



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2016년 8월
석사학위 논문

와송(*Orostachys japonicus* A.)의
기내배양과 유용물질의 생리활성에
관한 연구

조선대학교 대학원

생 명 과 학 과

김 승 미

와송(*Orostachys japonicus* A.)의
기내배양과 유용물질의 생리활성에
관한 연구

A study on *in vitro* culture of *Orostachys japonicus* A.
and physiological activity of extract

2016년 8월 25일

조선대학교 대학원

생명과학과

김승미

와송 (*Orostachys japonicus* A.)의
기내배양과 유용물질의 생리활성에
관한 연구

A study on *in vitro* culture of *Orostachys japonicus* A.
and physiological activity of extract

지도교수 박 현 용

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2016년 4월

조선대학교 대학원

생 명 과 학 과

김 승 미

김승미의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 조 태 오 (인)

위 원 조선대학교 교수 송 상 기 (인)

위 원 조선대학교 교수 박 현 용 (인)

2016년 5월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables	III
List of Figures	IV
Abstract	VI
제 1 장 서론	1
제 2 장 재료 및 방법	3
2.1 재료식물 및 시료의 추출	3
2.2 실험 방법	5
2.2.1 Tissue culture	5
가. 성장조절제의 영향	5
나. Callus culture	7
2.2.2 생리활성의 측정	8
가. 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정	8
(1) 총 폴리페놀 함량 측정	8
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	9
나. 항산화 활성 능력 측정	10
(1) DPPH radical 소거활성	10
(2) ABTS radical 소거활성	11
(3) 아질산염 소거활성	12
다. 항산화 효소활성 측정	13
(1) 효소액의 조제	13
(2) Catalase (CAT)의 활성 측정	13
(4) Ascorbate Peroxidase (APX)의 활성 측정	13
(5) Peroxidase (POX)의 활성 측정	14
라. Tyrosinase 활성 저해효과 측정	15
2.2.3 항균활성 측정	16

가. 사용 균주 및 배지	16
나. 균주의 배양 및 항균활성 효과 측정	16
2.2.4 항암활성 효과	22
가. 세포의 배양	22
나. 인체 암세포의 생존율 측정	22
2.2.5 통계처리	23
제 3 장 결과 및 고찰	24
3.1 Tissue culture	24
3.1.1 성장조절제의 영향	24
3.1.2 Callus culture and plant regeneration	33
3.2 생리활성 측정	39
3.2.1 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량	39
3.2.2 항산화 활성 능력	42
가. DPPH radical 소거활성	42
나. ABTS radical 소거활성	44
다. 아질산염 소거활성	46
3.2.3 항산화 효소활성	48
3.2.4 Tyrosinase 활성저해 효과	53
3.3 항균활성 효과	55
3.4 MTT assay에 의한 인체 암세포 생존율	59
3.4.1 폐암 세포주(Calu-6)의 생존율	60
3.4.2 유방암 세포주(MCF-7)의 생존율	62
3.4.3 대장암 세포주(HCT-116)의 생존율	64
제 4 장 요약 및 결론	67
제 5 장 참고문헌	68

List of Tables

Table 1.	List of strains and cultivation condition used for screening of antimicrobial activity test	17
Table 2.	Composition of brain heart infusion agar	18
Table 3.	Composition of nutrient agar	19
Table 4.	Composition of YM Agar + 1% olive oil	20
Table 5.	Composition of trypticase soy agar	21
Table 6.	Effects of 2,4-D/BAP concentration on root or callus formation of <i>O. japonicus</i> explants at 5 weeks after culture	28
Table 7.	Effects of 2,4-D/BAP concentration on root or callus formation of <i>O. japonicus</i> explants at 5 weeks after culture	32
Table 8.	Total polyphenol and flavonoid contents of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	41
Table 9.	DPPH (100 μM) radical scavenging activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	43
Table 10.	ABTS radical scavenging activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	45
Table 11.	Nitrite scavenging activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	47
Table 12.	Inhibition zone size against the microorganism by agar diffusion method of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	58
Table 13.	IC ₅₀ (μg/mL) of solvent extracts from <i>O. japonicus</i> on three cancer cell lines	66

List of Figures

Fig. 1	Schemes of solvent fractionation from <i>Orostachys japonicus</i>	4
Fig. 2	The cutting direction of <i>O. japonicus</i> leaf and explants placed in an array on medium.	6
Fig. 3	Effects of various concentration of 2,4-D/BAP on callus formation of <i>O. japonicus</i> 5 weeks after culture	27
Fig. 4	Effects of 2,4-D concentrations on the adventitious root formation of <i>O. japonicus in vitro</i> culture at 5 weeks after culture	29
Fig. 5	Formation of roots from explants of <i>O. japonicus</i> at 4 weeks after culture on medium supplemented with 100 μ M 2,4-D and 0.5 μ M BAP	30
Fig. 6	Effects of 2,4-D/BAP concentrations on callus formation from leaf explant of <i>O. japonicus</i> at 4 weeks after culture	31
Fig. 7	Four kinds of callus developed from <i>O. japonicus</i> leaf esplant at 4 weeks after culture	36
Fig. 8	Plantlet regeneration from the deep green callus with the smooth surface from leaf explants of <i>O. japonicus</i>	37
Fig. 9	Plant regeneration from the callus which has heaps of small and solid lumps in tissue culture from <i>O. japonicus</i>	37
Fig. 10	<i>In vitro</i> micropropagation of <i>O. japonicus</i>	38
Fig. 11	APX activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	50
Fig. 12	CAT activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	51
Fig. 13	POX activities of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	52

Fig. 14 Tyrosinase inhibition activity of solvent extracts from <i>O. japonicus</i>	54
Fig. 15 Inhibition activity of solvent extracts from <i>O. japonicus</i> against the microorganism in paper disc diffusion assay	57
Fig. 16 Effects of solvent extracts from <i>O. japonicus</i> on cell viability of Calu-6 cell	61
Fig. 17 Effects of solvent extracts from <i>O. japonicus</i> on cell viability of MCF-7 cell	63
Fig. 18 Effects of solvent extracts from <i>O. japonicus</i> on cell viability of HCT-116 cell	65

ABSTRACT

A study on in vitro culture of *Orostachys japonicus* A. and physiological activity of extract

Seung Mi, Kim

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

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

In the tissue culture using leaf tissue of *Orostachys japonicus*, callus were induced most efficiently in 5-week-after culture in the MS medium supplemented with 10 μM BAP and 4 μM 2,4-D at the growth condition of 24°C 6500 lux 16 hr-day-length. Adventitious roots developed in all the medium supplemented with 0, 0.1, 1 μM 2,4-D whereas roots formed only in the uppersides of the leaflets not in contact with MS medium containing 0.5 μM BAP and 100 μM 2,4-D. Shoot regeneration was observed when callus induced in the MS medium containing 10 μM BAP and 4 μM 2,4-D was transplanted in to the MS medium without any plant growth regulators. Massive proliferation methods given by these tissue culture methods for *O. japonicus* might provide efficient ways to its production.

The ethylacetate fraction extract for *O. japonicus* contained 634.48 $\mu\text{g/ml}$ polyphenol and 205.20 $\mu\text{g/ml}$ flavonoid. The polyphenol and flavonid contents of *O. japonicus* were 0.16 \times and 3.3 \times higher than those of *Aronia* a source of well-known health supplement food, respectively. The ABTS radical scavenging ability of ethylacetate fraction extract at 1 mg/ml was higher than 95% which is comparable to ascorbic acid of 97%. The APX enzymatic activity and catalase activity were 1125.89 μmol ascorbate oxidized/min/mg protein and 119.87 H_2O_2 decomposed/min/mg protein, respectively. In disc agar plate diffusion assay, the extract

gave rise to a larger inhibition circle with *Lissteria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Malassezia furfur* strains compared with antibiotics kanamycin suggestive of high antibiotic activity. These results suggest that fraction extract of *O. japonicus* might be very effective and economical in developing natural antioxidant and antibiotic.

Key words : *Orostachys japonicus*, tissue culture, the fraction extract, antioxidant, antibiotic

제 1 장 서 론

와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 암송, 옥송, 작엽하초, 바위솔 등으로 불리는 돌나물과의 식물로, 가을에 추대되어 종자의 성숙과 함께 고사하는 일년생 식물이다[1,2]. 이러한 식물특성 때문에 자연산 와송은 주로 가을에 출하되며, 인공재배된 와송도 꽃대가 고사하기 직전인 9~10월에 출하되어 생체로 이용될 수 있는 기간이 매우 짧다[3]. 최근 몇 년 동안 다양한 와송의 효능이 알려지면서, 와송의 수요가 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 와송의 노지재배를 위한 유묘의 생산 및 일장조절 온도조절 배양토와 플러그 트레이 규격 설정 등 다양한 연구가 진행되었다[4,5]. 현재까지 주로 연구된 와송의 대량번식을 위한 노지재배는 일조, 강수량, 해충 등에 의해 와송의 생산과 품질에 많은 영향을 줄 수 있으며, 또한 많은 비용과 노력이 요구된다.

기내 조직배양은 대량 번식[6], 무병주 생산에 의한 수량과 품질의 향상[7], 멸종위기 식물들의 자원 보존[8], 불임성 식물의 번식[9], 종·속간 교잡을 이용한新品种의 개발[10] 등에 이용되고 있다. 또한 F1 종자 생산용 웅성불임개체의 유지, 증식 등에 이용하고 있으며[11], 바이러스 감염의 문제로 인해 번식이 어려운 히야신스를 기내배양으로 바이러스 무병주 생산에 활용되었다[12]. 따라서 현재까지 연구된 와송의 노지재배와는 다른 방법인 조직배양을 이용한 대량번식의 방법이 개발된다면 기후, 해충 등에 영향을 받지 않고 무병주의 와송을 공급할 수 있으며, 노지재배에 비교하여 작은 공간에서 작은 비용과 노력으로 대량 생산을 할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 노지재배에서 9~10월에만 출하가 가능한 것을 연중생산으로 확대할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 와송의 조직배양을 통해 callus 유도과 plant regeneration에 관한 방법을 개발하고, 이를 이용하여 와송의 대량 번식에 대한 기초 연구를 시도하고자 하였다.

인간의 수명은 급격히 증가하고 있지만, 현대사회에서 각종 스트레스, 운동부족, 환경오염, 잘못된 식습관으로 인하여 노화, 암, 당뇨, 비만, 심장질환 등 각종 질환의 발병률이 증가되는 것으로 밝혀지고 있다[13]. 이를 위해 다양한 약용 식물들로부터 건강 기능성 식품개발을 위한 성분분석, 항산화, 항균, 항암, 항비만과 같은 효능의 연구가 활발하게 진행되고 있다[14, 15, 16]. 특히 과채류에 많이 함유되어 있는 페놀성 화합물과 플라보노이드, 아스코르빈산, 토코페롤과 같은 항산화물질은 세포의 손상을 가져오는 reactive oxygen species (ROS)의 작용을 억제하여 노화의 지연과 암, 심혈관계질환 등을 예방할 수 있는 것으로 보고되었다[17, 18]. 이러한 생리기능을 갖는 폴

리페놀 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechin isoflavonoes, lignans, resveratrols 등을 총칭하며, 식물의 광합성에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다[24]. 폴리페놀에는 다수의 하이드록실기(-OH)를 포함하고 있는데, 하이드록실기는 쉽게 다른 화합물들과 결합할 수 있기 때문에 폴리페놀이 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어난 것으로 밝혀져 있다[19,20]. 플라보노이드 (flavonoids)는 자연계에 널리 분포되어있는 화합물로, 폴리페놀과 같이 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위에 함유된 것으로 알려져 있다. 플라보노이드는 ROS를 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며[21], 폴리페놀과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다[22]. 최근 이와 같은 식물 추출물을 이용한 연구들이 진행되고 있으며, 와송의 추출물을 이용한 연구들 또한 다양하게 진행되고 있다. 인체 대장암 세포주에 와송 클로로포름 분획물 100 µg/ml 농도로 24시간 처리 후 50.19% 세포생존이 나타나는 결과가 보고되었고[23], 전립선 암세포주에 600 µg/ml 농도로 48시간 처리한 경우 10%의 세포생존율과, apoptosis 유도가 보고되었다[24]. 간암 세포주에 2.0 mg/ml 농도로 24시간 처리 후 약 40%의 세포생존율을 나타낸다고 보고되었다[25]. 와송 추출물을 처리한 경우 백혈병세포주의 apoptosis 유도단백질의 합성을 촉진시켰으며[27], 염증반응을 유도한 대식세포에 와송 Dichloro methane 추출물을 처리한 경우, nitric oxide(NO) 생성 억제를 확인하고, 항염증효과를 보고되었다[28]. 또한 식이성 고지혈증을 유발한 흰쥐에 와송 추출물의 경구투여를 한 흰쥐는 정상식을 한 흰쥐보다 체중이 감소하고, 중성지방의 함량이 감소하는 결과를 통해 와송이 항비만과 고지혈증에 대한 효과가 있다고 보고하였다[29]. 와송의 효능은 채취 시기[30], 건조방법[31], 추출용매를 다르게 하여 항암, 항산화, 항비만, 항염증 효과를 비교하여 연구되었다. 그러나 현재까지의 연구에서는 대부분 단일추출물에 관한 연구에 국한되어 있다. 따라서 본 논문에서는 와송을 n-hexane, methylenechloride, ethylacetate, n-butylalcohol, water를 이용하여 5가지 용매로 분획 추출하였고, 분획 추출물의 생리활성을 비교하였다. 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하였고, 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 알아보기 위하여 항산화능 및 항산화 효소 활성을 측정하였다. 또한, 다양한 균주들을 대상으로 와송 분획 추출물의 항균력을 측정하여 식품첨가물이나 생활용품 개발 등에 활용함으로써 식품산업 및 화장품산업에서의 이용가치를 타진하고자 하였다. 그리고 와송 분획 추출물별 폐암, 대장암, 유방암 세포주의 항암활성을 조사함으로써 암 예방 및 치료를 할 수 있는 건강 기능성 식품으로의 활용 가능성을 규명하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

2.1 재료식물 및 시료의 추출

노지에서 재배된 와송(*Orostachys japonicus*)을 2014년 7월 채취하여 실험에 이용하였다. 조직배양에 이용할 와송은 5~6 cm 크기의 잎을 선별하여 2% NaOCl 용액에 3회 살균 한 후, 멸균 증류수를 이용하여 2회 세척 하여 배양에 이용하였다.

폴리페놀과 플라보노이드 함량측정, 항산화, 미백, 항균 및 항암 활성능력 등 생리활성 실험을 위해 와송을 -70°C 이하 초 저온 냉동고(NIHON, Japan)에 5시간 이상 동결 시킨 후, 동결된 재료를 0.05 ~ 0.5 Torr(mmHg)로 -50°C 이하에서 완전하게 진공 동결 건조(IIshin, Korea)하여 이용하였다. 동결 건조된 와송 부피의 2배량(v/v)의 98% methanol에 48시간 이상 침지하여 총 3회에 걸쳐 반복 추출하였다. 이 추출액을 filter paper(Tokyo Roshi Kaisha, Ltd. 150mm Japan)를 이용하여 여과하였으며, 여과액을 $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축(BUCHI, Switzerland)하였다. 이 와송 methanol추출물을 분별 깔대기에 담아 (Fig. 2)과 같이 분획, 추출하였다. 분별 깔대기에 증류수 500 ml를 넣고, 극성이 낮은 n-hexane 500 ml를 첨가하여 24시간 이상 교반하여 분획, 추출하였다. 이후 methylenechloride 500 ml, ethylacetate 500 ml, n-butyl alcohol 500 ml로 차례대로 반복하여 분획, 추출하였다. 처음 첨가한 증류수의 분획물을 마지막으로 5가지 용매별 분획물을 획득하였다. 이 분획물을 감압 농축하여 완전히 건조 시킨 후, 냉동 보관하며 와송 분획 추출물로 실험에 사용하였다.

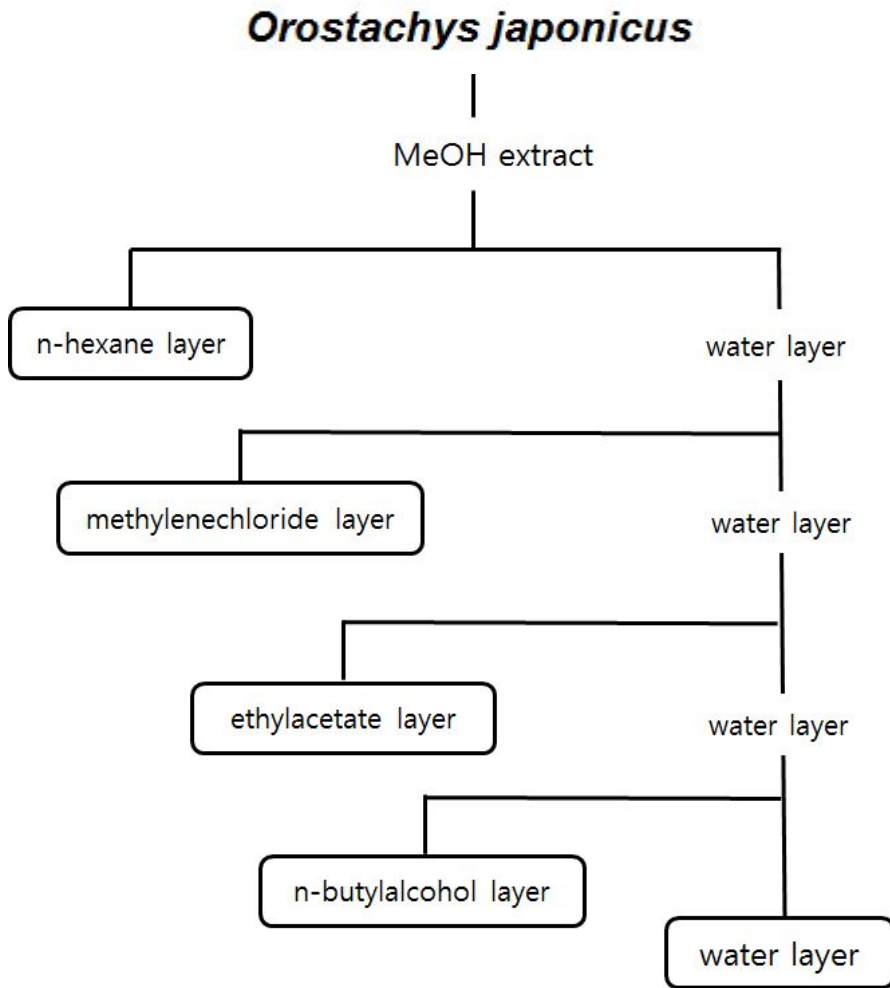


Fig. 1 Schemes of solvent fractionation from *Orostachys japonicus*.

2.2 실험 및 방법

2.2.1 와송의 Tissue culture

가. 성장조절제의 영향

배양에 이용할 와송의 잎 조직 절단방법은 fig. 1에 설명하였다. 5~6 cm 크기의 잎을 양 끝부분을 약 0.3 cm 정도를 제거하고 잎의 원부(distal), 중간부(middle), 근부(proximal)로 3등분한 후, 각 부위를 다시 약 0.6 cm의 두께로 3등분 하여 절편의 정단부가 위쪽을 향하게 치상하였다.

배양 배지는 sucrose 30 g/l, myo-inositol 100 mg/l를 첨가한 MS배지[32]에 0, 0.1, 1, 10, 100 μ M 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μ M BAP를 조합한 것을 HCl과 KOH를 이용하여 pH 6.2로 조정하였다. 121°C에 20분 고압살균(SANYO, Japan) 후, 60×10 mm petri dish에 10 ml씩 분주하였다. 각 배양접시 당 각 A, B, C 부위의 잎 절편 1개씩 총 3개의 잎 절편을 치상하였다. 2회 반복 실시하여 24°C 6500 lux의 광도로 16시간/일 광주기 조건으로 배양했으며, 조직배양에서 성장조절제에 의해 나타나는 상호작용을 측정하였다.

처음 실험의 결과에서 높은 농도의 성장조절제 조건이 요구되어 0, 4, 20, 100, 500 μ M 2,4-D와 0, 2, 10, 50, 250 μ M BAP를 조합, 배양하였다. 조건 당 3개의 잎 절편을 치상한 후, 24°C 6500 lux의 광도로 16시간/일 광주기 조건으로 배양하여 나타나는 결과를 조사하였다.

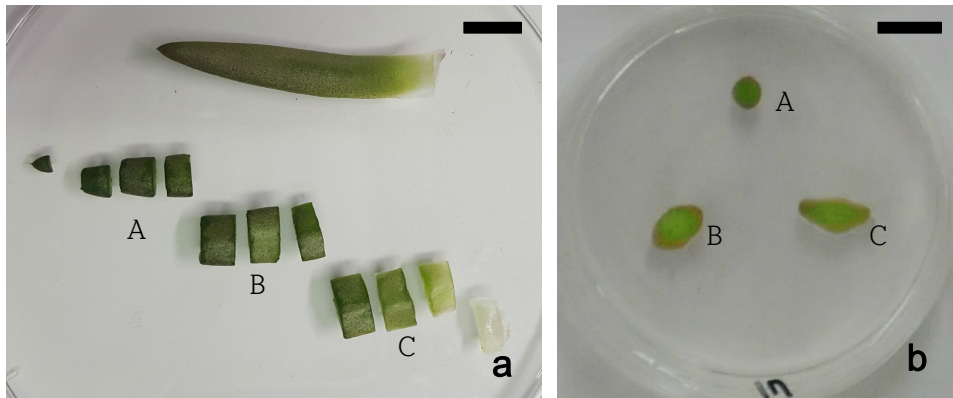


Fig. 2 The cutting direction of *O. japonicus* leaf and explants placed in an array on medium. A: the distal region, B: the middle region, C: the proximal region. Both ends of the leaf were cut. a: The leaf pieces were separated as three equal parts as A, B and C. And the A, B and C were cut within fragments into approximately 0.6 cm in length; b: A~C explants were placed counter clockwise for their distal surfaces to face air.

나. Callus culture 및 plant regeneration

와송 조직 절편으로부터 5주 동안 유도된 캘러스를 형태적 특징에 따라 임의적으로 활면 캘러스(Fig. 7a), 조면 캘러스(Fig. 7b), 포도상 캘러스(Fig. 7c), 구형 캘러스(Fig. 7d)로 분류하였다. 재분화를 위해 각 캘러스들을 5×5 mm의 크기로 나누어 0, 0.1 μM 2,4-D와 0, 0.1 μM BAP를 조합 첨가한 MS 배지에 계대배양하였다. 24℃ 6500 lux의 광도로 16시간/일 광주기 조건으로 배양하여 캘러스의 변화와 식물체의 재분화율을 조사하였다.

2.2.2 생리활성의 측정

가. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

Folin-ciocalteu reagent시약은 sodium molybdate와 sodiumtungstate를 인산용액과 반응시켜 제조하며, 다양한 페놀성 물질들은 알칼리 조건에서 folin-ciocalteu reagent시약의 phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex에 전자를 공여하여 청자색 환원물을 생성하게 된다. 이 청자색 환원물의 흡광도를 측정하여 폴리페놀 함량으로 정량하게 된다. 이와 같은 화학반응을 이용한 Folin-Denis방법[33]에 따라 와송 분획 추출물에 대한 총 폴리페놀의 함량을 측정하였다.

분획 추출물은 98% methanol에 1 mg/ml로 용해하여 25 μ l, 10배 희석한 folin-ciocalteu reagent 500 μ l를 혼합하여 상온에서 5분간 반응시킨 후, 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3) 500 μ l를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액을 water bath (BUCHI, Switzerland)에서 37 $^\circ\text{C}$ 로 60분간 반응시켰다. Spectrophotometer (Mecasys, Korea)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 표준물질로 chlorogenic acid (Sigma, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 이를 기준으로 와송의 분획별 추출물의 총 폴리페놀 함량을 정량하였다.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

Flavonoid에 알칼리를 작용시키면 hesperidin과 naringin 등의 flavan, 또는 수용성 flavonol 배당체가 황색을 나타낸다. 이 화합물의 흡광도를 측정하여 flavonoid의 함량을 정량한다. 이 화학반응을 이용한 Jia와 Tang의 방법[34]에 따라 와송 분획 추출물에 대한 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

분획 추출물을 98% 메탄올에 1 mg/ml농도로 용해하여 100 μ l, diethylene glycol 1000 μ l, 1N NaOH 10 μ l를 넣어 잘 혼합한 후, water bath에서 37 $^{\circ}$ C로 60분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 425 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 표준물질로 naringin (Sigma, USA)을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 이를 기준으로 와송의 분획별 추출물의 총 플라보노이드 함량을 정량하였다.

나. 항산화 활성 능력 측정

(1) DPPH radical 소거활성

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical은 free radical로써 보라빛을 띠며 517 nm에서 특징적인 광 흡수를 나타낸다. radical이 소거되면 노란 빛을 띠게 되어 517 nm의 광을 흡수하지 못하게 된다. 이 radical은 유기용매에서 매우 안정적이며, proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 radical 소거활성 측정에 이용되고 있다. 이와 같은 방법을 이용한 Blois방법[35]에 따라 와송의 분획 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정 하였다.

분획 추출물을 98% 메탄올을 용매로 하여 각 10, 5, 2.5, 1, 0.5 mg/ml의 농도로 희석시킨 후, 시료 100 μ l 와 100 μ M의 DPPH 용액 900 μ l 를 잘 혼합한 후, 암소에서 30분간 반응시켜주었다. Spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 radical의 감소를 정량하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값을 구하였으며, 이 값을 아래 식에 대입하여 백분율(%)로 환산함으로써 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 표현하였다.

$$A_n(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

A_n : DPPH radical 소거 활성에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료를 첨가하지 않은 DPPH용액의 흡광도

A : 각 시료와 DPPH용액을 반응시킨 용액의 흡광도

(2) ABTS radical 소거활성

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) radical은 potassium persulfate와 24시간 반응하여 짙은 녹색을 나타내며 항산화력이 높은 물질과 반응할 경우 투명한 색에 가까워지는 특징을 나타낸다. ABTS radical 소거활성 측정은 DPPH radical 소거 활성력 측정과 함께 체내의 radical 소거활성을 간접적으로 측정하는 실험으로, DPPH radical 소거활성 측정과 원리가 유사한 방법이다. 이 화학반응을 이용한 Re 등의 방법[36]에 따라 와송의 분획 추출물의 ABTS radical 소거활성을 측정하였다.

와송 분획 추출물을 메탄올을 용매로 하여 각 0.5, 1, 2.5, 10 mg/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다. ABTS·+용액은 증류수에 2.45 mM potassium persulfate를 용해하여 이 용액에 7 mM ABTS를 녹여 12~17시간 이상 암소에 보관하여 ABTS cation radical을 형성 시킨 후, 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.900 ± 0.002 이 되도록 methanol로 희석하였다. 희석된 ABTS·+용액 950 μ l에 시료를 50 μ l를 잘 혼합한 후, 암소에서 5분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 radical 감소를 정량하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균값을 이용하였으며, 이 값을 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 표현하기 위해 아래 식에 대입하여 백분율(%)로 환산하였다.

$$A_n(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

A_n : ABTS·+ radical 소거 활성에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료를 첨가하지 않은 ABTS·+용액의 흡광도

A : 각 시료와 ABTS·+용액을 반응시킨 용액의 흡광도

(3) 아질산염 소거활성

와송 분획 추출물의 아질산염 소거활성 능력 측정은 Kato 등[39]과 Kim 등[38]의 방법에 따라 0.1 N HCl 또는 0.2 M citrate buffer를 이용하여 반응액의 pH를 각 1.2, 4.0, 6.0으로 맞추어 반응의 차이를 측정하였다. 분획 추출물 (20 mg/ml) 40 μ l에 1 mM NaNO_2 20 μ l와 pH buffer 140 μ l를 사용하여 반응 부피를 200 μ l로 조절하였다. 이 반응액을 37°C에서 50분간 반응시킨 후, 2% acetic acid 1,000 μ l, Griess reagent 80 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후, 빛을 차단한 암소에서 15분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식에 대입하여 아질산염 소거능을 백분율로 나타냈다.

$$N(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

N : 아질산염 소거능

A_0 : 1 mM NaNO_2 에 control을 50분간 반응시킨 흡광도

A : 1 mM NaNO_2 에 시료를 첨가하여 50분간 반응시킨 흡광도

라. 항산화 효소 활성 측정

(1) 효소액의 조제

용매는 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) 48.5 ml에 2 mM EDTA 1 ml, PVP 0.5 g, 1 mM PMSF 500 μ l로 준비하였다. 항산화 효소 활성 측정은 용매 1000 μ l에 와송 분획추출물 5 mg을 첨가하여 overnight시킨 후, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 이용하였다. 각 분획 추출물 효소액의 단백질은 Bradford방법[39]에 따라 BSA를 표준물질로 사용하여 정량하였다.

(2) Catalase(CAT) 활성의 측정

Catalase(CAT)활성은 Mishra 등[40]의 방법을 변형하여 측정하였다. 효소액 100 μ l와 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 500 μ l, 110 mM H₂O₂ 400 μ l를 혼합하였다. 소거된 H₂O₂를 spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 단백질 1 mg당 소거된 H₂O₂를 μ mol로 표기하였다.

(3) Ascorbate peroxidase(APX) 활성의 측정

Ascorbate peroxidase(APX) 활성은 Chen과 Asada[41]방법에 따라 측정하였다. 효소액 100 μ l와 200 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 500 μ l, 5 mM ascorbate 100 μ l, 2 mM H₂O₂ 10 μ l를 혼합하였다. Ascorbate의 산화정도를 spectrophotometer를 이용하여 290 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 단백질 1 mg당 산화된 ascorbate를 μ mol로 표기하였다.

(4) Peroxidase(POX) 활성의 측정

Peroxidase(POX) 활성은 Chance와 Maehly 등[42]의 방법에 따라 측정하였다. 효소액 100 μ l와 80 mM potassium phosphate buffer(pH6.9) 500 μ l, 15 mM guaiacol 100 μ l, 65 mM H₂O₂ 100 μ l를 혼합하였다. Tetra guaiacol형성을 spectrophotometer를 이용하여 470 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 단백질 1 mg당 형성된 tetra guaiacol을 μ mol로 표기하였다.

마. Tyrosinase 활성저해 효과 측정

멜라닌 색소는 세포내에서 tyrosinase에 의해 tyrosine은 산화되어 DOPA로의 전환되고, DOPA-quinone으로 전환시켜 생성시킨다[43]. Tyrosinase의 활성 저해 측정은 피부의 melanin 생합성의 기작을 효율적으로 나타낼 수 있으므로 미백 효과를 나타내는 좋은 방법으로 밝혀지고 있다. 이 반응을 이용한 Flurkey의 방법[44]에 따라 와송 추출물의 tyrosinase활성 저해 효과를 측정하였다.

효소액은 mushroom tyrosinase를 100 unit/ml로 희석하여 사용하였으며, 기질은 10 mM 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine과 0.1 M의 potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 2 : 3비율로 혼합하여 이용하였다. 와송의 분획별 추출물 시료 200 μ l, mushroom tyrosinase 200 μ l, 기질혼합용액 600 μ l를 잘 혼합한 후 37°C의 waterbath에서 20분간 반응시켰다. spectrophotometer를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 다음 식에 대입하여 tyrosinase 활성 저해능을 수치로 나타냈다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{A_0}{A_n}\right) \times 100$$

A_0 : 와송의 분획 추출물 시료 무 첨가군의 흡광도

A_n : 와송의 분획 추출물 시료 첨가군의 흡광도

2.2.3 항균활성 측정

가. 사용균주 및 배지

항균 활성을 위해 사용한 균주는 유해한 균주를 중심으로 뇌수막염, 자궁내막염 등을 유발하는 *Listeria monocytogenes*, 피부상재균이며 항생제 내성 상용 대표 균인 *Staphylococcus epidermidis*, 식중독, 피부 화농성질환을 일으키는 *Staphylococcus aureus*, 지루성피부염을 일으키는 *Malassezia furfur*, 대장균(*Escherichia coli*)과 폐렴, 패혈증을 일으키며 대부분항생제에 저항성을 갖는 *Pseudomonas aeruginosa* 등 총 6가지를 선발하였으며, 위 균주들은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korea Biological Resource Center, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganism, KCCM)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 균주의 균종과 번호 및 배양조건은 Table 1에 배지 조성표는 Table 2~5에 정리하였다.

나. 균주의 배양 및 항균활성 효과 측정

와송의 분획 추출물의 항균활성 효과를 측정하기 위하여 한천배지확산법(disc agar plate diffusion method)[45]을 이용하였다. 한천배지확산법은 항생물질에 의해 최소 억제농도까지 시험세균이 자라지 못하여 형성되는 억제환 inhibitor zone의 직경을 측정하는 방법으로, 각 균주에 적합한 한천 배지를 petri dish에 분주, 응고시킨 다음 0.8% Agar와 균주 100 μ l를 혼합하여 준비한 top Agar를 도말하였다. Top Agar 표면에 멸균된 8 mm paper disc (Adventic, Japan)를 일정한 간격으로 올려놓고, 중앙의 paper disc에는 kanamycin (1 mg/ml) 30 μ l, 주변의 paper disc에는 각 분획추출물들을 30 μ l씩 주입하였다. 이때 paper disc의 흡수력을 고려하여 10 μ l씩 세 차례 나누어 주입하였다. 이 한천배지들을 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 incubator에서 배양하여 paper disc 주위에 생성되는 저해환을 관찰하였다. 저해환이 24시간 이내에 생성된 경우 항균활성이 양성인 것으로 판정하였으며, 저해환의 직경을 측정하여 항균 활성 정도를 판정하였다.

Table 1. List of strains and culture conditions used for screening of antimicrobial activity test

Strains	Strains No.	culture condition
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM40307	37°C Brain heart infusion agar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC1917	37°C Nutrient agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCT1621	37°C Nutrient agar
<i>Malassezia furfur</i>	KCTC7743	37°C YM agar+1% olive oil
<i>Escherichia coli</i>	KCCM11234	37°C Trypticase soy agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC2004	37°C Nutrient agar

Table 2. Composition of brain heart infusion agar.

Component	Contents
Brain Heart Infusion	17.5 g
Peptone	10.0 g
Glucose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15 g
Purified water	1 l
pH	7.4±0.2

Table 3. Composition of nutrient agar.

Component	Contents
Beef extract	1.0 g
Peptone	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
Agar	15 g
Purified water	1 l
pH	6.8±0.2

Table 4. Composition of YM agar + 1% olive oil

Component	Contents
Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Dextrose	10.0 g
Agar	10.0 g
Purified water	1 l
pH	6.3±0.2

Table 5. Composition of trypticase soy agar.

Component	Contents
Pancreatic digest of casein	15.0 g
Pancreatic digest of soybean	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	15 g
Purified water	1 l
pH	7.3±0.2

2.2.4 항암 활성 효과

가. 세포의 배양

실험에 사용된 세포배양은 한국 세포주 은행에서 분양받은 인간 유래 폐암세포주 Calu-6 (KCLB No.10002), 유방암 세포주 MCF-7 (KCLB No.30022), 대장암 세포주 HCT-116 (KCLB No.10247)를 RPMI 1640 (Lonza, USA)의 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)(Lonza, USA)와 1% Antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, USA)을 첨가한 복합배지를 이용하여, 37°C, 5% CO₂ Incubator (SANYO, MCO - 17A1C, Japna)의 습윤 배양기에서 2일마다 한 번씩 새로운 배지로 계대배양하였다. 3회 이상의 계대배양을 거친 세포주를 실험에 이용하였다.

나. 인체 암세포의 생존율 측정

MTT assay는 색변화를 통해 특정파장의 흡광을 측정하는 실험방법으로, 황색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 세포내의 미토콘드리아에 의해 보라색을 띄는 비수용성의 MTT formazan(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide)으로 환원시키는 능력을 이용한 검사법이다. 흡광도가 높게 나올수록 살아있는 세포가 많아 세포내 미토콘드리아에 의해 MTT formazan으로 많이 환원된 것을 의미하며, 흡광도가 적을수록 죽은 세포가 많아 MTT formazan으로 작게 환원된 것으로, 흡광도에 따라 세포의 생존율을 판단하는 검사법으로 이용되고 있다.[46].

Hansen[47] 등의 방법에 따라 MTT assay법에 의해 와송 추출물의 암세포 증식 억제 효과를 분석하였다. 각 세포주를 3 × 10⁴ cell/ml 밀도가 되도록 hemocytometer로 cell counting 한 후, 96 well microplate에 98 μl/well 씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 습윤 세포 배양기에서 24시간 incubation하여 세포를 부착시켰다. 각 well에 와송의 분획별 추출물을 농도별로 조제하여 2 μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 각 well에 5 mg/ml의 MTT solution(sigma, USA)을 10 μl씩 첨가하여, 4시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 그리고 각 well에 100 μl의 DMSO를 첨가하여 15분간

shaking 시켰다. Micro plate spectrophoto meter (BIO RAD, xMark, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 추출물 무첨가군을 100%로 하여 암세포 증식 억제율을 구하였다.

$$\text{percent of viable cells(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.2.5 통계처리

와송의 용매별 분획추출물의 생리활성에 대한 각 실험은 SAS software (SAS Institute, USA)을 이용하였다. ANOVA procedure을 실시하여 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 0.05% 수준에서 유의성을 검정하였다. 와송의 용매별 분획추출물의 생리활성에 대한 각 실험은 3회 실시하였으며, 결과 값은 평균±오차로 표기하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

3.1 Tissue culture

3.1.1 생장조절제의 영향

*Orostachys japonicus*를 0, 0.1, 1, 10, 100 μM 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μM BAP를 혼합 처리하여 5주 동안 배양한 결과는 Fig. 3, Table 6에 나타냈다.

BAP가 포함되지 않는 배양 조건에서 0, 0.1, 1 μM 2,4-D를 첨가한 배지에서 배양 1주 후, 접촉면에서 붉은 뿌리가 발달하였으며, 2주 후 뚜렷한 부정근이 관찰되었다. 발달된 부정근은 4주 후 14.2 mm, 10.5 mm, 8.0 mm 길이로 발달하였다. 2,4-D의 농도가 증가할수록 부정근의 길이는 짧아지고, 곁뿌리가 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 이 등[49]이 다육식물에 속하는 염좌의 기내배양연구에서 옥신을 처리하지 않아도 부정근이 발달하는 결과와 유사하게 나타냈다. 일반적으로 다육식물은 잎을 삼목하여 번식에 이용하는데, 와송 역시 옥신을 첨가하지 않아도 잎 조직에서도 뿌리가 발달하였다. 이와 같은 결과는 잎의 삼목이 가능한 대부분의 다육식물이 보이는 특성으로 사료된다. 10, 100 μM 의 2,4-D를 첨가한 경우 4주 후, 바닥면에서 1 mm의 짧은 부정근이 평균 2~3개 발달하였다.

0.5 μM BAP와 0, 0.1, 1 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 BAP가 첨가되지 않은 배지보다 짧은 8 mm, 5 mm, 2 mm의 부정근이 형성되었다. 0.5 μM BAP와 10, 100 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 배지접촉면에서 부정근을 관찰할 수 없었으며, 배양 2주 후 윗면에서 부정근이 발달하였다. 0.5 μM BAP와 10 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 부정근이 51.1 mm, 45.1 mm로 길게 발달하였다. 0.5 μM BAP와 100 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 관다발 층을 기준으로 20 mm 이하의 부정근이 윗면에서 발달하였다(Fig. 5). 10 μM 이상의 2,4-D가 첨가된 경우 배지접촉면에서 뿌리의 발달이 억제되는 결과가 관찰되었으며, 0.5 μM BAP와 10 μM 이상의 2,4-D가 첨가될 경우 윗면에서 뿌리의 발달이 촉진되는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 작물재배에서 나타나는 고농도의 2,4-D 현상과 같이 조직배양에서도 제초제의 특성과 같은 독성을 나타내는 현상으로 사료된다[48].

5 μM BAP가 첨가된 배지에서는 부정근의 발달이 나타나지 않았으며, 캘러스가 발달하였다. 5 μM BAP와 0.1 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 와송의 원부에서 2주 후 조직이 1.3배 비대 되었으며, 단단한 알맹이들이 모인 형태의 구형 캘러스(Fig. 7d)가

발달하였다. 5 μM BAP와 1, 10, 100 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 2주 후, 조직의 밑면이 생장되었다. 4주 후, 원래의 크기보다 2배 이상 비대 되었으며, 단단하고 매끈한 활면캘러스(Fig. 7a)로 발달하였다.

50 μM BAP와 0, 0.1, 1, 10, 100 μM 2,4-D를 혼합 처리한 경우 각 배양배지의 경우 모두 2주 후 포도상의 캘러스(Fig. 7c)가 발달하였다. 포도상 캘러스는 2,4-D의 농도가 높아지며 캘러스에 존재하는 포도상의 크기가 평균 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.1 mm 로 작아지는 것을 관찰하였다.

0, 0.5 μM BAP이 첨가된 경우 뿌리가 발달하였고, 5, 50 μM BAP이 첨가된 경우 조직이 커지며 캘러스를 형성하였다. BAP의 농도가 5 μM 이상 첨가된 경우 와송의 조직이 비대해지며, 2,4-D의 농도구배에 따라 구형캘러스, 활면캘러스, 포도상 캘러스가 발달되었다(Table 6). 실험에서 나타난 결과와 같이 50 μM BAP, 100 μM 2,4-D의 고농도로 첨가된 배지에서 치상한 조직들은 고사하지 않고 발달하였다. 따라서 이와 같은 고농도에서의 반응을 규명하기 위하여 250 μM BAP와 500 μM 2,4-D가 첨가된 배지를 조합하여 배양을 시도하였다. 즉, 4, 20, 100, 500 μM 2,4-D와 2, 10, 50, 250 μM 의 BAP를 조합하여 5주 동안 관찰하였다.

4, 20, 100, 500 μM 2,4-D와 2, 10, 50, 250 μM 의 BAP를 조합하여 실험한 결과를 Table 7 에 캘러스의 크기와, 캘러스의 특징에 따라 분류하여 정리하였다. 2 μM BAP와 0, 4, 20, 100 μM 2,4-D를 혼합처리 한 경우, 0, 4 μM 2,4-D에서 앞 원부의 조직에서 단단한 알맹이들이 모인형태의 구형 캘러스가 발달하였다. 20 μM 2,4-D에서 앞 원부와 중간부위에서 표면이 매끈한 활면 캘러스가 발달하였다. 100 μM 2,4-D에서 앞 근부에서 캘러스가 발달하였다. 10 μM BAP와 0, 4, 20, 100 μM 2,4-D를 혼합처리 한 경우, 0, 4 μM 2,4-D에서 앞 원부의 조직에서 활면 캘러스가 발달하였다. 20 μM 2,4-D에서 앞 중간부위에서 표면이 조면 캘러스(Fig. 7b)가 발달하였고, 100 μM 에서 앞 근부에서 캘러스가 발달하였다. 50 μM BAP와 0, 4, 20, 100 μM 2,4-D를 혼합처리 한 경우, 0, 4 μM 2,4-D에서 앞 원부, 중간부위의 조직에서 포도상캘러스가 발달했으며, 20 μM , 100 μM 2,4-D에서 앞 근부에서 캘러스가 발달하였다(Fig 6). 250 μM BAP의 경우 20 μM 이하의 2,4-D에서 앞 단면주위에 작게 캘러스가 발달하였다. BAP농도가 높아질수록 낮은 농도의 2,4-D에서 캘러스가 발달했다(Table 7). 500 μM 2,4-D가 첨가된 배지에서 BAP의 농도와 관계없이 모두 1주 후 흑색을 띄며 고사하였다. 참다래 캘러스형성의 최적 2,4-D의 농도는 0.1 mg/l(0.4 μM)[49], 희수나무 최적 2,4-D의 농도는 0.2 mg/l(0.9 μM)로 보고하였고[50], 고구마 등의 최적 2,4-D의 농도는 1

mg/l(4.5 μ M)로 보고하였다[51]. 최적농도 이상의 2,4-D가 첨가된 경우 callus가 발달하지 않고 고사하는 것으로 보고되고 있다[52]. 그러나 와송의 경우 5 μ M 이상의 BAP와 100 μ M 2,4-D에서 캘러스가 발달하였다(Fig. 3). 와송과 같은 돌나물과의 식물인 돌나물은 3.0 mg/l(13.5 μ M) 2,4-D와 1.0 mg/l BA 첨가 배지에서 가장 높은 캘러스형성률을 보고하였고[53], 또 다른 돌나물과의 식물인 둥근잎꿩의비름의 경우 2.0 mg/l(9.6 μ M) 2,4-D가 조직발달의 최적의 농도로 보고하였다[54]. 돌나물과식물의 조직배양에서 캘러스의 발달에 요구되는 2,4-D의 농도는 타 식물에 비교하여 높은 옥신의 농도를 요구하는 것으로 나타났다. 와송의 경우 일반적인 식물들이 갖는 2,4-D의 독성이 나타나는 농도보다 약 20 배 더 높은 100 μ M에서 고사하지 않고, 캘러스가 발달하였으며, 100배 높은 500 μ M에서 흑색으로 변하며 고사하는 것으로 관찰 되었다.

와송 잎 조직으로부터 유래된 캘러스는 10 μ M BAP에서 가장 잘 발달하였다. 낮은 농도 2,4-D에서 원부의 캘러스가 발달하였으며, 2,4-D의 농도가 높아질수록 중간부, 근부의 캘러스 발달이 나타났다. 원부의 경우 10 μ M BAP와 4 μ M 2,4-D가 첨가된 배양배지에서 캘러스가 크게 발달했고, 중간부의 경우 10 μ M BAP와 20 μ M 2,4-D가 첨가된 배양배지에서 캘러스가 크게 발달했고, 근부의 경우 100 μ M 2,4-D에서 캘러스가 발달하였다. 이와 같은 결과를 통해서 와송 조직의 세포 내 옥신의 농도구배가 존재하며, 옥신의 농도는 원부로 갈수록 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

추가적으로 BAP와 2,4-D의 농도를 세분화하여 BAP의 농도와 2,4-D의 농도에 따른 와송 원부, 중간부, 근부로부터 캘러스 발달을 규명하고, 또한 면역측정법을 이용하여 IAA를 정량, 분석하는 방법[55]을 통해서 와송 잎조직내에 함유되어 있는 옥신함량을 정확히 측정 한 후, 와송의 잎조직을 이용한 조직배양에서 옥신의 영향을 규명하는 연구가 요구된다.

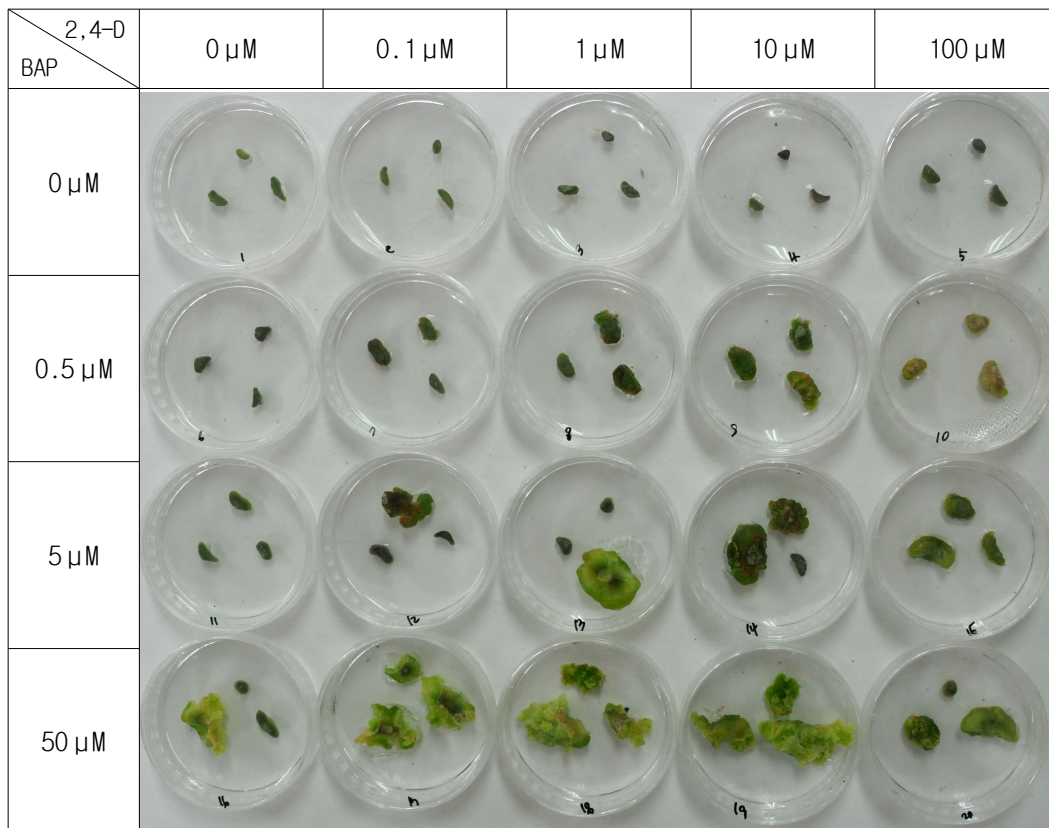


Fig. 3 Effects of various concentration of 2,4-D/BAP on callus formation of *O. japonicus* 5 weeks after culture.

At 0, 0.1, 1 μ M 2,4-D without BAP, adherent faces of explants adhering to medium developed roots where as at 100 μ M 2,4-D together with 0.5 μ M BAP, non-adherent faces did. Callus developed from at a lower concentration of 2,4-D as the concentration of BAP increased.

Table 6. Effects of 2,4-D/BAP concentration on root or callus formation of *O. japonicus* explants at 5 weeks after culture.

PGR		a		b		c	
2,4-D (μM)	BAP (μM)	Root	Callus	Root	Callus	Root	Callus
0	0	++		++		++	
	0.5	+		+		+	
	5		-		-		-
	50		-		++		-
0.1	0	++		++		++	
	0.5	+		+		+	
	5		+++		-		-
	50		++		++		++
1	0	+++		+++		+++	
	0.5	+	+	+	+	+	+
	5		-		-		++++
	50		+++		+++		+++
10	0	+		+		+	
	0.5	+		+		+	
	5		++		+++		-
	50		++		+++		+++
100	0	+		+		+	
	0.5	++		++		+++	
	5		+		++		+
	50		+		++		++

A: the distal region, B: the middle region, C: the proximal region (Number of lateral roots per 1 cm of adventitious root. +++: more than 10; ++: 5 or more, 10 or less; +: 1 or more, 5 or less) (Relative size difference between incubated callus and the original explants +++: more than 3x; ++: 2x or more, 3x or less; +: 1x or more; -: no change)

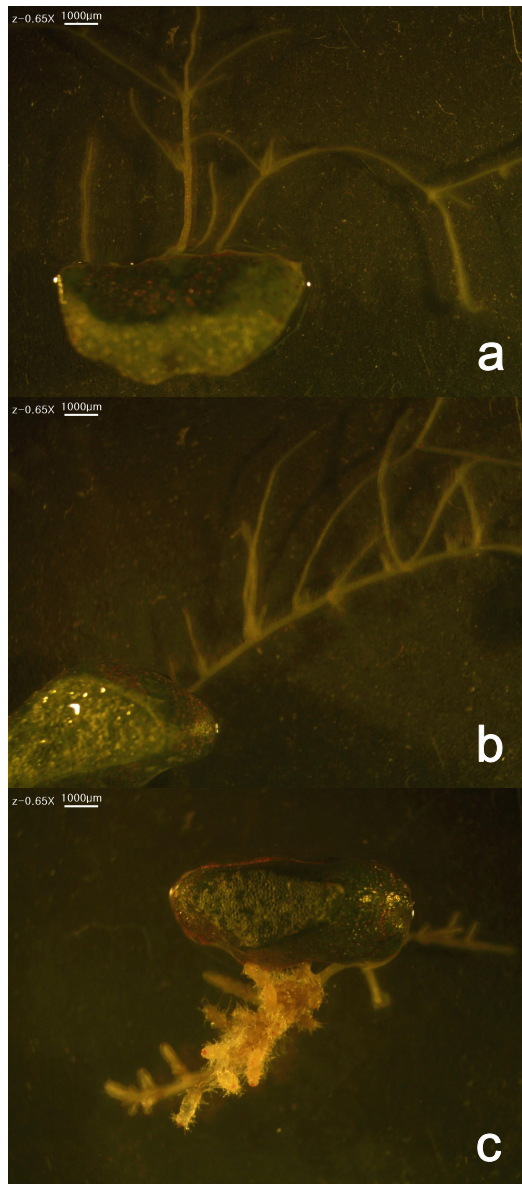


Fig. 4 Effects of 2,4-D concentrations on the adventitious root formation of *O. japonicus* *in vitro* culture at 5 weeks after culture.

a: 0 μ M; b: 0.1 μ M; c: 1 μ M. 2,4-D as the concentration of 2,4-D increases, the length of adventitious roots decreases and the number of lateral roots increases.

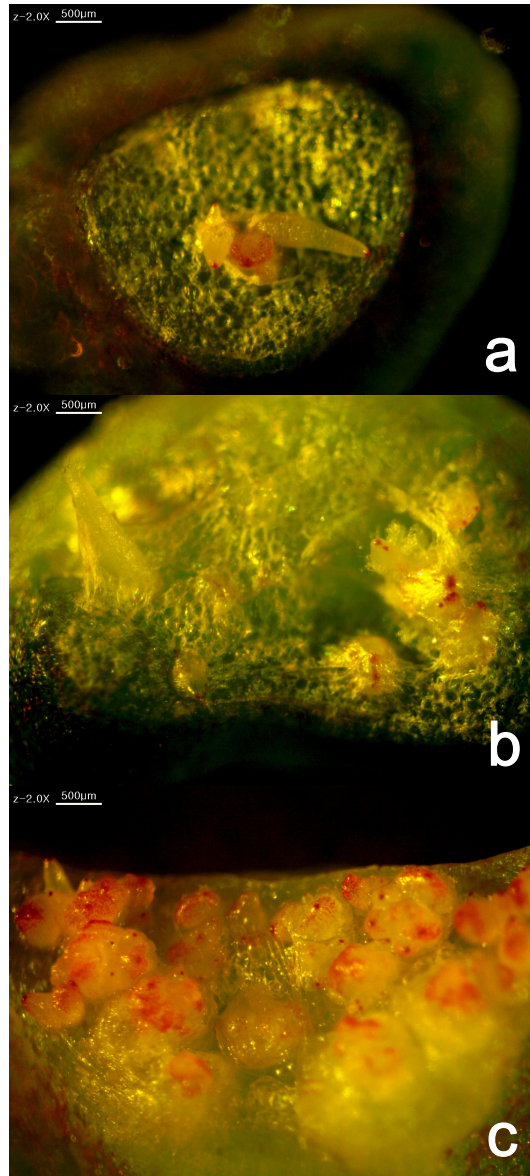


Fig. 5 Formation of roots from explants of *O. japonicus* at 4 weeks after culture on medium supplemented with 100 μ M 2,4-D and 0.5 μ M BAP

a: the distal region; b: the middle region; c: the proximal region. At 100 μ M 2,4-D, no root formation was observed at the faces of adherent side, whereas non-adherent face, developed roots instead. Based on the shapes of the excised side, roots were likely to emerge around vasculature regions.

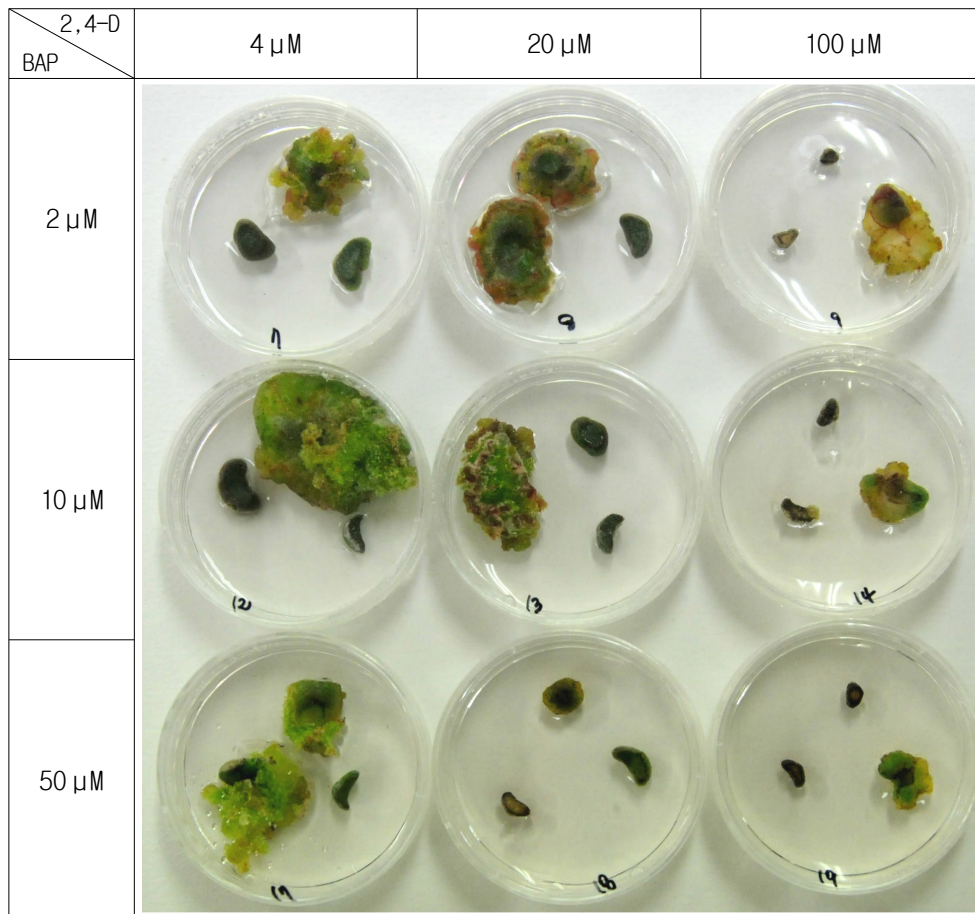


Fig. 6 Effects of 2,4-D/BAP concentrations on callus formation from leaf explant of *O. japonicus* at 4 weeks after culture.

At 2 μ M BAP and 4 μ M 2,4-D, explants originated from distal region proliferated most efficiently. At 2 μ M BAP and 20 μ M 2,4-D, explants from distal region and mid leaf region proliferated most efficiently. At 10 μ M BAP and 4 μ M 2,4-D, explants originated from distal region proliferated most efficiently. At 10 μ M BAP and 20 μ M 2,4-D, explants originated from mid region proliferated most efficiently.

Table. 7 Effects of 2,4-D/BAP concentration on root or callus formation of *O. japonicus* explants at 5 weeks after culture

PGR			a	b	c
BAP(μ M)	2,4-D (μ M)				
2	0	◆	+	-	-
	4	◆	++	-	-
	20	◆	++	◆	++
	100		-	-	++
	500		-	-	-
10	0	■	+++	-	-
	4	■	+++	+	-
	20		-	▲	+++
	100		-	-	+
	500		-	-	-
50	0	●	++	●	+
	4	●	++	●	++
	20		-	-	+
	100		-	-	+
	500		-	-	-
250	0		+	+	-
	4		-	+	-
	20		-	-	+
	100		-	-	-
	500		-	-	-

A: the distal region, B: the middle region, C: the proximal region

▲: rough callus ■: smooth callus ◆: globular callus ●: botryose callus

(Relative size difference between incubated callus and the original explants.

+++ : more than 3x; ++ : 2x or more, 3x or less; + : 1x or more; - : no change)

3.1.2 Callus culture and plant regeneration

와송에서 생성된 캘러스를 특징에 따라 활면 캘러스, 조면 캘러스, 포도상 캘러스, 구형 캘러스로 4가지로 임의적으로 분류하였다(Fig. 7). 캘러스를 5×5 mm 크기로 절단하여 기본 MS 배지에 2,4-D와 BAP의 조합에 따른 캘러스의 변화와 식물체의 재분화율을 조사하였다.

활면 캘러스(Fig. 7a)는 표면이 매끈하고 녹색의 단단한 형태로, 10 μ M BAP와 4 μ M 이하의 2,4-D가 첨가된 배지에서 4주 후 2.5 cm로 발달하였다. 이와 같이 형성된 캘러스를 성장조절제를 첨가하지 않은 기본 MS배지에서 계대배양 할 경우 1주 후 매끈했던 표면에 투명하고 끝부분이 뾰족한 둥근 배 발생 캘러스가 형성되었으며(Fig. 8a), 2주 후 부정배가 발달되었다(Fig. 8b). 5주 후 완전한 소식물체를 형성하였다. 평균 캘러스 1개 조각 당 30개의 소식물체가 재분화 되었으며, 이 소식물체의 내부는 투명했다(Fig. 8d). 이와 같이 형성된 소식물체는 7주 후 진한 녹색의 소식물체로 발달하였다. 활면 캘러스 전체에서 배 발생 캘러스가 형성된 후(Fig. 10a), 소식물체로 발달하였다(Fig. 10b). 활면 캘러스를 0.1 μ M BAP와 0.1 μ M 2,4-D가 첨가된 배지로 계대배양할 경우, 3주 후 투명한 부정배가 발달하였다. 6주 후 투명한 캘러스가 소식물체로 발달하였으며, 캘러스 조각 1개당 4개의 소식물체가 재분화 되었다.

구형 캘러스는(Fig. 7d) 캘러스전체에 작은 덩어리로 구성된 형태이며, 4 μ M BAP와 2 μ M 2,4-D가 첨가된 배지에서 5주후 발달하였다. 구형 캘러스를 성장조절제를 첨가하지 않은 기본 MS배지에서 계대배양 할 경우 4주 후 구덩어리마다 평균 2~3개의 소식물체가 발달하였다. 활면 캘러스의 소식물체 발달과 비교하여 소식물체의 개체 수가 작게 발달하였으며, 뿌리가 발달하였다(Fig. 9c).

녹색의 알갱이로 구성된 형태인 포도상 캘러스(Fig. 7c)는 50 μ M이상 BAP와 10 μ M 이하 2,4-D로 조합한 조건에서 발달하였으며, 절단하는 경우 포도상의 알갱이가 터져 캘러스를 절단하지 않고 계대배양 하였다. 표면이 거친 형태의 조면 캘러스(Fig. 7b)는 10 μ M BAP와 10~20 μ M 2,4-D가 첨가된 배지에서 발달하였다. 포도상 캘러스와 조면 캘러스는 2주 후 배지 접촉면 부근이 점차 흑색으로 변화되기 시작하며, 4주 후에는 캘러스 전체가 흑색으로 고사하였다.

따라서, 와송의 잎 조직을 이용한 식물체 재생을 위한 최적 조건은 10 μ M BAP와 4 μ M 2,4-D를 조합한 기본 MS배지에 5주 동안 배양하여 유도된 캘러스를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 계대배양하는 방법으로 나타났다.

와송은 건조한 환경에서 재배되는 다육식물로, 와송의 발달에 건조 stress의 영향이 있을 것으로 사료된다. 건조stress의 영향을 규명하고, 빛, 온도 등의 다양한 조건의 조합에 관한 연구를 통하여 와송의 식물체 재생의 효율성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

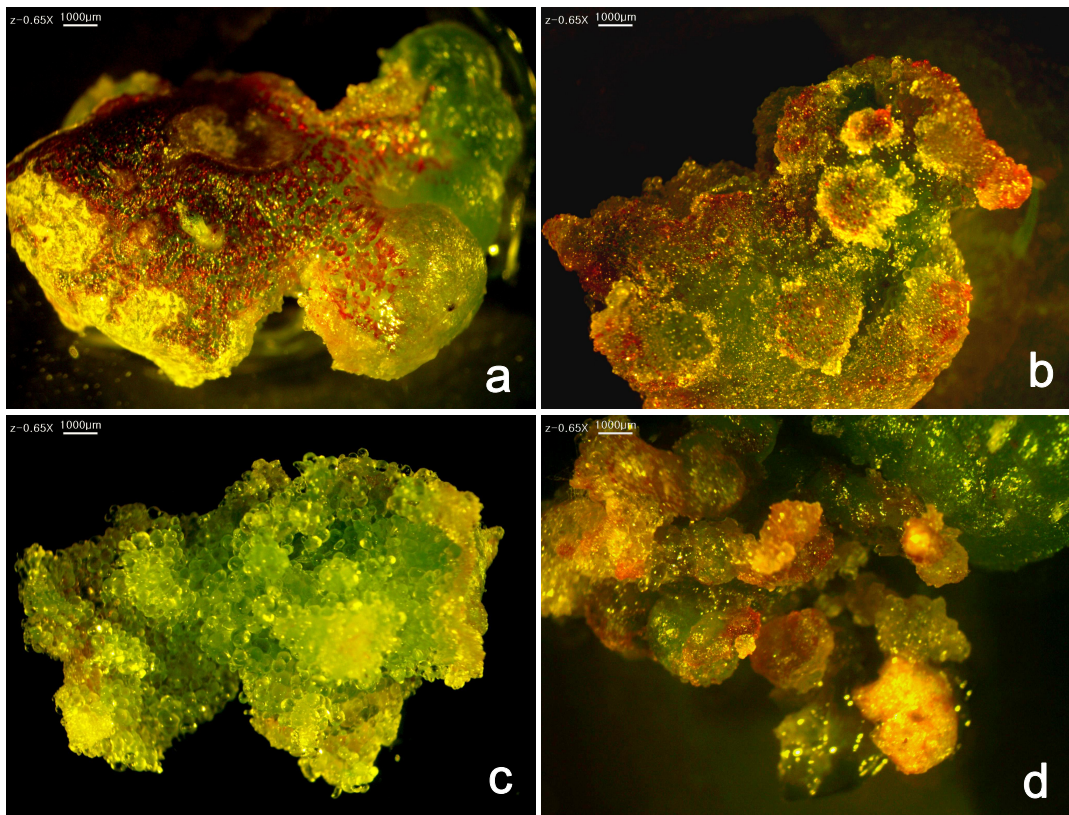


Fig. 7 Four kinds of callus developed from *O. japonicus* leaf explant at 4 weeks after culture.

a: The deep green and smooth callus was developed in 10 μ M BAP, 0, 4 μ M 2,4-D.
 b: The callus possessing rough surface tended to be developed in 10 μ M BAP, 20 μ M 2,4-D. c: the callus with bubble-like round particles was developed when concentration is over 50 μ M BAP and under 4 μ M 2,4-D. d: The callus with small and solid lumps was developed in 5 μ M BAP and 0.1 μ M 2,4-D.

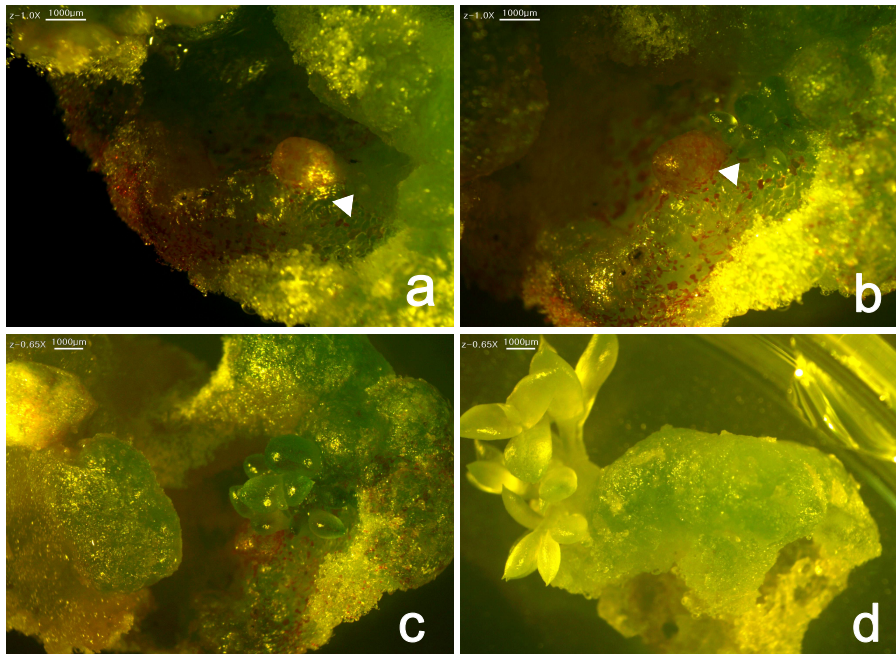


Fig. 8 Plantlet regeneration from the deep green callus with the smooth surface from leaf explants of *O. japonicus*.

a: Round embryo genic callus began to form on the smooth surface of explants at 1 week after culture in the basal MS media. b: Smooth and transparent callus masses with sharp edges developed radially exhibiting representative *O. japonicus*'s phyllotaxis. c: Leaf primordia were arranged displaying representative phyllotaxis at 3 weeks after culture. d: Plantlets emerged at 5 week after culture.

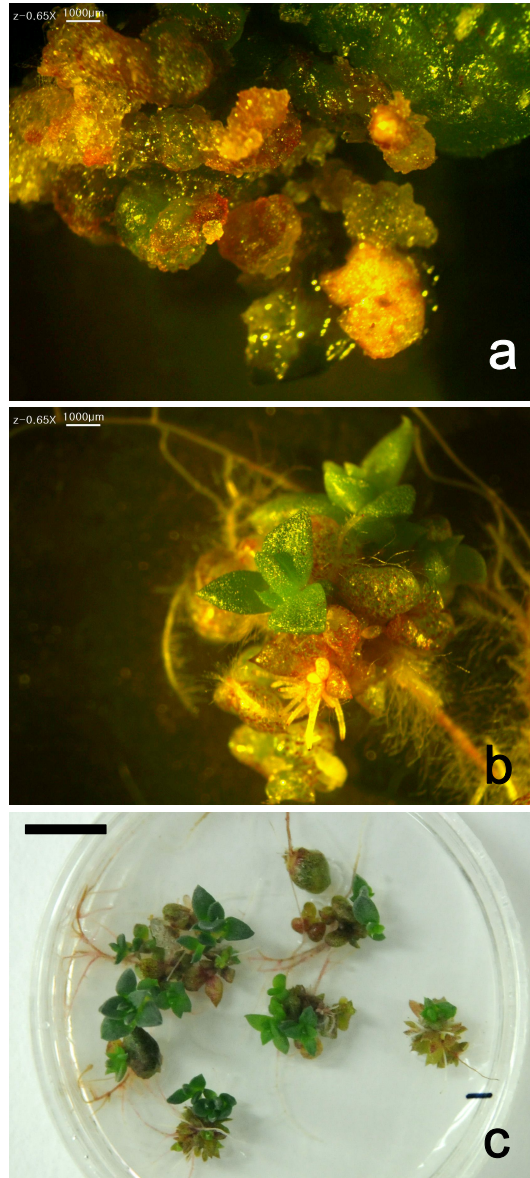


Fig. 9 Plant regeneration from the callus which has heaps of small and solid lumps in tissue culture from *O. japonicus*.

a: the callus possessing heaps of small and solid lumps. b, c: At 4 weeks after culture shoot from the callus. In the basal MS media both root and shoot developed efficiently, 2 to 3 shoot were found to develop from callus masses on average.

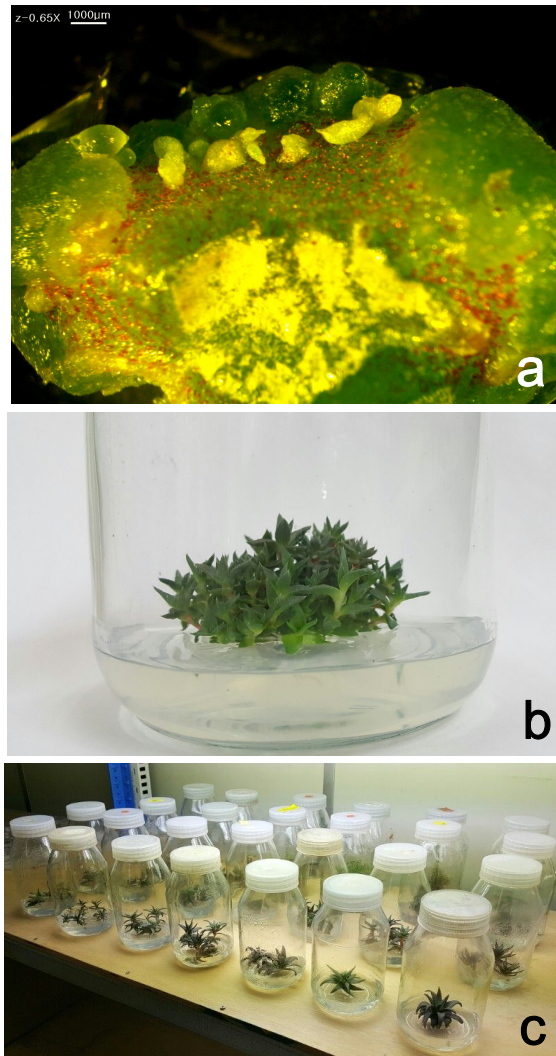


Fig. 10 *In vitro* micropropagation of *O. japonicus*

a: Formation of shoots from the deep green callus which has the smooth surface in tissue culture from leaf explant of *O. japonicus* in MS media with 5µM BAP and 10µM 2,4-D 5 weeks after culture. b: Shoots emerged from the whole callus at 15 weeks after culture. c: 40 weeks after culture.

3.2 생리활성 측정

3.2.1 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

와송의 총 polyphenol 함량과 총 flavonoid 함량은 Table 7에 나타났다. 와송 분획 추출물의 polyphenol 함량은 ethylacetate가 634.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높았으며, n-butylalcohol 351.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$, n-hexane 148.37 $\mu\text{g}/\text{mg}$, methylenechloride 124.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$, water 8.40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 순으로 높게 측정되었다. 와송 분획추출물의 flavonoid 함량은 Polyphenol과 동일하게 ethylacetate분획추출물이 205.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높았으며, n-hexane 98.54 $\mu\text{g}/\text{mg}$, n-butylalcohol 97.85 $\mu\text{g}/\text{mg}$, methylenechloride 74.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$, water 5.67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 순으로 높게 측정되었다.

박[56]은 한국재래약초의 페놀화합물과 항산화능에 대한 연구에서 methanol추출화합물에서 폴리페놀함량은 계피 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 소목 108 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 초피 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 어성초 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 순으로 높게 나타났다고 보고하였고, 윤[57]등의 연구에서 천년초 선인장 추출물의 폴리페놀함량은 뿌리가 46.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 열매가 44.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 종자가 44.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 줄기가 4.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 플라보노이드함량은 줄기 25.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 뿌리가 1.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 열매가 1.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 종자가 1.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 보고하였다. 김[58]등의 자생식물과 생약자원 추출물에 관한 연구에서 식물추출물의 폴리페놀함량을 비수리 228.9 mg/g, 애엽 203.92 mg/g, 오이 171.94 mg/g, 참나무 겨우살이 46.76 mg/g로 보고하였으며, 플라보노이드 함량은 비수리 90.15 mg/g, 애엽 44.52 mg/g, 참나무 겨우살이 57.02 mg/g, 질경이 48.06 mg/g, 울금 14.31 mg/g 등으로 보고하였다. 이[59]의 유자의 항산화활성 연구에서 유자 껍질의 폴리페놀의 함량이 91.24 mg/g, 과육은 33.95 mg/g로 보고되었다. 황[60]등의 연구에서 이용한 아로니아는 안토시아닌 함량이 높고, 폴리페놀 함량이 높다고 알려져, 10대 슈퍼푸드로 선정되었으며, 건강기능성식품으로 널리 이용되고 있다. 열풍건조한 아로니아의 폴리페놀 함량은 757.6 mg/g로, 플라보노이드 함량은 62.9 mg/g로 보고되었다. 이와 같은 결과와 비교하여 볼 때, 와송의 ethylacetate 분획추출물의 polyphenol의 함량은 634.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 비수리의 3배, 계피, 소목, 초피등의 6배 이상으로 매우 높은 함량을 확인할 수 있었으며, n-butylalcohol 추출물도 계피, 소목, 초피 보다 3배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다. 플라보노이드 함량도 ethylacetate 분획추출물의 경우 비수리의 2배, 애엽, 참나무 겨우살이, 질경이의 5배이상 높게 나타난 것을 확인하였다. 아로니아의 폴리페놀함량과 플라보노이드

함량과 비교할 때, 와송 ethylacetate 분획추출물의 폴리페놀 함량은 0.16배 낮지만, 플라보노이드 함량은 와송 ethylacetate 분획추출물이 3.3배 높게 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때, 와송의 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높게 나타났으며, 와송을 이용하여 현재 피로회복과 심혈관 질환 예방으로 출시된 폴리페놀 건강기능성식품, 노화방지 화장품 등에 와송의 천연폴리페놀을 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 8. Total polyphenol and flavonoid contents of solvent extracts from *O. japonicus*

solvent extracts	Total polyphenol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total flavonoid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
n-hexane	148.37 \pm 2.26 ^c	98.54 \pm 3.61 ^b
methylenchloride	124.38 \pm 2.78 ^d	74.63 \pm 2.12 ^c
ethylacetate	634.48 \pm 4.34 ^a	205.20 \pm 2.75 ^a
n-butylalcohol	351.14 \pm 3.71 ^b	97.85 \pm 2.66 ^b
water	8.40 \pm 0.92 ^e	5.67 \pm 1.16 ^d

3.2.2 항산화 활성 능력

가. DPPH radical 소거활성

와송의 분획 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Table 8에 나타났다. 각 분획추출물의 radical 소거활성은 10 mg/ml에서 ethylacetate 98.17%, n-butylalcohol 94.84%, n-hexane 89.99%, methylenechloride 88.64%, water 40.34% 순으로 좋게 나타났다. 특히 ethylacetate는 대조구로 이용한 ascorbic acid의 97.90%보다 높은 값을 보이며 매우 우수한 효과를 보이는 것으로 나타났다. 또한 DPPH radical의 50%의 소거능을 나타내는 IC₅₀ 값은 ethylacetate 0.45 mg/ml n-butylalcohol 0.77 mg/ml, n-hexane 1.47 mg/ml, methylenechloride 1.96 mg/ml water 12.93mg/ml 순으로 50%소거활성을 나타냈다.

이[59]의 유자의 항산화활성 연구에서 1 mg/ml의 농도에서 유자과육은 50.93%, 껍질은 93.12%의 DPPH radical 소거능을 보고하였다. 김[61]의 개똥쑥, 은행잎, 홍삼의 항염증 및 항산화 연구에서 0.5 mg/ml의 농도의 메탄올 추출물에서 개똥쑥은 83.4%, 은행잎 84.2%, 홍삼 43.8%의 DPPH radical 소거능을 보고하였다. water 추출물을 제외한 와송 분획추출물은 유자 과피에 비해 낮지만 5 mg/ml이상의 농도에서 대부분 85% 이상의 DPPH radical 소거능을 나타내고 있으며, 건강기능성 식품으로 널리 이용되는 홍삼보다 2배의 DPPH radical 소거능이 확인된바 체내 항산화 기능성제품 제조에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 9. DPPH (100 μ M) radical scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

solvent extracts	DPPH radical scavenging activity, % of control					
	Concentration (mg/ml)					
	0.5	1	2.5	5	10	IC ₅₀
n-hexane	22.93 \pm 1.50 ^c	40.78 \pm 1.23 ^c	79.20 \pm 0.35 ^b	89.12 \pm 0.97 ^c	89.99 \pm 1.68 ^c	1.47
methylenechloride	20.32 \pm 0.88 ^c	41.81 \pm 1.57 ^c	71.09 \pm 2.05 ^c	85.37 \pm 0.59 ^d	88.64 \pm 1.09 ^c	1.96
ethylacetate	88.84 \pm 0.35 ^a	94.60 \pm 0.45 ^a	95.86 \pm 0.40 ^a	97.01 \pm 0.13 ^a	98.17 \pm 0.31 ^a	0.45
n-butylalcohol	48.91 \pm 1.49 ^b	74.72 \pm 0.16 ^b	92.75 \pm 0.16 ^a	93.22 \pm 0.50 ^b	94.84 \pm 0.88 ^b	0.77
water	9.90 \pm 1.38 ^d	11.77 \pm 0.96 ^d	19.32 \pm 0.74 ^d	25.16 \pm 1.17 ^e	40.34 \pm 0.36 ^d	12.93
Ascorbic acid	97.36 \pm 0.01	97.49 \pm 0.04	97.56 \pm 0.01	97.68 \pm 0.02	97.90 \pm 0.03	<0.1

나. ABTS radical 소거활성

와송의 ABTS radical 소거활성은 Table 9에 나타났다. 각 분획추출물의 radical 소거활성은 10 mg/ml에서 ethylacetate 98.56%, methylenechloride 98.21%, n-butylalcohol 91.98%, n-hexane 85.73%, water 59.88%으로 높게 나타났다. 특히 ethylacetate는 1 mg/ml에서도 95.59%의 소거능을 보이며 대조구로 이용한 ascorbic acid와 비슷하게 효과를 보이는 것으로 나타났다. 또한 ABTS radical의 50%의 소거능을 나타내는 IC₅₀ 값은 ethylacetate 0.47 mg/ml, n-butylalcohol 0.87 mg/ml, methylenechloride 4.26 mg/ml, n-hexane 4.79 mg/ml, water 7.39 mg/ml 순으로 ethylacetate가 가장 낮은 농도에서 50% 소거활성을 나타냈다.

주[62]는 약용식물의 ABTS radical 소거 활성력 측정에서 0.5 mg/ml의 농도에서 갈근 62.49%, 쇠비름 30.31%, 참빗살나무 52.58%, 합환피 43.43%, 감국 52.47%의 소거능을 나타냈다고 보고하였다. 이는 와송의 ethylacetate 분획추출물이 0.5 mg/ml농도에서 63.76%의 ABTS radical 소거활성을 보이는 값과 유사하거나 낮은것으로 나타났다. 유자의 항산화 연구에서 ABTS radical 소거능의 IC₅₀값이 과피가 1.26 mg/ml, 과피+과육 2.92 mg/ml, 과육 6.20 mg/ml로 나타났다[59]. 와송 ethylacetate 분획추출물의 IC₅₀값 0.47 mg/ml, n-butylalcohol 분획추출물의 IC₅₀값 0.87 mg/ml 보다 높게 나타나, 와송 분획추출물 중 ethylacetate와 n-butylalcohol의 ABTS radical 소거활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. DPPH radical과 ABTS radical은 다른 종류의 radical로 DPPH radical 소거활성이 높아도 ABTS radical 소거활성이 모두 동일하게 측정되지 않는다. 와송의 경우 DPPH radical 소거활성과 ABTS radical 소거활성 모두 높은 활성을 나타내어 좋은 항산화기능을 보이며, ethylacetate 분획추출물은 1 mg/ml의 농도에서 90% 이상의 소거능이 측정되어 천연 항산화제로서 충분한 기능을 할 것으로 사료된다.

Table 10. ABTS radical scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

solvent extracts	ABTS radical scavenging activity, % of control					
	Concentration (mg/ml)					
	0.5	1	2.5	5	10	IC ₅₀
n-hexane	8.37±0.48 ^c	11.45±1.01 ^{cd}	34.10±1.54 ^d	68.61±0.20 ^d	85.73±0.38 ^c	4.79
methylenechloride	2.63±0.17 ^e	9.24±0.39 ^{cd}	42.18±0.57 ^c	74.02±0.41 ^c	98.21±0.13 ^a	4.26
ethylacetate	63.76±0.65 ^a	95.59±0.11 ^a	96.42±0.01 ^a	96.88±0.00 ^a	98.56±0.00 ^a	0.47
n-butylalcohol	26.34±0.69 ^b	58.69±1.19 ^b	89.86±1.01 ^b	90.09±0.90 ^b	91.89±0.32 ^b	0.87
water	4.19±0.16 ^d	13.29±0.90 ^{dc}	13.54±0.58 ^e	50.80±1.38 ^e	59.88±1.59 ^d	7.39
Ascorbic acid	98.43±0.00	98.59±0.03	98.53±0.20	98.59±0.03	98.45±0.01	<1

다. 아질산염 소거활성

우리가 흔히 섭취하는 식품들에 발색, 풍미증진, 산패 방지 등을 위하여 아질산염을 식품 첨가제로 널리 이용되고 있지만, 아질산염을 섭취했을 경우 위 내에서 아민류와 반응하여 발암성 물질인 nitrosamine을 생성하게 된다[63]. 이러한 nitrite의 소거능은 nitrosamine이라는 발암물질의 생성억제와 메트헤모글로빈증 등의 질병을 예방할 수 있는 것으로 보고되었다[64,65].

와송의 분획추출물 10 mg/ml을 아질산나트륨 용액에 첨가하여 아질산염에 대한 소거능을 조사한 결과를 Table 10에 나타냈다. 아질산 소거능은 상당히 pH에 의존적으로 나타났으며, pH 1.2에서 n-hexane 25.13%, methylenechloride 36.67%, ethylacetate 81.68%, n-butylalcohol 74.00%, water 47.14% 으로 아질산 소거활성이 측정되었으며, ethylacetate가 81.68%로 가장 높은 아질산 소거활성이 측정되었다. 그리고 pH 4.2에서는 n-hexane 18.70%, methylenechloride 15.94%, ethylacetate 66.19%, n-butylalcohol 55.75%, water 17.44% 으로 아질산염 소거활성이 측정되었다. pH 1.2와 마찬가지로 ethylacetate 추출물이 높은 아질산염 소거능이 측정되었다. 그리고 pH 6.0에서는 ethylacetate 47.15%, n-butylalcohol 29.09%, water 7.99%의 아질산염 소거활성이 측정되었으며, n-hexane과 methylenechloride에서는 활성이 나타나지 않았다. Ethylacetate 추출물은 pH가 증가해도 분획추출물 중 가장 높은 아질산염 소거능을 나타냈다. 이는 왕고들빼기의 메탄올 추출물의 아질산 소거능을 연구한 박[66]의 결과와도 유사한 결과이다. 한국 재래약초의 항균 및 항산화성에 대해 연구한 박[56]의 연구에서 약모밀, 소목, 마디풀, 육계나무의 아질산염 소거능이 높게 나타났는데, pH 1.2에서 가장 활성이 좋았으며, pH 4.2, pH 6.0으로 높아질수록 활성이 낮게 나타났다. pH 6.0에서 약모밀은 30%의 활성을 나타냈고, 소목, 마디풀, 육계나무 등은 10% 이상의 소거활성을 나타냈다고 보고하였다. 이 식물들은 pH 1.2, pH 4.0에서 50%이상의 아질산염 소거활성을 나타냈다. 이와같은 결과들로 비교하여 볼 때, 와송의 ethylacetate추출물의 경우 PH 1.2, 4.0에서 81.68%, 66.19%로 높게 나타났으며, pH 6.0에서 47.15%로 소목, 마디풀 보다 30% 더 높은 아질산염 소거활성을 확인할 수 있었다. 또한, pH가 증가될수록 아질산염 소거활성이 감소되어 소목, 마디풀은 10%이하의 소거 활성을 보였지만 와송의 ethylacetate 추출물은 pH 6.0에서 47.15%로 소거활성이 측정되어, 현재 육가공 식품에 품질 유지와 풍미를 위해 전반적으로 많이 쓰이며 발암 물질 논란이 되고 있는 아질산염 소거제로서 이용 가능성을 확인하였다.

Table 11. Nitrite scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

solvent extracts	Nitrite scavenging activity, % of control		
	Concentration (mg/ml)		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
n-hexane	25.13±0.90 ^e	18.70±1.62 ^c	ND ^d
methylenchloride	36.67±1.54 ^d	15.94±1.07 ^c	ND ^d
ethylacetate	81.68±2.31 ^a	66.19±0.96 ^a	47.15±1.80 ^a
n-butylalcohol	74.00±0.67 ^b	55.75±1.46 ^b	29.09±1.45 ^b
water	47.14±0.71 ^c	17.44±2.53 ^c	7.99±2.27 ^c

3.2.3 항산화 효소 활성

생체 내에서 생성된 활성 산소(ROS)는 세포내 산화스트레스를 초래하게 되는데 이때 이와같은 독성으로부터 보호하기 위하여 방어물질인 ascorbate peroxidase(APX), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(POX), ascorbic acid, glutathion, carotenoid 등의 항산화 물질을 생성시킨다고 보고하였다[68][69]. 식물들은 고착하여 생활을 하기 때문에 외부 스트레스에 대한 환경 적응 능력이나 저항성이 동물 보다 높아 많은 종류의 항산화 물질을 만들어내는 것으로 알려져 있다[67]. 세포에 유해한 oxygen radical을 과산화수소로 전환시키고, 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능을 한다고 보고하였다[69].

APX(ascorbate peroxidase)는 식물의 엽록체, 미토콘드리아, 세포질 및 세포벽에 존재하고, APX는 ascorbate를 산화시켜 과산화수소를 불활성화하여 세포질과 엽록체에서 가장 중요한 활성산소 제거제 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 과산화수소는 catalase나 peroxidase가 다시 물과 산소로 분해하여 생체 내 항산화 기작을 유지하는 것으로 보고 되었다[67].

와송의 분획 추출물의 APX, Catalase, POX 효소활성을 Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13에 나타냈다. APX 효소활성은 ethylacetate가 1125.89, n-butylalcohol 481.91, n-hexane 136.02, methylenechloride 128.682, water가 77.62 $\mu\text{mol ascorbate oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$ 으로 측정되어 APX 효소활성은 ethylacetate가 높게 측정되었으며, n-butylalcohol, n-hexane, methylenechloride, water순서대로 높은 항산화 효소 활성이 측정되었다(Fig. 11). ethylacetate는 박[66]의 왕고들빼기 생리활성 연구에서 뿌리 660.76 $\mu\text{mol ascorbate oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$ 보다 2배 높은 값으로 측정되었다.

Catalase 효소활성은 ethylacetate 119.87 $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ decomposed}/\text{min}/\text{mg protein}$ 으로 가장 높게 측정되었으며, n-butylalcohol 34.80, n-hexane 9.58, methylene chloride 8.49, water 4.71 $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ decomposed}/\text{min}/\text{mg protein}$ 순으로 높게 측정되었다(Fig. 12). 박[66]의 연구에서 왕고들빼기의 catalase 효소활성은 13.88 $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ decomposed}/\text{min}/\text{mg protein}$ 로 뿌리가 가장 높게 나타났는데, 와송의 ethylacetate추출물은 왕고들빼기 뿌리의 9배 이상, n-butylalcohol은 2배 이상의 활성을 나타내며 몹시 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다.

POX 효소활성은 n-butylalcohol 2.71, ethylacetate 2.35, n-hexane 1.79, methylenechloride 1.77, water 1.54 mmol tetraguaiacol/min/mg protein순으로 높게 나타났다(Fig. 13). 박[66]의 연구에서 왕고들빼기 줄기의 POX 효소활성은 7.04 mmol ascorbate oxidized/min/mg protein으로 나타났으며, 꽃 5.73, 뿌리 3.91 mmol ascorbate oxidized/min/mg protein로 나타났는데, 이는 와송의 분획별 추출물보다 높은 수치로 나타났다.

와송은 분획별 추출물중에 ethylacetate의 추출물의 APX와 catalase의 효소활성이 1125.89 μ mol ascorbate oxidized/min/mg protein, 119.87 mmol H₂O₂ decomposed/min/mg protein로 n-hexane의 8배, n-butylalcohol의 2.33배 높았으며, POX효소활성은 n-butyl alcohol이 2.71 mmol tetraguaiacol/min/mg protein로 ethylacetate 2.35 mmol tetraguaiacol/min/mg protein보다 높게 나타났다. 와송의 분획 추출 용매에 따라 효소 활성이 차이가 많이 나타남을 확인하였다. 높은 항산화 효소 활성을 보이는 ethylacetate, n-butylalcohol분획 추출물을 이용하여 anti-aging에 관련된 천연 화장품 개발이나 건강 기능성 식품으로서의 활용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

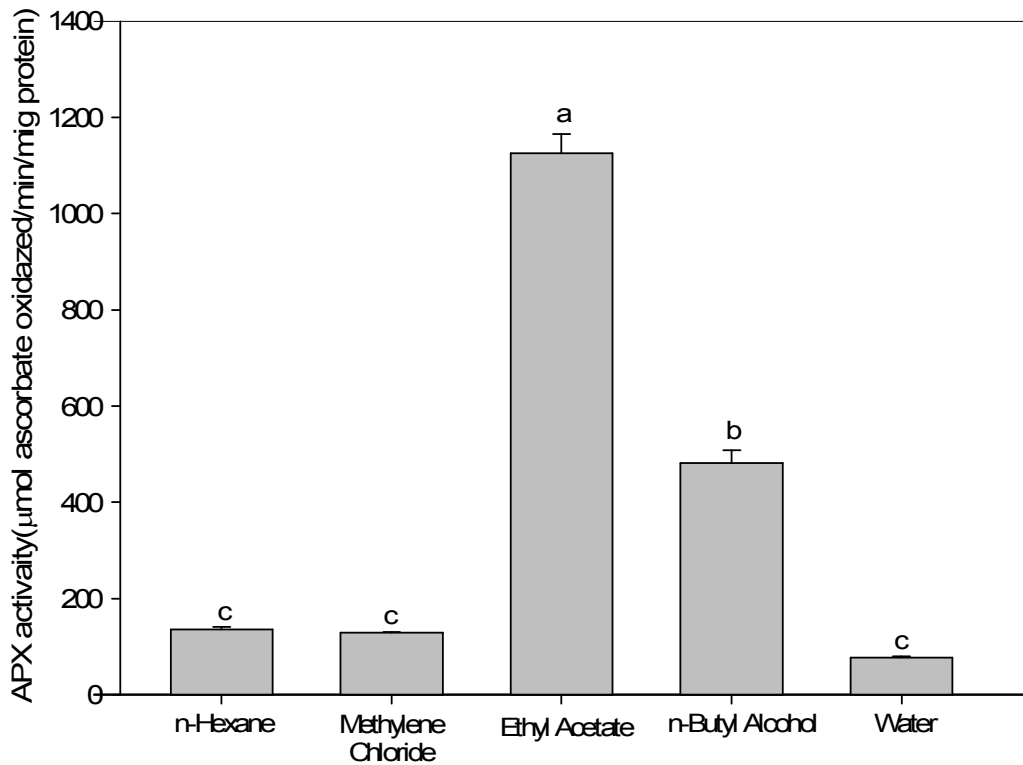


Fig. 11 APX activities of solvent extracts from *O. japonicus*.

Bar 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.

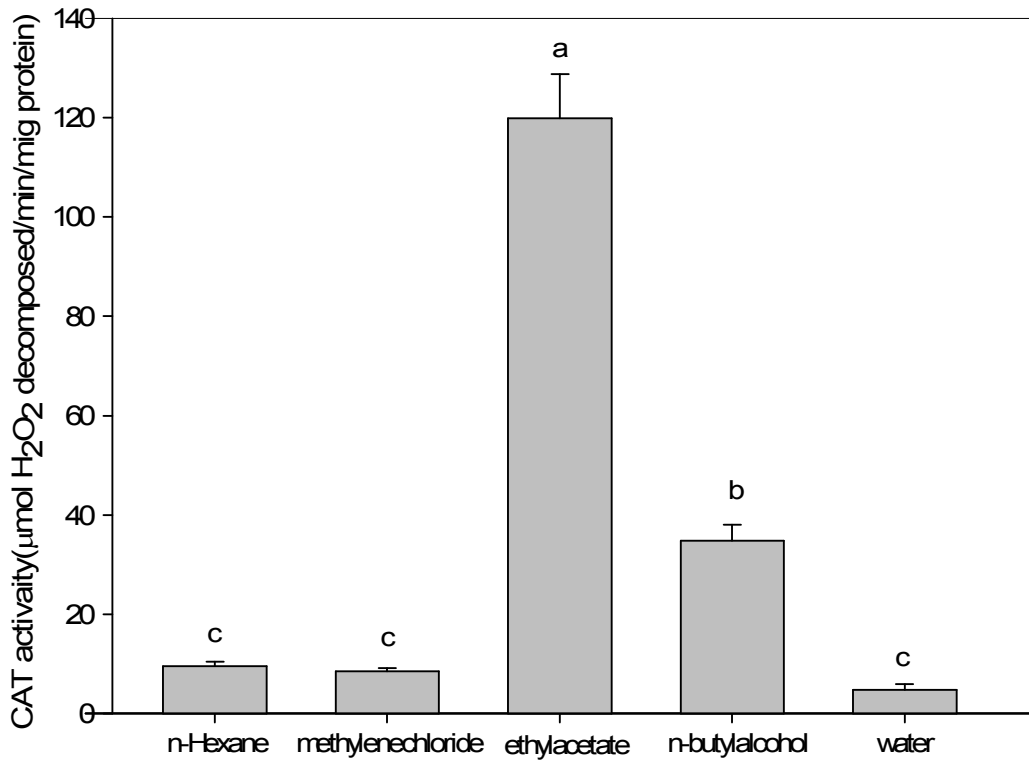


Fig. 12 CAT activities of solvent extracts from *O. japonicus*.

Bar 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.

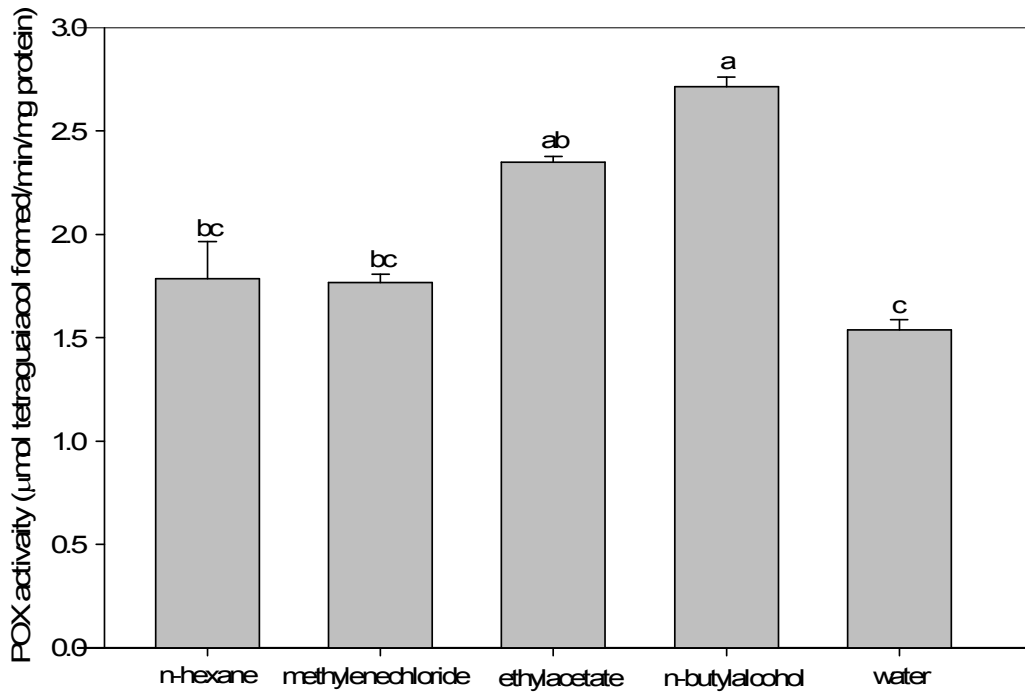


Fig. 13 POX activities of solvent extracts from *O. japonicus*.

Bar 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.

3.2.4 Tyrosinase 활성저해 효과

와송의 분획 추출물별 tyrosinase 활성저해 효과를 fig. 14에 나타냈다. 분획 추출물을 각각 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml, 10.0 mg/ml의 농도로 희석하여 tyrosinase 활성저해 효과를 구하였다. 농도 0.5 mg/ml에서 n-hexane 50.14%, methylenechloride 33.67%, ethylacetate 25.42%, n-butylalcohol 38.18%, water 11.60%으로 측정되었다. 농도 1.0 mg/ml에서 n-hexane 60.40%, methylenechloride 51.02%, ethylacetate 37.80%, n-butylalcohol 45.38%, water 15.24%으로 측정되었다. 농도 2.5 mg/ml에서 n-hexane 68.89%, methylenechloride 71.34%, ethylacetate 47.95%, n-butylalcohol 62.72%, water 19.20%으로 측정되었다. 농도 5.0 mg/ml에서 n-hexane 71.97%, methylenechloride 83.09%, ethylacetate 65.99%, n-butylalcohol 80.96%, water 23.28%로 측정되었다. 농도 10.0 mg/ml에서 n-hexane 88.94%, methylenechloride 88.53%, ethylacetate 83.61%, n-butylalcohol 88.59%, water 36.52%으로 측정되었다. 와송 추출물의 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 저해 효과가 증가되었다. 10.0 mg/ml 농도에서 water를 제외한 모든 추출물에서 80%이상의 tyrosinase 활성저해 효과가 나타났으며, n-hexane 추출물이 가장 tyrosinase 저해 효과가 높게 나타났다.

박[66]의 연구에서 왕고들빼기의 5.0 mg/ml의 농도의 꽃 추출물이 27.5%의 저해 효과를 보고하였고, 양 등[70]의 오이 추출물에 대한 tyrosinase 활성저해 효과에서는 0.1 mg/ml의 농도에서도 17%의 활성저해 효과를 보고하였다. 차[71]의 연구에서 수박 속껍질 추출물과 흑측은 0.15 mg/ml의 농도 이상에서 40% 이상의 tyrosinase 활성저해율을 보고하였다. 결과와 비교하여 와송 추출물의 농도는 0.5 mg/ml로, 오이, 수박 속껍질보다 3배 이상 높은 농도지만 n-hexane 추출물의 50.14%의 결과를 제외하면, 수박속껍질이나 흑측의 40% 저해율 보다 낮은 33.67%, 25.42%, 38.81%, 11.60%의 저해율이 측정되었다. 하지만 와송은 0.5 mg/ml 농도의 n-hexane 추출물이 50.14%로 나타나 왕고들빼기 꽃 27.5% 보다 높은 저해율을 나타냈다. 이 실험의 결과로 와송이 미백 효과에 뛰어난 것으로 판단되며 추후 주름 개선, 피부노화 억제 개선 또는 미백 기능성 화장품의 주요재료로서 와송의 가치가 매우 높을 것으로 생각되며 다양한 연구로 피부 보호 효과 및 미백에 대한 연구를 더욱 폭넓게 수행해야 할 것으로 사료된다.

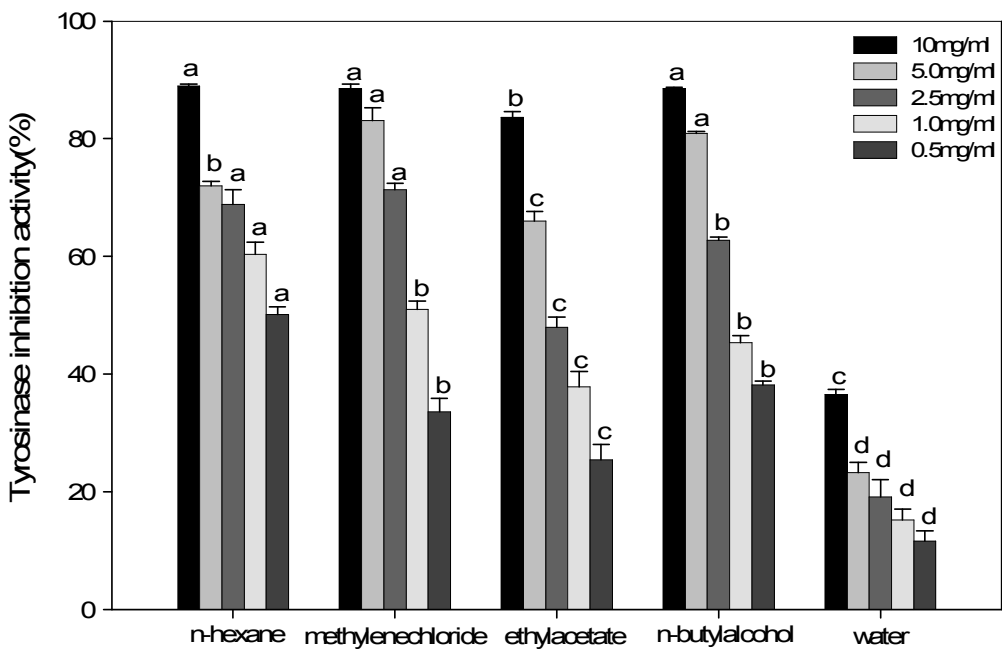


Fig. 14 Tyrosinase inhibition activity of solvent extracts from *O. japonicus*.

Bar 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.

3.3 항균활성 효과

Agar diffusion assay를 이용하여 측정된 와송의 분획 추출물의 항균활성을 Fig. 15, Table 10 에 저해환의 크기를 나타냈다. 6종의 균주 *Lissteria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 항균활성이 나타났으며, 와송 분획추출물 중 ethylacetate 추출물의 항균활성이 좋았으며, n-butylalcohol, water에서도 일부 항균활성이 나타났다. n-hexane, methylenechloride 추출물은 저해환이 작거나 형성되지 않았다.

*Lissteria monocytogenes*는 와송 분획별 추출물의 저해환이 ethylacetate 30.5 mm, n-butylalcohol 23.1 mm, water추출물 20.5 mm로 kanamycine의 16.7 mm 보다 큰 저해환이 나타났으며, n-hexane 10.2 mm, methylenechloride 12.8 mm 로 나타났다(Fig. 15.1). *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 에 대한 와송 분획별 추출물의 저해환은 ethylacetate가 25.2 mm, 25.1 mm, 27.6 mm로 와송 분획추출물중 가장 큰 저해환을 형성했으며, n-butylalcohol 17.5 mm, 16.0 mm, 25.0mm, water추출물 15.0 mm, 12.5 mm, 22.2 mm 로 ethyllacetate다음으로 n-butylalcohol, water 순서대로 좋은 항균활성을 확인하였다. 특히 ethylacetate 추출물은 *Staphylococcus epidermidis* 에 대한 항생제의 저해환 25 mm 보다 큰 30.5 mm 의 저해환을 형성했고, *Malassezia furfur*에서의 항생제의 저해환 20.1 mm 보다 큰 32.1 mm 의 저해환을 형성하여, *Staphylococcus epidermidis* , *Malassezia furfur*에서 ethylacetate 항균활성이 뛰어난 것을 확인하였다(Fig. 15. 2,3,4,6). *Escherichia coli*에서 kanamycine은 20.0 mm의 저해환을 형성했고, ethylacetat 13.9 mm, n-butylalcohol 9 mm, water 9 mm의 저해환을 형성했으며, n-hexane과 methylene chloride는 저해환이 형성되지 않았다(Fig. 15.5).

한[72]의 포도씨 추출물, 성[73]의 은행잎 추출물, 권[74]의 동백나무잎 추출물의 항균연구에서 추출물의 항균활성에 대한 결과를 와송 추출물의 결과와 비교하였을 때, *Listeria Monocytogenes*의 경우 모든 와송의추출물 n-hexane 10.2 mm, methylene chloride 12.9 mm, ethylacetate 30.5 mm, n-butylalcohol 23.1 mm, water 20.5 mm의 저해환을 형성하였고, 은행, 동백은 10 mm 이하의 저해환을 형성하여 와송 추출물보다 항균활성이 낮게 나타났다. 동백의 경우 n-hexane과 ethylacetate추출물의 활성이 없었다. *Staphylococcus aurens*의 경우 n-hexane추출물과 n-butylalcohol의 포도추출물

은 10 mm, 16 mm의 저해환을 형성하여 와송의 n-hexane추출물 8 mm, n-butylalcohol 15 mm 보다 큰 저해환을 형성하였으며, 그 뒤로 은행 7 mm, 동백 0mm 의 저해환을 형성하였고, ethylacetate와 water추출물의 경우 22.5 mm, 12.5mm 의 저해환을 형성하여 포도씨 ethylacetate추출물 8 mm, water추출물 10 mm 보다 큰 저해환을 형성하였고, 동백 ethylacetate추출물 9 mm, water추출물 9mm, 은행 ethylacetate추출물 7 mm, water추출물 9 mm 순서대로 높게 나타났다. *Escherichia coli*의 경우 ethylacetate추출물의 경우 와송 13.9 mm, 포도 12 mm, 은행 8.5 mm, 동백 0mm 순으로 큰 저해환을 형성하였으며, Hexane, n-butylalcohol, water추출물에서는 포도 12~16 mm, 와송 9~10 mm, 은행 7~8 mm, 동백 0~6 mm 순으로 저해활성이 높게 나타났다. *Pseudomonas*의 경우 ethylacetate에서 와송이 27.6 mm 의 저해환을 형성하여 포도씨 12mm의 저해환 보다 크게 나타났으며, 나머지 추출물에서 포도씨의 경우 항균활성이 나타나지 않았다. 대부분 균주에서 와송추출물이 다른 식물추출물과 비교하여 높은 항균활성을 나타냈다. 특히 ethylacetate추출물의 경우 대부분 균에서 와송이 가장 큰 저해환을 형성하였다. 이와 비교하여 와송 ethylacetate의 추출물의 경우 대부분 균주에서 높은 항균활성능력을 갖는 것으로 나타나 천연항균제, 천연보존료 개발에 유익한 원료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

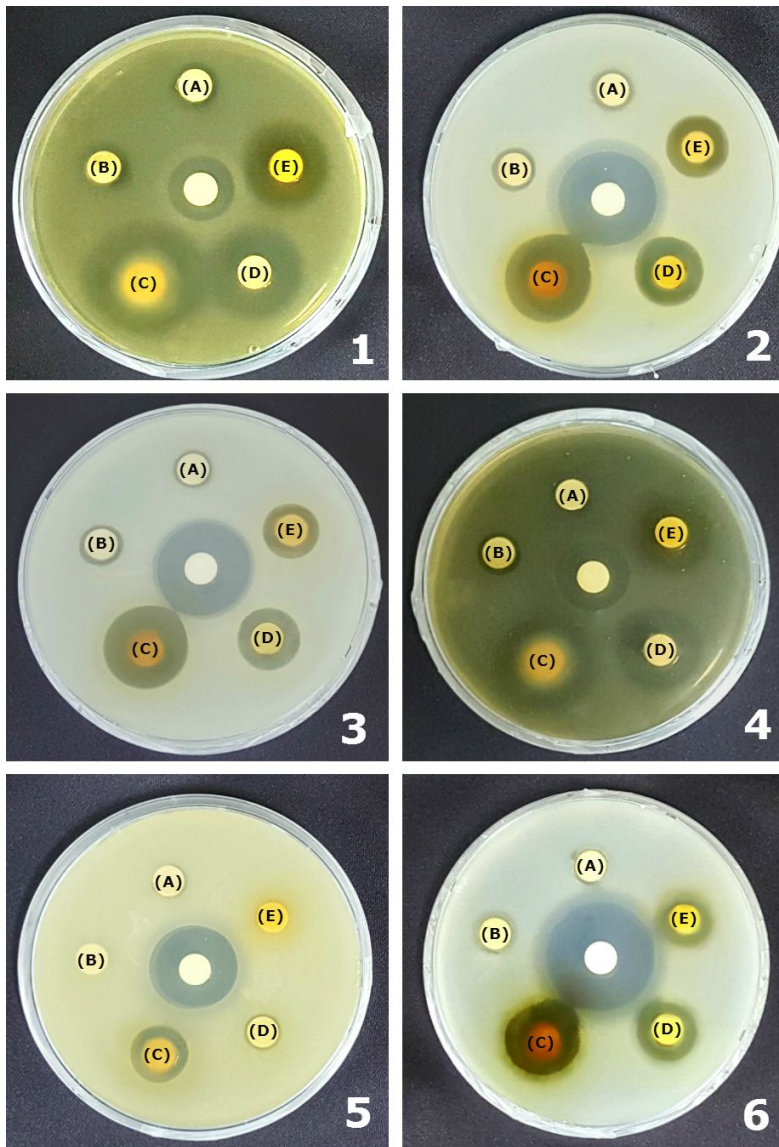


Fig. 15 Inhibition activity of the *O. japonicus* against the microorganism in paper disc diffusion assay.

(1~6:strains)(1)*Lissteria monocytogenes*, (2)*Staphylococcus epidermidis*, (3)*Staphylococcus aureus*, (4)*Malassezia furfur*, (5)*Escherichia coli*, (6)*Pseudomonas aeruginosa* (A~E:solvent extratcts from *Orostachys japonicus*.) (A)n-hexane, (B)methylenechloride, (C)ethylacetate, (D)n-butylalcohol, (E)water

Table 12. Inhibition zone size against the microorganism by agar diffusion method of solvent extracts from *O. japonicus*

	Inhibition zone size (mm)					
	n-hexane	methylene chloride	ethyl acetate	n-butyl alcohol	water	kanamycin
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	++	++++	+++	+++	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	++	++++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	+++	++	++	+++
<i>Malassezia furfur</i>	+	++	+++++	++++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	++	+	+	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+++	++	++	+++++

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

3.4 MTT assay에 의한 인체 암세포 생존율

와송 분획별 추출물농도 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 폐암 세포주(Calu-6)의 생존율은 n-hexane 33.11%, methylenechloride 40.74%, ethylacetate 40.43%, n-butylalcohol 70.33%, water 87.33%의 생존율을 나타냈다. n-hexane추출물과 methylenechloride와 ethylacetate에서 높은 세포증식억제효과를 나타냈다. 유방암 세포주(MCF-7)의 생존율은 n-hexane 50.63%, methylenechloride 60.80%, ethylacetate 60.15%, n-butylalcohol 44.77%, water 80.06%의 생존율을 나타냈다. water추출물을 제외한 대부분 추출물에서 세포증식억제효과를 나타냈다. 대장암 세포주(HCT-116)의 생존율은 n-hexane 61.79%, methylenechloride 61.84%, ethylacetate 63.58%, n-butylalcohol 65.97%, water 82.17%의 생존율을 나타냈다.

와송 분획별 추출은 특히 폐암 세포주(Calu-6)에 큰 세포증식 억제 활성이 나타났다. n-hexane 분획추출물은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 33%의 생존율을 보여 높은 암세포 증식억제활성을 나타냈다. 유방암 세포주(MCF-7)에서 n-butylalcohol 분획추출물에서 높은 암세포증식억제활성을 나타냈다. 그러나 대장암 세포주(HCT-116)에 대해서는 5가지 분획추출물 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 60%이상의 생존율을 나타내며, 폐암, 유방암보다 낮은 세포증식억제활성을 나타냈다. 와송 분획추출물에 따라 암세포 증식 억제율에 차이가 있으며, 암 세포의 종류에 따라 추출물의 증식억제효능에 편차가 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때, 와송이 폐암, 유방암 예방 및 치료소재로서 연구 및 개발될 가치가 있는 것으로 사료된다.

3.4.1 폐암 세포주 (Calu-6)의 생존율

MTT assay에 의한 와송의 분획 추출물에 대한 폐암 세포주(Calu-6)의 세포증식억제 효과를 측정하여 Fig. 16 에 나타내었고, 폐암 세포주(Calu-6)의 세포 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC₅₀값은 Table 11 에 나타냈다.

와송의 분획 추출물은 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml의 농도로 희석하여 농도별 폐암 세포주(Calu-6)의 생존율을 나타냈으며, 추출물농도 50 µg/ml에서 n-hexane 70.75%, methylenechloride 79.52%, ethyl acetate 78.60%, n-butylalcohol 93.06%, water 97.27%의 생존율을 나타냈다. 추출물 농도 100 µg/ml에서 n-hexane 63.54%, methylenechloride 71.84%, ethylacetate 68.81%, n-butylalcohol 86.15%, water 94.87%, 추출물농도 200 µg/ml에서 n-hexane 53.25%, methylenechloride 68.09%, ethylacetate 55.41%, n-butyl alcohol 81.12%, water 92.88%의 생존율을 나타냈다. 추출물농도 400 µg/ml에서 n-hexane 40.11%, methylenechloride 56.54%, ethylacetate 54.34%, n-butylalcohol 78.90%, water 90.00%, 추출물농도 800 µg/ml에서 n-hexane 37.84%, methylene chloride 43.21%, ethylacetate 50.47%, n-butylalcohol 77.30%, water 89.55%의 생존율을 나타냈다. 추출물농도 1000 µg/ml에서 n-hexane 33.11%, methylenechloride 40.74%, ethyl acetate 40.43%, n-butylalcohol 70.33%, water 87.33%의 생존율을 나타냈다. n-hexane추출물과 methylenechloride와 ethylacetate에서 높은 세포증식억제 효과를 나타냈다. 와송 분획별 추출물의 폐암 세포주(Calu-6)에 대한 IC₅₀값은 n-hexane 419.03 µg/ml, methylenechloride 678.45 µg/ml, ethylacetate 686.40 µg/ml, n-butyl alcohol 2175.22 µg/ml, water 5431.67 µg/ml으로 나타냈다. 천 등[75]의 서양민들레 추출물의 부위별 연구에서 폐암 세포주(Calu-6)에 대한 IC₅₀값은 꽃 85.7, 잎 251.3, 꽃대 284.5, 뿌리 775.4 mg/kg으로 보고하였다. 민들레 꽃, 잎, 꽃대의 경우 와송의 n-hexane추출물보다 낮은 IC₅₀값으로 나타나 민들레의 세포증식억제능력 보다 낮은 것을 확인하였다. 그러나 천 등[76]의 재배인삼의 연령별 생리활성에 관한 연구에서는 1000 µg/ml의 농도일 때 5년생 인삼이 47.2%, 2년생 인삼이 59%, 나머지 3년, 4년, 6년생 인삼이 85%이상의 폐암 세포주 생존율을 보고하였다. 인삼에 비교하여 와송 분획별 추출물은 n-hexane 33.11%, methylenechloride 40.74%, ethylacetate 40.43%의 생존율을 나타내어 인삼보다 높은 세포증식억제활성을 나타냈다.

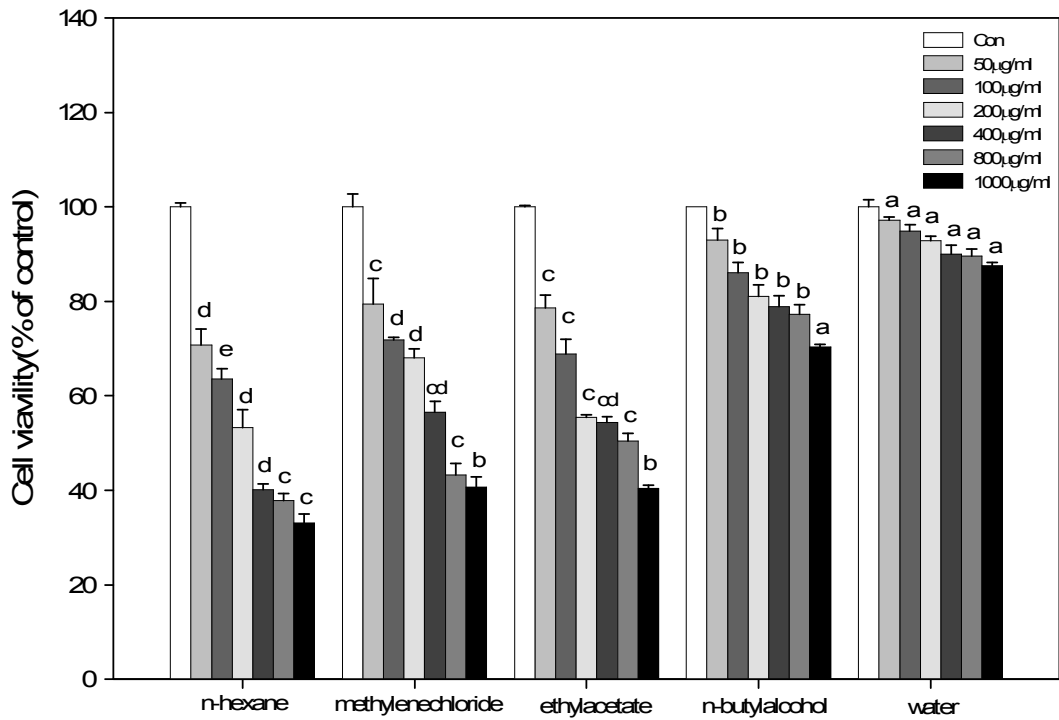


Fig. 16 Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of Calu-6 cell

Bar 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.

3.4.2 유방암 세포주(MCF-7)의 생존율

MTT assay에 의한 와송의 분획 추출물에 대한 유방암 세포주 (MCF-7)의 세포증식억제 효과를 측정하여 Fig. 17에 나타냈고, 유방암 세포주 (MCF-7)의 세포 사멸을 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC₅₀값은 Table 11에 나타냈다.

와송의 분획 추출물은 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml의 농도로 희석하여 단계별 유방암세포 (MCF-7)의 생존율을 나타냈다. 추출물농도 50 µg/ml에서 n-hexane 73.07%, methylenechloride 82.10%, ethyl acetate 80.33%, n-butylalcohol 71.69%, water 92.06%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 100 µg/ml에서 n-hexane 69.78%, methylenechloride 73.85%, ethylacetate 76.09%, n-butylalcohol 62.59%, water 91.37%, 추출물농도 200 µg/ml에서 n-hexane 67.42%, methylenechloride 71.27%, ethylacetate 74.00%, n-butylalcohol 55.38%, water 87.62%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 400 µg/ml에서 n-hexane 58.47%, methylenechloride 67.07%, ethylacetate 67.27%, n-butylalcohol 52.16%, water 81.85%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 800 µg/ml에서 n-hexane 54.49%, methylenechloride 66.21%, ethylacetate 63.09%, n-butylalcohol 49.55%, water 81.94%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 1000 µg/ml에서 n-hexane 50.63%, methylenechloride 60.80%, ethyl acetate 60.15%, n-butylalcohol 44.77%, water 80.06%의 생존율을 측정했다. water 추출물을 제외한 대부분 추출물에서 세포증식억제 효과를 나타냈다. 특히 n-butylalcohol과 n-hexane 추출물에서 다른 추출물보다 높은 세포증식억제효과를 나타냈다. 추출물의 유방암 세포주 (MCF-7)에 대한 IC₅₀값은 n-hexane 997.44 µg/ml, methylenechloride 1651.03 µg/ml, ethylacetate 1464.54 µg/ml, n-butylalcohol 328.82 µg/ml, water 3409.41 µg/ml으로 나타났다. 임 등 [77]의 연구에서 황칠나무 추출물을 50, 100 µg/ml로 처리하였을 때 90%이상 생존하였고, 500 µg/ml로 처리하였을 때 41.7%의 세포 생존율을 보고하였다. 김 등 [78]의 연구에서 오미자추출물이 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml의 경우 96.2%, 67.4%, 43.3%, 25.2%의 생존율을 보고하였다. 50, 100 µg/ml 농도에서는 와송 n-hexane, n-butylalcohol 추출물이 73.07%, 71.69%로 낮은 세포생존율을 보이지만 500 µg/ml의 농도에서 58.47%, 52.16% 로서 황칠나무 추출물과 오미자 추출물에 비교하여 더 세포생존율이 높게 나타났다. 와송 추출물은 높은 농도보다 낮은 농도에서 황칠나무 추출물과 오미자 추출물보다 높은 세포증식억제 효과를 나타냈다.

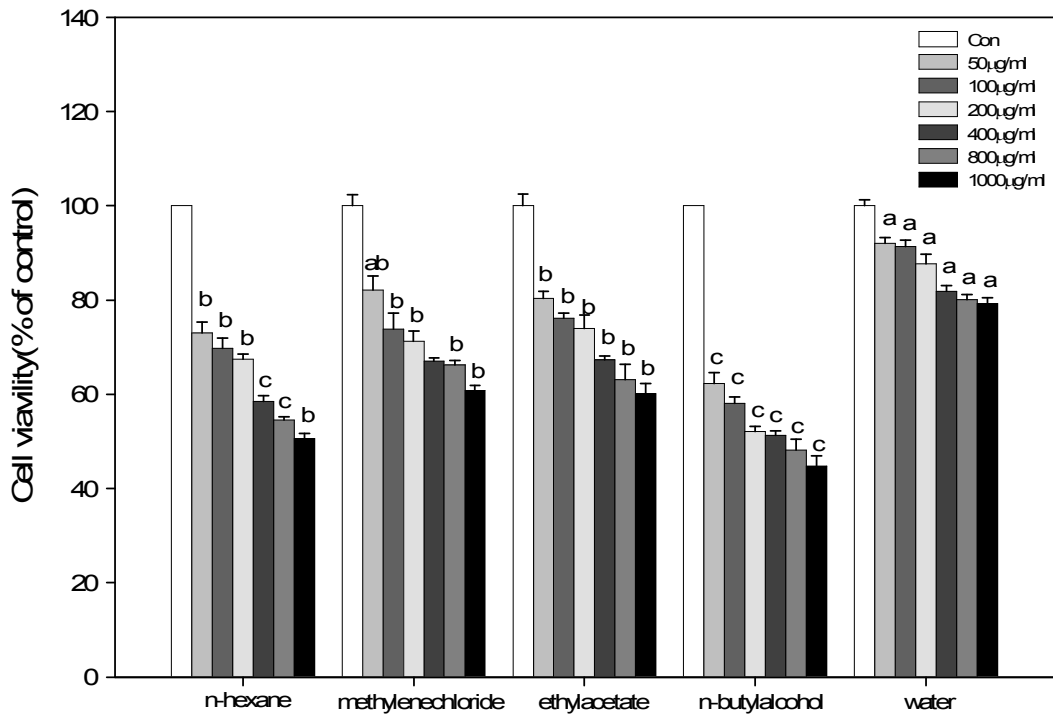


Fig. 17 Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of MCF-7 cell

Bar 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.

3.4.3 대장암 세포주(HCT-116)의 생존율

MTT assay에 의한 와송의 분획 추출물에 대한 대장암 세포주 (HCT-116)의 세포증식 억제 효과를 측정하여 Fig. 18에 나타내었고, 대장암 세포주 (HCT-116)의 세포 사멸을 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC₅₀값은 Table 11에 나타냈다.

와송의 분획 추출물은 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml의 농도로 희석하여 단계별 대장암 세포주 (HCT-116)의 생존율을 나타냈으며, 추출물농도 50 µg/ml에서 n-hexane 80.07%, methylenechloride 79.73%, ethylacetate 83.03%, n-butylalcohol 82.86%, water 89.24%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 100 µg/ml에서 n-hexane 79.79%, methylenechloride 71.95%, ethylacetate 76.65%, n-butylalcohol 75.22%, water 88.49%, 추출물농도 200 µg/ml에서 n-hexane 76.75%, methylenechloride 67.87%, ethylacetate 73.39%, n-butyl alcohol 73.55%, water 87.96%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 400 µg/ml에서 n-hexane 71.14%, methylenechloride 65.64%, ethylacetate 67.81%, n-butylalcohol 72.06%, water 87.62%, 추출물농도 800 µg/ml에서 n-hexane 67.36%, methylene chloride 63.30%, ethylacetate 64.03%, n-butylalcohol 69.82%, water 85.62%의 생존율을 측정했다. 추출물농도 1000 µg/ml에서 n-hexane 61.79%, methylenechloride 61.84%, ethylacetate 63.58%, n-butylalcohol 65.97%, water 82.17%의 생존율을 측정했다. water 추출물을 제외한 추출물에서 60%의 생존율을 측정했다. 추출물의 대장암 세포주 (HCT-116)에 대한 IC₅₀값은 n-hexane 1658.43 µg/ml, methylenechloride 1719.71 µg/ml, ethyl acetate 1628.08 µg/ml, n-butylalcohol 2254.48 µg/ml, water 15903.33 µg/ml으로 나타났다.

천 등[75]의 재배인삼의 연령별 생리활성에 관한 연구에서는 2년생이 98%로 나타났으며, 3,4,5,6년생 인삼추출물은 모두 100%이상의 세포주 생존율을 보고하였다. 홍 등 [79]의 길경추출물에 의한 대장암 세포주에 관한 연구에서, 1000 µg/ml의 농도일 때 24시간 처리 후 약 80%의 세포 생존율을 보고하였다. 권 등[80]의 삼지구엽초에 대한 연구에서 1000 µg/ml에서 59.3%, 500 µg/ml에서 77%의 생존율로, 와송과 비슷한 암 세포증식억제 활성을 나타냈다. 인삼, 길경과 비교하여 와송 분획별 추출물이 대장암 세포주에서 비슷한 암세포증식억제 활성을 갖는 것으로 사료된다.

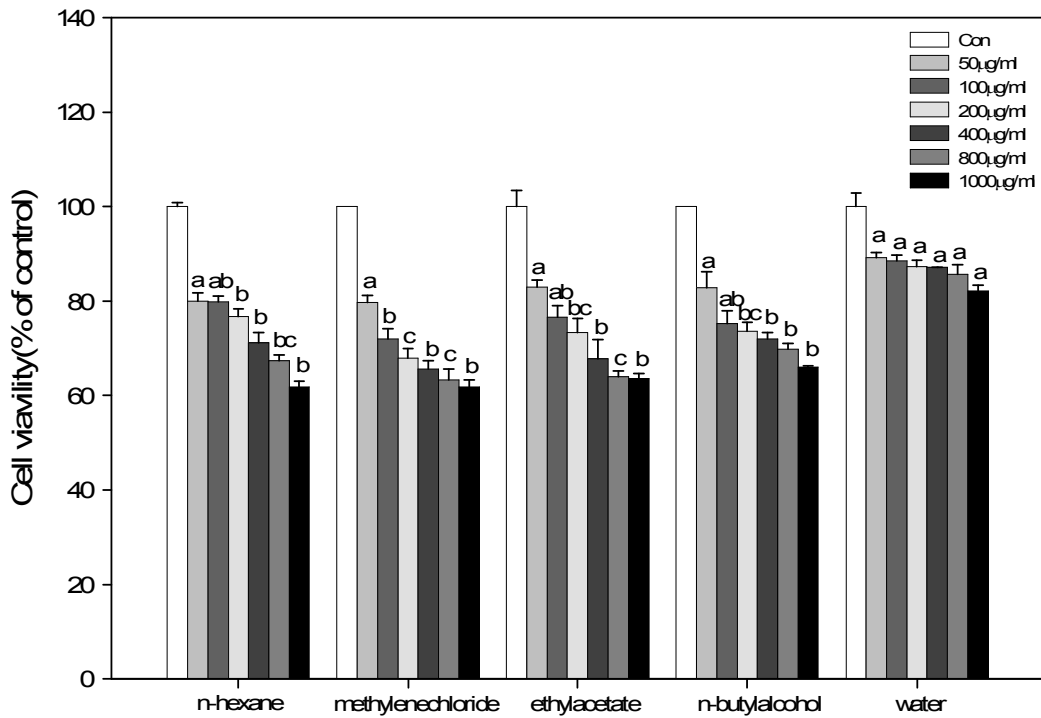


Fig. 18 Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of HCT-116 cell

Bar 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.

Table 13. IC₅₀ (μg/ml) of solvent extracts from *O. japonicus* on three cancer cell lines.

Cell line	IC ₅₀ * (μg/ml)				
	Solvent extracts from <i>O. japonicus</i>				
	n-hexane	methylene chloride	ethylacetate	n-butyl alcohol	water
Calu-6	419.03	678.45	686.40	>1000	>1000
MCF-7	997.44	>1000	>1000	328.82	>1000
HCT-116	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

*Extract concentrations, which show 50% cell viability of solvent extracts from *Orostachys japonicus*.

제 4 장 요약 및 결론

와송의 잎조직을 이용한 조직배양에서 캘러스의 유기는 10 μM BAP, 4 μM 2,4-D로 조합된 MS배지, 24°C 6500Lux 16시간 광주기의 배양 조건에서 5주 후에 가장 잘 유기되었다. 0, 0.1, 1 μM 2,4-D를 첨가한 배양 조건에서 모두 뿌리가 발달했으며, 0.5 μM BAP, 100 μM 2,4-D로 첨가된 배지에서는 배지와 접촉되지 않는 윗면에서 뿌리가 발달되었다. Shoot의 형성은 10 μM BAP, 4 μM 2,4-D가 첨가된 배지에서 유기된 callus를 성장조절물질이 포함되지 않은 MS배지에 옮겨주었을 때 shoot가 형성되었다. 따라서 이러한 조직배양을 이용한 대량 증식의 방법을 통해 효율적인 와송 생산에 이용될 수 있는 것으로 사료된다.

와송 ethylacetate 분획추출물의 폴리페놀 함량은 634.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 플라보노이드 함량은 205.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타났다. 10대 슈퍼푸드에 알려져 건강기능성 식품으로 이용되고 있는 아로니아의 폴리페놀 함량은 757.6 mg/g 에 비하여 0.16배 낮았으며, 플라보노이드 함량은 62.9 mg/g 로 3.3배 높은 결과를 나타냈으며, 타 식물에 비교하여 높은 결과를 나타냈다. 또한 ethylacetate 분획추출물의 1 mg/ml 농도에서 DPPH radical, ABTS radical 소거능은 95% 이상으로, ascorbic acid의 97%의 소거능과 유사한 결과를 나타냈다. APX 효소활성과 catalase 효소활성은 1125.89 μMol ascorbate oxidized/min/mg protein, 119.87 mmol H_2O_2 decomposed/min/mg protein 으로 나타났으며, disc agar plate diffusion에서 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur* 균주에서 항생제 kanamycine 보다 큰 저해환을 형성하는 높은 항균력이 확인되었다. 이와 같은 결과는 와송 ethylacetate 분획추출물을 이용한 천연 항산화제와, 천연 항균제로서의 개발에 커다란 효과와 함께 경제성을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Lee KW, KIM HD and Park KR. (2003) Numerical Taxonomy of Korean *Orostachys* (Crassulaceae). Kor. j. Plant Tax. 33(4) 359-371
- [2] Jeon SH, Hong DO, Lee CW, Kim HY, Shin SC and Kang JH. (2006) Growth and Flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger Affected by Transplanted Seedling Size. Korean J. Medicinal Crop Sci.14(3); 153-157
- [3] Lee PS. 이필승 (2011) 와송 대량증식기술 및 출하기간 연장기술개발. 농촌진흥청.
- [4] Lee JH. (2014) 바위솔(와송) 안정재배 기술개발
- [5] 송정섭 (2003) 바위솔 번식과 재배기술 Landscaping tree 77(11); 12-14
- [6] Kim K.S. (1999) Micropropagation and *In Vitro* Production of Achyranthes Saponin in *Achyranthes japonica*
- [7] Kim Y.S., Eun J.S., Park J.S., Jeong J.H. and Lim H.S. (2003) Virus-free Stock production by Apical Meristem Culture for CarMV and CarRSV in Camation. 원예과학기술지 21(1) 108
- [8] 이봉춘, 김재현, 이석구, 박재인, 문흥규, 현영일 (1987) 희귀식물의 기내배양에 의한 급속증식. 한국임학회 76(1) 70-77
- [9] Lee SH. (2001) In vitro culture of *eleutherococcus senticosus* Maxim. accessions.
- [10] 정진아. (2005) 기내배양을 통한 한국자생양치식물의 대량번식 및 돌연변이 육종
- [11] 안민실. (2002) Fundamental Studies for Interspecific and Intergeneric Cross Breeding in the Genus *Hemerocallis*.
- [12] 고은경 (2001) Changes of Starch and Protein on Regeneration of Bulblets from the Culture of Bulb Scale Segments of *hyacinthus orientalis* in vitro.
- [13] Kim SH. (2010) Effects of the combination of *Umbilicaria esculenta* extract and anticancer drugs on human cancer cells. MS Thesis, Energy Korea Polytechnic University, Shinheung, Korea
- [14] 농림부 (2003) Development of high quality *Cynanchum wilfordii* Hemsley foods products and mechanistic elucidation of its antioxidant activity
- [15] Kim YS. (2014) Improvement of Production Management and Development of Processed Products

- [16] Kim ES. Development of loquat leaf-derived anti-obesity product and establishment of loquat leaf mass production system(2015)
- [17] Aruoma, O.I., H. Kaur and B. Halliwell. (1991) Oxygen free radical and human disease. *Journal of Royal society of Health* 111:172-177
- [18] Chae SK. (2001) The Antioxidative Activity of Phenolic Compounds in Wine. *J.Korean Soc. Ond. Food technol.* 5(1) 49-56
- [19] Yang YK., Kim SO. and KIM JH. (2014) Evaluation of the Nutritional Value of Traditional Korean Noodles through Energy Density and Diversity. *The Korean Journal of Food And Nutrition* Vol. 27(4) 732-741
- [20] Kim EJ., Choi JY., Yu MR., Kim MY., Lee SH. and Lee BH. (2012) Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal plants. *Korean J. Food science and technology* 44(3) 337-342
- [21] Chung HY., Sung B., Jung KJ., Zou Y. and Yu BP. (2006) The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid. Redox Sign.* 8: 572-581
- [22] Lu Y. and Foo LY. (2000) Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* 68(1) 81-85
- [23] Jung EJ. (2011) *Orostachys japonicus* induces apoptosis through caspase-dependet on human colon cancer cells.
- [24] Won YS., Lee JH., Kwon SJ., Ahn DU., Shin DY. and Seo KI. (2014) Anticancer Effects of Cultivated *Orostachys japonicus* on human Prostate Cancer Cell. *J.Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 41(1) 67-73
- [26] Yoon CH. (2004) The effects of *Orostachys japonicus* on the mRNA expression of different antioxidant enzymes and inhibition of cell growth in HepG2 cells.
- [27] Oh CH., Bae JB., Kim NS., Jeon H., Han KS., Lee MJ. and Kwon J. (2009) Effect of *Orostachys japonicus* A. Verger on Apoptosis Induction of Human Leukemia HL60 Cells Kor. *J. Pharmacogn.* 40(2) 118-122
- [28] Suk DH. (2010) Inhibitory Effect of the Extracts from *Orostachys japonicus* on Inflammation.
- [29] Kim SG., Choi JW., Park HJ., Lee SM. and Jung HJ. (2009)

- Anti-hyperlipidemic Effects of the Flavonoid-rich Fraction from the Methanol Extract of *Orostachys japonicus* in Rat. Kor. J. Pharmacogn. 40(1) 51-58
- [30] Choi SY., Chung MJ., and Sung NJ. (2008) Studies on the antioxidative Ability of Methanol and Water Extracts from *Orostachys japonicus* A. berger According to harvest Times. Korean J. Food & Nutr. 21(2) 157-164
- [31] Lee S.J., Seo J.K., Shin J.H., Lee H.J. and Sung N.J. (2008) Antioxidant Activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) According to Drying Methods. J. Korean Soc Food & Nutr. 37(5) 605-611
- [32] Murashige. T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- [33] Folin O., And W. Denis. (1912) On Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry* 12: 239-243.
- [34] Jia Z., Tang M. and Wu J. (1998) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4) 555-559.
- [35] Blois M. S. (1958), Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* 26, 1199-1200.
- [36] Re R, Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Catherine RE. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 26, 1231-1237
- [37] Kato. H., I.E. Lee, N.V. Chuyen, S.B. Kim and F. Hayase. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Bio. Chem.* 51, 1333-1338.
- [38] Kim D.S., B.W. Ahn, D.M. Yeum, D.W. Lee, S.T. Kim and Y.H. Park. (1987) Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. *Bull. Korean Fish. Soc.* 20, 463-468.
- [39] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- [40] Mishra N.P., Mishra R.K. and Singhal G.S. (1993) 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.* 102:903-910.
- [41] Chen G.X. and Asada K. (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves : Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30:987-998.
- [42] Chance B. and Maehly A.C. (1995) Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol.* 2:764-775
- [43] Park J0., Park J0.,and Joo CG. (2015) A study on Whitening and Anti-inflammatory Effects of *Eriobotrya Japonica* Leaf Extracts with Different Extraction Methods. *J.Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 41(2):151-157
- [44] Flurkey WH. (1991) Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci* 55: 93-95
- [45] Seo SH., Oh SY., Lee JS., Cho WK., Kim TS. and Ma JY. (2011) Effects of Soshiho-tang on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage in Hepatocytes. *Korean J. Orient. Int. Med.* 32(4)487-496
- [46] Hansen MB, nielsen SE, Berg K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell Kill. *J Immunol Methods* 119:203-210.
- [47] Lee H.K. and Park P.M (2013) Effective Plant Hormone Regulator and Medium to Reproduction of succulent, *Crassula portulaca*. *Korean A. Horticultural Science & Technology* 31(S2) 175-175
- [48] 김재백, 고건일, 최진영, 한상수, 함성호 (1986) Phenoxyalkanoic acidic Herbicides. Report of Institute of Pharmaceutical Research and Development 1(1) 125-190
- [49] Oh B.D (2010) Protoplast isolation, culture and Plant regeneration from callus in Kiwifruit *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*
- [50] Bae D.H. (2009) Plant Regeneration through Organogenesis and Camptothecin analysis from Callus of *Camptotheca acuminata Decaisne*
- [51] Shin K.S., Goh K.H., Lee Y.H., Park Y.W. and Suh S.C (2004) Effect of Casein on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Shoot Apical Meristem Explants of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) *Korean J. Plant*

- Biotechnol. 31(1) 67-72
- [52] 이향분 (2010) Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Organogenesis from Leaf Tissue Culture of *Muscari armeniacum* 'Early Giant'
- [53] 안정호 (2003) Effects of Growth Regulator, Medium and Genotype on In Vitro Culture of *Sedum sarmentosum*.
- [54] Kwon H.K. and Yoon E.S. (2010) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *sedum rotundifolium* D.Lee. J.Plant Biotechnol. 37. 83-88
- [55] Whang T.E., Lim H.O. and Lee J.W. (1991) Analysis of Plant Hormones by Immunoassay I . Production of Monoclonal Antibodies to Indole- 3-acetic acid. Korean J. Crop Sci. 36(6) 506-512
- [56] Park MJ.(2001) Studies on the Antimicrobial and Antioxidative effect of Korean traditional herbal medicine
- [57] Yoon JA, Hahm SW, Park JE and Son YS. (2009) Total Polyphenol and Flavonoid of Fruit Extract of *Opuntia humifusa* and Its Inhibitory Effect on the Growth of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 38(12), 1679-1684
- [58] Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH and Lee BH. (2012) Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. Korean journal of food science and technology 44(3), 2012.6, 337-342
- [59] Lee YJ. (2008) Antioxidant Activity in Yuza (*Citrus junos*) and Quality Characteristics of Yuza Yogurt
- [60] Hwang E.S. and Do Thi N. (2014) Antioxidant Contents and Antioxidant Activities of Hot-Water Extracts of Aronia (*Aronia melanocarpa*) with Different Drying Methods. J. Korean Food Sci. Technol. 46(3) 303-308
- [61] Kim WS. (2014) Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Effects of *Artemisia annua* L., Ginkgo biloba leaf, and Korean red ginseng
- [62] Ju JC., Shin JH., Lee SJ., Cho HS.,and Sung NJ. (2006) Antioxidative Activity of Hot Water Extracts from Medicinal Plants. J Korean Soc Food Sci

Nutr 35(1), 7-14

- [63] Chow C.K. and Hong C.B. (2002) Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicol.* 180: 195-207
- [64] Song JW. (2007) Antioxidative and Antitumor Activities of Extracts from *Saussurea lappa*, *Agrimonia pilosa* and *Prunella vulgaris*
- [65] B00 H0, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, and Park SU. (2009) Different of Total Phenolics and Flavonoids, Radical Scavenging Activities and Nitrite Scavenging Effects of *Momordica Charantia* L. According to Cultivars.
- [66] Park JH. (2014) A study on on physiological activity of wild *Lactuca indica*
- [67] Kang N.J, J.K. Kwon, H.C. Lee, H.B. Jeong and H.T. Kim. (2003) Antioxidant enzymes as defense mechanism against oxidative stress induced by chilling in *Cucurbita ficifolia* leaves. *J. Kor. Hort. Sci* 44(5)605-610
- [68] Jeong H.J., Kim E.H., Cung G.Y., Lim J.k., Yoo J.M., Shim Y.E., and Park J.H. (2001) Evaluation of the antioxidant potential and enzyme activities in species of *Rhus*. *Korean J. Plant Res* 14(3) 220-228
- [69] Alscher, R.G. and J.L. Hess. (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton 1-174
- [70] Yang SY and B00 H0. (2013) Phenolic Componds, Antimicrobial Effects and Tyrosinase Inhibition Activities of Cucumber Grown Greenhouse According to Cultivars and Growth Stages. *Korean J. Plant Res.* 26(5):264-651.
- [71] Cha EJ. (2003) The Effects of Plant Extracts on Tyrosinase and Antioxidant Enzyme Activities
- [72] Han MN.(2002) (A) study on the antioxidatie and antimicrobial effects of grape seeds extracts
- [73] Sung GO. (2004) Antimicrobial Activities of the Extract of *Gingo biloba* L. leaves on the food-borne pathogens
- [74] Kwon MK. (2003) (A)study on the antimicrobial activities of the extract of *Camellia japonica* L. leaves
- [75] Chon YS., Bae CH. and Lee SC (2012) Antioxidant and Cytotoxic Potentials of Methanol Extracts from *Taraxacum officinale* F.H. Wigg. at Differnet Plant Parts. *Kor. J. Plant Res.* 25(2) 232-239

- [76] Chon SU. and Kim YM. (2011) Differential Physiological Activity in Different Ages of *Panax ginseng*. *Kor. J. Crop Sci.* 56(1) 80-87
- [77] Im KJ., Jang SB. and Yoo DY. (2015) Anti-cancer Effects of *Dendropanax Morbifera* Extract in MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *J. Korean Obstet Gynecol.* 28(2) 26-39
- [78] Kim JN., Chae H., Kwon YK. and Kim BJ. (2014) Effects of *Schixandra Chinensis* on Human Breast Cancer Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 28(2) 162-168
- [79] Hong SH., Park C., Han MH., Kim JH., Lee MH. and Choi YH. (2014) Effects of *Platycodon grandiflorum* on the Induction of Autophagy and Apoptosis in HCT-116 Human Colon Cancer Cells. *Journal of Life Science* 24(11) 1244-1251
- [80] Guon TE. and Jung HS. (2014) Effect of *Epimedium Koreaunum* Nakai on Apoptosis in HCT116 Human Colon Cancer Cells

감사의 글

짧지 않은 4년의 시간동안 식물 생리학 실험실에서 늘 순탄하지만은 않았지만, 든든한 버팀목이 되어주신 박현용 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 건강하시고 늘 행복하시길 진심으로 기도 드립니다. 늘 허허 웃어주시며 따뜻한 충고의 말씀 주신 조태오 교수님께 감사드립니다. 실험조교를 하며 가끔 실수도 있었지만 늘 웃으면서 괜찮다 해주시고, 언제나 따뜻하게 칭찬해주시고, 격려해주신 송상기 교수님께 감사드립니다. 그리고 학과에 윤성명 교수님, 전택중 교수님, 이준식 교수님, 조광원 교수님께도 감사드립니다.

바쁘시지만 언제나 제 걱정하시며 지도해주신 박정훈 선생님, 언제나 제 연락에 바로 답변주시고 응원 해주셔서 정말 감사드립니다. 좋은분 만나서 축하드려요. 늘 함께 행복하셨으면 좋겠어요. 좌절할 때마다 늘 큰 힘이 되어준 우리 실험실 든든한 막내 준형아, 나보다 잘 하고 있어 넌 정말 잘할거야, 큰 힘이 되어줘서 정말 고마워. 달달한게 필요하면 언제든지 연락하라고 했던 소연이 언니, 새롭게 시작할 다른 길에서도 늘 행복하길 빌게요. 전공이 다르지만 자기 일처럼 걱정해주고 늘 먼저 안부 물어주는 민지야, 나에게 정말 큰 힘이 되었어 고마워. 많이 막막했었고 두려웠는데 다 이겨내게 해줬어. 다음 학기 때 너도 힘내서 잘 끝내길 바래. 그리고 발표준비 도와주신 신구 오빠, 언제나 제 걱정해주신 소영이 언니 정말 감사드려요.

쌍둥이처럼 똑 닮은 지혜야, 내가 마지막으로 학교에 남아있을 줄 알았는데 이제 너한테 바통을 넘기고 떠나게 되네, 인턴생활 잘하고 좋은 곳으로 취업하길 바랄게. 그날 초코케익이 큰 위로가 되었어 고마워. 수학과 학과실을 떠나서 이제 독서실로 가게 된 유진아, 덕분에 조교일도 논문준비도 편안했어. 준비하는 시험 결과 잘나오길 기도할게. 우리 영원한 재간동이 해봉이 헤인아, 덕분에 학교생활 정말 즐거웠어. 늘 내편이 되어줘서 고마워. 너도 준비하는 시험 잘 마치길 바랄게. 우리 혈맹이팽 서로 다른 길을 걷게 되었지만, 늘 변하지 않고 함께 하자. 힘든 이야기 들어주고 응원해준 정원아 고맙다. 그리고 언제나 내편이 되어주는 영근이 오빠, 곁에서 기쁜일, 슬픈일 함께 기뻐해주고 토닥여줘서 고맙습니다. 앞으로도 함께 행복하면 좋겠습니다.

여기까지 나를 믿어주고 응원해준 우리엄마. 정말 고마워요. 엄마 믿음만큼 열심히 달려왔어요. 이제 잠시 움츠렸다가 사회로 나아가서 이제 엄마에게 든든한 버팀목이 될게요. 고맙고 정말 사랑합니다. 그리고 내 동생 승진아, 가끔 티격태격 하지만 언니 걱정해주고 응원하는거 알아. 나도 많이 걱정하고 응원한다. 열심히 공부해서 좋은 선생님이 되길 바랄게. 여기에 모두 적지 않았지만 많은 분들에게 큰 도움을 받아왔고 많은 감사의 인사를 전합니다. 모두 사랑하고 감사드립니다.

2016년 6월
김승미 드림