creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000276311

2014年 8月 碩士學位論文 야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)부위별 추출물의 생리활성에 관한 연구 朴 正 勳

2014年 8月

碩士學位 論文

야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.) 부위별 추출물의 생리활성에 관한 연구

朝鮮大學校 大學院

生 命 科 學 科

朴 正 勳

야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.) 부위별 추출물의 생리활성에 관한 연구

A study on physiological activity of extracts in different organs from *Lactuca indica* L.

2014年　8月　25日

朝鮮大學校　大學院

生命科學科

朴　正　勳

Collection @ chosun

야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.) 부위별 추출물의 생리활성에 관한 연구

指導敎授　朴　鉉　庸

이 論文을 理學 碩士學位申請 論文으로 提出함

2014年 8月

朝鮮大學校 大學院

生命科學科

朴　正　勳

Collection @ chosun

朴正勳의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 敎 授

委 員 朝鮮大學校 敎 授

委 員 朝鮮大學校 敎 授

2014年 5月

朝鮮大學校 大學院

Collection @ chosun

목 차

LIST OF TABLE ····· iii
LIST OF FIGURE ····· iv
ABSTRACT ····· v

1. 서론 ····· 1
2. 실험재료 및 방법 ····· 4
 2.1 재료식물 ····· 4
 2.2 실험방법 ····· 4
  2.2.1 추출물의 제조 ····· 4
  2.2.2 폴리페놀 함량측정 ····· 5
  2.2.3 플라보노이드 함량측정 ····· 5
  2.2.4 항산화 활성능력 측정 ····· 6
   1) DPPH radical 소거활성 ····· 6
   2) ABTS radical 소거활성 ····· 6
   3) 아질산염 소거활성 ····· 7
  2.2.5 항산화효소 활성측정 ····· 8
   1) 효소액의 조제 ····· 8
   2) Super Oxide Dismutase (SOD)의 활성측정 ····· 8
   3) Catalase (CAT)의 활성측정 ····· 10
   4) Ascorbate Peroxidase (APX)의 활성측정 ····· 10
   5) Peroxidase (POX)의 활성측정 ····· 10
  2.2.6 항암 활성 효과 ····· 11
   1) 세포의 배양 ····· 11
   2) 인체 암세포 및 정상세포의 생존율 측정 ····· 11

Collection @ chosun

2.2.7 항균활성 측정 ····· 13
1) 사용균주 및 배지 ····· 13
2) 균주의 배양 및 항균활성 효과 측정 ····· 19
2.2.8 Tyrosinase 활성 저해효과 측정 ····· 20
2.2.9 통계처리 ····· 20
3. 결과 및 고찰 ····· 21
3.1 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량 ····· 21
3.2 항산화 활성능력 ····· 24
3.2.1 DPPH radical 소거활성 ····· 24
3.2.2 ABTS radical 소거활성 ····· 27
3.2.3 아질산 소거활성 ····· 29
3.3 항산화 효소활성 ····· 31
3.4 MTT assay에 의한 인체 암세포 및 정상세포 생존율 ····· 37
3.4.1 암세포 생존율 ····· 37
1) 자궁경부암(HeLa) 세포주의 생존율 ····· 37
2) 폐암(Calu-6) 세포주의 생존율 ····· 39
3) 유방암(MCF-7) 세포주의 생존율 ····· 41
4) 대장암(HCT-116) 세포주의 생존율 ····· 43
5) 후두암(SNU-1066) 세포주의 생존율 ····· 45
3.4.2 신장(HEK293)세포주의 생존율 ····· 47
3.5 항균활성 효과 ····· 50
3.5.1 균주별 항균활성 효과 ····· 50
3.6 Tyrosinase 활성 저해효과 ····· 54
4. 결론 ····· 56
5. 참고문헌 ····· 59

Collection @ chosun

LIST OF TABLE

Table 01. Amount of each solution for sample, blank 1, 2 and 3 ····· 09

Table 02. List of strains and cultivation conditions used for screening of antimicrobial activity test ····· 14

Table 03. Composition of Nutrient Agar ····· 15

Table 04. Composition of YM Agar + 1% Olive oil ····· 16

Table 05. Composition of Brain Heart Infusion Agar ····· 17

Table 06. Composition of Trypticase Soy Agar ····· 18

Table 07. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 23

Table 08. DPPH radical scavenging activities of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 26

Table 09. ABTS radical scavenging activities of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 28

Table 10. Nitrite scavenging activities of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 30

Table 11. The effect of IC_{50} (㎍/㎖) of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on five different cancer cell lines and Human Embryonic Kidney 293(HEK293) cell ····· 49

Table 12. Inhibitory activity against the microorganism by agar diffusion method of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 53

Collection @ chosun

LIST OF FIGURE

Fig 01. The effect of SOD activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 33

Fig 02. The effect of APX activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 34

Fig 03. The effect of CAT activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 35

Fig 04. The effect of POX activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 36

Fig 05. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HeLa cell ····· 38

Fig 06. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on Calu-6 cell ····· 40

Fig 07. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on MCF-7 cell ····· 42

Fig 08. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HCT-116 cell ····· 44

Fig 09. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on SNU-1066 cell ····· 46

Fig 10. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HEK293 cell ····· 48

Fig 11. Inhibitory activity of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* against the microorganism in paper disc diffusion assay ····· 52

Fig 12. Tyrosinase inhibition activity of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* ····· 55

Collection @ chosun

ABSTRACT

A study on physiological activity of extracts in different organs from *Lactuca indica* L.

Park, Jeong-Hun

Advisor: Prof. Park, Hyeon-Yong, Ph.D.

Department of life science,

Graduate School of Chosun University

This study was focused on the physiological activity of *Lactuca indica* L. by parts (root, stem, leaf, flower), by using a methanol extract method from each part (root, stem, leaf, flower) of naturally-grown *Lactuca indica* L. in our region. For the specimen, extract from each part (root, stem, leaf, flower) of *Lactuca indica* L. was used, by using methanol as a solvent.

This research found the following results.

Total polyphenol contents were 13.50 mg/g extract D.W (Dry Weight) for root, 15.44 mg/g extract D.W for stem, 35.09 mg/g extract D.W for leaf, and 12.50 mg/g extract D.W for flower, and total flavonoid contents were 1.43 mg/g extract D.W for root, 5.34 mg/g extract D.W for stem, 26.90 mg/g extract D.W for leaf and 6.20 mg/g extract D.W for flower.

DPPH radical scavenging activities were 10 ㎎/㎖, 32.65% for root, 64.23% for stem, 90.37% for leaf and 32.54% for flower, and the effects were good in the

Collection @ chosun

order of leaf, stem, flower, and then root. Especially DPPH radical scavenging activity of leaf section was 90.37%, which was almost the same level of activating ability as ascorbic acid and butylated hydroxyanisole of the control group.

ABTS radical scavenging activities 20 ㎎/㎖ were 48.22% for root, 45.62% for stem, 99.84% for leaf and 65.32% for flower, and resultingly, the effects were good in the order of leaf, flower, root, and stem.

Nitrite scavenging activities under the condition of pH 1.2 were 55.63% for root, 55.28% for stem, 21.49% for leaf and 21.25% for flower, and under the condition of pH 4.2, 49.85% for root, 42.35% for stem, 12.36% for leaf and 10.33% for flower. As a result, the scavenging ability was remarkably excellent under the condition of pH 1.2 and the effects were good in the order root, stem, leaf, and flower, and in particular, the scavenging ability was not shown under the condition of pH 6.0.

For antioxidant enzyme activity, SOD (superoxide dismutase) activities were 85.05% for root, 89.43% for stem, 90.71% for leaf and 85.40% for flower - in other words, every parts showed high activity, all over 80%. And APX (ascorbate peroxidase) activities were shown as 660.27, 164.55, 88.25, 165.26 μM ascorbate oxidized/min/mg protein, each in the order of root, stem, leaf, and flower. Also catalase enzyme activities were 13.92, 2.77, 4.39, 3.72 μM H_2O_2 decomposed/min/mg protein, each in the order of root, stem, leaf and flower, and to sum those figures up, the root part showed the highest effect of antioxidative enzyme activity. POX (peroxidase) enzyme activities were 3.91, 7.04, 1.03, 5.73 μM tetraguaiacol formed/min/mg protein, each in the order of root, stem, leaf and flower.

Collection @ chosun

For the survival rate of cancer cell and human normal kidney cell (HEK293) by MTT assay, MCF-7 showed the highest anticancer activity as a result of the cell viability measurement by stages, by diluting each extract concentration as 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 400 ㎍/㎖ and 800 ㎍/㎖, and following that, HeLa and SNU-1066 were the second and third ones which showed a good anticancer activity. By contrast, HCT-116 showed inadequate anticancer activity. Human normal kidney cell (HEK293) showed over 80% of cell viability and it was possible to carry out a selective destruction between normal cell and cancer cell.

Regarding six kinds of strain - *Escherichia coli*, *Malassezia furfur*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Salmonella enterica* subsp, *Listeria monocytogenes* – which went through an antibacterial activity test, most extracts from each part of *Lactuca indica* L. showed antibacterial activities, except *Salmonella enterica* subsp and *Listeria monocytogenes*. In contrast with other bacteria, *Salmonella enterica* subsp and *Listeria monocytogenes* showed almost no antibacterial activity.

In case of tyrosinase inhibition activity, the concentrations of sample 5 ㎎/㎖ were 13.17% for root, 14.11% for stem, 19.67% for leaf and 21.01% for flower, and it was concentration dependent. It showed high tyrosinase inhibition activity and especially among all concentrations, an activity inhibition effect of tyrosinase of flower part showed the highest value.

In conclusion, this study indicates that wild *Lactuca indica* L. could be a very important natural resource in the future for health functional food, cosmetic product as well as new medicine development, and it could be used in many ways.

Collection @ chosun

1. 서 론

최근 현대인들의 각종 질병치료 및 미용 등에 관련하여 기존의 병원 치료 외의 천연물질이나 자생식물 등을 이용한 대체요법이 활발하게 연구되고 있으며, 또한 이들 천연물질을 이용한 건강기능성 식품소재들이 많이 개발되고 있다(Park and Lee, 1996; Kim, 2013).

천연물을 이용한 건강 기능성 식품을 개발하기 위해 선과제로 해당 천연물의 효능이나 성분분석 등의 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 이 가운데 항산화와 관련된 건강기능성 식품들이 주를 이루고 있으며 그에 대한 연구 또한 다양하게 이루어지고 있다(농림부, 2003).

활성산소는 체내의 필요한 에너지를 얻기 위한 과정에서 산화반응이 일어나며 유해산소, 프리라디칼(free radical)이라 불리는 산소 유리기 반응성산소종은 산소에서 생성되는 산소 프리라디칼(oxygen free radical: OFR) 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소화합물을 일컬으며 호흡에 의해 체내에 들어온 산소 5% 내외가 활성산소로 바뀌는 것으로 알려져 있다(Halliwell and Gutteridge, 1999). 체내 활성산소의 산화적인 스트레스로 세포 내 구성성분인 단백질, 지질, DNA 성분 등이 제 기능을 하지 못하고 손상되며 생체기능을 저하시켜 여러 질병의 원인으로 지목되고 있다(Halliwell and Gutteridge, 1999; Valko *et al.,* 2007).

활성산소로 인한 질병으로는 암, 백혈병, 뇌혈관 장애(뇌졸중), 심장질환(심근경색, 동맥경화), 폐 경화증, 간염, 신장염, 당뇨병 등으로 아주 다양하며(Li *et al.,* 2000; Pellegrini and Baldari, 2009), 세포손상으로 인한 신체 노화촉진과 자외선 흡수 억제력의 감소로 인한 멜라닌 색소가 형성되며 신진대사가 쇠퇴하고 피부의 주요 구성 물질인 콜라겐을 산화시켜 피부의 탄력을 잃게 하고 주름을 생기게 하여 노화를 촉진시킨다(Aruoma *et al.,* 1991; Li *et al.,* 2000).

Collection @ chosun

우리 인체의 면역체계는 아주 뛰어나 활성산소에 의해 발생되는 세포 변질이나 그 외 질병들을 사전에 방어해주는 기작을 가지고 있는데 이를 인체의 항산화 기능이라 한다.

인체 내에서의 항산화 기능을 하는 항산화 효소는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) 및 catalase (CAT) 등이 있으며(Frei, 1994) 슈퍼옥사이드 라디칼과 과산화수소를 분해하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 체내에서는 모든 활성산소에 대한 퇴치 능력은 한계가 있어 항산화제의 섭취를 통해 활성산소를 제거하도록 해야 하며, 이러한 필요성 때문에 치료와 예방을 위한 항산화 물질의 연구가 활발히 이루어지고 있다(Imai *et al.,* 1994; Rice-Evans *et al.,* 1997).

또한, 오늘날 급속한 경제성장 및 산업발달과 함께 현대사회에서 간편하고 편리함을 추구하는 현대인들의 먹거리를 위해 각종 첨가물을 이용하여 보존기간과 기능을 지속시키기 위한 합성보존료 등이 이용되고 있는 실정이다(Cherry, 1999). 그러나 합성보존료 등에 대한 끊임없는 부작용과 불신 등으로 천연보존료에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있고 실제로 이용되는 분야도 다양해지고 있다(Kim, 2006). 그리고 식품의 장기 보관 등에 필수적인 항균력에 대한 천연 항균성 물질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이를 이용한 다양한 항균제가 시판, 이용되고 있다.

이에 본 논문에서는 야생 왕고들빼기의 항산화 활성 능력과 항암, 항균활성 등의 생리활성 검증을 통하여 야생 왕고들빼기의 기능성 식품으로서 활용 가능성과 인체에 대한 효능을 올바르게 인지하고 현대인의 고질적인 질병치료에 기여함을 목적으로 하였다. 식물을 이용하여 병을 치유하고자 하는 행위는 인류가 탄생된 이후 계속되는 근본적인 의료 행위이며 가장 근접하게 접근할 수 있는 건강관리에 대한 필수 요소이다.

Collection @ chosun

왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)는 국화과로 일년생 또는 월년생 식물이며 전초를 산와거라 하며 약용한다. 그 효능으로는 열을 내리고 피를 맑게 하며 종기를 없애는 효과가 있다. 줄기나 잎을 달여서 복용하면 열을 내릴 수가 있으며 봄, 여름 사이 뿌리를 달여 마시면 감기, 해열, 편도선염, 인후염, 유선염, 자궁염, 산후출혈, 종기 따위의 치료에 효력이 있으며 동의학에서는 건위, 소화제, 해열제로 사용해 왔다. 생즙은 진정작용과 마취작용이 있으며, 성분으로는 베타-아미린, 타락사스테롤, 게르마니콜, 베타-시토스테롤 등을 함유하고 있다. 왕고들빼기 전초에는 chlorogenic acid, germanicum, hyocyamine, inulin 등을 함유하고 있고(Kim *et al.,* 1997), 왕고들빼기 뿌리의 사포닌 함량이 3.25~4.3%로 더덕의 사포닌 함량보다 높게 나타나 기능성 성분으로써의 가치도 충분히 입증한 바 있으며(Kim *et al.,* 2012), 왕고들빼기의 triterpenoid 성분을 분리하였고, triterpenoid 중 triterpene acetate의 혈청 콜레스테롤 저하력이 강하다는 결과를 보고하였다(Lee and Huh, 1996).

본 논문에서는 왕고들빼기의 부위별(root, stem, leaf, flower) 메탄올 추출물의 항산화능을 측정하고, 또한 생체 내 항산화 기능을 하는 항산화 효소활성을 분석함으로써 천연 항산화제로서의 효용성과 그 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 또한 식품 유해균 및 피부질환 관련 균주를 대상으로 왕고들빼기 메탄올 추출물의 항균력을 조사하여 식품첨가물이나 항균력이 있는 생필품 개발 등에 활용함으로써 관련 식품산업 및 향장산업 발전에 기여하고자 하였다. 그리고 MTT Assay 방법을 이용한 왕고들빼기의 부위별 항암활성을 분석하여 야생 왕고들빼기 추출물이 여러 인체 암세포에 대해 생육억제 효능을 나타내는지를 확인함으로서 향후 특정 암을 예방하고 치료 효과를 기대할 수 있는 고부가가치 건강기능성 식품으로의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

Collection @ chosun

2. 실험재료 및 방법

2.1 재료식물

본 연구에 사용된 야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)의 전초는 전남 보성군의 인근 야산에 자생하는 것을 2013년 8월 채취하였고, 증류수를 이용하여 깨끗이 수세하고 정선한 후 뿌리(root), 줄기(stem), 잎(leaf), 꽃(flower) 4 부위로 분리한 다음, -50˚C 이하 동결건조기(Ilshin, Korea)에 건조 후 분쇄기에 마쇄하고, –70˚C 이하 초저온 냉동고(OPERON, Korea)에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 추출물의 제조

야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)의 부위별 건조시료 2배량의 80% methanol에 침지하여 24시간 정치하며 마그네틱 바로 저으면서 3회 이상 반복 추출하고 air compressor (DOA-P704-AC. USA)와 filter paper (Adventic 2, 110 mm, japan)를 이용하여 여과하였고, 여과한 액을 45˚C rotary vacuum evaporator (IKA, Japan)로 감압 농축한 후 농축액을 동결건조하여 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)의 부위별 methanol 추출물로 사용하였다.

또한, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, 아질산염 소거능 실험에서는 부위별로 동결 건조한 왕고들빼기를 마쇄한 후, 최고농도를 20 ㎎/㎖로 하여 실험에 사용하였다.

Collection @ chosun

2.2.2 폴리페놀 함량측정

야생 왕고들빼기(*Lactuca indica* L.)의 부위별 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis(1912) 방법을 일부 변경하여 spectrophotometer를 이용, 725 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 왕고들빼기의 부위별 추출물에 메탄올을 이용하여 일정 농도로 녹이고 0.25 ㎖씩 test tube에 취한 후, 여기에 10배 희석한 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma, USA) 0.5 ㎖을 각각 혼합하여, 상온에서 5분간 방치하였다. 그 후, 7.5% sodium carbonate (Na_2Co_3) 0.5 ㎖을 혼합하여 30˚C에서 90분간 방치한 후, spectrophotometer를 이용 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량을 구하기 위하여 표준물질 chlorogenic acid (Sigma, USA)을 이용하여 검량선을 작성하고 왕고들빼기의 부위별 총 폴리페놀 함량을 구하여 정량하였다.

2.2.3 플라보노이드 함량측정

총 플라보노이드 함량측정은 Jia 와 Tang(1999)의 방법을 변형한 방법에 따라 측정하였고, 왕고들빼기 부위별 추출물을 1 ㎎/㎖의 농도로 80% methanol에 용해한 다음 diethylene glycol 10 ㎖, 1N-NaOH 0.1 ㎖을 가한 후, 37˚C incubator에 1시간 반응시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 Naringin (Sigma, USA)을 사용하였다.

Collection @ chosun

2.2.4 항산화 활성능력 측정

1) DPPH radical 소거활성

왕고들빼기의 부위별 시료를 Blois(1958) 방법을 일부 변경하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 각 농도의 시료를 메탄올을 용매로 하여 희석시킨 후, 900 ㎕의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA) 용액 100 μM과 각 시료 100 ㎕를 혼합하여 교반한다. 이 혼합시료를 암소에서 30분간 반응시킨 후 radical이 감소하는 정도를 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자 공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 계산한 후 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 백분율로 계산하였다.
왕고들빼기 부위별 시료에 대한 50%의 DPPH radical 소거 활성력은 IC_{50} (The half maximal scavenging concentration)으로 나타내었다.

$An = (A_0 - A) / A_0 \times 100$

An : DPPH radical 소거 활성력에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 DPPH 용액의 흡광도

A : 반응용액중의 DPPH와 각 시료의 반응한 흡광도

2) ABTS radical 소거활성

야생 왕고들빼기의 부위별 ABTS radical 소거활성은 Re 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 7 mM ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (Sigma, USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 증류수에 용해하고 15시간 동안 암소에 보관하여 ABTS 양이온

Collection @ chosun

radical ($ABTS^{\cdot}+$)을 형성 시킨 후, 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.700~0.900이 되도록 methanol로 희석하였다. 희석된 $ABTS^{\cdot}+$용액 950 ㎕에 농도별 추출물 50 ㎕를 가하여 5분 동안 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 ABTS radical 소거능을 구하였다.

왕고들빼기 부위별 시료에 대한 50%의 ABTS radical 소거 활성력은 IC_{50} (The half maximal scavenging concentration)으로 나타내었다.

$$An = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

An : ABTS radical 소거 활성능에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 $ABTS^{\cdot}+$ 용액의 흡광도

A : 반응용액중의 $ABTS^{\cdot}+$와 각 시료의 반응한 흡광도

3) 아질산염 소거활성

야생 왕고들빼기의 부위별 시료의 아질산염 소거 능력 측정은 1 mM $NaNO_2$ 20 ㎕에 시료의 추출액(20 ㎎/㎖) 40 ㎕와 0.1 N HCl 또는 0.2 M citrate buffer를 이용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 4.2, 6.0으로 각각 조제한 pH buffer 140 ㎕ 혼합하여 부피를 200 ㎕ 로 정량하여 실험에 사용하였다. 이 반응액을 37℃ water bath에서 50분 반응시킨 후, 2% acetic acid 1,000 ㎕, griess reagent (30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합) 80 ㎕를 첨가하여 잘 혼합시켜 암소에서 15분간 반응시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 아질산염 소거능을 구하였다.

$$N(\%) = [1 - (A-C) / B] \times 100$$

Collection @ chosun

N : nitrite scavenging ability

A : absorbance of 1 mM $NaNO_2$ added sample after standing for 50 minute

B : absorbance of 1 mM $NaNO_2$

C : absorbance of control

2.2.5 항산화 효소활성 측정

1) 효소액의 조제

100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) 용액에 2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone), 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)를 첨가하여 균질화 한 후에, 동결 건조한 야생 왕고들빼기의 부위별로 분말한 시료 0.3 g을 넣어 over night하여 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 다음 상층액을 항산화 효소활성 측정에 사용하였다.
각 시료의 단백질 정량은 Bradford법(1976)에 따라 BSA (bovine serum albumin) (Sigma, USA)를 표준물질로 사용하여 측정하였다.

2) Super Oxide Dismutase (SOD)의 활성 측정

Super Oxide Dismutase (SOD) 활성 측정은 분석용 Kit (Sigma, Japan)를 사용하여 측정하였으며, SOD 효소활성이 NBT (nitroblue tetrazolium)의 환원 저해능을 측정하는 photochemical NBT method를 이용하였다. 반응액은 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM xanthine, 0.025 mM NBT로 하였으며, spectrophotometer를 이용하여 흡광도 450 nm에서 NBT 환원 저해율을 측정하였다. SOD효소 활성은 아래의 계산식에 의하여 구하였다.

Collection @ chosun

Table 1. Amount of each solution for sample, blank 1, 2 and 3.

	sample (㎕)	Blank1 (㎕)	Blank2 (㎕)	Blank3 (㎕)
Sample solution	20		20	
dd H_2O		20		20
WST working solution	200	200	200	200
Enzyme working solution	20	20		
Dilution buffer			20	20

Super Oxide Dismutase (SOD)활성 (NBT환원 저해율, %)

{[(blank1-blank3) - (sample-blank2)] / (blank1-blank3) x 100

Collection @ chosun

3) Catalase (CAT)의 활성측정

Catalase (CAT)활성은 Mishra 등(1993)의 방법을 일부 변형하여 측정하였으며, 반응액의 최종 농도는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 10 mM H_2O_2가 포함 되도록 하였다. CAT 활성은 이 반응액에 제조한 효소액을 가한 후 spectrophotometer를 이용하여 240 nm의 흡광도에서 1분간 소거된 H_2O_2 변화를 측정하였고, 단백질 1 mg당 소거된 H_2O_2를 μM로 표시하였다.

4) Ascorbate Peroxidase (APX)의 활성측정

Ascorbate Peroxidase (APX) 활성은 Chen과 Asada(1989)의 방법에 따라 측정하였으며, APX의 반응액은 0.5 mM ascorbate와 0.2 mM H_2O_2가 첨가된 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 하였다. 이 반응액에 제조한 효소액을 가한 후 ascorbate의 산화 정도를 spectrophotometer를 이용하여 290 nm에서 1분간의 흡광도 변화로 측정하였으며, 단백질 1 mg당 산화된 ascorbate를 μM로 표시하였다.

5) Peroxidase (POX)의 활성측정

Peroxidase (POX) 활성은 Chance와 Maehly(1995)의 방법에 따라 측정하였고, POX 반응액은 최종 농도가 1.5 mM guaiacol과 6.5 mM H_2O_2가 포함된 40 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9)로 조제 하였다.
이 반응액에 조제한 효소액을 가한 후, tetraguaiacol 형성을 spectrophotometer를 이용하여 470 nm에서 1분간의 흡광도 변화로 측정하였으며, 단백질 1 mg당 형성된 tetraguaiacol을 μM로 표시하였다.

Collection @ chosun

2.2.6 항암 활성효과

1) 세포의 배양

실험에 사용된 세포배양은 한국 세포주 은행에서 분양받은 인체 자궁암 세포주 HeLa (KCLB No.10002), 폐암 세포주 Calu-6 (KCLB No.30056), 유방암 세포주 MCF-7 (KCLB No.30022), 직장암 세포주 HCT-116 (KCLB No.10247), 후두암 세포주 SNU-1066 (KCLB No.01066), 인체 정상 신장 세포주 HEK293 (KCLB No.21573)를 각각의 세포주에 따라 RPMI1640 (Lonza, USA), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Lonza, USA), EMEM (Minimum Essential Medium) (Lonza, USA)의 배지에 10% FBS (fetal bovine serum) (Gibco BRL, USA)와 1% antibiotic - antimycotic (Gibco BRL, USA)을 첨가한 복합배지를 이용하여, 37˚C, 5% CO_2 incubator (SANYO, MCO – 17AIC, Japan)의 습윤 배양기에서 계대배양하였고, 2일마다 한 번씩 새로운 배지로 교체하였다. 실험에 사용한 세포주는 적어도 3회 이상의 계대배양을 거친 것을 이용하였고, 여분의 세포주는 DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma, USA)를 혼합한 배지에 부유 시킨 후 초저온 냉동고(OPERON, Korea)에 보관하였다.

2) 인체 암세포 및 정상세포의 생존율 측정

암세포 증식 억제 효과를 분석하기 위해 Hansen 등(1989)의 방법에 따라 MTT assay법에 의한 암세포 및 인체 정상세포 생존율 실험을 하였다. MTT assay법은 탈수소 효소작용에 의해 MTT tetrazolium이 cell안에 침투하여 mitochondria 내에서 적자색을 띄는 formazan product로 환원시키는 mitochondria의 능력을 이용하여 측정하는 검사법이다.

Collection @ chosun

한국 세포주은행에서 분양받은 각 세포주를 3×10^4 cell/㎖ 농도가 되도록 hemocytometer로 cell counting 한 후, 96 well microplate에 98 ㎕/well 씩 분주한 다음, 37˚C, 5% CO_2 습윤 세포 배양기(SANYO, MCO – 17AIC, Japan)에서 24시간 incubation하여 세포를 부착 시킨 다음 항암 검색의 대상이 되는 왕고들빼기 부위별 추출물을 농도별로 조제하여 2 ㎕씩 각 well에 첨가하였다. 이것을 48시간 배양 시킨 후, 각 well에 5 ㎎/㎖ 의 MTT(3 - (4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl) -2,5 –diphenyltetrazolium bromide) solution (Sigma, USA)을 10 ㎕씩 첨가하고, 4시간 동안 반응시킨 다음 상층액을 조심스럽게 제거 한 후, 각 well에 100 ㎕의 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 15분간 plate shaker (Finepcr, SH30, Korea)로 흔들어 주었다. 이후 micro plate spectrophotometer (Bio Rad, xMark, USA)를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 추출물 무첨가군을 100%로 하여 암세포 증식 억제율을 구하였다.

왕고들빼기 부위별 메탄올 추출물에 대한 50%의 cell viability는 IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration)으로 나타내었다.

percent of viable cells(%) = (대조구의 흡광도 – 시료처리구의 흡광도) / 대조구의 흡광도 × 100

Collection @ chosun

2.2.7 항균 활성 측정

1) 사용 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 대장균인 *Escherichia coli*, 피부 상재균 이며 항생제에 내성을 키우는 대표적인 균인 *Staphylococcus epidermidis*, 식중독의 원인균인 *Salmonella enterica* subsp, 리스테리아증의 원인균인 *Listeria monocytogenes*, 지루성 피부염의 원인균 *Malassezia furfur*, 칸디다증의 원인균이며 아토피와 특히 여성의 질염 원인균인 *Candida albicans*등 인간에게 직간접적으로 유해한 균주를 중심으로 선별하여 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korea Biological Resource Center, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganism, KCCM)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 각 균주의 균종과 번호 및 배양조건은 Table 2에 배지 조성 표는 Table 3~6에 나타내었다.

Collection @ chosun

Table 2. List of strains and cultivation conditions used for screening of antimicrobial activity test.

Strains	Strains No.	Cultivation condition
Staphylococcus epidermidis	KCTC1917	37℃, Nutrient Agar
Candida albicans	KCTC7965	25℃, YM AGAR
Listeria amonocytogenes	KCTC3569	37℃, Brain Heart Infusion Agar
Escherichia coli	KCCM11234	37℃, Trypticase Soy Agar
Salmonella enterica subsp	KCTC1925	37℃, Nutrient Aga
Malassezia furfur	KCTC7743	37℃, YM Agar + 1% Olive oil

Collection @ chosun

Table 3. Composition of Nutrient Agar.

Component	Contents (g/ℓ)
Beef extract	1.0
Peptone	5.0
Sodium chloride	5.0
Yeast extract	2.0
Agar	15
pH	6.8 ± 0.2

Collection @ chosun

Table 4. Composition of YM Agar + 1% Olive oil.

Component	Contents (g/ℓ)
Yeast extract	3.0
Malt extract	3.0
Peptone	5.0
Dextrose	10.0
Agar	15
Olive oil	10.0
pH	6.3 ± 0.2

Collection @ chosun

Table 5. Composition of Brain Heart Infusion Agar.

Component	Contents (g/ℓ)
Brain Heart Infusion	17.5
Peptone	10.0
Glucose	2.0
Sodium chloride	5.0
Dipotassium phosphate	2.5
Agar	15
pH	7.4 ± 0.2

Collection @ chosun

Table 6. Composition of Trypicase Soy Agar.

Component	Contents (g/ℓ)
Pancreatic digest of casein	15.0
Pancreatic digest of soybean	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15
pH	7.3 ± 0.2

Collection @ chosun

2) 균주의 배양 및 항균활성 효과 측정

야생 왕고들빼기 부위별 추출물의 항균활성 효과 측정에 사용하기 위해 분양 받은 고체 배지 내의 균주를 적당량 취한 후에 5 ㎖ broth의 균 액체배지에 접종하고, 각각의 배양 조건에서 24시간씩 2~3회 계대배양한 후에 시험 균주로 사용하였다. 한천배지확산법(disc agar plate diffusion method)을 이용하여 항균 활성 효과를 측정하였으며, 각 시험 균주에 적합한 배지에 일정한 농도로 균주를 배양한 한천 배지를 petri dish에 분주한 후 20~25℃로 식혀 굳힌 다음 배지 위에 top agar를 도말하여 멸균된 8 mm paper disc (Adventic, Japan)를 top agar plate 표면에 일정한 간격으로 놓았다. 각 시료 추출물들을 paper disc에 40 ㎕씩 주입하며, 이때 paper disc의 흡수력을 고려하여 20 ㎕씩 두 번에 나누어서 주입시킨 후, 각 균의 생육 적정 온도에서 24시간 동안 incubator에서 배양하여 paper disc 주위에 저해환의 생성을 관찰하였다. 24시간 이내에 저해환이 생성된 경우 항균활성이 양성인 것으로 판정하였으며, 저해환의 직경을 측정하여 항균 활성 정도를 관찰하였다.

Collection @ chosun

2.2.8 Tyrosinase 활성 저해효과 측정

미백효과를 알아보기 위한 tyrosinase 활성 저해 실험은 Flurkey(1991)의 방법을 변형하여 실험하였다. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로의 전환에 관여하고 DOPA-quinone으로 전환 시켜 melanin 색소를 생성시키는 반응에 관여한다(Hearing and Jimenez, 1987). 효소액은 mushroom tyrosinase (sigma, USA)를 100 unit/㎖로 희석하여 0.2 ㎖, 기질로는 10 mM 3,4-Dihydroxy-L–phenylalanine과 0.1 M의 potassium phosphate buffer (pH 6.8)의 혼합용액 0.6 ㎖을 이용하였고, 왕고들빼기 부위별 시료 0.2 ㎖을 주입 후, 잘 혼합한 다음 37˚C에서 약 20분간 반응한 후, spectrophotometer를 이용하여 흡광도 475 nm에서 측정 후, tyrosinase 활성 저해능을 다음의 식에 의하여 계산 하였다.

저해율(%) = { 1−(무첨가군의 흡광도 / 시료첨가군의 흡광도) } × 100

2.2.9 통계처리

왕고들빼기의 부위별 methanol 추출물의 생리 활성에 대한 각각의 실험 결과는 SAS software (SAS Institute, USA)를 이용, ANOVA Procedure를 실시하여 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 이용하였으며 0.05% 수준에서 유의성을 검정하였다. 각 실험은 3회 실시하였고, 평균 ± 표준오차로 표기하였다.

Collection @ chosun

3. 결과 및 고찰

3.1 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량

야생 왕고들빼기의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 Table 7에 나타냈다. 야생 왕고들빼기 뿌리의 총 폴리페놀 함량은 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 13.50, 15.44, 35.09, 12.50 mg/g extract DW (Dry Weight)으로 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 순으로 높게 나타났다. 왕고들빼기의 총 플라보노이드 함량은 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 1.43, 5.34, 26.90, 6.20 mg/g extract DW으로 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 순으로 나타나 총 폴리페놀 함량과 유사한 결과를 얻었다.

Kim 등(2012)은 왕고들빼기 잎의 총 폴리페놀 함량은 42.08 mg/g DW, 뿌리 23.09 mg/g DW, 총 플라보노이드 함량은 잎 23.09 mg/g DW, 뿌리 0.77 mg/g DW으로 보고하였고, 비타민C 함량은 잎 24.14 mg/100g, 뿌리 0.38 mg/100g으로 보고하여 다른 국화과 식물보다 우수한 비타민C 보급원임을 밝히기도 하였다. 이와 같은 연구 결과는 본 실험과 유사한 결과로 뿌리보다 잎에서의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드함량이 높음을 알 수 있다.

식물체 내 페놀성 화합물은 활성 산소에 노출되어 손상되는 DNA나 단백질 등을 보호, 콜레스테롤 저하, 항암 등의 능력이 큰 것으로 알려져 있다(Fukujawa and Takaishi, 1990; Halliwell, 1991; Heim *et al.,* 2002; Sohn *et al.,* 2008; Egley *et al.,* 1983). 페놀류 중 가장 효과가 좋은 생리활성을 나타내는 플라보노이드는 폴리페놀 성분의 일종이며 효소의 작용을 돕고 활성 산소종을 효과적으로 제거하는 물질로 알려져 있으며, 현재까지 약 200여 종류 이상의 플라보노이드가 밝혀진 것으로 보고되고 있다(Hetog *et al.,* 1993).

본 논문의 실험결과 왕고들빼기의 식물체에는 다량의 페놀 성분을 함유하는 것으

Collection @ chosun

로 나타나 섭취할 경우 인체 내에서 항산화 및 항암 등의 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

Table 7. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica*

Plant Part	Total polyphenol (mg/g extract D.W)	Total flavonoid (mg/g extract D.W)
Root	[z]13.50 ± 0.19[bc]	1.43 ± 0.14[d]
Stem	15.44 ± 0.20[b]	5.34 ± 0.13[c]
Leaf	35.09 ± 0.15[a]	26.90 ± 0.22[a]
Flower	12.50 ± 0.39[c]	6.20 ± 0.22[b]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments.
Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

3.2 항산화 활성능력

3.2.1 DPPH radical 소거활성

DPPH는 그 자체가 비교적 안정한 free radical로서 자색 화합물이며 흡광도 517 nm에서 특징적인 광 흡수를 나타낸다. 이 radical은 유기용매인 알코올 등에 매우 안정적이며, 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되어 항산화 활성을 매우 쉽고 용이하게 관찰할 수 있는 장점이 있다.

현재 자생식물이나 약초 등을 이용하여 항산화 활성 규명과 확인을 위하여 DPPH radical 소거 활성실험을 많이 이용하고 있고 높은 전자 공여능이 확인되고 있다(Egley *et al.,* 1983). 야생 왕고들빼기의 부위별 DPPH radical 소거 활성력은 Table 8에 나타내었다. 10 ㎎/㎖에서 잎 90.37%, 줄기 64.23%, 뿌리 32.65%, 꽃 32.54%로 나타났다. 이는 소거능의 대조구로 사용된 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole의 97%와 고들빼기 잎 부위에서 90.37%로 유사하게 높은 항산화 소거 활성력을 보였고 줄기, 뿌리, 꽃 부위는 잎 부위보다는 약간 미치지 못하는 결과를 도출하였다. 50%의 항산화 소거 활성력을 나타내는 IC_{50} 값은 잎 4.02 ㎎/㎖, 줄기 7.50 ㎎/㎖, 꽃 16.94 ㎎/㎖, 뿌리 16.96 ㎎/㎖ 순으로 잎이 가장 낮은 농도에서 IC_{50} 값을 나타내어 매우 효과적인 항산화력을 보였고 줄기, 뿌리, 꽃 순으로 나타났으며 특히 뿌리와 꽃 부위의 항산화력은 거의 동일한 활성력을 보였다.

Kim 등(2012)은 왕고들빼기 methanol 추출물에 대한 DPPH radical 소거 활성력에 대한 연구에서 잎의 경우 300 ㎍/㎖의 농도에서 소거능이 78%, 뿌리의 경우 400 ㎍/㎖의 농도에서 21%로 나타났다고 보고하였다. Chon과 Kang(2013)은 재배형 고들빼기(*Youngia sonchifolia* Maxim) 부위별 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능 측정에서 뿌리, 잎, 꽃, 줄기 순으로 각각 77.1, 74.0, 69.6, 65.3% 순으로 뿌리, 잎, 꽃, 줄기 순으로 높은 활력을 나타내는 것으로 보고하였다. 이 결과는 재배

Collection @ chosun

형 일반 고들빼기와 야생 왕고들빼기의 항산화 차이를 알 수 있으며 야생 왕고들빼기에 더 높은 항산화력이 있어 앞으로 이에 대한 더 많은 연구와 상품 개발 등이 기대된다.

Collection @ chosun

Table 8. DPPH radical scavenging activities of methanol extracts in different plant parts from *Lactuca indica.*

Plant Part	DPPH radical scavenging activity, % of control							
	Concentration (㎎/㎖)							
	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	*IC_{50}
Root	[z]5.46±0.33[c]	7.98±0.24[b]	8.90±0.27[c]	12.23±0.31[d]	14.95±0.17[c]	20.09±1.26[c]	32.65±0.98[c]	16.96
Stem	6.58±0.15[bc]	9.49±0.28[a]	11.45±0.41[b]	16.33±0.37[b]	21.23±0.30[b]	34.26±0.18[b]	64.23±0.68[b]	7.50
Leaf	9.09±0.40[a]	10.30±0.26[a]	16.36±0.31[a]	29.76±0.39[a]	47.24±1.00[a]	72.40±0.71[a]	90.37±0.15[a]	4.02
Flower	7.52±0.55[b]	9.42±0.39[a]	10.66±0.03[b]	13.65±0.15[c]	15.67±0.28[c]	21.81±0.59[c]	32.54±0.79[c]	16.94
Ascorbic acid	96.97±0.03	97.22±0.03	97.36±0.08	97.49±0.03	97.52±0.00	97.55±0.03	97.61±0.03	<0.1
Butylated hydroxyanisole	57.20±0.04	88.92±0.03	96.47±0.08	97.35±0.03	97.39±0.03	97.55±0.03	97.67±0.03	<0.1

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05).

Means followed by same letters are not significantly different.

*Extract concentrations, which show 50% activity of DPPH radical scavenging, were determined by interpolation.

Collection @ chosun

3.2.2 ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거 활성력 측정은 DPPH radical 소거 활성력 측정과 원리는 거의 동일하며 체내의 radical 소거 활성력을 간접적으로 측정하는 실험 방법이며 야생 왕고들빼기의 ABTS radical 소거 활성력은 Table 9에 나타내었다.

ABTS radical은 potassium persulfate와 24시간 반응하여 아주 짙은 녹색을 나타내며 항산화력이 높은 물질과 반응하였을 때 거의 투명한 색에 가까워지는 특징을 가지고 있다. 야생 왕고들빼기의 부위별 ABTS radical 소거 활성력은 20 ㎎/㎖에서 잎에서 99.84%로 가장 좋은 활성력을 보였고 꽃 65.32%, 뿌리 48.22%, 줄기 45.62% 순으로 좋은 활성력을 나타냈다. 마찬가지로 IC_{50} 값도 잎 6.70 ㎎/㎖, 꽃 13.69 ㎎/㎖, 뿌리 20.26 ㎎/㎖, 줄기 21.07 ㎎/㎖ 순으로 잎 부분에서 가장 낮은 값을 보였다.

Joo(2013)는 약용식물 추출물의 ABTS radical 소거 활성력 측정에서 갈근, 쇠비름, 참빗살나무, 합환피, 감국의 경우 0.5 ㎎/㎖의 추출물 농도에서 각각 62.49, 30.31, 52.58, 43.43, 52.47%의 소거능을 나타냈다고 연구하였다. 이와 같은 결과는 본 논문의 왕고들빼기 ABTS radical 소거 활성력 보다 수치상으로 높은 소거능을 보였지만, 추출물 제조상에서 Joo 등의 연구와 다름을 알 수 있고 본 실험에 사용한 동결건조 시료를 추출물로 계산하였을 때 거의 유사하거나 같은 수준의 ABTS radical 소거 활성력을 보이는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 야생 왕고들빼기가 약용식물로서의 효능을 가지고 있는 것으로 추측할 수 있으며 항산화제의 원료로서 가능성을 나타내는 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

Table 9. ABTS radical scavenging activities of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica*.

Plant Part	ABTS radical scavenging activity, % of control					
	Concentration (mg/mL)					
	1	2.5	5	10	20	*IC_{50}
Root	[z]4.44±0.19[d]	11.93±0.22[d]	17.22±0.09[c]	31.28±2.43[c]	48.22±0.57[c]	20.26
Stem	6.59±0.17[c]	14.53±0.18[c]	18.08±0.38[c]	29.65±0.04[c]	45.62±0.86[d]	21.07
Leaf	14.31±0.15[a]	25.88±0.34[a]	44.52±0.51[a]	87.25±0.11[a]	99.84±0.02[a]	6.70
Flower	12.32±0.19[d]	18.02±0.24[b]	27.08±0.19[b]	41.66±0.43[b]	65.32±0.35[b]	13.69
Ascorbic acid	98.43±0.00	98.59±0.03	98.53±0.00	98.59±0.03	98.45±0.03	<1
Butylated hydroxyanisole	98.09±0.00	98.38±0.03	98.23±0.00	98.87±0.03	98.66±0.03	<1

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments.
Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.
*Extract concentrations, which show 50% activity of DPPH radical scavenging, were determined by interpolation.

Collection @ chosun

3.2.3 아질산 소거활성

아질산염은 우리가 흔히 섭취하는 생선이나 육류 등에 발색, 풍미 증진, 산패 방지 등을 위하여 식품 첨가제로 널리 이용되고 있다. 그러나 이러한 아질산염을 섭취할 경우 인체의 위에서 아민류와 반응하여 발암성 물질인 nitrosamine을 생성하는 것으로 보고되고 있다(Boo *et al.,* 2009).

야생 왕고들빼기의 부위별 시료를 아질산나트륨 용액에 첨가하여 아질산염의 소거능을 조사한 결과 Table 10과 같은 결과를 나타냈다. 왕고들빼기의 아질산 소거능은 pH에 상당히 의존적으로 나타났으며, pH 1.2에서는 뿌리 55.36%, 줄기 55.28%, 잎 21.49%, 꽃 21.25%로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위 순으로 활성을 보였으며, 특히 뿌리와 줄기 그리고 잎과 꽃 부위는 유사한 수준의 활성을 나타내었다. pH 4.2에서는 뿌리 49.85%, 줄기 42.35%, 잎 12.36%, 꽃 10.33%의 결과로 pH 1.2의 결과와 유사한 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위 순으로 양호한 활성력을 보였다. pH 6.0에서는 아질산 소거 활성이 나타나지 않았으며, 이와 같은 결과는 연잎 에탄올 추출물의 아질산 소거능에 대한 Yim 등(2008)의 연구결과와 유사한 결과로 나타났다. Kang과 Lee(2013)의 연구에 의하면 쑥의 아질산 소거능에서 사철쑥은 pH 1.2에서 추출 방법별(환류냉각추출, 고온가압추출, 저온고압추출, 초음파추출)로 각 45.48%, 45.73%, 36.70%, 31.53%등으로 나타났으며, 약쑥과 개똥쑥은 45.73%, 44.25%, 33.50%, 32.02%, 37.68%, 20.20%, 27.50%, 20.53% 순으로 나타나는 것으로 보고하였고, Park 등(2002)은 pH 1.2에서 쑥의 열수 추출물의 아질산 소거능이 최고 37%를 나타냈다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 동일한 국화과에 속하는 왕고들빼기의 아질산염 소거능의 결과와 매우 유사한 결과이며, 항균력이나 항산화력에서 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있는 쑥과 비교하여도 야생 왕고들빼기의 활성력이 유사한 것으로 보인다.

Collection @ chosun

Table 10. Nitrite scavenging activities of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica.*

Plant Part	Nitrite scavenging activity(%)		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Root	[z]55.63 ± 1.90[a]	49.85 ± 2.03[a]	ND[x]
Stem	55.28 ± 1.53[a]	42.35 ± 0.44[b]	ND
Leaf	21.49 ± 1.71[b]	12.36 ± 1.13[c]	ND
Flower	21.25 ± 0.92[b]	10.33 ± 0.81[c]	ND

[z]Data represent the mean values ± SE of three independent experiments. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

[x]ND=Not detected.

Collection @ chosun

3.3 항산화 효소활성

생체 내에서 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 장애를 초래하게 되는데 이때 방어 기작으로 생물들은 이런 독성으로부터 자신을 보호하기 위하여 방어물질인 ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) 등과 ascorbic acid, glutathione, carotenoid 등의 항산화 물질을 생성시킨다(Jeong *et al.,* 2001; Kang *et al.,* 2003; Kim *et al.,* 2010). 일반적으로 고착생활을 하는 식물들은 외부 스트레스에 대한 환경 적응능력이나 저항성이 다른 생물체 보다 높아 많은 종류의 항산화 물질을 생합성한다(Alscher and Hess, 1993). SOD (super oxide dismutase)는 생체내에서 O^{2-} (super oxide)의 소거에 관여하는 효소이며, 산소를 소비하는 모든 생물에 존재하고 활성산소에 방어 기작으로서 중요한 역할을 담당한다(Greenstock, 1993). 세포에 유해한 oxygen radical을 과산화수소로 전환시키고, 다시 catalase와 peroxidase에 의하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Cho and Choi, 2013). APX (Ascorbate peroxidase)는 식물의 엽록체, 미토콘드리아, 세포질 및 세포벽에 존재하고, ascorbate를 산화시켜 과산화수소를 불활성화하며(Jeong *et al.,* 2001), 세포질과 엽록체에서 가장 중요한 제거제 역할을 한다. 이들은 환원용 기질로 ascorbic acid를 이용하며, GPX (glutathione peroxidase)가 H_2O_2를 제거하고 지질의 과산화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다(Wheeler *et al.,* 1998).

야생 왕고들빼기 부위별 시료의 SOD, APX, CAT, 그리고 POX 활성을 아래 Fig. 1~4에 나타내었다. 왕고들빼기 부위별 SOD 활성 즉, SOD 효소 활성이 NBT (nitroblue tetrazolium)의 환원을 저해하는 능력검정에서 뿌리 85.05%, 줄기 89.43%, 잎 90.71%, 꽃 85.40%로 부위별 모든 부분이 80% 이상으로 높은 활성을 나타냈으며 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 순으로 높은 활성을 나타냈다. Cho와 Choi(2013)는

Collection @ chosun

담쟁이 분획별 추출물의 SOD 활성 실험에서 부탄올층 0.5 ㎎/㎖에서 93% 의 SOD 활성을 보고하였고, Seo 등(2008)의 머위 추출물의 SOD 유사 활성에서 머위 잎의 에탄올 추출물이 96.7%의 높은 활성을 보고하였다. Jeong 등(2001)의 식용 백합 에탄올 추출물의 SOD 유사 활성 측정 결과에서는 잎 82.7% 꽃 66.1% 구근 50.6%로 잎에서 높은 결과를 나타내는 것으로 보고하였다. APX 활성에서는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위에서 각각 660.76, 164.55, 88.25, 165.26 μM ascorbate oxidized /min/mg protein으로 나타나 APX는 뿌리, 꽃, 줄기, 잎 순으로 높은 항산화 효소 활성을 보였다.

과산화수소를 물 분자와 산소 분자로 분해하여 생체 내 항산화 기작을 유지하는 데 매우 중요한 CAT 효소 활성은 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위에서 각각 13.88, 2.77, 4.39, 3.98 μM H_2O_2 decomposed/min/mg protein으로 나타나 뿌리에서 가장 좋은 항산화 효소 활성력을 나타내었다. Boo 등(2011)은 천연색소 추출물의 CAT 활성에서 뽕잎 17.73 μM H_2O_2 decomposed /min/mg DW, 지황 16.38 μM H_2O_2 decomposed/min/mg DW, 오디 12.62 μM H_2O_2 decomposed/min/mg DW의 순으로 활성이 높게 나타났다고 보고하였다.

CAT와 유사한 기작으로 과산화수소를 물 분자와 산소 분자로 분해하는 POX 효소 활성에서는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위에서 각각 3.91, 7.04, 1.03, 5.73 μM tetraguaiacol formed/min/mg protein으로 줄기와 꽃 부위에서 비교적 높은 활성 상태를 나타냈다. SOD는 모든 부위에서 높은 항산화 효소 활성력을 나타냈다. APX와 CAT는 뿌리 부위에서 좋은 활성을 보였으며 POX는 줄기와 꽃 부위에서 양호한 효소 활성력을 보여 결과적으로 왕고들빼기 식물체의 부위별 항산화 효소 활성에서는 효소의 종류에 따라 그리고 식물체의 부위에 따라 그 차이가 크게 나타났다.

Collection @ chosun

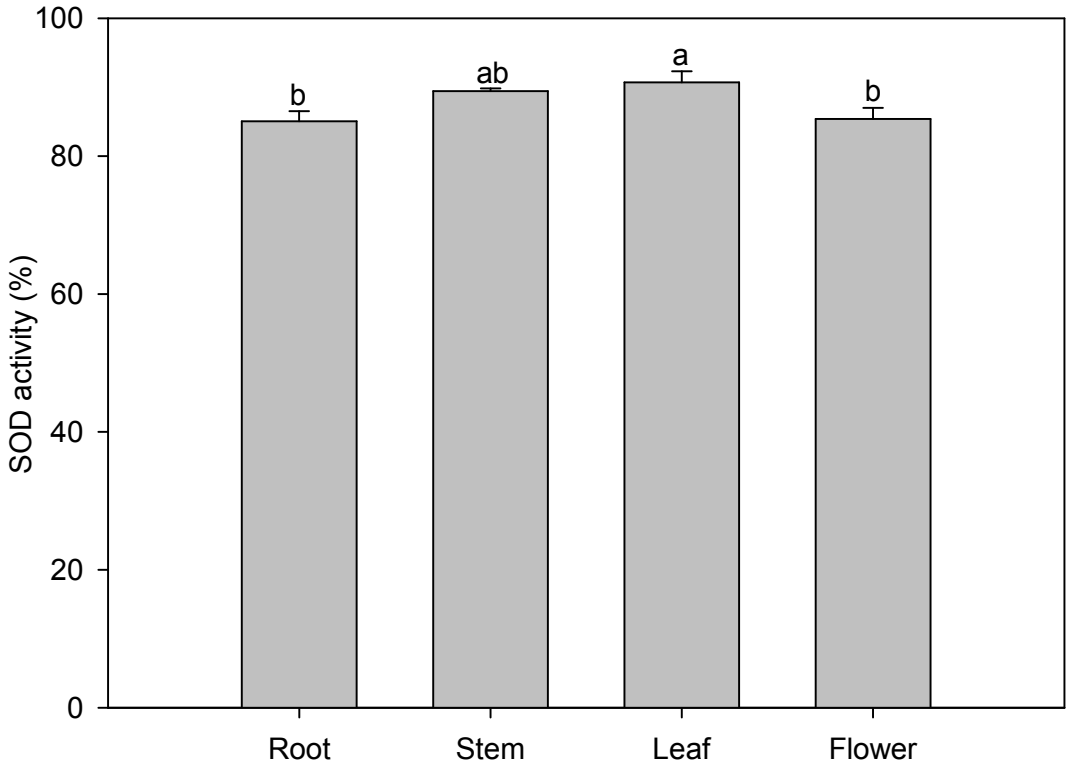


Fig. 1. The effect of SOD activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica.*

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

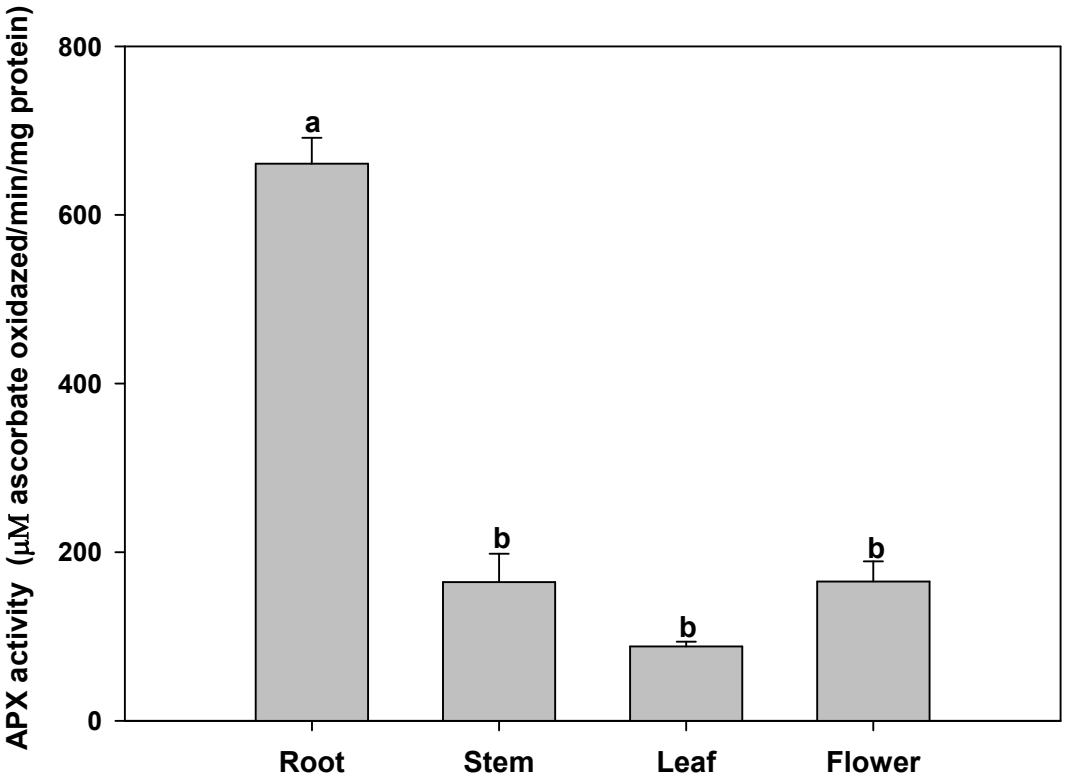


Fig. 2. The effect of APX activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica.*

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

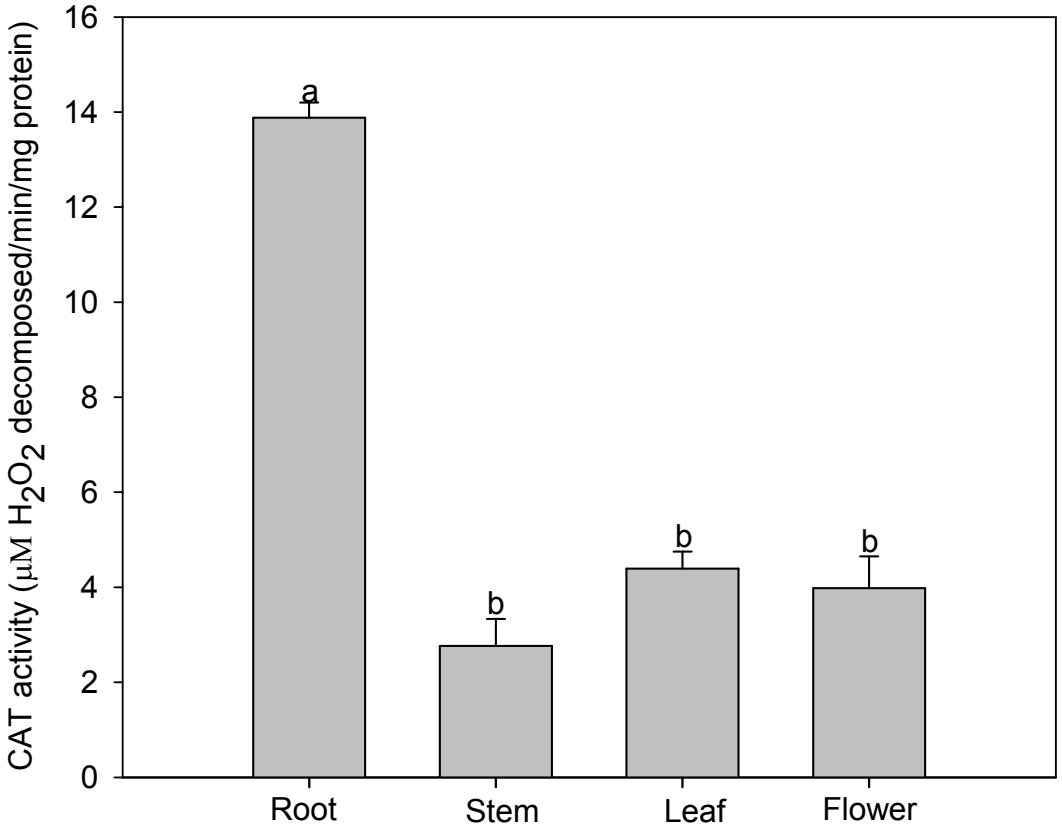


Fig. 3. The effect of CAT activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica.*

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

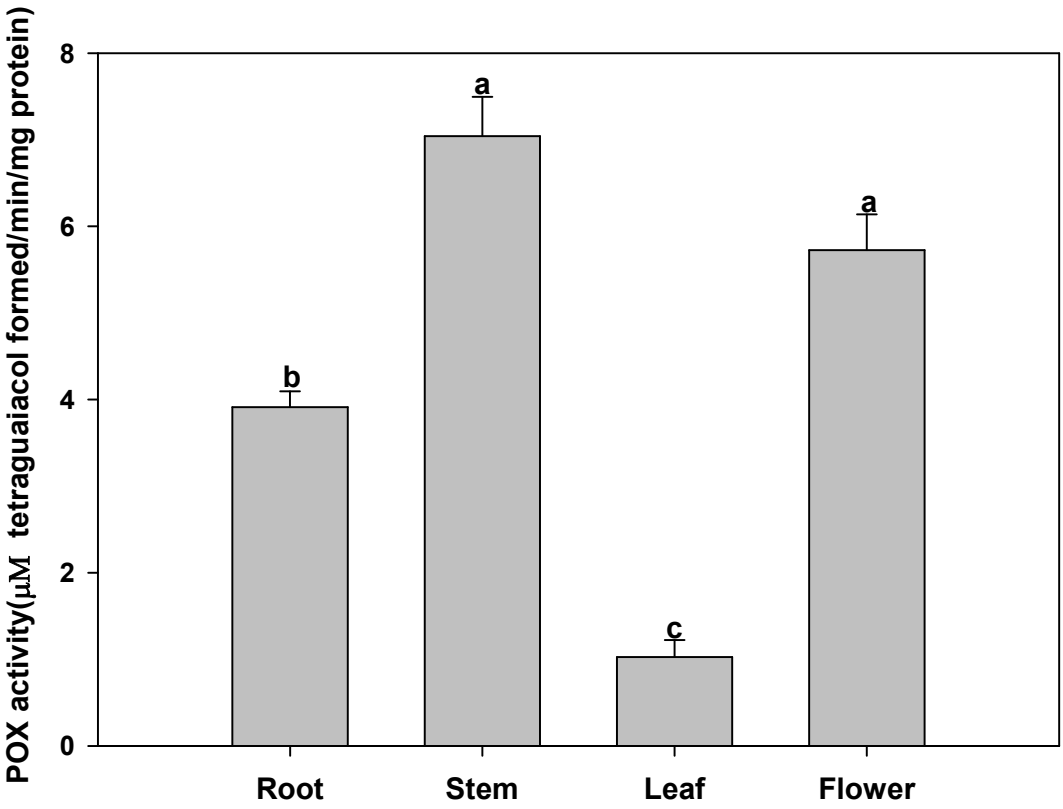


Fig. 4. The effect of POX activity by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica.*

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

3.4 MTT assay에 의한 인체 암세포 및 정상세포 생존율

3.4.1 암세포 생존율

1) 자궁경부암(HeLa) 세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 자궁경부암(HeLa) 세포의 항암효과를 측정하여 Fig. 5에 나타내었고 자궁경부암(HeLa) 세포 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50} 값은 Table 11에 나타냈다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 세포 생존율을 측정 한 바, 부위별 추출물을 50 ㎍/㎖로 처리하였을 때, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 71.9, 67.17, 61.45, 78.22%로 잎과 줄기 부분에서 가장 높은 항암 활성을 보였고, 추출물 농도가 200 ㎍/㎖일 때 꽃 부위를 제외한 뿌리, 줄기, 잎 부위 추출물에서 50% 이하의 세포 생존율을 보였으며, 800 ㎍/㎖의 고농도 추출물에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 43.7, 37.5, 32.3, 67.21%로 잎과 줄기에서 가장 강한 항암활성을 보였고, 꽃 부위에서는 항암활성이 다른 부위보다 낮은 것으로 나타났다.

추출물의 자궁경부암(HeLa) 세포주에 대한 IC_{50} 값은 뿌리 535.81 ㎍/㎖, 줄기 308.27 ㎍/㎖, 잎 266.28 ㎍/㎖, 꽃 800 ㎍/㎖ 이상으로 나타나 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 부위 순으로 낮은 값을 나타내었다. Lee 등(2008)은 사철쑥의 메탄올 추출물 1,000 ㎍/㎖, 2,000 ㎍/㎖ 처리 군에서 세포 고사의 특징을 나타내었다고 보고하였다. 이는 자궁경부암(HeLa) 세포주에 대한 항암 활성효과가 야생 왕고들빼기에서 더 뛰어난 것을 시사해 주는 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

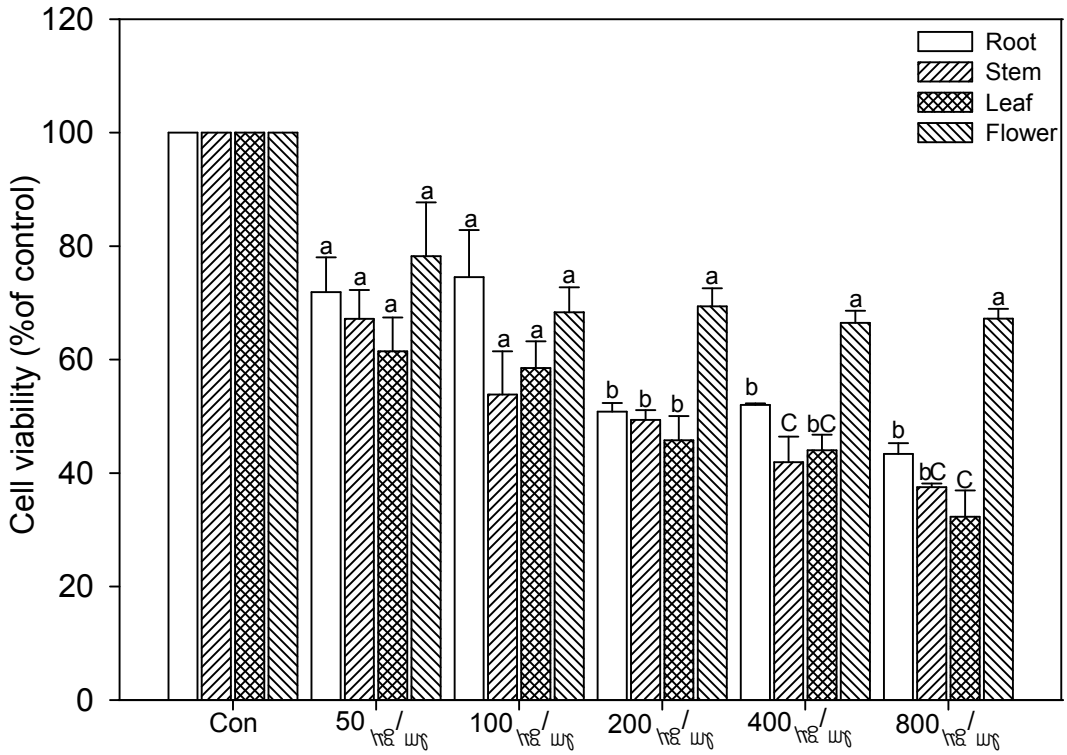


Fig. 5. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HeLa cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

2) 폐암(Calu-6) 세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 폐암(Calu-6) 세포의 항암효과를 측정하여 Fig. 6에 나타내었고 폐암(Calu-6) 세포사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50} 값은 Table 11에 나타냈다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 세포 생존율을 측정 한 바, 추출물 농도 50 ㎍/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 61.85, 79.60, 69.01, 77.38%로 나타났고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 60.20, 74.53, 70.44, 81.27%, 200 ㎍/㎖의 농도에서 63.08, 71.05, 67.05, 81.87%, 400 ㎍/㎖의 농도에서 51.48, 71.37, 47.95, 66.00%, 800 ㎍/㎖의 농도에서는 51.27, 41.70, 45.54, 57.95%를 나타내어 800 ㎍/㎖의 고농도 추출물에서 줄기와 잎 부위에서 상대적으로 양호한 항암 활성을 나타내었고 다음으로 뿌리와 꽃 순으로 암세포 사멸 효과가 나타났다. 추출물의 폐암 세포주에 대한 IC_{50} 값은 뿌리 800 ㎍/㎖ 이상, 줄기 689.76 ㎍/㎖, 잎 311.90 ㎍/㎖, 꽃 800 ㎍/㎖ 이상으로 나타나 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 부위 순으로 낮은 값을 나타냈다.

Collection @ chosun

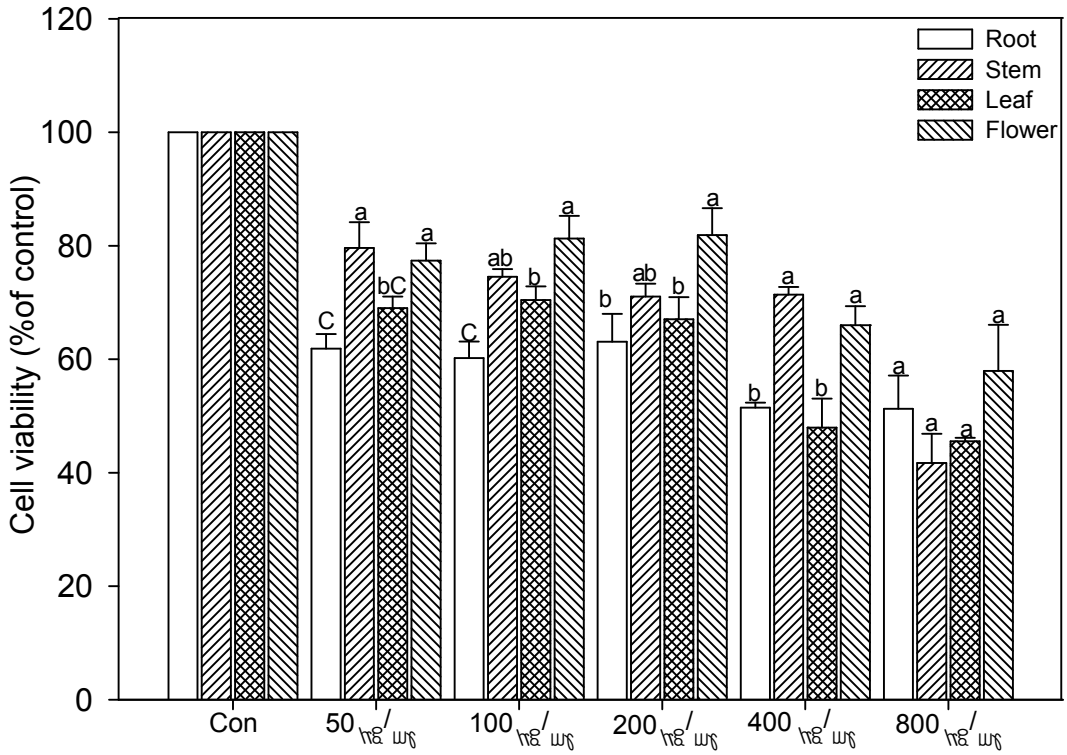


Fig. 6. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on Calu-6 cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

3) 유방암(MCF-7) 세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 유방암(MCF-7) 세포의 항암 효과를 측정하여 Fig. 7에 나타내었고 유방암(MCF-7)세포 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50}값은 Table 11에 나타냈다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 유방암(MCF-7) 세포 생존율을 측정 한 바, 추출물 농도 50 ㎍/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 64.52, 71.34, 78.00, 64.17%로 나타났고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 44.08, 46.66, 62.61, 44.29%, 200 ㎍/㎖의 농도에서 41.67, 45.27, 45.61, 42.67%, 400 ㎍/㎖의 농도에서 37.64, 38.91, 34.18, 43.12% 800 ㎍/㎖의 농도에서는 31.33, 29.98, 23.23, 32.09%를 나타내었다. 추출물의 유방암(MCF-7) 세포주에 대한 IC_{50} 값은 뿌리 113.84 ㎍/㎖, 줄기 150.03 ㎍/㎖, 잎 173.22 ㎍/㎖, 꽃 128.56 ㎍/㎖ 이상으로 나타나 농도 의존적으로 아주 강한 항암 활성을 보였으며 뿌리, 꽃, 줄기, 잎 부위 순으로 낮은 값을 나타냈다.

Collection @ chosun

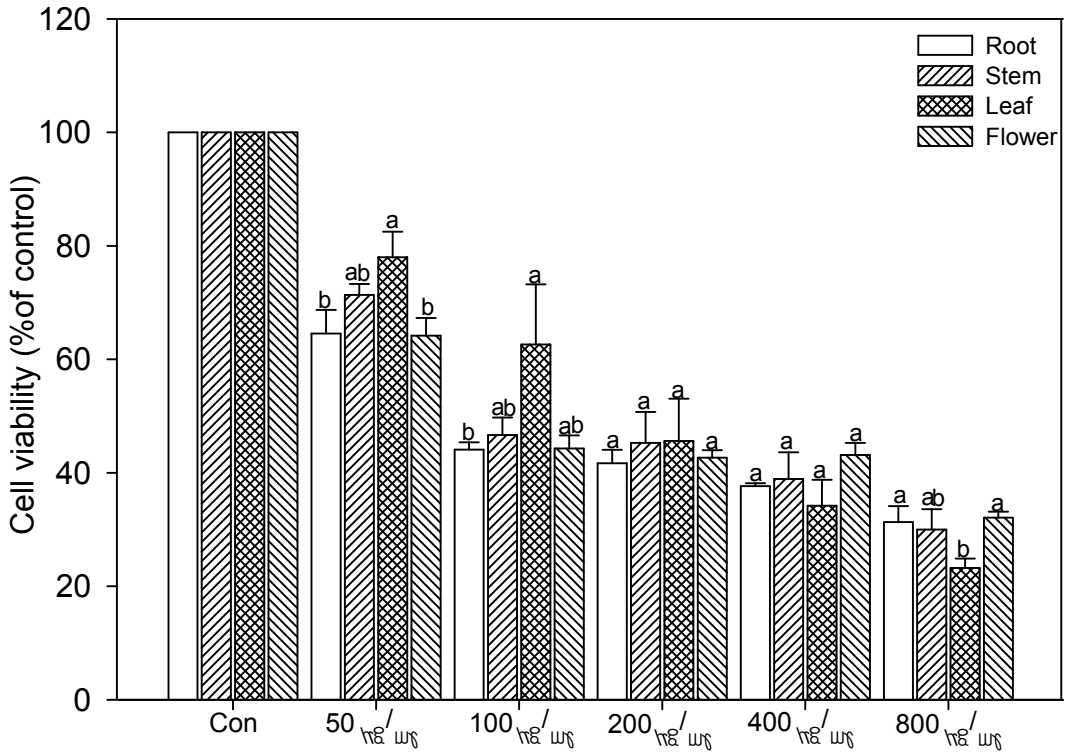


Fig. 7. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on MCF-7 cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

4) 대장암(HCT-116) 세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 대장암(HCT-116) 세포의 항암효과에 대한 결과는 Fig. 8과 같다. 대장암(HCT-116) 세포주의 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50} 값은 Table 11에 나타냈다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 대장암(HCT-116) 세포 생존율을 측정 한 바, 추출물 농도 50 ㎍/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 91.32, 66.88, 77.26, 70.77%로 나타났고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 84.66, 100.60, 64.66, 85.26%, 200 ㎍/㎖의 농도에서 87.31 ,63.71, 67.57, 81.87%, 400 ㎍/㎖에서 87.39, 88.48, 83.32, 68.86%, 800 ㎍/㎖의 농도에서는 76.64, 79.93, 86.20, 79.98%를 나타내어 뿌리, 줄기, 잎, 뿌리 네 부위 모두 800 ㎍/㎖의 고농도에서도 70% 이상의 세포 생존율을 보여 항암 활성의 정도가 매우 낮거나 없는 것으로 사료되며, 추출물의 대장암(HCT-116) 세포주에 대한 IC_{50} 값도 모든 부위가 800 ㎍/㎖로 측정 범위를 벗어나 농도 의존적이지 않았으며 높은 측정값을 나타냈다.

Collection @ chosun

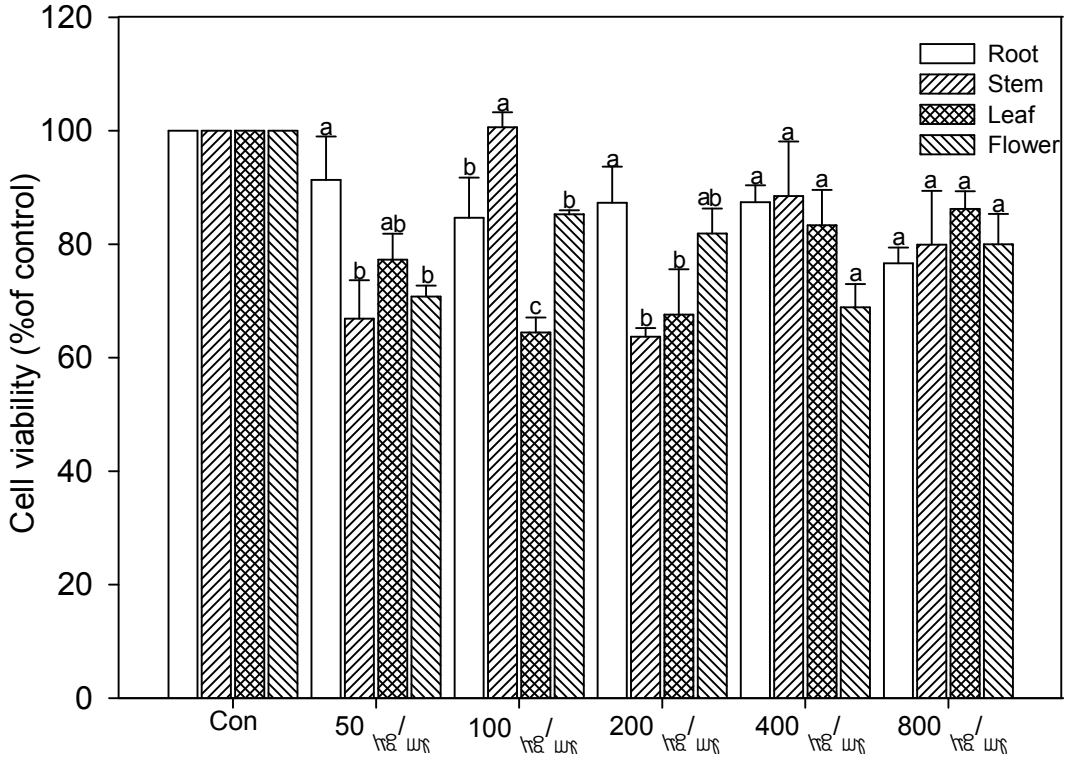


Fig. 8. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HCT-116 cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

5) 후두암(SNU-1066) 세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 후두암(SNU-1066) 세포의 항암 효과를 측정하여 Fig. 9에 나타내었고 후두암(SNU-1066) 세포주의 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50} 값은 Table 11에 나타내었다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 후두암(SNU-1066) 세포 생존율을 측정 한 바, 추출물 농도 50 ㎍/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위에서 각각 79.22, 58.51, 90.32, 64.51%로 나타났고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 62.27, 56.29, 86.83, 64.75%, 200 ㎍/㎖의 농도에서 59.53, 53.68, 88.50, 66.12%, 400 ㎍/㎖의 농도에서 56.94, 47.52, 96.81, 63.49%, 800 ㎍/㎖의 농도에서는 41.26, 46.42, 84.80, 51.06%를 나타내었다. 잎 부위의 후두암(SNU-1066) 세포 생존율이 추출물 800 ㎍/㎖의 고농도에서 84.80%를 보임에 따라 잎 부위에서의 항암활성은 매우 저조한 것으로 사료되며 추출물의 후두암(SNU-1066) 세포주에 대한 IC_{50} 값은 뿌리와 줄기가 각각 556.02, 466.29 ㎍/㎖로 낮은 값을 보였고 잎, 꽃 부위는 모두 800 ㎍/㎖ 이상으로 나타나 높은 측정값을 보였다.

Collection @ chosun

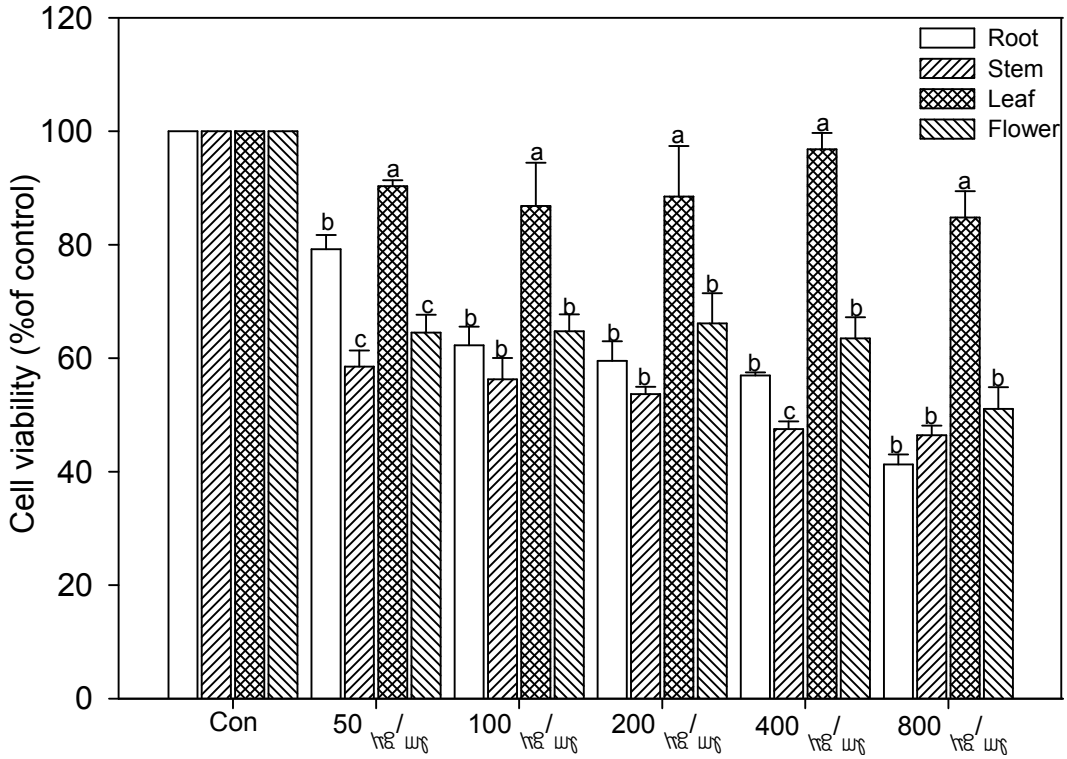


Fig. 9. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on SNU-1066 cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

3.4.2 신장(HEK293)세포주의 생존율

야생 왕고들빼기의 MTT assay에 의한 부위별 인체 정상 신장(HEK293) 세포주의 생존율을 측정하여 Fig. 10에 나타내었고 신장(HEK293) 세포주의 생존율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC_{50} 값은 Table 11에 나타내었다.

왕고들빼기의 부위별 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 단계별 신장(HEK293) 세포주의 생존율을 측정 한 바, 추출물 농도 50 ㎍/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 117.74, 81.18, 107.10, 103.14%로 나타났고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 113.33, 94.60, 114.61, 87.04%, 200 ㎍/㎖의 농도에서 114.45, 86.07, 97.34, 79.16%, 400 ㎍/㎖에서 99.43, 87.45, 95.00, 80.98%, 800 ㎍/㎖의 농도에서는 106.46, 82.57, 93.95, 84.11%를 나타내어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 네 부위 모두 정상 신장(HEK293) 세포주의 생존율이 80% 이상으로 나타나 고들빼기 부위별 추출물의 세포 독성은 나타나지 않는 것으로 보이며 이와 같은 결과는 암세포에 관하여 선택적인 사멸이 가능할 것으로 사료된다. 추출물의 정상 신장(HEK293) 세포주에 대한 IC_{50} 값은 모든 부위에서 800 ㎍/㎖로 높은 값을 보여 세포 생장이 매우 안정적으로 나타났다.

Collection @ chosun

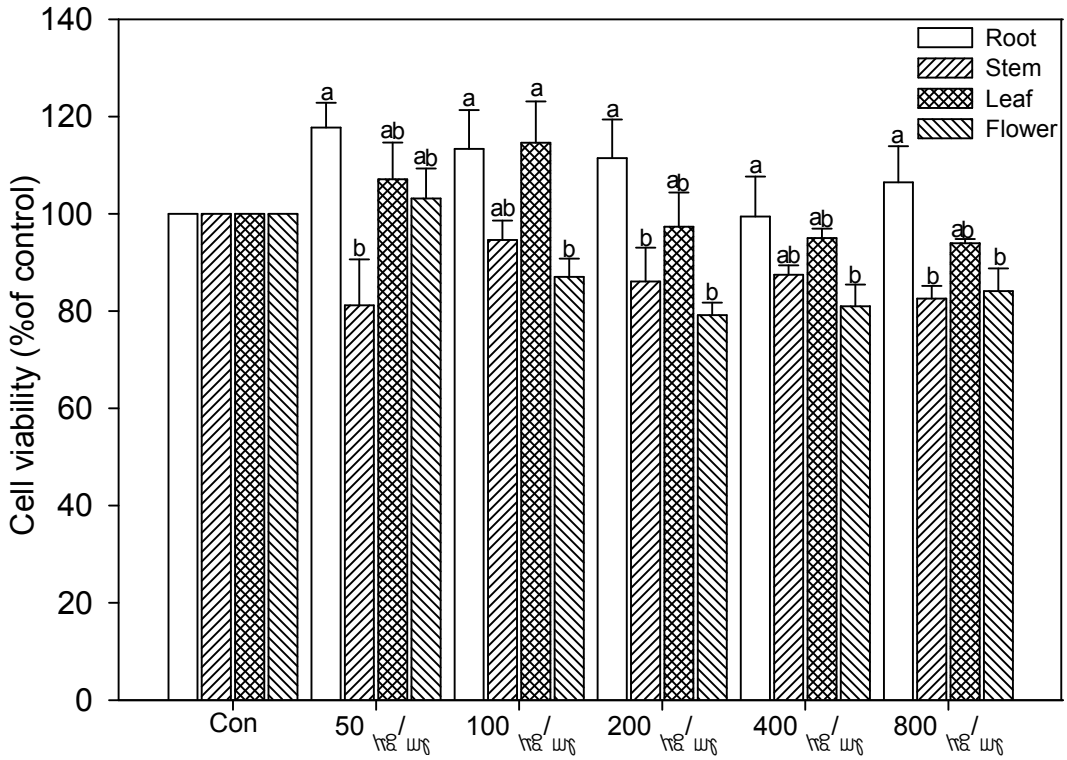


Fig. 10. The viability of cell by methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on HEK293 cell.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

Table 11. The effect of IC_{50} (㎍/㎖) of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* on five different cancer cell lines and Human Embryonic Kidney 293(HEK293) cell.

Plant Part	*IC_{50} (㎍/㎖)					
	Cell line					
	HeLa	Calu-6	MCF-7	HCT-116	SNU-1066	HEK293
Root	535.81	>800	113.84	>800	556.02	>800
Stem	308.27	689.76	150.03	>800	466.29	>800
Leaf	266.28	311.90	173.22	>800	>800	>800
Flower	>800	>800	128.56	>800	>800	>800

*Extract concentrations, which show 50% cell viability of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica*.

Collection @ chosun

3.5 항균 활성 효과

3.5.1 균주별 항균 활성 효과

야생 왕고들빼기의 부위별 추출물을 agar diffusion assay를 이용한 항균활성을 Fig. 11과 Table 12에 나타냈다. 시험한 6종의 균주 *Escherichia coli, Malassezia furfur, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, Salmonella enterica* subsp, *Listeria monocytogenes*에 대해 *Salmonella enterica subsp, Listeria monocytogenes*를 제외한 대부분의 왕고들빼기 부위별 추출물에서 항균활성이 나타났으며, *Salmonella enterica subsp, Listeria monocytogenes*는 다른 균들과는 달리 항균활성이 없는 것으로 나타났다.

*Escherichia coli*는 왕고들빼기 추출물의 줄기와 꽃 부분에서 높은 항균활성을 보였고, 다음으로 잎과 뿌리에서 양호한 항균활성을 보였다. Choi 등(2012)의 *Escherichia coli*의 돌나물의 메탄올 추출물 분획 간 항균활성 실험에서는 clear zone이 8~13 mm 정도의 항균활성 효과가 나타났다고 보고하였다. 이는 왕고들빼기의 줄기와 뿌리 부분의 clear zone인 30 mm에 못 미치는 것으로 *Escherichia coli*에 대한 왕고들빼기의 항균 활성이 뛰어난 것으로 사료된다.

*Malassezia furfur*에서는 clear zone이 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위 모든 부분에서 30 mm 이상으로 고르게 나타나 *Malassezia furfur*에 대한 항균 활성이 뛰어난 것을 확인하였다. Yang과 Boo(2013)의 연구에서 시설재배 오이의 *Malassezia furfur*에 대한 항균 활성 clear zone이 14 mm 나타났고, Lee 등(2007)이 연구한 구절초 추출물 30%를 함유한 시제품에서 18 mm 의 비교적 높은 clear zone이 생성되었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 동일한 국화과인 왕고들빼기의 *Malassezia furfur*에 대한 항균 활성도도 높음을 간접적으로 증명하는 것으로 사료된다.

*Staphylococcus epidermidis*는 뿌리, 잎, 꽃 부위에서 상대적으로 줄기보다 높은

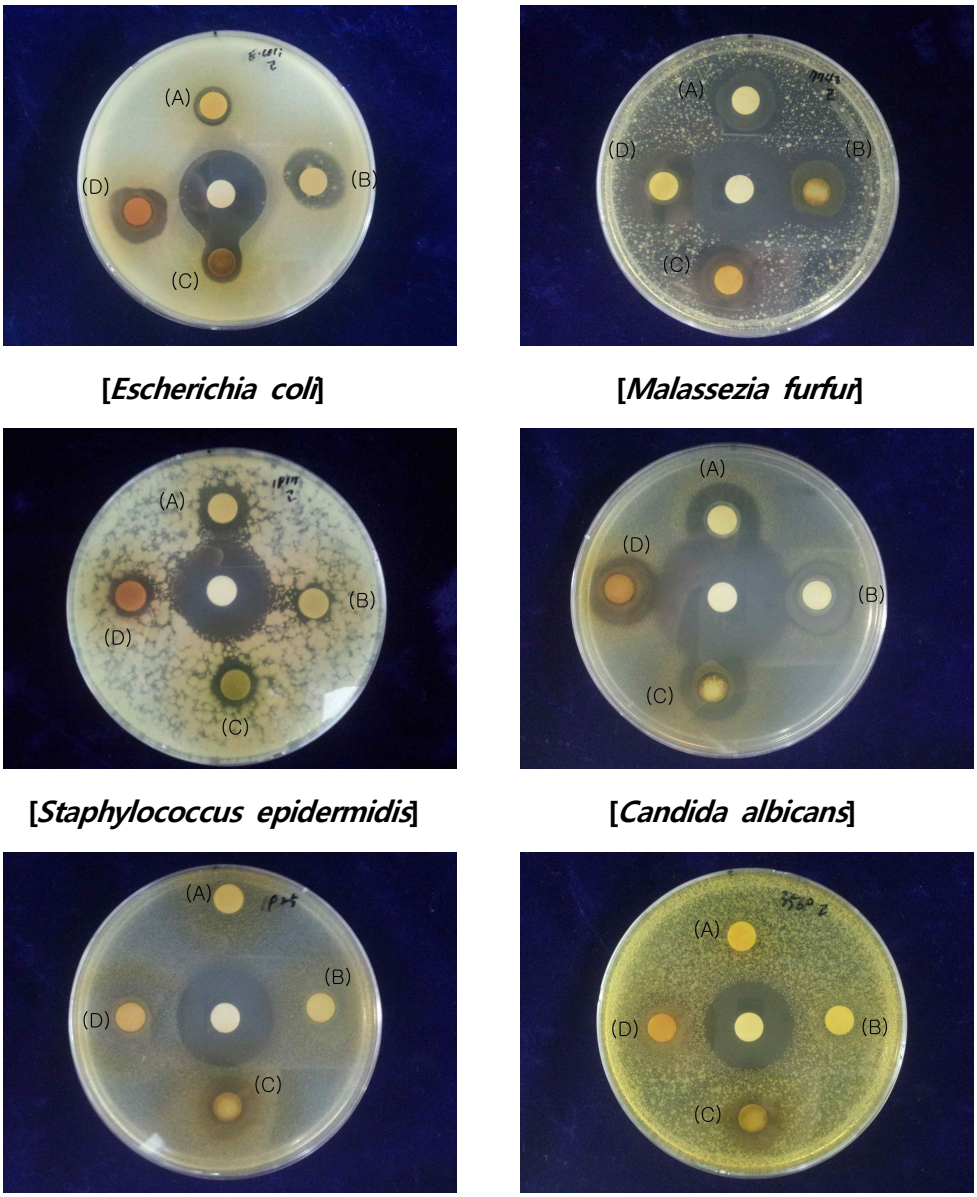
Collection @ chosun

항균 활성을 보였고 clear zone은 20~25 mm로 *Escherichia coli, Malassezia furfur* 에 대한 결과와 비교하여 clear zone이 좁게 나타나는 결과를 보였다. Cho 등(2008)의 항균실험에서 쇠비름의 항균활성이 40 mm clear zone을 나타내 뛰어난 *Staphylococcus epidermidis* 의 항균력을 나타냈다고 보고하였다.

*Candida albicans*는 *Malassezia furfur*에서처럼 저해환이 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 모든 부위에서 30 mm 이상으로 매우 좋은 항균 활성을 나타내었으며, Jang 등(2003)의 연구에서는 산초나무 황벽나무 등에서 15 mm 이상의 저해환을 나타냈다고 보고하였다. 항균 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있는 산초나무와 비교 하여 왕고들빼기가 *Candida albicans*에 대한 항균 활성도가 높은 결과를 제시해 주었다.

Salmonella enterica subsp, *Listeria monocytogenes*에서는 왕고들빼기의 부위별 항균력에서 저해환이 거의 나타나지 않았다. 위의 두 가지 균주에 대해서는 항균 활성이 없는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 왕고들빼기가 모든 균주에 대한 항균력을 나타내지 않지만 선택적 균주에 대해 뛰어난 항균력이 있어 특정 균주 관련 질병의 치료 및 예방에 효과적인 것으로 사료된다.

Collection @ chosun



[*Escherichia coli*] [*Malassezia furfur*]

[*Staphylococcus epidermidis*] [*Candida albicans*]

[*Salmonella enterica* subsp] [*Listeria monocytogenes*]

Fig. 11. Inhibitory activity of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica* against the microorganism in paper disc diffusion assay.
A: Root of the *Lactuca indica* B: Stem of the *Lactuca indica*
C: Leaf of the *Lactuca indica* D: Flower of the *Lactuca indica*

Collection @ chosun

Table 12. Inhibitory activity against the microorganism by agar diffusion method of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica*.

	Inhibition zone size (mm)			
	Root	Stem	Leaf	Flowers
Escherichia coli	++	++++	+++	++++
Malassezia furfur	+++++	+++++	+++++	+++++
Staphylococcus epidermidis	+++	++	+++	+++
Candida albicans	+++++	+++++	+++++	+++++
Salmonella enterica subsp	-	-	+	-
Listeria monocytogenes	-	-	-	-

+++++ : lager than 30mm, ++++ : 25~30mm, +++ : 20~25mm, ++ : 10~20, + : mm smaller than 10mm, - : not detected.

Collection @ chosun

3.6 Tyrosinase 활성 저해효과

야생 왕고들빼기의 부위별 tyrosinase 활성 저해효과를 확인하였고 Fig. 12에 나타냈다. Tyrosinase의 활성 저해 측정은 피부의 melanin 생합성의 기작을 아주 효율적으로 나타낼 수 있으므로 미백효과를 나타내는데 중요한 평가 방법이라 할 수 있다. 시료를 각각 0.5, 1, 2.5, 5 ㎎/㎖의 농도로 희석하여, tyrosinase 활성 저해효과를 구하였다. 농도 0.5 ㎎/㎖에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 2.75, 2.33, 4.56, 12.69%로 나타났고, 1 ㎎/㎖의 농도는 9.89, 10.41, 7.47, 14.48%, 2.5 ㎎/㎖의 농도에서는 11.80, 11.51, 17.81, 19.28%을 나타내었다. 시료 5 ㎎/㎖의 농도에서는 13.17, 14.11, 19.67, 21.01%로 나타나 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 저해효과가 높게 나타났으며, 모든 농도에서 꽃 부위의 tyrosinase 활성 저해효과가 가장 높게 나타났다. 뿌리와 줄기 부분의 시료는 대부분 비슷한 tyrosinase 활성 저해효과를 보였으며, 잎 부위의 시료에서 꽃 부위 다음으로 좋은 tyrosinase 활성 저해효과가 나타났다. Kim 등(2011)의 연구에서 선학초 에탄올 추출물의 경우 1000 ppm에서 58.4%의 저해활성을 나타내었으며, 열수추출물의 경우 같은 농도에서 27.5%의 활성을 나타냈다고 보고하였고, Yang과 Boo(2013)의 오이 추출물에 대한 tyrosinase 활성 저해효과에서는 대부분 0.1 ㎎/㎖의 농도에서 17% 이하의 저해활성을 보였다고 보고하였다.

Collection @ chosun

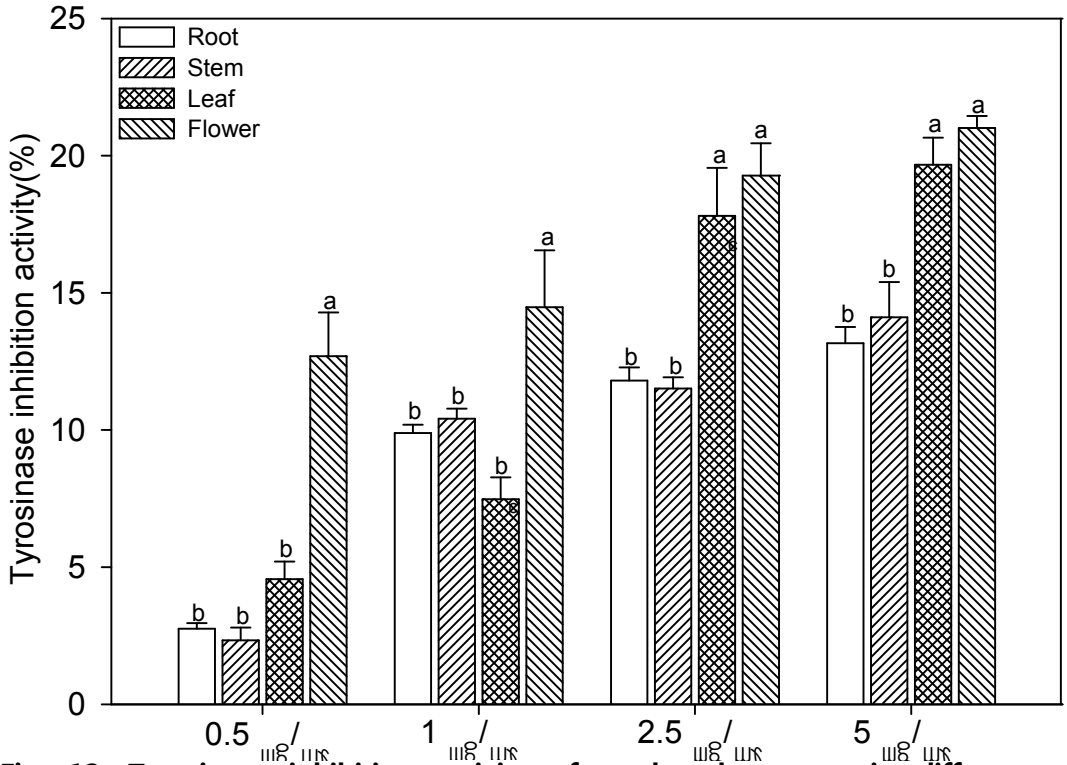


Fig. 12. Tyrosinase inhibition activity of methanol extracts in different parts from *Lactuca indica*.

Bars represent the standard error of the mean.

Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Collection @ chosun

4. 결 론

본 연구는 야생 왕고들빼기의 부위별(뿌리, 줄기, 잎, 꽃) methanol 추출물에 대한 polyphenol 및 flavonoid 함량, 항산화 활성, 항산화 효소 활성, 항암 및 항균활성, tyrosinase 저해활성을 측정하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

1. 야생 왕고들빼기의 부위별 총 폴리페놀 함량은 잎, 줄기, 뿌리, 꽃이 각각 35.09, 15.44, 13.50, 12.50%로 잎이 가장 높은 함량을 보였고, 총 플라보노이드 함량은 26.90, 6.20, 5.34, 1.43%로 총 폴리페놀과 마찬가지로 잎에서 가장 많은 함량을 보였다. 이는 플라보노이드가 폴리페놀의 일종이며 그 함량도 비례적으로 높음을 알 수 있다.
2. 야생 왕고들빼기의 부위별 DPPH radical 소거 활성력은 10 ㎎/㎖에서 잎 90.37%, 줄기 64.23%, 뿌리 32.65%, 꽃 32.54%로 나타났다. 이는 소거능의 대조구로 사용된 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole 의 97% 와 왕고들빼기 잎 부위에서 90.37% 로 비슷한 높은 항산화 소거 활성력을 보였고 줄기, 뿌리, 꽃 부위는 이에 약간 미치지 못하는 결과를 도출하였다.
3. 야생 왕고들빼기의 부위별 ABTS radical 소거 활성력은 20 ㎎/㎖에서 잎에서 99.84%로 가장 좋은 활성력을 보였고 꽃, 뿌리, 줄기가 각각 65.32, 48.22, 45.62% 순으로 좋은 활성력을 나타냈다. 마찬가지로 IC_{50} 값도 잎, 꽃, 뿌리, 줄기에서 각각 6.70, 13.69, 20.26, 21.07 ㎎/㎖ 순으로 잎 부분에서 가장 낮은 값을 보였다.
4. 왕고들빼기의 아질산 소거능은 pH에 상당히 의존적으로 나타났으며, pH 1.2에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 55.36, 55.28, 21.49, 21.25%로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위 순으로 높은 활성을 보였고, pH 4.2에서는 49.85, 42.35, 12.36, 10.33%로 pH 1.2 에서와 마찬가지로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위 순으로 좋은 활성력을 보였으며, pH 6.0에서는 활성이 모두 나타나지 않았다.

Collection @ chosun

5. 야생 왕고들빼기 부위별 SOD 활성, 즉, SOD 효소 활성이 NBT (nitroblue tetrazolium) 의 환원을 저해하는 능력 검정에서 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각 85.05, 89.43, 90.71, 85.40%로 부위별 모든 부분이 80% 이상으로 높은 활성을 보였고 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 순으로 높은 활성을 보였다. APX 활성에서는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 660.27, 164.55, 88.25, 165.26 μM ascorbate oxidized /min/mg protein 등으로 나타나 APX는 뿌리, 꽃, 줄기, 잎 순으로 높은 항산화 효소 활성을 보였다. CAT 효소 활성은 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 13.92, 2.77, 4.39, 3.72 μM H_2O_2 decomposed/min/mg protein 순으로 좋은 항산화력을 보여 뿌리에서 가장 좋은 항산화 효과를 나타내었다. POX 효소 활성에서는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 부위가 각각 3.91, 7.04, 1.03, 5.71 μM tetraguaiacol formed/ min/mg protein로 줄기와 꽃 부위에서 비교적 좋은 활성상태를 보였다. SOD는 모든 부위에서 높은 항산화력을 보였고, APX와 Catalase는 뿌리 부위에서 좋은 활성을 보였으며 POX는 줄기와 꽃 부위에서 양호한 활성력을 보였다.
6. 야생 왕고들빼기의 부위별 항암 활성효과는 유방암 세포주(MCF-7)에서 IC_{50} 값이 뿌리 113.84 ㎍/㎖, 줄기 150.03 ㎍/㎖, 잎 173.22 ㎍/㎖, 꽃 128.56 ㎍/㎖ 로 모든 부위에서 가장 낮은 값을 보여 유방암 세포주에 대한 항암 활성력이 가장 좋은 것으로 나타났고, 자궁경부암 세포주(HeLa) 의 IC_{50} 값이 잎 266.28 ㎍/㎖, 줄기 308.27 ㎍/㎖, 뿌리 535.81 ㎍/㎖로 나타나 항암 활성력이 있는 것으로 나타났으며, 폐암 세포주(Calu-6), 후두암 세포주(SNU-1066) 순으로 그 효과가 좋았으며, 대장암 세포주(HCT-116)는 항암 활성 효과가 미미하였다. 인체 정상 신장 세포주 (HEK293)는 추출물의 농도가 800 ㎍/㎖의 고농도에서도 대부분 80% 이상의 생존율을 보여 암 세포주, 특히 유방암 세포주(MCF-7)와의 선택적 사멸 기작을 나타내었다.
7. 시험에 사용된 6종의 균주 *Escherichia coli, Malassezia furfur, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, Salmonella enterica* subsp, *Listeria monocytogenes*에 대해 *Salmonella enterica* subsp, *Listeria monocytogenes*를

Collection @ chosun

제외한 대부분의 왕고들빼기 부위별 추출물에서 항균활성이 나타났으며, *Salmonella enterica* subsp, *Listeria monocytogenes*는 다른 균들과는 다르게 항균 활성이 없는 것으로 나타났다.

8. 추출물 최종 농도 5 ㎎/㎖에서 뿌리 13.17%, 줄기 14.11%, 잎 19.67%, 꽃 21.01%로 나타나 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 저해 효과가 높게 나타났으며, 모든 농도에서 꽃 부위의 tyrosinase 활성 저해 효과가 가장 높게 나타났다.

위의 실험에서 대부분의 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높은 부위에서 항산화, 항균, 항암 활성 등이 뛰어난 것으로 확인되었으며 암 세포주, 특히 유방암 세포주(MCF-7)에 높은 사멸 기작을 나타내었고 항균 활성에서도 특정 균주에 대한 사멸 기작을 보였다. 이는 향후 왕고들빼기의 폴리페놀 함량에 관한 심도있는 연구가 요구되며, 인체의 특정 질병에 대한 신약 개발 및 향장 소재 등으로의 다양한 활용 기능성이 있을 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

5. 참 고 문 헌

농림부. 2003. Development of high Quality Cynanchum Wilfordii Hemsley Food Products an Mechanistic Elucdation of its Antioxidant Activity.

Alscher, R.G. and J.L. Hess. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Ra ton 1993, 1-174.

Aruoma, O.I. ,H. Kaur and B. Halliwell. Oxygen free radical and human disease. *Journal of Royal Society of Health* 1991, 111:172-177.

Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature 1958, 26, 1199-1200.

Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, and Park SU. Different of Total Phenolics and Flavonoids, Radical Scavenging Activities and Nitrite Scavenging Effects of Momordica charantia L. According to Cultivars. Korean J. Medicinal Crop Sci 2009, 17(1) : 15-20.

Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH and Song WSAntioxidant Activity According to Each Kind of Natural Plant Pigments. Korean J. Plant Res 2011, 24(1) : 105-112.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72:248-254.

Chance B. and Maehly A.C. Assay of catalse and peroxidase. Methods Enzymol 1995, 2:764-775.

Cherry JP. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. Food Technol. Chicago 1999, 53: 54-59.

Chen G.X. and Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol 1989, 30:987-998.

Collection @ chosun

Cho EK and Choi YJ. Antioxidant, Antidiabetic, and Ant-Inflammatory Effects of Extracts and Fractions from Parthenocissus tricuspidata Stems. Journal of Life Science 2013, Vol. 23. No. 3. 399-405.

Choi JY, Kim HM, Mok SY,Choi K, Ku JJ, Park KW, Cho EJ, Lee SH. Antibacterial Activity and Protective Role against Gastric Cancer by Sedum sarmentosum. J Appl Biol Chem 2012, 55(3), 157-161.

Chon SU, Kang JG. Phenolics Level and Antioxidant Activity of Methanol Extracts from Different Plant Parts in Youngia sonchifolia Korean J. Crop Sci 2013, 58(1): 20-27.

Cho YJ, Ju IS, Kwon OJ, Chun SS, An BJ and Kim JH. Biological And Antimicrobial Activity of *Portulaca oleracea*. J. Korean Soc Apple. Biol. Chem 2008, 51(2), 49-54.

Egley G.H. Paul R.N., Vaughn K.C. and Duke SO. Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in sida spinosa L. Plant 1983, 157:224-232.

Fukujawa, K. and Y. Takaishi. Antioxidant. J. Act. Oxyg. Free rad 1990, 1, 55-70. Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J Food Sci* 1991, 55: 93-95.

Folin, O. and W. Denis. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. Journal of Biological Chemistry 1912, 12: 239-243.

Frei, B. 1994. Nonenzymatic antioxidant defense systems. Clarendon Press Oxford.

Greenstock, C. L. Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. Med Hypothesis 1993, 41, 473-478. Halliwell, B. Drug antioxidant effects. Drug 1991, 42, 56-605.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, NY, USA. 1999, pp. 246-350.

Collection @ chosun

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 1989, 119:203-210.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem 2002, 13: 572-584.

Hetog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. J. Agr. Food Chem 1993, 41: 1242-1246

Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. Plant Med 1994, 60: 417-420.

Jang SY, Ryu SY and Kim SD. Antifungal Activity of Plant Extracts against *Pityrosporum ovale* and *Candida albicans*. Kor. J. Pharmacogn 2003, 34(4): 303-307.

Jeong, H.J., E.H. Kim, K.J. Lee, G.Y. Chung, J.K. Lim, J.M. Yoo, Y.E. Shim and J.H. Park. Evaluation of the antioxidant potential and enzyme activities in species of Rhus. Korean J. Plant Res 2001, 14(3):220-228.

Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on super – oxide radical. Food Chem 1999, 64: 555-559.

Joo SY. Antioxidant Activities of Medicinal Plant Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 2013, 42(4), 512-519.

Kang KM and Lee SH. Effects of Extraction Methods on the Antioxidative Activity of Artemisia sp. J Korean Soc Food Sci Nutr 2013, 42(8), 1249-1254.

Kang N.J, J.K. Kwon, H.C. Lee, H.B. Jeong and H.T. Kim. Antioxidant enzymes as

Collection @ chosun

defense mechanism against oxidative stress induced by chilling in Cucurbita ficifolia leaves. J. Kor. Hort. Sci 2003, 44(5):605-610.

Kim DH, An BJ and Lee JY. Whitening Activities of the Agrimonia pilosa L. Extracts. Appl. Biol. Chem 2011, 54(4), 284-289.

Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Mi Kim MY, Lee SH, and Lee BH. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 2012, 44, No. 3, pp. 337-342.

Kim JM, Kim JN, Lee KS, Shin SR and Yoon KY. Comparison of Physicochemical Properties of Wild and Cultivated Lactuca indica. J Korean Soc Food Sci Nutr 2012, 41(4), 526-532.

Kim JN, Kim JM and Lee KS, Antioxidant Activity of Methanol Extracts from Lactuca indica Korean J Food Preserv 2012, 19(2), 294-300.

Kim MJ, Lee E, Cha BC, Choi MY, Rhim TJ and Park HJ. Serum Cholesterol Lowering Effect of Triterpene Acetate Obtained from Lactuca indica. Kor. J. Pharmacogn 1997, 28(1): 21-25.

Kim SJ, Shin JY, Park YM, Chung KM, Lee JH, Kweon DH. Investigation of antimicrobial activity and stability of ethanol extracts of licorice root (Glycyrrhiza glabra). Korean J. Food Sci. Technol 2006, 38: 241-248.

Kim SO. Development of Functional Food Materials Using Traditional Native Plant Medicines. Food industry and nutrition 2013, Vol.18 No.2 pp. 12-16.

Kim TY, Jeon TW, Yeo SH, Kim SB, Kim JS and Kwak JS. Antimicrobial, Antioxidant and SOD-Like Activity Effect of *Jubak* Extracts. Korean J. Food & Nutr 2010, Vol. 23. No. 3, 299-305.

Lee HD, Huh SS. Growth characteristics and manufacturing Process and utilization of Lactuca indica L.(wang-godulppaegi). Korean J. plant. Res 1996, 9(1) 41-46.

Collection @ chosun

Lee HJ, Kim KH, Park JK, Hwang EH. Effects of Artemisia Capillaris Thunberg on Apoptosis in HeLa Cells. The Korean journal nutrition 2008, Vol.41 No.1, pp, 22-30.

Lee SH and Lee JS. Production and Characteristics of Antidandruffy Compound from *Chrysanthemum zawadskii.* Kor. J. Microbial. Biotechnol 2007, Vol. 35, NO.3, 220-225.

Li, H. S. Yashiki, J. Sonoda, H. Lou, S. Ghosh, J. Byrnes, C. Lema, T. Fujiyoshi, M. Karasuyama, and S. Sonoda. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheralblood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. Cancer Sci 2000, 91, 34-40.

Mishra N.P., Mishra R.K. and Singhal G.S. Changes in the Activities of Anti-Oxidant Enzymes during Exposure of Intact Wheat Leaves to Strong Visible Light at Different Temperatures in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors. Plant Physiol 1993, 102:903-910.

Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park GS and Choi KH. Antioxidative and Nitrite Scavenging Activities of Mugwort and Pine Needle Extrats. Korean Journal of Food Preservation 2002, vol. No. 2, pp248-252.

Park JC, Lee HY. Screening of Medicinal Plants on the Anti-inflammatory Effect and Active Component. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 1996, pp. 523-528.

Pellegrini M, Baldari CT. Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr MolMed* 2009, 9: 392-398.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Catherine RE Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloraztion assay. Free Radical Biol Med 1999, 26, 1231-1237.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997, 2: 152-159.

Collection @ chosun

Seo HS, Chung BH, Cho YG. The Antioxidant and Anticancer Effects of Butterbur (Petasites japonicus) Extracts. Korean J. Plant Res 2008, 21(4) : 265-269.

Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM, Kim SY. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of Saxifraga stolonifera. Korean J. Microbiol. Biotechnol 2008, 36: 195-200.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol 2007, 39: 44-84.

V.J. Hearing, M. Jimenez Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment, Int. J. Biochem 1987, 19(12), 1141.

Wheeler, G.L., M.A. Jones and N. Smirnoff. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature 1998, 393(6683):363-369.

Yang SY and Boo HO. Phenolic Compounds, Antimicrobial Effects and Tyrosinase Inhibition Activities of Cucumber Grown Greenhouse According to Cultivars and Growth Stages. Korean J. Plant Res 2013, 26(5):645-651.

Yim JA, Lee ES, Baek sh. Antioxidative Activity and Nitrite Ability of Ethanol Extract from Nelumbo nucifera Leaves. Korean J. Oriental Physiology& Pathology 2008, 22(3):654-659.

Collection @ chosun