

최 종  
연구보고서

마가목의 생리활성 탐색과 기능성 제품의 개발  
Development of Functional Product and Screening For  
Biological Activities of the Extracts from *Sorbus*  
*Commixta* Hedl

연구기관  
강원대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “마가목의 생리활성 탐색과 기능성 제품의 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2003 . 8 . 11

주관연구기관명 : 강원대학교  
총괄연구책임자 : 김 종 대  
세부연구책임자 : 이 진 하  
연 구 원 : 이 현 용  
연 구 원 : 최 진 태  
연 구 원 : 최 근 표  
연 구 원 : 박 건 식  
위탁연구기관명 : 강원도 농업기술원  
고원농업시험장  
위탁연구책임자 : 서 정 식  
연 구 원 : 조 수 현

# 요 약 문

## I. 제 목

마가목의 생리활성 탐색과 기능성 제품의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 동·식물 기원의 천연물에 대한 관심이 높아져 천연물에서 새로운 기능성 물질을 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 천연물 소재 유래의 기능성 물질들은 식품이나 의약품에 많이 활용되고 있는 실정이다. 우리나라의 경우 국민생활이 향상되고 식습관을 비롯한 생활습관이 서구화되면서 우리나라의 질병양상도 크게 바뀌고 있다. 과거에는 결핵이나 폐렴 같은 감염성질환이 주요 사망원인이었으나, 동물성 지방의 과다섭취로 인하여 고혈압, 고지혈증, 동맥경화증, 심근경색증 및 뇌혈전증 등과 같은 혈관순환계질환의 사망률이 증가 추세에 있다. 이와 같은 성인병의 증가에 따라 사망률이 증가하면서, 각종 성인병의 치료와 예방에 천연물 소재 유래의 기능성 물질이 주목을 받고 있다.

한편, 마가목(*Sorbus commixta* Hedl.)은 장미과의 낙엽활엽수로 소교목에 속하며 대부분 높은 고산지에서 자생한다. 100년까지 살 수 있다고 하며 북아프리카, 유럽, 아시아 일부에 자생된다. 마가목 잎은 우상복엽으로 한 개의 잎에는 9-13개의 피침형 소엽이 붙어 있다. 열매는 품종에 따라 다르지만 보통 붉은 색을 띠며, 가을이 되면 대부분 산새들의 먹이가 되어 종자가 퍼지게 된다. 수피는 은회색이며 가지는 회색이고, 목재는 단단해서 불에 잘 타지 않는다고 하여 예로부터 조각재료로 많이 쓰였다. 꽃은 5-6월에 새하얗게 피어나며 총생한다. 서양에서는 가로수와 정원수로 이용하며 탄닌, 사과산, 구연산, 카로티노이드 성분이 풍부하여 잼이나 술을 만들어 감기와 위장약으로 활용하고, 잎은 양의 사료로 사용하고 있다. 마가목의 가지를 말린 후 달여 마시는 마가목 차는 관절염과 성인병에, 열매로 만든 마가목 술은 생식기 질환과 이

질, 설사병, 대장이나 위장질환에 좋은 것으로 알려져 있다. 국내에서 마가목은 강장 보호, 기관지염, 동맥경화, 방광염, 보혈, 설사, 양모, 위염, 진해, 폐결핵, 해수 등의 한약재로서 사용되어 왔으나 국내에서의 마가목에 대한 과학적인 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 마가목의 생리활성과 영양성분을 탐색함으로써 기능성 식품 자원으로서의 가능성을 확인하고 마가목의 재배법을 연구함으로써 부존자원으로서의 가치를 높여 농가의 소득증대에 기여하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 마가목의 재배기술을 확립하고 마가목의 추출물의 생리활성 탐색 및 영양성분을 분석하고 동물실험에 의한 효능검증을 함으로써 추출물을 이용한 기능성 식품을 개발하고자 하는 것이 목표이며 그 범위는 다음과 같다.

#### 1. 연구개발목표

가. 마가목 추출물의 생리활성 탐색 및 기능성 식품 개발

나. 마가목의 영양성분 분석 및 동물실험에 따른 효능검증

다. 마가목의 표준재배법 확립 및 우량묘 생산

#### 2. 연구개발 내용 및 범위

가. 마가목 추출물의 생리활성 탐색 및 식품제조

1) 마가목 추출물의 생리활성 탐색

- 추출물 및 분획물의 제조 및 수율
- 추출물 및 분획물의 항돌연변이원성 탐색
- 추출물 및 분획물의 항암효과 탐색

- 추출물 및 분획물의 세포독성 및 간 기능 생리활성 검색
- 추출물 및 분획물의 ACE 활성 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 측정

## 2) 기능성 식품개발

- 다류 제품 개발
- 음료 개발
- 주류 제품 제조
- 쿠키제품 개발
- 시제품에 대한 관능검사

## 나. 마가목의 영양성분 분석 및 동물실험

### 1) 마가목의 영양성분 분석

- 마가목의 일반성분 분석
- 지방산 분석
- 아미노산 분석
- 비타민 C 및 E 분석
- 무기물 분석
- 향기성분 분석
- 배당체 분석
- in vitro 항산화활성 측정
- 항산화 물질의 분리 및 구조 확인

### 2) 동물 실험

- 성장률
- 간장과 혈액 중의 지질함량
- 분변량 및 분변 중 담즙산 배설
- 간장 중의 항산화 활성 측정

## 다. 마가목의 표준재배법 확립 및 우량묘 생산

### 1) 발아율 향상

- 육묘상토 검정
- 종자 처리법

### 2) 표준 재배법 확립 및 우량 묘 생산

- 시비량 연구
- 병충해 조사
- 피복 방법

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 마가목 추출물의 생리활성 탐색 및 식품개발

마가목 잎, 수피, 열매 추출물의 Spore-rec assay와 Ames test에 의한 항돌연변이 활성탐색 결과, 추출물 모두 돌연변이원성을 나타내지 않았으며 열매와 수피의 에탄올 추출물에서 MNNG에 대하여 높은 항돌연변이원성을 나타내었다.

인간 암세포주를 이용한 항암효과 실험은 먼저 정상 간세포인 WRL68에 대한 세포독성효과를 검토한 결과, 0.75mg/ml 이하의 농도에서 수피의 물 추출물을 제외하고는 모두 20% 이하의 낮은 세포독성을 나타내어 추출물 자체의 세포 독성은 낮은 것으로 확인되었다. 인간 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF7), 간암세포(HepG2)에 대한 세포독성 결과, 수피의 에탄올 추출물이 폐암세포주인 A549에 대하여 1.0mg/ml의 농도에서 94%의 가장 높은 암세포 생육억제능을 나타내었으며, 0.75mg/ml 이상의 농도에서 65%이상의 생육억제 활성을 나타내었다. 유방암세포주인 MCF7에 대하여서는 0.75mg/ml이상의 농도에서 58%이상의 생육억제능을 나타내었으며, 열매의 에탄올 추출물이 1.0mg/ml의 농도에서 91%의 생육을 억제하였다. 간암세포주인 HepG2에 대하

여서는 수피와 열매의 추출물들이 0.75mg/ml 이상의 농도에서 56%이상의 생육억제활성을 나타내었다. GST 활성 측정 결과 1mg/ml에서 2.23배 높은 활성을 보였고 혈압조절에 관여하는 효소인 ACE 활성 측정결과 높은 억제율을 보였고  $\alpha$ -glucosidase 활성 측정 결과 최고 84%의 억제율을 나타내었다.

이와 같은 결과에서와 같이 마가목 잎, 열매, 수피 추출물들은 시료자체의 독성은 낮은 반면 항돌연변이원성 및 암 세포주에 대한 생육억제 활성이 높고 GST, ACE,  $\alpha$ -glucosidase 등의 활성을 억제하는 다양한 생리기능을 갖고 있어 앞으로 이들 추출물을 이용한 기능성 식품소재로의 이용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 2. 마가목의 영양성분 분석 및 동물실험

### 가. 마가목의 영양성분 분석

본 실험에서는 마가목의 영양성분 분석과 추출물을 쥐에 급여하여 지질대사 및 항산화 효소활성에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과는 다음과 같다. 열매의 일반분석결과 수분, 지방, 탄수화물, 단백질, 회분이 각각 69.4%, 1.8%, 23.8%, 2%, 3%이었다. 지방산 분석 결과 18:2>18:1>16:0>24:0>22:0 순으로 지방산의 함유량이 많았고, 아미노산의 경우 aspartic acid>glutamic acid>lysine>alanine 순으로 함유되어 있었다. 비타민 C와 E의 분석결과 각각 80.9mg/100g, 82.02mg/100g 함유되어 있었다. 미네랄 분석 결과 potassium이 1238.3mg/100g, calcium 290.8mg/100g, magnesium 111.5mg/100g 순으로 함유되어 있었다.

꽃 속의 향기성분 분석 결과 styrene를 비롯한 16개 성분이 검출되었고 배당체의 경우 phenol, anthraquinone, anthranol, nitril, flavonoid, anthocyan glycoside가 확인되었다. 또한 항산화 물질의 동정 결과 분자식(C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>), 분자량(364.61)인 (2,6-dihydroxy-4-[(4-hydrophenyl)peroxyl]benzoic acid)가 확인되었다.

### 나. 동물실험

Sprague-Dawley rats에 동결 건조한 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물을 식이

에 1% 수준으로 첨가하여 4주간 사육한 동물실험 결과, 성장률과 식이 섭취량에 있어서 각 군간에 유의적인 차이는 보이지 않았다. 혈청 중의 total cholesterol과 triglyceride 함량은 대조군에 비해, 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물군 모두 유의적으로 감소하였다. HDL-cholesterol과 phospholipids 및 glucose는 각 군간에 유의적인 차이가 없었다. 간장 중의 triglyceride 함량을 측정된 결과, 대조군에 비해 메탄올추출물군이 유의적으로 감소하였으나 물추출물군은 통계적인 유의성이 없었다. 간장 중의 total cholesterol 함량을 측정된 결과, 물추출물군과 메탄올추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으나 phospholipids 함량은 물추출물군과 메탄올추출물군이 대조군에 비해 약간 증가하였다. 분변량은 각 군간에 유의적인 차이가 없었으나, 담즙산 배설은 물추출물군과 메탄올추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 항산화 효소 중 glutathione peroxidase 활성은 물과 메탄올추출물 급여군이 대조군에 비해 높았다.

### 3. 마가목의 표준재배법 확립 및 우량묘 생산

마가목의 표준재배법 확립을 위해 발아율 제고 및 육묘방법을 연구한 결과 다음과 같다. 마가목 종자는 무처리에서 22.6%정도의 저조한 발아율을 보였으나, BA 200ppm을 20분간 처리에서는 78.9%정도로 발아율이 높았다. 출현율은 상자 육묘와 포트육묘 재배시 93-95%로 높았으며, 49공 포트육묘 재배시 육묘기간 50일 묘에서 근장이 길고, 건조근중이 높아 근생육이 양호하게 나타났다. 상자육묘 재배시 육묘기간이 40일묘에서 초장, 건조엽중이 포트육묘 보다 높았으며. 결과적으로 마가목의 실생육묘시 포트육묘로 50일 재배 후 이식하는 것이 가장 양호하였다. 시비량 설정연구에서 비료의 처리별 생육상황을 확인한 결과 초장의 길이가 가장 긴 것은 232 처리를 한 경우였고, 경경의 경우 모든 처리에서 차이가 없었다. 비료의 처리별 병해충에 의한 피해주율을 조사한 결과 충해의 경우는 000 처리가, 반점의 경우는 322 처리가, 황화의 경우는 212 처리가 각각 8.3%, 13.9%, 14.8%로 가장 높았다. 우량종묘선발 시험 결과 초장은 AP03이, 경경은 AP06이, 분지수는 AP04가, 분지길이는 AP03이, 분지높이도 AP03이 가장 우수한 특성을 보였다. 전체적으로 AP03과 AP13이 다른 종묘들에 비하여 초장, 경경, 분지수, 분지길이, 분지높이 등 모든 조사 항목에서 비교적 우수한 생육특성을 보였다. 마가목 육묘시 시비량 설정 연구, 육묘시 피복효과 및 전정효과

시험을 수행한 결과 비중에 따른 시비곡선 반응식은 질소  $Y=-0.151 \times 2+3.5833 \times +38.26$ , 인산  $Y=-0.0536 \times 2+1.8753 \times +44.172$ , 칼륨  $Y=-0.1408 \times 2+2.6209 \times +50.908$ 으로 시비추천량은 질소 12.6kg/10a, 인산 17.5kg/10a, 칼륨 10.7kg/10a이었다. 피복효과시험에서는 투명비닐 멀칭이 초장의 경우 톱밥 28.4cm, 벚짚 35.4cm, 흑색비닐 39.6cm, 투명비닐 41.9cm로 나타났고 신초장과 신초경도 같은 경향이였다. 마가목 전정시 초장은 전정 가지유 처리가 52.8cm, 전정 가지무 처리 59.2cm 무전정 가지유 처리 54.7cm, 무전정 가지무 처리 66.3cm로 나타났다.

#### 4. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 얻은 결과는 다음과 같이 활용할 수 있다.

- 마가목의 대량 재배 기술 보급으로 야생식물의 자원화와 이를 통한 관광용 수목림과 정원 등의 조경용수로 활용
- 마가목의 자원화로 농업인의 경제 활성화에 따른 농가소득 증대
- 마가목의 기능성 식품이나 건강 보조 식품 등의 재료화로 활용
- 마가목을 이용 희망 기업에 식품제조 기술을 이전하여 활용

## **Summary**

### **I. Title**

Development of Functional Product and Screening For Biological Activities of the Extracts from *Sorbus commixta* Hedl

### **II. Objectives and Significance of Research**

In recent years, great interest in the natural products originated from animals and plants lead to the research on the screening of novel compounds and the development of new commercial natural products. These new natural products could be used for foods and medicinal purposes. In Korea, industrialization and westernization resulted in the upgrade of standard of living and the change of food consumption patterns among Koreans, and these changes caused the change of disease occurrence patterns. In the past, infectious diseases such as tuberculosis and pneumonia was the main cause of death. However, in recent years, increased consumption of animal fats lead to the higher occurrence of a vascular tract and circulatory system diseases such as hypertension, arteriosclerosis, cardiac infraction, or cerebral thrombosis. Increase of geriatric diseases among the adult populations lead to a higher death rate among the adults, and, as a result, increase in the interest in beneficial natural novel compounds for the prevention and cure of geriatric diseases.

*Sorbus commixta* Hedl. belongs Rosaceae and lives in the higher elevation areas. It's life time lasts for more than 100 years and can be found in North Africa, Europe, parts of Asia. It's leaf is a pinnate compound leaf and, in each leaf, there is 9-13 lanceolate lobulus. The fruits, even though there are some variations, are usually red, and spread by wild birds in the fall. The bark is silver color and the wood is strong enough to be used as a carving material. It flowers

in May or June, and the flowers grow in clusters. In western countries, it is mostly used as a garden tree or a roadside tree. It contains high levels of tannic acid, malic acid, citric acid and carotenoid, and processed as a jam or liquor and used for a cold and a gastroenteric disorder treatments. Leaves are used as a feed for ram. Tea made from dried and boiled branches of *Sorbus commixta* Hedl. is useful for arthritis and various geriatric diseases. Liquor made from *Sorbus commixta* Hedl. is useful for reproductive organ diseases, dysentery, diarrhea, large intestine disorders, and gastroenteric disorders. In Korea, *Sorbus commixta* Hedl. has been used as a oriental medicine for the prevention and treatment of liver disorders, bronchitis, arteriosclerosis, bladder infection, and diarrhea, and used as an antianaemic agents. However, there were no scientific researches on the *Sorbus commixta* Hedl. for the medicinal proposes. Therefore, in this research, cultural aspects, and medicinal and nutritional aspects of *Sorbus commixta* Hedl. were investigated.

### **III. Scope and Contents of Research**

#### **1. Screening on the several biological activities of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl**

- 1) Sample Preparation of extracts and fractions
- 2) Mutagenicity and Antimutagenicity test using Ames test
- 3) Anticancer and cytotoxicity test
- 4) Screening of GST, ACE and  $\alpha$ -glucosidase activities

#### **2. Development of function product using the extracts of *Sorbus commixta* Hedl.**

- 1) Tea, soft drinks and cooky products
- 2) Sensory evaluation test for developed product

### 3. Analysis of nutritional components of *Sorbus commixta* Hedl.

- 1) Analysis of nutritional components
- 2) Animal study

### 4. Development of mass production of *Sorbus commixta* Hedl.

- 1) Germination rate
- 2) Growing seedling and soaking methods
- 3) Fertilizer requirement
- 4) Mulching and pruning effect test
- 5) Pest and disease occurrence

## IV. Conclusions and Recommendation

### 1. Development of Functional Product and Screening For Biological Activities of the Extracts from *Sorbus commixta* Hedl.

This study was investigated on the biological activities such as mutagenicity, antimutagenicity, anticancer, cytotoxicity, angiotension conversion enzyme,  $\alpha$ -glucosidase, glutathione-s-transferase of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl. *Sorbus commixta* Hedl were extracted ethanol and then fractionated with chloroform, butanol and water to get active fractions. The result of the mutagenicity test, the extracts of the *Sorbus commixta* Hedl. did not show a DNA-damage activity. The result of the Antimutagenicity test were provided that extracts of *Sorbus commixta* Hedl. showed 43~73% antimutagenic activities which added MNNG. Animal cell lines used anticancer test were A549, MCF7, HePG2. 91% of MCF7 cell growth was inhibited by *Sorbus commixta* extracts which final concentration was 1mg/ml. 94% of A549 cell growth was inhibited by *Sorbus commixta* extracts which final concentration was 1mg/ml. 91% of HepG2 cell growth was inhibited by *Sorbus commixta* extracts

which final concentration was 1mg/ml. There was a little cytotoxicity on human normal hepatocyte (WRL68), extracts (1mg/ml) showed over 70% survival. The recovery screening of liver function by using GST showed that specific activities of GST were more increased 2.23 times in adding the *Sorbus commixta* extracts(1mg/ml) than control. For screening regulate function of blood pressure used ACE, ACE activities which major cause of hypertension were inhibited up to 96% by adding the extracts(1mg/ml). In testing the hypoglycemic activity, 16% of  $\alpha$ -glucosidase activity was inhibited for the extracts(1mg/ml). Finally we developed food such as cookies, alcohol drink, soft drink, tea products using extracts of *Sorbus commixta* Hedl. Sensory evaluation results showed that developed food had high sensory score

## **2. Analysis of nutritional component of *Sorbus commixta* Hedl and Animal study.**

This study was carried out to investigate on the nutritional component and animal study. The analyzing results of general components in fruit contains moisture(69.4%), ash(3.0%), crude lipid(1.8%), crude protein(2.0%) and carbohydrate(23.8%). In case of bark contains moisture(50.3%), ash(4.0%), crude lipid(3.3%), crude protein(3.0%) and carbohydrate(39.4%). The analyzing results of fatty and shows that the major fatty acids have their contents on the order of 18:2>18:1>16:0>24:0>22:0. The analyzing results of amino acid, shows that water extracts have their contents on the order of aspartic acid>glutamic acid>lysine>alanine. The analyzing result of vitamin, the vitamin C and E content are 80.9 mg/100g, 82.02 mg/100g, respectively. The analyzing results of mineral, the content of potassium is 1,238.3 mg/100g, sodium 7.5 mg/100g, calcium 290.8 mg/100g, magnesium 111.5mg/100g, phosphorus 27.6 mg/100g in fruits. Volatile components in flowers of *Sorbus commixta* Hedl. W. Seventeen volatile components such on styrene, benzaldehyde, benzyl alcohol, benzeneacetonitrile, nonanal, phenylethyl alcohol, para-anisaldehyde, phenol methoxy-5-(1-propenyl)-, benzoic acid 2-methoxy-, 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione, phenol 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-, farnesol, hexadecanoic acid, tricosane, hexadecanoic acid, butyl ester, hexacosane,

hexanedioic acid, dioctyl ester were identified by GC-MS.

The analyzing results of glycoside, phenol glycoside, anthraquinone glycoside, anthranol glycoside, nitril glycoside, flavonoid glycoside, anthocyan glycoside, terpenoid, alkaloid were detected. The analyzing result of  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ -NMR and mass spectrum, molecular formula ( $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_2$ ), molecular weight (364.61), IUPAC name (2, 6-dihydroxy-4-[(4-hydrophenyl)peroxy]benzoic acid) was identified. The results to animal study, food intake, weight gain and liver weight were not shown in meaningful difference among the groups. The concentration of serum triglyceride and total cholesterol were significantly decreased in WE and MeOH group compared to control group. Serum HDL-cholesterol, phospholipids and glucose contents were slightly lower in WE and MeOH group than control group. The levels of liver triglyceride was significantly decreased in MeOH group compared to control group. The levels of total cholesterol and phospholipids in liver were significantly lower in WE and MeOH group than control group. Fecal bile acid excretion were higher WE and MeOH groups than control group. Cytosolic enzyme activity such as glutathion peroxidase was significantly increased in WE and MeOH group compared to control group.

### **3. Development of mass production of *Sorbus commixta* Hedl.**

This study was conducted to develop the mass production of *Sorbus commixta* Hedl. The results of the germination rate enhancement effect and the growing seedling method on *Sorbus commixta* Hedl. are follows. The optimum temperature of stratification and germination of mountain ash was 5°C. The seed germination rate in wet stratification with sand at 5°C for 90 days was 22.6% and the highest germination of 78.9% was observed when seed was soaked in BA 200ppm for 20 minute after stratification for 90 days at 5°C. The highest germination of large chinese hawthorn was 11.1% when seed was soaked BA 50ppm for 20 minute after stratification 90 days at 5°C. Emergence ratio in box raising seedling and pot seedling showed high, 93 and

95%. Root length and dry root weight in pot seedling for 50 days showed higher than that of direct seedling and box raising seedling. Plant height and dry leaf weight in box raising seedling showed higher than that of pot seedling and direct seedling. The growth increasement of seedling was high between 40 days and 50 days after seedling. The excellence seedling of mountain ash was produced in pot seedling for 50 days. The results of the studies on the fertilizer requirement, mulching effect, and pruning effect for the growth of *Sorbus commixta* HEDL in the cultivation field were performed. Reaction formula for each different fertilizer is as follow Nitrogen,  $Y = -0.151x^2 + 3.5833x + 38.26$ , Phosphate,  $Y = -0.0536x^2 + 1.8753x + 44.172$ , and Potassium,  $Y = -0.1408x^2 + 2.6209x + 50.908$  Recommended amount of fertilizer is 12.6kg/10a, 17.5kg/10a, and 10.7kg/10a for Nitrogen, Phosphate, and Potassium, respectively. In the mulching effect tests, it was found that plant length was 28.4cm, 35.4cm, 39.6cm, and 41.9cm in sawdust mulching, rice straw mulching, black non-transparent vinyl mulching, and transparent vinyl mulching, respectively. Transparent mulching also showed the best results in length and diameter of newly emerged plants. In the pruning effect tests, it was found that plant length was 52.8cm, 59.2cm, 54.7cm, and 66.3cm for pruned and branched, pruned and no-branched, no pruned and branched, and no pruned and no-branched. The results of the mass production are as follow In order to determine the effect of fertilizer for optimum plant growth, different types of fertilizers were treated. As a result, treatment 232 resulted in the highest plant length compared to others, and all the treatment did not show any difference in plant stem diameter. In order to determine the effect of fertilizer for pest and disease occurrence, different types of fertilizers were treated. Treatment 000 resulted in the highest pest infection rate of 8.3%, treatment 322 resulted in the highest spot occurrence rate of 13.9%, and treatment 212 resulted in the highest yellowing rate of 14.8%. In the selection for high quality seedlings, AP03, AP06, AP04, AP03 and AP09, and AP03 showed the highest values of 165, 1.5, 10, 87, and 36 in plant length, stem diameter, number of branch, length of branch, and the hight of branch, respectively. As a result, AP03 and AP13 showed the best quality in all the measured items.

# Contents

Chapter 1. Introduction	
Section 1. Objective and Scope of Research .....	23
Section 2. Needs of Research .....	23
Section 3. Research Trends in Domestic and Foreign Country.....	27
Chapter 2. Development of Functional Product and Screening For Biological Activities of the Extracts from <i>Sorbus commixta</i> Hedl	
Section 1. Introduction .....	28
Section 2. Methods and Materials.....	30
1. Screening on the several biological activities of the extracts from <i>Sorbus commixta</i> Hedl.....	30
1) Sample Preparation of extracts and fractions.....	30
2) Mutagenicity and Antimutagenicity test using Ames test .....	30
3) Anticancer test .....	31
4) Cytotoxicity test .....	32
5) Screening of GST activities .....	33
6) Screening of ACE activities .....	33
7) Screening of $\alpha$ -glucosidase activities .....	34
2. Development of function product using the extracts of <i>Sorbus commixta</i> Hedl .....	34
1) Tea products .....	34
2) Soft drinks .....	35
3) Cookies .....	36
4) Sensory evaluation test for developed product .....	39
Section 3. Results and Discussion	
1. Screening on the several biological activities of the extracts from <i>Sorbus commixta</i> Hedl .....	40

1) Yields of the fractions .....	40
2) Anticancer effects of the fractions.....	52
3) Cytotoxicity of the fractions.....	53
4) ACE inhibitory effects of the extracts and fractions .....	60
5) GST activities of extracts and fractions .....	60
6) $\alpha$ -glucosidase activities of the extracts and fractions .....	60
Chapter 3. Analysis of nutritional components of <i>Sorbus commixta</i> Hedl.	
Section 1. Introduction.....	68
Section 2. Methods and Materials .....	69
1. Analysis of nutritional components	
1) Analysis of General components .....	69
2) Analysis of fatty acid .....	69
3) Analysis of amino acid.....	69
4) Analysis of vitamin C and E.....	72
5) Analysis of minerals .....	72
6) Analysis of volatile components.....	72
7) Analysis of glycosides .....	75
8) Screening for antioxidative activities.....	75
9) Isolation and Identification for antioxidative substances .....	75
Section 3. Results and Discussion.....	82
2. Animal study	
1) Growth parameters .....	104
2) Lipid levels in serum .....	104
3) Lipid levels in liver .....	105
4) Fecal weight and fecal bile acid excretion.....	114
5) Measurement of Antioxidant enzyme activities in liver .....	114
6) MDA production in liver.....	120

Chapter 4. Development of mass production of <i>Sorbus commixta</i> Hedl.	
Section 1. Introduction .....	123
Section 2. Materials and Methods .....	123
1) Germination rate.....	124
2) Growing seedling method .....	125
3) Soaking method.....	125
4) Fertilizer requirement.....	125
5) Mulching effect test .....	126
6) Pruning effect test.....	126
7) Pest and disease occurrence .....	126
Section 3. Results and Discussion.....	127
1) Germination rate.....	127
2) Growing seedling method .....	130
3) Soaking method.....	135
4) Fertilizer requirement.....	142
5) Mulching effect test .....	150
6) Pruning effect test.....	150
7) Pest and disease occurrence .....	150
Chapter 5. References.....	159

# 목 차

제 1 장 서론 .....	23
제 1 절 연구개발의 목적과 범위 .....	23
1. 연구의 목적 .....	23
2. 연구개발 내용 및 범위 .....	23
가. 마가목 추출물의 생리활성 탐색 및 식품제조 .....	23
나. 마가목의 영양성분 분석 및 동물실험 .....	24
다. 마가목의 표준재배법 확립 및 우량묘 생산 .....	24
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	25
1. 기술적 측면 .....	25
2. 경제·산업적 측면 .....	25
3. 사회·문화적 측면 .....	26
제 2 장 국내·외 연구동향 .....	27
1. 관련기술의 현황 .....	27
2. 향후전망 .....	27
제 3 장 마가목 추출물의 생리활성 탐색 .....	28
제 1 절 서설 .....	28
제 2 절 연구내용 및 방법 .....	30
1. 추출물 및 분획물의 조제 .....	30
가. 추출물의 조제 .....	30
나. 분획물의 조제 .....	30
2. 항 돌연변이원성 탐색 .....	30
가. Bacillus subtilis의 spore rec-assay를 이용한 항돌연변이원성의 측정 .....	30
나. Ames-test를 이용한 항돌연변이원성 측정 .....	31
3. 항암 활성 측정 .....	32
가. 세포주 및 생육배지 .....	32
나. SRB 방법 .....	32

4. 세포 독성 측정 .....	33
5. GST 활성 측정 .....	33
6. ACE 활성 측정 .....	33
7. $\alpha$ -glucosidase 활성측정 .....	34
8. 마가목 추출물을 이용한 기능성 식품 소재 관련 기술 개발 .....	34
9. 마가목 추출물의 이용한 식품제조 .....	34
가. 다류 제품 개발 .....	34
나. 음료개발 .....	35
다. 주류 제품 개발 .....	35
라. 쿠키 개발 .....	36
마. 시제품에 대한 관능검사 .....	39
제 3 절 결과 및 고찰 .....	40
1. 추출물의 수율 .....	40
2. 마가목 추출물의 항돌연변이원성 탐색 .....	42
가. Spore-rec Assay를 이용한 항돌연변이원성 실험 .....	42
나. Ames test를 이용한 항돌연변이원성 실험 .....	42
3. 마가목 추출물의 항암 활성 실험 .....	47
4. 분획물의 수율 및 분획물의 항암, ACE, $\alpha$ -glucosidase, GST 활성 측정 결과 .....	52
가. 분획물의 수율 .....	52
나. 항암 활성 효과 .....	52
다. 세포독성 .....	53
라. ACE 억제 활성 탐색 .....	60
마. Glutathione S-transferase 활성측정 .....	60
바. $\alpha$ -glucosidase 억제 활성 탐색 .....	60
5. 마가목 추출물을 이용한 식품개발 .....	64
가. 다류, 음료, 주류, 쿠키(파이) 시제품 개발 .....	64
나. 관능검사 .....	66
제 4 장 마가목의 영양성분 분석 .....	68
제 1 절 서설 .....	68

제 2 절 연구내용 및 방법 .....	69
1. 마가목 , 수피, 열매의 일반성분 분석 .....	69
2. 마가목 열매와 수피의 지방산 분석 .....	69
3. 마가목 열매와 수피 추출물의 아미노산 분석 .....	69
4. 마가목 열매의 비타민C 및 E 분석 .....	72
5. 무기물 분석 .....	72
6. 마가목 꽃의 향기성분 분석 .....	72
7. 배당체 정성분석 .....	75
8. In vitro에서의 항산화 효과 실험 .....	75
9. 항산화 물질의 분리 및 구조 확인 .....	75
가. 추출 및 유기용매에 의한 분획 분리 .....	75
나. Sephadex LH-20을 이용한 항산화 물질의 분리 .....	75
다. Prep-HPLC에 의한 flavonoid의 분리 .....	76
라. Mass 및 NMR 분석 .....	76
10. 마가목 추출물의 효능검증(동물실험) .....	77
가. 식이의 재료와 조제 .....	77
나. 실험동물 사육 .....	77
다. 시료의 채취 .....	77
라. 미토콘드리아 및 cytosol의 분리 .....	79
마. 혈청 및 간장중의 지질함량 분석 .....	79
바. 분변 중의 담즙산 분석 .....	79
사. 마가목 열매 추출물의 in vivo 항산화 효소계 활성 측정(간장) .....	79
아. 단백질 정량 .....	80
자. 통계처리 .....	80
제 3 절 결과 및 고찰 .....	82
1. 마가목, 잎, 줄기, 열매로부터 추출물의 수율 .....	82
2. 마가목 열매 및 수피의 일반성분 분석 .....	82
3. 마가목 열매와 수피의 지방산 분석 .....	82
4. 마가목 추출물의 amino acid 분석 .....	86
5. 마가목 열매의 비타민C 및 E 분석 .....	91

6. 마가목 열매의 무기물 함량 .....	91
7. 마가목 꽃의 향기성분 분석 .....	94
8. 배당체의 정성분석 .....	94
9. 마가목 열매 추출물의 in vitro 항산화 활성 .....	98
10. 항산화 물질 분리 및 구조 확인 .....	98
11. 동물실험 .....	104
가. 성장률 .....	104
나. 혈청중의 지질함량 측정 .....	104
다. 간장중의 지질함량 측정 .....	105
라. 분변량 및 분변 중의 담즙산 배설 .....	114
마. 항산화 효소계 활성 측정(간장) .....	114
바. 간장조직의 지질과산화 분석 .....	120
제 5 장 마가목의 우량묘 대량생산법 .....	123
제 1 절 서설 .....	123
제 2 절 연구내용 및 방법 .....	124
1. 우량묘의 대량 배양기술 개발 .....	124
가. 마가목 種子의 發芽條件 .....	124
나. 마가목의 實生 育苗技術 .....	125
다. 시비량 설정시험 .....	125
라. 피복효과 시험 .....	125
마. 전정효과 시험 .....	126
바. 병해충 조사 .....	126
사. 우량묘 선발 .....	126
제 2 절 결과 및 고찰 .....	127
1. 마가목과 種子의 發芽率 提高 .....	127
가. 증적온도 및 발아온도에 따른 발아특성 .....	127
나. 저장방법에 의한 발아율의 변화 .....	130
다. 화학약품 처리가 마가목 종자 발아에 미치는 영향 .....	130
라. 성장조절제 처리가 마가목 종자 발아에 미치는 영향 .....	133

2. 마가목의 實生 育苗技術 .....	135
가. 육묘방법별 출현기 및 출현율 .....	135
나. 육묘방법별 생육량 변화 .....	135
3. 마가목의 표준재배법 .....	142
가. 시비량 설정연구 .....	142
나. 피복효과 시험 .....	147
다. 전정 효과시험 .....	150
라. 병해충 조사 .....	150
마. 우량묘 선발 .....	150
제 6 장 목표 달성 및 관련 분야에의 기여도 .....	157
제 7장 연구 개발결과의 활용계획 .....	158
제 8장 참고 문헌 .....	159

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

### 1. 연구의 목적

본 연구는 마가목의 재배기술을 확립하고 마가목의 추출물의 생리활성 탐색 및 영양성분을 분석하고 동물실험에 의한 효능검증을 함으로써 추출물을 이용한 기능성 식품을 개발하고자 하는 것이 목표이며 그 범위는 다음과 같다.

### 2. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 마가목 추출물의 생리활성 탐색 및 식품제조

##### 1) 마가목 추출물의 생리활성 탐색

- 추출물 및 분획물의 제조 및 수율
- 추출물 및 분획물의 항돌연변이원성 탐색
- 추출물 및 분획물의 항암효과 탐색
- 추출물 및 분획물의 세포독성 및 간 기능 생리활성 검색
- 추출물 및 분획물의 ACE 활성 및  $\alpha$ -glucosidase 활성 측정

##### 2) 기능성 식품개발

- 다류 제품 개발
- 음료 개발
- 주류 제품 제조
- 쿠키제품 개발
- 시제품에 대한 관능검사

## 나. 마가목의 영양성분 분석 및 동물실험

### 1) 마가목의 영양성분 분석

- 마가목의 일반성분 분석
- 지방산 분석
- 아미노산 분석
- 비타민 C 및 E 분석
- 무기물 분석
- 향기성분 분석
- 배당체 분석
- in vitro 향산화 활성 측정
- 향산화 물질의 분리 및 구조 확인

### 2) 동물 실험

- 성장률
- 간장과 혈액 중의 지질함량
- 분변량 및 분변 중 담즙산 배설
- 간장 중의 향산화 활성 측정

## 다. 마가목의 표준재배법 확립 및 우량묘 생산

### 1) 발아율 향상

- 육묘상토 검정
- 종자 처리법

### 2) 표준 재배법 확립 및 우량 묘 생산

- 시비량 연구
- 병충해 조사
- 피복 방법

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

국내의 많은 식물은 약용, 식용, 공업용 등으로 사용되어 왔다. 그 중에서 교목형 식물로는 고로쇠나무의 즙을 그대로 이용하는 식물이 있고 소나무 등은 공업용수지 및 식품용으로 다양하게 이용되어 왔다. 마가목의 경우 옛부터 우리의 생활 속에서 다양하게 사용되어 왔으나 그 성분, 기능 등이 확실하게 알려져 있지 않았고 더욱이 최근까지 연구도 미미한 상태이다. Sorbus속 식물로서 마가목에 대한 대량증식법이 확립될 경우 한의학적으로 황열이나 진해에 많이 사용되는 이 식물의 이용도가 증가될 뿐 아니라, 동속식물인 *Sorbus torminalis* 및 *Sorbus domestica*의 번식기술에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다. 마가목(*Sorbus commixta* Hedl)은 강원도 등 중부 지역과 남부지방에 산재한 엽소교목에 속하는 식물로 예로부터 관상용, 약용, 공업용 및 식용으로 사용되어 온 것으로 고전에서 전하여 지고 있다. 이 식물은 수피 뿐만 아니라 열매도 식용으로 사용되어 왔으나 식물에 대한 체계적이고 과학적인 연구는 아직 미미한 편으로 sorbic acid의 분석, 추출물의 임파계 등의 세포에 대한 작용이 거의 국내 연구의 전부이다.

이 식물은 꽃의 향기를 이용한 방향제, 천연성분을 이용한 약재료 등으로 알려져 있지만 확실한 성분의 기능에 대한 연구보고는 없었다. 특히 열매를 이용한 식품재료 등이 기대할 가치가 있을 것으로 사료된다.

### 2. 경제·산업적 측면

이 식물의 이용과 활용도에 따라 지역 경제에 활성화를 기대할 수 있고, 또한 이 식물을 이용한 제품 생산으로 제조업의 창업 혹은 고용확대 등으로 지역 경제에 기여할 수 있다. 마가목은 토양을 가리지 않고, 재배가 쉬워 가공식품이 개발되면 농가의 새로운 소득 원으로 자리잡게 될 것으로 기대된다. 특히 마가목은 낙엽소교목으로서 한랭지의 경사지에서도 잘 적응하므로 생산기반이 취약한 산간고랭지 임야의 이용성이 증가할

것으로 기대되며 도시에서는 정원수로서 이용하여 부존자원의 활용도도 증가할 것으로 생각된다. 또한 기업과의 공동 연구로 기업의 연구 의식을 고취시키고, 연구를 진담하는 대학과의 교류를 할 수 있는 기회를 가지게 함으로서 기업의 신제품 개발의식을 격려할 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

전통적으로 구전되어온 자생식물을 자원화하고 지역의 환경에 적응하는 자원 식물을 구상하여 관광 자원화와 산업용 자원 식물원의 경영이 가능할 것이다. 또한 세계적으로 일본과 한반도에 많이 분포하는 마가목을 연구하여 그 이용방안을 모색함으로써 부존 유전자원의 활용도를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 2 장 국내 · 외 연구동향

### 1. 관련기술의 현황

국내에서는 아직 이 식물에 대한 연구는 많은 편이 아니다. 마가목의 기내 번식에 관한 연구는 이미 시험적으로 연구되었고, 성분 및 생리 활성에 관한 연구로는 2편에 지나지 않는다. 하나는 sorbic acid 함량의 분석과 다른 하나는 임파구 세포에 대한 독성연구가 전부이다. 해외에서의 이 식물에 대한 연구는 유사 종은 있었으나 이 식물과 동일한 식물에 대한 우리의 연구 내용과 유사하거나 성분 등에 대한 연구 보고는 아직 발견할 수 없었다.

### 2. 향후전망

마가목을 이용한 기능성 식품이나 건강보조식품의 소재로서의 가치가 높을 것으로 예측되며 기능성 물질을 활용한 식품제조시 기업체의 고부가가치 창출 및 재배법의 확립을 통해 농가소득에 기여하고 관광 수목림 및 조경용 수림 조성에 기여함으로써 자연 식물의 자원화에 기여할 수 있다.

## 제 3 장 마가목 추출물의 생리활성 탐색

### 제 1 절 서설

최근 천연물에 대한 관심이 의약품에서 식품에 이르기까지 광범위하게 관심을 갖고 있으며 바이오 생명공학의 급속한 발달로 BT분야의 벤처기업들이 우리나라의 경쟁력 향상에 건인차 역할을 하고 있고, 천연물에서 새로운 기능성 물질을 찾으려는 연구가 하루가 다르게 진행되고 있다. 또한 천연물의 여러 가지 소재에서 찾아낸 신물질들의 기능성이 산업화되어 성공적 성과를 거두고 있다. 국민의 소득수준도 향상되고 치료위주의 의약체계에서 예방위주의 의료형태로 국민들의 관심이 바뀌어가고 있는 실정이다.

본 연구에 사용한 마가목(*Sorbus commixta* Hedl.)은 장미과의 낙엽활엽수로 소교목에 속하며 수고는 8m 까지 자라며 야산에는 드물어 대부분 높은 고산지대에 자생하는 것으로 알려지고 있다. 옛부터 귀한 약재로 이용되어 오고 있는 나무로 우리나라의 강원도와 남부의 해발 700 m 이상 되는 높은 지역에 군락을 이루어 자라고 있다. 잎은 우상복엽으로 6×2cm의 크기인데 한 개의 잎에는 9-13개의 피침형소엽이 붙어 있으며, 가을에 붉게 단풍이 든다. 열매는 보통 붉은색이나 외래 도입종의 경우 황색, 적황색, 흰색 등 품종에 따라 다양하며, 열매의 크기는 약 5-8mm 정도로 가을이 되면 붉은색으로 물든다. 수피는 은회색이며 가지는 회색인데 약간 보라색을 띠게 된다. 목재는 단단하여 예로부터 조각재료로 많이 쓰였다. 꽃은 5-6월에 하얗게 피어나며 총생하는데, 향이 짙어 벌들의 좋은 밀원으로 이용되어 왔다.

우리나라를 비롯한 동양에서는 관절염과 성인병에 좋다하여, 마가목 가지를 말려두었다가 달여 마시는 마가목 차가 알려져 있으며, 또한 열매를 이용한 마가목 술은 신장염에 효과가 있는 것으로 알려져 오고있으며, 마가목에 대한 연구로는 김등이 마가목의 열매로부터 sorbic acid의 분리(김, et al.1972)하여 보고하였고, 박등(박, et al. 2000)이 마가목 분획으로부터 지질대사에 대한 연구를 보고하였으나, 열매나 수피

의 다양한 과학적인 성분이나 생리활성에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 서양에서 마가목은 가로수와 정원수로 많이 활용되고 있으며, 열매는 탄닌, 사과산, 구연산, 카로티노이드 및 flavonoid 등 유효성분이 풍부(Borisov, et al. 1965; Davli, et al 1967)하여 잼이나 술을 만들어 사용하고 있으며, 잎은 양의 사료로도 사용되고 있는 유용 식물 자원이다. 따라서, 본 연구에서는 강원도 태백지역에서 채취한 마가목의 추출물을 제조하여 이들 추출물에 대한 항돌연변이원성실험, 항암효과실험, 세포독성, glutathione-s-transferase(GST)활성, Angiotensin conversion enzyme(ACE)활성,  $\alpha$ -glucosidase등의 생리활성을 탐색하여 약용 및 기능성 식품자원으로의 활용 가능성을 높이고자 하였으며 이들 추출물을 이용하여 다류, 음료, 주류, 쿠키 등의 제품을 개발하고 이들 시제품에 대한 관능검사를 실시하였다.

## 제 2 절 연구내용 및 방법

### 1. 추출물 및 분획물의 조제

#### 가. 추출물의 조제

마가목의 잎, 수피, 열매로 나누어 채취한 뒤 깨끗이 손질하여 추출 수율을 향상시키기 위하여 수피부는 세절하고 열매부는 분쇄기로 분쇄하여, 수직으로 환류 냉각기를 부착시킨 flask로 증류수 및 70%에탄올로 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 뜨거운 상태에서 감압 여과장치에서 여과, 농축 후 동결 건조하여 각각의 수율을 계산하였다.

#### 나. 분획물의 조제

동결 건조한 추출물을 70% 메탄올에 용해시킨 뒤 분획을 위해 메탄올 용해물, 증류수, Chloroform을 1: 9: 10의 비율로 혼합하여 separated funnel로 3회 분획한 후, 감압 농축하여 Chloroform 분획을 얻었다. 또한 그 잔여물을 Butanol로 3회 분획하였으며 마지막 잔여물을 수층으로 취하여 수율을 측정하고 실험에 사용하였다.

### 2. 항 돌연변이원성 탐색

#### 가. *Bacillus subtilis*의 spore rec-assay를 이용한 항돌연변이원성의 측정

##### 1) Mutagenicity test

PB1791 및 PB1652의 포자한천배지 thin paper disk(8mm)을 얻은 다음 마가목의 각 추출물을 50, 100 $\mu$ g/disk의 양으로 투여하여 DNA손상으로 세포의 생육이 억제되어 생성된 clear zone의 지름을 측정하여 돌연변이 유발능을 측정하였다. 비교 돌연변이 물질로서는 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG, Sigma Co. USA)를 20 $\mu$ l/disk로 투여하여 생성된 clear zone을 비교하였다.

## 2) Antimutagenic test

PB1791 및 PB1652의 포자 한천 배지의 thin paper disk(8mm)에 돌연변이물질인 MNNG( $20\mu\text{l}/\text{disk}$ )와 마가목의 각 추출물( $50, 100\mu\text{g}/\text{disk}$ )을 혼합 투여하였다. 마가목의 각 추출물에 의한 MNNG의 작용의 억제를 측정하여 항돌연변이능을 검색하였다.

### 나. Ames-test를 이용한 항돌연변이원성 측정

#### 1) 돌연변이원성 실험

마가목의 각 추출물들에 대한 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA100을 이용하여 개량된 Ames test인 preincubation 법으로 실시하였다. 마가목 각 추출물들을 건열 멸균된 glass cap tube에 각각  $50\mu\text{l}$ 씩과 TA culture에서 하룻밤 전 배양시킨 균액  $100\mu\text{l}$ 을 가한 뒤 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이  $700\mu\text{l}$ 가 되도록 하고 이것을  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 진탕 배양한 다음 histidine-biotin이 첨가된 top agar( $45^\circ\text{C}$ )를  $2\text{ml}$ 씩 가하여 잘 혼합한 후 minimal glucose agar plate에 도말 평판고화 시켜  $37^\circ\text{C}$ 에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

#### 2) 항돌연변이원성 실험

마가목의 각 추출물의 항돌연변이원성은 직접변이원성 물질인 MNNG의 돌연변이 유발능의 억제를 측정하여 검색하였다. 건열 멸균된 glass cap tube에 마가목 각 추출물들을 각각  $50\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 변이원 물질을 plate 당  $0.5\mu\text{g}$ 씩 첨가한 다음 전 배양시킨 균액을  $100\mu\text{l}$ 씩 가한 뒤 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이  $700\mu\text{l}$ 가 되도록 한 뒤 상기의 돌연변이 원성 실험과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 항돌연변이 활성은 변이원물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition %)로 나타내어 다음 식으로 산출하였다.

$$Inhibition(\%) = \frac{M - S_1}{M - S_0} \times 100$$

M : 돌연변이 물질만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수

S<sub>0</sub> : 자연 복귀 돌연변이 수

S<sub>1</sub> : 시료를 첨가하였을 때의 복귀 돌연변이 수

### 3. 항암 활성 측정

#### 가. 세포주 및 생육배지

1차 년도에서 보완 요구된 항암작용에 관여하는 유효성분의 분리 정제를 위하여 추출물을 분획하여 분획물에 대한 항암활성 측정을 위해 세포주는 A549(Lung carcinoma, human), Hep3B(hepatocellular carcinoma human), MCF7(breast adenocarcinoma, pleural effusion, human), AGS(stomach adenocarcinoma, human), 293(Human normal kidney), 을 사용하였다. Hep3B, MCF7은 DMEM배지로, A549, AGS는 RPMI-1640 배지에서, 293은 MRM 배지에서 10% fetal bovine serum으로 적응 시켜 실험에 사용하였다.

#### 나. SRB 방법

SRB(sulforhodamine B)assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF-7(10% FBS, DMEM 배지)와 A549, AGS(10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를  $4 \sim 10^4$  cell/ml으로 96 well plate의 각 well에 100 $\mu$ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)한 후, 각각의 시료를 농도별로 100 $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(trichloroacetic acid) 100 $\mu$ l를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 100 $\mu$ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회

정도 세척, 건조시킨 후에 10mM Tris buffer 100 $\mu$ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다..

#### 4. 세포 독성 측정

마가목 추출물의 정상 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 293 세포와 WRL68 세포를 이용, SRB 방법으로 세포독성을 측정하였다.

#### 5. GST 활성 측정

해독작용의 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST (gultathion -S-transferase) 의 활성을 측정하였다. 조제된 반응시약에 대조구로 추출물 및 발효액이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 시료들을 농도별로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 첨가한 후 다시 37 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 반응 후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심 분리(3,000rpm/10분)한 후 상등액을 340nm에서 흡광도를 측정한 뒤 다음과 같이 GST의 활성도를 계산하였다. 각 시료의 단백질 정량은 protein assay kit(Sigma Co.)를 이용하여 측정하였다.

#### 6. ACE 활성 측정

ACE(angiotensin conversion enzyme) 활성측정은 실험 시작 전 반응물들의 온도는 37 $^{\circ}$ C로 유지하고, 10ml의 증류수(37 $^{\circ}$ C)를 ACE reagent one vial에 넣어 용해시킨 뒤, 10개의 effendorf tube에 1ml씩 10개로 분주하였다. 여기에 마가목의 물과 메탄올 추출물을 농도별로 0.1ml씩 ACE reagent가 담겨진 effendorf tube에 첨가하고, ACE calibrator one vial을 1ml의 증류수로 녹여 각 effendorf tube에 1 $\mu$ l씩 첨가하였다. 위의 반응물들을 5분 동안 일정 온도(37 $^{\circ}$ C)에서 반응시킨 후 340nm에서 흡광도를 측정하여 다시 5분 동안 온도를 유지시키면서 반응시킨 후 다시 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 증류수를 0.1ml 사용하였고 ACE 억제활성계산은 Sweet 등의 방법을 사용하였다.

## 7. $\alpha$ -glucosidase 활성 측정

생체내 혈당조절에 결정적인 역할을 수행하는  $\alpha$ -glucosidase의 억제효과를 측정하였다. 10mM PIPES buffer에 용해시킨 효소(50unit)액 10 $\mu$ l와 20mM maltose 40 $\mu$ l, 각 농도의 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물을 반응시킨 후, 효소에 의해 유리된 glucose의 양을 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약으로 측정하여, 시료를 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소 활성 저해능을 계산하였다.

## 8. 마가목의 추출물을 이용한 기능성 식품 소재 관련 기술 개발

식품소재 개발을 위해 건조된 마가목 열매를 3배수의 물을 이용하여 한약약탕기로 100 $^{\circ}$ C로 3시간 추출·여과·농축 후 다류 음료, 쿠키, 탁주, 약주를 제조개발 하였고 마가목 열매와 수피를 시판 소주에 침출하여 침출주를 개발하였다.

## 9. 마가목 추출물의 이용한 식품제조

### 가. 다류 제품 개발

마가목 추출물을 20~50% 농도로 조절한 후 가용성 전분이나 알파 전분 또는 가용성 전분 등을 아래와 같은 비율로 하여 혼합한 후 환, 과립차 농축즙(청)을 제조하였다. 다류의 기능을 상승시키고 맛을 조절하기 위하여 포도당, 산뽕잎 농축액 등의 식품 성분 강화제를 첨가하여 기능성 제품으로 제조하였다.

제 품 명	원 료	배합 비율
마가목 환	마가목 농축액	20%
	산뽕잎 농축액	20%
	알파 전분	60%
마가목 과립차	마가목 농축액	20%
	알파전분	20%
	분말 포도당	60%
마가목 청(농축즙)	마가목 농축액	50%
	포도당	20%
	가용성 전분	30%

## 나. 음료개발

추출물을 일정농도로 조절하고 성분의 기능 강화를 위하여 벌꿀, 배 과즙, 모과향, 비타민 C, 안식향산나트륨 등의 식품성분을 다음과 같이 첨가하여 소비자의 기호에 맞는 제품을 제조하고 100ml 건후의 병 포장하였다.

제 품 명	원 료	배합 비율
마가목 음료	마가목 추출물(2 Brix)	84.94%
	벌꿀	9.00%
	배과즙(69 Brix)	6.00%
	모과향	0.01%
	비타민 C	0.01%
	안식향산나트륨	0.03%

## 다. 주류 제품 개발

### 1) 침출주

열매와 수피 2.5kg을 시판소주(알콜함량 30%) 50ℓ에 혼합하여 침출주를 제조하였다.

### 2) 탁주 및 약주 개발

마가목의 추출 성분을 다른 한약재 성분과 혼합하여 건강 기능성(혈액개선, 신경통) 탁주를 개발하였다. 탁주의 제조방법은 먼저 밀가루를 증기솥에 찌서 밀가루를 호화시켰다. 호화된 밀가루에 곡균 *Aspergillus oryze* 접종하기 위하여 상온까지 식힌 후 곡균을 접종하였다. 곡실온도 25℃~30℃로 유지하면서 24시간동안 접종된 균이 잘 자랄 수 입국하였다. 입국이 되면 다음날 아침 곡의 온도가 42℃가 되면 입상하여 24시간 동안 제국하였다.

제국이 완료되면 주모를 만들고, 완료된 주모에 의하여 술덧의 제 1단제조, 제 2단제조에 의하여 술덧을 만들었다. 술덧의 발효 숙성중에 한약제를 투입하여 효모로 동시에 발효시켜 마가목을 첨가한 건강기능성 탁주를 개발하였으며, 그 제조방법은 다음과 같다.

#### 가) 주모의 제조

여름철에는 3일간 총 60kg을 제조하였다. 곡 20kg(33%)+물 2말( 40L, 66%)+인산 300ml (0.5%)+인간칼륨(10g, 0.17%)+효모 150g(0.25%).

#### 나) 1단 제조

제조된 주모로 총 322L의 1단 술 덧을 제조하였다. 주모 12L(3.7%)+곡 110kg (34%) + 인산 400ml(0.121%)+물 10말(200L).

#### 다) 2단 제조

1단 술 덧에 덧밥을 첨가하여 2단 술 덧을 제조하였다. 1단 내용물 4말(80L, 25%)+찜쌀 80kg(25%)+물 6말(120L, 44%)+효소 70g(0.023%).

#### 라) 마가목을 첨가한 한약제 첨가

오가피, 우슬, 두충, 구기자(열매), 대추, 당귀, 감초를 기본으로 하여 마가목 1%를 첨가하여 한약제 농축액을 만들고 이것을 발효숙성 중에 첨가하여 탁주를 개발하였다. 약주는 밀술 발효 7일 후 2단 숙성을 15일 하여 여과하여 제조하였다.

#### 라. 쿠키 개발

마가목 추출물을 이용하여 아래와 같이 쿠키와 파이를 만들었다.

### 1) 마가목 추출물을 이용한 치즈 허브쿠키

쿠키의 제조방법은 크림법을 적용하였고, 재료의 배합비율은 table 1, 2, 3, 4와 같다. 마가목 추출물은 마가목을 고압 열수 추출하여 25 Brix의 추출물을 만들어 사용하였다. 먼저 치즈허브 쿠키는 추출물의 첨가비율을 밀가루에 대하여 20%로 하였으며, 대조구는 우유를 사용하였다. 쿠키의 제조방법은 박력분을 체질하여 두고, 버터, 쇼트닝, 마요네즈를 넣고 거품기를 사용하여 부드럽게 풀어주면서, 크림상으로 하였다. 여기에 소금, 오레가노, 파마산치즈를 넣고, 부드럽게 풀어주었다. 체질한 분말을 넣고, 나무 주걱으로 반죽을 하였다. 반죽이 거의 마무리 되어갈 때 대조구는 우유를 첨가하고, 마가목 첨가군은 추출물을 첨가하여 반죽을 완료하였다. 반죽이 완성되면 찰주머니를 사용하여 모양 각지를 끼우고 성형 및 팬닝을 한 후 위불 160℃, 아랫불 150℃의 대류형 오븐에서 약 15~20분간 구워서 만들었다.

제 품 명	원 료	배합 비율
치즈 허브쿠키	버터	20 g
	쇼트닝	30 g
	마요네즈	15 g
	소금	2 g
	오레가노	3 g
	파마산 치즈	30 g
	마가목 엑기스	20 g
	우유	0 g
	박력분	100 g

### 2) 마가목 추출물을 이용한 파이제조

마가목 추출물을 이용하여 파이를 만들었으며 배합비율은 다음과 같다. 반죽의 기본은 코코아 반죽과 녹차반죽으로 하였으며, 대조구는 물을 사용하였으나, 마가목 첨가군은 물대신 마가목 추출물을 첨가하였다. 파이의 제조방법은 먼저 소금을 찬물

에 용해시켰다. 그리고 밀가루, 코코아 분말을 체 쳐놓고, 그 위에 반죽용 버터를 넣고 도구를 사용하여 콩알만한 크리로 자르면서, 물을 첨가하여 반죽을 완성하였다. 완성된 반죽에 공기가 들어가지 않도록 비닐에 싸 후 냉장고에 30분간 휴지시켰다. 휴지된 반죽에 충전용버터를 넣고 3절 5회 접어 파이반죽을 완료하였다. 반죽이 완료되면 철판에 일정한 간격으로 팬닝하고, 윗불 200℃, 아랫불 210℃에서 20-25분간 구워서 만들었다.

제 품 명	원 료	배합 비율
코코아 반죽 파이	박력분	35 g
	강력분	50 g
	코코아	10 g
	소금	2 g
	물	0 g
	마가목 추출물	50 g
	반죽용 버터	8 g
	충전용 버터	40 g

제 품 명	원 료	배합 비율
녹차 반죽 파이	박력분	35 g
	강력분	50 g
	녹차	3 g
	소금	2 g
	물	0 g
	마가목 엑기스	50 g
	반죽용버터	8 g
	충전용버터	40 g

#### 마. 시제품에 대한 관능검사

음료, 쿠키(파이) 등의 시제품에 대해 대학원생 10인을 대상으로 하여 5단계 기호 척도법 (5점: 매우 좋다, 4점: 좋다, 3점: 보통이다, 2점: 나쁘다, 1점: 매우 나쁘다)에 의해 색, 향기, 맛, 종합평가를 쿠키와 파이는 조직감 등의 항목을 추가하여 숫자가 클수록 선호도가 높은 것으로 평가하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 추출물의 수율

마가목의 잎, 줄기, 열매부위를 추출에 적합하도록 세절, 마쇄한 뒤, 수직 환류 냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료의 중량에 대하여 각각 10배의 증류수와 에탄올을 가하여 증류수는 100℃, 에탄올은 80℃의 온도에서 12시간씩 3회 반복 추출하였다. 각각의 추출물들은 뜨거운 상태로 감압 여과 후 농축하여 동결 건조한 후 각각의 수율을 계산한 결과 Table 1과 같다. 열매의 에탄올, 물 추출물은 수율이 각각 46.8%와 36%로 가장 높았고, 줄기부위의 에탄올과 물 추출물의 수율은 각각 1.8%와 6.08%이었으며 잎 추출물의 수율은 각각 10.4%, 8.2%로 나타났다.

Table 1. Yields of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl.

Samples	Extracts	Yeilds
Leaf	H <sub>2</sub> O	10.4%
	Ethanol	8.2%
Bark	H <sub>2</sub> O	6.1%
	Ethanol	1.8%
Fruit	H <sub>2</sub> O	36.0%
	Ethanol	46.8%

## 2. 마가목 추출물의 항돌연변이원성 탐색

### 가. Spore-rec Assay를 이용한 항돌연변이원성 실험

*B.subtilis*를 이용한 spore rec assay는 야생균주인 PB1652(rec+)와 변이주인 PB1791(rec-)의 포자를 이용하여 변이원 물질인 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine)에 민감한 반응을 이용하여 항돌연변이원성을 탐색하고자 하는 시료에 대하여, 먼저 돌연변이 원성을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 마가목의 잎, 수피, 열매의 물과 에탄올 추출물(50, 100  $\mu$ g)의 돌연변이원성 측정결과 DNA-damaging activity(rec-/rec+)가 1을 나타내 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났으며 양성물질로 사용한 발암물질인 MNNG의 저해율은 2.57을 나타내었다.

한편 직접 돌연변이원성을 나타내는 발암물질인 MNNG에 대한 항돌연변이원성 결과는 Table 3에 나타내었다. DNA 수복능을 함유하고 있는 rec+(PB1652) 균주와 DNA 수복능을 잃은 rec-(PB1791) 균주를 이용하여 DNA에 돌연변이를 일으키는 유발물질인 MNNG와 마가목 잎, 수피, 열매 추출물을(50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g) 혼합 첨가하여 두균주의 생육을 비교함으로써 마가목 추출물의 항돌연변이원성을 측정하였다. 형성된 저해환(clear zone)을 비교하여 각 추출물이 돌연변이원 물질인 MNNG의 돌연변이원성을 얼마나 억제하는지를 rec+균과 rec-균의 difference zone(cm)으로 나타내었고, 그 결과 마가목 잎, 수피, 열매 추출물은 변이원 물질인 MNNG 대조구에 비해 낮은 difference zone을 보여 MNNG에 의한 돌연변이 억제 활성을 보였다.

### 나. Ames test를 이용한 항돌연변이원성 실험

먼저 항돌연변이원성을 실험하고자하는 추출물에 대하여 돌연변이원성을 실험하여 Table 4에 나타내었다. histidine 요구성 변이주인 *S. typhimurium* TA 100균주를 이용한 Ames test 결과 His+revertant colony수가 자연복귀 돌연변이의 수 132/plate와 큰 차이를 보이지 않아 마가목 잎, 줄기, 열매 추출물의 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다. 또한 마가목 추출물의 Ames test를 이용한 항돌연변이원성을 실험하여 Table 5에 나타내었다. 그 결과 마가목 잎의 에탄올 추출물(100 $\mu$ g)의 항돌연변이능은 최대 65%, 수피의 에탄올 추출물(100mg)은 68%, 열매의 에탄올 추출물(100 $\mu$ g)은 73%를 보여 항돌연변이원성이 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Mutagenic effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on *Bacillus subtilis* PB1652 and PB1791 in spore rec-assay.

Sample	Extracts	Dose ( $\mu\text{g}$ /paper disk)	Inhibition zone (cm)		DNA-damaging activity( $\text{rec}^-/\text{rec}^+$ )
			$\text{rec}^+$	$\text{rec}^-$	
Leaf	H <sub>2</sub> O	50	0.8	0.8	1
		100	0.8	0.8	1
	Ethanol	50	0.8	0.8	1
		100	0.8	0.8	1
Bark	H <sub>2</sub> O	50	0.8	0.8	1
		100	0.8	0.8	1
	Ethanol	50	0.8	0.8	1
		100	0.8	0.8	1
MNNG		20	1.02	2.62	2.57

Table 3. Anti-mutagenic effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on *Bacillus subtilis* PB1652 and PB1791 in spore rec-assay.

Sample	Extracts	Dose ( $\mu\text{g}/\text{paper disk} + \text{MNNG } 20\mu\text{l}$ )	Inhibition Zone(cm)		difference zone(cm)
			rec <sup>+</sup>	rec	
Leaf	Water	50	0.8	2.0	1.2
		100	0.8	1.8	1.0
	Ethanol	50	0.8	1.7	0.9
		100	0.8	1.5	0.7
Bark	Water	50	0.8	1.6	0.8
		100	0.8	1.5	0.7
	Ethanol	50	0.8	1.5	0.7
		100	0.8	1.3	0.5
MNNG		10	1.08	2.79	1.71

Table 4. Mutagenic effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on *Salmonella typhimurium* TA 100 in Ames test.

Sample	Extracts	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	His+ revertants / plate
Spontaneous revertants			132
Leaf	H <sub>2</sub> O	50	128
		100	118
	EtOH	50	128
		100	129
Bark	H <sub>2</sub> O	50	132
		100	123
	EtOH	50	121
		100	120
Fruit	H <sub>2</sub> O	50	119
		100	128
	EtOH	50	132
		100	133

Table 5. Anti-mutagenic effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on *Salmonella typhimurium* TA 100 in Ames test.

Sample	Extracts	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Anti-mutagenesis (%)
Leaf	H <sub>2</sub> O	50	34
		100	54
	EtOH	50	48
		100	65
Bark	H <sub>2</sub> O	50	43
		100	54
	EtOH	50	49
		100	68
Fruit	H <sub>2</sub> O	50	48
		100	64
	EtOH	50	51
		100	73

### 3. 마가목 추출물의 항암 활성 실험

항암 활성 측정을 위한 세포주로는 인간 폐암세포(A549), 인간 유방암 세포(MCF7), 인간 간암세포(HepG2), 세포독성을 위해서 인간 정상 간세포(WRL68)를 사용하였다. 세포 중 간암세포와 유방암 세포는 DMEM배지에서 나머지 세포들은 RPMI 1640배지에서 각각 10% fetal bovine serum으로 적응시켜 배양하였다. 인간 유방암세포(MCF7)에 대한 마가목 잎, 수피, 열매의 물과 에탄올 추출물의 농도에 따른 항암활성을 측정한 결과 Table 6과 같다. 추출물 농도가 증가함에 따라 유방암세포의 생육이 억제되었으며 잎의 경우 에탄올 추출물을 1mg 첨가시 85%, 물추출물은 1mg 첨가시 78% 생육의 억제되었고, 열매의 경우 에탄올 추출물은 1mg 첨가시 최고 91%까지 암세포 생육을 억제하여 높은 항암활성이 있음이 관찰되었다.

한편 인간 폐암세포(A549)에 대한 마가목 잎, 줄기, 열매의 물과 에탄올 추출물의 농도에 따른 암세포 생육 억제율을 측정한 결과 Table 7과 같다. 줄기의 경우 물추출물은 1mg 첨가시 86%, 에탄올 추출물은 최고 94% 폐암 암세포 생육을 억제하여 높은 항암활성이 있었다.

인간 간암세포(HepG2)에 대한 마가목 잎, 수피, 열매의 물과 에탄올 추출물의 농도에 따른 암세포 생육 억제율을 측정한 결과 Table 8과 같다. 잎의 경우 1mg 첨가시 물추출물과 에탄올 추출물이 63%, 75%를 보여 줄기나 열매에 비해 다소 낮은 항암 활성을 보였다. 열매의 경우 에탄올 추출물을 1mg 첨가시 최고 91% 생육 억제율을 보여 수피나 잎에 비해 높은 항암 활성을 보였다.

Table 9는 인간 정상 간세포(WRL68)에 마가목의 물과 에탄올 추출물을 0.2~ 1.0mg 첨가하여 세포 생육을 측정한 결과로서 잎의 에탄올 추출물을 1mg 첨가시 19~ 21%, 수피와 열매의 추출물은 각각 26~29, 25~29%의 저해율을 보여 세포독성이 그리 높지 않음을 알 수 있었다.

Table 6. Anticancer effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on MCF7.

Samples	Extracts	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.50	0.75	1.0
Leaf	H <sub>2</sub> O	18	35	59	78
	Ethanol	25	40	58	85
Bark	H <sub>2</sub> O	21	39	62	82
	Ethanol	29	42	82	86
Fruit	H <sub>2</sub> O	19	32	80	84
	Ethanol	24	35	84	91

Table 7. Anticancer effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on A549.

Samples	Extracts	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.50	0.75	1.0
Leaf	H <sub>2</sub> O	20	37	65	82
	Ethanol	26	35	62	89
Bark	H <sub>2</sub> O	20	34	72	86
	Ethanol	33	49	78	94
Fruit	H <sub>2</sub> O	24	41	75	81
	Ethanol	34	58	80	89

Table 8. Anticancer effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on HepG2,

Samples	Extracts	Concentration(mg/ml)			
		0.2	0.4	0.8	1.0
Leaf	H <sub>2</sub> O	19	25	41	63
	Ethanol	21	36	51	75
Bark	H <sub>2</sub> O	13	23	56	78
	Ethanol	16	27	68	86
Fruit	H <sub>2</sub> O	26	42	76	85
	Ethanol	33	44	78	91

Table 9. Cytotoxicity of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on WRL68.

Samples	Extracts	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Leaf	H <sub>2</sub> O	3	5	15	19
	Ethanol	6	11	20	21
Bark	H <sub>2</sub> O	7	10	24	26
	Ethanol	6	9	19	29
Fruit	H <sub>2</sub> O	5	11	21	25
	Ethanol	9	17	20	29

#### 4. 분획물의 수율 및 분획물의 항암, ACE, $\alpha$ -glucosidase, GST 활성 측정 결과

##### 가. 분획물의 수율

추출물은 뜨거운 상태로 감압 여과 후 농축하여 동결 건조한 추출물을 70% 에탄올에 용해시킨 뒤 에탄올 용해물, 증류수, Chloroform을 1: 9: 10의 비율로 혼합하여 separated funnel로 3회 분획한 후, 감압 농축하여 Chloroform 분획을 얻었다. 또한 그 잔여물을 n-butanol로 3회 분획하였으며 마지막 잔여물을 수층으로 취하여 수율을 측정하고 실험에 사용하였다. 분획 수율은 Table 10과 같이 마가목 수피 메탄올 추출물의 경우 부탄올 분획이 39.3%로 가장 높았으며 chloroform층은 11.4%, 수층 분획은 11.2%의 수율을 나타내었다. 열매 메탄올 추출물의 경우 수층 분획이 18.1%로 가장 높은 수율을 나타내었으며, 부탄올 12.3%, chloroform 7.0%의 분획 수율을 나타내었다.

##### 나. 항암 활성 효과

마가목 수피와 열매 메탄올 추출물에 대한 각 분획물들의 항암 활성은 인간 폐암 세포(A549), 인간 유방암 세포(MCF-7), 인간 간암세포(Hep-3B), 인간 정상 신장세포(293), 인간 위암세포(AGS)의 생육억제능을 측정하였다. 세포 중 간암세포와 유방암 세포는 DMEM-F12배지에서 신장세포는 MEM배지에서 나머지 세포들은 RPMI 1640 배지에서 각각 10% fetal bovine serum으로 적응시켜 배양하였다. 그 결과 Table 11, 12, 13, 14, 15에서와 같이 각 암세포주에 대해 생육 억제 활성이 나타났으며 특히 위암세포의 경우 수피의 수층 분획에서 1.0mg/ml의 농도에서 86%의 억제율을 보여 가장 높은 항암 활성을 나타내었다.

Table 11은 인간 폐암 세포주에 대한 마가목 용매 분획물들의 생육억제 결과로서 수피 메탄올 추출물의 분획의 경우, 수층 분획물이 1.0mg/ml의 농도에서 71%의 가장 높은 생육 억제능을 나타내었으며, chloroform은 같은 농도에서 47%, 부탄올 분획층은 45%의 생육 억제능을 나타내었다. 열매 추출물의 chloroform과 부탄올 분획물들은 0.5mg/ml 이상의 농도에서 69% 이상의 높은 암세포 생육억제 활성을 나타내었으며,

부탄올 분획물의 경우 1.0mg/ml의 농도에서 가장 높은 74%의 생육 억제능을 나타내었다.

Table 12는 인간 유방암세포주인 MCF-7에 대한 마가목 용매 분획물들의 생육억제 결과로서 대부분의 분획물이 0.75mg/ml이상의 농도에서 50%이상의 생육억제 활성을 나타내었으며, 수피의 chloroform 분획에서 68%의 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, 열매의 경우에도 chloroform 분획이 65%로 가장 높은 억제활성을 나타내었다.

인간 간암세포주(Hep-3B)에 대한 생육억제 결과는 Table 13과 같다. 열매의 수층 분획을 제외한 대부분의 분획물에서 0.75mg/ml이상의 농도에서 57%이상의 높은 억제활성을 나타내었으며, 수피 chloroform 분획 물의 경우 1.0mg/ml의 농도에서 79%의 가장 높은 억제 활성을 나타내었으며, 부탄올과 수층에서도 최고농도에서 72%의 높은 억제활성을 나타내었다. 열매에 있어서는 chloroform 분획이 1.0mg/ml의 농도에서 75%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 14는 인간 위암세포주에 대한 생육억제활성으로 수피의 수층 분획이 1.0mg/ml의 농도에서 86%의 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, 부탄올 분획이 73%, chloroform 분획이 57%의 생육억제 활성을 나타내었다. 열매 추출물의 경우 chloroform 분획이 1.0mg/ml의 농도에서 71%의 억제활성을 나타내었으며, 부탄올 분획이 67%, 수층 분획이 46%의 생육억제활성을 나타내었다.

#### 다. 세포독성

Table 15는 인간 정상 신장세포에 대한 세포독성을 측정한 결과로서 수피의 부탄올 분획 1.0mg/ml의 농도를 제외하고 30%이하의 생육저해를 나타내어, 시료 자체에 의한 독성은 나타나지 않는 것으로 사료되어진다.

Table 10. Yield of the fractions from *Sorbus commixta* Hedl extracts.

Sample	Yield(%)		
	Solvents		
	Chloroform	Butanol	Aqueous
Bark	11.4	39.3	11.2
Fruit	7.0	12.3	18.1

Table 11. Anticancer effects of the fractions isolated from *Sorbus commixta* Hedl extracts on A549.

Samples	Solvents	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Bark	Chloroform	20	35	43	47
	Butanol	18	26	27	45
	Aqueous	24	36	44	71
Fruit	Chloroform	35	60	70	73
	Butanol	26	58	69	74
	Aqueous	28	29	47	68

Table 12. Anticancer effects of the fractions isolated from *Sorbus commixta* Hedl extracts on MCF-7.

Samples	Solvents	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Bark	Chloroform	17	24	56	68
	Butanol	22	34	54	64
	Aqueous	11	36	59	65
Fruit	Chloroform	17	38	53	65
	Butanol	13	37	56	63
	Aqueous	26	42	58	60

Table 13. Anticancer effects of the fractions isolated from *Sorbus commixta* Hedl extracts on Hep-3B.

Samples	Solvents	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Bark	Chloroform	25	56	68	79
	Butanol	28	48	61	72
	Aqueous	23	54	65	72
Fruit	Chloroform	32	61	65	75
	Butanol	25	50	57	65
	Aqueous	35	47	48	60

Table 14. Anticancer effects of the fractions isolated from *Sorbus commixta* Hedl extracts on AGS.

Samples	Solvents	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Bark	Chloroform	12	21	36	57
	Butanol	45	46	57	73
	Aqueous	17	47	54	86
Fruit	Chloroform	30	46	66	71
	Butanol	13	38	53	67
	Aqueous	13	14	44	46

Table 15. Cytotoxicity of the fractions isolated from *Sorbus commixta* Hedl extracts on 293.

Samples	Solvents	Concentration(mg/ml)			
		0.25	0.5	0.75	1.0
Bark	Chloroform	4	24	24	35
	Butanol	4	15	19	39
	Aqueous	8	15	24	30
Fruit	Chloroform	8	21	27	28
	Butanol	9	27	35	26
	Aqueous	3	13	16	28

#### 라. ACE 억제 활성 탐색

ACE(angiotensin conversion enzyme)는 고혈압을 유도하는 효소이므로 이 효소의 억제활성을 측정하기 위해 ACE reagent를 사용했다. 본 실험에서는 ACE가 ACE calibrator의 촉매를 받아 FAPGG(Furylacryloylphenylalanylglyglycine)를 FAP (Furylacryloylphenyl alanine)와 GG(Glycylglycine)로 분해하는 원리를 이용한 것으로 마가목의 추출물과 분획물의 ACE활성 억제 정도를 측정한 결과는 Table 16에 나타내었다. 대조물질의 ACE 억제활성 100%에 비하여 마가목 수피의 70% 에탄올 추출물이 1.0mg/ml농도에서 96%, 열매의 추출물이 84%로 마가목 추출물의 ACE 효소에 대한 억제활성은 유의적 효과를 나타내지 않았으며, 분획물의 경우 오히려 효과가 감소하였다.

#### 마. Glutathione S-transferase 활성측정

추출물 및 분획물에 대한 GST(glutathione S-transferase)의 활성을 측정한 결과 Table 17과 같다. 마가목 수피와 열매의 메탄올 추출물의 경우 1.0mg/ml의 농도에서 대조물질(100%)의 활성에 비하여 약 2배 이상의 높은 해독활성을 나타내었다. 분획물에 있어서는 수피와 열매의 부탄올 분획이 최고농도에서 1.8배 이상의 높은 활성을 나타내었다.

#### 바. $\alpha$ -glucosidase 억제 활성 탐색

$\alpha$ -glucosidase는 생체내 혈당 상승에 결정적인 역할을 수행할 뿐만 아니라 당뇨병과도 밀접한 관련을 갖는다. 본 실험에서는 마가목의 추출물과 분획물을 기질(maltose)과 함께 첨가해서 추출물에 의한 효소 활성 억제율을 검색한 결과는 Table 18에 나타내었다. 대조물질의 효소억제활성 100%에 비하여 마가목 수피의 70% 메탄올 추출물이 1.0mg/ml농도에서 89%, 열매의 추출물이 84%로 마가목 추출물의 혈당강하 관련 효소에 대한 억제활성은 유의적 효과를 나타내지 않았으며, 분획물의 경우 오히려 그 효과가 감소하였다.

Table 16. ACE Inhibitory effects of 70% Ethanol extracts and fractions from the *Sorbus commixta* Hedl.

Relative ACE inhibition ratio(%)									
		Extraction solvents		Fraction solvents					
		70% Ethanol		Chloroform		Butanol		Aqueous	
concentration (mg/ml)		0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
	Bark	65	96	49	73	50	79	66	83
	Fruit	60	84	63	74	47	63	60	70

Table 17. Glutathione S-transferase activities of 70% ethanol extracts and fractions from the *Sorbus commixta* Hedl.

Relative activity of GST (%)									
		Extraction solvents		Fraction solvents					
		70% Ethanol		Chloroform		Butanol		Aqueous	
concentration (mg/ml)		0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
	Bark	193	223	115	145	150	193	134	165
	Fruit	154	210	102	130	147	180	144	142

Table 18.  $\alpha$ -glucosidase activities of 70% ethanol extracts and fractions from the *Sorbus commixta* Hedl.

		Hypoglycemic effect (%)							
		Extraction solvents		Fraction solvents					
		70% Ethanol		Chloroform		Butanol		Aqueous	
concentration (mg/ml)		0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
	Bark	68	89	35	80	36	79	54	79
	Fruit	55	84	35	64	36	63	35	78

## 5. 마가목 추출물을 이용한 식품개발

### 가. 다류, 음료, 주류, 쿠키(파이) 시제품 개발

아래의 사진과 같이 마가목 환, 마가목 청, 마가목 음료, 주류 및 쿠키와 파이 시제품을 개발하였다. 음료 시제품의 경우 당도는 12 Brix, pH는 3.5였으며 침출주의 색은 황금색으로 알콜 농도는 약 26% 정도로 나타났으며 탁주의 알콜 농도는 약 6.5%, 약주의 알콜 농도는 약 13% 수준으로 나타났다.





## 나. 관능검사

쿠키에 마가목 추출물을 첨가하여 개발한 치즈 허브 쿠키의 5단계 기호척도 법에 따른 관능검사 결과(Table 19), 색은 4.3, 냄새 4.27점, 조직감은 4.51, 맛은 4.51의 다소 좋은 점수를 얻었고 전체적인 만족도에서는 4.31점을 얻었다.

또한 마가목 추출물이 첨가된 코코아 파이와 녹차파이의 관능검사 결과 색상에서 평가 항목 중 가장 낮은 3.98점과 3.86점을 각각 얻었고, 그 외 향기, 조직감, 맛, 전체적인 만족도에서는 4.06점 이상을 받았다.

개발된 음료의 관능평가 결과 냄새와 맛이 각각 3.71과 3.90점이었으며, 색상은 대체 적으로 평가 항목에서 가장 높은 점수를 얻었고, 전체적인 만족도에서는 4.11점을 얻어 앞으로 마가목 추출물을 이용한 다양한 식품개발이 가능하리라 생각된다.

Table 19. Sensory evolution of cookies and pies containing *Sorbus commixta* extract.

Items	A*	B*	C*
Color	4.30±0.31	3.98±0.51	3.86±0.21
Odor	4.27±0.26	4.16±0.16	4.06±0.35
Texture	4.51±0.36	4.31±0.17	4.36±0.24
Taste	4.51±0.12	4.56±0.21	4.48±0.27
overall acceptance	4.31±0.19	4.28±0.31	4.23±0.28

\* Very good : 5 , Good : 4, Common : 3, Bad : 2, Very Bad : 1

\* A: Cheese Herb cookies \* B: Cocoa pies \* C: Green tea pies

## 제 4 장 마가목의 영양성분 분석

### 제 1 절 서설

최근 들어 국민생활이 향상되고 식습관을 비롯한 생활습관이 서구화되면서 우리나라의 질병양상도 크게 바뀌었다. 과거에는 결핵이나 폐렴 같은 감염성질환이 주요 사망원인이었으나, 동물성 지방의 과다섭취로 인하여 근래에는 고혈압, 고지혈증, 동맥경화증, 심근경색증 및 뇌혈전증 등과 같은 혈관순환계질환의 사망률이 증가 추세에 있다. 이와 같은 성인병의 증가에 따라 사망률이 증가하면서, 각종 성인병의 치료와 예방에 관심이 집중되고 있다(Song et al, 1993 ; Kim et al, 1995). 이러한 성인병 질환들은 생체내의 산화 스트레스에 의해서 생성된 생체막 지질과산화물 증가에 의한 대사장애나 생체내 지질대사와도 깊은 관련을 가지고 있다고 보고되고 있다(Plaa & Witschi, 1976 ; Alordmann et al, 1990).

한편, 마가목(*Sorbus commixta* Hedl.)은 장미과의 낙엽활엽수로 소교목에 속하며 대부분 높은 고산지에서 자생한다. 100년까지 살 수 있다고 하며 북아프리카, 유럽, 아시아 일부에 자생된다.

마가목 잎은 우상복엽으로 한 개의 잎에는 9-13개의 피침형소엽이 붙어 있다. 열매는 품종에 따라 다르지만 보통 붉은색을 띠며, 가을이 되면 대부분 산새들의 먹이가 되어 종자가 퍼지게 된다. 수피는 은회색이며 가지는 회색이고, 목재는 단단해서 불에 잘 타지 않는다고 하여 예로부터 조각재료로 많이 쓰였다. 꽃은 5-6월에 새하얗게 피어나며 총생한다. 서양에서는 가로수와 정원수로 이용하며 탄닌, 사과산, 구연산, 카로티노이드 성분이 풍부(Borisov & Zhuravlev, 1965)하여 잼이나 술을 만들어 감기와 위장약으로 활용하고, 잎은 양의 사료로 사용하고 있다. 마가목의 가지를 말린 후 달여 마시는 마가목차는 관절염과 성인병에, 열매로 만든 마가목 술은 생식기 질환과 이질, 설사병, 대장이나 위장질환에 좋은 것으로 알려져 있다. 예로부터 국내에서는 강장보호, 기관지염, 동맥경화, 방광염, 보혈, 설사, 양모, 위염, 진해, 폐결핵, 해수 등

에 한약재로서 사용되어 왔으나 마가목의 영양성분에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정으로, 본 실험에서는 마가목의 영양성분 분석을 위해 일반성분, 지방산, 아미노산, 비타민 C, 비타민 E, 무기물, 향기성분, 배당체를 분석하였으며 추출물의 in vitro 항산화 활성 및 동물실험을 통하여 지질대사 및 항산화 활성 개선효과를 검토하여 보았다.

## 제 2 절 연구내용 및 방법

### 1. 마가목, 수피, 열매의 일반성분 분석

마가목 열매 및 수피의 일반성분분석은 AOAC법에 따라 분석하였다. 수분은 105°C 건조법, 조단백질함량은 Semimicro kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 550°C 에서 회화하여 측정하였으며, 탄수화물은 가감법을 사용하였다.

### 2. 마가목 열매와 수피의 지방산 분석

마가목 열매와 수피로부터 soxhlet방법에 의해 지방을 추출한 후, BF<sub>3</sub>-methanol 로 methylation 시킨 다음 gas liquid chromatograph(Hewlett Packard 5890 series II GC, Hewlette Packard 3396A integrator)로 지방산 조성을 분석하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

### 3. 마가목 열매와 수피 추출물의 아미노산 분석

마가목 열매와 수피 추출물의 아미노산 분석을 위해 각각의 시료 0.4g을 6N-HCl 로 100°C에서 24시간 가수분해한 후 HPLC를 이용하여 분석하였고 분석 조건은 Table 2와 같다.

Table 1. Operating condition for fatty acid analysis.

---

Colum	stabilwax(30m×0.25mmid×0.25μm $\phi$ )
Carrier gas flow rate	0.1ml/min N <sub>2</sub>
H <sub>2</sub> flow rate	30ml/min
Air flow rate	360ml/min
Oven Temp.	140°C(3min) increase 5°C/min, 250°C(10min)
Injector Temp.	250°C
Detector Temp.	260°C(FID)

---

Table 2. Operating condition of amino acid analyzer.

Instrument	<p>Pico-Tag amino acid analysis system</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- water 717 V6k injector</li> <li>- waters 510 pump</li> <li>- waters 680 gradient controller</li> <li>- waters 486 absorbance detector</li> <li>- waters 746 integrator</li> </ul>
Column	Waters Pico-Tag column(3.9×150mm, 4 $\mu$ m) + TCM, 47°C
Detector	UV (254nm)
Mobile phase	<p>A - 19~20g sodium acetate trihydrate  500~600<math>\mu</math>l TEA  11Milli-Q auality water  pH 6.4 with phosphoric acid  위 용액 935ml+CH<sub>3</sub>CN 65ml →filter</p> <p>B - 60%CH<sub>3</sub>CN</p>

#### 4. 마가목 열매의 비타민C 및 E 분석

식품공전법에 의해 마가목 열매의 비타민C를 분석하기 위해 메타인산-초산 용액과 혼합, 여과한 후 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNP)법으로 파장 520nm에서 UV spectrophotometer(UV KON943, Kontron Instruments, Italy) 사용하여 정량하였다.

비타민 E는 60% KOH로 검화 후 ethyl acetate : n-hexane(1:9) 용매로 추출하여 HPLC로 분석하였다. HPLC의 분석 조건으로 컬럼은 HP APS Hypersil(200 × 4.6 mm)를 사용하였으며, 이동상으로 n-hexane : isopropanol(98 : 2 v/v), 형광검출기를 이용하여 Ex. 파장 297 nm, Em. 파장 327 nm에서 형광검출기를 이용하여 내부표준법으로 측정하였다.

내부표준물질로 2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman을 사용하였으며, HPLC 분석조건은 Table 3과 같다.

#### 5. 무기물 분석

무기질 함량은 시료를 황산-질산 습식 분해법으로 분해한 후, 일정용액으로 하여 atomic absorption spectrophotometer(Varian Spectra AA-300, Australia)로 Mg, Fe, Ca, Mn, Zn, Cu, Na, K 등의 무기물을 분석하였다. 칼슘은 인의 간섭을 피하기 위하여 AAS의 manual에 따라 KCl을 첨가하였으며, Nitrous oxideacetylene gas를 사용하였다. 인은 Hewlett-packard UV/Vis spectrophotometer 8452A를 이용하여 몰리브덴 청 비색법으로 분석하였다.

#### 6. 마가목 꽃의 향기성분 분석

마가목의 꽃 부위로부터 향기성분을 연속증류기 증류 추출법으로 추출한 후 농축한 시료를 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석한다. 분석조건은 표준방법에 준하여 실시한다.

Table 3. Instrument and operation conditions for tocopherols analysis by HPLC.

Instrument	HPLC Waters
Detector	470 Scanning Fluorescence Detector Gain : $32 \times 10$ Filter : 1.5 Ex. : 297 nm    Em. : 327 nm
Injector	U6K Injector
Controller	Automatic gradient controller
Pump	510 Delivery system
Column	HP-APS Hypersil $5\mu m$ , $200 \times 4.6$ nm
Mobile phase	n-Hexane : IPA (98 : 2)
Flow rate	1.5 ml/min

## 7. 배당체 정성분석

천연물의 성분은 모든 식물의 연구 재료에 따라 동일하지 아니하고 다양하므로 일정한 분리, 확인 등의 지정된 프로토콜이 없는 것이 일반적이다. 따라서 본 실험에서는 마가목의 추출물을 다량으로 확보하여 분리하는 각 단계마다 성분의 정성적 확인을 위하여 약리작용을 지닌 배당체 화합물들(phenol glycoside, Anthraquinone glycoside, Anthranol glycoside, Nitril glycoside, Allunm & Mustard glycoside, Flavonoid glycoside, Anthocyan glycoside)을 다음과 같은 방법에 의해 확인하였다.

가. Phenol glycoside : Gibbs 시약을 첨가하여 청색침전을 확인하였다.

나. Anthraquinone glycoside : Borntager 반응으로 추출액 5ml에 10%의  $H_2SO_4$  5ml를 첨가한 뒤 가열, 배당체를 가수분해한 후 ether로 비당질을 추출한 다음 10%의 KOH를 첨가하여 적색침전물의 생성을 확인하였다.

다. Anthranol glycoside : 50% KOH 100ml에  $H_2O$  25ml를 첨가한 후 추출물을 5ml 첨가하여 30분간 정치시켜 청색침전물의 생성을 확인하였다.

라. Nitril glycoside : 추출액 2ml에 암모니아시약 1ml를 첨가하여 10분 이내에 혼탁해지는 것을 확인하였다.

마. Allunm & Mustard glycoside : ethanol에 녹인 추출물을 5ml에  $NH_4OH$ 를 점적하여 alkylthio-요석의 생성을 확인하였다.

바. Flavonoid glycoside : 진한 황산법을 이용, 추출물 5ml에 진한황산을 점적하여 황색 및 황적색 침전의 생성을 확인하였다.

사. Anthocyan glycoside : 추출물 5ml에 각각 10%KOH와 10%HCl을 점적하여 알칼리 첨가구에서 청색을 산 첨가구에서 적색 착색을 나타내는 것을 확인하였다.

야. Terpenoid : 추출물 소량을 acetic acid anhydride 1ml에 가하여 녹인 후 진한황산을 2-3방울 점적하였을 때 나타나는 경계면의 적록착색을 나타내는 것을 확인하였다.

자. Alkaloid : 추출물 소량을 chloroform 2ml에 녹인 후 탄닌(탄닌 1g/H<sub>2</sub>O 8ml/ethanol 1g)용액을 점적하여 침전을 확인하였다.

## 8. *In vitro*에서의 항산화 효과 실험

마가목 열매 추출물의 *in vitro* 항산화 효과 검색을 위하여 쥐 brain homogenate 200 $\mu$ l와 마가목 열매의 물 추출물과 메탄올 추출물(mg/ml)을 각각 농도별로 0, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l를 가한 후 ADP, FeCl<sub>3</sub>, NADPH를 첨가하여 30분 incubation하여 이때 발생하는 malondialdehyde를 정량하였다. 추출물을 첨가하지 않는 대조군의 MDA 발생 정도를 100으로 하여 마가목 열매 물 추출물과 메탄올 추출물을 첨가시 발생하는 MDA 억제율을 비교함으로써 *in vitro* 항산화 효과를 측정하였다.

## 9. 항산화 물질의 분리 및 구조 확인

### 가. 추출 및 유기용매에 의한 분획 분리

마가목 시료 5kg을 잘게 썰어서 시료의 5배의 80% methanol을 사용하여 3시간 동안 sonication을 실시하여 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 추출액을 감압 농축기로 농축하여 H<sub>2</sub>O에 용해시켜 2l로 만든 후 분액 깔대기를 사용하여 1:1 비율로 Hexane, Ethylacetate, n-Buthanol, H<sub>2</sub>O 순서로 각각 2번 씩 fractionation을 실시하였다.

### 나. Sephadex LH-20을 이용한 항산화 물질의 분리

Hexane, ethylacetate, n-buthanol, H<sub>2</sub>O의 분획물 중에서 DPPH method에 의한 항산화 활성이 가장 높았다. ethylacetate 층에서 C-18 gel로 채워진 glass column(3cmID×63.5cm)을 통과시킨 Sample을 Sephadex LH-20이 채워진 glass

column (3cmID×40cm)으로 분리하였다. Sample의 loading 은 한 번에 2.8g씩 세 번에 나누어 자유낙하를 통해서 분리한다. 전개용매는 이차 증류수와 methanol을 각각 1:1로 섞어서 사용하였고 분리된 sample은 test-tube (1.5cmID×18cm) 한 개당 30분씩 fraction collector와 controller를 사용하여 채취하였다. 그 다음 FI-CL method를 실시하여 활성산소 소거능이 강한 fractions을 따로 모은 후에 thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 각각의 spot을 확인한 후 비슷한 부분끼리 나누었다.

#### 다. Prep-HPLC에 의한 flavonoid의 분리

Gilson(Gilson Medical Electronics. France)사의 2대의 306 pumps, 807 manometric module, 811C dynamic mixer, Model 116 detector로 구성된 HPLC를 사용하였다. 위와 같이 장치된 Prep-HPLC gradient system을 이용하여 Sephadex LH-20 glass column에서 분획된 부분을 차례로 분리하였다. 분리에 사용된 Column은 Microsorb C-18(21.4mmID×250mm)column을 사용하였으며, Solvent A는 acetic acid로 pH 2.8로 맞춘 H<sub>2</sub>O, Solvent B는 methanol을 이용하였으며 검출은 UV Detector를 이용하여 280nm에서 실시하였다.

#### 라. Mass 및 NMR 분석

Prep-HPLC에 의해 분리된 물질에 대한 분자량 및 구조 분석을 위해 mass spectrometer (HPLC/MS/MS: PerkinElma API2000)를 사용하였다. Injection mode는 DIP mode이고, 분석 voltage는 4500eV로 분석한다. DIP injection 후 voltage를 변환시키며 분석하여 주 target 물질의 분자량을 확인하고, 그 peak를 target으로 scanning하여 이온화된 peak를 얻은 후 대상물질의 구조를 확인하였다.

모든 NMR 측정은 Bruker Avance 400 spectrometer system (9.4T)에서 실행되었다. <sup>1</sup>H NMR 실험은 32K data points를 이용 1s의 relaxation delay를 사용하여 32회의 transients가 실행되었고 90pulse는 9.7s가 적용되었으며, spectral width는 5708Hz를 지정하여 실험을 실시하였다.

## 10. 마가목 추출물의 효능검증(동물실험)

### 가. 식이의 재료와 조제

대조군의 실험 식이는 American Institute of Nutrition (AIN)에서 권장한 식이 조성(Table 4)에 따라 정제사료를 혼합하여 조제하였고 실험군은 현재 식용이 가능한 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물을 동결건조하여 사료에 1%수준으로 첨가하여 조제하였다.

### 나. 실험동물 사육

실험동물은 생후 4주된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리를 구입하여 각 그룹 당 8마리씩 3군으로 나누어 1주간 고품사료(제일제당주식회사 제품)로 예비 사육하고, 마가목 추출물을 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 개별 사육 cage에서 4주간 각각의 해당 식이로 사육하였다. 사육장 내의 온도는  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였으며 12시간 간격으로 점등과 소등을 실시하였고 습도, 화기, 조도를 자동으로 조절하였다. 실험기간 중 식이와 물의 섭취는 자유롭게 행하였고, 사료 섭취량 및 체중 증가량은 매 2일 마다 일정한 시간에 측정하였다.

### 다. 시료의 채취

분변 중의 담즙산 측정을 위하여 실험 종료 2일전에 대사 cage에서 2일간 분변을 수집하여 동결건조 후 담즙산 분석을 위한 시료로 사용하였다. 사육기간이 완료된 후 12시간 절식시킨 후 오전 10시에 단두 도살하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 30분간 실온에서 방치한 후 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻으며, 간장은 채혈 후 즉시 적출하여 중량을 측정하고 분변, 간 및 혈청 시료는 분석 전까지는 냉동 보관하였다가 사용하였다.

Table 4 . Composition of experimental diets.

(%)

Ingredients	CON <sup>1)</sup>	WE <sup>2)</sup>	ME <sup>3)</sup>
Casein	20.0	20.0	20.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Corn starch	15.0	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Mineral mix(AIN-76)	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix(AIN-76)	1.0	1.0	1.0
Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Sucrose	49.5	48.5	48.5
WE extract	-	1.0	-
ME extract	-	-	1.0

<sup>1)</sup> CON : Control group fed AIN diets

<sup>2)</sup> WE : Group fed with water extracts of *Sorbus commixta* Hedl

<sup>3)</sup> ME : Group fed with methanol extracts of *Sorbus commixta* Hedl

## 라. 미토콘드리아 및 cytosol의 분리

항산화 효소계 활성측정을 위해 Fig 1과 같은 방법에 따라 간장중의 cytosol을 분리하였다. Cytosol의 분리를 위하여 모든 과정은 저온실(4°C)과 ice-bath를 사용하여 김 등의 방법으로 수행하였다. 우선 간장 조직세포 전체의 과산화 정도를 측정하기 위하여 간장의 homogenate를 제조하였다. 간장 3g을 칭량하여 세절하고 HEPES buffer(균질완충용액: 20mM HEPES + 140mM KCl, pH 7.4) 30ml를 넣고 homogenizer를 이용하여 900 rpm으로 균질화하였다. 균질액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 뜬 기름을 제거한 뒤 상등액의 맑은 부분을 시료원으로 취하였다. 남은 균질액의 상등액을 105,000×g(38,000rpm)에서 1시간 동안 초고속원심분리하여 상등액인 cytosol과 침전물로 분리하였다.

## 마. 혈청 및 간장중의 지질함량 분석

혈청 중 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지질, 인지질은 각각의 측정용 kit(신양화학약품주식회사)를 사용하여 분석하였다. 간장 중 지질함량은 Folch법에 따라 추출, 정제한 다음 총콜레스테롤 분석은 Sperry와 Webbe법, 중성지방은 Fletcher법, 인지질은 Rouser법에 의해 각각 비색 정량하였다.

## 바. 분변 중의 담즙산 분석

분변 중의 담즙산 함량은 Roelof 등의 방법에 따라 담즙산을 추출한 후, 담즙산 측정용 kit(Bile acids Diagnostic kits<sup>®</sup>, Sigma kit. No 450, 미국)를 사용하여 효소법으로 측정한다.

## 사. 마가목 열매 추출물의 in vivo 항산화 효소계 활성 측정(간장)

### 1) Superoxide dismutase 활성

Superoxide dismutase의 활성은 McCord 등의 방법을 이용 측정한다. 50mM

potassium phosphate buffer(pH 7.8), 0.1mM cytochrome c, 0.5mM xanthine, 1.5mM KCN, 1% sodium deoxycholate, xanthine oxidase에 각 시료를 혼합한 후 xanthine과 xanthine oxidase의 반응으로 생성되는 활성을 측정해 구한다.

## 2) Catalase 활성

Catalase 활성은 Abei의 방법을 이용하여 측정한다. 50mM phosphate buffer(pH 7.0)에 각 시료를 혼합한 후, 30mM hydrogen peroxide를 가해 hydrogen peroxide가 catalase에 의해 H<sub>2</sub>O로 분해될 때의 흡광도 변화를 240nm에서 5분간 측정하여 활성을 구한다.

## 3) Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase의 활성은 Leopold 등이 제안한 방법을 이용해 glutathione reductase에 의한 NADPH 산화와 짝지은 glutathione의 환원정도로 측정한다. 1mM EDTA가 들어있는 0.1mM potassium phosphate buffer(pH7.0)에 각 시료, 10mM glutathione, 10mM glutathione reductase, 1.5mM NADPH, 12mM t-butylhydroperoxide를 혼합한 후 340nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하여 활성을 구한다.

### 아. 단백질 정량

단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin)를 표준물질로 사용하여 Lowry 등의 방법에 따라 Protein assay kit(Sigma)를 가지고 측정하였다.

### 자. 통계처리

각 처리군별 실험 결과는 Super ANOVA(Analysis of variance) program을 이용하여 평균(mean)과 표준오차(standard error, S.E.)로 제시하였다. 각 처리 군간의 유의성을 검증하기 위하여 ANOVA 검증을 실시하였으며, 유의성이 발견된 경우 Duncan's new multiple range test로 p<0.05 수준에서 검증하였다.

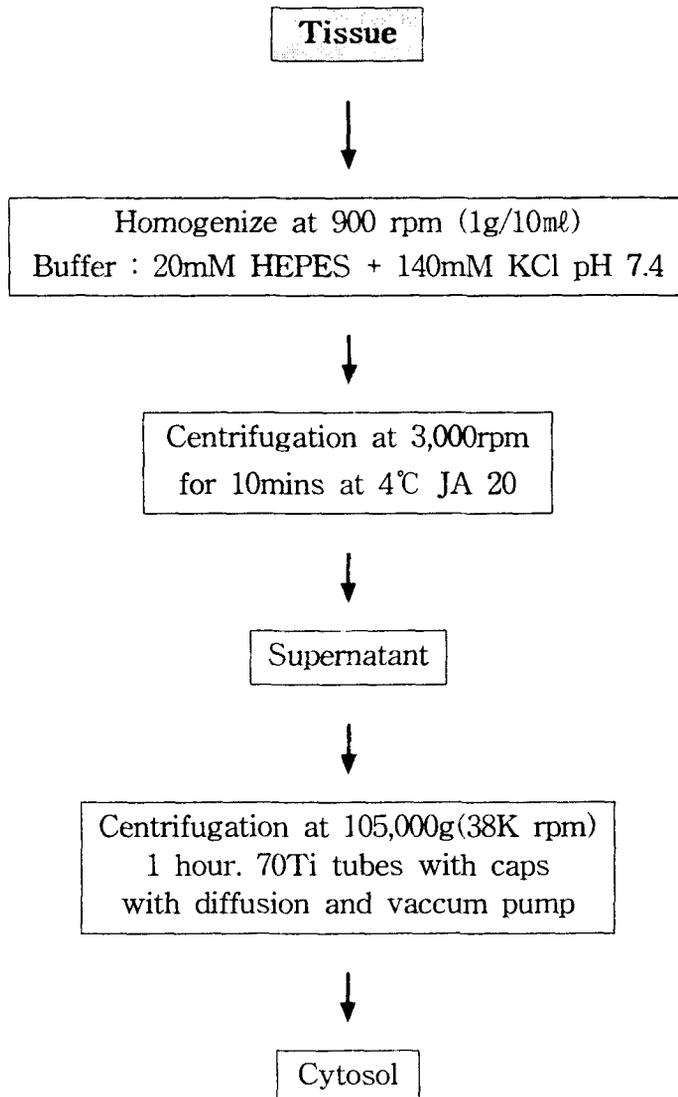


Fig. 1. Procedure for cytosol preparation

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 마가목, 잎, 줄기, 열매로부터 추출물의 수율

마가목의 잎, 줄기, 열매부위를 추출에 적합하도록 세절, 마쇄한 뒤, 수직 환류 냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료의 중량에 대하여 각각 10배의 증류수와 메탄올을 가하여 증류수는 100℃, 메탄올은 80℃의 온도에서 12시간씩 3회 반복 추출하였다. 각각의 추출물들은 뜨거운 상태로 감압 여과 후 농축하여 동결 건조한 후 각각의 수율을 계산한 결과 Table 9와 같다. 열매의 메탄올, 물 추출물은 수율이 각각 46.8%와 36%로 가장 높았고, 줄기부위의 메탄올과 물 추출물의 수율은 각각 1.8과 6.08%이었으며 잎 추출물의 수율은 각각 10.4, 8.2%로 나타났다.

### 2. 마가목 열매 및 수피의 일반성분 분석

마가목 열매 및 수피의 일반성분분석은 AOAC법에 따라 분석하였다. 수분은 105℃건조법, 조단백질함량은 Semimicro kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 회분은 550℃에서 회화하여 측정하였으며, 분석한 결과는 Table 5, 6과 같다. 마가목 열매의 수분 함량은 69.4%, 회분은 3.0%, 조지질은 1.8%였고, 조단백질 함량은 2.0%, 탄수화물이 23.8%였다(Table 5).

마가목 수피의 수분 함량은 50.3%, 회분함량은 4.0%, 조지질과 조단백질 함량은 각각 3.3%와 3.0%, 탄수화물은 39.4%였다 (Table 6).

### 3. 마가목 열매와 수피의 지방산 분석

마가목 열매와 수피로부터 soxhlet방법에 의해 지방을 추출한 후, BF<sub>3</sub>-methanol로 methylation 시킨 다음 gas liquid chromatograph(Hewlett Packard 5890 series II GC, Hewlette Packard 3396A integrator)로 지방산 조성을 분석하였다.

Table 9. Yields of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl.

Samples	Extracts	Yeilds
Leaf	H <sub>2</sub> O	10.4
	Methanol	8.2
Bark	H <sub>2</sub> O	6.1
	Methanol	1.8
Fruit	H <sub>2</sub> O	36.0
	Methanol	46.8

Table 5. Proximate composition of *Sorbus commixta* Hedl(fruits).

Ingredients	%
Moisture	69.4
Ash	3.0
Crude Lipid	1.8
Crude protein	2.0
Carbohydrate	23.8

Table 6. Proximate composition of *Sorbus commixta* Hedl(barks).

Ingredients	%
Moisture	50.3
Ash	4.0
Crude Lipid	3.3
Crude protein	3.0
Carbohydrate	39.4

마가목 열매 지방질의 지방산 분석결과를 Table 7에 나타내었다. 그 결과 18:2(linoleic acid)지방산이 54.8%로 가장 많았으며, 18:1(oleic acid)이 22.8%, 16:0(palmitic acid)이 8.9%, 24:0(lignoceric acid)이 3.2%순 이었다. 또한 마가목 수피의 지방산 분석 결과를 Table 8에 나타내었다. 역시 열매와 마찬가지로 18:2(linoleic acid) 지방산이 53.7%로 가장 많았으며 18:3(linolenic acid)이 13.9%, 18:1이 8.3%, 16:0이 7.5%, 22:0이 6.0%순 이었다.

#### 4. 마가목 추출물의 Amino acid 분석

마가목 열매와 수피 추출물의 아미노산 분석을 위해 각각의 시료 0.4g을 6N-HCl로 100℃에서 24시간 가수분해한 후 HPLC를 이용하여 분석하여 Table 9, 10에 나타내었다. 마가목 열매의 아미노산 분석결과 물 추출물의 경우는 aspartic acid 함량이 가장 높았으며, 그 다음은 glutamic acid, lysine, alanine, serine, arginine, isoleucine, phenylalanine 순 이었다. 에탄올 추출물의 경우는 물 추출물에 비해 아미노산 함량이 낮게 나타났으며 aspartic acid, lysine, isoleucine, valine 순으로 나타났다

마가목 수피 추출물의 아미노산 분석결과 물추출물의 경우 arginine, alanine의 함량이 가장 높았으며, 그 다음으로 aspartic acid, glutamic acid, lysine 순이었고, 에탄올 추출물의 경우 phenylalanine 함량이 월등히 높았으며 lysine, leucine 순으로 나타났다.

Table 7. Fatty acid composition of the lipids from *Sorbus commixta* Hedl(fruits).

Fatty acid	Area(%)
14 : 0	0.536
16 : 0	8.894
16 : 1	0.318
17 : 0	-
18 : 0	2.611
18 : 1	22.786
18 : 2	54.840
18 : 3	1.609
20 : 0	1.093
20 : 1	0.552
20 : 2	-
20 : 3	-
22 : 0	2.914
22 : 1	0.364
23 : 0	0.296
24 : 0	3.187

Table 8. Fatty acid composition of the lipids from *Sorbus commixta* Hedl(barks)

Fatty acid	Area(%)
14 : 0	0.536
16 : 0	8.894
16 : 1	0.318
17 : 0	-
18 : 0	2.611
18 : 1	22.786
18 : 2	54.840
18 : 3	1.609
20 : 0	1.093
20 : 1	0.552
20 : 2	-
20 : 3	-
22 : 0	2.914
22 : 1	0.364
23 : 0	0.296
24 : 0	3.187

Table 9. Amino acid compositions of the fruits extracts from *Sorbus commixta* Hedl.

Amino acid	H <sub>2</sub> O extracts	MeOH extracts
Aspartic acid	0.81	0.20
Glutamic acid	0.26	0.09
Serine	0.16	0.05
Glycine	0.05	0.01
Histidine	0.06	0.02
Arginine	0.15	0.01
Threonine	0.05	0.06
Alanine	0.17	0.03
Proline	0.09	0.06
Tyrosine	0.08	0.05
Valine	0.16	0.10
Methionine	0.06	0.02
Cysteine	0.03	0.02
Isoleucine	0.14	0.10
Leucine	0.11	0.06
Phenylalanine	0.14	0.03
Lysine	0.22	0.16
Total	2.76	1.05

Table 10. Amino acid compositions of the barks extracts from *Sorbus commixta* Hedl.

Amino acid	H <sub>2</sub> O extracts	MeOH extracts
Aspartic acid	0.20	0.02
Glutamic acid	0.17	0.01
Serine	0.05	-
Glycine	0.05	0.01
Histidine	0.06	0.01
Arginine	0.23	0.01
Threonine	0.13	0.01
Alanine	0.23	0.01
Proline	0.04	0.01
Tyrosine	0.02	0.01
Valine	0.03	0.01
Methionine	0.01	0.01
Cysteine	0.01	0.02
Isoleucine	0.01	0.01
Leucine	0.02	0.14
Phenylalanine	0.01	1.59
Lysine	0.14	0.81
Total	1.40	2.67

## 5. 마가목 열매의 비타민C 및 E 분석

식품공전법에 의해 마가목 열매의 비타민C를 분석하기 위해 메타인산-초산 용액과 혼합, 여과한 후 2,4dinitrophenylhydrazine(DNP)법으로 파장 520nm에서 UV spectrophotometer(UV KON943, Kontron Instruments, Italy) 사용하여 정량한 결과 비타민C는 열매 100g당 80, 9mg의 함량을 보였다.

마가목 줄기와 열매의 비타민E 함량분석 결과를 Table 11에 나타내었다. 열매 추출물의 비타민 E 동족체 중  $\alpha$ -tocopherol은 55.17mg/100g,  $\gamma$ -tocopherol은 14.10mg/100g,  $\delta$ -tocopherol은 2.75mg/100g을 나타내었다. 한편 줄기는  $\alpha$ -tocopherol만 1.40mg/100g을 함유하고 있었다.

## 6. 마가목 열매의 무기물 함량

무기질은 열량은 나타내지 않지만 효소의 보조인자 역할을 하며, 인지방질, 인, 단백질, 호르몬, 헤모글로빈, 비타민, 아미노산, 효소 및 조효소 등의 유기화합물의 구성성분이기도 하며, 비타민과 같이 생명에 관계되는 많은 생리작용에 관여함으로써 생존에 절대적으로 필요한 영양소이다. 황산질산 습식분해법으로 분해한 마가목 열매 추출물의 주요 무기물의 정량분석 결과, 칼륨의 함량이 1,238.3mg/100g으로 가장 많았으며, 나트륨이 7.5mg/100g, 마그네슘이 111.5mg/100g, 망간이 7.7mg/100g, 아연이 1.6mg/100g, 인이 27.6mg/100g, 철이 2.7mg/100g, 구리가 0.4mg/100g을 나타내었다(Table 12).

Table 11. Vitamin E contents in fruit and bark of the *Sorbus commixta* Hedl.

(mg/100g)

Vitamin E	Fruit	Bark
$\alpha$ -tocopherol	55.17	1.40
$\gamma$ -tocopherol	14.10	-
$\delta$ -tocopherol	2.75	-

Table 12. Mineral contents in fruit of the *Sorbus commixta* Hedl.

(mg/100g)

Items	K	Na	Ca	Mg	Mn	Zn	P	Fe	Cu
Fruit	1,238.3	7.5	290.8	111.5	7.7	1.6	27.6	2.7	0.4

## 7. 마가목 꽃의 향기성분 분석

마가목의 꽃 부위로부터 향기성분을 연속증류기 증류 추출법으로 추출한 후 농축한 시료를 가스 크로마토그래피(GC/MS)를 이용하여 분석하였다(Fig 2). 그 결과 (Table 13) peak 1은 분자량 104인 styrene이 peak 2는 분자량이 106인 Benzaldehyde이 peak 3은 분자량이 108인 Benzyl Alcohol이 peak 4는 분자량이 131인 Benzeneacetonitrile이 peak 5는 분자량이 142인 Nonanal이 peak 6은 분자량이 122인 Phenylethyl alcohol이 peak 7은 분자량이 136인 Para-anisaldehyde이 peak 8은 분자량이 164인 Phenol, 2-methoxy-5-(1-propenyl)-이 peak 9은 분자량이 166인 Benzoic acid, 2-methoxy-이 peak 10은 분자량이 220인 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione이 peak 11은 분자량이 220인 Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-이 peak 12는 분자량이 222인 Farnesol이 peak 13은 분자량이 256인 Hexadecanoic acid이 peak 14는 분자량이 324인 Tricosane이 peak 15는 분자량이 312인 Hexadecanoic acid, butyl ester이 peak 16은 분자량이 366인 hexacosane이 peak 17은 분자량이 370인 Hexanedioic acid, dioctyl ester가 확인되었다.

## 8. 배당체의 정성분석

마가목 열매의 물, 70% methanol 추출물, 줄기의 methanol 추출물의 배당체 화합물들을 확인한 결과 Table 14와 같다.

페놀배당체와 terpenoid의 경우 열매 및 수피 추출물 모두에 많이 있는 것이 확인되었고 수피 메탄올추출물에서는 안트라퀴논 배당체가, 열매 물추출물에서 flavonoid와 anthocyan 배당체가 많이 있는 것이 확인되었다. 그러나 Allunm & Mustard glycoside는 열매 및 수피 추출물에서 확인되지 않았다.

Table 13. Volatile Components in flowers of *Sorbus commixta* Hedl.

Peak Number	M · W	Name
1	104	Styrene
2	106	Benzaldehyde
3	108	Benzyl Alcohol
4	131	Benzeneacetonitrile
5	142	Nonanal
6	122	Phenylethyl alcohol
7	136	Para-anisaldehyde
8	164	Phenol, 2-methoxy-5-(1-propenyl)-
9	166	Benzoic acid, 2-methoxy-
10	220	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione
11	220	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-
12	222	Farnesol
13	256	Hexadecanoic acid
14	324	Tricosane
15	312	Hexadecanoic acid, butyl ester
16	366	Hexacosane
17	370	Hexanedioic acid, dioctyl ester

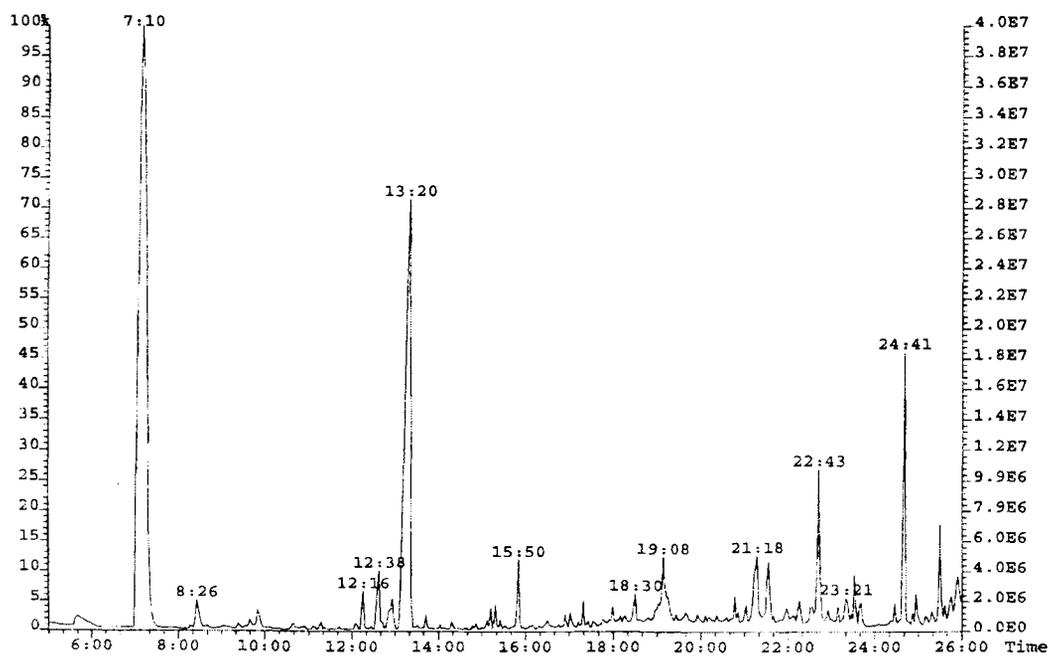


Fig. 2. GC/MS spectrum of *Sorbus commixta* Hedl.

Table 14. Glycoside contents of the extracts from the *Sorbus commixta* Hedl.

	H <sub>2</sub> O (Fruit)	ME (Fruit)	ME (Bark)
phenol glycoside	++	++	++
Anthraquinine glycoside	+	+	++
Anthranol glycoside	+	+	+
Nitril glycoside	+	+	+
Allunm & Mustard glycoside	-	-	-
Flavonoid glycoside	++	+	+
Anthocyan glycoside	++	+	+
Terpenoid	++	++	++
Alkaloid	+	+	+

- : Not detected, + ; detected, ++ ; much detected

## 9. 마가목 열매 추출물의 *in vitro* 항산화 활성

마가목 열매의 물과 메탄올 추출물 50, 100, 200 $\mu$ g을 brain homogenate에 넣고 ADP와 FeCl<sub>3</sub>, NADPH를 첨가하여 산화를 유발한 후 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 MDA 발생정도와 비교하여 항산화 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물 모두 대조군에 비해 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였는데, 특히 물 추출물이 메탄올 추출물보다 항산화 활성이 높은 것을 확인하였다. 각 추출물을 200 $\mu$ g 첨가하였을 때, 물과 메탄올 추출물 모두 대조군에 비해 약 70% 정도의 항산화 효과를 나타내었다.

## 10. 항산화 물질 분리 및 구조 확인

항산화 물질 분리를 위해 항산화력이 가장 높은 ethyl acetate fraction을 sephadex LH-20 gel을 사용하여 분취하여 TLC를 행하였다. UV-vis radiator를 이용하여 TLC상에서 spot을 확인하였고, prep-HPLC를 이용하여 확인된 spot으로부터 2개의 fraction을 최종 분리하고 이 2개의 fraction을 각각 K1, K2(Fig 4)로 명명하였다. 명명된 K1, K2 fraction의 brain homogenate에 대한 항산화력을 측정된 결과 매우 항산화력이 우수한 K2의 구조를 분석한 결과 <sup>13</sup>C-NMR(Fig. 5)에서 확인 할 수 있듯이, 모든 peak가 100ppm 보다 down field에 위치하고 있는 것으로 보아 gallic acid의 유도체임을 알 수 있었고, <sup>1</sup>H-NMR(Fig. 6)과 질량분석 결과 구조식은 C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>(Fig 7)으로 분자량이 364.61임이 밝혀졌으며 IUPAC 명은 2,6-di-hydroxy-4-[(4-hydrophenyl)peroxy]benzoic acid로 판명되었다.

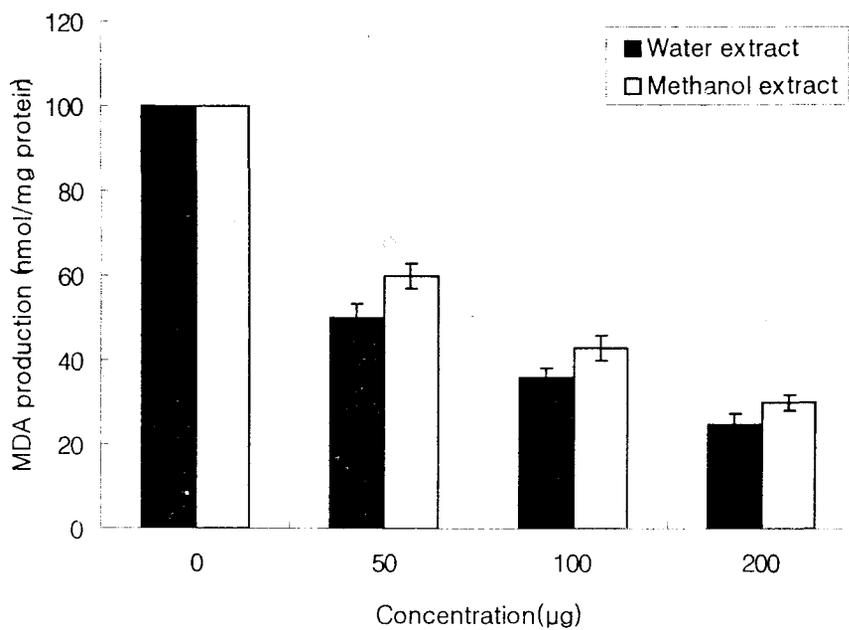


Fig. 3. *in vitro* antioxidative activities of extracts from *Sorbus commixta* Hedl on MDA production using rat brain homogenate.

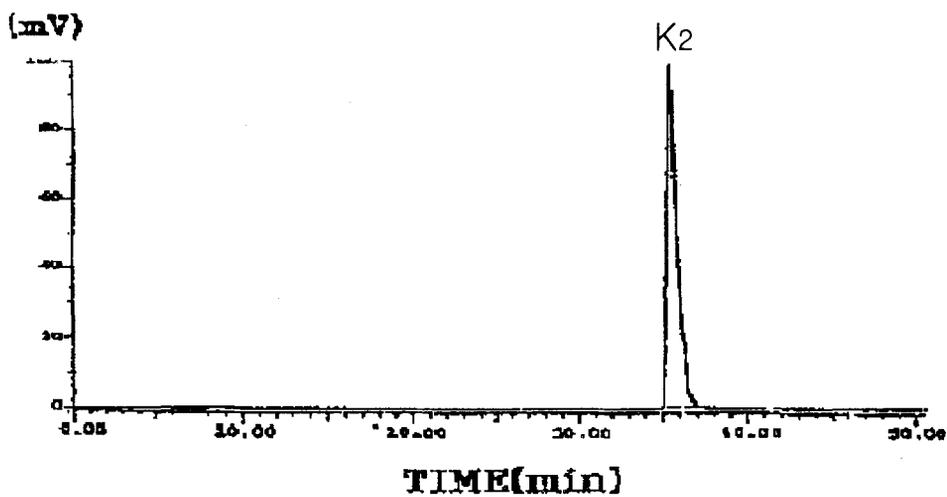
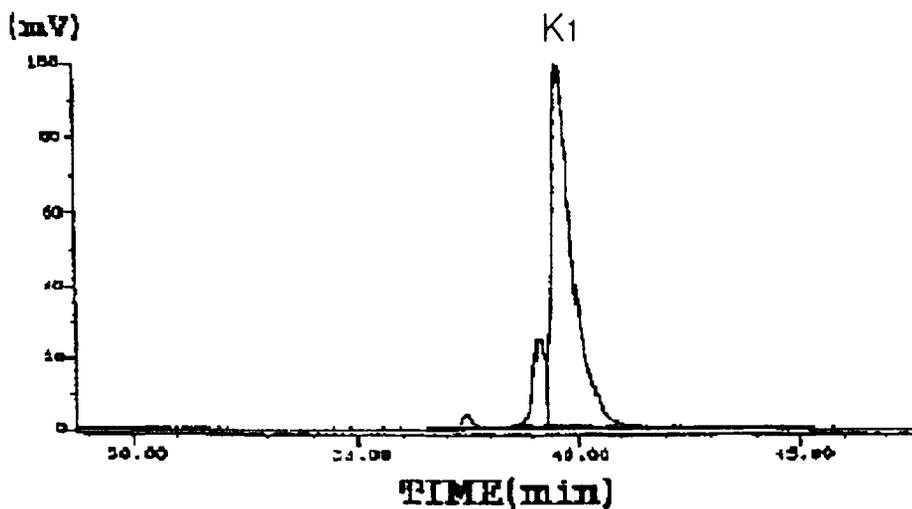


Fig 4. The Chromatography of K1, K2 using the prep-HPLC  
(Column; C-18, 21, 4mmID × 250 mm, Beckman).

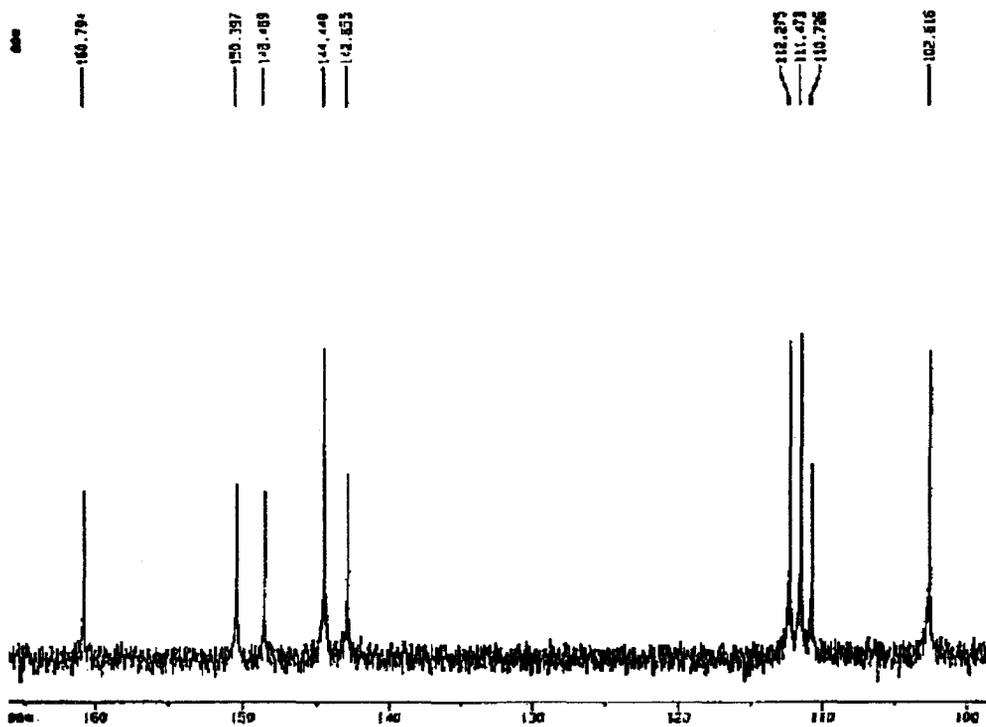


Fig. 5.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of K2 isolated from *Sorbus commixta* Hedl.

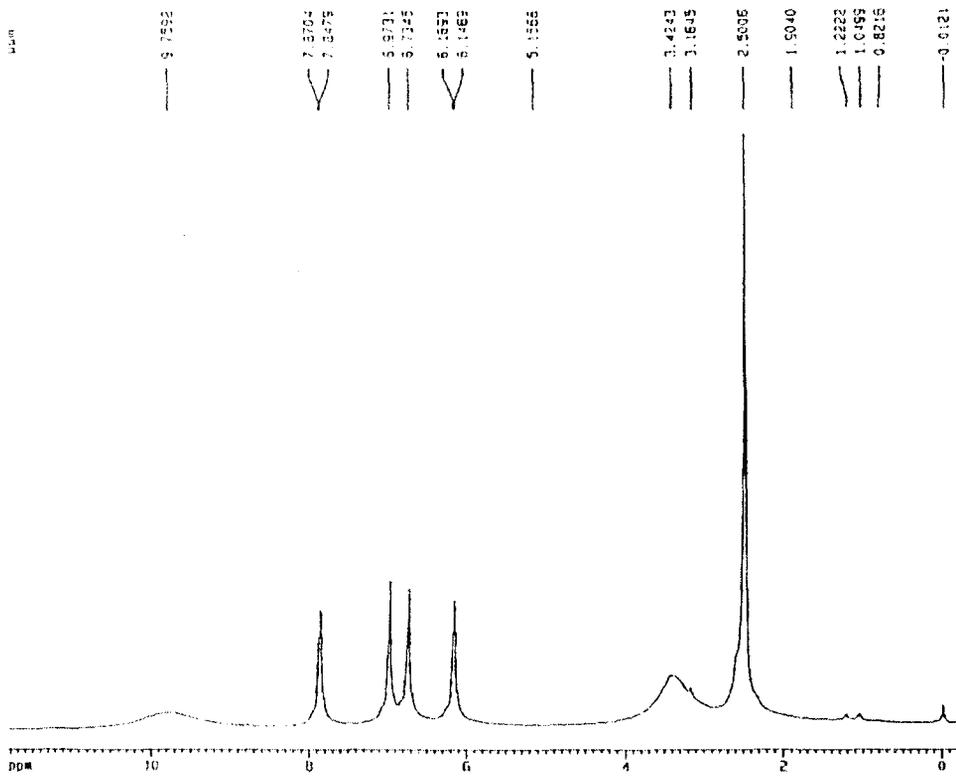


Fig. 6. <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of K2 from *Sorbus commixta* Hedl.

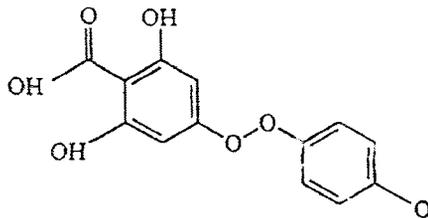
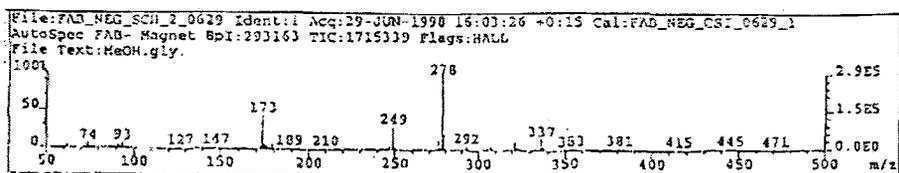
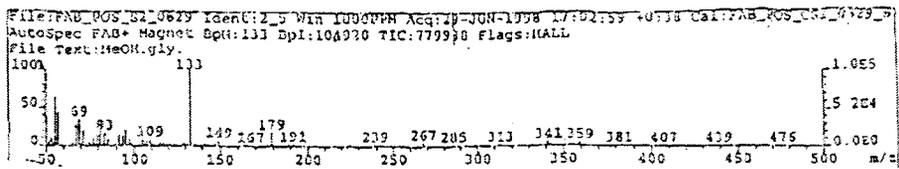


Fig. 7. Mass Spectrum of SCH3-2 from *Sorbus commixta* Hedl.

## 11. 동물실험

### 가. 성장률

동결 건조한 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물을 Sprague-dawley rats 식이에 1% 수준으로 첨가한 후, 마가목 열매 추출물을 급여하지 않은 대조군과 함께 개별 사육 cage에서 4주간 해당 식이로 사육하고 성장률을 측정된 결과는 다음(Table 15)과 같다. 체중증가량에서 메탄올 추출물 급여군은 대조군과 비교하여 거의 차이를 보이지 않은 반면, 물 추출물 급여군의 경우 대조군과 비교하여 높은 체중증가량을 보였다. 하지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 식이 섭취량은 모든 군에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 간장의 무게는 대조군에 비해 약간 낮은 경향을 보였지만, 간장의 무게 역시 큰 차이를 보이지 않았다. 이것으로 볼 때, 마가목 열매의 추출물 급여는 동물의 성장에 큰 장애를 나타내지 않는 것으로 사료되었다.

### 나. 혈청중의 지질함량 측정

혈청중의 triglyceride 함량은 대조군의  $77.8 \pm 2.41$  nmol/mg protein에 비해, 마가목 열매의 물 추출물군의 경우  $53.7 \pm 1.71$  nmol/mg protein으로 나타났고, 메탄올 추출물군은  $54.6 \pm 2.41$  nmol/mg protein으로 나타나 물과 메탄올 추출물군 모두 대조군과 비교하여 30% 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 8). Total cholesterol 함량을 측정된 결과(Fig. 9A), 마가목 열매의 추출물을 급여하지 않은 대조군의 total cholesterol 함량은  $108.6 \pm 5.52$  nmol/mg protein을 보인 반면, 물추출물군은  $85.2 \pm 3.54$  nmol/mg protein, 메탄올추출물군은  $84.3 \pm 7.88$  nmol/mg protein으로 대조군에 비해 22% 감소하여 통계적인 유의성을 보였다. HDL-cholesterol 함량의 경우(Fig. 9B), 대조군이  $32.3 \pm 3.51$  nmol/dl인 반면 마가목 열매의 물추출물군은  $41.1 \pm 5.78$  nmol/dl로 오히려 증가하는 경향을 보였고, 메탄올 추출물군 역시 물추출물군 만큼 증가하진 않았지만  $34.7 \pm 3.59$  nmol/dl로 대조군에 비해 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 각 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Phospholipid 함량은 Fig. 10에 나타내었다. 대조군은  $101.2 \pm 10.03$  nmol/dl, 마가목 열매의 물추출물군  $103.5 \pm 5.8$  nmol/dl, 메탄올추출물군은  $102.2 \pm 7.36$  nmol/dl로 모든 군에서 phospholipid 함량이

비슷한 수치를 나타내었으며 유의적인 차이는 발견할 수 없었다. Glucose 함량을 측정 한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. 마가목 열매의 추출물을 급여하지 않은 대조군은  $138.9 \pm 8.21$  nmol/dl인 반면, 마가목 열매의 물추출물군은  $105.6 \pm 8.61$  nmol/dl로 23% 감소하는 것을 알 수 있었다. 그리고 메탄올추출물군의 경우,  $122.2 \pm 2.25$  nmol/dl로 물추출물군보다 감소하는 폭이 적었지만 대조군에 비해 12% 감소하였다. 하지만 물추출군과 메탄올추출물군 모두 통계적인 유의성은 보이지 않았다.

#### 다. 간장중의 지질함량 측정

간장중의 triglyceride 함량을 측정한 결과는 Fig. 12과 같다. 대조군의 경우  $64.0 \pm 3.35$  mg/g liver인 반면, 마가목 열매의 메탄올추출물군은  $56.4 \pm 1.43$  mg/g liver로 나타나 triglyceride 함량이 13% 유의적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다. 물추출물군도  $57.4 \pm 1.21$  mg/g liver로 대조군에 비해 triglyceride 함량이 감소하였으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다. Total cholesterol 함량을 측정한 결과(Fig. 13), 대조군의 total cholesterol 함량이  $6.51 \pm 0.21$  mg/g liver인데 반해, 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군은 각각  $5.27 \pm 0.15$ ,  $5.36 \pm 0.14$  mg/g liver를 나타내어 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군의 total cholesterol 함량 모두 대조군에 비해 17% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. Phospholipid 함량을 측정한 결과, 대조군의 경우 phospholipids 함량은  $32.84 \pm 1.29$  mg/g liver, 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군은 각각  $36.99 \pm 1.23$ ,  $34.23 \pm 1.27$  mg/g liver를 나타내었다(Fig 14). 대조군에 비해 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군 모두 phospholipids 함량이 증가함을 알 수 있었고, 특히 물추출물군의 경우 13% 유의적으로 증가하였다.

Table 15. Growth parameters and liver weights in rats.

Dietary groups	Initial body weight(g)	Weight gain (g/4weeks)	Feed intake (g/day)	Liver Weight (g/100g B.W.)
CON <sup>1)</sup>	88.2±2.85	187.7±17.1	24.7±1.57	4.03±0.27
WE <sup>2)</sup>	85.8±4.05	197.7±11.6	25.3±1.96	3.66±0.12
ME <sup>3)</sup>	90.5±2.92	188.5±6.30	23.9±1.53	3.59±0.09

Mean±S.E.(n=8)

<sup>1)</sup> CON : Control group fed AIN diets

<sup>2)</sup> WE : Group fed with water extracts of *Sorbus commixta* HEDL

<sup>3)</sup> ME : Group fed with methanol extracts of *Sorbus commixta* HEDL

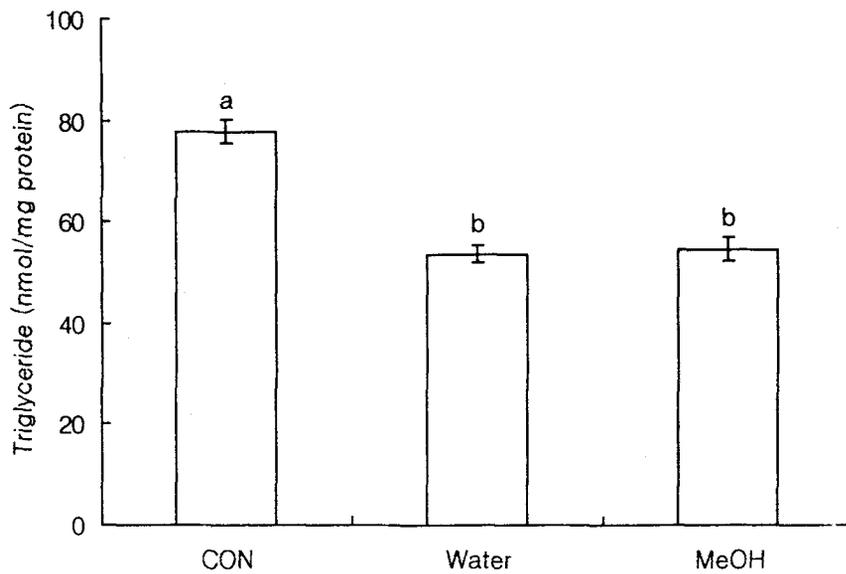


Fig. 8. Concentration of serum triglyceride in rat fed experimental diets

<sup>ab</sup> Values significantly different compared to control( $p < 0.01$ ).

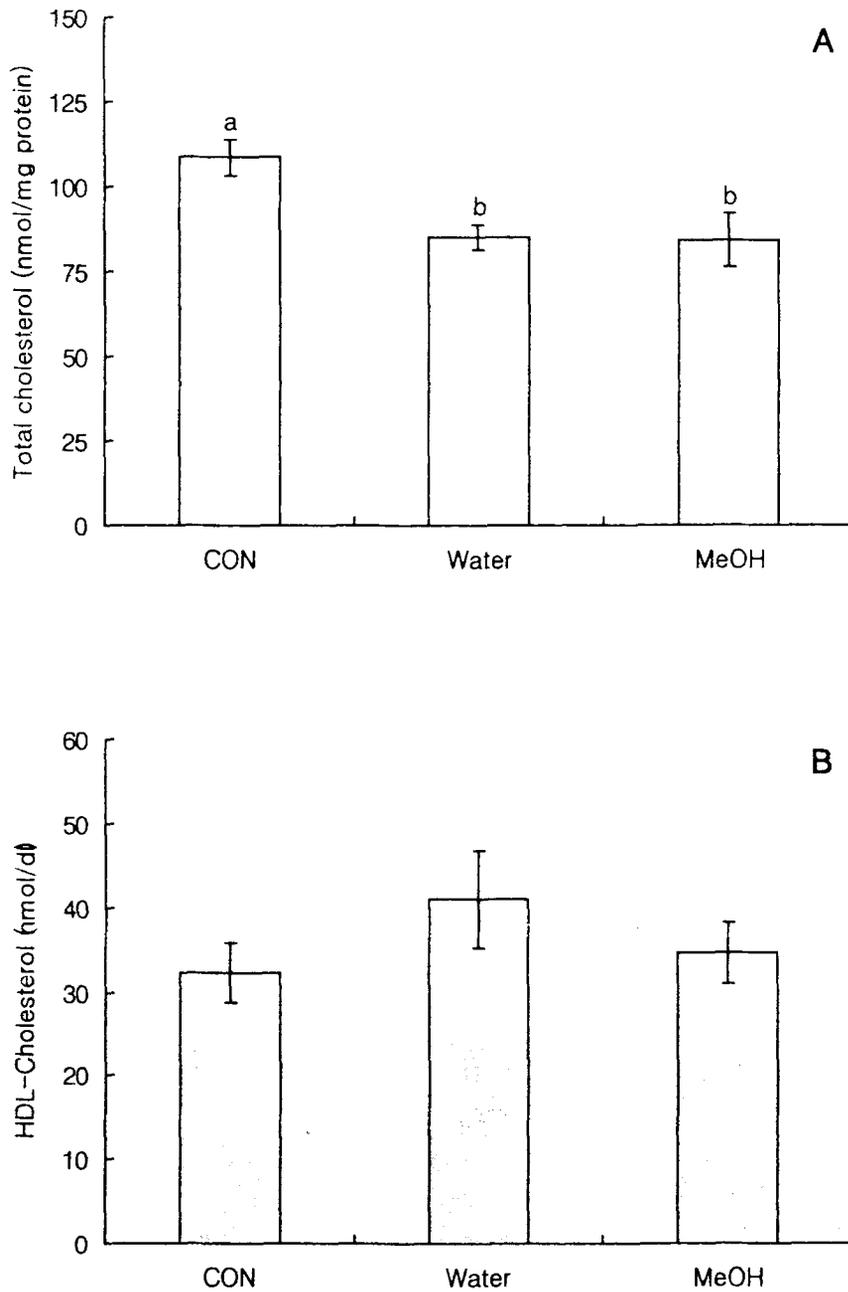


Fig. 9. Concentration of serum total cholesterol(A) and HDL-cholesterol(B) in rat fed experimental diets.

<sup>ab</sup> Values significantly different compared to control(p<0.01).

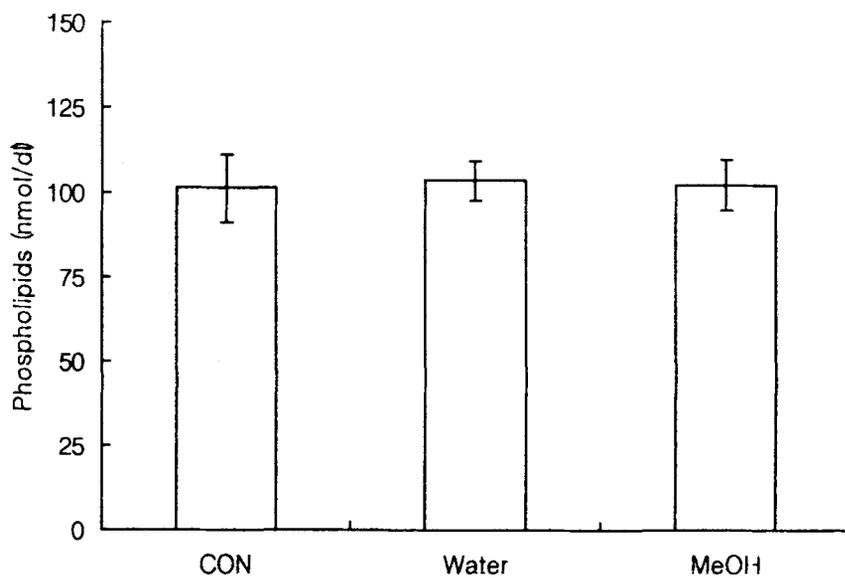


Fig. 10. Concentration of serum phospholipids in rat fed experimental diets

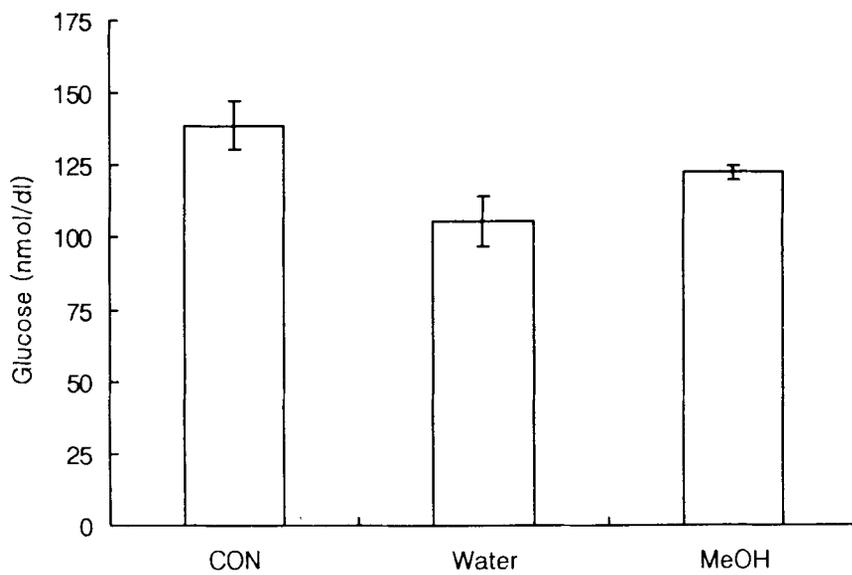


Fig. 11. Concentration of serum glucose in rat fed experimental diets

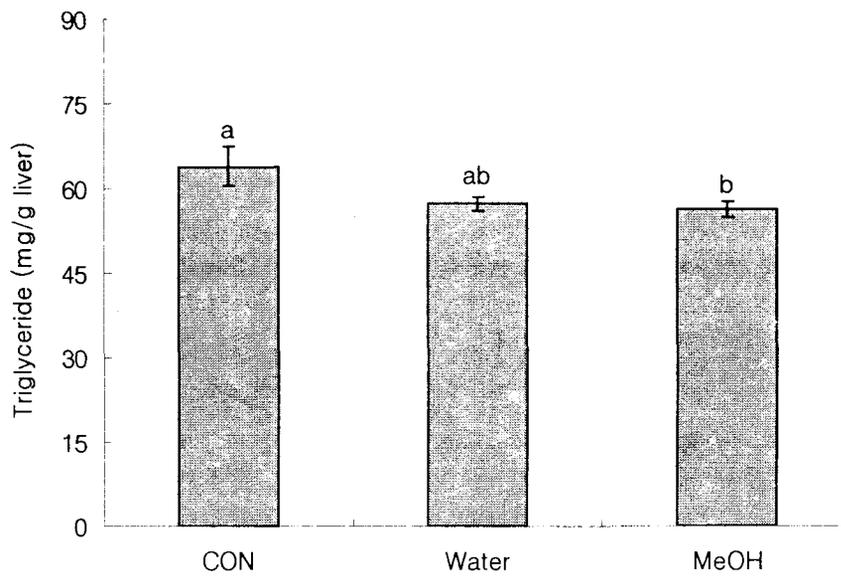


Fig. 12. Concentration of liver triglyceride in rat fed experimental diets

<sup>ab</sup> Values significantly different compared to control( $p < 0.01$ ).

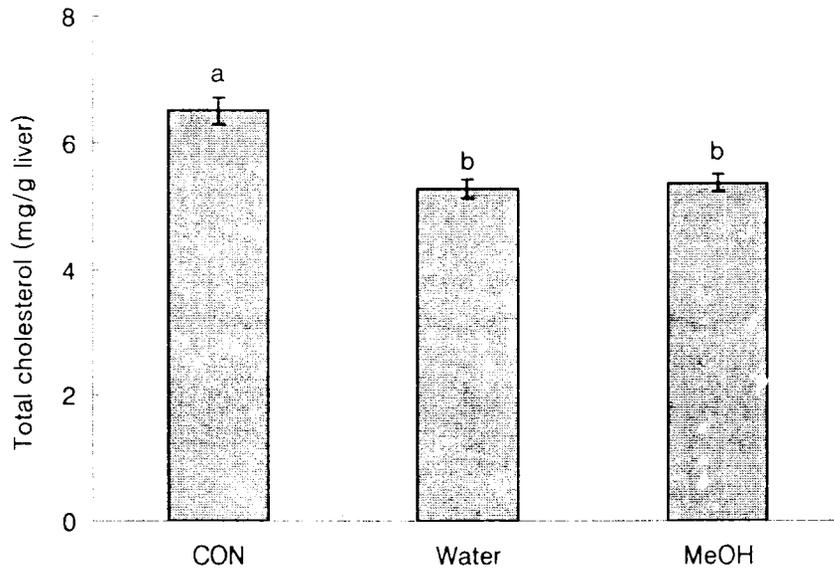


Fig. 13. Concentration of liver total cholesterol in rat fed experimental diets

<sup>ab</sup> Values significantly different compared to control( $p < 0.01$ ).

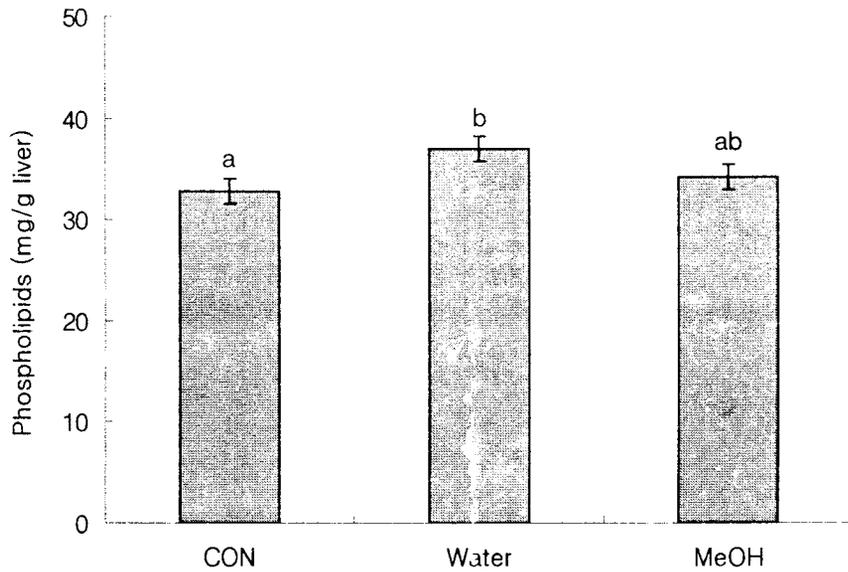


Fig. 14. Concentration of liver phospholipids in rat fed experimental diets

<sup>ab</sup> Values significantly different compared to control ( $p < 0.01$ ).

## 라. 분변량 및 분변 중의 담즙산 배설

단두도살하기 12시간 전 절식시킨 쥐의 분변을 취하여 분변량을 조사한 결과, 각각의 식이 급여 후 분변량에 있어서 각 군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Table 16). 그러나 분변중의 담즙산 함량은 대조군이  $8.56 \pm 0.56 \mu\text{ moles/day}$ 인 것에 비해, 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군이 각각  $11.20 \pm 0.71$ ,  $10.57 \pm 0.61 \mu\text{ moles/day}$ 로 유의적으로 높게 나타났다.

## 마. 항산화 효소계 활성 측정(간장)

### 1) Superoxide dismutase 활성

생체내에서 생성된 superoxide free radical은 자발적인 변화에 의해서 분해되기도 하지만 대부분 SOD에 의해  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 로 전환되어, free radical로 인한 생체독성을 감소시킨다. 마가목 열매 추출물을 급여 후 간장 중 cytosol을 분리하여 cytosol중의 SOD activity를 측정한 결과 Fig. 15와 같다. 대조군의 경우  $13.44 \pm 0.15 \text{ unit/mg protein/min}$ 의 활성을 보였고, 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군은 각각  $13.75 \pm 0.19$ ,  $13.88 \pm 0.32 \text{ unit/mg protein/min}$ 의 활성을 보여 대조군보다 SOD activity가 증가하는 경향을 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다.

### 2) Catalase 활성

Catalase는 지질과산화 반응의 연쇄반응 중에 생성되고 반응성이 강한 lipid hydroperoxide( $H_2O_2$ )를 제거하여 생체의 손상을 막는 중요한 역할을 한다. 마가목의 열매 물과 메탄올 추출물을 급여 후 생체의 대사과정 중에 생성되는  $H_2O_2$ 를 제거하는 catalase의 activity를 측정한 결과 Fig. 16과 같이 나타났다. 대조군( $914.00 \pm 16.17 \mu\text{ moles } H_2O_2 \text{ reduced/mg protein/min}$ )과 비교해서 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올 추출물군 모두 활성이 증가( $947.48 \pm 15.35$ ,  $946.25 \pm 19.63 \mu\text{ moles } H_2O_2 \text{ reduced/mg protein/min}$ )함을 알 수 있었다. 하지만 대조군에 비해 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table 16. Fecal weight and fecal bile acid excretion in rats fed experimental diets.

Dietary groups	Fecal weight(g/day)	Bile acid( $\mu$ moles/day)
CON	3.56 $\pm$ 0.21	8.56 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
WE	3.80 $\pm$ 0.31	11.20 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>
ME	3.72 $\pm$ 0.27	10.57 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>

Mean  $\pm$  S.E.(n=8)

<sup>a-b</sup>Values in the same column with different superscript letters are significantly different (p<0.05)

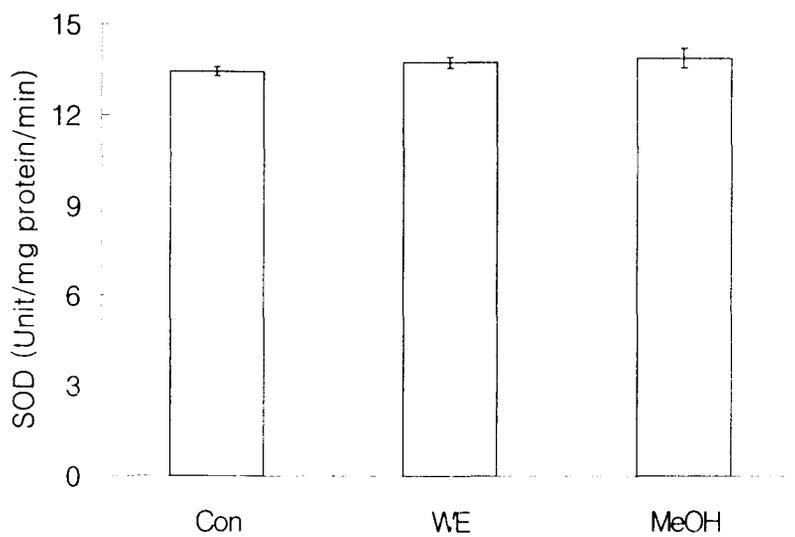


Fig. 15. Effects of the extracts from *Sorbus commixta* Hedl on cytosolic superoxide dismutase activity in liver. \* Mean  $\pm$  S.E.(n=8)

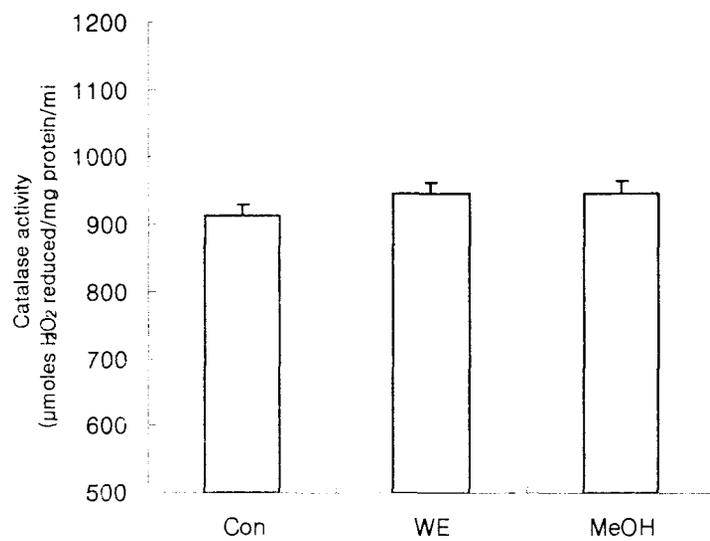


Fig. 16. Effects of the extract from *Sorbus commixta* Hedl on cytosolic catalase activity in liver. \* Mean  $\pm$  S.E.(n=8)

### 3) Glutathione peroxidase

Selenium-cysteine 활성부위를 갖고 있는 glutathione peroxidase(GSH-Px)는  $H_2O_2$ 를 분해하여 조직세포의 산화적 손상으로부터 세포막을 보호하는 역할을 한다. 즉, SOD 활성으로 생성된  $H_2O_2$ 는 catalase와 GSH-Px에 의해  $H_2O$ 로 전환되어 정상적인 생체를 유지하려 한다. 마가목 열매의 물과 메탄올 추출물을 급여 후 간장 cytosol중의 GSH-Px activity를 측정한 결과는 Fig 17과 같다. 대조군의 경우  $42.89 \pm 3.78 \mu$  mole NADPH oxidized/g protein/min의 활성을 보였다. 마가목 열매의 물추출물군과 메탄올추출물군은 각각  $55.75 \pm 1.76$ ,  $56.03 \pm 5.28 \mu$  mole NADPH oxidized/g protein/min를 나타내 대조군에 비해 물추출물군과 메탄올추출물군이 25% 증가하여 유의적으로 높은 glutathione peroxidase activity를 보였다.

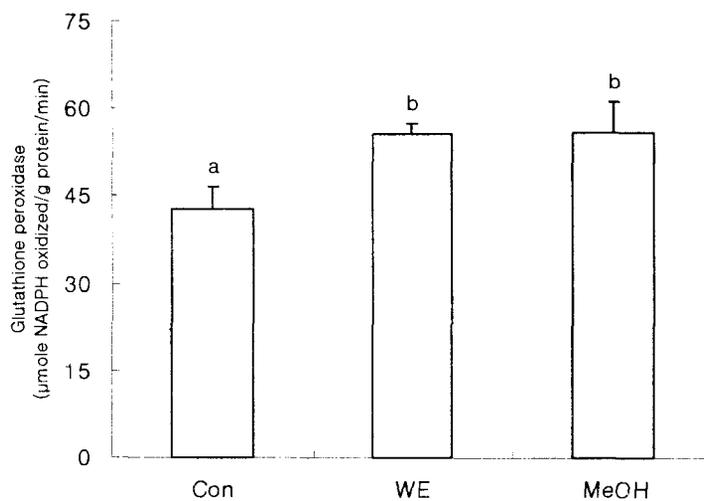


Fig. 17. Effects of the extract from *Sorbus commixta* Hedl on cytosolic glutathione peroxidase activity in liver. \* Mean  $\pm$  S.E.(n=8)

<sup>ab</sup> Values in the same column with different superscript letters are significantly different(P<0.05)

#### 바. 간장조직의 지질과산화 분석

지질 과산화 반응은 활성 산소종이 생체내에서 단백질의 SH기나 DNA와 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등으로 생체 구성분자의 구조적 변화를 일으키거나, 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화 유발을 촉진하고, 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(MDA) 함량이 증가되어 세포에 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시키므로 간 질환 등의 여러 가지 질병을 초래하여 결국 노화와 유전적 장애의 원인이 된다.

마가목 열매의 추출물을 식이에 1% 수준으로 첨가하여 급여 후 간장 homogenate 및 mitochondria와 microsome을 분리하여 lipid peroxidation을 유발 후 TBA법을 이용한 MDA 발생량을 측정된 결과 다음과 같았다. Homogenate의 MDA 발생량은 대조군이  $74.2 \pm 9.83$  nmol/mg protein, 마가목 열매의 물과 메탄올추출물군이 각각  $59.71 \pm 3.94$ ,  $54.3 \pm 5.56$  nmol/mg protein으로 감소하는 경향을 나타내었고, 특히 메탄올추출물군의 감소가 두드러졌지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 18).

Mitochondria의 MDA 발생량은 대조군( $92.01 \pm 14.49$  nmol/mg protein)에 비해 물과 메탄올추출물군( $86.1 \pm 10.65$ ,  $74.1 \pm 9.69$  nmol/mg protein) 모두 감소하는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 19A). Microsome의 MDA 발생량은 (Fig. 19B), 대조군( $63.6 \pm 4.1$ nmol/mg protein)에 비해 물과 메탄올추출물군( $58.8 \pm 3.45$ ,  $58 \pm 6.16$ )이 약간씩 감소하였지만 유의적 차이는 나타나지 않았다.

이상에서와 같이, liver homogenate, mitochondria, microsome을 분리하여 MDA 발생량을 측정된 결과, 추출물을 급여하지 않은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였고 특히 알 수 있었다. 특히 물추출물군보다는 메탄올추출물군의 감소가 높았다.

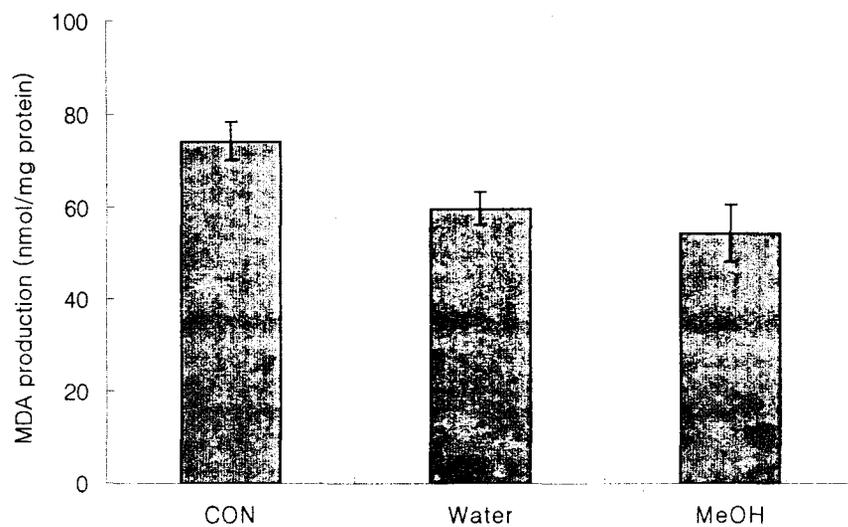


Fig. 18. Effect of the fruit extract from *Sorbus commixta* Hedl on MDA production in liver homogenate.

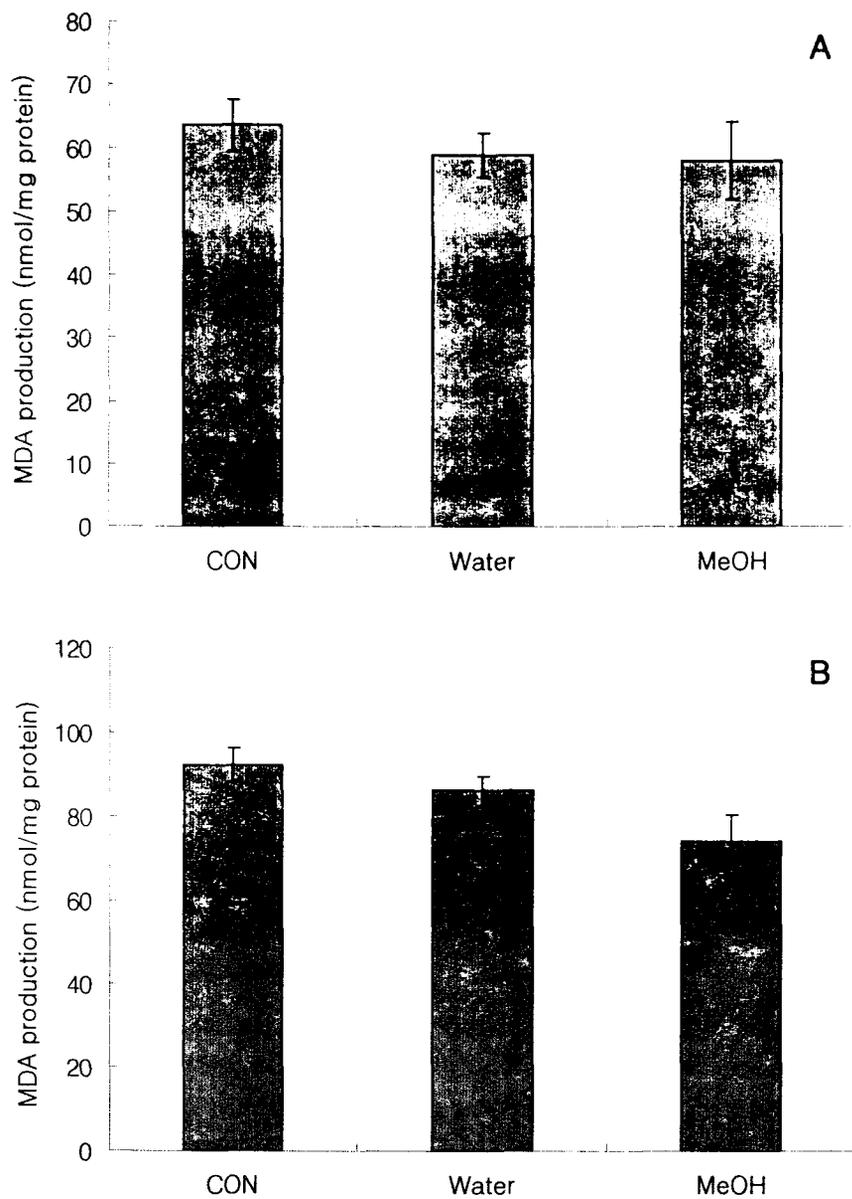


Fig. 19. Effect of the fruit extracts from *Sorbus commixta* Hedl. on MDA production in liver microsomes(A) and mitochondria(B).

## 제 5 장 마가목의 우량묘 대량생산법

### 제 1 절 서설

마가목(*Sorbus commixta* Hedl.)은 장미과(科), 마가목속(屬)에 속하는 낙엽활엽수이다. 소교목(小喬木)으로 수고는 5~13m정도까지 자라는데 야산에는 드물고 대부분 높고 고산지대에서 자생하며 4종(마가목, 당마가목, 산마가목, 팔배나무), 11변종(잔털당마가목, 목마가목, 왕털마가목, 흰털당마가목, 넓은잎당마가목, 차빛당마가목, 털팔배나무, 긴팔배나무, 벌배나무, 왕잎팔배나무, 긴잎팔배나무)이 있다. 마가목은 100년까지 살 수 있다고 하며 북아프리카, 유럽, 아시아 일부에 자생하고 있다. 우리나라에는 강원도와 경기도 이남 남부에도 해발 700m이상 되는 깊은 산 중턱 이상의 숲 속에 분포되고 있으나, 옛날부터 귀한 약재로 이용해온 나무라서 마구잡이로 채취하였기 때문에 지금은 인간의 손길이 닿기 어려운 깊은 산중이나 절벽에서 구경할 수 있는 나무가 되었다.

잎은 우상복엽(翼狀複葉)으로 6×2cm 크기인데 한 개의 잎에는 9-13개의 피침형 소엽(彼侵形小葉)이 붙어있으며, 가을에 붉게 단풍이 들면 빨간 열매와 함께 사람의 마음을 사로잡아 아름다운 경관수로서 유럽에서는 가로수나 조경수로 즐겨 심어 왔으나 우리나라에서는 최근에 와서 비로소 각광을 받고 있다. 또한 서양에서는 가로수와 정원수 이외에도 사과산, 구연산, 카로티노이드 등의 유효성분이 풍부한 열매를 잼이나 술을 만들었고 감기와 위장약으로 사용해 왔다.

마가목은 초기생육이 좋고 결가지가 많아 한 그루만 키워도 열매와 가지를 충분히 얻을 수 있다. 마가목은 가지를 잘라서 말려 두었다가 달여서 마시는 마가목차는 관절염과 성인병에 좋다고 하며, 열매를 이용한 마가목술은 신장염에 효과가 있다고 알려지고 있다. 이와 같이 마가목은 조경수뿐만 아니라 약용으로도 그 이용 가치가 많은 유전자원이나, 고갈되어 가고있는 수종이기 때문에 대량번식 기술 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 마가목의 실생묘목 생산에 필요한 발아율 제고 및 육묘기술 개발과 표준재배법 확립을 위해 시비량, 피복효과, 전정효과, 병해충조사를 수행하였다.

## 제 2 절 연구내용 및 방법

### 1. 우량묘의 대량 배양기술 개발

#### 가. 마가목 種子의 發芽條件

본 시험은 1999년과 2000년도에 강원도 평창지역에 자생하고 있는 마가목(*Sorbus commixta* Hedl)의 종자를 채취하여 과피 및 과육을 제거한 후 충실한 종자만 선별하여 공시하였다. 저장조건은 층적온도(0, 3, 5, 8℃)와 저장방법(습윤층적, 노천매장, 변온저장)을 각각 달리하였으며, 습윤층적은 종자를 망사자루에 넣어 습윤한 모래 상자 내에서 각 층적 온도별로 90일간 저장 후 실시하였다.

노천매장은 종자를 습윤한 모래와 섞어 망사자루에 넣은 후 땅속 50cm 깊이에 묻어 120일간 경과한 후 발아시험을 하였다. 변온저장은 실내 상온과 0℃를 3일 간격으로 90일 동안 반복 처리하였는데 화학약품으로는 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)과 치아염소산나트륨(NaOCl)을 사용하였고, 황산 용액의 처리농도는 50, 70, 90%, 침지 시간은 5, 10, 20분이었으며, 치아염소산나트륨 용액은 처리농도를 100, 200, 400ppm으로 침지시간은 20분이었다. 발아조건은 암상태 및 광(300 lux) 조건하에서 온도 5, 10, 25, 35±1℃로 Multiroom incubator(대한과학, LMI3004PL)에서 실시하였다.

공시된 종자는 치상시 70%의 에탄올에 30초, 1% NaOCl에 10분간 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 직경 9cm의 Petridish에 여과지 2매를 깔고 3ml의 멸균수를 넣어 적습상태를 유지시킨 다음 처리당 50립씩 3반복으로 치상하여 일정기간별로 발아율을 조사하였다.

발아율 조사는 유근이 2mm정도일 때 발아되는 것을 대상으로 조사하였으며, 시험결과의 통계분석은 Duncan의 다중검정법으로 하였다.

## 나. 마가목의 實生 育苗技術

본 시험은 2000부터 2001년까지 2개년간 강원도농업기술원 유리온실에서 수행하였으며, 산마가목 종자를 수확 후 습윤층적 150일 후 BA 200ppm 용액에 20분간 침지하여 10일 동안 최아시킨 후 시험재료로 사용하였다. 실생육묘 방법은 육묘상직과, 상자육묘(70×35×10cm), 49공 Pot육묘였으며, 파종 후 50일간 육묘하면서 묘소질을 조사하였고, 직과와 상자육묘의 파종 간격은 7×5cm였다. 조사항목은 온실내 온·습도, 출현기, 출현율, 초장, 근장, 건엽중과 건근중을 조사하였다.

## 다. 시비량 설정시험

본 시험은 마가목 1년생 묘목을 시험 재료로 하여 해발 750m의 고원농업시험장 포장에서 시비량 및 피복재료별 시험을 수행하였다. 묘목을 재식거리 30×20cm, 구당면적을 2.5m×1m, 난괴법 3반복으로 토양의 비옥도가 다소 낮은 사양토에서 4월17일에 정식하였다. 비료 수준은 질소 5, 10, 15kg/10a, 인산 5, 10, 15kg/10a, 칼륨 5, 10, 15kg/10a하였으며, 질소는 기비50%, 추비 25%(2회분시) 인산은 전량기비, 칼륨은 기비 70%, 추비 30%, 퇴비는 2,000kg/10a를 사용하였다.

시험 전 토양의 화학적 성질을 보면 Ca함량은 6.56cmol(+)kg<sup>-1</sup>으로 일반적인 밭작물 재배에 적절한 수준이었으나 그 이외의 양분 함량은 적정치에 비하여 많이 부족한 경향이였다. 시비적량은 시비수준별 수량에서 시비량과 수량과의 관계인 2차 회귀곡선을 도출하고 최고 수량에서 10%를 감한 양으로 정하였다.

생육조사는 농촌진흥청 농사시험연구 조사기준을 준용하였고 토양은 시료채취 후 음건하여 2mm체로 친 후 분석하였다. pH와 EC는 시료:물을 1:5로 하여 pH, EC메타로 측정하였고, 유기물은 Tturin법, 인산은 Lancaster법, 양이온은 NH<sub>4</sub>OAc로 침출한 후 ICP로 측정하였다.

## 라. 피복효과 시험

피복재료로 벚짚, 톱밥, 투명필름(Polyethylene), 흑색필름 등 네 가지 처리로

2.5m×1m두둑을 작성한 후 투명 및 흑색필름을 피복하였다. 톱밥과 벚짚은 토양 표면이 보이지 않게 1~1.5cm정도 덮었다. 온도조사는 수은 온도계를 지표에서 10cm깊이로 매설하고 오전 10시와 오후 2시에 측정하였다.

#### 마. 전정효과 시험

시험에 사용된 묘목은 실생묘 2년 차에 지상부 30cm를 절단한 묘목을 사용하였으며 분지수가 많은 묘목과 적은 묘목을 구분하여 시험을 수행하였다.

#### 바. 병해충 조사

본 시험은 마가목 1년생 묘목을 시험 재료로 하여 해발 750m의 고원농업시험장 포장에서 3월 26일에 묘목을 재식거리 30×20cm, 구당면적을 2.5m×1m로 정식하여 생육기간 동안 농사시험연구조사기준(농촌진흥청)에 의거 병해충을 관찰하였다.

#### 사. 우량묘 선발

시험에 사용된 묘목은 실생묘 1년 차에 생육이 왕성한 건전주를 집단선발법에 의해 수집한 개체를 2년 차에 재식거리 30×20cm, 구당면적을 2.5m×1m로 정식 후 농사시험연구조사기준(농촌진흥청)에 의거 생육을 관찰하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 마가목과 種子의 發芽率 提高

#### 가. 증적온도 및 발아온도에 따른 발아특성

1999년 강원도 평창군에서 채취한 마가목의 과실특성은 표1과 같이 과실은 성숙기에 붉은 적색을 나타냈고, 생체 중은 3.2 정도 더 컸으며, 1과실당 종실수는 마가목이 3.2개였다. 마가목 과실은 수확 후 물에 2일정도 침지한 후 건져서 망사자루에 넣은 다음 두 손으로 비벼 과육과 과피를 분리하여 흐르는 물에 씻어 종자를 얻었고, 두 종자는 공히 시험재료로 사용하기 전 습윤한 상태로 유지하여 마르지 않도록 하였다.

증적저장시 최적의 온도를 구명하기 위해 증적온도를 0℃부터 8℃ 범위내에서 4처리로 증적 저장한 후 발아온도를 8℃로 하여 발아시험을 한 결과(표2), 0℃ 증적저장시에는 전혀 발아가 되지 않았고 3℃는 14%, 5℃는 17%, 8℃는 15%로 5℃에서 가장 높은 발아율을 보였다. 그리고 5℃로 증적 저장된 재료를 가지고 발아온도를 5℃부터 35℃까지 4수준으로 한 결과 15℃이상의 온도에서는 발아율이 5% 미만으로 저조하였으나, 5℃ 에서는 22%의 발아율을 보여 마가목 종자는 저온에서 발아가 유기 되는 것으로 나타났다. 즉 마가목 종자는 저온증적 저장 중 배의 후숙이 이루어진 후 낮은 온도에서 발아가 촉진되었다

종자가 발아에 미치는 요인은 온도, 수분, 종자성숙도, 배의 후숙, 발아억제물질 등의 여러 요인(Chung et, 1994)들이 작용하는데 증적처리는 후숙에 의한 영향으로 발아가 촉진된 것으로 사료되었다. 마가목 종자는 저온인 5℃에서 습윤증직한 처리에서 발아율이 높았는데 이것은 숙단 등의 산채 11종의 발아에 농가냉장고 조건(4℃) 처리가 40%이상 발아촉진 효과가 있다는 Park et(1998)의 결과와 비슷하였다.

Table 1. Characteristics of two fruits native plant used in this experiment.

Native plant	Collecting date	Collecting site	Fruit color	Fruit wt. (g/100)	Fruit width (mm)	Seed wt. (g/100)	Seeds/fruit
<i>Sorbus commixta</i> Hedl	15 Oct.	Peong chang Jin-bu	Red	15.5	6.7	0.23	3.2

Table 2. The stacking temperature and germination rate at every germination temperature of *Sorbus commixta* Hedl seed.

Wet stacking temperature (°C)	Germination rate (%)	Remark	Germination temp. (°C)	Germination rate (%)	Remark
0	0	Germination rate : 8°C	5	22	Stacking temperature : 5°C
3	14	Wet stacking period : 90 date	15	5	Wet stacking period : 90 date
5	17		25	2	
8	15		35	1	

그리고 발아최적온도는 저온 층적저장 온도인 5℃에서 발아율이 가장 높았는데, 초피나무의 종자 발아온도로 20℃에 적용한 Kim 등(1996)의 보고와는 다르게 마가목은 저온에서 발아율이 높은 특성을 나타내었다. 관행적인 목본류의 종자발아는 노천매장이나 습윤층적 후 이른봄 육묘상에 파종하거나, 전년도 가을 종자 수확 후 본포에 바로 파종하여 겨울을 지낸 후 봄에 자연발아 시키는 것으로서 저온 경과 후 봄에 온도가 올라감에 따라서 종자가 휴면이 타파하여 발아하는 것으로 알려져 있다.

#### 나. 저장방법에 의한 발아율의 변화

종자의 발아는 종자 자체의 발아능력과 파종된 지점의 환경에 따라, 많은 요인의 영향을 받으며, 종자 자체의 발아능력은 자발적 휴면과 파종 후 환경조건 등과 밀접한 관계가 있다. 휴면타파를 위한 온도처리(Kang et, 1997)로 항온, 일중변온과 같은 발아온도의 조절과 발아 전 온도처리가 있는데, 저온처리는 처리가 간편하기 때문에 농가에서 많이 이용되고 있으나 효율적인 처리는 종마다 다른 것으로 보고되고 있다. 마가목 종자의 휴면을 타파하기 위한 방법으로 습윤층적과 노천매장을 하였고, 또한 마가목 열매의 과육이 휴면에 미치는 영향을 조사하였다.(표 3). 저장방법에 관계없이 과육이 포함된 경우 발아율이 떨어져서 과육에 발아억제 물질이 존재하는 것으로 추측되었고, 습윤층적 보다는 노천매장시에 발아율이 가장 높아서 과육을 제거한 후 노천매장 하였을 경우 40%의 발아율을 나타내었다. 마가목 종자는 저온 처리시 항온보다는 온도조절이 휴면타파에 큰 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

#### 다. 화학약품 처리가 마가목 종자 발아에 미치는 영향

많은 종자에서 종피의 일부를 제거시키거나 부숙시켜 투수성을 높여 발아를 촉진하는 화학약품으로는 치아염소나트륨(NaOCl), 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 염산, 아세톤, 알콜 등이 이용되고 있다 (Choi and Kang, 1984). 이들 약품 가운데 황산과 치아염소산나트륨을 마가목 종자에 처리한 결과(표4), 황산에 의한 영향은 적으나, 치아염소산화나트륨에 의한 영향이 나타나서 치아염소산화나트륨 4%로의 용액에 10분간 침지 하였을 때 47%의 가장 높은 발아율을 보였으며, 4%로 40분간 침지 하였을 때는 발아가 전혀 되지 않아 오히려 역효과를 나타내어 화학약품 처리시에는 농도 및 침지시간에 각별히 유의해야 할 것으로 사료되었다.

Table 3. Germination rate of *Sorbus commixta* Hedl seed according to storage method

Storage method	Sarcocarp	Germination rate(%)
Wet stacking	deleted	14
	contains	4
Storage in ground	deleted	40
	contains	34
Alternating temperature storage※	deleted	40
	contains	0

※ 0°C ↔ atmosphere

Table 4. Germination rate of *Sorbus commixta* Hedl seed by chemical reagent treatment.

Treatment	Concentration (%)	Soaking time			
		5	10	20	40
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	18	24	24	-
	5	8	26	20	-
	10	28	17	24	-
NaOCl	1	-	18	31	35
	2	-	26	45	37
	4	-	47	41	0

#### 라. 생장조절제 처리가 마가목 종자 발아에 미치는 영향

일반적으로 종자의 휴면을 타파하여 발아율을 높이는 데는  $GA_3$ 가 효과적인 것으로 알려져 있는데 고추냉이의 종자 휴면타파에 BA와 Kinetin이  $GA_3$ 보다 더 효과적이라고 보고된 바 있으나, 미숙배의 생장에는  $GA_3$ 가 그리고 성숙배의 생리적 미숙에는 저온이나 BA가 더 효과적인 것으로 알려져 있다. 마가목 종자 발아에 BA와  $GA_3$ 가 미치는 영향을 구명하기 위해서 각각의 농도별로 20분간 침지한 후 발아시험을 실시한 결과는 표 5에서 보는바와 같이  $GA_3$ 는 200ppm 처리시 발아율이 35%로 100ppm과 400ppm처리보다 높게 나타났으며 두 생장조절제 간의 비교에서도  $GA_3$ 보다 BA 처리가 마가목의 발아율 향상에 영향이 큰 것으로 나타났다.

Table 5. Germination rate of *Sorbus commixta* Hedl seed by growth reagent treatment.

Treatment	Concentration (ppm)		
	100	200	400
GA <sub>3</sub>	19	35	17
BA	74	78	63

## 2. 마가목의 實生 育苗技術

마가목의 대량번식 기술개발을 위하여 실생종자를 이용한 발아율 제고와 육묘 방법 개선 시험을 실시하게 되었다. 지금까지는 가을에 종자를 수확한 후 밭이나 비닐하우스에 파종하여 이듬해 20~30%만 발아되어 출아된 육묘를 생산하거나, 종자를 망사자루에 넣어 노천매장하여 2년 후에 본밭에 파종하는 것이 일반적인 방법이었다. 그러나 실생종자 육묘기술은 가을에 수확한 종자를 망사자루에 넣어 저온 습윤층적하여 최아파종 후 이용하는데 이러한 기술은 지금까지의 관행에서 발생되는 낮은 발아율과 습윤작업에 의한 육묘의 손실을 방지할 수 있고, 또한 균일묘 생산 및 연중 묘목 생산을 가능하게 하였다.

### 가. 육묘방법별 출현기 및 출현율

파종은 최아파종 방법을 이용하였으며, 최아파종시 유근의 길이는 0.3-0.8cm 정도였다. 출현율은 최아파종 5-6일 후 처리별로 약간의 차이는 있었으나, 모두 양호한 결과를 얻었으며, 상자육묘시 최고 95.5%의 출현율을 보였다(표 6).

### 나. 육묘방법별 생육량 변화

육묘방법에 따른 육묘일수별 지상부 및 지하부의 생육량을 표 7과 그림 1, 2에서 보는바와 같이 초장은 상자 및 포트육묘시 길었고, 근장은 포트육묘에서 양호하였다. 초장은 상자육묘 50일 때 9.1cm, 근장은 49공 포트육묘 50일 때 9.7cm로 가장 길었고. 육묘일수별로는 초장은 30일에서 40일 육묘시 길었고, 근장은 40일에서 50일 육묘시 증가량이 컸다. 육묘 후 이식해야 하는 작업상의 절차가 있기 때문에 근생육이 우수하고 메트 형성율이 좋아야 이식 후 활착율이 높아지므로 상자육묘방법 보다는 49공 포트 육묘방법이 좋을 것으로 사료되었으며, 적정 육묘 기간은 뿌리 발달이 육묘 시작 후 50일에 크게 증가하나 육묘 시기 및 육묘 장소에 따라서 생육정도가 다르므로 약 40-50일 정도 육묘 후 이식하면 양호할 것으로 사료되었다.

Table 6. Emergence at every growing seedling methods.

Growing seedling methods	Sowing date of sprouted seed	Emergence date	Emergence rate(%)
Direct seeding on seed bed	5. 5	5. 1	89.9
Seedling box growing seeding	5. 5	5. 9	95.5
Pot growing seedling)	5. 5	5. 9	93.2

Table 7. Growth patterns at every growing seedling method and cultivation terms.

Growing seedling method	Height(cm/plant)			Root lenth(cm/plant)		
	30days	40days	50days	30days	40days	50days
Direct seeding and seed bed	2.4	3.0	3.9	2.7	3.7	5.1
Seedling box growing seeding	4.6	6.1	9.1	4.0	4.5	6.4
Pot growing seeding (49holes)	4.9	7.1	78.0	5.2	5.9	9.7

7 J : BA 200ppm 20min.the immersion

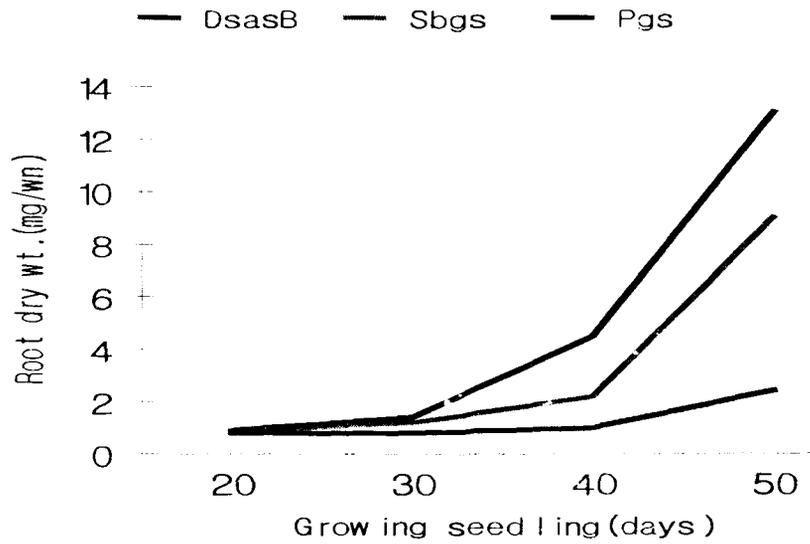


Fig 1. The difference of leaf dry weight at every growing seedling method

- \* DsasB : Direct seeding and seed Bed
- Sbgs : Seedling box growing seedling
- Pgs : Pot growing seeding(49 holes)

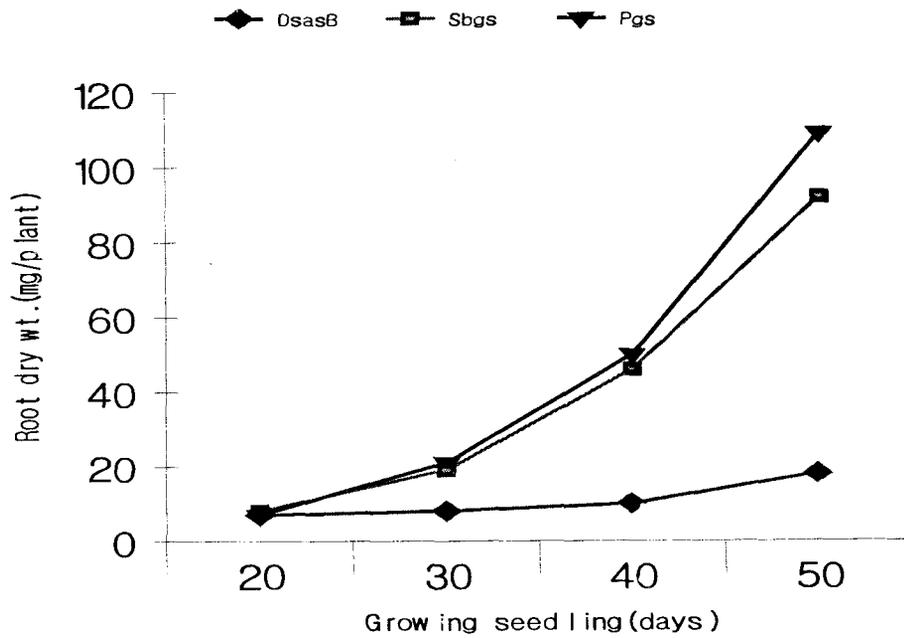


Fig 2. The difference of root dry weight at every growing seedling method

- \* DsasB : Direct seeding and seed Bed\*
- SbgS : Seedling box growing seedling
- Pgs : Pot growing seeding(49 holes)

표 8는 육묘방법별로 60일간 육묘한 마가목 육묘를 포장에 정식하여 생육량의 변화를 살펴본 것으로 60일간 육묘하여 생육량이 좋았던 처리는 상자육묘와 포트육묘였는데 이러한 묘를 포장에 정식한 후 10일, 60일, 110일에 3회로 나누어 그 생육량의 차이를 조사한 결과, 수고, 분지수, 수경 등 이 포트육묘한 처리에서 가장 양호하여 육묘방법의 차이가 정식 후 생육량 변화에 영향을 준 것으로 나타났다. 육묘 보다 높았으며, 결과적으로 마가목의 실생육묘시 포트육묘로 50일 재배 후 이식하는 것이 가장 양호하였다.

Table 8. Growing patterns after planting at growing seedling method.

Growing days	Growing seedling method	Height(cm)	No.of branch	Stem width(mm)
10	Direct seeding and seed bed	4.7	4.7	-
	Seedling box growing seeding	4.6	4.9	-
	Pot growing seeding	4.8	4.7	-
60	Direct seeding and seed bed	18.8	8.5	-
	Seedling box growing seeding	25.3	10.0	-
	Pot growing seeding	27.8	10.2	-
110	Direct seeding and seed bed	22.4	8.0	5.4
	Seedling box growing seeding	31.1	9.6	6.1
	Pot growing seeding	37.2	10.1	6.2

### 3. 마가목의 표준재배법

#### 가. 시비량 설정연구

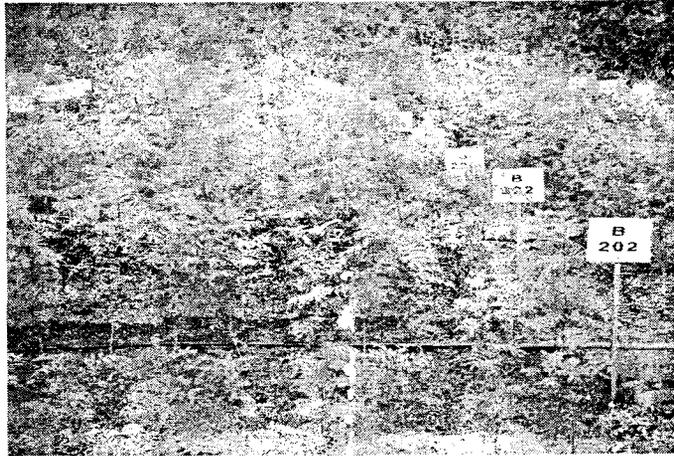
시험포장은 포장조성 4년 차로 토양 비옥도가 매우 낮은 상태이다. 토양 산도, Ca, K은 적정함량에 근접하고 있지만 유기물, Mg, 인산의 함량은 매우 부족한 경향이 있다.

표 9 는 4월 17일에 본포에 정식하여 약 95일간의 생육상황을 살펴보면 질소 무비구에서는 초장이 38.7cm, 질소 시비량 10kg/10에서 60.4cm로 최대 생육상황을 보이고 있으며, 15kg/10a에서는 57.6cm로 생육이 떨어졌으나, 신초장과 신초경, 분지수는 시비량이 증가함에 따라 증가하는 경향이다. 인산 시비량에 따른 초장은 인산 무비구 46.2cm, 15kg/10a에서 63.1cm로 시비량이 증가함에 따라 초장도 커지는 경향으로 마가목의 생육에 있어 인산의 요구도가 큰 것으로 생각된다. 신초장과 신초경, 분지수는 질소와 마찬가지로 인산 시비량이 증가함에 따라 증가하였다. 칼륨에 대한 생육반응은 5kg/10a에서 초장이 63.1cm로 최대 생육을 보이고 있으며, 시비량이 증가함에 따라 초장이 작아지는 경향을 나타내고 있으며, 신초장 및 신초경, 분지수도 같은 경향을 나타내고 있다.

비중에 따른 시비곡선 반응식은 질소  $Y = -0.151 \times 2 + 3.5833 \times + 38.26$ , 인산  $Y = -0.0536 \times 2 + 1.8753 \times + 44.172$ , 칼륨  $Y = -0.1408 \times 2 + 2.6209 \times + 50.908$ 으로 시비추천량은 질소 12.6kg/10a, 인산 17.5kg/10a, 칼륨 10.7kg/10a로 나타났으며, 구기자 : 14-10-14kg/10a, 두충 : 12-12-9kg/10a에 비하여 인산의 요구도가 커서 추후 인산 시비량에 대한 정밀한 검정이 필요한 것으로 사료된다.

표 11은 1차 추비 15일후 토양을 분석한 것으로 질소의 함량은 무비구에서 4,84mgkg<sup>-1</sup>, 15kg/10a 시용구에서 6.54mgkg<sup>-1</sup>로 나타났으나, 처리 수준간에 일정한 경향을 나타내지 않았다. 이는 질산태 질소가 매우 유동적으로 용탈과 분석에 의한 오차가 다소 있는 것으로 사료된다. 인산은 무비구 289mgkg<sup>-1</sup>, 15kg/10a 시용구에서 392mgkg<sup>-1</sup>로 처리간에 뚜렷한 경향을 나타내고 있다. 토양중의 칼륨의 함량도 인산과 마찬가지로 시

비수준에 따라 일정한 경향을 보이고 있다.



( 비료시험 )

표 9 생육중기 처리별 생육상황.

구 분	초장(cm)	신초장(cm)	신초경(cm)	분지수(개)
000	32.7	11.5	0.37	2.1
022	38.7	18	0.39	1.7
122	51.0	29.9	0.43	2.0
222	60.4	34.9	0.46	2.2
322	57.6	41.6	0.49	2.3
202	46.2	25.2	0.43	2.1
212	49.4	28.7	0.47	2.1
232	59.4	36.8	0.501	2.4
220	50.0	30.6	0.44	2.3
221	63.1	40.0	0.49	2.4
223	59.4	37.5	0.48	2.3

표 10 비종에 따른 시비반응곡선식

(단위 : kg/10a)

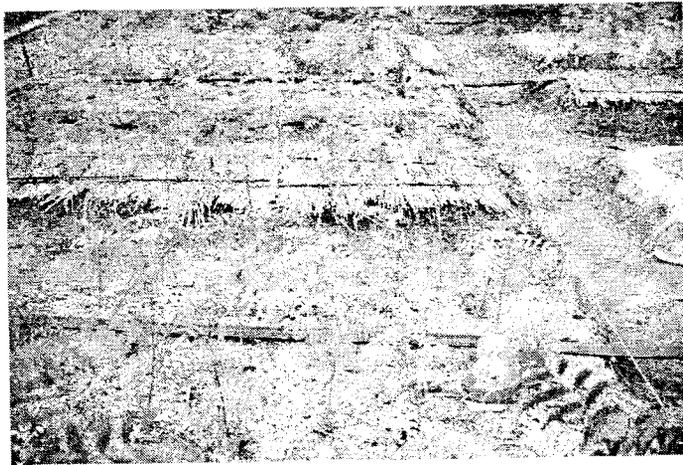
구분	시비반응곡선식	추천시비량	비 고
N	$Y = -0.151 \times 2 + 3.5833 \times + 38.26$	12.6	R2=0.98**
P	$Y = -0.0536 \times 2 + 1.8753 \times + 44.172$	17.5	R2=0.92**
K	$Y = -0.1408 \times 2 + 2.6209 \times + 50.908$	10.7	R2=0.84*

표 11. 토양화학적 성질

구분	pH (1:5)	O.M. gkg-1	P2O5 mgkg-1	K Exch.cation	Ca cmol(+)kg-1	Mg	EC dSm-1	NO3--N mgkg-1
022	6.4	11.4	311	0.56	6.63	1.47	0.14	4.84
122	6.2	15.4	394	0.66	6.48	1.47	0.20	6.71
222	6.4	14.7	338	0.69	7.26	1.61	0.20	4.90
322	6.5	15.8	391	0.72	7.21	1.47	0.21	6.54
202	6.7	21.7	289	0.72	7.29	1.58	0.23	5.83
212	6.4	13.5	297	0.69	7.61	1.56	0.18	7.70
232	6.4	13.8	392	0.60	7.23	1.59	0.19	5.77
220	6.2	0.21	358	0.53	7.46	1.58	0.21	9.63
221	6.1	11.6	423	0.51	7.19	1.68	0.18	3.85
223	6.4	16.6	336	0.78	6.59	1.36	0.22	5.66

## 나. 피복효과 시험

표 12는 토양피복에 따른 마가목 생육상황으로 초장은 톱밥이 28.4cm, 볏짚 35.4cm, 흑색비닐 39.6cm, 투명비닐 41.9cm로 나타났으며, 신초장, 신초경도 톱밥, 볏짚, 흑색비닐, 투명비닐의 순으로 증가하였다. 이는 그림 3 에서 보는바와 같이 피복 재료에 따른 토양내 온도차이에 기인한 것으로 사료된다. 토양온도는 볏짚이 평균 18.5℃로 가장 낮았고 흑색비닐은 23.2℃로 가장 높았다. 5월중의 토양온도는 처리간 차이가 크나 7월중의 토양온도는 처리간 차이가 작게 나타났는데 이는 7월중 맑은 날 일수가 약 6일로 온도상승이 적은 것으로 사료된다. 일반적으로 흑색비닐 멀칭보다 투명비닐 멀칭이 토양온도 상승을 높이는데 효과적이나 본 시험에서는 비가 자주 오고 흐린 날이 많고 기온이 낮아 토양온도 상승이 적은 것으로 사료된다.



( 피복재료 시험 )

표 12 피복재료별 생육상황

구 분	초장(cm)	신초장(cm)	신초경(cm)	분지수(개)
투명비닐	41.9	24.1	0.39	1.7
흑색비닐	39.6	20.9	0.38	1.7
벗 짚	35.4	19.3	0.36	1.9
톱 밭	28.4	11.4	0.30	1.8

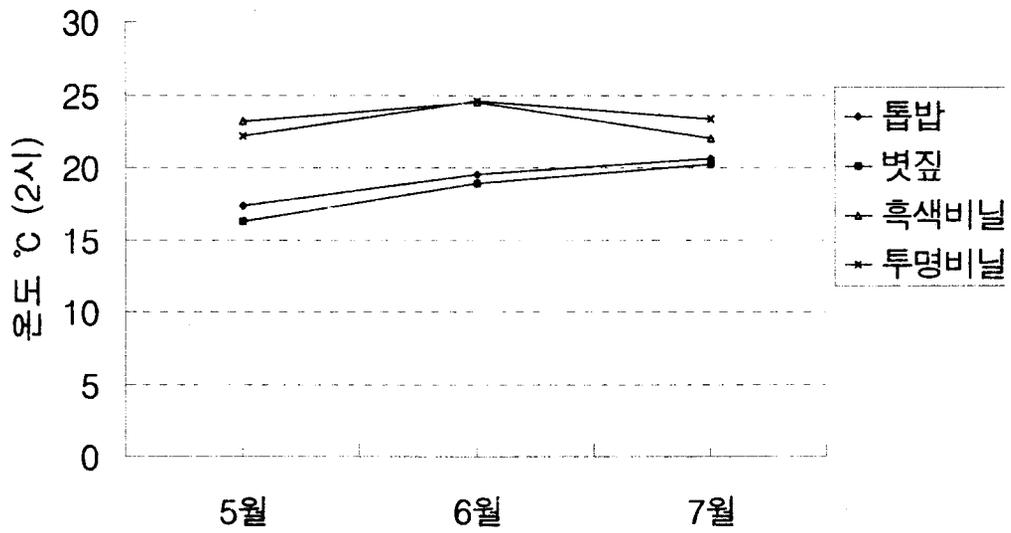


그림 3 피복재료별 온도변화

#### 다. 전정 효과시험

표 13은 전정에 따른 생육상황으로 무전정 가지무 처리는 초장이 66.3cm, 전정 가지무 처리는 초장이 59.2cm로 전정시 약 7.1cm가 적었고 신초 및 신초경도 무전정 보다 작았다. 무전정이 무전정 가지유 처리와 전정 가지유 처리도 같은 경향을 나타내고 있으며, 분지수도 전정이 평균 4.2개, 무전정이 4.8개로 무전정이 생육이 왕성한 것으로 나타났으며, 이는 식물체의 정단부가 제거되면서 생육이 억제된 것으로 사료된다.

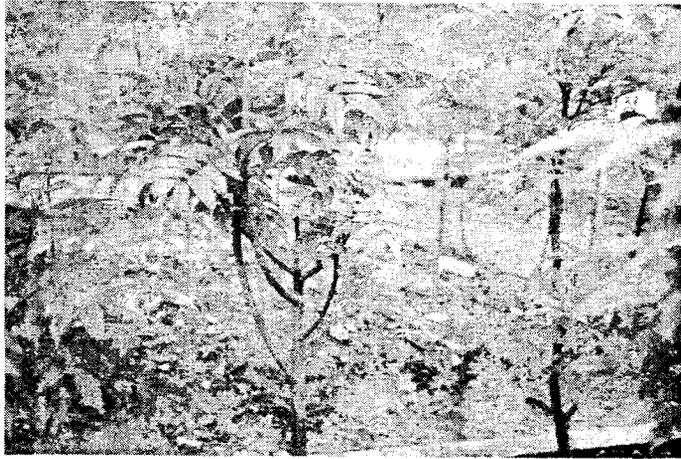
#### 라. 병해충 조사

본포 정식 후 진딧물이 현재까지 2회 발생되어 적기에 진딧물을 방제하면 생육에 지장이 없었으며, 진딧물은 주로 생장점을 가해하였으며, 피해를 입은 개체도 약제방제 후 일정 시간이 경과되면 정상적인 성장을 하였음.

비료의 처리별 병해충에 의한 피해주율을 조사한 결과 충해의 경우는 000 처리가 , 반점의 경우는 322 처리가, 황화의 경우는 212 처리가 각각 8.3%, 13.9%, 14.8%로 가장 높았다.

#### 마. 우량묘 선발

우량종묘선발 시험결과, 표 15와 같이 초장은 AP03이, 경경은 AP06이, 분지수는 AP04가, 분지길이는 AP03이, 분지높이도 AP03이 가장 우수한 특성을 보였다. 전체적으로 AP03과 AP13이 다른 종묘들에 비하여 초장, 경경, 분지수, 분지길이, 분지높이 등 모든 조사 항목에서 비교적 우수한 생육특성을 보였다.



( 전정 된 마가목 모습 )



( 전정 시험 )

표 13 마가목 전정에 따른 생육상황

구 분	초장(cm)	신초(cm)	신초경(cm)	분지수(개)
전정 가지무	59.2	18.1	0.47	3.3
	가지유	52.8	16.7	0.44
무전정 가지무	66.3	27.3	0.57	4.3
	가지유	54.7	18.9	0.46

표 14 처리별 생육상황

처리	발병주율(%)			비 고
	충 해	반 점	황 화	
000	8.3	12.0	9.3	
022	6.5	10.2	10.2	
122	5.6	10.2	11.1	
222	6.5	9.3	10.2	
322	7.4	13.9	9.3	
202	5.6	10.2	8.3	
212	7.4	10.2	14.8	
232	7.4	9.3	7.4	
220	5.6	10.2	12.0	
221	6.5	9.3	13.9	
223	6.5	7.4	12.0	

표 15 우량종묘 생육특성

구분	초장 (cm)	경경 (cm)	분지수 (개)	분지길이 (cm)	분지높이 (cm)	비고
AP01	132	1.2	4	46.8	12	
AP02	154	1.2	0	0	0	
AP03	165	1.2	3	87.0	36	
AP04	148	1.6	10	44.7	2	
AP05	144	1.2	4	38.8	29	
AP06	159	1.5	4	82.5	31	
AP07	165	1.2	2	68.0	22	
AP08	124	1.0	2	48.5	31	
AP09	133	1.3	2	87.0	33	
AP010	160	1.2	3	42.0	30	앞마름현상발생
AP11	143	1.1	4	46.0	34	
AP12	152	1.2	2	70.0	32	
AP13	169	1.2	7	47.9	35	
AP14	112	1.1	4	30.0	11	앞마름현상발생
AP15	162	1.3	5	44.6	42	



< 마가목 재배 시험포 사진 >

## 제 6 장 목표 달성 및 관련 분야에의 기여도

목표	목표달성도 및 관련분야에의 기여도
<p>① 마가목의 생리활성 탐색과 식품개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항돌연변이 항암, 항산화, 간기능, ACE, α-glucosidase</li> <li>- 시제품 개발 및 관능 검사</li> </ul>	<p>마가목 추출물의 돌연변이성, 항돌연변이원성, 항암, 항산화, 간기능, ACE, α-glucosidase의 활성을 측정완료 하였다. 마가목 추출물을 이용한 다류에서 마가목 환, 마가목 청 제품과 음료, 주류에서는 탁주와 약주 및 침출주를 개발하였으며, 스넥류에서는 쿠키와 파이를 개발하였고, 음료와 스넥류에 대해서는 관능검사를 완료함으로서 식품산업체에서 제품개발을 통한 부가가치 창출에 기여</p>
<p>② 마가목의 영양성분 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반성분,지방산, 천연물, 무기물, 비타민, 아미노산, 향기성분 및 항산화 물질 분석과 동물실험을 통한 효능 검증</li> </ul>	<p>마가목의 영양성분(일반성분,지방산,천연물, 무기물, 비타민, 아미노산, 향기성분 및 항산화 물질)을 분석하였고, 추출물을 동물에 급여하여 지질대사 및 항산화 활성 등의 효능이 있음을 확인 완료함으로써 마가목의 기능성 식품재료화에 기여</p>
<p>③ 마가목의 재배법 확립, 우량묘생산, 표준재배법</p>	<p>우량묘 선별 및 시비량, 병충해 조사를 통해 우량묘 생산 기술을 완료하여 마가목의 자원화로 농가소득에 기여하고 재배기술 보급으로 야생식물의 자원화에 기여</p>

## 제 7장 연구 개발결과와 활용계획

- 야생 교목류의 대량 재배 기술 파급
- 마가목의 성분을 이용한 제품 개발 기술
- 마가목의 천연물 성분의 확인
- 마가목의 대량 재배 기술 보급으로 야생식물의 자원화
- 마가목의 자원화로 농업인 경제 활성화
- 마가목의 성분을 이용한 식품 재료화
- 마가목을 이용한 식품제조 기업에 대한 수익으로 기업 경영 개선
- 마가목을 이용한 정원수 이용 및 숲의 관광 자원화
- 마가목의 관광용 수목림 및 정원성 이용 가능성
- 마가목의 대량 재배법을 이용한 야생 유사 자원의 대량 재배기술 확보
- 마가목의 식품 재료화( 기능성 탁주, 침출주, 다류, 음료, 쿠키류 )
- 마가목을 이용한 식품제조 업체의 창업 지원 또는 마가목 이용 희망 기업에 식품제조 기술의 이전
- 석·박사과정 인력양성

## 제 8장 참고 문헌

1. Borisov, M. I. and N. S. Zhuravlev. 1965. Flavonoids of the flowers of *Sorbus aucuparia* L., *Farmatsevychnyi Zhurnal*, 20(3): 50-52
2. Davli, A. I. and G. V. Makarova. 1967. Study of flavonoids of *Sorbus pendula*, *Farmatsevychnyi Zhurnal* 22(1): 50-53
3. Dool, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today., *J. Natl. Cancer Inst.*, 66(6) : 1192,
4. Doyle, A., J. B. Griffiths, and D. G. Newell. 1993. *Cell & Tissue culture : Laboratory procedures.*, Wiley.
5. Hirano, K., yT. Hagiwara. Y. Ohta, H. Masumoto, T., Kada. 1982. Rec-assay with spores of Bacillus with and without metabolic activation. *Mut. Res.*, 97 : 339-347,
6. Kada, T., M. Moriya, Y. Shirasu. 1974. Screening of pesticides for DNA interaction by rec-assay and mutagenesis testing, and framshift mutagens detected. *Mut Res.*, 26 : 243-248,
7. Maron, D. M. and B. N. Ames 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation res.* 113 : 173
8. Micael, C. A., A. S. Domic and M. Anne. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay., *Cancer Res.*, 48 : 589-601.
9. Moon, S. H., J. O., Kim. S. H. Rhee. K. Y. Park. K. H. Kim. and T. H. Rhew. 1993. Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22: 334,
10. 김창은, 이승무, 조영일, 탁현기. 1972. 국산 건조마가목 열매로부터 Sorbic Acid 의 분리에 관한 연구 한국식품과학회지, 4(1) : 1-5.
11. 박동기, 임병우, 신홍묵. 2000. 황금, 정향, 화피 및 마가목으로부터 분리된 BuOH 분획이 항체생산능, 지질 대사 및 지질 과산화에 미치는 영향. 동의병리학

- 회지, 14(1): 171-182
12. **Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NI (1999)** Isolation and structure determination of antioxidants from the root *Paeonia lactiflora*. J. Korea Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42(2): 170-175
  13. **Boyd MR (1989)** Status of implementation of the NCI human tumor cell line *in vitro* primary drug screen. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 30: 562-568
  14. **Choi BH, Kang KH (1984)** Principles of seed science and technology. Hongikjae. p384.
  15. **Chung HG, Seong NS, Chae JC (1994)** Effect of seed condition, grain period and cold stratification treatment on germination of *Bupleurum falcatum*. L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2(1): 32-37
  16. **Chung IM, Kim KH, Ahn JS, An SC (1999)** Screening of Korean medicinal and food plants with antitumor activity. Korean J. Medicinal Crop Sci. 7(1): 37-44.
  17. **Kang JH, Park JS, Ryu YS (1997)** Effect of prechilling, light quality and daily irradiation hours on seed germination in three Campanulid plants. Korean J. Medicinal Crop Sci. 5(2): 131-138
  18. **Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY (1995)** Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1): 80-85
  19. **Kim IJ (2002)** The research and extension. R.D.A. 43(2) : 22-24
  20. **Kim SJ, Shin JH, Kim KJ, Park SD, Choi BS, Kim KU (1997)** Effect of GA<sub>3</sub>, Kinetin and physical treatment on the seed germination of *Zanthoxylum piperitum* A.P. DC. Korean J. Medicinal Crop Sci. 5(1) : 43-48.
  21. **Kwon OJ (2001)** Landscaping tree. Korean Landscaping Tree Association. 63: 8-15
  22. **Nam SH, Yang MS (1995)** Isolation of cytotoxic substance from *Chrysanthemum boreale* M. Agricultural Chemistry and Biotechnology 38(3): 273-277.
  23. **Park IK, Lee JO, Seol KY, Ahn YJ (1998)** Cytotoxic activity of Bombyx mori and Morus alba derived materials against human tumor cell lines. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 41(2):187-190
  24. **Park KW, Lee GP, Jeong JC (1998)** Seed morphology of thirty Korean wild green

- species effect of seed straction on germination. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39(2): 129-134.
25. **Ryu SY, Zee OP (1992)** An antitumor activity of psoralea corylifolia. Arch. Pharm. Res. 15: 356-360
  26. **Song JC, Park NK, Hur HS, Bang MH, Back NI (2000)** Examination and isolation of natural antioxdants from korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci. 8(2): 94-10
  27. **Alordmann R, Ribierre C, Rouach H (1990)** Ethanol induced Aicohol. 25:231-237
  28. **American Institute of Nutrition (1977)** Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. J. nutr., 107:1340
  29. **Borisov MI, Zhuravlev NS (1965)** Flavonoids of the flowers of *Sorbus aucuparia* L. Famatsevtychnyi Zhurnal. 20(3):50-52
  30. **Fletcher MJ (1968)** A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin. Chm. Acta., 22:393
  31. **Folch J, lees M, Sloane-Stanley GH (1957)** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226:497
  32. **Kim BN, Kim JD, Ham SS, Choi YS, Lee SY (1995)** Effects of spice added Natto supplementation on the lipid metabolism in rats. J.Korean Soc, Food Nutr., 24:121
  33. **Kim HW (1998)** Screening of antioxidants from *Sorbus commixta* Hedund and determination of its antioxidant activity. Kon-Kuk University.
  34. **Lee MK, Lee HY, Lee JH, Oh JS, Kim JD (2002)** Anticancer effect of *Sorbus commixta* Hedl. extracts. Korean J. Medicinal Crop Sci., 10(5):403-408
  35. **Lee SM, Kim CE, Joe YI, Tahk HK (1972)** Isolation of sorbic acid from the mountain ash berries. Korean J. Food SCI. Technology, 4(1):1-5
  36. **Lim BU, Park DK, Shin HM, Kim SH (2000)** Effects of BuOH fractions isolated from *Scutellaria baicalensis*, *Euginia aromaticz*, *Sorbus commixta*, *Betula mandshrica* on anticody productivity, metabolism of unsaturated fatty acid and lipid hydroperoxides. Korean J. Oriental Medical Pathology, 14(1):171-182

37. **Plaa GI, Witschi H** (1976) Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16:125-131
38. **Roelof DM, Hielke DV, Jan FC** (1985) t-Butanol extraction of feces : A rapid procedure for enzyme determination of fecal bile acids. *Cholesterol metabolism in health and disease*, 1:113
39. **Rouser G, Siakotos AN, Fleisher S** (1966) Quantitative analysis of phosphorus analysis of sopts. *Lipids*, 1:85
40. **Song YM, Tak YJ** (1993) Factors related to serum total cholesterol. *J. Korean Acad. Fam Med.*, 13(12):935-942
41. **Sperry WM and Webb M** (1950) A revision of the Schoenheimer-Sperry method of cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 187:97