

황철의 안정적 생산기술개발 및 황철나무 기원의  
생리활성물질 탐색

주관기관 : 전남대학교  
협동기관 : 강원대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “황칠의 안정적 생산기술개발 및 황칠나무 기원의 생리활성물질 탐색” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 7일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 황 백

세부연구책임자 : 오 광 인

연 구 원 : 김 옥 태

연 구 원 : 홍 민 희

연 구 원 : 김 중 영

연 구 원 : 김 유 정

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 현 용

연 구 원 : 이 현 수

# 요 약 문

## I. 제 목

황칠의 안정적 생산기술 개발 및 황칠나무 기원의 생리활성물질 탐색

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 전통도료인 황칠을 분비하는 황칠나무는 남해안의 일부 지역에만 자생하는 난대성 수목으로 1992년 정병석 등에 의해 전통도료의 복원에 관한 보고 후 재배 및 증식에 관한 연구와 칠액성분 및 황칠나무의 생리활성에 대한 연구 등 단편적인 연구가 있어왔으나 이의 보다 체계적인 연구가 절실했으며, 황칠의 효율적인 복원을 위해 필요한 체계적이고 과학적 실험으로 자원수목으로서의 가치를 재고함으로써 남도지역과 지역 농업인의 소득증대에 기여하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

황칠 수액의 분비량 기준 우수개체의 선발과 도료 성분의 정성/정량적 기준 마련하고자 하였으며, 선발개체의 효율적 증식을 통한 우수개체의 빠른 증식법 개발을 위해 조직배양법과 삽목법을 병행하였고 황칠나무 잎, 줄기 및 배양세포에서의 생리활성물질의 탐색에 대한 연구를 수행하였다. 연구과정에서 일부내용의 추가/보완 등으로 황칠수액 분비 우수주를 구분할 수 있는 AFLP marker 개발하고자 하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 황칠 수액 우수개체를 완도, 보길도, 해남 일원에서 발굴하여 매년 채종 및 관리를 병행하고 있으며, 이의 효율적인 증식수단인 조직배양개체와 녹지 삽목 번식체를 전남대학교에 유지·관리하고 있다. 또한 황칠 잎의 생리활성 물질을 기초로 기능성 제재의 개발을 수행중에 있다.

## Summary

The object of this research was produce the Hwangchil lacquer efficiently and enhance the utilization of *Dendropanax morbifera* Lev. in order to augment a income of territorial peasants. To attain above objects, we have been work a series of research, including 1. selection of specific individuals for high yield and survey of the habitat, 2. identification of essential oils and examination on quantitative/qualitative of major compounds and on time-course variation for 1 year, 3. development of efficient multiplication method with superior individuals *in vitro*, 4. development of AFLP marker for screening of a lot of trees, 5. development of propagation method by green-branch cuttage, 6. identification of golden/yellow pigments in Hwangchil lacquer, 7. screening and purification/identification of physiological active compounds in suspended cells and leafs of *Dendropanax morbifera* Lev., 8. development of functional matter based on physiological activity.

From these research, there was some results following, 1. 4 superior individuals for secretion of Hwangchil lacquer was selected among 500 trees that grow naturally in the southern coast district, 2. essential oils was indentified from selected trees and those was consisted of  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -cubebene,  $\alpha$ -copane,  $\alpha$ -selinene,  $\beta$ -elemene, germacrene D,  $\delta$ -cadinene,  $\gamma$ -cadinene, 3. the exudated yield of Hwangchil lacquer was best during July-August and a lot of differences on individual trees/compound patterns was represented in time-course examination, 4. multiplication method using axillary bud propagation *in vitro* and green branch cuttage was developed, 5. we have been conducting the final purification and identification of yellow/golden pigments chemically, but it was unknown pigments up to date, 6. some biological activity about anti-cancer and enhancing immunity from leaf extract were confirmed, based on these, we are planning to develop functional matter using leafs of *Dendropanax morbifera* Lev.

# CONTENTS

Chapter 1 Introduction	-----1
Chapter 2 The present situation about these research in domestic and abroad	-4
Chapter 3 Contents and results	-----5
Paragraph 1 Selection of superior individuals for high yield, seed harvesting and management	-----5
Paragraph 2 Identification of essential oils and quantitative/qualitative pattern of major components with superior individuals	-----10
Paragraph 3 Time-course variation in major sesquiterpene compounds during 1 year with superior individuals	-----14
Paragraph 4 Identification of yellow pigments in Hwangchil lacquer	-----19
Paragraph 5 <i>In vitro</i> culture and cell culture	-----26
Paragraph 6 Green branch cuttage with superior individuals	-----31
Paragraph 7 AFLP marker development	-----49
Paragraph 8 Screening of biological active compounds and manufacturing of leaf extracts	-----52
Chapter 4 An attainment and contributions	-----83
Chapter 5 A plan for practical use	-----85
Chapter 6 An information obtained from abroad about these research	-----86
Chapter 7 References	-----87

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 -----	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	4
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 -----	5
제 1 절 칠액 생산 우수개체의 선발, 채종 및 관리 -----	5
제 2 절 황칠 수액 중 정유성분의 동정 및 선발개체의 정유성분의 정량적 패턴조사 -----	10
제 3 절 황칠나무 선발개체의 황칠 수액 분비량 및 주요 sesquiterpene의 년 중 경시변화 -----	14
제 4 절 황칠 수액 중 색소의 동정에 관한 연구 -----	19
제 5 절 황칠 우수개체의 기내변식 및 세포배양 -----	26
제 6 절 황칠수액 우수 분비-선발주의 녹지 삼목에 관한 연구 -----	31
제 7 절 황칠나무 우수개체 선발 AFLP marker 개발 -----	49
제 8 절 황칠나무 생리활성물질 탐색 및 잎 추출 엑스제조 -----	52
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	83
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 -----	85
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보 -----	86
제 7 장 참고문헌 -----	87

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

황칠나무(*Dendropanox morbifera* LEV.)는 두릅나무에 속하는 상록 활엽교목으로 우리나라의 제주도와 완도, 보길도, 해남 등 남·서해안 일대에 자생하고 있는 우리나라 특산 수종이다. 겨울에도 낙엽이 지지 않는 수종으로 수피(樹皮)에 상처를 주면 황색의 진(津)이 나오는 데 이것을 황칠(黃漆)이라 하며 전통적으로 가구 및 다양한 분야에 이용되었다. 황칠은 목공예 표면도장용 칠의 하나로서 옷칠은 검은색 도료인데 비해 황칠은 황색이다. 또한 황칠은 금빛을 띠고 있으면서 투명하여 바탕의 나뭇결을 생생하게 보여주는 특징이 있다. 우리나라 목칠공예의 아름다움은 울긋불긋한 채색이 아니라 나무결의 효과를 살리는 것을 중요하게 여겼으며 황칠은 이러한 효과를 내기에 적절한 도료였다. 이처럼 목칠공예에 중요한 황칠의 공급원인 황칠나무는 옷나무와는 달리 열대수목인 난지산으로 내한성이 매우 약하여 그 생육한계가 해발 600m 이하인 연평균 최저기온이  $-2^{\circ}\text{C}$  이상이며, 평균기온  $12\sim 15^{\circ}\text{C}$ 로 약산성 토양과 습기가 많은 지역에서 자생하고 있다.

황칠은 백제시대부터 최고급 전통도료로 이용되어 왔으며, 일본, 중국 등 왕실 가구나 건축자재 도료로 수출되어 왔던 수출 품목이었으며, 금속, 나무, 종이, 옷감, 상아 등 다양한 분야의 황금색 색상 도료로 사용되어 왔다. 또한 안식향이라는 진정 및 안정작용의 생리활성효과를 보이는 독특한 향기를 가지고 있으며, 도색 후 향기가 2년 이상 지속되는 경우도 있고, 자외선 및 전자기파를 흡수하는 효과도 있는 것으로 알려졌다. 이러한 황칠의 사용은 조선시대까지 이어져 왔으나 조선말기 이래 황칠 채취량의 부족 및 채취 수목자원의 고갈 그리고 정제 기술의 쇠퇴 등으로 인해 사실상 그 명맥이 끊어진 상태였다.

한편, 최근의 일부 지자체(1996, 전라남도) 및 연구소(1997, 생명공학연구소)의 연구를 통하여 황칠나무를 재료로 황칠의 생산 및 이용성에 대한 연구를 수행한 바 있으며, 그 결과로 황칠의 우수성과 도료로서의 제품화에 대한 가능성 및 황칠나무 성분 중 생리활성물질로서의 가능성을 확인한 바 있다. 또 그러한 연구를 통하여 제안된 과제는 무엇보다도 황칠나무의 안정적 재배와 채취량이 많은 우수 품종의 개발이 요구되며, 이를 통한 안정적이고 지속적인 공급이 상품화되는 과정에서 가장 중요한 과제가 된다고 제시하고 있다.

따라서 황칠의 안정적인 공급이 황칠의 전통도료로서의 복원과 상품화에 가장 중요한 관건이라고 판단하고, 이에 따른 본 연구과제의 필요성은 다음과 같다.

#### 기술적 측면

- 임목 육종은 주로 어떤 특수물질의 증진을 위한 목적보다는 보다 생장이 빠르고 통직한 형질 즉 목재로서의 가치가 높은 쪽으로 육종되어져 왔다. 그러나 최근에 목재뿐만 아니라 나무가 갖는 특수한 목적, 즉 약용, 천연도료 등에 사회적, 경제적 요구와 관심이 증대됨에 따라 임목으로부터 특수한 물질생산을 위한 육종이 시도되고 있다
- 임목에 대한 연구내용은 유전자원 보존개발, 유전자원 수집 및 노거수 list 작성, 간접선발을 위한 형질특성 구명, 대량생산을 위한 증식 특성 구명, 우량개체 선발 등으로 요약되나 황칠나무에 대한 연구는 1996년 전라남도 연구용역의 결과를 시작으로 몇 가지 연구가 있었으나, 기존 황칠의 성분 분석과 대량생산을 위한 체계화에 대한 연구는 미미한 실정이다.
- 화학적 주요 구성성분, 식물부위별 성분 분포 및 칠 성분 외 생리활성성분의 체계적인 연구 미비로 본 연구를 통하여 성숙한 황칠나무 외에 세포배양 및 어린 식물 유래의 2차대사산물에 대하여 활성성분을 분리하고 각종 기기분석을 통하여 활성성분의 화학구조를 밝히고 더 나아가 분리된 활성 유효성분을 의약품으로 개발할 가능성을 타진할 필요가 있다.
- 황칠의 구체적 성분분포 및 년 중 변화 및 개체간 차이 등에 대한 정량적 검토가 없었다.
- 황칠나무 우수주의 번식을 목적으로 조직배양이 시도되기는 하였으나, 탈분화에 이은 재분화가 되지 않았고 경정배양에서의 재분화율이 높지 않아, 그에 따른 보다 정밀한 재조사가 요구된다.
- 황칠나무의 종자 번식에 이은 칠의 채취까지는 10년 이상의 장기간이 소요되어 집중적인 재배품목으로서 장려하기가 어렵기 때문에, 생리활성물질의 공급원으로서의 역할도 구명되어 자원으로서의 가치를 재고시킬 필요가 있다.

#### 경제·산업적 측면



- 황칠나무 수액의 도료적 가치는 현대의 어떠한 인공도료로도 흉내낼 수 없는 특성을 가지고 있는데다가 최근 국민의 생활수준 향상과 더불어 고급 공예품의 선호도가 높아지고 부가가치가 높은 상품으로서의 개발 가능성이 크다.
- 자원의 활용이 상대적으로 미약했던 제주도와 서남해안 지역에서 주로 서식하는 특성을 고려할 때 이 지역 기존의 천연 특산물인 황칠나무의 용도를 다양화, 극대화할 수 있는 방법이 있다면 궁극적으로 지역과 국가 경제에 이바지할 수 있는 일이라고 할 수 있을 것이다.

#### 사회·문화적 측면

- 한국에서 자생하는 식물 중에는 그 특수성을 비롯한 품질의 우수성이 매우 뛰어난 것은 물론 세계적인 희귀성과 함께 개발 가능성이 높은 식물들이 많으며 이들을 이용 가능한 유용 자원식물을 검색하고 그의 용도 개발을 위하여 그 식물이 갖는 다양한 가치(도료, 약용, 각종 기초식품 등)를 규명·개발하는 것은 자원의 합리적인 관리 및 이용이라는 측면에서 매우 중요한 일이며 이러한 관점에서 우리나라 특산식물로서 황칠나무의 유전자원을 보존하고 적절히 이용한다는 것은 가치 있는 일이라 할 수 있다.
- 우리나라의 전통적 감각에 어울리고 오랫동안 사용해 온 도료로서 체계적인 화학적 조성규명에 의한 특성연구의 결과로 도막의 품질이 개선된다면 전통문화의 재현과 창달에 기여하여 문화적으로 우수한 문화유산을 발전시켜 우리나라 고유의 도료 제조 기술을 갖추게 될 것이다.
- 최근 각국의 전통문화에 대한 중요성과 옛 문화를 되살리려는 복고조가 세계적인 사조로 다시금 조명되고 있어, 자연스러움에 바탕을 두고 있는 고유한 전통자원인 황칠도료가 옷칠과 더불어 한국의 미와 색조가 주목될 수 있을 것으로 보인다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### - 국내기술 현황

황칠나무의 재배 및 증식에 관한 국내의 연구가 아직 다른 농산품목인 작물에 비하여 현저하게 부족하며, 이는 황칠나무가 우리나라 남부 도서 해안지역에서만 생장이 가능한 난대성수목으로 자생지가 특정지역으로 한정되어 있기 때문에 재배에 관한 연구가 대규모적으로 이루어지기 어려웠을 것으로 보인다.

다만 자생지 근교의 일부 농사 시험연구기관(완도난지시험장)에서 재배 및 번식에 관한 시험이 일부 시행되어 왔으며, 최근에 정병석 등(1992)에 의한 “전통도료 황칠재현을 위한 황칠나무의 특성 및 이용에 관한 연구”에서 황칠나무 자생지 분포, 자생지의 환경, 황칠나무 줄기의 해부학적 구조, 황칠나무의 번식방법 등 황칠의 특징 등을 연구한 바 있다. 또한 산림청 임업연구원 남부임업시험장에서 1990년부터 황칠나무의 자생지를 중심으로 유전자원을 수집하여 산칠량이 많이 생산되는 개체를 선발하려는 연구가 있었다. 1996년에는 전라남도 용역사업으로 황칠나무에 관한 연구가 있었으며, 재배, 증식, 생리활성물질의 검색을 비롯한 도료로서의 응용성 등을 연구조사 한 바 있다.

### - 국외 기술현황

황칠나무의 주요 분포국가로 일본과 중국을 들 수 있으며, 먼저 일본의 경우 황칠에 대한 최초의 과학적인 연구는 1937년 야스다(安田)에 의한 “황칠의 성분 및 함유된 정유에 관해서”라는 보고가 나온 이래 황칠나무에 관한 연구를 수행하였으나 일본에서 식하는 황칠나무에서는 황칠의 분비가 거의 이루어지지 않았다. 현재 일본에서는 황칠과 비슷한 *Dendropanax* 속인 *trifidus*(금칠이라고도 함)가 재배되고 있으나 주로 조경수로 이용하고 있으며, 생리활성 물질의 탐색에 대한 연구는 지속적으로 수행되고 있으나 칠액의 생산을 위해서 황칠나무가 재배 및 연구된 경우는 거의 보고 되지 않았다.

예로부터 중국에서는 우리나라로부터 조공(朝貢)을 받아 황실을 중심으로 사용해 왔으며 일본 등지에서는 황칠보다는 옷칠 및 금칠 등을 이용한 고급 공예품에 관한 기술개발 및 전수가 이어져왔으나 우리나라 남부지방의 고유산물인 황칠도료의 기술개발은 전무한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 칠액생산 우수개체 선발, 채종 및 관리

#### 1. 서론

황칠나무 우수개체의 선발과 효율적인 대량 증식방법을 최종목표로 정하고 황칠수액 분비가 우수한 개체를 탐색하고 선발된 일부 개체를 기준으로 종자를 채종하고 시험관내 발아 증식과 필드 파종 방법을 병행하여 관리하고자 하였다.

#### 2. 연구내용 및 방법

본 시험의 공시재료로는 제주도, 보길도, 완도, 해남에 자생하는 약 500주의 황칠나무를 대상으로 하였다. 황칠나무에 1 cm의 조각칼로 약 10 cm 길이로 수피를 제거한 다음 일주일 후에 황칠 수액을 채취하였다. 채취시기는 2000~2001년 8~9월의 기간에 한정하였으며, 채집지 및 개체별로 채취한 황칠수액을 각각 정량하였다.

선발 개체군(보길도4, 해남1)과 대조군(보길도2, 해남2) 개체로부터 종자를 11월-1월에 걸쳐 채집하였으며, 채집한 종자는 4°C blood bank에 보관하였다. 종자는 냉장고에서 약 4주 보관한 이 후 멸균과정을 걸친 다음 종자의 외피를 벗기거나, embryo를 적출하여 발아배지(MS+1% sucrose, gelite 0.25%)와 발아배지에 giberrellin, IBA, IAA 등을 농도별(0.2 mg/L - 1 mg/L)로 처리한 배지에 치상하여 유식물을 유도하였으며, 유도된 유식물은 전남대학교 식물생리실험실 내 배양실(25°C, 16/8h light period)에서 유지·배양하였다.

#### 3. 결과 및 고찰

황칠수액의 분비량에 있어 개체 및 서식지별 차이가 있는지를 검토하고, 차이가 있다면 이를 토대로 서식환경 및 우수 개체선발을 위한 기초자료를 수집하고자 하였다. 황칠나무의 주요 서식처에 관하여 조사하였던 Kim (1998)의 보고를 참고하여, 제주도 돈네코계곡, 수악계곡, 기도원일대와 완도 점찰산, 보길도 부용리, 월송리 및 해남 두륜산 일대(Fig. 1)에 자생하는 개체의 집단 서식장소를 탐사하고 흉고 직경이 15 cm 이상되는 개체를 대상으로 수액 분비량을 조사하였다 (Fig. 2).

20년 이상 수령의 집단 서식지는 이상의 채집장소 모든 곳에서 발견할 수가 있었으나, 서식밀도는 제주도가 가장 높게 나타났다. 조사한 약 500개체 중에는 흉고 직경과 수령에 따른 수액 분비량에서 차이도 있었으나 (결과 미제시), 일정 직경 이상의 개체를 기준으로 상처에 의한 자연 분비액만을 고려할 때 수액이 거의 분비되지 않는 개체가 일반적이거나 일부 개체는 5g 이상 분비되는 개체까지 개체목간의 차이가 현저한 것으로 나타났다 (표 1). 한편, Table 1의 내용을 보길도, 제주도 및 완도·해남의 서식지별로 구분하여 분비량과의 관계를 조사한 결과, Table 2에서 보는 것처럼 채칠량은 완도·해남>보길도≥제주도의 순이었다. 이러한 결과는 Kim (1998)의 보고와 비교해 볼 때 연령, 서식지별 분비정도의 차이는 물론 개체목간에 변이 존재에 대한 보고와는 일치하였으나, 제주도 서식 개체군에서의 분비량이 보다 우수했다는 결과와는 차이를 보였다.

한편, 이러한 개체별 조사를 통한 칠액분비 개체는 종자를 채종하여 냉장보관 또는 종자의 일부는 시험관내에서 발아시켜 유식물로서 또는 포장에서 실생번식 유지하였다.

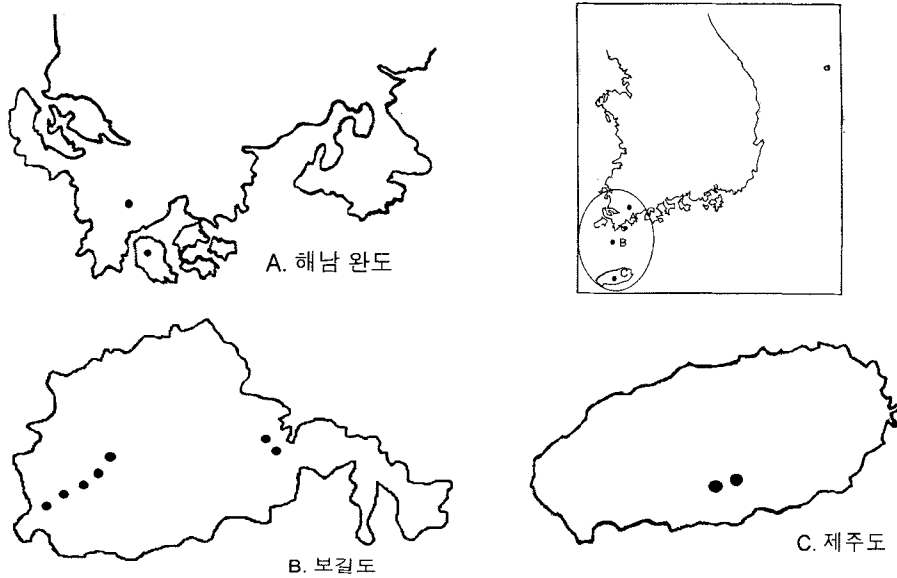


Fig 1. Collection areas of *Dendropanax morbifera* lacquer



Fig. 2. Wounding and secretion for *Dendropanax morbifera* lacquer



Fig. 3. Seeds of *Dendropanax morbifera* lacquer

Table 1. Distribution of *Dendropanax morbifera* lacquer of collection areas and lacquer yield.

A. Bogil Island

No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)
2	0.3992	81	0.0363	153	0.2363	236	0.6825
10	0.0208	88	0.042	158	1.0032	240	0.0334
13	0.3892	90	0.0241	161	0.7562	242	0.7113
27	0.0429	94	0.0478	165	0.1455	246	0.6191
31	0.2073	96	0.0182	166	0.0243	247	0.4748
35	0.0351	103	0.3413	182	0.501	249	0.141
40	0.0387	108	0.4947	186	0.3523	250	0.669
44	0.0811	110	3.9878	191	0.1712	254	0.0428
49	0.0203	119	0.8664	198	0.3677	260	0.6205
57	0.1429	123	0.0296	206	0.2345	261	0.1896
58	0.7104	128	0.0157	211	0.0459	262	6.3869
63	0.0564	140	0.0412	221	0.0786	271	0.5182
70	0.0272	141	0.0083	229	0.5635	273	5.1961
79	0.0528	147	0.5224	235	1.0528	281	5.1199

B. JeJu Island

No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)
282	1.5047	326	1.2854	353	0.3115	375	0.0864
286	0.8308	330	0.1934	357	0.2469	377	0.0822
290	0.2958	334	0.6281	358	0.0822	382	0.0822
292	0.1743	338	0.0773	361	0.1988	386	1.096
301	0.0631	342	0.4188	364	0.0514	387	0.5538
308	1.3136	343	0.1951	365	0.3471	390	0.9843
313	0.0109	347	0.0323	369	0.3248	392	0.4265
317	0.0323	350	0.322	370	0.7087	398	0.1449
320	2.6637	351	0.4022	372	0.081	399	0.8546
325	0.3703	352	1.9723	374	0.0666	400	0.0576

C. Haenam, Wando,

No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)	No.	Lacquer yield (g)
403	0.764	439	0.3889	473	2.102	488	0.8281
435	0.3075	466	1.2471	479	0.2456	492	2.1902

Table 2. Distribution of *Dendropanax morbifera* lacquer of collection areas.

	Locality	Lacquer yield (g)							
		0	0~1	1~2	2~3	3~4	4~5	5~6	6~7
No. of trees/500	Bogil Island	222	52	3	0	1	0	2	1
	Jeju Island	94	21	3	1	0	0	0	0
	Haenam,Wando	68	22	3	7	0	0	0	0
Lacquer yield(%)	Bogil Island	79	19	1	0	0.4	0	0.7	0.4
	Jeju Island	79	18	3	0.8	0	0	0	0
	Haenam,Wando	68	22	3	7	0	0	0	0

## 2절 황칠 수액 중 정유성분의 동정 및 선발개체의 정유성분의 정량적 패턴조사

### 1. 서론

황칠나무에 관한 최초의 과학적인 연구는 일본인 安田 (1928, 1937년)에 의한 황칠수액 중 정유성분에 대한 연구로 황칠은 일종의 정유성분으로서 주성분은 2중 결합이 2개 있는 dicyclic sesquiterpene 이며 그 외에 알코올, 에테르 등의 성분을 함유하고 있다고 보고된 바 있다. 국내에서도 Jeong 등 (1995)이 주요 성분으로 sesquiterpene인  $\beta$ -selinene이라고 확인한 바 있으며, Lim and Jeong (1998)은  $\beta$ -cubebene이 주요 성분이라고 보고한 바 있다.

개체별과 주요 성분의 양적/질적 구성에 차이를 보이는 지를 알고자 하였으며, 이러한 차이가 실제 황칠액의 품질을 결정하는 요인이 된다고 한다. 따라서 본 연구에서는 주요 정유 성분인  $\beta$ -elemene, germacrene D,  $\beta$ -selinene,  $\alpha$ -selinene,  $\gamma$ -cadinene,  $\delta$ -cadinene 등을 고려하여 각 서식지별 수액 분비량이 우수한 선발 개체목에서의 수액 중 정유성분의 양적·질적 차이를 조사하고자 하였다.

### 2. 연구 내용 및 방법

건조한 시료 0.5g (D.W)를 사용하여 pentane:ether (9:1, v/v) 5 ml씩 3회 추출한 다음 여과지를 사용하여 여과하고 회전 증발기에서 무 감압하에서 농축한 다음 MeOH 2 ml에 재 용해시켜 GC-Mass 분석을 위한 시료로 사용하였다. GC-Mass의 분석조건은 다음과 같다. Column은 HP-5MS (crosslinked 5% HP ME Siloxane)을 사용하였으며, He gas를 사용하여 Flow rate 1.0 ml/min으로 하였다. Oven Temperature는 50°C (2min 유지) → 10°C/min → 200°C → 5/min → 250°C (5min 유지) 조건으로 하였으며, Inlet Temp.는 250°C, Detector Temp.는 270°C, Split ratio는 20:1, Injection Volume는 1 $\mu$ l 등의 조건으로 수행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

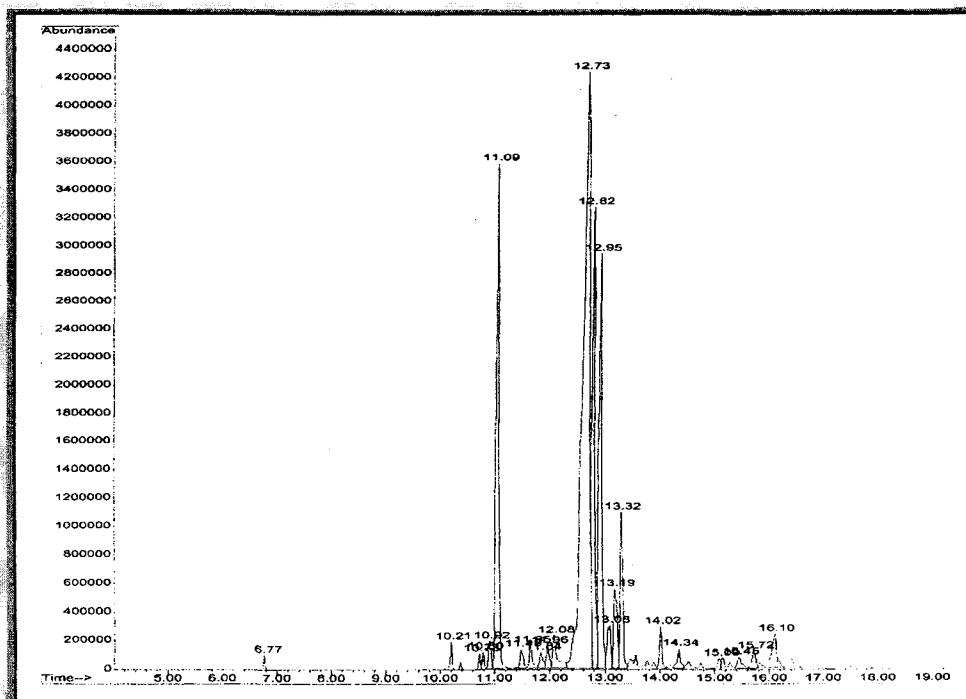
본 조사에서도 황칠 수액 중 정유성분은 방향성 dicyclic sesquiterpene 이었으며, 주요 성분은 1,6-atadiene-3-ol,  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -cubebene,  $\alpha$ -ylangene,  $\alpha$ -copane,  $\beta$ -elemene, germacrene D,  $\beta$ -selinene,  $\alpha$ -selinene,  $\delta$ -cadinene,  $\gamma$



-cadinene, germacrene B, germacrene D-4-ol 등으로 동정되었다 (Fig. 4). 특히 본 조사에서 채취한 황칠수액은 germacrene D가 가장 많은 비율을 구성하고 있었으며, 이 성분은 기타 다른 정유성분 함유 식물에서도 주요 성분을 이루고 있으며, 다른 sesquiterpene derivatives의 생합성 시발물질임이 밝혀진 바 있다(Bülow and König, 2000). 이러한 분석자간 황칠정유 주성분에서의 차이는 일반적으로 황칠수액이 초기 삼출액과 달리 시간경과에 따른 빛이나 산소 노출에 따른 화학적 변화가 일어난다고 하는 보고(Lim et al., 1998)에 비추어 황칠수액의 채취 후 경과 시간이나 보관방법에 있어 차이에 기인한 것이 아닌가 추정되며 이에 대한 상세한 조사가 요구된다 하겠다. 또한 다음에 제시된 개체 및 서식환경 별 정유성분의 분포 차이 역시 하나의 원인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

주요 정유 성분인  $\beta$ -elemene, germacrene D,  $\beta$ -selinene,  $\alpha$ -selinene,  $\nu$ -cadinene,  $\delta$ -cadinene 등을 고려하여 각 서식지별 수액 분비량이 우수한 선발 개체목에서의 수액 중 정유성분의 양적·질적 차이를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 것처럼 개체별로 정유성분의 양적인 분포는 균일하지 않았다. 특히 대부분의 개체가 germacrene D가 주성분인 것에 비하여 완도·해남 498 개체는  $\beta$ -selinene 이 주요 성분이었다. 또한 제주도 서식개체에서는 칠액 생산량과 상관없이  $\alpha$ -selinene이 검출되지 않았다. 이러한 결과는, 각 개체가 분비하는 수액의 정유성분의 절대량은 물론 성분의 생성패턴에서도 차이가 존재하고, 서식환경에 따른 정유성분의 생성패턴에서도 차이가 있음을 의미한 것이라 하겠다.

이러한 결과를 종합하면, 황칠나무 수액의 분비량은 서식환경이나 개체 수령에 의한 차이 외에도 개체목간 차이가 있었으며, 칠액 분비량을 기준으로 선발한 개체에서도 서식환경이나 개체목간의 정유성분에 있어 질적인 분포 역시 차이를 가지고 있었다. 따라서 황칠수액의 균일한 안정적 생산을 확보하기 위해서는 자연적으로 분포·서식하는 황칠나무 중에서 분비액의 양적·질적인 평가로 우수개체를 발굴하고 이를 모본으로 하여 증식을 비롯한 황칠수액의 생산과 개선에 관한 지속적인 연구에의 필요성을 제기한다 하겠다.



A(6.77) 1.6-atadien-3-ol, B(10.21)  $\alpha$ -terpinene, C(10.374)  $\alpha$ -cubebene,  
 D(10.714)  $\alpha$ -ylangene, E(10.791)  $\alpha$ -copane, F(11.09)  $\beta$ -elemene,  
 G(12.73) germacrene D, H(12.82) $\beta$ -selinene, I(12.95)  $\alpha$ -selinene,  
 J(13.19)  $\gamma$ -cadinene, K(13.32)  $\delta$ -cadinen, L(14.02) germacrene B

Fig. 4. The components identified from *Dendropanax morbifera* lacquer by GC/MS

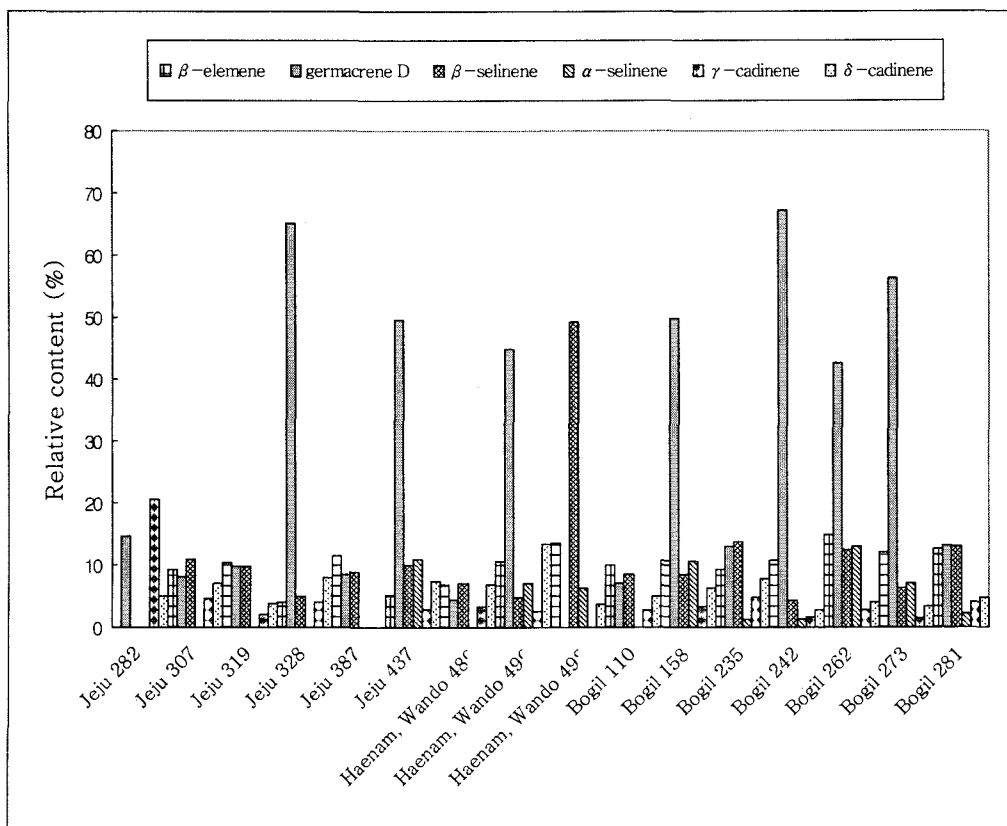


Fig. 5 Relative content of major components in essential oils of lacquer from different habitat of *Dendropanax morbifera* trees.

### 3절 황칠나무 선발개체의 황칠수액 분비량 및 주요 sesquiterpene의 년 중 경시변화

#### 1. 서론

일반적으로 황칠수액의 중요함에 비하여 현재 자연 서식하는 대부분의 개체에서 분비하는 수액의 양은 극히 소량이고, 분비가 일년 중 한정된 시기에 국한되며, 수액 분비량에서의 개체별 차이 역시 큰 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 선행 연구에서 수액량을 기준으로 임으로 선발하였던 우수개체 4주를 대상으로 년 중 시기별 황칠수액량과 수액중 주요 정유성분의 변화를 알아보고자 하였다.

#### 2. 연구내용 및 방법

일정기간동안 완도 보길도, 해남 등지의 자생군락 개체 약 5주를 대상으로 분비량 조사에서 량을 기준으로 선발한 개체 4주를 조사대상으로 하였다. 채취는 5월에서 9월까지 6주 간격으로 실시하였다. 채취 방법은 각 개체의 흉고 부분을 중심으로 4방향에서 1cm의 조각칼로 수피를 제거한 다음 일주일 경과 후에 분비된 황칠수액을 채집하는 방법으로 하였다. 채취한 황칠수액을 정량한 다음 병에 밀폐 보관한 상태로 냉동보관하였다. 성분 분석을 위해서는 냉동보관한 시료를 동결보전하여 수분을 제거한 다음 사용하였다. 분석은 건조한 시료 1g를 사용하여 pentaned으로 3회 추출한 다음 합한 추출액을 여과지를 사용하여 여과하고, 회전 증발기 하에서 무 감압하에서 농축한 다음 methanol에 재 용해시켜 분석을 위한 시료로 사용하였다.

#### 3. 결과 및 고찰

황칠수액 분비량을 기준으로 선발한 개체군이긴 하지만 개체별 수액량의 차이가 있었으며, 각 개체목 간 수액량의 채질 시기별 변화도 관찰되었다. 황칠나무 수액은 기온이 낮은 4월까지 분비가 거의 이루어지지 않으며, 5월이 되면서 분비되기 시작하여 7~9월에 분비량이 가장 많고 10월에는 급격히 감소하여 분비가 거의 이루어지지 않았다. 개체별로는 해남 492는 전체적 분비량이 저조한 반면, 동일 서식지 선발군인 보길도 3주는 비교적 분비량이 우수하였다. 그렇지만 보길 262와 보길 281는 각각 8월과 9월에 분비량이 우수하였고 보길 273의 경우에는 6월에 높은

분비량을 나타내어, 분비의 시기별 변화에서도 개체목간 차이가 있음을 나타내었다 (Fig. 6).

황칠수액 성분 중 방향성 정유성분 중 주 성분인  $\beta$ -elemene,  $\alpha$ -selinene,  $\beta$ -selinene,  $\delta$ -cadinene 와 germacrene D을 기준으로 선발개체목간 채칠 시기별 함량 변화를 알아보았다. 해남 No. 492의 경우 5월과 9월은 각각 채칠량 부족과 강우 등의 영향으로 성분 분석이 불가능하였으나, 주요 정유성분의 상대적 함량 역시 8월에 가장 높았다 (Fig. 7). 보길 262는 채칠량은 8월에 정점을 보이고 9월에는 상당한 폭으로 감소를 보였으나, 단위 칠액당 개별성분은 오히려 9월에 최고함량을 나타내었다. 6월부터 9월까지 개별 성분 모두 점점 증가하는 것을 보여준다 (Fig. 8). 그러나 보길 No. 273는 6월과 8월 사이에 함량변화는 거의 없다가 8월 이후부터 점점 감소하였다 (Fig. 9). 반면에 보길 No. 281은 수액량에서 9월에 정점과 마찬가지로 각 성분의 상대적 함량 역시 9월에 최대 수치를 나타내었다. 보길 No. 281은 보길 262와 마찬가지로 germacrene D가 다른 선발개체목과 달리 단연 많은 비중을 차지하여 다른 성분의 약 20배 높은 구성비를 이루고 있었다 (Fig. 10).

결과를 요약하면, 년 중 황칠나무 수액의 분비량과 최대분비의 시기는 개체목간 차이가 두드러졌으며, 수액 중 정유성분의 상대적 함량분포, 최대 생산 시기 등도 역시 개체목간 다양한 변화를 나타내었다. 따라서 황칠의 대량생산이라는 목적으로 남부의 일부지역에서 황칠나무를 민·관이 대량으로 식재하고 있으나, 이에 앞서 황칠나무 개체목간의 이러한 특성도 충분히 고려하여 우수한 개체의 선발, 최적 분비 시기의 선정, 칠액 성분의 표준화 등을 고려되어야 할 것을 제시하는 바이다.

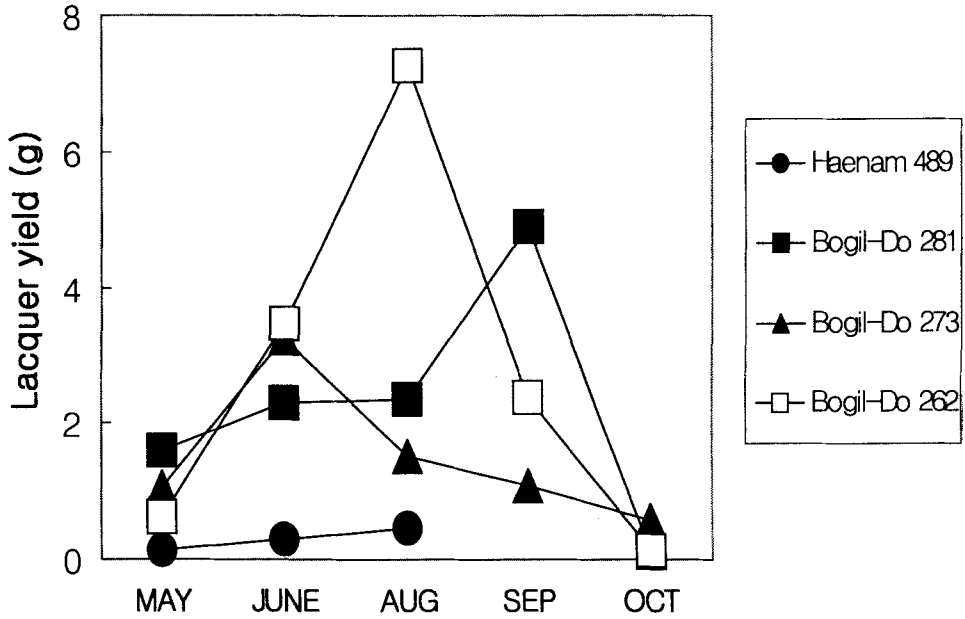


Figure 6. Time course changes in Hwangchil lacquer yields of 4 selected trees of *Dendropanax morbifera* Lév (Haenam 492, Bogil-Do 262, Bogil-Do273, Bogil-Do 281). The sample collection of Haenam 492 in September was impossible to the rain.

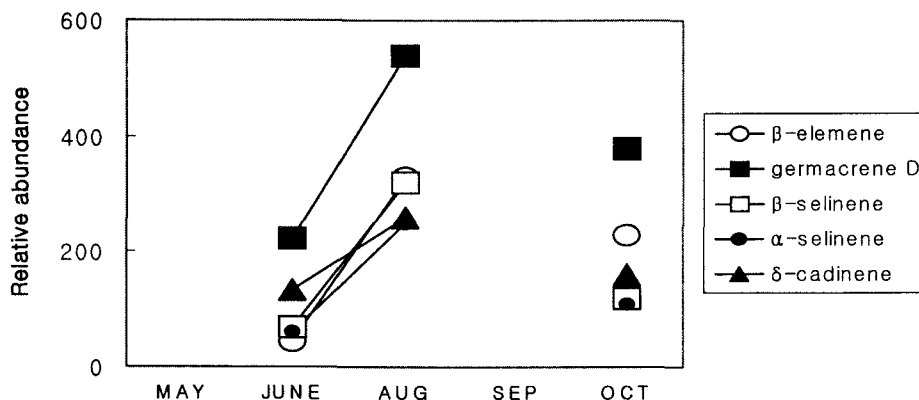


Figure 7. Time course changes in relative contents of principal aromatic essential oils in Hwangchil lacquer of *Dendropanax morbifera* Lévy (Haenam 492). Samples in May and September were impossible to analyze the components because of the extremely low Hwangchil lacquer yield harvested and of the heavy rainfalls, respectively.

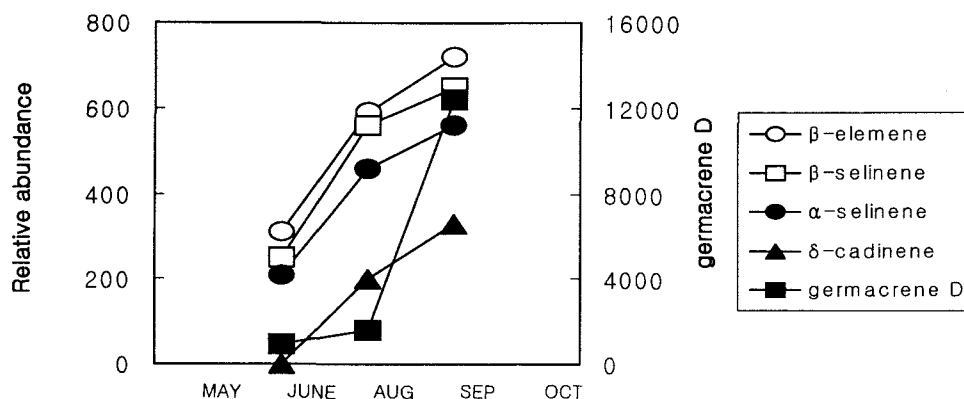


Figure 8. Time course changes in relative contents of principal aromatic essential oils in Hwangchil lacquer of *Dendropanax morbifera* Lévy (Bogil-Do 262). Samples in May and October were impossible to analyze the components because of the extremely low Hwangchil lacquer yield harvested.

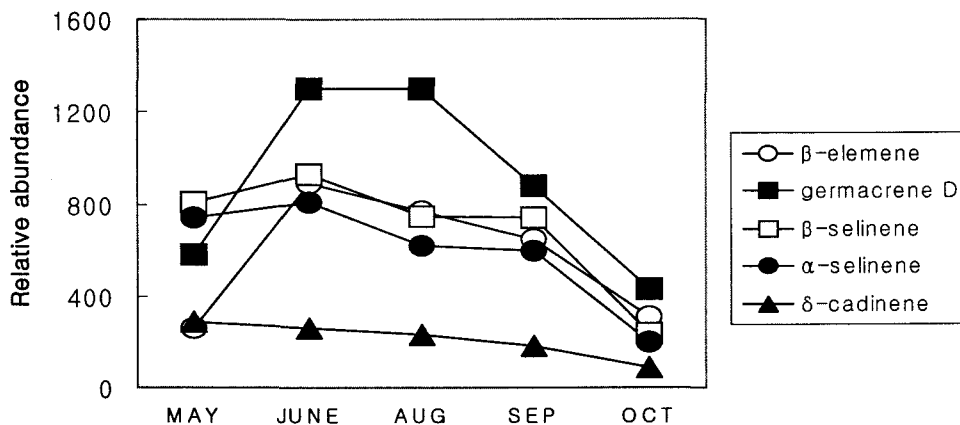


Figure 9. Time course changes in relative contents of principal aromatic essential oils in Hwangchil lacquer of *Dendropanax morbifera* Lév (Bogil-Do 273).

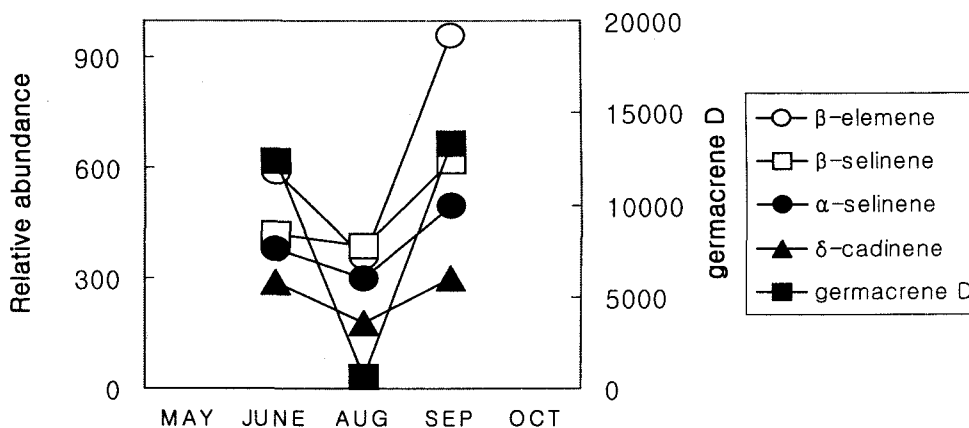


Figure 10. Time course changes in relative contents of principal aromatic essential oils in Hwangchil lacquer of *Dendropanax morbifera* Lév (Bogil-Do 281). Samples in May and October were impossible to analyze the components because of the extremely low Hwangchil lacquer yield harvested



## 4절 황칠 수액 중 색소의 동정에 관한 연구

### 1. 서론

황칠 수액의 주요성분으로는 정유성분이 알려져 있으나, 실제 황칠수액의 도료로서의 특성을 나타내는 수액 중 노란색 또는 황금색으로 알려진 지용성 색소성분이다. 따라서 색소성분의 분리와 동정으로 노란색소의 정량적 판단이 가능한 표준품의 공급을 목적으로 하고 있으며, 아울러 수액 분비 초기의 흰색 수액이 햇빛과 공기에 노출되면서 점차 노란색으로 광화학반응해가는 과정의 이해에 도움이 될 수 있을 것이다.

### 2. 연구내용 및 방법

황칠수액과 황칠나무잎에서 추출한 색소성분을 Liquid chromatography 와 Solid phase extraction 분석장비로 분리농축하여 이들 색소 화합물을 정제하기 위하여 먼저 HPLC 분석기기의 최적 분석조건을 수립하였다. 실험에 사용된채 column 고정상의 극성도가 각각 다른 RP-C18 (Bondapak, 3.9 X 300mm, Waters), CLC-SIL (M, 3.9 X 250mm, Shimpack, Shimadzu), Spherisorb CN (Kontro, 5 X 250mm)을 사용하였으며 이동상은 극성이 다른 여러 유기용매를 혼합하여 이용하였고 flow rate와 Photodiode array detector(DAD)의 파장을 최적화하였다.

본 연구에 이용한 HPLC의 조건은 Table 3에 제시하였다.

Table 3. 황칠 색소성분 분석을위한 HPLC조건

Instrument	Waters501 HPLC system
Column	CLC-SIL(M.25cm, Shim-pack, Shimadzu)
Detector	Hewlett-Parkard 1050 series Photodiode array detector (DAD)
Wave length	230nm, 265nm, 290nm,320nm, 446nm
Mobile phase	n-hexane: methanol: ethylacetae (80:5: 15, v/v)
Injection volume	5 $\mu$ l
Flowrate	1.0ml/min

## 2. 결과 및 고찰

### 가 HPLC에 의한 황칠수액의 분리

황칠수액 색소는 Liquid chromatography 에 의해 두 개의 분획구로 분리되었는데 각각의 분획구를 위해서 언급한 HPLC의 최적 분석조건에 의해 정제, 분리하여 분취하였다. Fig. 11은 황칠수액 색고성분 분획구 I을 HPLC로 320nm에서 분석한 chromatogram 이며, peak A는 황칠수액OR의 황색을 나타내는 성분이므로 이를 분취, 분취하였다. Peak A에 대한 UV-Vis spectrum(200-600nm)은 photodiode array 검출기로 측정하였다.

Fig. 12는 황칠수액에서 분리한 분획구 II의 HPLC chromatogram이며, 280nm에서 검출한 그래프다. 황색을 띤 Peak B를 분리, 분취하였고 Peak B에 대한 UV-Vis spectrum (200-600nm)을 photodiode array 검출기로 측정하였다.

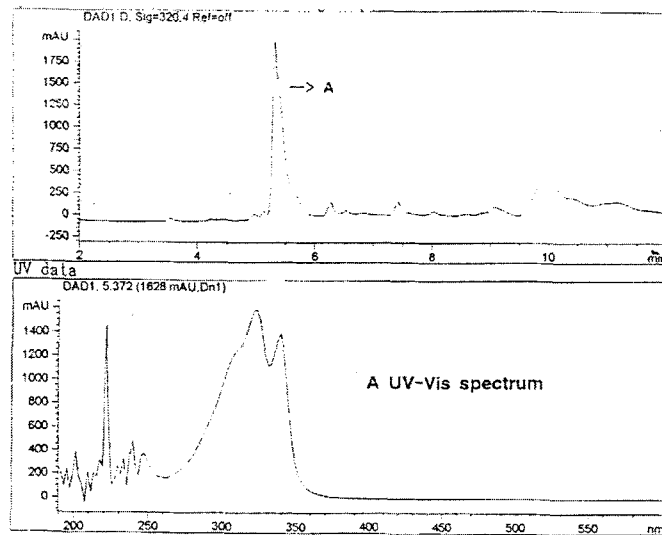


Fig 11: 황칠 색소성분 I (분획구A)의 액체크로마토그램

Column: CLC-SIL(M. 25cm, Shim-pack, Shimadzu), mobile phase: n-hexane: methanol: ethylacetate (80:5:15, v/v), flow rate: 1.0ml/min, detection: 320nm photodiode array detector (HP DVD series

1050)

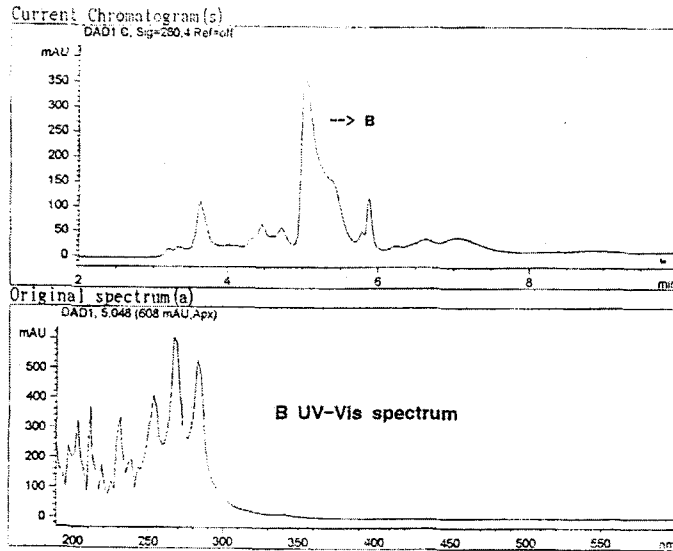


그림 12: 황칠 색소성분 II(분획구B)의 액체크로마토그램

Column: CLC-SIL (M.25cm, Shimadzu), mobile phase:n-hexane:methanol: ethylactae (80: 5:15, v/v), flow rate: 1.0ml/min, detection: 280nm photodiode array detector (HP DADseries 1050)

나. 황칠수액색소의 UV-Vis spectrum

HPLC로 분획, 분취한 color pigment I, II를 methanol로 희석하여 UV-Vis spectrometer(UV 160A, Shimadzu, Japan)를 사용하여 각각 200-400nm와 400-600nm 파장에서 흡수되는 spectrum을 측정하였다. Pigment I의 UV-Vis spectrum은 Fig. 13에 제시하였으며, 306nm,312nm와 342nm에서 최대 흡광

도를 나타내었으나, 가시광선 파장의 범위에서는 최대 흡광도가 나타나지 않았다. Pigment II의 UV-Vis spectrum은 Fig. 14에 제시하였으며, 259nm, 267nm와 283nm에서 최대 흡광도를 나타내었으나, pigment I과 마찬가지로 가시광선 파장의 범위에서는 최대 흡광도가 관찰되지 않았다.

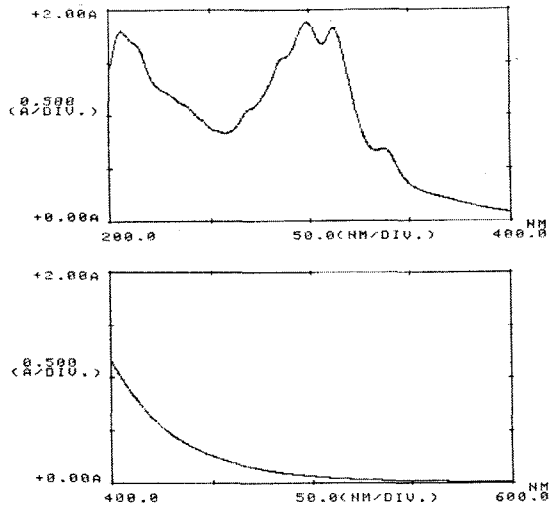


Fig. 13. 황철의 색소성분 I의 자외선-가시광선 스펙트럼

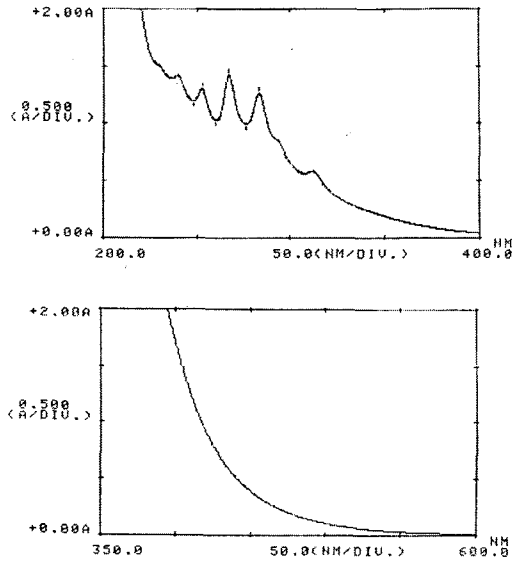


Fig. 14. 황철의 색소성분 II의 자외선-가시광선 스펙트럼

다. 황칠수액 색소의 FTIR-Spectrum

Fig. 15는 HPLC에서 분획, 분취하여 유기용매를 제거한 pigment I (Fraction A)을 FTIR (BRUKER, 500-4000 $\text{cm}^{-1}$ )에 흡광도를 측정하여 얻은 IR spectrum이다.

2935 $\text{cm}^{-1}$ 는 지방족 methylene기의 C-H 신축진동을 나타내고, 1030-1040 $\text{cm}^{-1}$ 사이의 약한 peak는 methylenedimethyl C-H굽힘진동을 나타내고, 1030-1040 $\text{cm}^{-1}$ 의 peak는 ether나 epoxide의 C-O결합의 흡수띠로 보인다. 이 IR spectrum에서는 방향족의 C-H peak나 hydroxy group의 O-H peak 또는 amino 계열의 N-H peak가 전혀 관찰되지 않았다.

황칠수액에서 분리된 pigment II (Fraction B)의 FTIR spectrum은 Figure 16에 제시하였다. 이 spectrum에서 2935 $\text{cm}^{-1}$  methylene 기의 C-H 신축진동을 나타내며, 1034 $\text{cm}^{-1}$ 는 ether나 epoxide의 C-O결합의 흡수띠로 간주될 수 있다. 특이하게 이 spectrum에서 2380-2420 $\text{cm}^{-1}$ 의 강한 peak가 관찰되었는데 이는 nitril기의 C $\equiv$ N결합의 흡수띠로 여겨진다. 이 IR spectrum에서도 역시 방향족의 C-H peak나 hydroxy group의 O-H peak 또는 amino 계열의 N-H peak가 나타나지 않았다.

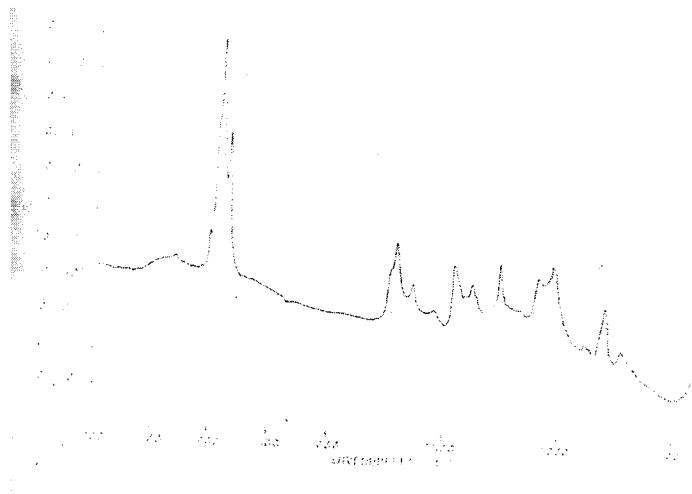


Fig. 15. 황칠 수액 색소성분 I (분획구 A)의 적외선 스펙트럼

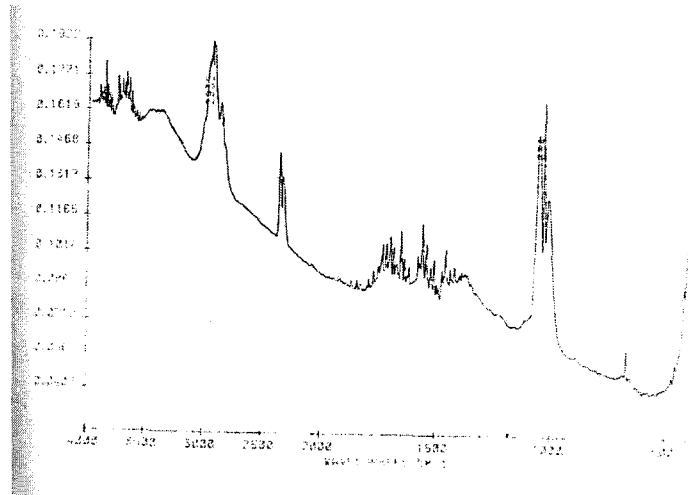


Fig. 16. 황칠 수액 색소성분 II(분획구 B)의 적외선 스펙트럼

## 제 5절 황칠 우수개체의 기내 번식 및 세포배양

### 1. 서론

기내 조직배양을 통한 대량증식법에는 세포배양을 통한 체세포배 발생법, 부정아 발생법, 생장점 또는 액아배양법 등이 있다. 그러나 세포배양을 통한 기관발생이나 체세포배 발생은 먼저 기관이 탈분화되기 때문에 세포가 갖는 특성상 여러 가지 변이체가 나타날 수 있는 가능성이 있고, 계대배양 기간이 길어질수록 부정아 형성능력이 감소할 뿐만 아니라 배수체, 이수체 등의 유전적으로 비정상적인 세포의 발생 빈도가 높아 이 방법은 유전적 변이 발생이나 재분화 능력 문제와 더불어 증식률 및 재현성이 낮아 대량증식법으로는 일반화 되어 있지 않다 (Konan et al., 1997). 따라서 식물체가 갖는 유전적인 특성을 그대로 유지하기 위해서는 모식물이 갖는 특성을 그대로 유지하면서 대량증식의 효율을 높일 수 있는 방법을 찾아야만 한다. 휴면 중인 액아로부터 식물체를 재생시키는 방법은 기관이 탈분화되지 않고 바로 기관발생이 일어나기 때문에 유전적으로 가장 안정된 방법이며 (Sanchez-Gras & Calvo, 1996; George & Ravishankar, 1997), 유식물체의 획득에 필요한 시간도 짧기 때문에 급속 대량증식 수단으로서의 실용성이 가장 높다고 할 수 있다 (Bhangwat et al., 1996; Quraishi et al., 1996; Bhattacharya, 1997).

### 2. 연구 내용 및 방법

황칠나무의 액아배양을 통하여 기내에서 대량증식을 이루고자 무균배양 중인 황칠나무의 액아를 절취하여 TDZ (0.005, 0.01, 0.05, 10 mg/L), BA (0.1, 1, 5, 10 mg/L) 그리고 kinetin (0.1, 1, 2.5, 5 mg/L)이 첨가된 MS 배지에 치상하였다. 광조건하에서 4주 배양후 액아로부터 발생한 싹의 수를 조사하였다 (Table 4).

캘러스의 형성을 위해 유식물의 잎, 줄기를 일정한 크기로 절단 한 후 MS 배지에 Auxins과 cytokinins을 조합 또는 단독처리한 배지위에 치상한 후 6주후 형성되는 캘러스의 무게와 지름 등으로 캘러스 형성조건을 측정하였다. 형성된 캘러스는 절취한 다음 고휘 또는 액상의 배지에 이식하여 이후의 실험재료로 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

대부분의 다양한 호르몬 조건은 호르몬이 첨가되지 않은 대조구와 유사한 싹



발생율을 보여주었지만 (Fig. 17), 특히 BA가 첨가된 MS배지에서 황칠의 액아를 배양했을 경우 많은 신초를 발생시켰다. kinetin의 농도가 많을 수록 신초발생은 나타나지 않았으며 농도가 낮을 경우에는 신초 발생에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 목본 식물에서 강력한 신초 유도 호르몬인 TDZ를 처리하여 줄기다발을 유도하려하였지만, kintein과 유사하게 농도가 높을수록 신초 발생은 일어나지 않았으며, 반면 농도가 낮을수록 어떠한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 여러 종에서 신초의 증식 시 BA가 효과적이라고 보고한바 있다. 황칠의 경우 액아로부터 다량의 신초 발생에 BA처리시 효과는 다른 호르몬에 비해 우수하였다. 특히, 5 mg/L의 BA가 첨가된 조건에서 가장 많은 수의 신초가 발생하였다. 그 외의 농도에서도 다른 호르몬이나 대조구에 비해 우수하여 BA는 황칠의 액아로부터 신초를 발생시키는데 매우 유용한 호르몬임을 확인하였다.

액아로부터 발생한 신초의 성장 및 발근을 위한 성장조절제의 종류 및 농도를 규명하기 위해 약 2 cm의 길이로 잘라 IBA, IAA, NAA (0.5-5 mg/L)의 농도로 첨가된 MS 고형배지를 사용하여 8주간 배양한 결과, 호르몬이 첨가되지 않은 대조구에 비교하여 볼때 뿌리의 발생, 신장 및 신초의 성장이 전반적으로 양호하여, 호르몬의 농도에 따른 뿌리의 발생 양상이 다르게 나타났다(Table 2). 대부분의 발근 발생 형태는 주근을 주축으로 하여 길게 성장하였고(Fig. 18), 측근은 거의 발생하지 않거나 5-6개의 적은 수의 측근 발생을 보였다. 호르몬이 첨가된 대부분의 조건에서 발생율이 우수하여 액아로부터 발생한 신초들의 발근에 있어 호르몬이 필요함을 확인하였다. 발근 수는 NAA가 5 mg/L 첨가된 조건에서 우수하였고, 발근율은 IAA가 5 mg/L 첨가된 조건에서 84%로 가장 좋은 결과를 보여주었다. 일반적으로 고농도의 오옥신 처리는 절취된 신초부위에서 캘러스를 유도하거나 괴사를 일으키지만, 황칠의 경우 오옥신의 처리농도가 증가함에 따라 발근율 및 발근 생장이 우수하였다.

캘러스 생성에 대한 호르몬 조성표는 제시하지 않으나 NAA 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L로 조합된 배지에서 가장 활발한 캘러스 유기 및 유지를 보였다 (Fig. 19). 유도된 캘러스는 동일한 고형 또는 액상의 배지에서 1달 간격으로 계대배양하였으며, 필요한 경우 성분 분석 등에 이용하였다.

Table 4. Effect of Kinetin, BA and TDZ on multiple shoot development from axillary bud of *Dendropanax morbifera*.

Cytokinins (mg/L) <sup>a</sup>		No. of shoots from axillary buds (Mean±SE)
Control	0	2±1.3
Kinetin	0.1	4±2.2
	1	3±2.1
	5	-
	10	-
	0.1	12±6.5
BA	1	22±8.7
	5	32±10.5
	10	15±12.4
	5	-
TDZ	0.005	2±1.1
	0.01	2±0.3
	0.05	-
	1	-

-; not respond

<sup>a</sup>Plant growth regulators were added to MS basal medium.

Table 2. Effect of IBA, IAA and NAA concentrations added to the rooting medium on root development in *Dendropanax morbifera*.

Table 5. Effect of Kinetin, BA and TDZ on multiple shoot development from axillary bud of *Dendropanax morbifera*.

Auxin type	Auxin concentration, mg/L							
	0.5	1	2	5	0.5	1	2	5
	<u>Percentage rooting (12)<sup>a</sup></u>				<u>Number of roots per shoot (0.3)<sup>b</sup></u>			
IBA	55	60	58	77	2.0	2.2	2.1	3.2
IAA	63	65	71	84	1.5	2.0	1.9	3.1
NAA	70	72	76	71	2.2	3.0	3.1	4.4

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> value in parenthesis represent control without hormones.

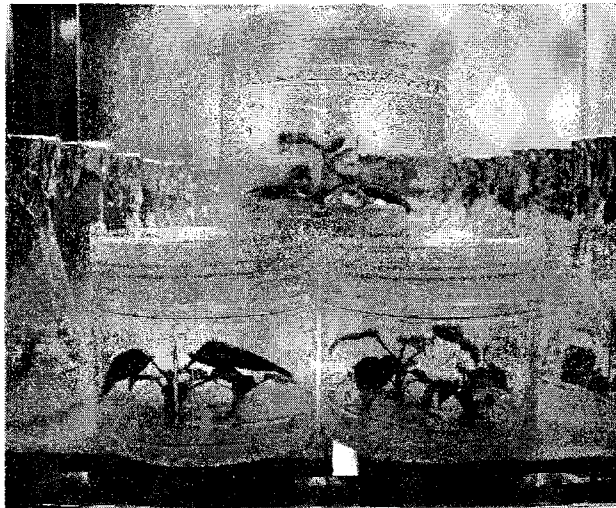
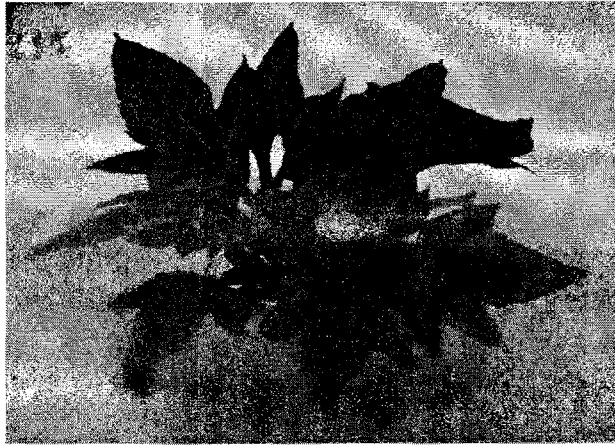


Fig. 17. Multiple shoots induced from explants *Dendropanax morbifera* on MS basal medium containing 5 mg/L BA.

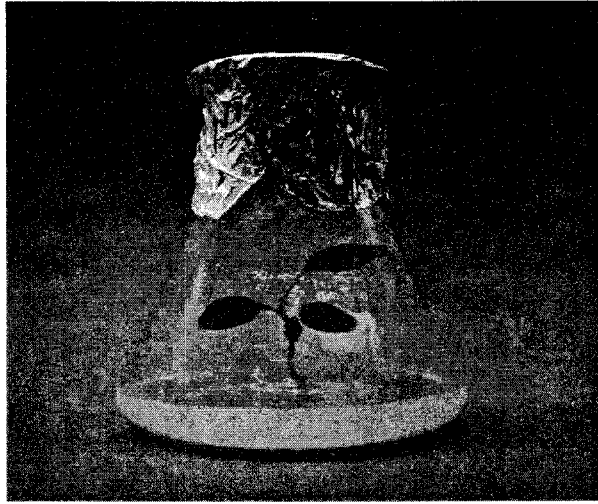


Fig. 18. Root differentiation from shoot induced from explants *Dendropanax morbifera* on MS basal medium containing 5 mg/L NAA

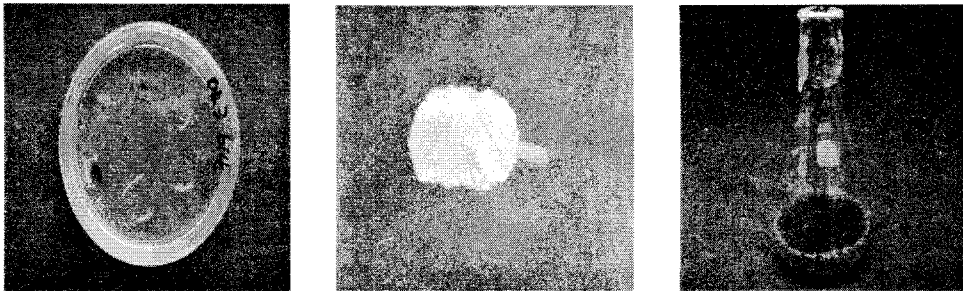


Fig. 19. callus induction and suspension culture from explants *Dendropanax morbifera* on MS basal medium containing NAA 1 mg/L and kinetin 0.5 mg/L

## 6절 황칠수액 우수 분비-선발주의 녹지삼목에 관한 연구

### 1. 서론

황칠나무의 번식은 종자와 삼목이 일반적인 번식법으로 알려져 오고 있다. 종자 번식법은 종자 과육에 발아억제물질이 들어 있어 과육을 붙인 채 파종하면 발아하지 않은 경우가 많고 우량 개체를 선발 시 타식성(他殖性)으로 인하여 원하는 모수의 형질을 그대로 생산할 수 없는 불확실한 번식법이다. 하지만 삼목은 원하는 개체를 손쉽게 대량으로 증식할 수 있어 우량개체 황칠나무 묘목 생산에 매우 적합한 방법이다. 오늘날 삼목기술은 매우 발달하여 유망한 수종에 한하여 상업적으로 이용되고 있는 실정이지만 산림수종에 대하여는 경제적인 효율성 때문에 매우 제한적으로 이용되고 있다. 황칠나무의 삼목은 숙지삼과 녹지삼이 주로 이용되는데 일반적으로 7~8월에 실시하는 녹지삼이 더 발근이 잘된다고 보고 되고 있어, 황칠나무 녹지삼에 대한 보다 다양한 삼목법의 연구가 요구되는 실정으로 보다 더 체계적인 황칠나무 삼목을 개발 보급코자 한다.

### 2. 연구내용 및 방법

#### 가. 공시재료의 삼수조제 방법

공시재료는 전라남도완도수목원에서 연습림에서 7월 12일에서 8월 17일 사이 일주일 간격으로 6회에 걸쳐 당년도 자란 소지를 새벽 동이 트기 전에 채취하였으며, 예리한 칼로 경사 방향으로 절단하여  $24(\pm)^\circ\text{C}$  항온기 속에서 절단면의 2.5 cm되는 곳까지 침적하였다. 잎은 정아 밑에서 2엽만 남기고 제거하였으며, 3반복 난괴법으로 배치하여 실시하였다.

#### 나. 삼목상 준비

삼목상은 자동 Mist 분수장치가 설치된 그린하우스 내에 지면으로부터 0.6 m위에 공기 유통이 양호하도록 벤취식으로 설치하였으며, 지붕 위와 옆면에는 75% 차광막을 쳐 삼목 후 강한 일사광선을 차단하였다. 그리고 높은 관계 습도를 유지하기 위해 Mist control를 부착하여 자동분무가 되도록 했다. 겨울에는 동해를 방지하기 위해 난방 장치를 설치하여 영상의 온도를 유지하였다. 삼목상 배양토는 각

처리구별 58×42 cm 크기의 화분에 Perlite : Peatmoss를 1:1로 혼합한 배양토를 사용하였으며, 화분 상단에서 3 cm 아래까지 차도록 배양토 29.0ℓ를 채운 후 3번 정도 두드린 다음 물조리개를 이용 1화분마다 1개정도의 물을 주었으며, 삽목 후에도 물조리개 1개정도 량의 물을 주었다. 일단 배양토에 물을 주었거나 삽목이 완료되면 삽목상의 배양토 다짐 및 삽수가 흔들리지 않도록 삽목상 관리에 주의하였다.

#### 다. 삽목시험

##### 1) 시기별 삽목

삽수 채취는 7월 12일, 7월 20일, 7월 27일, 8월 3일, 8월 10일, 8월 17일 6차에 걸쳐 7일 간격으로 25년생 모수에서 당년도에 자란 소지를 채취하였고, 삽수조제는 삽수장 12.6±5.4 cm 삽수직경 4.12±1.27 mm 크기로 180분 조제하여 식물 호르몬 IBA 40 ppm을 18시간 침적 후 실험에 사용하였다.

##### 2) 모수 연령별 삽목

2년, 5년, 10년, 17년, 20년, 25년, 32년 생의 모수에서 당년생 소지를 선택하여 채취하였으며, 삽수조제는 삽수장 13.1±5.4cm 삽수직경 5.41±4.38 mm 크기로 210분을 조제 IBA 40 ppm에 18시간 침적 처리 후 실험에 사용하였다.

##### 3) 호르몬의 종류와 농도별 삽목

삽수의 조제는 모수 연령은 30년생에 삽수를 채취하여 삽수장 14.1±2.0 cm 삽수 직경 4.25±1.0 mm 크기로 480분을 조제하고, 발근 촉진제 NAA·IBA 각각 20, 40, 60, 80, 100 ppm과 IAA50, 100, 150, 200 ppm 용액에 18시간 침적 후 실험에 사용하였다.

##### 4) 삽수의 채취 부위별 삽목

삽수 조제는 32년생 황칠나무 모수에서 수관의 길이를 상, 중, 하 3등분하여 부위별로 당년도에 자란 건전한 소지를 각각 구분 채취하여 삽수장 8.11±6.37의 크기로 90분을 조제하고, IBA40 ppm에 18시간 침적 후 실험에 사용하였다.

##### 5) 삽수에 달린 잎의 개수별 삽목

삽수에 잎을 0, ½, 1.0, 1½, 2.0, 3.0개를 각각 붙여 식물호르몬 IBA 40 ppm에 18

시간 침적 후 180본을 실험에 사용하였다.

라. 조사방법 및 분석

위 실험의 조사방법은 삼목 후 7개월 만에 각 처리구별로 굴취하여 발근 수, 발근이 되지 않고 callus만 형성하고 있는 수, 고사상태의 수, 신초의 발생 수, 신초 길이, 신초에서 발생된 잎의 수 등을 조사하였다. 나무생장에 중요한 영향을 미치는 뿌리발생 상태는 각 처리구별로 균등하게 9본씩을 선발하여 2 cm 이상의 뿌리 발생 counting, 2 cm 이상 되는 전체 뿌리 길이를 CI203 Root length kit로 측정, 뿌리의 발생 위치, 뿌리의 목질화 정도를 측정 조사하였다.

Table 6. 삼목방법별 공시재료의 특성 및 처리내용

삼목방법	수량 (본)	모수 년령 (년)	채취시기	삼수크기		호르몬 처리
				삼수장 (cm)	삼수직경 (mm)	
시 기 별	180	25	2002. 7. 12.~8.17. (1주 간격, 6회)	12.6±5.4	4.12±1.27	IBA 40ppm (18시간)
모수년령별	210	2,5,10,17 20,25,32	2002. 7. 17.	13.1±5.4	5.41±4.38	〃
호르몬 종류와농도별	480	30	2002. 7. 17.	14.1±2.0	4.25±1.0	IBA 20,40,60,80,100ppm NAA 20,40,60,80,100ppm IAA 50,100,150,200ppm
채취부위별	90	32	2002. 7. 19.	8.1±6.3	3.88±0.71	IBA 40ppm (18시간)
잎의 갯수별	180	30	2002. 7. 19.	11.4±1.6	4.12±1.05	〃

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 삼목 채취시기별 삼목

Table 7 에서처럼 삼수의 채취 시기가 삼목 발근에 영향을 미치고 있었다.

본 실험에서 7월20일 채취한 삼수가 발근율 90%로 가장 좋은 반면 8월10일 56.7%, 7월 12일 53.3%, 8월 17일 50.0%로 삼수 채취가 늦어질수록 발근율이 점차 떨어지고 있어, 발근율이 가장 양호한 7월 20일과 가장 낮은 8월 17일을 비교할 때 절반 가까이 발근율이 떨어짐을 알 수 있었다.

Fig. 20에서와 같이 발근된 뿌리의 부정근 형성과 전체뿌리길이에서는 발근율이 가장 좋은 7월 20일에서 부정근 발생 수 16.0개 전체뿌리 길이 113.8 cm로 가장 높게 나타난 반면, 이에 비하여 발근율이 낮은 7월 12일은 부정근 발생 수 43.7%, 전체뿌리길이 55.4%가 줄어들었으며, 8월 17일은 부정근 발생 수 70.6%, 전체뿌리길이 81.2%가 감소하였다.

또한 뿌리의 발생 위치는 7월 12일, 7월 20일, 7월 27일은 주로 절단부에서 뿌리가 발생한 반면 8월 10일과 8월 17일은 절단면 뒷부분과 절단상부에서 뿌리가 발생하였는데 식물호르몬 IBA 40 ppm을 처리한 영향으로 사료된다.

최(1998) , 김(1998) 연구한 '황칠나무 번식법에 관한 연구'와 '황칠나무의 발근력 증진 시험'에서 황칠나무 삼목 적기인 7월 중순부터 8월 초순경의 녹지상태에 실시하는 것이 가장 좋다는 연구결과를 토대로 시험한 결과를 볼 때 황칠나무 삼수 채취의 최적기는 7월 20일에서 7월 30일 사이에 실시하는 것이 가장 좋을 것으로 사료된다.



Table 7. 황칠나무 삼수채취시기별 발근수와 발근율

채취 시기	삼목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전체뿌리 길이(cm)	발근 위치
7월 12일	30	16	53.3 <sup>c</sup>	1	3.0 <sup>d</sup>	13	43.3 <sup>a</sup>	0	0.0	0	0	9.0 <sup>c</sup>	50.7 <sup>c</sup>	절단전면
7월 20일	30	27	90.0 <sup>a</sup>	3	10.0 <sup>c</sup>	0	0.0 <sup>f</sup>	0	0.0	0	0	16.0 <sup>a</sup>	113.8 <sup>a</sup>	절단전면
7월 27일	30	25	83.3 <sup>b</sup>	3	10.0	2	6.7 <sup>e</sup>	1	1.2	0.5	2	12.4 <sup>b</sup>	85.0 <sup>b</sup>	절단전면
8월 3일	30	20	66.7 <sup>c</sup>	4	13.3 <sup>b</sup>	6	20.0 <sup>d</sup>	0	0.0	0	0	3.5 <sup>d</sup>	14.0 <sup>f</sup>	
8월 10일	30	17	56.7 <sup>d</sup>	6	20.0 <sup>a</sup>	7	23.3 <sup>c</sup>	0	0.0	0	0	5.3 <sup>d</sup>	17.7 <sup>e</sup>	절단전면 윗·상
8월 17일	30	15	50.0 <sup>f</sup>	6	20.0 <sup>a</sup>	9	30.0 <sup>b</sup>	0	0.0	0	0	4.7 <sup>d</sup>	21.4 <sup>d</sup>	절단부 윗·상
합계(평균)	180	120	(66.7)	23	(12.8)	37	(20.5)					(8.5)	(50.4)	

1. 공통글자 평균은 DMRT 5% 수준에서 처리간에 유의적인 차이가 없었다.

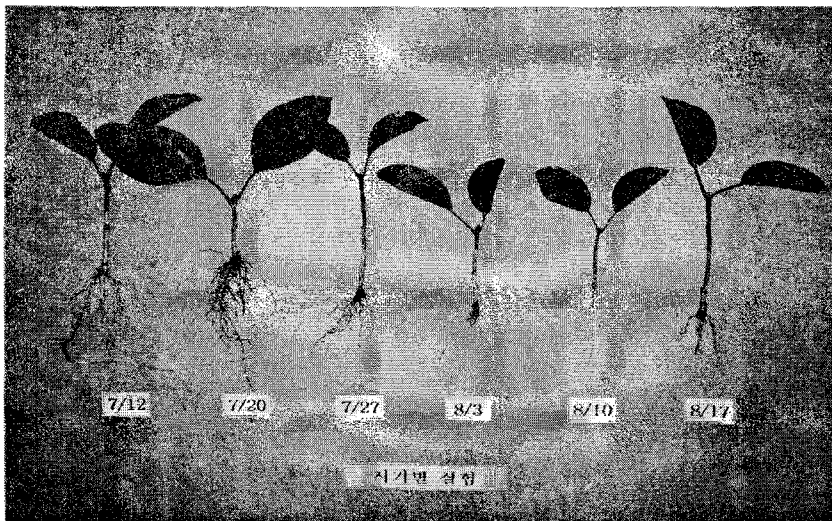


Fig. 20. 황칠나무 삼수채취 시기별 발근수와 발근율 비교

#### 나. 모수연령별 삼목

Table 8에서 보는 바와 같이 황칠나무 삼수의 발근율은 2년생부터 32년까지 연령별로 다양하게 나타났다.

발근율은 25년생에서 100%로 가장 높게 나타났으며, 2년생, 10년생, 17년생은 각각 90.0%, 93.3%, 93.3%로 5% 범위 내에서 유의적인 차이가 없었고, 5년생 86.7%, 20년생은 63.3%로 낮게 나타났다.

신초의 발생에서는 모수 32년생이 26.7%로 가장 높게 나타났으며, 발근율이 가장 낮은 10년생과 20년생은 신초가 전혀 발생하지 않았다. 신초의 길이와 잎 수는 5년생이 각각 2.1cm와 4.2개로 가장 높았고, 2년생이 각각 0.1 cm와 1.0개로 낮게 나타났다.

뿌리의 부정근 형성관계에서 2년생이 부정근 형성수 60.3개 전체뿌리길이 265.1 cm로 가장 높은 반면 발근율이 가장 낮은 10년생은 7.8개 57.0 cm로 2년생에 비하여 각각 80.7%와 78.4%로 줄어들었다. 또한 발근율이 가장 양호한 25년생은 각각 8.7개 48.8 cm로 2년생에 비하여 각각 85.5%와 81.5%가 줄어든 것으로 나타났다. 뿌리의 상태는 Fig. 21에서 보는 것과 같이 나타났다. 발근 위치는 대부분 연령층이 절단면 전체에서 고르게 나타난 반면 2년생은 절단부 전체와 상단 2.5 cm에서 부정근이 발생하였다. 이와 같은 결과는 황칠나무 삼목은 오(1996, 1976, 1987)의 동백나무, *Metasequoia*와 Flowering dogwood의 삼목 시 부정근의 형성수와 발근율이 모수 연령 증가함에 따라 떨어진다는 연구결과와는 일치하지 않았다. 그 것은 황칠나무의 삼목 모수의 선정이 맹아에 의해서 성숙 목으로 자랐기 때문에 정확하게 모수 연령을 확인하는데 어려움이 있었다. 따라서 연령이 증가 증가하는 20년 이상에서 일정한 경향치가 나타나지 않고 있다. 발근 후 나무의 생장에 영향을 미치는 부정근 형성관계에서는 대체적으로 연령이 낮을수록 높게 나타나는 경향이 뚜렷하였다. 따라서 황칠나무 삼목 시 어린 모수는 발근율이 높다고 할 수 있으나 대량의 삼수 확보가 어려우므로 가능한 17년생 내외에서 삼목이 잘된 우량 개체목을 선발하여 모수로 이용함이 보다 효율적인 증식법으로 사료된다.

Table 8. 황칠나무 삽수 모수연령별 발근수와 발근율

연령별	삽목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형상수	전체뿌리 길이(cm)	발근 위치
2년생	30	28	90.0 <sup>c</sup>	0	0.0	3	10.0 <sup>c</sup>	2	16.7	0.1	1.0	60.3 <sup>a</sup>	264.1 <sup>a</sup>	절단전면 상2.5cm
5년생	30	26	86.7 <sup>d</sup>	0	0.0	4	13.3 <sup>b</sup>	5	25.0	2.10	4.2	14.3 <sup>c</sup>	120.6 <sup>b</sup>	절단전면
10년생	30	28	93.3 <sup>b</sup>	0	0.0	2	6.7 <sup>d</sup>	0	0.0	0	0	7.8 <sup>e</sup>	57.0 <sup>e</sup>	절단전면
17년생	30	28	93.3 <sup>b</sup>	0	0.0	2	6.7 <sup>d</sup>	2	6.7	0.65	2.0	17.4 <sup>b</sup>	101.2 <sup>c</sup>	절단전면
20년생	30	19	63.3 <sup>f</sup>	0	0.0	11	36.7 <sup>a</sup>	0	0.0	0	0	3.7 <sup>f</sup>	30.3 <sup>e</sup>	절단전면
25년생	30	30	100 <sup>a</sup>	0	0.0	0.0	0.0 <sup>e</sup>	6	19.4	0.66	2.0	8.7 <sup>de</sup>	48.8 <sup>f</sup>	절단전면
32년생	30	24	80.0 <sup>c</sup>	2	6.7	4	13.3 <sup>b</sup>	8	26.7	1.0	3.0	9.7 <sup>d</sup>	84.2 <sup>d</sup>	절단전면
합계 (평균)	210	182	(86.7)	2	(1.0)	26	(86.7)					(17.1)	(101.0)	

1. 공통글자 평균은 DMRT에 의한 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

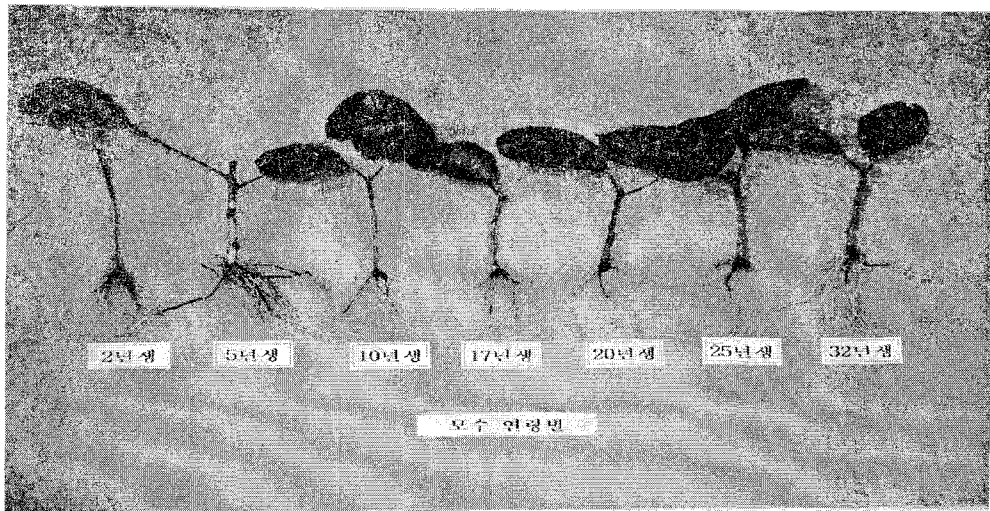


Fig. 21. 황칠나무 삽수 모수연령별 발근수와 발근율 비교

다. 호르몬의 종류와 농도별 삽목

본 실험은 황칠나무의 삽목발근에 적절한 Auxin 농도를 밝히고자 삽수기부를 IBA, IAA, NAA의 희석 농도별로 일정시간 침적 후 삽목 하였고, 그 결과는 Table 9, 10, 11에서와 같이 발근 촉진호르몬을 저농도로 처리하였을 때 폭넓은 발근 효과를 나타내고 있었다.

1) NAA의 농도별 발근 효과

Table 9에 나타난 바와 같이 NAA호르몬 농도별 처리에서 발근율은 60 ppm에서 80.0%로 가장 높게 나타난 반면, 저농도 20 ppm에서는 70.0%, 고농도100 ppm에서는 43.3%로 가장 낮게 나타났으며, 무처리에서는 63.3%로 나타났다.

Table 9. NAA 호르몬 농도별 발근수와 발근율

호르몬 (ppm)	삽목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전체 길이(cm)	발근 위치
※ 무처리	30	19	63.3 <sup>d</sup>	5	16.7 <sup>a</sup>	6	20.0 <sup>d</sup>	8	28.6	1.6	4.6	5.8 <sup>d</sup>	28.2 <sup>e</sup>	
NAA20	30	21	70.0 <sup>b</sup>	4	13.3 <sup>b</sup>	5	16.7 <sup>c</sup>	8	26.7	1.10	3.6	13.2 <sup>ac</sup>	90.2 <sup>a</sup>	절단면 중·하단
NAA40	30	20	66.7 <sup>c</sup>	2	6.7 <sup>c</sup>	8	26.7 <sup>b</sup>	1	3.3	0.40	2.0	12.4 <sup>ac</sup>	66.2 <sup>d</sup>	절단면 중·하단
NAA60	30	24	80.0 <sup>a</sup>	2	6.7 <sup>c</sup>	4	13.3	8	26.7	0.30	1.8	11.1 <sup>c</sup>	64.6 <sup>d</sup>	절단전면
NAA80	30	18	60.0 <sup>e</sup>	5	16.7 <sup>a</sup>	7	23.3 <sup>c</sup>	4	13.3	0.20	2.8	13.5 <sup>b</sup>	77.2 <sup>c</sup>	절단면 상1.0cm
NAA100	30	13	43.3 <sup>f</sup>	1	3.3 <sup>d</sup>	16	53.3 <sup>a</sup>	1	3.3	0.20	2.0	15.8 <sup>a</sup>	81.1 <sup>b</sup>	절단면 상2.0cm
합계 (평균)	150	96	(64.0)	14	(9.3)	40	(26.7)					(13.2)	(75.8)	

1. 공통글자 평균은 DMRT에 의한 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

신초의 발생은 NAA20 ppm, 60 ppm에서 각각 26.7%로 나타났으며, 신초의 길이는 20 ppm에서 60 ppm의 1.5 cm에 비하여 5.5 cm로 잎수는 1.5개에 비하여 3.6개로 높게 나타났다.

뿌리발생에서 부정근 형성은 NAA 20 ppm에서 13.2개 높게 나타난 반면 40 ppm에서 12.4개, 60 ppm 11.1개로 점차 낮아지다 80 ppm에서 13.5개로 다시 높아져 100 ppm에 15.8개 가장 높았고 무처리는 5.8개로 나타났다. 전체 뿌리길이는 20 ppm이 90.2 cm로 가장 높은 반면 이에 비하여 60 ppm에서는 28.2% 낮은 66.2 cm로 나타났으며, 무처리에서는 28.2 cm로 나타났다. Fig. 22에서 보는 바와 같이 뿌리의 목질화 정도는 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm 순으로, 발근 위치는 20~40 ppm은 절단부 중·하단부에서 부정근 형성된 반면 60 ppm에서는 절단부 전체, 80 ppm은 절단부 전체와 상단 1 cm까지, 100 ppm은 절단부 전체와 상단 2cm까지 점진적으로 NAA의 농도가 높아질수록 뿌리 발생 위치도 높아짐을 알 수 있었다.

본 실험 결과 오(1996.)의 동백나무 삽목 연구에서 NAA 80 ppm에서 최적의 발근을 보였다고 발표한 것에 비하여 황칠나무는 60 ppm에서 최적의 발근율을 보였다. 이 같은 이유는 황칠나무의 목질부가 동백나무에 비하여 더 유연한 결과로 사료되고, NAA 100 ppm에서는 호르몬 영향에 의하여 부정근 발생 위치가 상승하거나 고농도 처리에 의하여 삽수의 기부가 검게 변하여 고사율이 높은 것을 볼 수 있었으며, 이러한 현상으로 호르몬 처리가 삽수 발근에 뚜렷한 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다

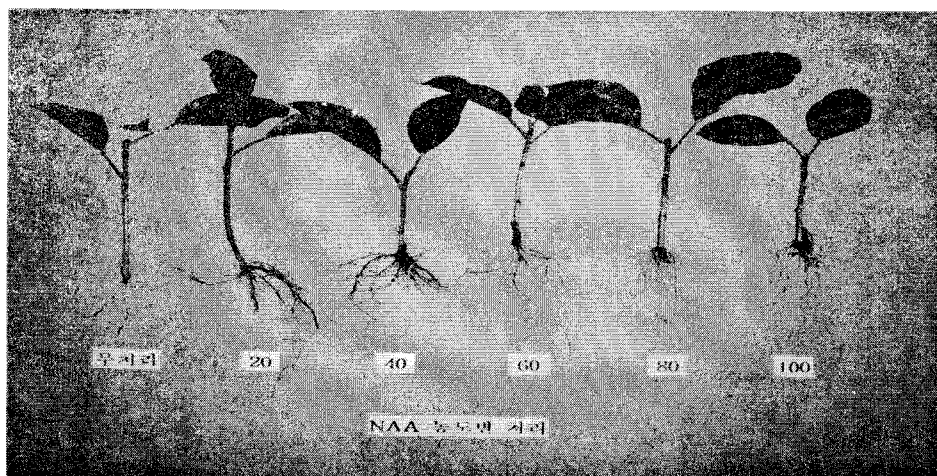


Fig. 22. NAA 호르몬 농도별 발근수와 발근율 비교

## 2) IBA의 농도별 발근 효과

IBA 농도별 발근율은 Table 10에서 보는 바와 같이 IBA 20 ppm에서 발근율이 100%인 반면 농도가 높아질수록 발근율이 떨어져 80 ppm에서는 83.3%로 20 ppm에 비하여 낮은 발근율을 보였으나, IBA 100 ppm에서는 93.3%로 다시 높은 발근율을 보였다.

이와 같은 결과는 삽목 후 발근 조사 시점이 7개월 만에 이루어진 것으로 판단된다. 신초의 발생에서는 IBA 60 ppm에서 신초발생 36.7%로 가장 높았으나 신초의 평균 잎 수는 IBA 40 ppm에서 5개로 가장 높게 나타났다.

Fig. 23에서 보는 것과 같이 뿌리 발생에서 부정근 형성은 IBA 80 ppm에서 21.5개로 나타났으며, 전체뿌리의 길이는 40 ppm에서 209.3cm로 부정근 형성수가 가장 높은 80 ppm에 비하여는 70%높게 증가한 결과를 보였고, 20 ppm에서 144.2%가 증가하였다. 뿌리의 목질화는 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 20 ppm, 100 ppm 순으로 부정근이 형성되었음을 알 수 있었다. 뿌리의 발생 위치는 20ppm이 절단면 중·하단지역에서 부정근이 발생되었고, 40 ppm은 절단면 전체와 상단 1 cm에서 Callus의 형성 없이 발근이 되었으며, 60 ppm은 절단면 전체와 절단면 뒷면에서 수피가 갈라지면서 발근이 되었고, 80 ppm은 절단면 전체와 상단 1.5 cm까지 Callus가 형성되지 않은 상태에서 발근이 이루어 졌으며, 100ppm은 절단부 뒷면과 상단 1 cm 부근 엽자루 부근에서 집중적으로 발생하는 등 호르몬 농도에 따른 부정근 발생 위치가 다르게 나타났다. 이와 같은 현상은 IBA의 고농도에 의하여 절단면은 손상을 입은 반면 줄기의 수피 부분을 자극하여 발근이 이루어 졌음을 알 수 있었다.

이와 같은 결과로 보아 황칠나무 삽목 시 IBA가 NAA, IAA에 비하여 삽수의 부정근 형성에 깊게 관여하고 있음을 알 수 있었고, 이러한 결과는 오(1996)가 실시한 동백나무의 삽목 연구에서의 결과와 일치 하였으나, 최(1998)의 황칠나무 발근 촉진제 처리효과 시험에서 식물생장호르몬에 2시간 동안 침적 후 마사토에 삽목한 결과 IBA 10 ppm 38%, IBA 50 ppm 63%, IBA 100 ppm 89%, IBA 150 ppm 60%의 결과와 비교할 때 상반된 결과로 볼 수 있다. 이러한 결과는 침적시간과 배양토에 기인한 것으로 판단된다. 따라서 위와 같은 식물생장호르몬 처리에 의한 황칠나무의 삽목에 대하여 발근율과 전반적인 뿌리의 발달관계를 종합할 때 IBA 40 ppm에 18시간침적 후 실시하는 것이 최적이라고 판단된다.

Table 10. IBA 호르몬 농도별 발근수와 발근율

호르몬 (ppm)	삽목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전체뿌리 길이(cm)	발근 위치
IBA20	30	30	100 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	8	26.7	0.48	3.2	11.5 <sup>d</sup>	85.7 <sup>e</sup>	절단면 중·하단
IBA40	30	28	93.3 <sup>b</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	2	6.7 <sup>a</sup>	2	6.7	1.00	5.0	19.1 <sup>b</sup>	209.3 <sup>a</sup>	절단전면 상단1cm
IBA60	30	26	86.7 <sup>c</sup>	3	10.0 <sup>b</sup>	1	3.3 <sup>b</sup>	11	36.7	1.02	2.4	15.4 <sup>c</sup>	106.2 <sup>c</sup>	" 절단뒷면
IBA80	30	25	83.3 <sup>d</sup>	3	10.0 <sup>b</sup>	2	6.7 <sup>a</sup>	1	3.3	0.30	1.0	21.5 <sup>a</sup>	123.1 <sup>b</sup>	절단전면 상단1.5cm
IBA100	30	23	76.7 <sup>e</sup>	6	20.0 <sup>a</sup>	1	3.3	2	6.7	0.25	2.0	18.5 <sup>b</sup>	97.7 <sup>d</sup>	절단뒷면 상단1cm
합계 (평균)	150	137	(91.3)	12	(8.0)	6	(4.0)					(14.3)	(124.4)	

1. 공통글자 평균은 DMRT 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

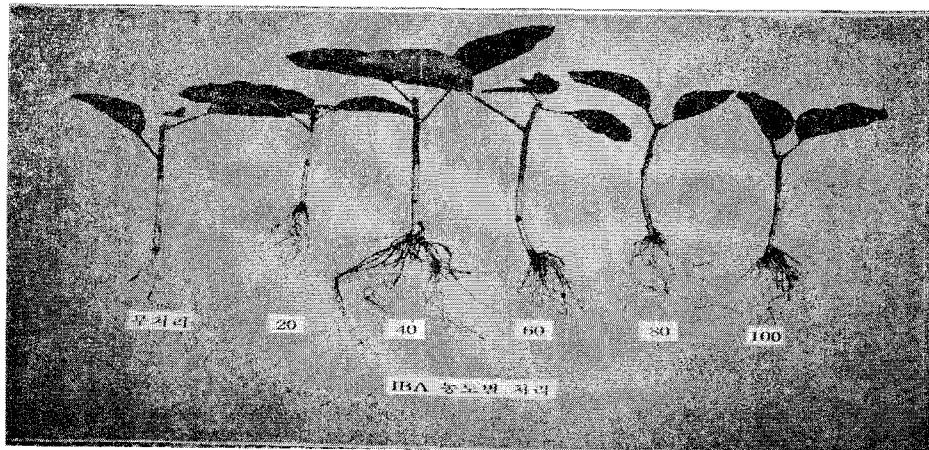


Fig. 23. IBA 호르몬 농도별 발근수와 발근율 비교

### 3) IAA의 농도별 발근 효과

Table 11에 나타난 바와 같이 IAA 50 ppm의 낮은 농도에서 발근율이 93.3%로 가장 높게 나타난 반면 고농도로 갈수록 Callus의 형성이 높게 났다.

신초의 발생 또한 발근율이 높은 IAA 50 ppm에서 36.7%와 잎수 3.2개로 가장 높게 나타났다. 뿌리형성관계는 Fig. 24에서 보는 바와 같이 부정근 형성수는 IAA 100 ppm에서 발근율이 가장 높은 50 ppm 7.3개 보다 28.7%가 높은 9.4개 나타났고, 전체의 뿌리길이도 62.6cm로 50 ppm에 비하여 11.5%가 높게 나타났다. 또한 뿌리의 목질화 등 뿌리 상태는 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm순으로 나타나 발근율이 높은 저농도에서 먼저 발근이 이루어졌음을 알 수 있었다. 발근 위치는 50 ppm과 100 ppm은 절단면 하단부에서 발생하였고, 150 ppm과 200 ppm은 절단면 중·하단부에서 발생되어 고농도로 갈수록 발근 위치가 높아짐을 알 수 있었다.

이러한 결과는 오(1996)<sup>1)</sup>의 동백나무 실험에서 IAA 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm에서 발근율이 각각 6.7%, 6.7%, 8.3%, 20%로 저농도에서 낮게 나타나고 고농도로 갈수록 높게 나타나는 결과와 상반되었고, 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 IAA에 의한 황칠나무 삽목은 IAA 50 ppm과 100 ppm 사이에서 실시하는 것이 최적이라 판단된다.



Table 11. IAA 호르몬 농도별 발근수와 발근율

호르몬 (ppm)	삼목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전뿌리 길이(cm)	발근 위치
IAA50	30	28	93.3 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>d</sup>	2	6.7 <sup>b</sup>	11	36.7	1.96	3.2	7.3 <sup>b</sup>	56.1 <sup>b</sup>	절단면 하단
IAA100	30	22	73.3 <sup>c</sup>	2	6.7 <sup>c</sup>	6	20.0 <sup>a</sup>	11	34.4	1.62	3.8	9.4 <sup>a</sup>	62.6 <sup>a</sup>	절단면 하단
IAA150	30	24	80.0 <sup>b</sup>	4	13.3 <sup>b</sup>	2	6.7 <sup>b</sup>	2	6.7	0.25	0.6	6.6 <sup>c</sup>	48.1 <sup>b</sup>	절단면 중하단
IAA200	30	20	66.7 <sup>d</sup>	9	30.0 <sup>a</sup>	1	3.3 <sup>c</sup>	4	13.3	0.25	2.8	8.0 <sup>a</sup>	62.3 <sup>ab</sup>	절단면 중하단
합계 (평균)	120	95	(77.9)	15	(12.3)	12	(9.8)					7.8	57.3	

1. 공통글자 평균은 DMRT에 의한 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

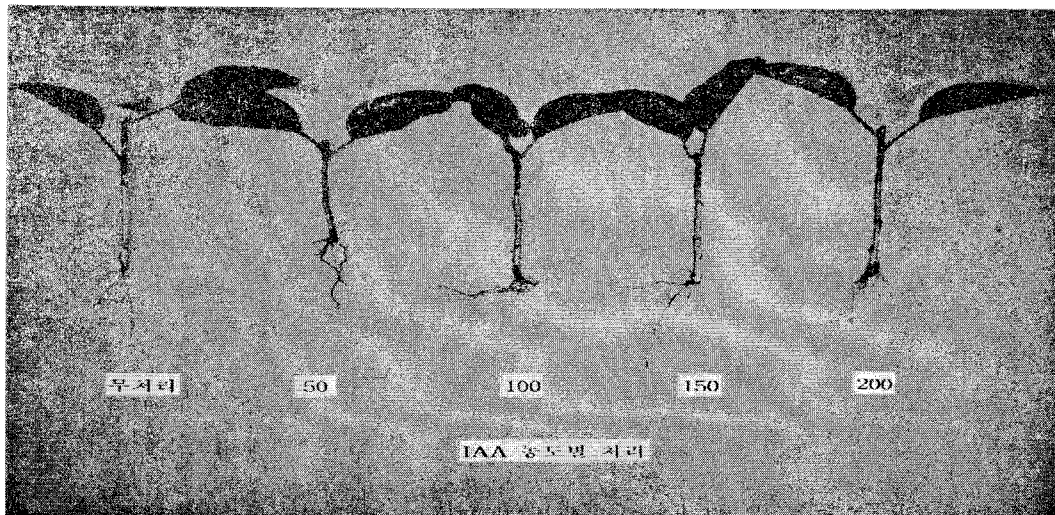


Fig. 24. IAA 호르몬 농도별 발근수와 발근율 비교

#### 바. 삼수채취 부위별 삼목

황칠나무의 삼수채취 부위별 발근 관계를 규명하기 위하여 황칠나무 수관을 중방향 길이로 상·중·하 3등분하여 삼목 하였으며, 결과는 Table 9와 같다.

Table 12에서 보는 바와 같이 상단과 중앙부에서 각각 5% 범위 내에서 유의적인 차이가 없는 86.7%, 90.0%의 높은 발근율을 보이고 있었으며, 하단부는 76.0%의 발근율을 보였다. 신초의 발생은 중간부에서 3.3%가 발생한 반면 상단과 하단은 전혀 발생되지 않았다.

뿌리 발생관계에서는 Fig. 25에서 보는 바와 같이 발근율이 가장 양호한 중간부에서 부정근 16.4개와 전체뿌리 길이 84.2 cm로 상·하단에 비하여 높게 나타났으며, 상단과 하단은 중간부에 비하여 각각 28.1%, 58.6%로 낮은 결과를 나타내었다. 뿌리의 목질화 정도는 상, 중, 하 순으로 상단부에서 채취한 삼수가 먼저 발근이 되었음을 알 수 있었다. 뿌리의 발생 위치는 상단부와 하단부는 절단면 전체와 절단 상단 0.5cm에서 발근이 되었고, 중간부는 절단면 전체와 절단면 뒷부분에서 발근되는 현상을 보였다.

위와 같은 삼수 채취 부위별 발근율과 뿌리상태를 종합적으로 비교할 때 황칠나무의 삼수 채취는 중간부에서 채취하는 것이 최적으로 사료되므로, 황칠나무를 삼목용 모수로 육성 시 중간부를 삼수로 이용할 수 있도록 특별히 관리해야 된다. 이러한 결과는 오(1996) 동백나무 삼목 연구에서 상 25.0%, 중40.0%, 하 75.0%로 하단부로 갈수록 발근율이 높은 것과는 상반되었다.

Table 12. 삼수 채취 부위별 발근수와 발근율

채취 부위	삼목 본수 (본)	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전체뿌리 길이(cm)	발근 위치
상	30	26	86.7 <sup>b</sup>	0	0.0 <sup>b</sup>	4	13.3 <sup>a</sup>	0	0.0	0	0.0	12.3 <sup>b</sup>	60.5 <sup>b</sup>	절단전면 상단0.5cm
중	30	27	90.0 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>b</sup>	3	10.0 <sup>c</sup>	1	3.3	0.1	1.0	16.4 <sup>a</sup>	84.2 <sup>a</sup>	절단전면 절단뒷면
하	25	19	76.0 <sup>c</sup>	3	12.0 <sup>a</sup>	3	12.0 <sup>b</sup>	0	0.0	0	0.0	7.1 <sup>c</sup>	34.8 <sup>c</sup>	절단전면 상단0.5cm
합계 (평균)	85	72	(84.7)	3	(3.5)	10	(11.8)					(11.9)	(59.8)	

1. 공통글자 평균은 DMRT에 의한 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

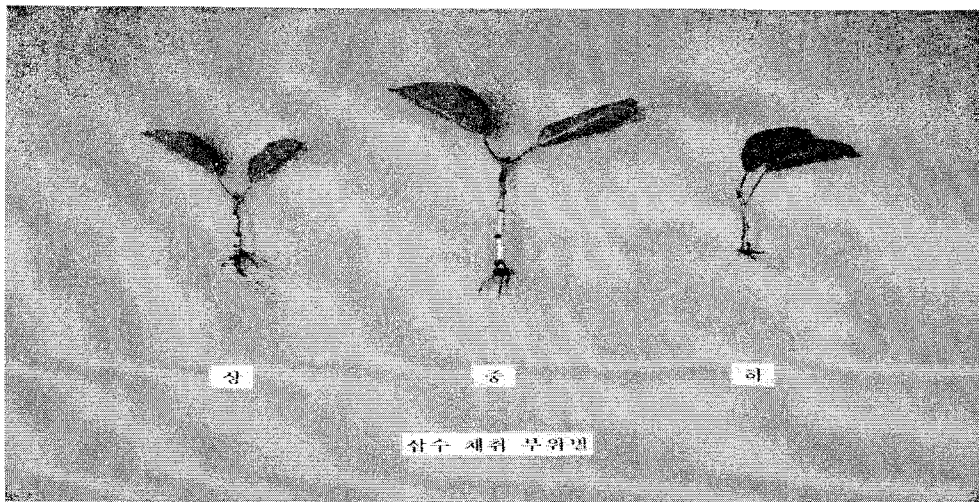


Fig. 25. 삼수 채취 부위별 발근수와 발근율 비교

#### 마. 삼수에 달린 잎의 개수별 삼목

Table 13에서 보는 바와 같이 삼수에 달린 잎의 개수에 따른 발근율 규명하고자 본 실험을 실시한 결과 잎이 하나도 없는 0개 일 경우 전체가 고사하였고, 잎이 2.0개일 때 86.7%의 발근율을 보였으며, 1.5개일 때와 3.0개 일 때 각각 5%범위 내에서 유의적인 차이가 없는 73.3%와 76.7%의 발근율을 보였고, 잎이 0.5개 일 때와 1.0개일 때 각각 63.3%, 66.7%의 발근율을 보였다. 신초 발생은 삼수의 잎이 1.5개 일 때와 2.0개일 때 각각 16.7%로 발생율이 가장 높았고, 신초의 길이나 잎의 개수에 따른 발생율은 1.0개일 때 가장 양호하였으며, 0.5개와 1.0개는 전혀 발생하지 않았다.

뿌리의 발생 상태에서 부정근의 형성은 잎이 2개 일 때 18.5개로 가장 높았으며, 잎이 1.0개와 3.0개일 때는 발근율이 높은 2개 일 때 보다 각각 45.9%, 34.0%가 감소하는 경향을 보였다. 전체뿌리길이는 잎이 2.0개일 때 114.0cm로 가장 높게 나타났다. 잎이 1.0개와 3.0개에 비하여 각각 111.8%와 68.8%가 줄어든 결과가 나타났다. 뿌리의 목질화 정도는 1.5개, 2.0개, 3.0개, 1.0개, 0.5개 순으로 1.5개와 2.0개일 때 발근이 가장 먼저 됨을 알 수 있었다. 뿌리의 발생 위치에서는 Fig. 26에서 보는 바와 같이 0.5개와 1.0개는 절단면 전체와 절단 상단에서 주로 발생하였고, 1.5개일 때는 절단면 중앙부에서 2.0개와 3.0개는 하단부에서 발생됨을 알 수 있었다.

Table 13. 삼수에 달린 잎의 개수별 발근수와 발근율

잎의 개수 (개)	삼목 본수	발근 수		Callus 수		고사본수		신초발생				뿌리발생		
		본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	본수	비율 (%)	발생 수	비율 (%)	길이 (cm)	엽수 (개)	부정근 형성수	전체 길이 (cm)	발근 위치
0	30	0	0.0 <sup>f</sup>	0	0.0 <sup>d</sup>	30	100.0 <sup>a</sup>	0	0.0	0	0	0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>f</sup>	
1	30	20	63.3 <sup>d</sup>	4	13.3 <sup>a</sup>	7	23.3 <sup>a</sup>	0	0.0	0	0	14.0 <sup>b</sup>	60.3 <sup>d</sup>	절단전면
1.0	30	18	60.0 <sup>e</sup>	1	3.3 <sup>b</sup>	11	36.7 <sup>b</sup>	0	0.0	0	0	10.3 <sup>d</sup>	53.8 <sup>e</sup>	절단전면
1.5	30	22	73.3 <sup>c</sup>	0	0.0 <sup>c</sup>	8	26.7 <sup>c</sup>	5	16.7	0.82	3.6	15.5 <sup>b</sup>	93.1 <sup>b</sup>	절단중·하단부
2.0	30	26	86.7 <sup>a</sup>	1	3.3 <sup>b</sup>	3	10.0 <sup>e</sup>	5	16.7	1.40	3.4	18.5 <sup>a</sup>	114.0 <sup>a</sup>	절단하단부
3.0	30	23	76.7 <sup>b</sup>	4	13.3 <sup>a</sup>	3	10.0 <sup>e</sup>	1	3.3	0	0.0	12.2 <sup>c</sup>	67.5 <sup>c</sup>	절단하단부
합계 (평균)	180	108	(60.0)	10	(5.6)	62	(34.4)					(14.1)	(77.7)	

1. 공통글자 평균은 DMRT에 의한 5% 수준에서 처리 간에 유의적인 차이가 없었다.

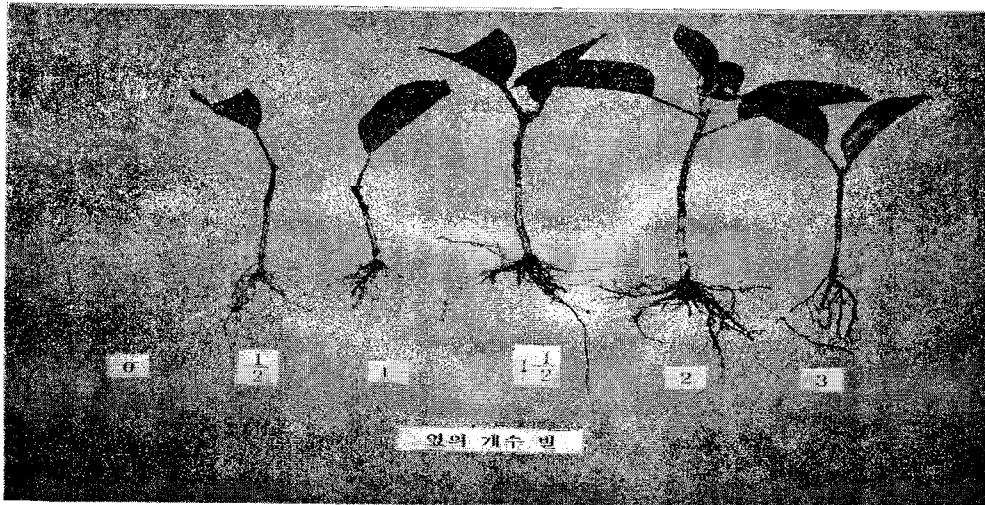


Fig. 26. 삼수에 달린 잎의 개수별 발근수와 발근율 비교

이러한 결과는 오(1996)<sup>1)</sup> 동백나무 삼목 연구에서도 1.5개와 2.0개일 발근율이 높다는 연구결과와 일치하였다. 위와 같은 연구 결과를 종합하여 볼 때 황칠나무 삼목 시 적정한 잎의 개수는 1.5개에서 2.0개임을 알 수 있었다.

이상의 녹지삼목을 중심으로 황칠나무 삼목 증식법 개발에 관한 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 7월 12일부터 8월 17일까지 일주일 간격으로 6회에 걸쳐 삼수를 채취 실험한 결과 7월 20일이 90.0%로 발근율이 가장 높았으나, 뿌리의 부정근 형성수와 전체 뿌리길이에서는 7월 27일이 가장 양호한 하였고, 7월 12일과 8월 17일에는 발근율과 부정근 형성 등이 현저하게 낮아졌다.

나. 모수년령별 삼목에서 2년생, 10년생, 17년생은 각각 93.3%, 93.3%, 91.7%로 높은 발근율을 보였고, 32년생은 80.0%로 발근율이 다소 낮은 발근율을 보였다. 모수 연령에 따른 발근율에는 뚜렷한 차이가 없었지만, 뿌리 발생에서 부정근과 전체 뿌리의 길이에서는 연령이 낮을수록 높게 나타났다.

다. NAA, IBA, IAA의 식물 생장호르몬 농도별 삼목실험에서 NAA는 60ppm, IBA는 40ppm, IAA는 50ppm과 100ppm의 사이에서 발근율, 부정근 형성, 전체의 뿌리 길이 등이 가장 양호한 결과를 보였다.

라. 황칠나무 전체 수관을 종 방향으로 상·중·하로 구분하여 삼수를 채취 삼목한 결과 중간부에서 90.0%의 발근율과 부정근 형성수 및 전체의 뿌리길이 등에서 가장 양호한 결과를 보였으며, 상단과 하단 순으로 발근율과 부정근 형성수 등이 낮아졌다.

마. 삼수에 달린 잎의 개수별 발근율을 규명하기 위하여 삼수의 잎을 0개, 1개, 1½개, 2.0개, 3.0개를 삼목한 결과 2.0개에서 86.7% 발근율과 부정근 형성 및 전체뿌리길이 등에서 가장 양호한 반면 잎은 0개인 경우 전체가 고사한 하였고, 잎이 3.0개일 때도 76.7%의 낮은 발근율을 보였다.

## 7절 황칠나무의 우수개체 선발 AFLP marker 개발

### 1. 서론

황칠나무의 수액분비량이나 수액성분의 구성에 있어 개체간 차이가 있었으며, 이를 기준으로 현재 남해안 일대에 자생하는 황칠개체 중 우수개체의 선발에 대한 필요성은 본 연구 이외에도 제기된 바 있다. 본 연구진도 약 500개체를 무작위 선발하여 수액량 기준으로 우수분비개체를 선정하고 이를 대상으로 번식과 육종을 위한 연구를 수행하고자 하였다. 그러나 수액의 채취는 매우 번거롭고 힘든과정이며, 이에 따라 보다 정확하고 간단한 유전자 마커의 개발할 필요성이 제기되었다.

### 2. 연구내용 및 방법

AFLP 분석에 이용한 재료는 선발개체 보길도 27번과 40번을 대조군으로는 보길도 34번과 서2001년 9월 채취된 황칠나무 잎을 사용하였으며, 분석은 Gibco BRL AFLP 분석방법과 Mano's modified protocol을 적용 수행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

Table 14에서는 보이는 64 조의 상용 selective primer를 사용하여 수액분비가 우수한 선발개체(보길 27, 보길 40번)와 수액분비가 저조한 대조군 개체(보길33, 해남)를 사용하여 AFLP fingerprint 방법을 사용하였다.

그 결과 4개체 모두가 인자형(genotype)이 다른 것으로 조사되었으며, 보길 27과 보길 40개체에서는 각각 28개의 specific band가 나타났고, 우수개체(보길 27, 보길 40)에만 나타나고 저조개체 (보길 34, 해남)에는 나타나지 않는 분자표지 가능성이 있는 14개 specific band가 보였다(Fig. 26). 또한 이러한 band 유무를 기준으로 NT-SYS를 통한 phylogenetic dendrogram을 작성하여 본 결과 서식환경과는 상관관계를 유추하기 어려웠으며, 칠액분이이로서 칠액 분비 우수개체를 찾아내고 검증할 수 있는 분자표지로서의 가능성있는 marker를 몇 개 찾아내고 현재 더 많은 개체를 대상으로 조사중에 있다.

Table 14. Selective primer pairs for AFLP analysis

	E-AAC	E-AAG	E-ACA	E-ACT	E-ACC	A-ACG	E-AGC	E-AGG
M-CAA	1	2	3	4	5	6	7	8
M-CAC	9	10	11	12	13	14	15	16
M-CAG	17	18	19	20	21	22	23	24
M-CAT	25	26	27	28	29	30	31	32
M-CTA	33	34	35	36	37	38	39	40
M-CTC	41	42	43	44	45	46	47	48
M-CTG	49	50	51	52	53	54	55	56
M-CTT	57	58	59	60	61	62	63	64

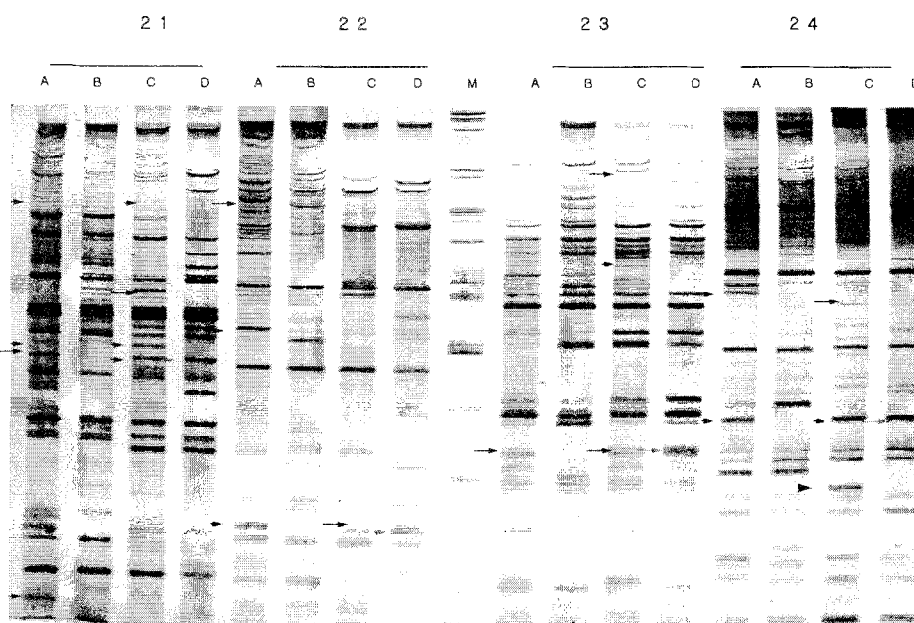


Fig. 26 AFLP gel analysis. A: Bogil 27, B: Bogil 40, C: Bogil 33, D: Haenam



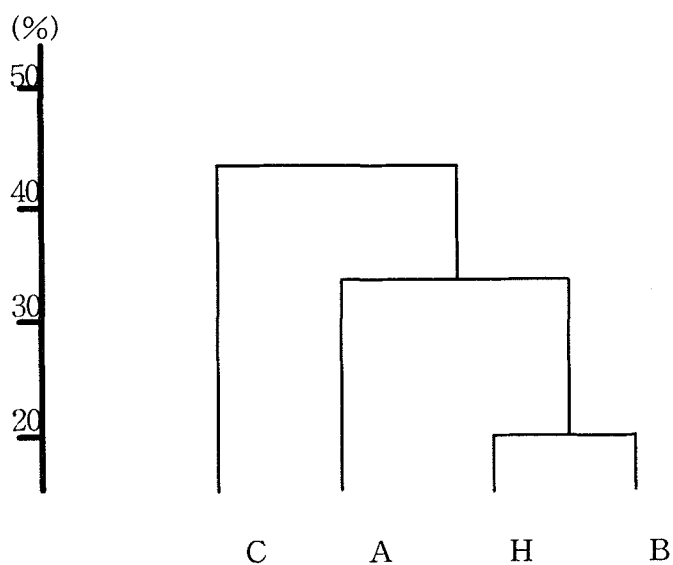


Fig. 27 Genetic dendrogram of studied selection individuals based on AFLP analysis. A: Bogil 27, B: Bogil 40, C: Bogil 33, H: Haenam

## 8절 황칠나무의 생리활성물질 탐색 및 잎 추출 엑스 제조

### 1. 서론

본 실험에서는 황칠 나무 잎의 서로 다른 추출물(증류수, 에탄올, 증류수와 ethanol을 1:1의 비율로 혼합한 추출물)을 이용한 다양한 생리활성 실험(항암, 면역, 동력학적 측정, 신경세포, 세포분화실험)을 통한 황칠나무 잎의 새로운 가치 부여에 그 의의가 있다.

### 2. 연구내용 및 방법

#### 가. 식물재료

본 실험에 사용한 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)의 잎은 2001년 4월말에 전남 완도군 보길도의 자생지에서 채취한 후 곧바로 실험실로 운반하여 물로 깨끗이 씻고 표면의 잔여수분이 제거될 정도로 상온에 방치하여 건조시킨 후 실험에 사용하였고 깨끗이 손질하여 추출 수율의 향상을 위해 잘게 분쇄한 후 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료중량 100g에 대하여 각각 10배의 증류수와 ethanol, 증류수와 ethanol을 1:1의 비율로 혼합한 추출용매를 사용하여 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조 한 뒤에 각각의 수율을 계산하였으며 Table 1에 나타내었다.

#### 나. 암세포의 성장저해 및 독성 실험

실험에 사용된 암 세포주는 인간 유래의 유방암세포(MCF7), 폐암세포(A549), 간암세포(Hep3B), 위암세포(AGS)를, 정상세포로는 인간 간세포(WRL-68)를 이용하였다. 세포배양에 사용된 기본배지는 A549와 AGS의 경우는 RPMI 1640(GIBCO, USA)을 MCF7, Hep3B는 DMEM(GIBCO, USA)이며 FBS(GIBCO, USA) 10%를 첨가하여 배양하였다. 실험에 사용한 세포의 초기농도는  $4 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절하여 96 well tissue culture microplate에  $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 씩 접종하여 사용하였다. 암세포의 생육저해와 정상세포의 세포독성은 sulforhodamineB (SRB)방법 과 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrazilium bromide(MTT)방법을 이용하였다. Selectivity의 측정은 각 암세포주의 생육억제 활성을 측정한 후 각 농도에서 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다.

#### 다. 면역세포 생육 및 Cytokines 분비 실험

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 MTT assay와 24well plate에 세포를 2.0×10<sup>4</sup>cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시켜 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 두 가지 방법을 사용하였다. 또한 면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Interleukine-6(IL-6)과 Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α)의 양은 ELISA kit(Genzyme, USA)를 이용하여 측정되어졌다. 우선 배양배지를 원심분리하여 상층액을 취한 다음 다양한 농도의 추출물들과 함께 37°C에서 30분간 배양 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질을 이용해 표준곡선을 작성하고 이에 시료에서 얻어진 O.D값을 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

#### 라. Microphysiometer를 이용한 세포 활성 측정

Microphysiometer(Molecular Devices, USA)는 약물에 대한 세포의 산도변화를 측정하는 장비로 1회용 capsule 안쪽의 다공성 여과 막 사이에 세포를 놓고 관심대상의 약물을 cell chamber안에 유입시키면서 제한된 시간 내에 배양한다. 이때 세포의 대사활성도의 변화는 산성물질의 방출속도 변화의 결과를 반영하며, 이 신호를 silicon sensor는 전기신호로 바꾸어 해석한다. Microphysiometer의 측정은 MTT assay나 SRB assay을 측정 할 때 비교 값으로 필요로 된다. 따라서, Microphysiometer의 측정은 항암 활성의 일반적인 측정의 결과와 비교되었고, 세포에 대한 감초 추출성분의 시간별 활성도 변화를 측정했다. Pump cycle은 total cycle time이 2분으로 하여 최종 측정되는 시간(start slope measurement(1min 28sec) → Stop slope measurement (1min 58sec))은 30초로 하였다. 그리고 측정된 수치의 표시는 약물투여 전에 running buffer만을 흘려보내면서 측정된 값이 일정하게 유지되어지는 임의의 선으로 baseline을 설정하고, 이것을 100%로 하여 이 baseline값에 대한 %로 표현되었다. Adherent cell은 보통 실험 1일전, capsule에 옮겨 안정화시킨다. Plate속에 있는 capsule cup에 3×10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 세포를 투여하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 24시간 안정화시킨 다음 측정할 때 spacer, insert를 차례로 넣은 후, plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정한다. 이때 running buffer는 세포의 growth medium으로 하였으며,

본 실험에서는 인간 간암세포인 Hep3B를 이용했고, running buffer로 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

#### 마. 분화 측정 방법(HL-60 cell의 differentiation)

HL-60(human promyelocytic leukemia) 세포는 5% heat-inactivated fetal bovine serum과 RPMI 1640 medium을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 continuous suspension culture로 유지한다. 시료처리 18시간 전에 세포를  $1.2 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 24 well plate에 1ml 접종하여 전 배양한다. 분화촉진용 시료를 농도별로 투여하고, 4일 동안 배양한다. 시료에 대한 생존율을 고려하여 HL-60세포를  $1.0 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 세포를 취한 후, 2000rpm에서 10분간 원심 분리하여 배지를 제거하고 PBS(or medium)로 두 번 세척한 다음, 100 $\mu$ l의 PBS(or medium)를 넣고 혼합한다. 이 100 $\mu$ l의 세포 혼합액에 100 $\mu$ l의 NBT/TPA 용액을 가하고 차광하고 1시간동안 37°C에서 배양한 후, slide glass에 duplicate로 1적씩 떨어뜨려 실온에서 건조시킨다. 이 때, NBT/TPA 용액은 2mg/ml(w/v, D.W.) NBT와 1 $\mu$ l/ml(10 mg TPA 시약에 DMSO 1ml를 가하여 10mg/ml(w/v, DMSO)의 농도로 조제한 것을 앞서 만든 NBT에 넣어 최종농도가 1 $\mu$ l/ml로 조제한다. TPA(12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate : Phorbol 12-myristate 12-acetate)농도로 사용직전에 조제한다. 건조된 slide glass를 순수한 MeOH를 duplicate로 1적씩 떨어뜨려 고정시켜 약간 건조시킨 후, 0.3%(w/v, MeOH) safranin O로 염색하여 formazan이 포함되어 있는 세포의 수(감청색으로 염색이 된 세포의 수)를 현미경상에서 세어 최소 200개의 세포 중의 백분율을 구한다. 양성대조군으로는 세포분화 유도물질인 RA(retinoic acid)또는 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>을 사용한다.

#### 바. TLC에 의한 생리활성물질의 분리/확인

활성 성부의 비교 및 분리는 TLC silicagel 60(Merck Co.)을 이용하였다. TLC 판의 전개 개시 전에 시료와 표준물질로 황칠나무 잎의 주요 유용 성분과 비슷한 활성을 나타내는 retinoic acid를 5.0 $\mu$ g씩 점적한 다음, 전개용매(n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 1.5 : 1 : 0.1)에 담근 후 상단부 1cm까지 전개시켰다. 전개가 끝나면 UV lamp 365 nm에서 spot를 확인한 후 전개용매를 60°C에서 증발시킨 뒤, anisaldehyde-sulphuric acid(Sigma Co.)로 발색하였다.

## 사. HPLC를 통한 생리활성물질 탐색

황칠나무 잎의 에탄올 추출물과 표준물질로는 황칠나무 잎의 주활성 성분인 retinoic acid을 이용하여 측정하였다. HPLC기기는 BIO-T다 instrument사의 HPLC 500 system을 사용하여 측정하였으며 측정조건은 C18 컬럼을 사용하여 이동상으로는 water : acetonitrile : acetic acid = 60 : 40 : 1, 유속은 0.9/min, 검출기는 254nm, 0.05 AUFS감도 등으로 하였다.

## 아. 제품화 공정

### 1) 분말화 제조

황칠의 분말화를 위해 황칠나무 잎을 100℃에서 48시간 추출 후 증강제나 강감제를 첨가하고 당도를 조절할 후 일정하게 40-45 brix를 유지시켜 분무건조기에서 110℃로 2시간 동안 분무 건조를 시키면 감초의 powder가 생산된다. 이 때의 조건으로는 인버터는 속도가 55Hz 정도이며, 히터의 온도는 150~170℃를 유지시키는 것이 좋으며 팬의 풍량은 만들어진 감초파우더가 기계 내부의 벽에 달라붙지 않고 잘 포집 될 수 있도록 약 100이상으로 맞추는 것이 좋다. 이렇게 생산된 감초의 powder는 수분의 흡수를 막기 위해 곧바로 진공포장 시킨 후 냉장이나 냉동보관을 한다. Fig. 29는 이러한 분무건조기의 모습을 나타낸 것이다.

## 황칠나무 잎의 분말제조과정

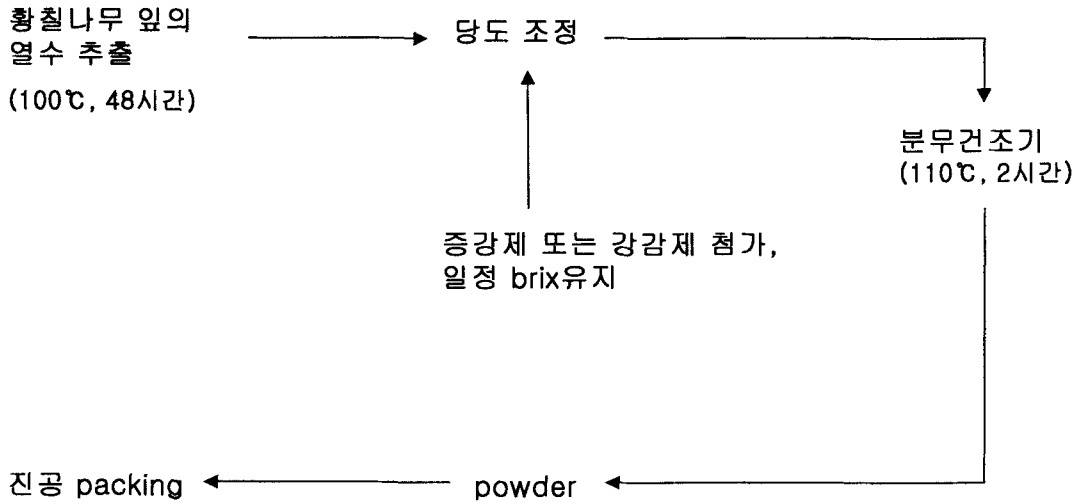


Fig. 28. 황칠나무 잎의 분말화 공정도

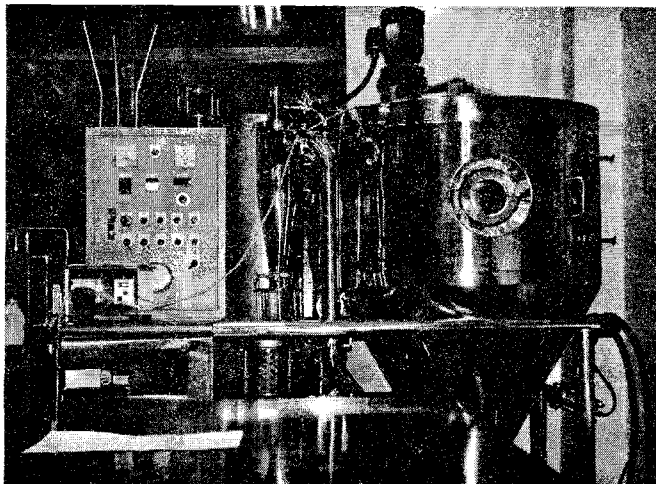


Fig. 29. 황칠나무 잎의 분말제조에 사용된 실험실내의 분무건조기 모습

## 2) 농축액을 이용한 액상 파우치의 제조

황칠나무 잎의 농축액을 이용한 기능성 파우치의 제조를 위해 황칠나무 잎을 100℃에서 48시간 추출 후 감압 여과기로 불순물들을 제거시킨다. 또한 이렇게 여과된 감초추출물의 성분파괴를 막으며 물을 제거시키기 위해 감압 농축기를 사용하여 50℃이하의 조건에서 감압 농축을 실시하여 20~30 brix로 추출물을 감압 농축한다. 이렇게 감압 농축된 추출물에 감미제로 식용 올리고당을 첨가하여 당도를 조절한 후 진공 파우치기를 이용하여 파우치 한 봉지당 150~200 ml의 황칠나무 잎 농축액을 넣고 진공포장을 하여 황칠나무 잎의 액상 pouch를 제조한다. 또한 황칠나무 잎의 감압 농축액을 진공포장을 하지 않고 그대로 동결건조를 시켜서 감초분말과 비슷한 다른 종류의 powder를 얻을 수 있다. 이 powder는 고열과 고압을 가하지 않아 추출물 중의 기능성 성분이 파괴되지 않고 고유의 기능성을 가지고 있는 것이 특징이며, 특히 기능성식품첨가제나 부형제로 여러 가지 식품에 사용이 가능하다. 이렇게 제조된 황칠나무 잎 농축액의 동결건조분말은 수분의 재 흡수를 방지하기 위해 진공포장 시킨 후 냉장이나 냉동보관을 하며, 기능성을 가진 액상 파우치는 냉장보관을 한다.

### 황 칠 나 무 잎 의 액 상 농 축 제 조

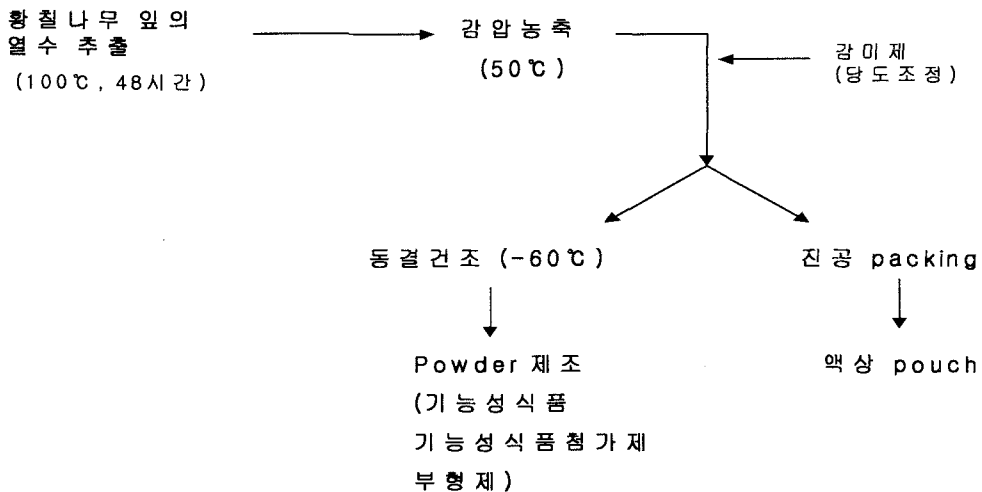


Fig. 30. 황칠나무 잎을 이용한 액상의 기능성 pouch제조와 기능성 첨가제의 제조 공정



Fig. 31. 황칠나무 잎을 이용한 액상 기능성 파우치의 제조의 사용된 진공 파우치기의 모습

### 3) 환 제조

황칠나무 잎 가루와 농축액을 혼합하여 기능성을 갖는 감초 환을 제조하기 위해 황칠나무 잎 가루와 찹쌀가루, 황칠나무 잎의 농축액을 각각 8 : 1 : 1(v/v)로 혼합하여 황칠나무 잎의 환을 제조하였다. 환의 제조에 사용된 황칠나무 잎 가루는 수율의 문제 때문에 황칠나무 잎의 농축액을 분말 화한 것을 사용하지 않고 황칠나무 잎을 잘 세정하여 열풍 건조기에서 72시간 건조시킨 후 이것을 분쇄기로 분쇄하여 황칠나무 잎의 분말을 얻었다. 이렇게 얻어진 분말을 이용하여 환의 모양을 만들기 위해 찹쌀가루를 감초의 농축액과 같이 끓여 만든 찹쌀 죽과 혼합하여 반죽을 제조하였다. 이렇게 만들어진 반죽을 반죽기를 사용하여 잘 혼합을 시킨 후 장환기를 사용하여 가늘고 긴 환을 만들어 낸다. 이렇게 만들어진 가늘고 긴 환을 제환기를 이용하여 각각의 환으로 잘게 잘라내고 서로 달라붙지 않게 황칠나무 잎 가루를 뿌려서 정환기로 옮긴다. 정환기는 말대어진 환을 동그랗게 더욱 단단하게 만들어주는 기계로 정환기에서 약15분 정도 30rpm의 속도로 환이 단단하게 될 때까지 돌려지게 되며 특히 이 과정에서 환의 외부에 10%의 꿀을 녹여 만든 수용액을 뿌려 환이 부서지지 않고 견고하게 윤기를 가질 수 있게 만든다. 이렇게 만들어진 감초의 환을 공기와의 접촉을 피하기 위해 진공 포장하여 냉장이나 냉동보관을



한다.

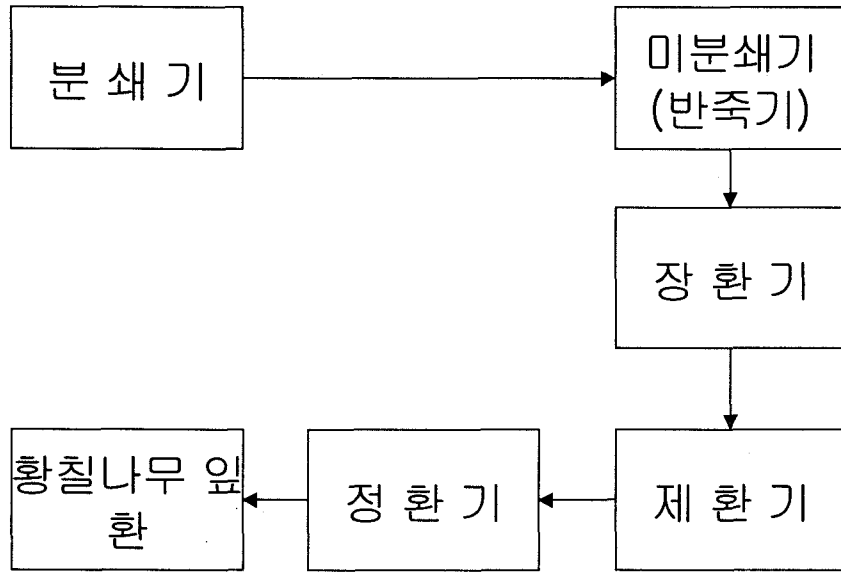
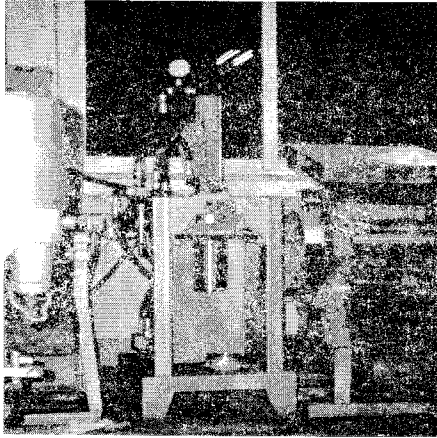
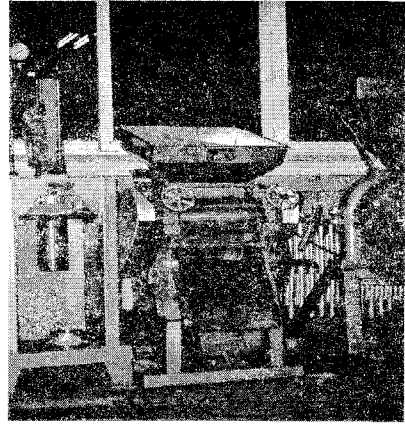


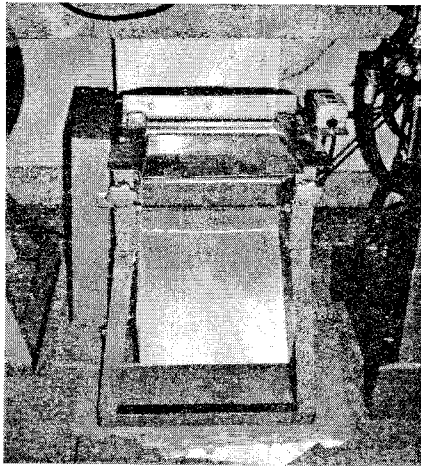
Fig. 32. 황칠나무 잎 가루와 농축액을 이용한 환의 제조과정



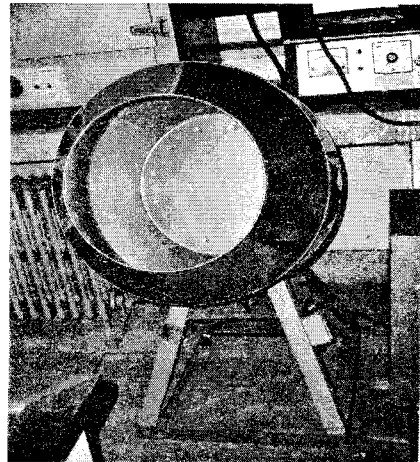
(가) 반죽기



(나) 장환기



(가) 제환기



(나) 정환기

Fig. 33. 황칠나무 잎의 환제조시 사용된 기기

#### 4) 과립의 제조

농축액을 혼합하여 기능성을 갖는 황칠나무 잎의 과립을 제조하기 위해 황칠나무 잎 가루와 황칠나무 잎의 농축액, Dextrose anhydrous, Malto dextrin을 각각 2 : 4 : 4(v/v)로 혼합하여 증감제난 강감제를 이용해서 60~65 brix로 맞추고 황칠나무 잎의 과립을 제조하였다. 이렇게 제조된 황칠나무 잎 혼합물을 과립화 하기 위해서 과립기에 넣고 여기서 얻어진 샘플을 열풍건조기에서 3시간 동안 37℃에서 잘 건조시킨 후 잘게 부셔서 과립을 만든다. 이렇게 만들어진 감초의 환을 공기와 수분의 접촉을 피하기 위해 진공 포장하여 냉장이나 냉동보관을 한다.

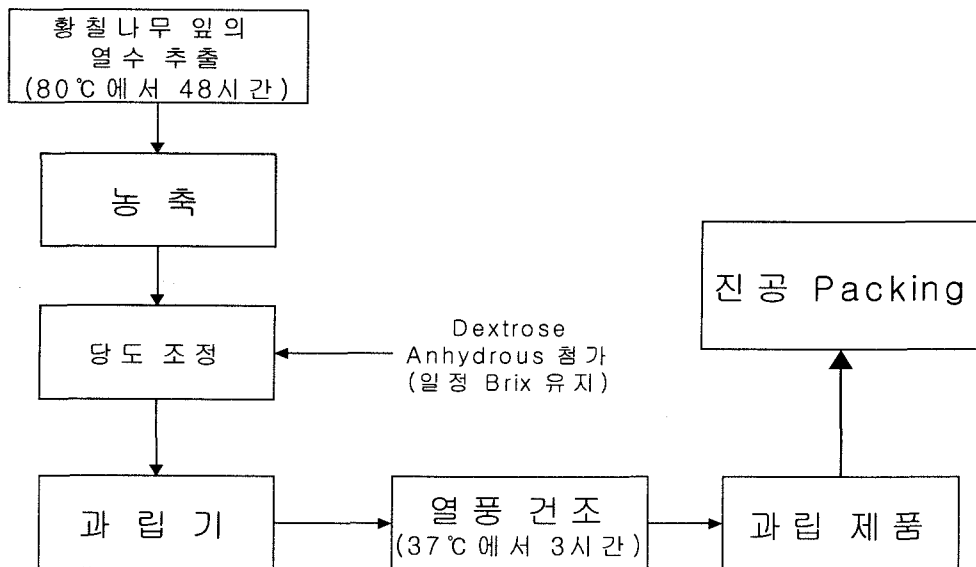


Fig. 34. 황칠나무 잎 가루와 농축액을 이용한 과립의 제조공정

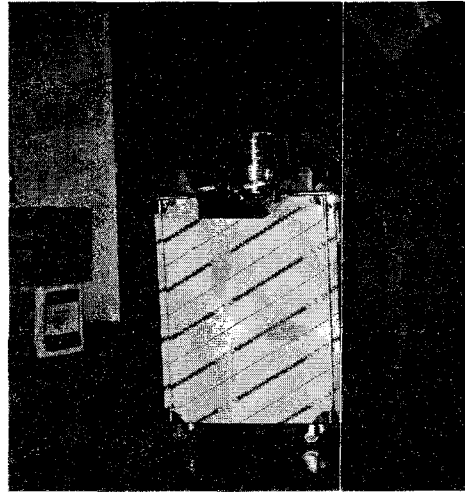


Fig. 35. 황칠나무 잎의 과립 제조 시에 사용된 과립기의 모습

### 3. 결과 및 고찰

상기 방법들에 의해 황칠 조 추출물 및 분리물들의 유용 생리 활성 탐색 결과는 다음과 같다.

가. 전라남도 보길도에서 채취한 황칠나무 잎의 추출은 각 중량 10 배량의 에탄올, 물, 물과 에탄올(1:1v/v)으로 이루어졌고, 농축, 동결, 건조하여 얻어진 각각의 최종 추출 수율은 물 10.27%, 물과 에탄올 7.321%, 에탄올 14.25% 이었다.

나. 항암효과 실험에서 황칠나무 잎의 용매별 추출물 과 유용 대상 표준 물질인 retinoic acid 의 인간 정상 간 세포인 WRL-68에 대한 세포독성은 모두 최고 농도인 1.0 g/l에서 28%이하의 낮은 세포독성을 나타내었다. 암세포인 Hep3B, MCF7, A549, AGS의 생육억제 활성은 1.0g/L의 농도에서 에탄올 추출물이 Hep3B와 MCF7에서 각각 68%, 65%를 A549와 AGS에서는 에탄올 추출물이 61.9%와 53.4%이고 retinoic acid가 81%의 억제활성을 나타냈다. 그리고 정상세포의 세포독성율(%)에 대한 암세포의 생육억제 활성율(%)의 selectivity는 모두가 1.5 이상으로 나타나 선택성이 있었다.

다. 인간 면역 세포 (T and B cell) 을 이용한 면역 증진 실험에서 생육 촉진 결과는 T 세포와 B 세포 모두 에탄올 추출물의 1.0 g/l의 농도에서 각각 1.27배와 1.21배의 생육촉진 활성을 나타내었고, 생육도에서는 T 세포와 B 세포의 생육 활성도를 배양 시간별로 7일 동안 생 세포수를 측정함으로 나타내었다. T 세포와 B 세포 모두 MTT로 측정하였을 때와 마찬가지로 각각의 추출물을 비교하여 에탄올 추출물이 다른 두 가지 추출물보다 더 나은 활성 촉진을 나타내었고, T 세포가 더 활성화됨을 보였다. 전체적으로 역시 에탄올 추출물이 다른 두 가지 추출물보다 더욱 생육을 증강시키는 것으로 나타났다. 그리고 T 세포와 B 세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$  증진효과 실험은 IL-6는 T세포와 B세포에서 에탄올 추출물이 각각 73.8(pg/ml)와 64.8(pg/ml)대의 증진효과를 가져왔다. 또한 TNF- $\alpha$ 의 경우도 마찬가지로 B세포와 T세포에서 에탄올 추출물 각각 1.0g/L에서 121(pg/ml)과 102(pg/ml)로 가장 증진 효과가 크게 나타났다. 특히 IL-6는 T세포의 증진효과가 더 높았으며, TNF- $\alpha$ 의 경우는 B세포의 증진효과가 더욱 크게 나타났다.

라. 화철 추출물들의 적용 범위 확대를 위해 기존의 생리 활성과는 달리 신경세포의 적응성을 보기 위해 신경 세포의 생육증강 활성 측정 결과, 증식에서는 배양 1일부터 약 2배의 세포수 증식이 시작되면서 배양 5일째에는 에탄올 추출물의 경우  $18 \times 10^4$  viable cells/ml로 약 1.8배의 세포증식을 증진시킴을 알 수 있었고 에탄올 추출물과 물, 에탄올 추출물이 비슷한 정도의 수치를 나타냈다. 또한 전체 세포 중 신경돌기가 형성된 세포의 비율이 60%이상으로 나타났으며 이것으로 볼 때에 황칠나무 잎의 성분이 어느 정도 신경학적 인자 촉진에 영향을 미친다고 추측된다.

마. Microphysiometer를 이용해서 간암 세포주에 대한 항암 활성 측정결과를 나타낸 것으로 0.6g/l농도의 에탄올 추출물과 retinoic acid을 동량의 농도로 투여한 지 약 90분후부터 세포의 대사활성도가 떨어져 4시간 후에는 시료를 투여하지 않은 대조구보다 에탄올 추출물은 약 60%, Retinoic acid는 약 80%가 떨어졌으며 특히 에탄올 추출물과 retinoic acid의 효과가 거의 비슷하다는 것을 결과를 통해 알 수 있었다. 이는 Hep3B의 SRB 측정법에서 측정된 0.6mg/ml에서 나타난 결과를 반증해주는 결과라고 볼 수 있다.

바. HL-60세포( $1.22 \times 10^5$  cell/ml)에 RA(retinoic acid)와 1.0mg/ml의 농도로 각각

의 추출물을 0, 2, 4, 6일에 대한 NBT 환원반응에 의한 granulocyte로의 분화를 측정하였을 때 양성대조군인 retinoic acid는 2, 4, 6일에 31.4%, 44.7%, 59%로 증가했고, 추출물중에는 에탄올 추출물이 다른 추출물보다 높은 12.5%, 19.8%, 34.9%로 증가하였다.

사. 1,2차 년도에서 이들 추출물 관한 탐색결과를 통해 3차년도에서는 물질의 분리 및 동정을 통한 기준물질의 탐색과 각 분획물의 생리활성을 다음과 같이 나타냈다.

1) 에탄올 추출물과 enzymatically hydrolyzed glycyrrhizin을 diethyl ether, chloroform으로 분획한 결과 수율(% , v/v)을 살펴보면, 에탄올 추출물은 diethyl ether 분획층이 1.29%, chloroform 분획층이 1.47%, 증류수 분획층이 35.21%를 나타내었고 enzymatically hydrolyzed glycyrrhizin은 diethyl ether 분획층이 1.1%, chloroform 분획층이 1.79%, 증류수 분획층이 19.35%로 나타났다(Table 15).

Table 15. The fraction yeild of the ethanol extract from the leaves of *Dendrofanax morbifera lev.*

Sample	Solvents	Yields(%)
Ethanol extract	diethyl ether fraction	1.09
	chloroform fraction	0.97
	water fraction	34.82

2) 황칠나무 잎의 추출물 중 가장 활성이 좋았던 에탄올 추출물과 에탄올 추출물의 기준물질로 쓰인 retinoic acid을 측정하기 위한 HPLC 측정결과 (Fig. 48) 황칠나무 잎의 에탄올 추출물에서 기준물질의 결과와 에탄올 추출물의 결과치의 면적비를 계산하여 황칠나무 잎의 추출물 내에는 0.02%의 retinoic acid와 비슷한 활성을 가진 유용성분이 포함되었다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 48).

3) 생리활성이 가장 좋았던 ethanol 추출물과 ethanol 추출물의 dethyl ether

분획층 활성물질을 비교하기 위해서 TLC 실험을 해본 결과 에탄올 추출물에 여러 가지 성분들이 존재함을 알 수가 있었고 이를 비교 분석 하기 위해서 HPLC 분석 결과를 뒷받침해주는 retinoic acid의 TLC 전개에서와 거의 같은 선상에서 spot을 관찰할 수 있었다. 특히, 분획층에서는 확연한 물질 분리에 대한 spot을 관찰 할 수 있었다. 이것은 기준 물질로 비교한 retinoic acid와 유사한 성분이 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 49).

4) 분획물에 대한 함암 활성에 대해서는 인간 간암 세포인 Hep3B의 억제활성을 나타냈으며(Fig. 27), 1.0 g/L의 최고 농도에서 에탄올 추출물의 diethyl ether 분획물이 73%의 높은 억제율을 나타냈으며, selectivity도 마찬가지로 1.0 g/L의 농도에서 5.5로 높게 나타났다. 이로서 간암에 효과가 있다는 것을 알 수가 있다. 인간 유방암 세포인 MCF7의 억제활성(Fig. 28)을 나타낸 것으로 1.0 g/L의 농도에서 에탄올 추출물의 diethyl ether 분획물이 63%의 억제율을 나타냈고, selectivity도 마찬가지로 diethyl ether 분획물이 1.0 g/L의 농도에서 4.3으로 나타났다. 인간 폐암 세포인 A549에 대한 억제 활성(Table 17)이 에탄올 추출물의 diethyl ether 분획물이 69%의 억제율을 나타냈고, 생육억제 활성을 나타냈고, 에탄올 추출물의 diethyl ether 분획물이 가장 높은 저해율과 Selectivity를 나타내었다. 인간 위암 세포인 AGS의 에탄올 추출물의 diethyl ether 분획물이 1.0 g/L의 농도에서 71% 생육저해 활성을 나타내었으며(Table 17), selectivity는 diethyl ether 분획물 1.0g/L의 농도에서 5.01로 가장 높았다. 위의 서로다른 4가지의 암세포주에서 MCF7을 제외한 모든 세포주가 diethyl ether 추출물이 비교적 높은 저해율을 보였으며 선택적 사멸도 역시 다른 두 가지 분획물보다 높은 것으로 나타났다. 그리고 기준물질로 삼은 retinoic acid의 활성과 비교하였을 때는 가장 저해율이 좋은 diethyl ether 분획물과 비교해 보았을 때 retinoic acid가 더 높은 활성을 나타내었고 이는 선택적 사멸도에서 역시 동일한 결과를 얻을 수 볼 수 있었다. selectivity는 보통 1.5 이상일 때 암세포에 대한 선택성이 있어 암세포의 생육을 억제한다고 할 수 있으며 본 실험에서는 모든 암 세포에서 WRL-68에 대한 selectivity로 나타내었다.

이상의 결과를 살펴 볼 때에 에탄올 추출물에 대한 HPLC 분석시 많은 작은 피크들이 나타났고 이는 황칠나무 잎의 경우 GC Mass에 대한 연구 결과 많은 휘발성 성분이 포함되어 있다는 보고가 있다. 이런 결과로 황칠에 대한 보다 정밀한 탐

색 실험을 통해서 더 많은 유용성분이 밝혀져야 한다고 생각되며 연구가 수행되어야 한다고 사료된다. 에탄올 추출물의 분획물 중에 diethyl ether 분획물이 가장 항암활성이 높고(Hep3B 73%, A549 71%, AGS 71%) 단 인간 유방암 세포주인 MCF7은 63%의 활성을 나타내었고 chloroform 분획물과 water 분획물(65%, 65%)과 비슷한 활성을 나타내었다. selectivity도 diethyl ether 분획물이 높은 것으로 나타났으며, 이런 결과로 추출물 중에서는 에탄올 추출물이 암세포에 대하여 높은 억제 활성이 있음과 동시에 특정 유용 성분을 포함한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 분획물의 암세포에 대한 높은 억제 활성도 에탄올 추출물의 분획물이 높은 억제율을 결과로 보았을 때 위의 HPLC에서 검출되어진 retinoic acid와 유사한 성분이 포함되어 있는 것으로 나타났다.

이로서 황칠 잎 추출물들의 유용 물질 및 생리 활성 탐색 결과 기존에 알려진 유용 성분인 retinoic acid 외에 다른 물질 혹은 여러 물질의 상승 작용에 의해 다양한 그리고 좋은 생리 활성이 나타나는 것으로 확인되어, 황칠 잎을 이용한 새로운 기능성 물질 혹은 식품 소재화 가능성이 높은 것으로 나타났다.



Table 16. The extraction yield of *Dendropanax morbifera* Lev. by distilled water, distilled water : ethanol(1:1) and ethanol.

Sample	Solvent	Yield(%)
<i>Dendropanax morbifera</i> Lev.	distilled water	10.27
	water:ethanol(1:1,v/v)	7.32
	ethanol	14.25

Table. 17. Comparison of inhibiting the growth of AGS and A549 in adding the crude extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

<i>Dendropanax morbifera</i> Lev.	Concentration (g/L)	Cell line	
		AGS(%)	A549(%)
Water extract	0.2	19.1	29.3
	0.4	32.2	27.5
	0.6	41.9	35.7
	0.8	45.3	44
	1.0	55.2	54.2
Water:ethanol 1:1(v/v) extract	0.2	30	26.3
	0.4	38	27.2
	0.6	47.2	38
	0.8	55.4	43.1
	1.0	61.4	52
Ethanol extract	0.2	26.2	27.3
	0.4	41.1	30.3
	0.6	47.8	38
	0.8	56.2	49.3
	1.0	61.9	53.4

Table 18. The secretion of cytokines from human T and B cells in adding the extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

<i>Dendropanax morbifera</i> Lev.	cultured time (day)	Cell lines			
		T cell(pg/ $\mu$ lml)		B cell(pg/mlml)	
		IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
Water extract	1	40	26	20	25.8
	2	42	30	22	30
	3	58	33.2	38	33.2
	4	64	38.2	44.1	38.2
	5	74	44	54	44
	6	76	63.2	56	53.8
Water:ethanol 1:1(v/v) extract	1	40.1	25	20	25
	2	48	31	28	31
	3	57	35.6	37	35.5
	4	63	41	43	41.8
	5	75	45	55	45.9
	6	92.2	66.6	72	56.6
Ethanol extract	1	42.5	24	22	24
	2	58	34.1	38	34
	3	68	35	48	35.9
	4	69.2	44	49	44.1
	5	77.3	58	57.2	58.6
	6	94	75	73.8	64.8
Control(no addition)		30	35	34	21

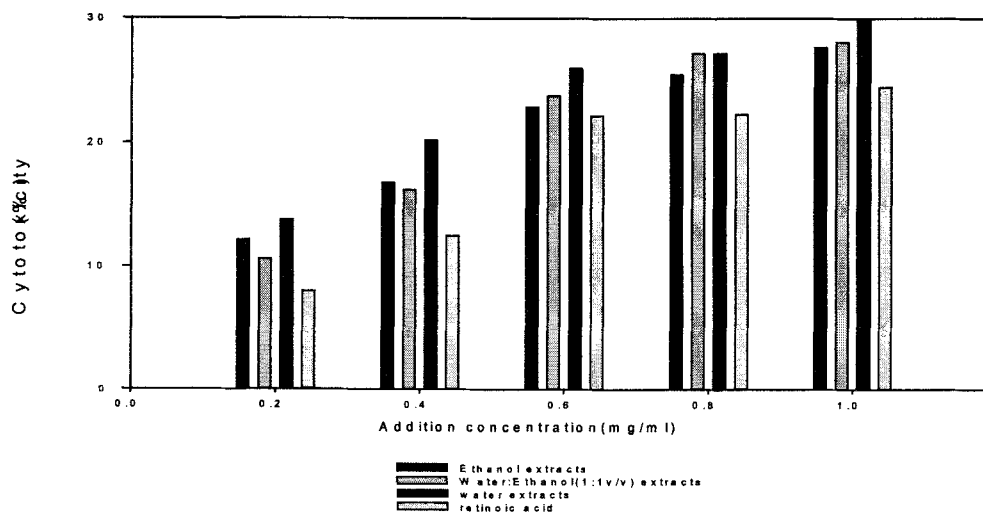


Fig. 36. Cytotoxicity of the crude extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. on normal human cell line, WRL-68.

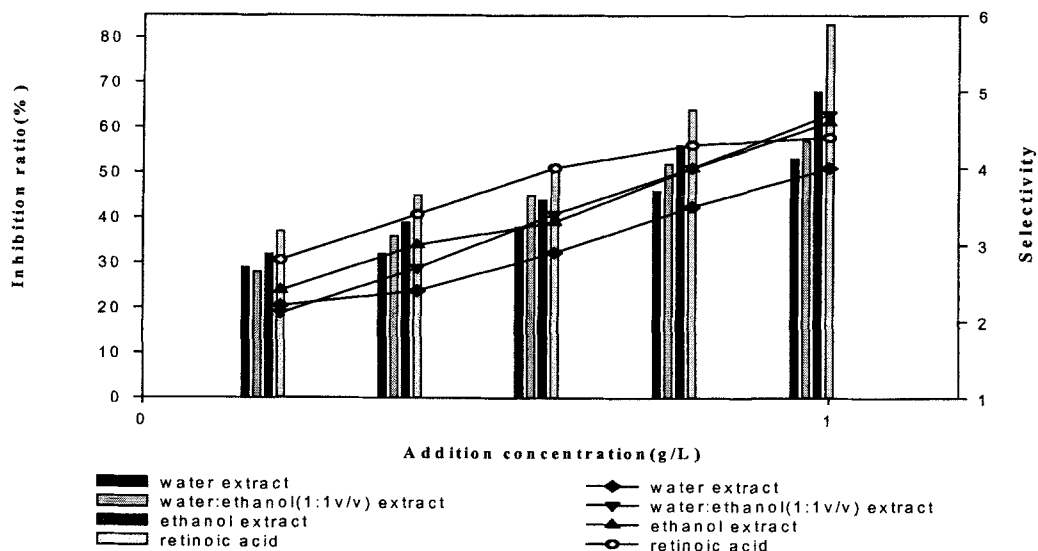


Fig. 37. Inhibition ratio of growth of Hep3B (bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the crude extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

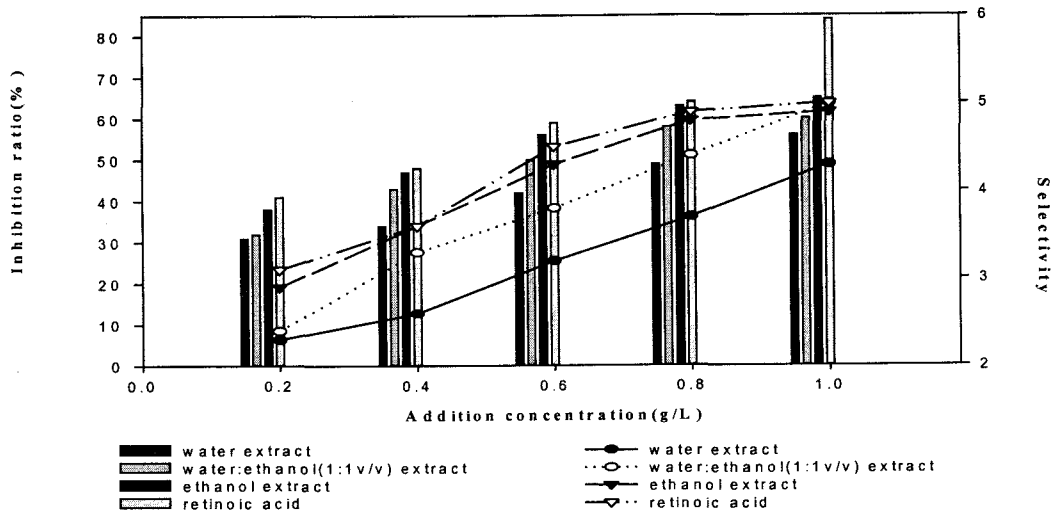


Fig 38. Inhibition ratio of growth of MCF-7(bar chart, %) and selectivity(scatter line) in adding the crude extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

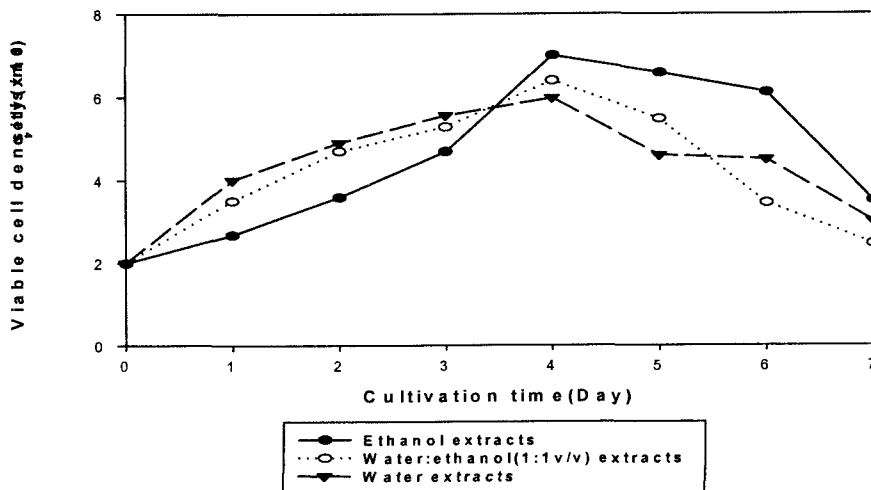


Fig. 39. The effect of the crude extracts from *Dendropanax*

*morbifera* Lev. on enhancing the growth of human immune B cells.

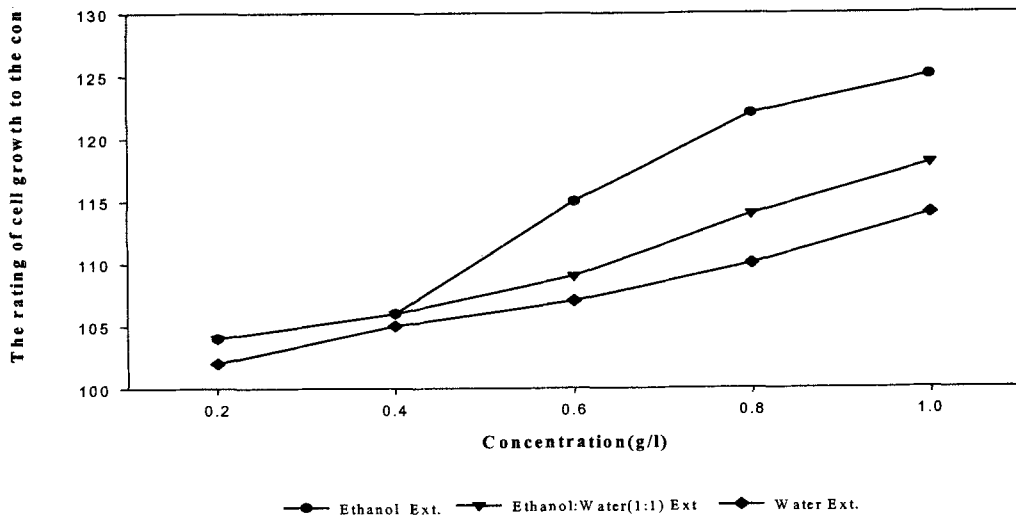


Fig. 40. The effect of the crude extracts from *Dendropanax morbifera* Lev. on enhancing the growth of human immune T cells.

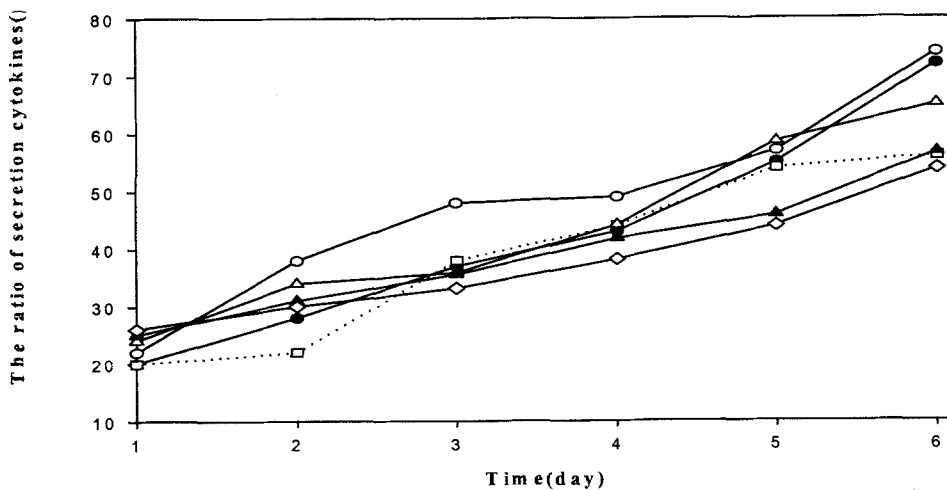


Fig. 41. The secretion of cytokines from human immune Jurkat (T cell) in adding 1.0 (pg/ml) from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

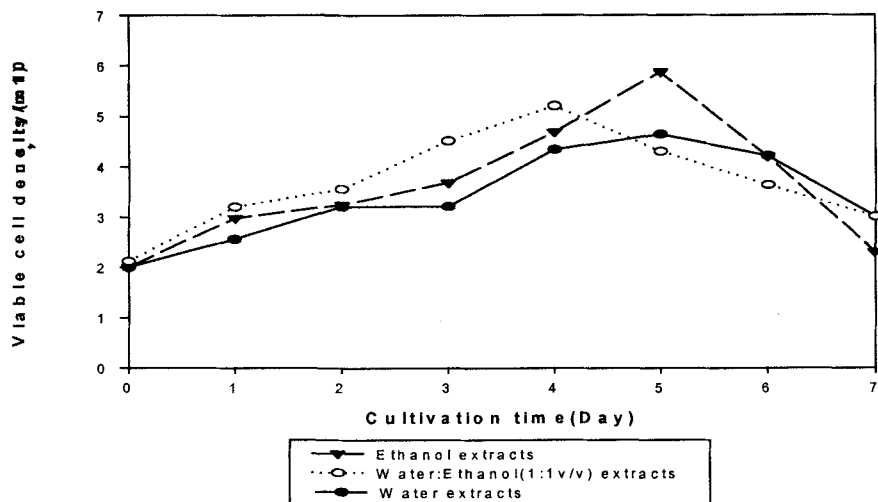


Fig. 42. The growth of viable cell density of human B cell (Raji) in adding (1.0 mg/ml) the crude extracts from the leaves of the *Dendropanax morbifera* Lev.

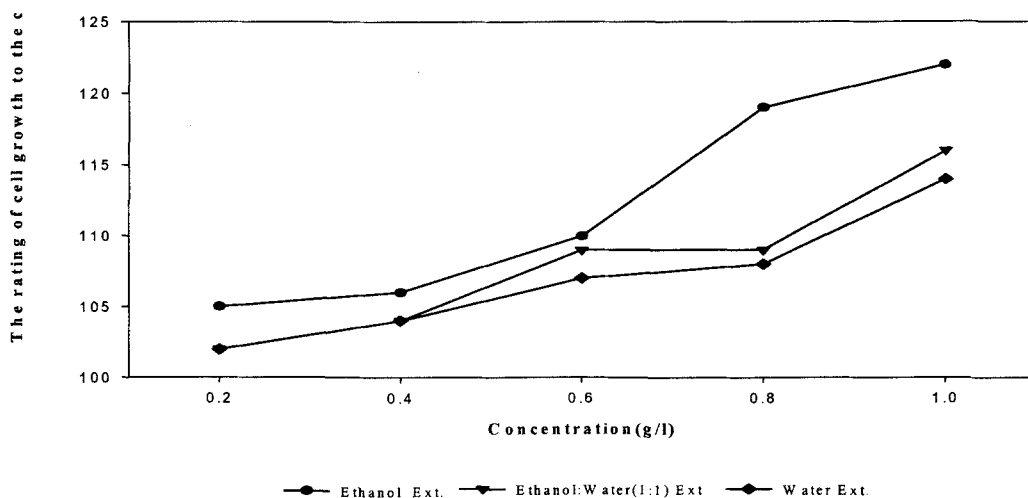


Fig. 43. The effect of the crude extracts from the leaves of the *Dendropanax morbifera* Lev. on enhancing the growth of human immune B cells.

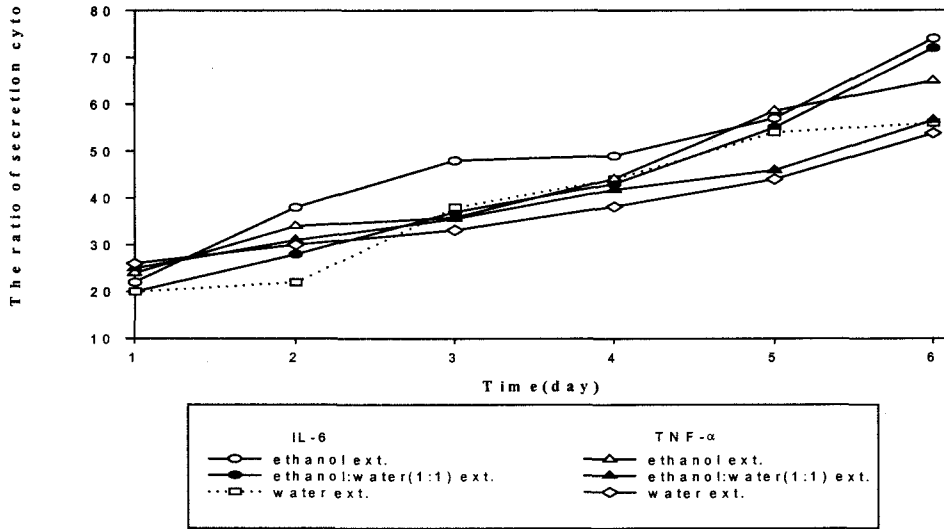


Fig. 44. The secretion of cytokines from human immune Raji (B cell) in adding 1.0 (pg/ml) from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.

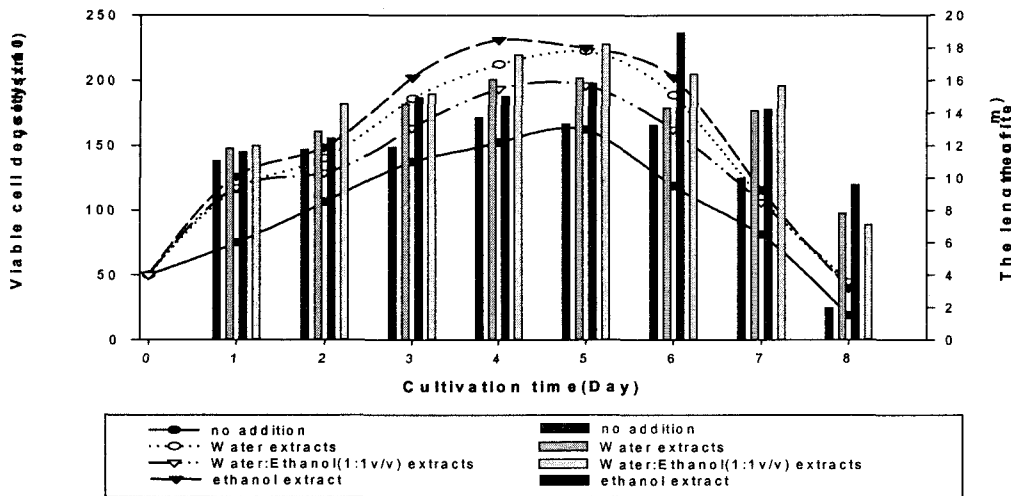


Fig. 45. The relationship between the growth of human immune T cell (scatter line, %) and the secretion of cytokines (bar chart) by adding 1.0 (mg/l) of *Dendropanax morbifera* Lev. extracts.

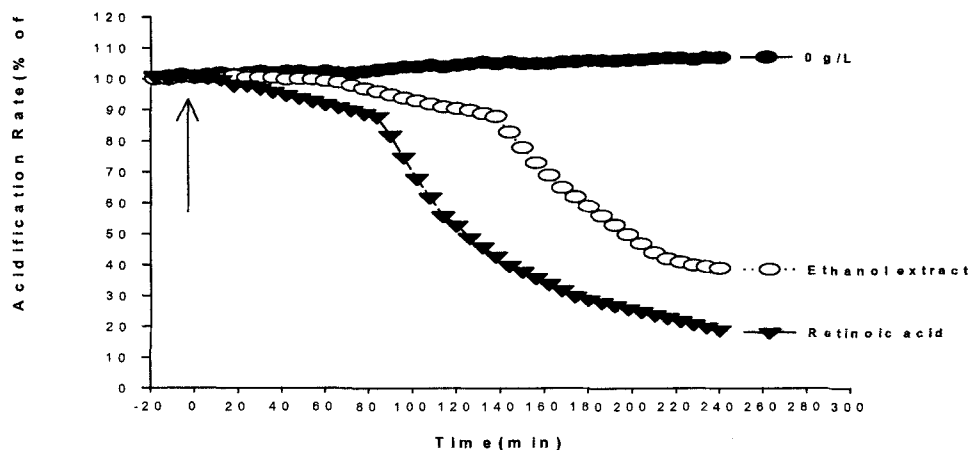


Fig. 46. Kinetics of responding to human Hepatocellular carcinoma (Hep3B) in adding to 0.6 mg/ml of the ethanol extracts and retinoic acid from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. using a microphysiometer for 4 hours.

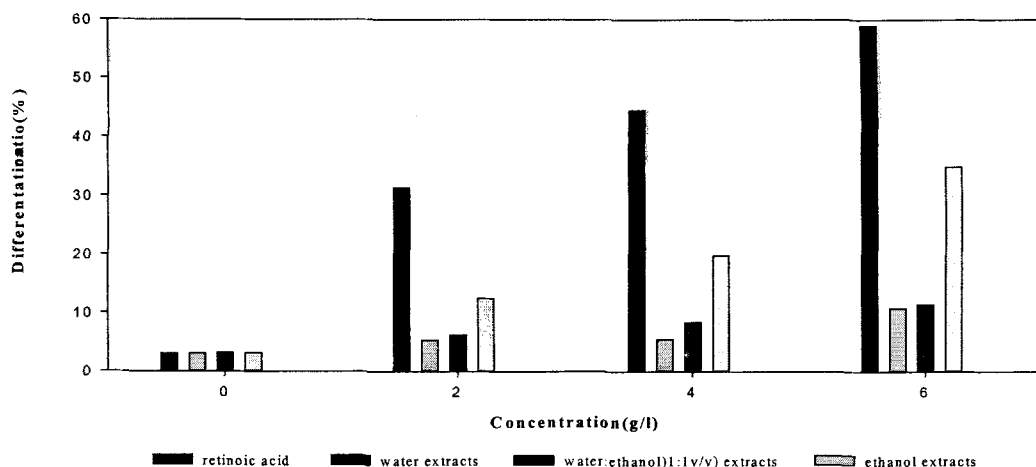
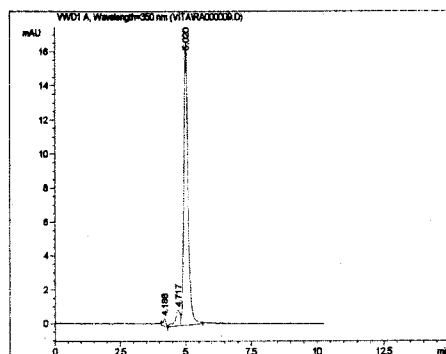
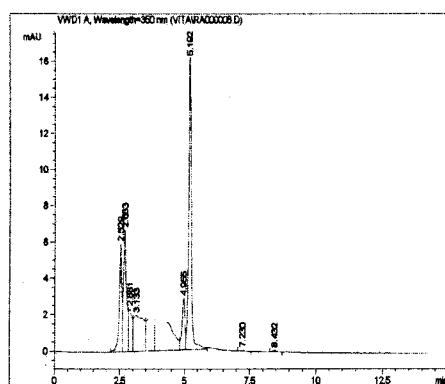


Fig. 47. Cell differentiation of HL-60 cells after treatment with retinoic acid, crude extracts from the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Cells ( $1.2 \times 10^5$ ) were treated with indicated concentration of agenets for 2, 4 and 6 days.





(A)



(B)

Fig. 48. HPLC analysis of the ethanol extracts from the leaves of *Dendrofanax morbifera lev.* and the standard(Retinoic acid). (A). Standard(retinoic acid), (B) Ethanol extract

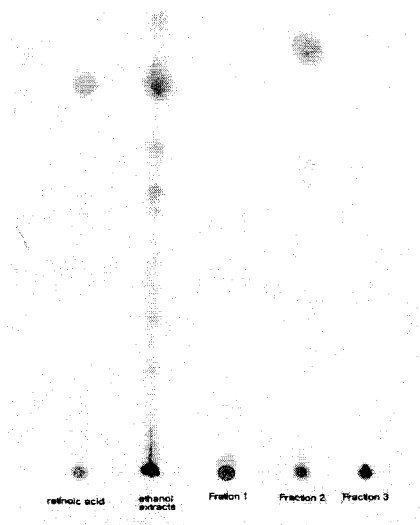


Fig. 49. TLC patterns of the ethanol extracts and fraction(1:chloroform, 2:Diethylether, 3:water) from the leaves of *Dendrofanax morbifera lev.* and the standard(Retinoic acid).

사. 황칠나무 잎을 원료로 한 제품화

1) 제품에 대한 관능검사 결과

관능검사를 통한 황칠나무 잎의 제품화에 대한 결과는 환의 경우가 가장 좋은 선호도를 보였고, 다음으로 파우치와 과립 그리고 분말의 순으로 나타났다(Table 11).

Table 19. 황칠나무 잎을 이용한 4가지 제품의 관능 검사 결과

종 류	선 호 도			합계(명)
	상	중	하	
환 제품	14	14	2	30
액상 파우치 제품	9	14	7	30
과립 제품	11	13	6	30
분말 제품	10	15	5	30

2) 황칠나무 잎의 분말화

황칠나무 잎의 분말은 제품화시킨 4 가지 제품 중 2번째로 선호도가 좋은 제품으로 30명을 대로 한 관능검사의 결과를 나타내었다. 주로 단맛의 선호도가 가장 좋은 것으로 나타났으며 이러한 당도를 가진 황칠나무 잎의 분말을 단독으로 제품화시키는 것보다는 다른 식품이나 분말과 혼합하여 제품화를 한다면 좋을 것이라는 결론을 얻었다. 예를 들어 콩을 갈아 만든 전통식품인 미숫가루나 전통차와 결합시켜 특유의 단맛을 잘 조화시킨다면 새로운 제품을 만들어 낼 수 있을 것으로 보인다. Fig. 50은 감초의 추출액을 이용한 감초분말의 제조 후의 모습을 나타낸 것으로 백색의 색을 가진 것을 알 수가 있다.

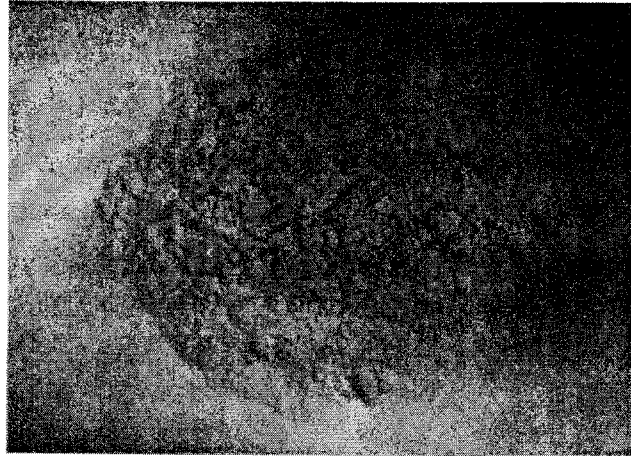


Fig. 50. 황칠나무 잎의 추출액을 분무건조하여 만들어진 분말의 모습

### 3) 황칠나무 잎의 농축액을 이용한 액상 기능성 파우치의 제조

황칠나무 잎을 이용한 제품 중에 가장 기호도가 좋은 제품으로 30명을 대상으로 한 관능검사에서 제일 좋은 점수를 받은 제품이다. 황칠나무 잎 농축액은 Fig. 51에 나타내었고, 특징적인 단맛에 감미제인 올리고당을 첨가하여 만든 이 황칠나무 잎 농축액을 이용한 파우치는 감압과 열의 가열이 없는 것이 특징으로 감초가 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 감초의 기능성을 갖는 음료의 개발을 시도한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 보이며, 또한 감초의 농축액을 다이어트 식품의 생산에 이용해본다면 특유의 당도를 이용한 기능성 다이어트식품의 생산도 가능할 것으로 본다. 감초 농축액은 갈색의 색을 갖고 있으며 특유의 단맛을 가진다.



Fig. 51. 황칠나무 잎의 농축액을 이용하여 제조된 액상 기능성 파우치의 모습

#### 4) 황칠나무 잎의 가루와 농축액을 이용한 환의 제조

황칠나무 잎을 이용하여 만든 제품 중에 관능검사를 통해서 가장 선호도가 낮은 제품으로 선택된 감초환은 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. 하지만 환을 만드는데 쓰인 재료들을 고려해보면 앞에서 언급된 황칠나무 잎 분말과 황칠나무 잎 농축액의 두 가지 제품들을 포함하기 때문에 그 기능성은 다른 제품보다 뛰어날 것으로 보인다. 다만 황칠나무 잎 환의 어두운 색깔과 환이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 없애버릴 수 있는 제품화 방법을 만든다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다. Fig. 52에서 보듯이 황칠나무 잎 으 환 제품은 어두운 색과 특유의 질감이 단점으로 보인다.

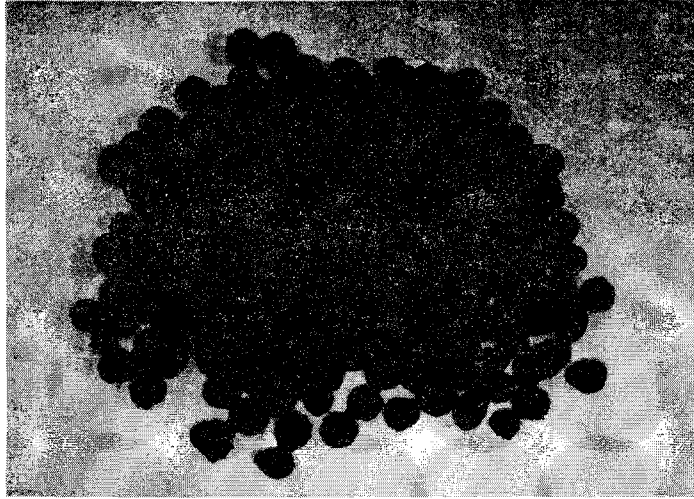


Fig. 52. 황칠나무 잎의 가루와 농축액을 이용해서 제조된 환의 모습

#### 5) 황칠나무 잎의 가루와 농축액을 이용한 과립 제조

황칠나무 잎을 이용하여 만든 제품 중에 관능검사를 통해서 3번째의 선호도가 매겨진 제품으로 선택된 황칠나무 잎 과립은 그 선호도가 비교적 높았다. 게다가 황칠나무 잎의 환제품과 더불어 가장 기능성이 뛰어날 것으로 판단된다. 선호도가 비교적 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. 하지만 기존의 유사한 형태의 제품이 피로회복제나 혹은 간식으로 나온 것이 있고 유아식이나 선식으로 이용했을 때 그 효용 가치가 높을 것으로 생각되고, 과립을 만드는데 쓰인 재료들을 고려해보면 앞에서 언급된 황칠나무 잎 분말과 황칠나무 잎 농축액의 두 가지 제품들을 포함하기 때문에 그 기능성은 다른 제품보다 뛰어날 것으로 보인다. 다만 황칠나무 잎 과립의 어두운 색깔과 과립이 갖는 약처럼 보인다는 선입견을 없애버릴 수 있는 제품화 방법을 만든다면 상품화에 좋은 결과를 가져올 것으로 보인다. Fig. 53에서와 같이 황칠나무 잎 과립은 어두운 색과 특유의 질감이 단점으로 보인다.

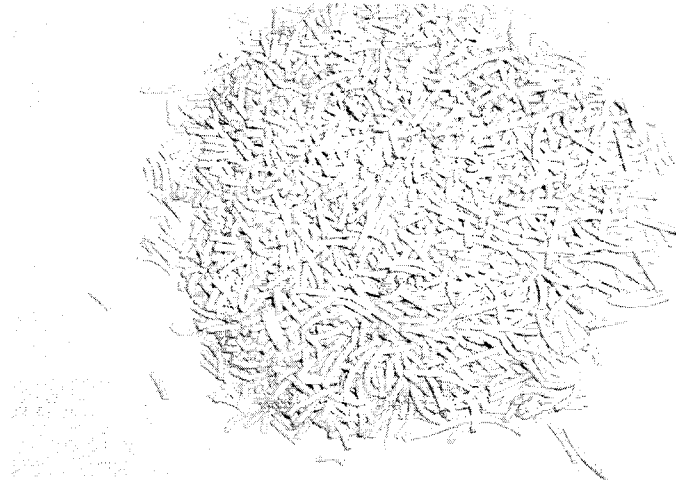


Fig. 53. 황칠나무 잎의 가루와 농축액을 이용해서 제조된 과립의 모습

#### 6) 적 요

생리 활성이 가장 좋았던 ethanol 추출물과 ethanol 추출물의 diethyl ether 분획물은 HPLC 실험을 통한 동정 실험에서 기준 물질로 삼은 기존의 함암제로 잘 알려져 있는 retinoic acid와 유사한 물질이 황칠나무 잎의 ethanol 추출물에 함유되어 있다는 결과를 얻을 수 있었고, TLC 실험을 해본 결과에서도 HPLC에서 나타난 작은 여러 피크들이 전개 과정에서도 볼 수 있었으며 추출물에 여러 가지 유용성분이 존재함을 알 수가 있었으며, 특히 기준물질로 선택한 retinoic acid와 유사한 물질이 존재한다는 것을 TLC 전개로 알 수 있었다. 이것은 이러한 유용성분과 함께 여러 가지 성분들이 생리활성의 효과를 뒷받침 해주는 것이라고 볼 수 있을 것이다.

지금까지의 결과를 종합적으로 살펴보면 1, 2차년도 실험에서 밝혀진 황칠 나무 잎의 추출물과 추출물 중 활성이 가장 좋았던 분획물인 diethyl ether층은 대부분의 활성에서 기준 물질인 retinoic acid가 전박적으로 crude한 추출물보다 더 활성이 좋았다. 하지만 crude한 추출물에서만 비교 분석하였을 때는 에탄올 추출물의 경우

가 전반적인 실험에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 단 물과 에탄올 추출물의 경우는 몇 가지의 실험(함암, 면역, 신경세포)에서는 에탄올 추출물과 비슷한 결과를 얻을 수 있었고, 이 결과는 황칠나무 잎에 있는 유용성분이 유기용매에 잘 결합되는 구조라는 결과를 얻을 수 있었다. 또 분획물과 일반 추출물의 비교에서는 대체적으로 에탄올 추출물의 분획물 중 diethyl ether층이 면역 실험에서는 기준 물질로 선택한 retinoic acid보다 더 높은 활성율을 보였다. 게다가 면역세포의 생육도에서 역시 거의 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 순수 물질인 retinoic acid에서는 포함 되어 있지 않은 물질이 diethyl ether 분획물에 또 다른 유용물질이 포함되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 반영하여 새로운 면역 기능을 강화시키는 약품이나 기능성 식품을 개발하면 좋은 것으로 사료되어지고 여기 더 많은 지속적인 투자와 연구가 병행되어야 할 것이다. 특히 3차년도에 제품화로 개발한 황칠나무 잎의 환, 과립, 기능성 액상 파우치, powder는 그 자체로도 기능성을 갖지만 다른 식품에 첨가되어 부가적인 효과를 더 할 수 있는 제품이라고 할 수 있을 것이다.

결론적으로 여러 황칠나무 잎의 추출물 중 특히 에탄올이나 이 추출물을 분획시 얻은 분획물은 여러 가지 유용성분을 포함하고 있어 여러 가지 성인병을 야기시키는 원인들에 대한 조기의 면역체계를 강화시킬 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 또한 신경 세포의 생육을 촉진하는 결과로 볼 때 이러한 황칠나무 잎의 유용성분은 신경활성물질의 탐색이 유효할 것으로 사료되어진다. 앞으로 이러한 결과를 식품 중에 첨가 또는 직접 식품으로 활용한다면 우리 몸의 면역체계를 강화할 수 있는 기능성 식품과 신경기능의 향상등을 목적으로 하는 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 생각이 되며, 앞으로 보다 많은 연구가 행하여져야 할 것으로 전망된다



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	연구 목표	달성도	기여도
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 칠액생산 우수개체 선발</li> <li>○ 표준성분개발</li> <li>○ 성분추출 및 분획제조</li> <li>○ 세포 및 유식물 배양확립</li> </ul>	100 80 90 100	
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조직배양법 확립</li> <li>○ 대사과정 및 성분패턴조사</li> <li>○ 생리활성물질 탐색</li> </ul>	100 80 100	
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재분화 효율 최적화</li> <li>○ 표준성분비교로 우수개체 선발, 최적 재배지 선정 및 채취시기 선정 등</li> <li>○ 생리활성물질의 분리·동정</li> </ul>	100 100 100	
최종평 가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 황칠성분의 과학적 구명, 고생산주의 급속번식</li> <li>○ 생리활성물질의 대량생산</li> </ul>	100 70	

### 1. 기술적 측면

가. 선발된 채칠량이 많은 우량한 개체를 품종화하여 보급할 경우 칠액생산 효율을 높일 수 있을 것이다.

나. 우수주의 효율적이고 급속한 번식법으로 대량생산이 가능하게 됨으로써 우수한 품종을 빠른 시일 내에 재배자에게 공급할 수 있다.

다. 황칠나무 개체간, 서식지, 환경변화 등의 차이에 따른 황칠의 총생산과 품질

의 비교평가를 할 수 있는 정성, 정량 분석이 가능해진다.

라. 남부지역의 산림을 황칠나무를 비롯한 여러 가지 유용한 난대수종을 조립하므로써 내륙임업과 차별을 두는 남부임업을 실현시킬 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다.

마. 황칠에 함유 구성성분의 일부가 확인되어 천연물화학에 관한 연구의 기초 자료 제공이 가능하다.

#### 나. 경제 · 산업적 측면

##### 1) 예상수익, 농가소득증대 및 생산성 향상에 따른 비용절감 방안

가) 황칠나무에 대한 재배법, 증식법 등이 체계적으로 연구되고 자원으로서의 가치가 향상되므로써 농가소득 향상에 기여할 것으로 본다.

나) 생리활성물질의 존재는 황칠나무의 용도개발에 있어서 칠성분 외 부가가치 창출에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

다) 전통황칠의 고유물성과 다름없으며 수율이 높은 생산조건의 충족은 황칠의 공업적인 생산이 가능할 것으로 기대된다.

라) 극소수의 장인에 의하여 전통기법으로만 제조하였던 황칠을 과학적 방법을 이용하여 생산하므로써 표준화된 규격의 도료를 공업적으로 생산이 가능하다.

##### 2) 수출 가능성 및 시장성 분석

단기적으로는 금속공예용 도료시장, 장기적으로는 목공예, 종이 등 다용도 도려시장에 일정부분의 시장점유가 예상되고 황칠의 대량생산시 가격하락의 요인도 있어 일반인의 수요가 충분히 창출될 수 있을 것이다.

##### 3) 산업적 효과 및 산업발전에 미치는 영향

황칠의 안정된 공급은 이미 확인된 바 있는 금속도장을 비롯한 도자와 목재 및 종리류에도 고유한 황금색의 도장효과를 가지고 있어 각종 공예품, 화폐, 찻상, 식기 등의 다양한 산업에 내수나 수출에의 활성화에 기여할 것이고 이에 따른 관련 산업의 새로운 가치창출의 기회를 제공할 수 있을 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 우리나라의 전통 도료인 황칠성분의 과학적인 분석으로 황칠성분의 우수성을 입증하고, 황칠 외에 황칠나무로부터 생리활성성분을 검색하여 황칠나무의 효용을 극대화할 수 있는 기술적 토대를 제공할 수 있을 것이다. 또한 21세기 전통문화의 계승 발전 차원에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 성공적인 결과를 활용할 수 있는 내용은 다음과 같이 요약할 수 있다.

- ① 장기적으로 국내·외 전통공예가 및 가구 제작자 들에게 효용성이 높은 안정된 품질인 황칠의 공급이 가능하게 된다.
- ② 우리나라의 남부 해안 및 제주도 등을 주산지로서 하는 황칠나무 최적지화에 의한 지역특산화를 이룬다면 생산·가공·제품화의 단계를 일원화할 경우 경제적 효율성을 높일 수 있어 지역 주민의 소득증대에 기여 할 수 있을 것으로 생각된다.
- ③ 개체간 변이에 의해 채칠량에 차이나 품질의 차이 등을 정량적으로 이해하므로써 산칠량이 많은 우량개체의 대량공급을 위해 집단재배의 필요성 등을 확인 할 수 있을 것이다.
- ④ 황칠나무에서 황칠 외 천연 생리활성성분의 이용을 보장하는 것은 황칠재배 농민에 대해 안정적인 소득보장으로 연결될 수 있어 재배농가 및 지역의 경제에 도움이 될 수 있으리라 보인다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당없음

## 제 7 장   참고문헌

1. 강우석, 윤문태, 배규용, 임행진, 장석모, 김예희. 조림학. 학문사. (1992)
2. 공영토, 강인애, “국내 유통 옷칠의 품질과 도막물성”, 임업연구원 연구보고. 47, 47~62(1993).
3. 공영토, 강인애, “옷·황칠의 도막성능 평가”, 임산연구원 보고, 40(Ⅲ), 130~148(1992).
4. 김세현, 나천수, 김원우, 김영중. 황칠나무 발근력 증진. 한국자원식물학회지 11(2) : 167-172(1998).
5. 김수인. 한국산 싸리속의 계통분류학적 연구. 서울대학교박사학위 논문 90. 1986.
6. 김영상 등. 한국의 자생식물. 농진회. 농촌진흥청. 농진총서 19-p267(1991).
7. 김태욱. 구자운. 조중수. 황칠나무 자원식물 및 이용개발. 산림청 단기 임산 신소득 개발에 관한 연구(Ⅱ), 109-143(1991)
8. 김태정. 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부. (1996).
9. 산림청 임업연구원. 한국수목도감. 삼정인쇄공사. (1992).
11. 산림청 임업 연구원, “새로운 단기 임업 소득”, 산림청. p.96(1993).
10. 이종석, “조선 칠의 한 특징에 관하여 -문헌상의 황칠을 중심으로-”, 고고미술, 143, 11(1978).
12. 오광인. 유한춘. 박화식. 동백나무증식에 관한 연구. 광주·전남발전연구원 (1996).
13. 오광인. Metasequoia의 삼목에 관한 연구. 메타세콰이아의 발근에 관한 삼수 채취 시기, 삼수년령, 옥신농도, 침적시간, 삼수장의 영향 -전남대학교 대학원. p28(1976).
14. 오광인. 이정석. 박화식. Flowering Dogwood의 삼목에 관한 연구. 연습림연구보고 제9집. p65-74(1987).
15. 오광인. 이정석. 고려영산홍의 삼목에 관한 연구(1). Auxin농도, 삼수장, 삼수의 침적시간, 삼수채취 시기를 중심으로- No6, 1983. p19-28(1983).
16. 오광인. Metasequoia의 삼목에 관한 연구(Ⅱ) -삼목시기, 삼목피음, 삼수직경을 중심으로-Vol.12. Dec, 1977. p57-67(1977).

17. 오광인. 채정기. 연필향나무의 삼목증식. - 삼목시간, 옥신농도, 삼수채취부위를 중심으로- Vol.12, Dec, 1977. p57-67(1982).
18. 오광인, 이정석, 조경진. 호랑가시나무(*Ilex cornuta* Lin이.)의 삼목에 관하여- 삼목시간, 옥신농도, 성별-. 전남대학교 논문집 제30집. p67-71(1985).
19. 이창복. 대한식물도감. 향문사. (1985).
20. 임경빈. 조림학원론. 향문사. (1992).
21. 정병석, 김우중, “전통도료 황칠재현을 위한 황칠나무의 특성 및 이용에 관한 연구”, 제 38회 전국 과학전람회 기초과학(생물)부분, (1992).
22. 정명호. “한국 전통공예의 세계시장화를 위한 연구”, 한국문화예술진흥원 문화발전연구소, (1991)
23. 정명호. “문헌에 나타난 황칠”, 아트 and 크래프트, p.13(1993).
24. 조종수, “ 단기 임산 신소득원 개발에 관한 연구(I,II,III), 임산유지 및 칠자원 개발”, 임업연구원. (1990, 1991, 1992)
25. 직업훈련연구 Center. 도료시험법 : 15-158 (1982)
26. 최성규. 황칠나무 번식에 관한 연구. 약학지 (1998).
27. 최태봉. 현정오. 이재호. 최형순. 어수형. 이돈구. RADP 표지자를 이용한 황칠나무 천연 집단의 유전변이 및 보전전략. 한육지. 344-355(2000).
28. 홍석천. 변승현. 김삼식. 한국원색수목도감. 개명사. (1986).
29. Bulow N and Konig W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55 : 141-168(2000).
30. Choi, S.K. Cutting Propagation of *Dendropanax morbifera* LEV. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(4) : 251-257(1998)
31. Dominguez, X.A., and Alcorn, J.B., Screening of Medicinal Plants used by Huastec Mayans of Northeastern Mexico, *J. Ethnopharmacol.*, 13(2), 139-156(1985).
32. Hisea M. and Isao K. : Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1102-1105(1993)

33. Hogeboom, G. H., General methods for the isolation of liver cell components:  
Fraction of cell components of animal tissue, Meth. Enzymol. 1, 16-19(1965).
34. Jeffrey G. Harome and Herbert Baxter : A Handbook of Bioactive Compounds  
from Plants. 584(1993)
35. Jeong, B.S., J.S. Jo, B.S. Pyo and B. Hwang. Studies on the Distribution of  
*Dendropanax morbifera* and Component Analysis of the Golden Lacquer.  
Korean J. Biotechnol. Bioeng. 10(4) : 393-400(1995).
36. Kim, H.R., H.J. Chung. Chemical Characteristics of the Leaves and the Seeds  
of Korea *Dendropanax* (*Dendropanax morbifera* Lev. ). J. Korean Soc.  
Agric.Chem. Biotechnol. 43(1) : 63-66(2000).
37. Kim, H.R., H.J. Chung. Seasonal Changes in Chemical Components of the  
Leaves of *Dendropanax morbifera* Lev.. Jour. Korean For. Soc. 88(4) :  
562-567.(1999)
38. Kim, S.H. Ecology and superior tree selection of *Dendropanax morbifera* Lev.  
Doctor thesis. 1998
39. Lim, K.P., Kim Y. S and Chung W.Y. Studies on the development of  
traditional Korean Golden Varnish(Hwangchil)(I) -Anatomical characteristics  
and chemical composition of wood and exudates of Hwangchil-namu  
(*Dendropanax morbifera*). Mokchae Konghak 25(3): 24-28(1997).
40. Lim, K.P., W.Y. Chung. Studies on the development of traditional Korean  
Golden Varnish (Hwangchil)(II)-chemical composition and coating-oil  
characteristics of the exudates and bark-extractives of Hwangchil-namu  
(*Dendropanax morbifera* Lev.). Mokchae Konghak 26(1): 7-13(1998).
41. Lim, K.P., W.Y. Chung and D.H. Hong. Studies on the development of  
traditional Korean Golden Varnish(Hwangchil)(III) - main component analysis  
of Korean Golden varnishes traditionally refined from the exudates of  
Hwangchil- namu (*Dendropanax morbifera* Lev.). Mokchae Konghak 26(3):  
73-80(1998).
42. Maghran G. H. El-Hossary G. SeidaA. and Amin W : Volatile oil of Ambrosia

- maritima. *Planta Medica*, 55, 105(1989)
43. Masao Toyota, Yoshinori Asakawa and Jan-Peter Frahm : Homomono and sesquiterpenoids from the liverwort *Lophecolea heterophylla*. *Phytochemistry*, Vol. 29, No. 7, 2334-2337(1990)
  44. Ohkawa, H.N., Ohishi, N. and Yagi, K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358(1979).
  45. Rothe, A., A. Heine, and E. Rebohle : Oil from juniper berries as an occupational allergen for the skin and respiratory tract. *Berufsdematosen*, 21, 11-16(1973)
  46. Samuelson, B., Leukotrienes, mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science*, 228, 568-575(1983)
  47. Tanaka, Y., Takagak, Y. and Nishimune, T., Effects of metal elements on b-hexosaminidase release from Rat Basophilic Leukemia Cells (RBL-2H3). *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2072-2076(1991).
  48. The Rain Tree Group, Inc., Austin, Texas 78757, <http://www.raintree@bga.com>
  49. Yoshihara, K. and Hirose, Y., The Sesquiterpene of *Dendropanax trifidus*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 51, 3395-3396(1978)
  50. 寺田 晁, 日本の金漆, 科学史研究 II (25) ; 118-136(1986).
  51. 寺田 晁. 1988. 古代塗料 金漆の研究. *日本漆工* 428 : 8-14
  52. 寺田 晁. 1990. 古代塗料 金漆の謎をつつる. *化学* 45(12) : 891-855.
  53. 安田邦鸞. 黄漆の成分及含有する精油の性状に就て. 朝鮮總督府 中央試験所 報告. 8:15~21(1928).
  54. 安田邦鸞. 黄漆の精油就て. 朝鮮總督府 中央試験所 報告. 17 : 1-4(1937).
  55. 堀田 満, 緒方 健, 新田あや, 星川清親, 柳 宗民, 山崎耕宇 외 14. (1989). *世界有用植物事典*. 平凡社. p.535.