 꽃잎 추출물로 염색한 화선지의 색상은 꽃잎의 색상과 관계없이 2.5Y의 황색 계열로 나타났다. 염색지의 명도는 5-7 정도로 보통 또는 밝은 편이었으며, 채도는 3-5 정도로 옅은 색상을 나타냈다.

Table 2는 목련 잎 및 자목련과 백목련 꽃잎 추출물로 염색한 순지의 염색결과로 화선지와 색상은 거의 없으나 화선지가 순지보다 다소 짙게 염색되는 경향을 나타냈다. 이것은 화선에 포함되어 있는 목재 펄프의 셀룰로오스 결정화도가 순지의 다투나무 인피섬유 펄프의 결정화도보다 낮은 것과 목재 펄프에 포함되어 있는 리그닌의 영향 때문이라 사료된다. 따라서 한지의 염색 시 목재 펄프를 약간 혼입하여 초지하는 것이 염색성을 향상시키는 하나의 방법이 될 수 있다고 생각된다.

염색보조제가 한지의 천연염색에 미치는 영향을 분석한 결과, 전반적으로 염색보조제의 처리가 미처리보다 염색성의 향상을 가져왔다. 염색 보조제 중에서는 콩즙 및 탈지분유가 키토산보다 우수한 염색성을 나타냈으나 색상이 약간 탁한 반면 키토산은 맑은 색상을 나타냈다. 보조제 중에서는 콩즙으로 전처리한 한지가 가장 짙은 색상으로 염색되었다.

매염제의 종류에 따른 한지의 염색 특성은 Al 매염이 가장 밝은 색상을 나타내 무매염지와 거의 비슷한 색상을 나타낸 반면, Cu, 및 Fe 매염은 Al 매염 및 무매염지보다 다소 짙은 색상을 나타냈다. 그러나 목련 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 한지에 있어서 매염제의 영향은 크지 않은 것으로 나타났다.

Table 2. 목련과 수목 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 순지의 색상

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus(L)</i>	Control	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	5YR 5/3.5
	Skim milk	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 6/3.5	5YR 5/3.5
	Soybean	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	5YR 5/3.5
	Chitosan	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/3.5	5YR 5/3.5
<i>M. liliflora(F)</i>	Control	10YR 7/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5
	Skim milk	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5
	Soybean	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	2.5Y 5/3.5
	Chitosan	2.5Y 7/3	10YR 7/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5
<i>M. denudata(F)</i>	Control	2.5Y 7/5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4
	Skim milk	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4
	Soybean	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	10RY 6/4
	Chitosan	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4

*L : leaf , F : flower

기타 특성으로서 백목련 및 자목련 꽃잎 추출물로 염색한 한지는 색상뿐만 아니라 상당히 좋은 향기를 가지고 있어 다양한 용도로의 이용이 가능하리라 생각된다.

Table 3 및 4는 목련, 백목련 및 일본목련 수피 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 염색 결과를 나타낸 것이다.

전반적인 염색 특성을 분석한 결과 2.5Y, 10Y, 7.5Y 및 2.5GY로 황색과 연두색 계열이 주를 이루고 있는 것으로 나타났다. 염색지의 명도는 6~8의 밝은 색상을 나타냈다.

Table 3. 목련과 수목 수피 추출물로 염색한 화선지의 색상

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus</i>	Control	2.5Y 8/3	2.5Y 8/4	7.5Y 8/3	5Y 7/2
	Skim milk	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3.5	2.5GY 7/1
	Soybean	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	10Y 7/3.5	5Y 6/2
	Chitosan	2.5Y8/4	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	10Y 7/2
<i>M. denudata</i>	Control	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3	5Y 7/2
	Skim milk	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	10Y 8/3.5	5Y 7/2
	Soybean	2.5Y 8/4	2.5Y 8/4	7.5Y 7/3.5	7.5Y 7/3
<i>M. obovata</i>	Control	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	10Y 7/2
	Skim milk	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	7.5Y 7/3.5	7.5YR 7/2
	Soybean	2.5Y 8/3.5	2.5Y8/3.5	5Y 6/3.5	2.5GY 5/1
	Chitosan	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	5Y 7/3	7.5GY 6/2

Table 4. 목련과 수목 수피 추출물로 염색한 순지의 색상

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus</i>	Control	2.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3.5	10Y 7/2
	Skim milk	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	7.5Y 7/3.5	2.5GY 7/2
	Soybean	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	7.5Y 7/3.5	7.5GY 6/2
	Chitosan	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	10Y 7/2
<i>M. denudata</i>	Control	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	5Y 7/2
	Skim milk	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	10Y 8/3.5	5Y 7/2
	Soybean	7.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	7.5Y 7/3.5	5Y 7/3
<i>M. obovata</i>	Control	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	10Y 7/2
	Skim milk	2.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	5Y 7/3	2.5GY 7/2
	Soybean	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	5Y 7/3.5	2.5GY 5/1
	Chitosan	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	5Y 6/3	10Y 5/2
		2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	5Y 7/3	7.5GY 6/2

냈으며, 채도는 1~3.5 사이로 무채색에 가까운 짙은 색상을 나타냈다.

한지의 종류에 따른 염색 특성은 목련과 수목의 수피 추출물로 염색한 한지의 경우, 목련 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 경우와는 달리 화선지와 순지와는 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 염색보조제 처리가 한지의 천연염색에 미치는 영향 또한 목련 잎 및 꽃잎 추출물 염색과 동일한 경향을 나타냈으며, 전반적으로 염색보조제의 처리가 미처리보다 염색성의 향상을 가져왔다. 염색 보조제 중에서

는 콩즙 및 탈지분유가 키토산보다 우수한 염색성을 나타냈으며, 보조제 중에서는 콩즙으로 전처리한 한지가 가장 짙은 색상으로 염색되었다.

매염제의 종류에 따른 목련과 수목 수피의 염색효과는 목련과 수목의 잎 및 꽃잎 추출물에서 있어서 큰 차이가 없었던 것과는 달리 수종에 따라 상당한 차이를 나타냈다. Al 매염의 경우 옅은 황색~황색으로 다른 매염제보다 밝은 색상을 나타낸 것에서는 동일하나 목련 및 일본목련 수피 추출물로 염색한 것이 짙은 색상을 나타냈고, 백목련 추출물이 가장 옅은 색상을 나타냈다. Cu 매염의 경우 옥색 및 미색~갈색으로 백목련 수피 추출물은 옥색을 나타냈으며, 목련 및 일본목련 수피 추출물은 미색~갈색을 나타냈다. Fe 매염은 수종에 따라서 미색 및 흑색을 나타냈으며, 백목련 수피 추출물이 미색을 나타낸 반면 일본목련 수피 추출물은 흑색을 나타냈다. 무매염 한지는 전반적으로 미색~황갈색을 나타냈으며, 일본목련 추출물이 갈색으로 가장 짙게 염색되었고, 목련 및 백목련 수피 추출물은 미색~옅은 황색으로 미표백 한지와 유사한 색상을 나타냈으며 백목련이 가장 옅은 색상으로 염색되었다.

각각의 수종에 따른 염색 특성을 분석한 결과, 목련은 모든 매염제에서 미색~황갈색의 색상을 나타냈다. 백목련은 목련과 유사한 경향을 나타냈으나 특히 초산구리 매염에서 아름다운 옥색으로 염색되는 특성을 나타냈다. 일본목련의 경우 갈색~다갈색의 색상을 나타냈으며, 특히 염화제이철 매염에서 흑색을 나타냈다.

나. 염색 한지의 색차(ΔE) 분석 결과

목련과 수목의 잎, 꽃잎 및 수피 추출물을 이용하여 화선지 및 한지 순지를 염색하고 각각의 염색 보조제 처리 및 매염제의 종류가 한지의 색상 발현에 미치는 영향을 분석하고자 각각의 염색지에 대한 색차(ΔE)를 구하였다.

Table 5, 6, 7, 8은 목련과 수목의 잎, 꽃잎 및 수피 추출물로 염색한 한지의 색차 분석 결과를 나타낸 것이다.

Table 5. 목련과 수목 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 화선지의 색차(ΔE) 분석결과

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus(L)</i>	Control	-	2.77	5.69	22.52
	Skim milk	4.87	6.85	8.30	25.19
	Soybean	8.22	6.28	9.28	22.70
	Chitosan	4.24	1.62	6.58	19.54
<i>M. liliflora(F)</i>	Control	-	1.12	5.85	14.76
	Skim milk	2.58	0.45	8.31	19.51
	Soybean	8.87	6.67	16.70	22.53
	Chitosan	4.80	4.17	13.52	20.08
<i>M. denudata(F)</i>	Control	-	1.95	2.79	4.45
	Skim milk	2.40	2.15	4.78	9.74
	Soybean	4.72	7.14	12.36	12.72
	Chitosan	4.50	0.91	5.17	7.32

*L : leaf , F : flower

Table 6. 목련과 수목 잎 및 꽃잎 추출물로 염색한 순지의 색차(ΔE) 분석결과

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus(L)</i>	Control	-	1.94	4.77	21.60
	Skim milk	4.36	6.36	9.51	25.94
	Soybean	5.40	5.07	8.59	25.31
	Chitosan	5.63	3.99	8.26	19.33
<i>M. liliflora(F)</i>	Control	-	2.63	10.07	14.79
	Skim milk	2.83	2.61	10.55	18.91
	Soybean	6.09	5.19	15.37	22.62
	Chitosan	3.33	3.05	11.66	17.87
<i>M. denudata(F)</i>	Control	-	3.68	4.17	4.29
	Skim milk	3.26	2.56	7.32	7.27
	Soybean	4.53	3.95	8.16	10.94
	Chitosan	2.99	1.47	4.91	6.97

*L : leaf , F : flower

Table 7. 목련과 수목 수피 추출물로 염색한 화선지의 색차(ΔE) 분석결과

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus</i>	Control	-	8.73	4.26	13.57
	Skim milk	5.99	6.10	9.44	16.79
	Soybean	6.55	9.81	12.85	19.02
	Chitosan	7.79	5.54	5.84	13.11
<i>M. denudata</i>	Control	-	2.71	2.62	12.37
	Skim milk	4.03	0.61	6.10	15.98
	Soybean	7.48	9.31	12.21	9.58
	Chitosan	2.22	3.76	4.13	13.49
<i>M. obovata</i>	Control	-	1.20	8.41	9.50
	Skim milk	0.94	2.74	15.50	27.56
	Soybean	4.40	2.74	15.17	27.11
	Chitosan	3.03	1.61	8.48	19.73

Table 8. 목련과 수목 수피 추출물로 염색한 순지의 색차(ΔE) 분석결과

Species	Auxiliary dyeing agent	Mordant			
		non	Al	Cu	Fe
<i>M. kobus</i>	Control	-	4.05	7.05	12.48
	Skim milk	3.63	4.03	9.66	17.00
	Soybean	5.18	8.60	10.56	17.72
	Chitosan	4.34	4.63	4.79	9.30
<i>M. denudata</i>	Control	-	0.19	2.82	13.32
	Skim milk	2.31	1.32	6.96	17.55
	Soybean	4.87	5.90	10.76	12.72
	Chitosan	1.67	0.27	2.58	9.83
<i>M. obovata</i>	Control	-	3.87	14.94	16.90
	Skim milk	5.67	3.03	15.81	24.12
	Soybean	5.65	6.65	16.64	27.02
	Chitosan	3.66	2.31	9.45	18.34

Table에서 알 수 있는 바와 같이 수종에 따라 다소의 차이는 있으나 모든 염료는 염색 보조제의 종류와 매염제의 종류에 따라 동일한 경향을 나타내고 있는 것을 알 수 있다.

염색보조제 무처리 한지의 색상과 보조제 처리 한지의 색상간 색차를 분석한 결과, 염색보조제 처리가 한지의 염색성을 향상시킨다는 사실을 알 수 있었다. 염

색보조제 종류에 따른 색차 분석결과 콩즙이 가장 큰 색차를 나타냈으며, 탈지분유, 키토산 순으로 색차가 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 사용된 모든 염료에서 동일한 경향을 관찰할 수 있었다.

한지의 염색성 변화는 염색보조제의 경우와 마찬가지로 매염제의 종류에 따라 동일한 염료일지라도 색차의 변화가 큰 것으로 나타났다. 무매염 한지와의 색차를 분석한 결과 Fe 매염 한지의 색차가 가장 크게 나타났으며, 이어서 Cu 매염, Al 매염 순으로 색차가 감소하였다.

한지의 종류가 염색성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 각각의 염료, 염색보조제 및 매염제에 대한 화선지 및 순지의 색차 변화를 분석하였다. Table에서 알 수 있는 바와 같이 화선지의 색차가 모든 염료, 염색보조제 및 매염제에 있어서 순지보다 큰 것으로 나타났다. 이것은 화선지의 염색성이 순지의 염색성보다 우수하다는 것을 의미하며, 그 이유는 전술한 바와 같이 섬유를 구성하고 있는 셀룰로오스의 결정화도와 리그닌의 함량에 기인한 것으로 사료된다.

다. 축진노화처리에 의한 염색 한지의 색상 분석 결과

목련과 수목의 염료로 천연염색한 한지의 견뢰도 평가를 위하여 축진노화 시험기를 이용하여 각각의 한지를 축진노화 처리하고 색상의 경시적 변화를 분석한 결과를 Table 8, 9, 10, 11, 12, 및 13에 나타냈다.

Table 8은 목련 잎 추출물로 염색한 화선지 및 순지를 축진노화 처리하였을 때의 색상 변화를 나타낸 것이다. 목련 잎 추출물로 염색한 한지의 축진노화 처리에 따른 색상의 변화는 전반적으로 축진노화 처리전의 주황색 및 갈색에서 축진노화 처리 후 황색 및 주황색으로 탈색되었으며, 축진노화 시간이 증가할수록 화선지 및 순지 모두 명도 및 채도가 증가하는 것으로 나타나 색상의 견뢰도가 감소한다는 사실을 알 수 있었다. 축진노화 처리에 따른 색상의 변화는 초기 24 시간 처리에서 가장 컸으며, 열화시간이 증가할수록 색상변화의 폭은 감소하였으며, 화선지의 견뢰도가 순지보다 우수한 것으로 나타났다.

축진노화 처리시간에 따른 한지의 색상 변화는 사용된 염색보조제 및 매염제에 따라 다소 상이한 경향을 나타냈으나 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 매염제의 종류에 따른 색상이 변화는 Fe 매염이 다른 매염제에 비하여 다소 크게 나타났으며, 축진노화 시간의 증가에 따라 채도가 감소하는 것으로 나타났다. 염색

Table 9. 목련 잎 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/3.5
	24h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5
	48h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 8/4	10YR 7/4	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5
	72h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 8/4	10YR 7/4.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4.5	10YR 8/4.5	10YR 7/4	2.5Y 7/3.5
Al	Control	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5
	24h	10YR 8/4	2.5Y 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4
	48h	10YR 8/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	2.5Y 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4
	72h	10YR 8/4	2.5Y 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4	10YR 8/4	10YR 7/4	10YR 7/4
Cu	Control	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5	10YR 7/3.5
	24h	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 6/4	10YR 6/4
	48h	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4.5	2.5Y 7/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4
	72h	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	10YR 7/4.5	10YR 7/5	2.5Y 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 6/4
Fe	Control	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5	5YR 5/3.5
	24h	2.5Y 5/2	2.5Y 6/2	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/3	2.5Y 5/3	2.5Y 5/3	2.5Y 5/2.5
	48h	2.5Y 5/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/3	2.5Y 5/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 5/2.5
	72h	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/3	2.5Y 5/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3

보조제의 경우 가장 짙게 염색되었던 콩즙의 색상변화가 다른 보조제에 비하여 컸으며, 탈지분유의 색상변화가 적은 것으로 나타났다. 축진노화 시간이 증가할수록 Fe 매염인 경우를 제외하고 매염제 및 염색보조제의 종류에 관계없이 명도 및 채도가 증가하여 색상의 견뢰도가 감소하였다.

Table 10 및 11은 자목련 및 백목련 꽃잎 추출물로 염색한 한지를 축진노화 처리하였을 때의 색상 변화를 나타낸 것이다.

염색한지의 색상 변화에 있어서 화선지가 순지에 비해 축진노화 처리에 의한 퇴색도가 낮은 것으로 나타났으나 그 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 매염제 및 염색보조제에 따른 자목련 꽃잎 및 백목련 꽃잎 추출물로 염색한 한지간의 색상은 주황색~갈색으로 큰 차이가 없었으며, 축진노화 시간이 증가할수록 황색으로 변하여 명도 및 채도가 증가하는 것으로 나타났다. 염색보조제가 축진노화 처리 시 염색한지의 색상 변화에 미치는 영향은 콩즙을 처리한 한지의 변색도가 다소 낮았으며, 다음으로 탈지분유 순이었으며, 키토산은 무처리보다 낮았으나 가장 높은 변색도를 나타냈다.

축진노화 시간에 따른 염색 한지의 색상 변화는 초기 24 시간 처리에서 가장 큰 색상 변화를 가져 왔으며, 시간이 증가 하더라도 색상의 변화가 미미하거나 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 염색보조제 및 매염제의 종류에 관계 없이 목련 꽃잎 추출물로 염색한 모든 한지에서 동일한 경향을 나타냈다.

Table 10. 자목련 꽃잎 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	10YR 7/3.5	10YR 7/3.5	10YR 7/3.5	10YR 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3	2.5Y 7/3
	24h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4
	48h	10YR 8/4.5	10YR 8/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
	72h	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
Al	Control	10YR 8/4	2.5Y 8/3.5	10YR 7/3.5	2.5Y 7/3	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/3.5	10YR 7/3.5
	24h	10YR 8/4.5	10YR 8/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/3.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5
	48h	10YR 8/4	10YR 8/4	10YR 8/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
	72h	10YR 8/4	10YR 8/4	10YR 8/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 8/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4
Cu	Control	2.5Y 7/3	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5
	24h	2.5Y 7/4	10YR 6/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4
	48h	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 6/4	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5
	72h	10YR 7/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5
Fe	Control	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 5/3.5	2.5Y 5/3.5	2.5Y 5/3.5	2.5Y 6/4
	24h	10YR 6/3.5	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 5/3.5	10YR 5/3.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4
	48h	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4
	72h	10YR 6/3.5	10YR 3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4

Table 11. 백목련 꽃잎 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	2.5Y 7/5	2.5Y 7/5	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4
	24h	10YR 7/5	10YR 7/5	10YR 6/5	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 6/4.5	10YR 6/5	10YR 6/4.5
	48h	10YR 7/5	10YR 7/5	10YR 7/5.5	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 7/5	10YR 6/5	10YR 6/4.5
	72h	10YR 7/5	10YR 7/5	10YR 7/5.5	10YR 7/4.5	10YR 7/5.5	10YR 7/5	10YR 6/5	10YR 6/4.5
Al	Control	2.5Y 7/5	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	10YR 6/5	2.5Y 6/4	2.5Y 7/5	2.5Y 6/4
	24h	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 7/5	10YR 7/4.5	10YR 7/5
	48h	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 6/5	10YR 7/5	10YR 7/4.5	10YR 7/5
	72h	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/5	10YR 7/4.5	10YR 7/5.5	10YR 7/5	10YR 7/5	10YR 7/5
Cu	Control	5Y 6/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 5/3.5	2.5Y 6/4	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/4
	24h	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 5/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4
	48h	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4.5	10YR 5/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5
	72h	10YR 6/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4.5	10YR 5/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5
Fe	Control	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	10YR 6/4	2.5Y 6/4	10YR 5/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	2.5Y 6/4
	24h	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4
	48h	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4
	72h	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4

Table 12, 13, 및 14는 목련, 백목련 및 일본목련 수피 추출물로 염색한 한지를 축진노화 처리하였을 때의 색상 변화를 처리시간, 매염제 및 염색보조제의 종류에 따라 분석한 것이다.

Table 12. 목련 수피 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	2.5Y 8/3	2.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	2.5Y 8/3.5
	24h	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 8/4	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 8/4	2.5Y 8/3.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/3.5	10YR 8/4	2.5Y 8/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
Al	72h	10YR 8/4	10YR 8/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 8/4	2.5Y 8/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
	Control	2.5Y 8/4	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	2.5Y 8/4	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5
	24h	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4
Cu	48h	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4
	72h	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 8/4	10YR 7/4	10YR 7/4
	Control	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3.5	7.5Y 7/3.5	10Y 7/3.5	7.5Y 7/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3
Fe	24h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 7/4	10YR 7/4	10YR 6/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4
	72h	2.5Y 7/4	10YR 7/4.5	10YR 6/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4
None	Control	5Y 7/2	10Y 7/2	2.5GY 7/1	2.5GY 7/2	5Y 6/2	7.5GY 6/2	10Y 7/2	10Y 7/2
	24h	5Y 6/2	5Y 6/2	5Y 6/2	5Y 6/2	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5
	48h	2.5Y 6/2	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3
Al	72h	2.5Y 7/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	10YR 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 7/3

Table 13. 백목련 수피 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	7.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5
	24h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	10YR 7/3.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4
Al	72h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	10YR 7/4	10YR 7/5	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4
	Control	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/4	2.5Y 8/4	2.5Y 8/4	7.5Y 8/3
	24h	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4
Cu	48h	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	10YR 7/3.5	10YR 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4
	72h	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4.5	2.5Y 7/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
	Control	2.5Y 8/3	7.5Y 8/3	10Y 8/3.5	10Y 8/3.5	7.5Y 7/3.5	7.5Y 7/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3
Fe	24h	2.5Y 7/3	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 6/4.5	2.5Y 6/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 7/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 7/4.5
	72h	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 7/4.5
None	Control	5Y 7/2	5Y 7/2	5Y 7/2	5Y 7/2	7.5Y 7/3	5Y 7/3	10Y 7/2	10Y 7/2
	24h	5Y 6/2	5Y 6/2	5Y 6/2	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5
	48h	5Y 6/2	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3
Al	72h	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3	2.5Y 6/3

Table 14. 일본목련 수피 추출물로 염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리결과

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5
	24h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 8/3.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4.5	2.5Y 8/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 8/3.5	10YR 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4	10YR 8/4	10YR 7/4.5	10YR 7/4
	72h	10YR 7/4	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4	10YR 8/4	10YR 7/4	10YR 7/4
	Control	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3	2.5Y 8/3.5	7.5Y 8/3	7.5Y 8/3
Al	24h	10YR 7/2	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4.5	2.5Y 8/4	2.5Y 7/4
	48h	2.5Y 7/3.5	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	2.5Y 7/3.5	10YR 7/4	10YR 7/4	2.5Y 7/4	10YR 7/4
	72h	2.5Y 7/4	2.5Y 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 7/4	10YR 8/4	10YR 8/4	10YR 7/4
	Control	7.5Y 7/3.5	5Y 7/3	5Y 6/3.5	5Y 7/3.5	5Y 6/3.5	5Y 6/3	5Y 7/3	5Y 7/3
	Cu	24h	2.5Y 6/4	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/3.5	2.5Y 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/3.5
48h		10YR 6/4	10YR 6/4	2.5Y 6/4	2.5Y 6/3.5	10YR 6/4	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4
72h		10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/4	10YR 6/3.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4.5	10YR 6/4	10YR 6/4
Control		7.5YR 7/2	2.5GY 7/2	2.5GY 5/1	2.5GY 5/1	10Y 5/1	10Y 5/2	7.5GY 6/2	7.5GY 6/2
Fe		24h	5Y 6/2	5Y 6/2	5Y 5/2	5Y 5/2	5Y 5/2	2.5Y 5/2.5	5Y 6/2
	48h	2.5Y 6/2.5	5Y 6/2	2.5Y 5/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 5/3	2.5Y 5/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5
	72h	2.5Y 6/3	2.5Y 6/2	2.5Y 5/2.5	2.5Y 6/2.5	2.5Y 5/2.5	2.5Y 5/3	2.5Y 6/2.5	2.5Y 6/2.5

Table 12는 목련 수피 추출물 염색 한지의 색상 분석 결과로 전체적으로 명도는 6~8로 처리 시간에 따라 큰 변화가 없었으며 색상은 처리시간이 경과함에 따라 무매염과 Al, Cu 매염은 황색에서 주황색으로 Fe 매염은 연두색에서 황색으로 변화하였다. 특히 Cu 매염이 다른 매염에 비해 색변화 폭이 가장 컸다. 채도는 축진노화 처리 시간의 경과에 따라 처리 후에 약간씩 증가했지만 2~4.5 정도로 여전히 탁한 색을 나타냈으며, Fe 매염의 채도가 가장 낮은 편이었고 탈지분유와 콩즙으로 전처리한 화선지의 채도는 감소하였다.

Table 13은 백목련 수피 추출물 염색 한지의 색상 분석 결과로 다른 추출물 염색 한지와 비슷한 결과를 보이며 역시 밝은 색상을 나타냈다. 매염제의 종류에 따른 염색 한지의 색상 변화는 Cu 매염이 가장 큰 것으로 나타났다. Fe 매염은 명도와 채도가 가장 낮게 나타났으며, 축진노화 처리시 색상이 황색 내에서만 변화 하였는데 목련, 일본목련 수피 추출물 염색 한지의 변화와 비교된다.

Table 14는 일본목련 수피 추출물 염색 한지의 색상 분석 결과로 목련과 백목련 수피 추출물 염색 한지와 비슷한 색상을 나타냈다. 축진노화 처리한 한지의 색상은 매염제의 종류에 따라 무매염, Al 매염 및 Cu 매염은 황색에서 주황색으로, Fe 매염은 연두색에서 황색으로 변색하였다. 축진노화 처리에 따른 한지의 명

도 변화는 무매염이 가장 높았고 Al 매염, Cu 매염, Fe 매염 순이었으며, 무매염 한지는 대체로 채도가 감소하였다.

3.2 염색 한지의 색차(ΔE) 분석 결과

목련 잎 및 목련 꽃잎으로 염색한 한지를 촉진노화 처리하여 색차를 분석한 결과를 Table 15, 16, 17에 나타냈다.

염색보조제 처리에 따른 염색한지의 건뢰도를 분석한 결과 콩즙으로 전처리한 염색 한지가 촉진 노화시 색차가 가장 큰 것으로 나타났다. 염색 재료에 있어서는 목련 잎 염료의 경우 촉진 노화처리 화선지의 색차가 크게 나타난 반면, 백목련 및 자목련 꽃잎 염료는 촉진 노화된 순지의 색차가 크게 나타났다. 그러나 콩즙 보조제 처리된 염색의 경우 색차는 염료의 경우와 반대로 화선지가 더 크게 나타났다.

Table 17. 촉진노화 처리 목련 잎 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	1.589	1.409	2.379	3.991	2.809	3.699	3.221	1.756
	48h	2.588	2.359	3.412	4.886	4.386	5.178	4.533	3.204
	72h	3.100	3.011	4.264	5.454	5.577	6.415	5.227	4.346
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	2.601	2.132	2.335	2.597	2.780	2.702	1.152	2.146
	48h	3.444	2.836	5.830	3.875	4.310	3.951	2.124	3.158
	72h	3.864	3.336	4.438	4.706	5.648	4.977	2.576	3.911
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	1.954	1.479	1.620	2.401	3.227	1.561	2.929	3.723
	48h	2.689	1.767	1.911	2.993	3.457	1.811	3.311	4.065
	72h	2.807	2.043	2.116	3.287	3.574	2.004	3.332	4.063
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	3.445	4.654	0.774	1.368	2.178	1.780	1.118	1.993
	48h	4.708	5.729	2.044	2.404	2.993	3.349	1.838	1.531
	72h	5.485	6.532	3.452	3.363	3.692	4.479	2.635	2.108

Table 16. 축진노화 처리 자목련 꽃잎 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	2.640	2.460	3.063	4.376	5.017	4.325	3.518	3.103
	48h	3.516	3.313	4.467	3.839	5.610	5.018	4.126	3.966
	72h	3.244	3.443	4.458	3.805	5.858	5.265	4.232	3.963
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	3.404	3.079	3.031	1.753	4.345	3.477	3.339	3.036
	48h	3.838	3.759	3.515	2.292	4.778	3.770	4.184	3.605
	72h	3.463	3.589	3.422	2.465	5.244	4.235	4.284	3.709
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	1.155	2.614	3.601	1.468	2.713	2.466	2.975	2.939
	48h	2.071	3.594	4.910	1.901	3.744	3.361	4.018	3.988
	72h	2.035	3.575	5.262	1.912	3.882	3.577	4.292	4.294
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	3.060	3.482	1.907	3.290	3.553	3.207	2.003	2.101
	48h	4.007	4.275	2.884	4.136	4.459	4.234	2.508	2.525
	72h	4.509	4.776	3.895	4.974	5.584	5.570	3.071	3.078

Table 17. 축진노화 처리 백목련 꽃잎 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Aging Time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji	Hwaseonji	Sunji
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	2.047	2.328	2.728	3.288	3.959	4.244	2.388	2.381
	48h	3.074	3.433	3.823	3.768	5.268	5.472	3.688	3.439
	72h	3.168	3.447	4.103	3.514	5.756	5.908	3.957	3.648
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	1.960	2.610	3.289	3.609	4.961	4.435	2.583	2.635
	48h	3.222	3.379	3.800	4.416	6.191	5.700	2.902	3.350
	72h	2.748	3.507	3.707	4.593	6.861	6.360	2.832	3.516
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	0.614	3.991	3.034	0.657	2.805	1.672	2.695	1.077
	48h	1.693	5.311	3.943	1.244	3.644	2.302	3.834	2.213
	72h	2.075	6.544	4.426	0.929	3.943	2.250	4.240	2.159
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	1.530	1.562	3.293	2.836	3.266	2.953	1.604	1.128
	48h	2.167	2.428	4.247	3.755	4.162	3.724	2.579	1.885
	72h	2.257	4.378	4.738	3.714	5.196	1.222	2.752	4.551

목련과 수목의 수피 추출물을 이용하여 천연염색한 화선지 및 순지의 축진노화 처리 후 색차 분석 결과를 Table 18, Table 19, Table 20에 나타냈다.

매염제의 종류에 따른 천연염색 한지의 축진노화처리에 의한 견뢰도를 색차 분석을 통하여 평가한 결과, 전반적으로 Cu매염 염색 한지의 색차 변화가 가장 커 염색한지의 견뢰도가 불량한 것으로 나타났다. Fe매염 염색 한지는 축진노화 처

리 후의 색차 변화가 가장 적게 나타나 다른 매염제 비하여 염색물의 견뢰도가 우수한 것으로 나타났다.

한지의 종류에 따른 견뢰도 특성을 분석한 결과, 순지 보다는 화선지가 색차변화가 크게 나타나 순지의 염색 견뢰도가 화선지보다 우수한 것으로 평가 되었다.

염료 수피의 종류에 따른 염색한지의 견뢰도를 평가한 결과 일본목련 수피 추출물로 염색한 한지의 축진노화처리 후 색차 변이가 가장 낮게 나타나 다른 수피 추출물보다 견뢰도가 우수한 것으로 평가 되었다. 반면 백목련 수피 추출물로 염색한 한지의 축진노화처리 후 색차 변이가 가장 크게 나타나 염색물의 견뢰도가 가장 불량한 것으로 나타났다.

한지의 염색성 향상을 위하여 사용된 염색 보조제의 종류에 따른 염색한지의 견뢰도를 축진노화시험법으로 분석한 결과, 전반적으로 노화시간이 증가할수록 염색물의 견뢰도가 감소하는 경향을 나타냈다. 보조제의 종류에 따른 염색물의 견뢰도 감소는 비슷한 경향을 나타냈으나 키토산으로 전처리한 염색물의 견뢰도 감소가 다른 염색보조제 보다 다소 크게 나타났다.

Table 18. 축진노화 처리 목련 수피 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Auxiliary dyeing agent								
	Aging time	None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	7.922	6.739	11.910	10.338	5.838	5.221	8.039	8.137
	48h	8.871	6.556	12.255	10.526	6.248	4.950	8.430	8.288
	72h	9.393	6.680	12.350	10.697	6.298	4.983	8.813	7.950
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	8.035	8.501	9.203	10.844	6.388	5.467	7.524	8.306
	48h	8.862	8.398	10.243	9.198	7.010	4.938	9.115	8.145
	72h	9.485	8.527	10.221	9.315	7.690	4.602	8.797	8.464
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	9.026	9.785	12.475	9.588	7.695	8.619	11.556	11.064
	48h	9.408	11.507	13.976	10.238	8.475	9.671	12.145	11.685
	72h	9.349	11.351	14.096	9.955	9.132	8.711	13.607	12.682
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	8.027	7.292	7.960	7.817	7.984	7.500	10.568	10.219
	48h	7.830	9.062	9.796	7.842	8.843	6.923	10.520	9.583
	72h	7.539	8.414	8.476	7.455	8.391	6.472	10.169	8.663

Table 19. 축진노화 처리 백목련 수피 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	10.655	10.270	6.259	6.777	10.875	9.326	10.315	10.505
	48h	11.244	10.061	6.661	7.118	11.137	9.233	10.642	10.846
	72h	11.697	10.112	7.075	7.077	11.663	9.035	10.973	10.900
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	11.681	10.543	12.309	9.984	8.187	8.661	11.489	10.221
	48h	12.297	11.043	11.241	11.686	8.497	8.645	11.754	10.324
	72h	13.078	11.301	13.674	11.893	9.077	7.293	13.069	11.017
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	10.324	13.737	13.990	12.268	16.098	9.860	15.721	14.404
	48h	10.981	15.454	15.640	15.692	16.650	13.283	17.356	16.121
	72h	11.239	14.401	19.491	16.212	17.519	13.484	18.071	18.155
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	10.207	10.744	9.293	10.161	12.661	9.770	12.789	11.919
	48h	10.486	10.253	9.866	10.295	11.096	8.437	12.807	11.673
	72h	10.092	9.492	10.044	9.669	9.974	7.693	12.147	10.905

Table 20. 축진노화 처리 일본목련 수피 추출물 염색 한지의 색차(ΔE) 분석결과

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	6.261	6.470	7.361	7.747	5.604	4.204	8.183	7.699
	48h	7.298	6.981	7.645	7.884	5.212	4.393	8.243	7.479
	72h	8.154	6.919	7.812	7.807	5.140	3.837	8.047	7.625
Al	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	7.820	7.618	4.727	6.604	5.331	8.108	6.472	8.255
	48h	6.873	7.445	6.306	6.860	5.570	5.314	6.918	9.411
	72h	7.743	6.729	6.280	8.301	6.370	4.497	7.496	9.461
Cu	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	9.403	5.439	3.187	2.918	7.441	7.933	8.412	8.677
	48h	8.760	6.392	3.445	2.254	7.531	9.240	9.527	9.160
	72h	11.41	8.017	3.996	3.437	9.430	9.514	10.001	9.956
Fe	Control	-	-	-	-	-	-	-	-
	24h	10.890	7.303	6.521	6.405	6.465	7.547	7.736	7.846
	48h	10.558	7.354	7.013	7.360	7.976	8.631	8.256	8.065
	72h	10.473	7.373	8.172	8.153	9.073	9.525	8.631	8.325

목련과 수목을 염재로 한 염색성 시험 사진 도록은 부록 3에 수록함

4. 결론

한지의 천연염색에 있어서 목련과 수목의 염료특성과 염색성 및 염색으로 인한 기능성 향상을 위하여 염색 보조제로서 콩즙, 탈지분유, 키토산을 각각 화선지와 순지에 처리하고 매염제로는 Al, Cu, Fe를 사용하였다. 목련 잎, 백목련 꽃잎, 자목련 꽃잎 목련 수피, 일본목련 수피, 백목련 수피를 염료로 하여 한지의 염색특성을 분석하였다.

본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 천연염색 한지의 색상은 2.5Y, 10Y, 5YR, 10YR, 7.5Y, 2.5GY로 염료의 종류에 관계없이 대체적으로 황색에서 주황색 계열의 색상을 나타냈다.

2. 한지의 종류에 따른 천연염료의 염색효과를 비교한 결과 화선지가 순지보다 양호한 것으로 나타났다. 순지의 제조에 사용되는 닥 인피섬유는 화선지 제조시 혼합되는 목재 펄프보다 셀룰로오스의 결정화도가 높고 리그닌 함량이 낮기 때문에 화선지보다 염색성이 불량한 것으로 판단된다.

3. 공시 염료의 염색효과는 목련 잎 및 일본목련 수피 추출물의 염색특성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

4. 한지와 같이 염색성이 불량한 셀룰로오스 원료의 염색성 향상을 위하여 콩즙, 키토산 및 탈지분유를 염색 보조제로 처리하여 염색효과 비교한 결과 염색 보조제 처리한 한지가 무처리 한지보다 양호하였다. 염색보조제의 종류에 따른 염색성 향상 효과는 콩즙, 탈지분유, 키토산 순이었다.

5. 천연염색 한지의 염색성 향상 및 색상 변화를 부여하기 위하여 Al, Cu, Fe계 매염제를 이용하여 매염을 실시한 결과, 철 매염이 가장 낮은 명도 값으로 염색한지 중에서 가장 어두운 색상을 나타냈으며, 구리 매염이 다음으로 짙은 색상을 나타냈다. 알루미늄 매염은 무매염 염색한지와 같은 색상을 나타냈으나 염색성은 무매염 보다 우수하였다.

6. 천연염색 한지의 색상 견뢰도를 평가하기 위하여 촉진노화시험기를 이용하여 견뢰도 시험을 실시한 결과, 견뢰도 감소는 초기 24h 처리가 가장 컸으며, 처리시간의 경과에 따라 견뢰도 감소도 증가하였다.

7. 촉진노화 처리시간이 경과함에 따라 대부분의 염색한지의 색상이 황색계열에서 주황색계열로 변하였고, 명도 및 채도의 증가로 견뢰도가 감소하는 것으로 나타났다.

8. 축진노화 처리시 매염제의 종류에 따른 천연염색 한지의 견뢰도 변화는 짙은 색으로 염색되었던 철매염 및 구리매염의 견뢰도 감소가 크게 나타났으나, 축진노화 처리시간이 증가할수록 매염제간의 차이는 감소하여 비슷한 색상을 나타냈다.

9. 축진노화 처리에 따른 염색 보조제의 색상 견뢰도르 비교한 결과, 염색성이 가장 양호하였던 콩즙의 견뢰도 감소가 컸으며, 키토산 처리 염색한지의 견뢰도 감소 또한 큰 것으로 나타났다.

10. 백목련 및 자목련 꽃잎 추출물로 염색한 한지의 경우, 목련 꽃잎에서 유래된 향기성분이 상당기간 지속되어 색지 및 향지로서의 이용이 가능할 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

년도	기관	연구개발 목표/내용/범위	평가의 착안점	달성도 (%)
1 차 년 도 (2 0 0 1)	주관기관 (제1세부)	- 줄기발생 배지 및 조건 구명 - 줄기증식 배지 및 조건 구명 - 체세포배유도 배지 및 조건 구명 - 시료채취, 가공, 추출	- 기관배양 - 체세포유도체 개발 - 천연염색성 시험	100
	주관기관 (제2세부)	1. 항암작용 - Sulphorhodamine B 분석법에 의한 검색 2. 고지혈증 - 혈액내 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 및 중성지방 함량 분석 - 간 및 지방조직의 지질분석에 의한 검색 - GOT, GPT 및 v-GTP 측정 3. 당뇨병 - α-glucosidase inhibitor의 탐색 4. 퇴행성 중추신경계 질환 - Catecholamine 생합성 과정에 대한 작용기전: PKA/PKC/Ca ⁺⁺ 농도 변화 - Catecholamine 생합성/대사 효소활성 - Neurite outgrowth 유도작용에 대한 작용기전: Neurite outgrowth 측정 - 실험곤충의 확보 유지 - 해충과 응애에 대한 활성물질 탐색 - 주요 식물병원균주의 분리동정 및 계대배양 - 병원균 생육억제물질의 탐색 (in vitro) - 실내 생물검정법 개발	- 생리활성 물질의 활성 검색 - Human cancer cell에 대한 세포독성 검색 - α-glucosidase inhibitor의 탐색 - 실험곤충의 확보 유지 I (진딧물, 나방류) - 해충과 응애에 대한 활성물질 탐색 I (진딧물, 나방류) - 주요 병원균의 확보 유지 (In vitro) - 병원균 생육억제물질 탐색 I - 실내 생물검정법 개발 I (진딧물, 나방류)	100
	제1협동	- 목련과 수종의 부위별 용매 분획 - 분획물의 항균, 항산화, 항돌연변이, 면역증진 등에 대한 생리활성검정	- 추출조건 및 용매분획 타당성 - 기능성 활성물질 탐색법 적정여부	100
	제2협동	- <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 에 의한 목련과 수종의 형질전환 - 형질전환 효율을 증대시키기 위한 기법 개발	- 형질전환기술 개발 - 품종별 염기서열분석	100
	위탁기관	- 배양세포의 유도 및 증식 - 현탁배양 기술개발	- 배양세포의 유도 및 증식 - 현탁배양 기술개발	100

년도	기관	연구개발 목표/내용/범위	평가의 착안점	달성도 (%)
2 차 년 도 (2 00 2)	주관기관 (제1세부)	-발근유도법 구명 -순화처리조건 구명 -체세포배유도배지 및 조건 구명 -발아촉진방법 구명 -경화조건 구명 -encapsulation 방법 확립 -수종별 부위별 시험 -유전자분석	-체세포 증식 및 저장 -체세포 발아에 의한 식 물체유도 -천연염료개발 -유전자분석	100
	주관기관 (제2세부)	1. 항암작용 -In vitro 급성 독성 측정 -Murine tumor 모델에서의 효능평가 2. 고지혈증 -혈구와 혈소판 수의 측정 및 혈소판 응집 측정에 의한 검색 독성시험 : 치사량검사 3. 당뇨병 -α-glucosidase inhibitor의 분리 정제 및 구조의 규명 4. 퇴행성 중추신경계 질환 -Catecholamine 생합성 과정에 대한 작용기전 -Catecholamine 생합성 효소 gene 조절작용 -Neurite outgrowth 유도작용에 대한 작용기전: NGF 수용체 친화성 L-DOPA-induced apoptosis -해충과 응애에 대한 활성물질 탐색 -병원균 생육억제물질의 탐색 (in vivo) -식물 저항성 유도물질의 탐색 (in vivo) -실내 생물검정법 개발	-생리활성 물질의 작용기전 -Murine tumor 모델에서의 효능평가 및 급성독성평가 -α-glucosidase inhibitor의 분리 정제 및 구조의 규명 -실험곤충의 확보 유지 II(진딧물, 나방류) -해충과 응애에 대한 활성물질 탐색 II(진딧물, 나방류) -병원균 생육억제 물질 탐색 (in vivo) -식물 저항성유도 물질 탐색 (in vivo) II -실내 생물검정법 개발 II(진딧물, 나방류)	100
	제1협동	-활성 분획물에 대한 간기능개선, 알콜 분해 촉진 등의 생리활성 탐색 -칼럼크로마토그래피 방법에 의한 물질 분리	-활성 분획물에 대한 탐색법 적정여부 -활성물질의 분리·정제 여부 -정제물질의 구조 및 결정 확립	100
	제2협동	-형질전환 조직의 증식 및 물질생산을 위한 배양조건 탐색 -형질전환 조직으로부터 기능성 물질의 추출 및 분석	-형질전환 조직의 증식 조건 탐색 -세포주 선발 -물질생산을 위한 배양조건 탐색 -품종별 염기서열 분석	100
	위탁기관	-세포주 선발 및 저온 보존-물질생산 증진 조건 확보 -공정화 기술 개발 -현탁배양세포로부터 유용물질 생산	-세포주 선발 및 저온 보존 -현탁 배양 세포 로 부터 유용물질 생산	100

년도	기관	연구개발 목표/내용/범위	평가의 착안점	달성도 (%)
3 차 년 도 (2 00 3)	주관기관 (제1세부)	-유도된 체세포배로부터 우량배를 선발 -순화 및 토양이식 -염색법확립 -유전자 분석	-체세포배encapsulation -인공종자 발아범구명 -천연염료개발 -유전자분석	100
	주관기관 (제2세부)	1. 항암작용 -Human tumor xenograft 모델에서의 효능평가 -세포독성 기전 연구 2. 고지혈증 -고지혈증유발과 관련된 중성지방 대사에 관여하는 효소 활성 측정에 의한 검색 -지단백질 대사에 관여하는 LPL 활성 측정 및 유전자 발현에 의한 검색 독성시험 : 치사량검사 3. 당뇨병 -α-glucosidase inhibitor의 항당뇨 효능 측정 독성시험 : 치사량 검사 4. 퇴행성 중추신경계 질환 -동물모델의 혈액/뇌중의 dopamine 함량: In situ brain perfusion 방법 Microdialysis -BBB transport: MBEC4 cells -살충 살균 스펙트럼, 침투이행성, 잔효성 및 교차저항성 등 -처리방법, 시기, 농도, 횟수 등 규명 -기주식물에 대한 약해 조사 -야외 적용시험	-생리활성 물질의 제품화 및 활성 검색: 독성시험검색 -Human tumor xenograft 모델에서의 효능평가 -α-glucosidase inhibitor의 항당뇨 효능 측정 -살충 살균 스펙트럼, 침투이행성, 잔효성 및 교차저항성 등 -처리방법, 시기, 농도, 횟수 등 규명 -기주식물에 대한 약해 반응시험 -야외 적용시험	100
	제1협동	-목련과 수종의 부위별 용매 분획 -분획물의 항균, 항산화, 항돌연변이, 면역증진 등에 대한 생리활성검정	-정제물질의 구조동정 여부 -활성성분의 제품화 -연구계획의 일관성 및 목표달성도	100
	제2협동	- <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 에 의한 목련과 수종의 형질전환 -형질전환 효율을 증대시키기 위한 기법 개발	-생물반응기를 이용한 물질생산기술 개발 -특이유전자 염기서열 확인	100
	위탁기관	-물질생산증진 조건 확보 -공정화 기술 개발	-물질생산증진 조건 확보 -공정화 기술 개발	100

제 2 절 관련분야에 의 기여도

1. 증식법개발

오미자의 액아 배양법, 체세포배 배양법은 증식에 활용도 가능하고 기내 육종 연구에도 이용이 가능하다. 또한 흑오미자의 삼목발근법은 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이는 학문적인 발전 뿐만 아니라 실용화에도 바로 사용할 수 있는 기술이다.

2.. 목련과 염재에 의한 염색성시험

온감과 종이에 대해 목련을 염재로 이용할 수 있다는 것은 기존 염재에 국한해 있던 범위를 벗어나 폭넓게 활용할 수 있을 것으로 기대됨

3.. 유전자분석

목련과 식물에서 유용유전자가 클로닝된 것은 본 연구가 최초로서, 유용한 약리성분을 지니고 있는 목련을 대상으로 생물공학적인 응용의 가능성을 제시하고 있다.

본 세부과제는 총 3개년의 과제수행기간 중 2년차와 3년차에 수행되었다. 2년차의 목표는 cDNA library 작성이었으며, 이 목표는 library 작성에 사용된 조직별로 tagging된 cDNA로 작성함으로써 100%이상 달성되었다. 3년차의 목표는 이차대사에 관여할 것으로 추정되는 유용유전자후보 10개를 cloning하는 것이었다. 조직특이 탐침을 2단계에 걸쳐 사용함으로써 정성적, 정량적인 발현정도를 상대 비교함으로써 화아와 수피에 특이적으로 발현되고 있는 유전자를 20개 클로닝하여 그 목표를 달성하였다.

4. 약리활성 검증

가. 각종 성인병은 경제적 선진-산업화에 따라 노령인구의 증가와 함께 증가하며, 사회적 문제가 되기 때문에 이와 관련된 치료제 및 연구방법의 개발/기술 확보는 국민복지 차원에서 국가가 투자해야 할 주요 기술 분야이며, 생리활성 물질의 분리기술, 신경과학 분야의 기반연구기술의 확보 등의 학문적 기여도가 높다.

나. 성인병 치료(퇴행성 중추신경계 질환, 당뇨병, 항암작용, 고지혈증 등)를 위한 생리활성 물질의 개발은 고부가가치를 제공하여주는 잠재력을 지니고 있으며, 의약품, 건강기능성 식품 산업의 발전에 기여할 수 있다.

다. 생리활성에 근거하여 기능별 유효 식물자원의 활용체계를 확립하며, 산림자원의 농가보급으로 인한 농가소득의 확보에 기여할 수 있다.

5. 생리활성이 있는 주요수종의 기능성 천연물질 탐색(산림과학원)

이러한 연구 결과는 목련과 수목의 활용과 관련하여 기능성 식품 개발에의 응용, 신약개발에의 응용면에서 중요한 기초자료가 될 것이며, 그리고 새로운 분리-분석 기술의 개발 및 축적은 천연물로부터 신약개발을 위한 기초기반 기술이 될 수 있으며, 국산식물 자원의 개발 및 응용을 통하여 국가 경쟁력 향상에 기여할 것으로 기대된다.

6. 형질전환에 의한 천연물질 대량생산(전남대)

- 가. 목련과 수종에 대한 형질전환 기본 기술을 확보함
- 나. 형질전환 조직을 활용한 고부가가치 약리물질의 생산성 확인
- 다. 형질전환 조직의 대량배양 연구 진행 중
- 라. 목련과 수종에 대한 신개념의 육종 기반 기술토대 마련

7. 세포배양에 의한 유용물질 대량생산(동신대)

- 가. 목련과 수종으로부터 체세포 유기 및 배양기술 확보
- 나. 수목자원의 현탁배양 체세포로부터 유용물질 생산기술 확보
- 다. 체세포로부터 지표물질 생산성 증대를 위한 조건 규명 중
- 라. 체세포 대량배양을 통한 유용물질 상시 생산 시스템 확보

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

연구논문 발표와 특허 출원 등을 통하여

- * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제1절 유효수종의 증식법개발

오미자에 대한 기내 증식법 중 액아배양방법은 실제로 이용할 수 있으며, 체세포배 유도에 의한 증식방법은 증식에도 활용이 가능할 뿐 만 아니라 기내에서의 형질전환 등에도 활용하여 유전육종연구에도 활용할 수가 있다.

남오미자개발된 증식법액아배양법과 삼목증식법은 또한 실제 증식에 활용할 수 있을 것임.

제2절 염색성시험

옷감에 대한 염색결과는 한복, 손수건, 스카프 등에 실용화가 가능하며 종이(한지)에 대한 염색은 한지공예로 쓸 수 있을 것이며 꽃잎을 염료로 사용한 경우는 향이 나므로 포장지, 실내 벽지로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

제3절 유전자분석

목련의 화아와 수피의 연구에서 발견된 terpene 대사관련 유전자들의 기능에 대해 분자생물학적인 연구결과를 산업적으로 이용하기 위해서는 좀더 진행한 후 가능할 것이다.

제4절 추출물의 의약활성탐색

1. 본 연구에서는 목련과 수목으로부터 성인병 치료물질(퇴행성 중추신경계 질환, 항암작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 감소작용, 면역 증강작용) 및 살충/살비에 미치는 활성 물질의 분리 및 활성 검색을 수행하였다.
2. MB-1-1 화합물(coumarin 유도체)은 저용량에서는 dopamine 함량 증가작용, 고용량에서는 neurite outgrowth 유도작용을 나타내며, MKB-2-5(lignan 유도체)는 neurite outgrowth 유도작용을 나타내었다. MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물은 퇴행성 중추신경계 질환(파킨슨씨 질환 등), 스트레스 등의 치료제 및 기능 개선제 개발에의 응용 가능성을 나타낸 것으로 사료되며, 이와 관련한 추가 연구를 진행할 계획이다.
3. 주요 추가연구 내용은 생리활성 물질(MB-1-1/MKB-2-5)의 in vitro 작용기전 및 in vivo 응용연구(퇴행성 중추신경계 질환 모델)를 진행하고자 하며, 이 연

- 구결과를 종합평가하여 질환 증상개선을 위한 제품화연구를 추진하고자 한다.
4. 현재, MKB-2-5 화합물은 국내 특허출원(출원번호: 2004-0036492, -0036493; 2004.5.21) 하였고, MB-1-1 화합물은 특허출원 준비 중에 있으며, 이 연구결과들을 정리하여 투고논문(SCI 급 2편 예상)을 준비하고자 한다.
 5. MB-1-1 및 MKB-2-5 화합물의 화학구조를 lead compound로 하여 유도체 합성하고 생리활성 검색을 진행하여, 독성이 낮고 효능이 증가된 새로운 생리활성 물질의 도출 연구에 응용하고자 한다.
 6. 항당뇨 작용을 나타낸 분획은 198W 및 4W(자목련 시료)이며, 일본 목련(209W 분획)은 강력한 암세포 분화 유도 효과 및 면역증강 효과를 나타내어, 새로운 개발의 선도물질 확보의 가능성을 나타내었다. 그러나, 생리활성 물질 분리의 어려움과 시간적 제약으로 단일성분의 활성 검색은 진행하지 못하였으며, 이에 대한 연구를 추가로 진행하고자 한다.

제 5절 생리활성이 있는 주요수종의 기능성 천연물질 탐색

1. 생리활성이 있는 주요수종의 기능성 천연물질 탐색 결과, 얻어진 대부분의 활성 실험에서 상대적으로 높은 활성을 나타낸 시료는 오미자(*Schizandra chinensis*) 열매 EtOH 추출물이다.

2. 따라서 활성연구는 이를 바탕으로 기능성소재로서의 가능성을 살펴보고, 오미자 열매의 물질과 목련 수피의 단리 물질들처럼 분리·동정을 거친 순수 물질보다는 조추출물로 사용하는 것이 앞으로의 이용에 있어 더 효율적일 것으로 생각된다.

제 6 절 형질전환에 의한 천연물질 대량생산

- 고부가가치의 수목자원에 형질전환 기법의 적용
- 유전자 전이기법의 수목자원으로 신기능성 유전정보 도입

제 7 절 세포배양에 의한 유용물질 대량생산

- 세포단계에서의 수목자원 연구개발 촉진
- 체세포배양을 통한 고기능성 약리물질 대량생산

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Botulinum 신경독성 물질은 부신 chromaffin 세포를 이용한 연구에서 catecholamine(dopamine/ norepinephrine)의 secretion 저해작용을 나타내고 있음에 착안하여, 최근 catecholamine secretion 저해작용을 나타내는 생리활성 물질의 검색과 관련한 연구가 진행되고 있다. Catecholamine의 정량적, 선택적 secretion 저해작용을 나타낸 생리활성 물질은 말초(피부부위)에서는 노화방지, 피부주름 예방 및 치료, 중추신경계에서는 학습/기억 등의 퇴행성 질환의 증상 개선제로 응용 가능성을 제시하고 있다.
2. Nogo A는 neurite outgrowth 저해제로서 CNS에 선택적으로 작용하여 신경계 축삭 상해(axonal damage), demyelination 등을 유도하여 자가면역 질환인 encephalomyelitis 발현과 관련이 있음이 보고 되었으며 Nogo A(amino-Nogo)와 관련한 연구가 주목을 받고 있다.

여 백

제 7 장 참고문헌

제1절 목련과 수목의 자원

- 고경식. 1991. 한국식물검색도감(수목). 아카데미서적
- 김용식, 송근준, 안영희, 오구균, 이경재, 이유미. 1998. 한국조경수목도감. 광
일문화사
- 김태욱. 1996. 한국의 수목 교학사
- 김태정. 1996. 한국의 자원식물.(전 5권) 서울대학교 출판부
- 박재인외. 2000. 숲, 문화 그리고 인간(증보판). 충북대학교 출판부 pp 37-50.--
- 이유미. 1995. 우리가 정말 알아야 할 우리나라 백가지. 현암사
- 이영노. 1996. 원색한국식물도감. 교학사
- 이창복. 1985 수목학. 향문사. 21-25.
- 이창복. 1993. 대한식물도감. 향문사 pp.990.
- 이창복.2003. 원색대한식물도감 상 하 향문사.

제2절 기능성 천연물질 추출법 확립(산림과학원, 구 임업연구원)

1. Ahn, J.H., T.H. Kim and H.Y.Lee. 1996. The continuous treatment of swine wastes by the growth. Kor. J. Appl. Micrirob. Biotechnol. 24, 345
2. Bani, T. Prabir, K. Chaudhuri. 1982. (-)-Maglifloenone, a novel spirocyclohexadienone neolignan and other constituents from *Magnolia liliflora*. phytochemistry, 21 : 3 747-750.
3. Bang O. S., Y. S. Lee and S. S. Kang, "A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte to macrophage". *Kor. J. Zool* 36, 514-521, (1993)
4. Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181 : 1199-1200
5. Chung, WT., Lee, SH., Cha, MS., Sung, NS., Hwang, B., Lee, HY., Biological Activities in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, *Kor. J. Medicinal Crop Sci.*, 9 (1), 45-54 (2001)
6. Cordell, G.A. 2000. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55:463-480.
7. Ci, Y. X., C. Y. Zhang, Jun feng, "Photoelectric behavior of mammalina cells and its bioanalytical applications", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45, 247-251 (1998)
8. Doll, R. and R. Peto, The causes of Cancer, Quantitative estimates of

- avoidable risks of Cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.*, 66(6), 1192 (1981).
9. Doyle, A., Griffiths, J. B. and Newell, D. G., *Cell & Tissue Culture, Laboratory Procedures.*, Wiley, (1993).
 10. Haraguchi, H. H. Ishikawa, N. Shirataki, A. Fukuda. 1997. Antiperoxidative activity of neolignans from *Magnolia obovata*. *J Pharm Pharmacol.* 49; 2: 209-12
 11. Haruhiko, Tada. F. Reiko, T. Yohko. 1982. 15-Acetoxycostunolide from *Magnolia sieboldii*. *Phytochemistry* 21:2, 458-459.
 12. Haraguchi, H. Ishikawa, H. Shirataki, N. Fukuda, A. 1997. Antiperoxidativity activity of neolignans from *Magnolia obovata*. *J.pharmacol.* 2:209-2012
 13. Hong, J.S., S.S. Kim and H.Y. Lee. 1997. The secretion of BDNF by the coculture of human fibroblasts. *Kor.J. Appl. Microbiol. Biotec.* 25, 21
 14. Ham, M.S., J.S. Hong, S.S. Kim and H.Y. Lee. 1996. Anticancer and immune activities of *A. gilgas*. *J. Natural Prod.* 26, 451
 15. Ham, M.S., S.L. Kim, J.H. Lee and H.Y. Lee. 1996. Screen and comparison of bioactivities of *A. nakai*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 745.
 16. Hames B. D. and Rickwood D., *Gel Electrophoresis of protein*, IRL press, (1981).
 17. Jun feng, Y. X. Ci, C. M. Gao and Y. Z. Li, "Voltammetric behavior of living cells *T. shanghaiensis* and its bioanalytical application", *Bio-electrochemistry and Bioenergetics*, 44, 89-93 (1997).
 18. Kim, S.Y., H.G. Kim, J.H. Lee and H.Y. Lee. 1996. tPA production by fed-batch cultivation under glutamine-limited conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 295
 19. Kim Y.N., H.G Kim, S.K. Lim, K.Y. Park, H. Murakami and H.Y. Lee. 1996. The economic production of anti-microbial factor from human promyeloocytes in low serum containing medium under chemostat cultivation. *Cytotechnol.* 19, 73.
 20. Longchuan C. and H. T. Armen, "Identification of Distinct Signalling Pathways for Somatostatin Receptors SSTR1 and SSTR2 as Revealed by Microphysiometry", *Cell. Signal*, 11(7), 499-505 (1999).
 21. Michael, C. A., A. S. Domnic and M. Ahne., Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, 48, 589-601 (1988).

22. Mercille, S. and B. Massie, Induction of Apoptosis in Nutrient-Deprived Cultures of Hybridoma and Myeloma Cells, *Biotechnology and Bioengineering.*, 44, 1140-1154 (1994).
23. Rukenstein A., and L. A. Green, The Quantitative Bioassay of Nerve Growth Factor, Use of Frozen 'Primed' PC12 Pheochromocytoma cells. *Brain Research*, 263, 177-180 (1983).
24. Shinichiro, T., A. Katsuhiko, Y. Mayumi and M. Yuzuru, S-990 A Novel Neurotrophic Compound from *Acremonium sp.* *J. Antibiotics.*, 47 (11), 1175-1181 (1994).
25. Yen, Y., and Guernsey, D. L. "Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation". *Cancer Res.* 46, 4156- 4161. (1986).
26. Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumure, I. Uehara, K. Komagoe, Y. Fujita and T. Okuda. 1989. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37(7) : 1919-1921.

제3절 의약활성탐색(충북대 약학과)

1. Fluharty SJ, Snyder GL, Stricker EM, Zigmond MJ: Short- and long-term changes in adrenal tyrosine hydroxylase activity during insulin-induced hypoglycemia and stress. *Brain Res.*, 287: 384, (1983)
2. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S: Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 239: 2910, (1964)
3. Greene LA, Tischler AS: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:2424, (1976)
4. Greene, L.A., Tischler, A.S., PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. *Adv. Cell. Neurobiol.*, 1982: 3, 373-414.
5. Gysbers, J.W., Rathbone, M.P., Guanosine and GTP enhance NGF stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *NeuroReport*, 1992: 3, 997-1000.
6. Lee, P.-G., Koo, P.H., Rat α_1 -microglobulin enhances nerve growth factor-promoted neurite outgrowth, TrkA phosphorylation, and gene expression of pheochromocytoma PC12 cells. *J. Neurochem.*, 2000: 74, 81-91.
7. Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E.,

- Bothwell, M., Chao, M., Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*, 1986: 47, 545-554.
8. Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., Parada, L.F., Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk protooncogene product induced by NGF. *Nature*, 1991: 350, 158-160.
 9. Kaplan, D.R., Miller, F.D., Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997: 9,213-221.
 10. Damon, D.H., D'Amore, P.A., Wagner, J.A., Nerve growth factor and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and gene expression in PC12 cells via both protein kinase C- and cAMP-independent mechanisms. *J. Cell Biol.*, 1990: 110, 1333-1339.
 11. Leprince, P., Bonvoisin, C., Rogister, B., Mazy-Servais, C., Moonen, G., Protein kinase- and staurosporine-dependent induction of neurite outgrowth and plasminogen activator activity in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1996: 52, 1399-1405.
 12. Hashimoto, S., Hagino, A., Blockage of nerve growth factor action in PC12h cells by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *J. Neurochem.*, 1989: 53, 1675-1685.
 13. Sato-Suzuki, I., Murota, S., Simvastatin inhibits the division and induces neurite-like outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, 1996: 220, 21-24.
 14. Middlemiss, P.J., Glasky, A.J., Rathbone, M.P., Werstuijk, E., Hindley, S., Gysbers, J., AIT-082, a unique purine derivative, enhances nerve growth factor mediated neurite outgrowth from PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, 1995: 199, 131-134.
 15. Mitsui A, Nohta H, Ohkura Y. High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.*, 344: 61 (1985).
 16. Lee MK, Nohta H, Ohkura Y: Assay for dopamine β -hydroxylase in human plasma and rat serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 421: 237 (1987)
 17. Lee M, Nohta H, Umegae Y, Ohkura Y: Assay for tyrosine hydroxylase by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 415: 289 (1987)
 18. Lee M, Nohta H, Ohkura Y, Yoo B: Assay for AADC based on fluorescence derivatization with 1,2-diphenylethylenediamine. *Anal. Chem. Acta*, 177: 93 (1985)

19. Lee M, Nohta H, Ohkura Y: Occurrence of aromatic L-amino acid decarboxylase in human plasma and its assay by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 378: 329 (1986)
20. Nagatsu T, Oka K, Kato T: Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 163: 247 (1979)
21. Naoi M, Nagatsu T: Inhibition of monoamine oxidase by 3,4-dihydroxyphenylserine. *J. Neurochem.* 47: 604 (1986)
22. Minami, M., W. Maruyama, P. Dostert, T. Nagatsu, M. Naoi. Inhibition of type A and B monoamine oxidase by 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and their N-methylated derivatives. *J. Neural Transm.*, 92:125-135 (1993)
23. Naoi, M., T. Nagatsu. Quinoline and quinaldine as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sci.*, 40: 1075-1082 (1986)
24. Moser, A., J. Scholz, H. Bamberg, V. Böhme. The effect of N-methyl-norsalsolinol on monoamine oxidase of the rat caudate nucleus in vitro. *Neurochem. Int.*, 28:109-112 (1995)
25. Naoi, M., T. Nagatsu. Inhibition of monoamine oxidase by 3,4-dihydroxyphenylserine. *J. Neurochem.*, 47:604-607 (1986)
26. Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM: Radioimmunoassay for cyclic nucleotidesI. Preparation of antibodies and idinated cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 247: 1106 (1972).
27. Shin, J.S., Kim, K.T., Lee, M.K. Inhibitory effects of bulbo-capnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, 1998: 244, 161-164.
28. Kim, H.S., Zhang, Y.H., Lee, M.K. Fang, L.H. Inhibitory effects of fangchinoline on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Med. Sci. Res.*, 1998: 26, 475-476.
29. Shin, J.S., Yun-Choi, H.S., Kim, E.I., Lee, M.K., Inhibitory effects of higenamine on dopamine content in PC12 cells. *Planta Med.*, 1999: 65, 452-455.
30. Shin, J.S., Kim, E.I., Kai, M., Lee, M.K., Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.*, 2000: 25, 363-368.
31. Lee, S.S., Yun-Choi, H.S., Kim, E.I., Lee, M.K., Inhibition of monoamine oxidase by higenamine. *Med. Sci. Res.*, 1999: 27, 71-72.
32. Lee, I.K., Yun, B.S., Oh, S.K., Kim, Y.H., Lee, M.K., Yoo, I.D., 5-Methylmellein

- and netriapyrone, two new monoamine oxidase inhibitors. *Med. Sci. Res.*, 1999: 27, 463-465.
33. Lee, S.S., Kai, M., Lee, M.K., Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain : Inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.*, 1999: 27, 749-751.
 34. Kim Y.M., Lee J.J., Yin S.Y, Kim Y., Lee C.K., Yoon Y.P., Kang M.H., Lee M.K., Inhibitory effects of tributyltin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, 322: 13-16 (2002)
 35. Lee J.J., Kim Y.M., Yin S.Y., Park H.D., Kang M.H., Hong J.T., Lee M.K., Aggravation of L-DOPA-induced neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1787-1795 (2003)
 36. Yin S.Y., Lee, J.J., Kim Y.M., Yang Y.J., Kang M.H., Kai M., Lee M.K., Enantiomer-selective inhibition of hydrastine on dopamine biosynthesis in PC12 cells, *Neuropharmacol.* (2004) in press.
 37. 안용준, 조광연. 살충제 개발을 위한 생물검정법 확립. 1. 각종유기용매가 곤충의 독성과 약해 및 화합물의 용해성에 미치는 영향. *한용곤*. 31(2): 182-189 (1992).
 38. 안용준, 김길하, 박노중, 조광연. 살충제 개발을 위한 생물검정법 확립. II. 처리방법 및 종간에 따른 살충제 감수성 차이. *한용곤*. 31(4): 452-460 (1992).
 39. 김길하, 문선주, 장영덕, 조광연. 신규살충제 flupyrazofos의 배추좀나방에 대한 작용 특성. *농과지*. 2: 117-125 (1998).
 40. 김길하, 이영수, 이인환, 안기수. 외래해충인 담배가루이의 살충제 감수성. *농과지*. 4: 51-58 (2000).
 41. 김창우, 김정화, 김길하. 국내 등록 사용중인 살충제에 대한 온실가루이의 감수성. *농과지*. 4: 751-81 (2000).
 42. Georghiou, G. P. The magnitude of the resistance problem. pesticide resistance: Strategies and tactics for management. National Academy Press. (1986).
 43. Georghiou, G. P. and C. E. Taylor. Pesticide resistance: strategiestactics for management. Factors influencing the evolution of resistance. National Academy Press (1986).
 44. Karnezis T., Mandemakers W., McQuualter J.L., Zheng B., Ho P.P., Jordan K.A., Murray B.M., Barres B., Tessier-Lavigne M., Bernard C.C.A., The neurite outgrowth inhibit Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination, *Nature Neuroscience*, 7(7), 736-744.

제4절 유전자분석(산림과학부)

1. Sambrook and Russel, 2001. Molecular Cloning - A Laboratory manual. 3rd Ed. CSHL Press.
2. Stratagene. Instruction Manual #200403-12. ZAP Express cDNA Synthesis Kit and ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit.
3. Mazen Tamer. 2002. Molecular regulation of plant monoterpene biosynthesis in relation to fragrance. Ph.D. Thesis. Wageningen University.
4. Joost Lucker, M Tamer, W Schwab, F Verstappen, L van der Plas, H Bouwmeester and H Verhoeven. 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthase. Eur. J. Biochem. 269:3160-3171.
5. Fernandez, P, N Paniago, S Lew, E Hopp and R Heinz. 2003. Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. BMC Genomics 4:40.

제5절 형질전환에 의한 천연물질 대량생산(전남대)

1. Arellano J, Vasquez F, Villegas T, Hernandez G (1996) Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone. Plant Cell Rep. 15:455-458
2. Bhadra R, Vani S, Shanks JV (1993) Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. Biotechnol. Bioeng. 41:581-592
3. Berlin J, Forche E, Wray V, Hammer J, Hosel W (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. Z. Naturforsch 38:346-352
4. Brillanceau MH, David C, Tempe J (1989) Genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 8:63-66
5. Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature 295:432-434
6. Chu CC, Wang CS, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin 18:659-668
7. Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high

- osmotic potential in grape(*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Rep. 9:143-146
8. Failla MC, Maimone F, De Paolis A, Costantino P, Cardarelli M (1990) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Nestle Research News 1986/87:92-103
 9. Gamberg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:148-151
 10. Giri A, Banerjee S, Ahuja PS, Giri CC (1997) Production of hairy root cultures in *Aconitum heterophyllum* wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant 33:280284
 11. Giri A, Narasu L (2000) Transgenic hairy roots :recent trends and applications. Biotech. Adv. 18:1-22
 12. Hamill JD, Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 5:111-114
 13. Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ (1987) New route to plant secondary products. Bio/Technology 5:800-804
 14. Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F (1999) *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill. FITOTERAPIA 70:451-471
 15. Hwang SJ, Pyo BS, Chae HJ, Hwang B (2002) Anthroquinone production in transformed roots of *Rheum undulatum* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10:88-92
 16. Knobloch KH, Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. Z. Naturforsch 35C:551-556
 17. Lloyd GB, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot top culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-437
 18. Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:321-329
 19. Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. (In Fiechter A eds.) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Berlin, Springer-Verlag pp.59-88
 20. Mukherjee SK, Sabapathi RB, Gupta N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena*

- L. Plant Cell Tissue Org Cult 25:13-16
21. Murashige T, Skoog F (1969) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
 22. Nguyen C, Bourgaud F, Forlot P, Guckert A (1992) Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Rep.* 11:424-427
 23. Nin S, Bennici A, Roselli G, Mariotti D, Schiff S, Magherini R (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. and production of secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* 16:725-730
 24. Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P (1998) Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea* : effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 17:405-409
 25. Sakato K, Misawa M (1974) Effects of chemical and physical conditions on growth of *Campotheca acuminata* cell cultures. *Agric. Biol. Chem.* 38:491-498
 26. van Gulik WM, Nuutila AM, Vinke KL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ (1986) Effects of carbon dioxide, air flow rate, and inoculation density on the batch growth of *Catharanthus roseus*. cell suspensions in stirred fermentors. *Biotechnol. Prog.* 10:335-339
 27. Wu S, Zu Y, Wu M (2003) High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. *J. Biotechnology* 106:33-43
 28. Zhong JJ, Seki J, Kinoshita S, Yoshida T (1992) Physiological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1256-1262
 29. Zhong JJ, Yoshida T (1995) High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production : Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1073-1079

제6절 세포배양에 의한 유용물질 대량생산(동시대)

1. Balandrin MJ, Klocke JA (1988) Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. (*In* Bajaj YPJ eds.) *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants*, vol. 4. Springer-Verlag, Berlin pp. 1-36
2. Berlin J, Forche E, Wray V, Hammer J, Hosel W (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z. Naturforsch* 38:346-352

3. Brain KR (1976) Accumulation of L-DOPA in cultures from *Macuna pruriens*. Plant Sci. Lett. 7:157-161
4. DiCosmo F, Facchini PJ, Kraml MM (1989) Cultured plant cells—the chemical factory within. Chemistry in Britain 25:1001-1004
5. DiCosmo F, Towers GHN (1984) Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In Phytochemical adaptations to stress (Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA eds.) Plenum press, NY pp. 97-175
6. Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape(*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Rep. 9:143-146
7. Dornenberg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures. Enzyme Microbe. Technol. 17:674-684
8. Endress R (1994) Plant cell biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp.121-242
9. Fontanel A, Tabata M (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Nestle Research News 1986/87:92-103
10. Fowler MW, Scragg A (1988) Natural products from higher plants and plant cell culture. (In Pais MSS, Mavituna F, Novais JM eds.) Plant cell biotechnology. NATO ASI Series, vol. 18. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165-177
11. Gamberg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:148-151
12. Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F (1999) *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill. FITOTERAPIA 70:451-471
13. Knobloch KH, Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. Z. Naturforsch 35C:551-556
14. Kvasnickova L, Glatz Z, Sterbova H, Kahle V, Slanina J, Musil P (2001) Application of capillary electrochromatography using macroporous polyacrylamide columns for the analysis of lignanas from seeds of *Schisandra chinensis*. J. Chromatography A 916:265-271
15. Lloyd GB, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot top culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-437

16. Matsubara K, Shigekazu K, Yoshioka T, Morimoto T, Fujita Y, Yamada Y (1989) High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. J. Chem. Tech. Biotech. 46:61-69
17. Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. In Fiechter A eds. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Berlin, Springer-Verlag pp.59-88
18. Mori T, Sakurai M, Furusaki S (1994) Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. J. Sci. Food Agric. 66:381-388
19. Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW (eds.)(1986) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge 222 pp.
20. Mukherjee SK, Sabapathi RB, Gupta N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell Tissue Org Cult 25:13-16
21. Murashige T, Skoog F (1969) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
23. Paska C, Innocenti G, Kunvari M, Laszlo M, Szilagyi (1999) Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. Phytochemistry 52:879-883
24. Petersen M, Alfermann AW (2001) The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. App. Microbiol. Biotechnol. 55:135-142
25. Phillipson JD (1990) Plants as source of valuable products. (In Charlwood BV, Rhodes MJC eds.) Secondary products from tissue culture. Oxford : Clarendon Press pp. 1-21
26. Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T (1993) Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. Phytochemicals 33:357-360
27. Sakato K, Misawa M (1974) Effects of chemical and physical conditions on growth of *Campotheca acuminata* cell cultures. Agric. Biol. Chem. 38:491-498
28. Sakurai M, Mori T (1996) Stimulation of anthocyanin synthesis by conditioned medium produced by strawberry suspension cultures. J Plant Physiol. 149:599-604
29. Scragg AH, Allan EJ, Leckie F (1988) Effects of shear on the viability of plant cell suspensions. Enzyme. Microbe. Technol. 10:361-367
30. Seidel V, Windhovel J, Eaton G, Alfermann AW, Arroo RRJ, Medarde M,

- Petersen M, Woolley JG (2002) Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta* 215:1031-1039
31. Sladkovsky R, Solich P, Opletal L (2001) Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* by HPLC. *J. Pharm. & Biochemical Analysis* 24:1049-1054
 32. Smollny T, Wichers H, Kalenberg S, Shahsavari A, Petersen M, Alfermann AW (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry* 48:975-979
 33. Stuart R, Street HE (1969) Studies on the growth in culture of plant cells. IV. The initiation of division in suspensions of stationary phase cells of *Acer pseudoplatanus* L. *J Exp Bot* 20:556-571
 34. Su WW, Lei F (1993) Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* cultures: Effects of inoculum size. *Biotechnol. Lett.* 15:1035-1038
 35. van Gulik WM, Nuutila AM, Vinke KL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ (1994) Effects of carbon dioxide, air flow rate, and inoculum density on the batch growth of *Catharanthus roseus* cell suspension in stirred ferments. *Biotechnol. Prog.* 10:335-339
 36. Wu S, Zu Y, Wu M (2003) High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. *J. Biotechnology* 106:33-43
 37. Zhong JJ, Seki J, Kinoshita S, Yoshida T (1992) Physiological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1256-1262
 38. Zhong JJ, Yoshida T (1995) High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production : Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1073-1079

제 6절 유효수종의 증식법개발(산림과학부)

< 액아 배양에 의한 증식 >

1. An EY, Han JS, Shin DW (1997) Grow inhibition of *Listeria monocytogenes* by pure compound isolated from extract of *Morus alba* Line bark (in Korean). *Korean JSci Technol* 29: 1236-1240
2. Baily LH, Baily EZ (1976) *Hortus third-A concise dictionary of plant cultivated in the United States and Canada*, McMillan Publishing Company, pp 620-1017

3. Bhuyan AK, Pattnaiks S, Chand PK (1997) Micropropagation of Curry Leaf Tree [*Murraya* (L.) Spreng.] by axillary proliferation using intact seedling. *Plant Cell Rep* 779-782
4. Dos S, Jha TB, Jha S (1996) In vitro propagation of cashewnut. *Plant Cell Rep* 615-619
5. Hikino H, Kiso Y, Taguchi H, Ikeya Y (1984) Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Medica* 50: 213-217
6. Hu CY, Wang PJ (1983) Meristem, shoot tip and bud cultures. In Evans DA, Sharp, Ammirato PV, Yamada Y, eds, *Handbook of plant cell culture, Vol I, Techniques for propagation and Breeding*. Macmillan Publish, New York, pp 177-227
7. Huang YS, He Y, Zhang JT (1990) Antioxidative effects of three compounds isolated from fruit of *Schisandrae chinense*. *J Pharmacology & Toxicology* 4: 275-277
8. Ikeya Y, Tanuchi H, Yosioka I, Iitaka Y, Kobayashi H (1979) The constituents of *Schizandra chinensis* Baill. I. Isolation of structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandrin. *Chem Pharm Bull* 27: 1383-1394
9. Ikeya Y, Sugama K, Tanaka M, Wakamatsu T, Ono H, Takeda S, Oyama T, Maruno M (1995) Structure of determination of biliary metabolites of schizandrin in rat and dog. *Chem Pharm Bull* 43: 121-129
10. Kaveriappa KM, Phillips LM, Trigiano RN (1997) Micropropagation of flowering dogwood *Cornus florida* from seedling. *Plant Cell Rep* 16: 485-489
11. Lloyd G, Mcgown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 421-427
12. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
13. Pattnaik SK, Chand PK (1997) Rapid clonal propagation of three mulberries *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhiu* Koiz. and *M. serrata* Roxb. through in vitro culture of shootbuds and nodal explants from mature trees. *Plant Cell Rep* 16: 503-508
14. Perinet P, Lalonde K (1983) In vitro propagation and nodulation of actinorhizal host plant, *Alnus glutinosa* (L.) Gaetn. *Plant Sci Lett* 29: 9-17
15. Pradhan C, Kar S, Pattnaik S, Chand PK (1998) Propagation of *Delbergia sisso* Roxb. through in vitro shoot proliferation from cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep* 18: 122-126
16. Ravishankar Rai V, Jagadishchandra KS (1987) Clonal propagation of *Cinnamomum Breyn* by tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 9: 81-88
17. Sha Valli Khan PS, Prakash E, Rao KR (1997) In vitro micropropagation of an endemic

- fruit tree *Syzygium alternifolium* (Wight) walp. *Plant Cell Rep* 16: 325-328
18. Sharma SK, Ramamurthy (2000) Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* tree. *Plant Cell Rep* 19: 511-518
 19. Song HJ, Bock JY, Baik SO, Kim YH (1989) Determination of lignan compounds in fruits *Schizandra chinensis* BAILLON by capillary-GC (FID). *J Korean Agric Chem Soc* 350-356
 20. Tang W, Eisenbrand (1992) *Schisandra chinensis* Baill. chap III. In chinese drugs of plant Pharmacology and Use in Traditional and modern Medicine.-Verlag. Berlin Heidelberg New York, Germany pp. 903-917
 21. Toda S, Kimura M, Ohnishi M, Nakashima K, Ikeya Y, Taguchi H, Mitsuhashi (1988) antioxidant. IV. Antioxidative compounds isolated from *Schizandra* fruit. *JapAgric Chem Soc* 25: 35-43

<체세포배양>

1. 김영철. 1996. 한약자원식물학. 학문출판. 32-33.
2. 김태정. 1996. 한국의 자원식물 I. 서울대학교 출판부. 297-298.
3. 김용욱, 이석구, 이봉춘, 장석성. 1992. 상수리나무(*Quercus acutissima*) 성숙배로부터 체세포배 발생과 식물체 재분화. *한국식물조직배양학회지* 19(6) : 363-368.
4. 김영욱, 윤 양, 노의래. 1995. 굴참나무 미숙배로부터 체세포배유도 및 발아. *임목육종연구소 연구보고* 31 : 147-152.
5. 김동임, 남주형, 권태완. 1973. 오미자의 일반성분, 유기산 및 Anthocyanin 색소에 관하여. *한국식품과학회지* 5(3) : 178-182.
6. 김영욱, 이석구, 이봉춘, 이재순, 장석성. 1992. 무궁화의 성숙배에서 체세포배 발생과 식물체 재분화. *한국육종학회지* 24(1) : 28-34.
7. 김준철, 박영찬, 이광웅, 조성호, 한태진. 1996. 참나물의 경단절편체로부터 다량의 이차체세포배 발생과 식물체 재분화. *한국식물조직배양학회지* 23(3) : 189-194.
8. 김재기, 김병원, 노광수. 1996. 구기자나무 체세포배 인공종자 생산과 발아. *한국육종학회지* 28(3) : 255-261.
9. 고갑천, 안창순. 1997. 미나리의 체세포 배 생산 연구. *한국식물조직배양학회지* 24(2) : 107-112.
10. 고정균, 박영철, 양두영, 김웅식, 오문유, 고석찬. 1997. 한라산 자생 왕벚나무 접합자배 유래의 캘러스로부터 체세포배 형성과 식물체 재분화. *한국식물조*

직배양학회지 24(6) : 345-349.

11. 고석찬, 김문자, 문병용, 박종범, 박홍덕, 소용영, 오병운, 이규배, 이점숙, 전방욱, 정병갑, 조덕이, 허권, 홍성식, 홍정희. 2001. 식물발생학. 아카데미서적. 262pp.
12. 권순태, 조문수. 1998. 야생식물 *Sicyos angulatus* L.로부터 켈러스 유도 및 체세포배 발생. 한국식물조직배양학회지 25(2) : 119-123.
13. 강병수, 고운채, 김선운, 노승현, 서영배, 안호애, 신민교, 안덕균, 이상인, 이영중, 이채운, 주영승. 1994. 본초학. 영림사. 622pp.
14. 문홍규, 윤 양. 1996. 찰피나무 미숙배를 이용한 체세포배 유도 및 식물체 재분화. 임목육종연구소 연구보고 32 : 64-71.
15. 문홍규, 한무석, 이석구. 1994. 멧대추의 체세포배 발생에 의한 식물체 재분화. 한국육종학회지 26(3) : 265-270.
16. 문홍규, 윤 양, 이숙구. 1994. 참나물(*Pimpinella brachycarpa*)의 체세포배 발생에 의한 식물체 대량증식. 한국식물조직배양학회지 21(2) : 85-90.
17. 문홍규, 오경은, 손성호. 1999. 두릅(*Aralia elata*)의 체세포배 유도, 발아 및 식물체 재분화에 미치는 요인. 한국식물조직배양학회지 26(4) : 275-280.
18. 문홍규, 김찬수. 1996. 멀구슬나무의 미숙배를 이용한 체세포배 유도 및 발아. 임목육종연구소 연구보고 32 : 58-63.
19. 빈철구, 구대회, 김영진, 고재영. 1996. 백합의 체세포배발생을 통한 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 23(4) : 249-252.
20. 박학봉, 최은경, 박병모. 1993. 새머루(*Vitis flexuosa* Thunberg)의 미숙배주로부터 체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 20(3) : 109-112.
21. 박학봉, 최은경. 1992. 매실나무(*Prunus mume* Sieb et Zucc)의 미숙배로부터 체세포배 발생과 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 19(5) : 261-266.
22. 박춘근. 1997. 오미자 수집종의 년차간 생육 및 성분특성. 전북대학교 대학원 석사학위논문. 23-24.
23. 신동원, 김남일, 여인석. 1999. 한눈으로 읽는 동의보감. 903pp.
24. 임록재. 1999. 조선약용식물지Ⅲ. 한국문화사. 62-63.
25. 양정식. 1996. 약용식물의 이용과 신재배기술. 선진문화사. 297-304.
26. 이강섭, 소용영. 1993. 땅두릅(*Aralia cordata* Thunb.)의 체세포배 발생 및 이상형배의 구조. 한국식물조직배양학회지 20(2) : 77-83.

27. 이지원, 이병일. 1993. 체세포배발생을 통한 미나리의 대량증식체계 개발 - 체세포배의 유기조건과 발생의 형태적 특성-. 한국원예학회지 34(2) : 108-114.
28. 이상호. 1997. 오미자 추출물의 항균활성 및 작용 메카니즘. 중앙대학교 대학원 박사학위논문. 109-111.
29. 이정숙, 이미경, 이성우. 1989. 오미자의 부위별 일반성분과 무기질함량에 관한 연구. 한국식문화학회지 4(2) : 173-176.
30. 이주연, 민용규, 김희연. 2001. 오미자로부터 항균활성 물질의 분리 및 항균효과. 한국식품과학회지 33(3) : 389-394.
31. 이선화, 1996. 체세포배 발생에 의한 *Asparagus(Asparagus officinalis L.)*의 대량증식. 전남대학교 대학원 박사학위논문. 4-54.
32. 이갑연. 1999. 제주특산 흑오미자 재배법 및 대량증식기술과 특수성분 및 천연염료 개발. 현장애로기술개발사업연구성과보고서. 60-62.
33. 유수열. 1988. 약용작물 재배의 실제. 오성출판사. 235-244.
34. 양정식. 1996. 약용식물의 이용과 신재배기술. 선진출판사. 298-299.
35. 지원대, 정민선, 정현채, 최용규, 정원환, 권대준, 김성영, 정영건. 2001. 오미자 물추출물의 세균증식 억제효과. 한국식품위생·안전성학회 16(2) : 89-95.
36. 정재동, 김규원, 김호일, 박효근, 백기엽, 서상기, 손재근, 유장렬, 은종선, 이기명, 이기운, 이용현, 이철희, 정근식, 지선옥, 최규섭, 허태린. 1999. 최신생물공학(식물편 I). 경북대학교 출판부. 176pp.
37. 정원중, 민성란, 송남희, 유장렬. 1994. 벼의 수화질 인공종자 생산. 한국식물조직배양학회지 21(3) : 183-186.
38. 장한호. 1996. 체세포배 유기에 의한 두릅 종묘의 대량증식에 관한 연구. 강원대학교 대학원 박사학위논문. 8pp.
39. 조재명. 1992. 한국수목도감. 산림청 임업연구원. 147-148.
40. 최인식, 김홍은. 1999. 알기쉬운 약초재배. 중부출판사. 29-39.
41. 최필선, 소용영, 조덕이, 유장렬. 1994. 멜론(*Cucumis melo L.*) 유묘 절편으로부터 고빈도의 체세포배발생과 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 21(1) : 1-6.
42. 최필선, 소용영, 조덕이, 유장렬. 1994. 한국 품종 대두(*Glycine max L.*) 미숙 배로부터 체세포배발생과 배지의 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid 농도가 체세포배의 형태에 미치는 영향. 한국식물조직배양학회지 21(1) : 7-13.

43. 최은경, 박학봉, 김광수, 이용기. 1995. 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)의 미숙배로부터 체세포배발생에 의한 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 22(2) : 77-81.
44. Arnold, S. V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69 : 233-249.
45. Aberlenc-bertossi, F., M. Noirot and Y. Duval. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56 : 53-57.
46. Ammirato, P. V. 1974. The effect of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway(*Carum carvi* L.) *Bot Gaz* 135 : 328-337.
47. Arrillage, I., J. J. Tobolski and S. A. Merkle. 1994. Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust(*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Reports* 13 : 171-175.
48. Bespalhok F., J. C. and K. Hattori. 1998. Friable embryogenic callus and Somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold(*Tagetes erecta* L.). *Plant Cell Reports* 17 : 870-875.
49. Bhansali, R. Raj, J. A. Driver and D. J. Durzan. 1990. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. *Plant Cell Reports* 9 : 280-284.
50. Bommineni, V. R., R. N. Chibbar, R. S. S. Datla and E. W. T. Tsang. 1993. Transformation of white spruce(*Picea glauca*) somatic embryos by microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 13 : 17-23.
51. Choi, Y. E., D. C. Yang and E. S. Yoon. 1999. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58 : 93-97.
52. Canhoto, J. M., M. L. Lopes and G. S. Cruz. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle(*Myrtaceae*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57 : 13-21.
53. Dal Vesco, L. L. and M. P. Guerra. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ*

- Culture 64 : 19-25.
54. Dandekar, A. M., G. H. McGranahan, C. A. Leslie and S. L. Uratsu. 1989. *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos as a method for the production of transgenic plants. *Journal of Tissue Culture Methods* 12(4) : 145-150.
 55. Elkonin, L. A. and N. V. Pakhomova. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61 : 115-123.
 56. Gall, O. Le, L. Torregrosa, Y. Danglot, T. Candresse and A. Bouquet. 1994. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus(GCMV). *Plant Science* 102 : 161-170.
 57. Hamama, L., M. Baaziz and R. Letouze. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65 : 109-113.
 58. Hanna, W. W., C. Lu and I. K. Vasil. 1984. Uniformity of plants regeneration from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq(Guinea grass). *Theor. Appl. Genet.* 67: 155-159.
 59. Jain, S. M., P. K. Gupta and R. J. Newton. 1999. Somatic embryogenesis in woody plants. *Kluwer Academic Publishers.* 4 : 387-401.
 60. Kim, Y. W., Y. Youn, E. R. Noh and J. C. Kim. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports* 16 : 869-873.
 61. Kintzios, S., C. Manos and O. Makri. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose(*Rosa* sp.). *Plant Cell Reports* 18 : 467-472.
 62. Kageyama, C., T. Komatsuda and K. Nakajima. 1990. Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tissue Culture Letters* 7: 108-110.
 63. Khalil, S. M., K. T. Cheah, E. A. Perez and D. A. Gaskill. 2002. Regeneration of banana(*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 20 : 1128-1134.

64. Kunitake, H., H. Imamizo and M. Mii. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). *Plant Science* 90 : 187-194.
65. Mary, R. J. and N. Jayabalan. 1997. Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in sesame. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49 : 67-70.
66. Merkle, S. A. and H. E. Sommer. 1986. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Can. J. For. Res.* 16 : 420-422.
67. Merkle, S. A. and A. T. Wiecko. 1990. Somatic embryogenesis in three magnolia species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(5) : 858-860.
68. Merkle, S. A. and B. A. Watson-Pauley. 1993. Regeneration of bigleaf magnolia by somatic embryogenesis. *HortScience* 28(6) : 672-673.
69. Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. *In* T. Thorpe, ed, *Frontiers of Plant Tissue Culture*, The International Association for Plant Tissue Culture 1978, Calgary, Canada. 22pp.
70. Motoike, S. Y., R. M. Skirvin, M. A. Norton and A. G. Otterbacher. 2001. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66 : 121-131.
71. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
72. Navarro, L., J. M. Ortiz and J. Juarez. 1985. Abberant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. *HorScience* 20 : 214-215.
73. Nagmani, R., M. R. Becwar and S. R. Wann. 1987. Single-cell origin and development of somatic embryos in *Picea abies*(L.) Karst.(Norway spruce) and *P. glauca*(Moench) Voss(white spruce). *Plant Cell Reports* 6 : 157-159.
74. Raemakers, C. J. J. M., E. Jacobsen and R. C. F. Visser. 1955. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81 : 93-107.

75. Sharma, A. and A. Kumar. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf-derived cell suspension of a mature tree *Thevetia peruviana* L. Plant Cell Reports 14 : 171-174.
76. Sotak, R. J., H. E. Sommer and S. A. Merkle. 1991. Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. Plant Cell Reports 10 : 175-178.
77. Steward, F. C. 1958. Interpretations of the growth from free cells to carrot plants. Amer. J. Bot. 45 : 709-713.
78. Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells.II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45 : 705-708.
79. Thorpe, T. A. 2000. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. Korean J. Plant Tissue Culture 27(4) : 245-258.
80. Xing, Z., W. A. Powell and C. A. Maynard. 1999. Development and germination of American chestnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57 : 47-55.
81. Yates, I. E. and C. C. Reilly. 1990. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan. HortScience 25(5) : 573-576.
82. Yusuf, A., R. K. Tyagi and S. K. Malik. 2001. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65 : 255-258.

제8절 염색성 시험(산림과학부)

- 1) 남성우, 천연 염색의 이론과 실제(1), 보성문화사 (2000)
- 2) 강인숙외, 염색의 이해, 교문사 (2001)
- 3) 이연순외, 염색의 이론과 실제, 미진사 (1997)
- 4) 이유진, 이연숙, 염색 보조제가 한지의 천연염색에 미치는 영향, 농학사 학위논문 (2002)
- 5) 과기술처, 전통 천연염료 염색방법 현대화, 1차년도 결과보고서 (1995)
- 6) 과기술처, 전통 천연염료 염색방법 현대화, 2차년도 최종결과보고서 (1996)
- 7) 양규복, 천연염색방법에 관한 연구, 원광대학교 (1993)

부 록 1. 실크의 염색성

	Al	Ca	Fe
leaf			
bark			
root			
flower			

A. *Magnolia kobus* Dc.

	Al	Ca	Fe
leaf			
bark			
root			
flower			

B. *Magnolia denudata* Desr.

	Al	Ca	Fe
leaf			
bark			
root			
flower			

C. *Magnolia obovata* Thunb.

	Al	Ca	Fe
leaf			
bark			
root			
flower			

D. *Liriodendron tulipifera* L.

그림 1. 목련과 수종과 부위별 염재에 따른 실크염색 결과.

부록 2. 옷감염색의 시제품



상의 : 실크, 일본목련수피
황산철
하의 : 실크, 목련꽃잎
황산철

패치 : 명주, 톨립나무잎
황산철
상의 바탕 및 하의 : 명주,
일본목련 꽃잎, 황산철

상의바탕 : 광목, 톨립나무잎
황산철(무전처리)
상의 패치 및 하의 : 광목,
톨립나무 잎, 황산철(오배자)





































그림 2 . 시제품(한복)



그림 3. 시제품 - 스카프(좌), 손수건(우)

부록 3. 종이의 염색결과 염재: 목련잎

목련잎

Mordant (매염제)	Aging time	Auxiliary dyeing agent(염색보조제)							
		None		Skim milk(탈지분유)		Soybean(콩즙)		Chitosan(키토산)	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								

백목련꽃잎

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								



























































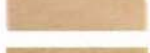
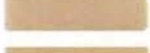
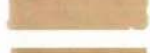

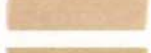
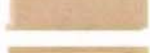









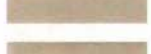
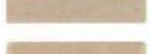

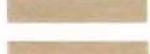

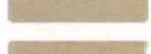
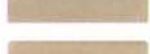







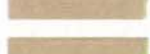








자목련 꽃잎

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								

목련 수피

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								

백목련 수피

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								

일본목련 수피

Mordant	Aging time	Auxiliary dyeing agent							
		None		Skim milk		Soybean		Chitosan	
		Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis	Hwaseonjis	Sunjis
None	Control								
	48h								
	72h								
Al	Control								
	48h								
	72h								
Cu	Control								
	48h								
	72h								
Fe	Control								
	48h								
	72h								