

와송(*Orostachys japonicus*) 용매별 분획 추출물의 항산화, 항균 및 암세포 독성 비교

김승미, 박정훈, 부희옥, 송상기, 박현용*

조선대학교 자연과학대학 생명과학과

In vitro Comparison of Biological Activities of Solvent Fraction Extracts from *Orostachys japonicus*

Seung Mi Kim, Jeong Hun Park, Hee Ock Boo, Sang Gi Song and Hyeon Yong Park*

Department of Life Science, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

Abstract - This study was conducted to evaluate the contents of total polyphenol and flavonoid, and the effect of antioxidant, antimicrobial activities and cytotoxicity *in vitro* by different solvent fractions from *Orostachys japonicus*. The ethylacetate fraction extract for *O. japonicus* contained 634.48 $\mu\text{g/g}$ polyphenol and 205.20 $\mu\text{g/g}$ flavonoid. 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 CAT activity were 1125.89 μmol ascorbate oxidized/min/mg protein and 119.87 H₂O₂ decomposed/ min/mg protein, respectively. In disc agar plate diffusion assay, the extract gave rise to a larger inhibition circle with *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Malassezia furfur* strains compared with antibiotics kanamycin suggestive of high antibiotic activity. The cytotoxicity of extracts of *O. japonicus* was significant differences between solvent fractions. That is, the cytotoxic effect against human cancer cell was higher in ethylacetate fraction extract than other fraction extracts. These results suggest that fraction extract of *O. japonicus* might be very effective and economical in developing natural antioxidant and antimicrobial.

Key words - *Orostachys japonicus*, Total polyphenolics, Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity

서 언

인간의 수명은 급격히 늘고 있지만, 현대사회에서 각종 스트레스, 운동부족, 환경오염, 잘못된 식습관으로 인하여 노화, 암, 당뇨, 비만, 심장질환 등 각종 질환의 발병률이 증가되는 것으로 밝혀지고 있다(Kim, 2010). 이를 위해 다양한 약용 식물들로부터 건강 기능성 식품개발을 위한 성분분석, 항산화, 항균, 항암, 항비만과 같은 효능의 연구가 활발하게 진행되고 있다(Kim, 2015; Kim and Cha, 2017). 최근 이와 같은 연구로서 와송의 추출물을 이용한 연구들이 다양하게 진행되고 있다. 와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 암송, 옥송, 작엽하초, 바위솔 등으로 불리는 들나물과의 식물로, 가을에 추대되어 종자의 성숙과 함

께 고사하는 일년생 식물이다(Jeon *et al.*, 2006). 현재까지 진행된 와송의 효능들로는 인체 대장암 세포주에 와송 클로로포름 분획물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 처리 후 50.19% 세포 생존이 나타나는 결과가 보고되었고(Jung, 2011), 전립선암 세포주에 600 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48시간 처리한 경우 10%의 세포 생존율과 apoptosis 유도가 보고되었다(Won *et al.*, 2014). Oh *et al.* (2009)은 와송추출물 실험에서 백혈병세포주의 apoptosis 유도단백질의 합성을 촉진시켰다고 하였으며, Suk (2011)은 염증반응을 유도한 대식세포에 와송의 dichloro methane 추출물 처리한 경우 nitric oxide (NO) 생성억제와 항염증 효과가 보고하였다. 또한 식이성 고지혈증을 유발한 흰쥐에 와송 추출물의 경구투여를 한 흰쥐는 정상식이를 한 흰쥐보다 체중이 감소하고, 중성지방의 함량이 감소하는 결과를 보여 와송이 항비만과 고지혈증에 대한 효과가 있다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2009). 이 외에

*교신저자: hypark@chosun.ac.kr

Tel. +82-62-230-6652

도 외송의 효능에 대해서 건조방법 (Lee *et al.*, 2008) 및 추출용매에 따른 항암, 항산화, 항비만, 항염증 효과에 대한 연구들이 있다. 그러나 현재까지의 연구에서는 대부분 단일용매 추출물에 관한 연구에 국한되어 있다. 따라서 본 논문에서는 외송을 n-hexane, methylenechloride, ethylacetate, n-butylalcohol, water를 이용하여 5가지 용매로 분획 추출하였고, 각 분획 추출물에 대해 여러 생리활성을 비교하였다. 즉, 분획별 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하였고, 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 알아보기 위하여 항산화능 및 항산화 효소 활성을 측정하였다. 또한, 다양한 균주들을 대상으로 외송 분획 추출물의 항균력을 측정하여 식품첨가물이나 생활용품 개발 등에 활용함으로써 식품산업 및 화장품산업에서의 이용가치를 검토하고자 하였다. 그리고 외송 분획 추출물별 폐암, 대장암, 유방암 세포주의 세포독성을 조사함으로써 암 예방 및 치료를 할 수 있는 건강 기능성 식품으로의 활용 가능성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료식물 및 시료의 추출

노지에서 재배된 외송(*Orostachys japonicus*)을 2014년 7월 채취하여 실험에 이용하였다. 외송을 -70°C 이하 초저온 냉동고(NIHON, Japan)에 5시간 이상 동결시킨 후, 동결된 재료를 0.05 ~ 0.5 Torr (mmHg)로 -50°C 이하에서 완전하게 진공 동결건조(Ilshin, Korea)하여 시료로 이용하였다. 동결건조된 외송 부피의 2배량(v/v)의 98% methanol에 48시간 이상 침지하여 총 3회 반복 추출하였고, 이 추출액을 $40\sim 45^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축(BUCHI, Switzerland)하였다. Methanol추출물을 분별 깔대기에 담아 Fig. 1에서와 같이 각 용매별로 분획, 추출하였다. 즉, 분별 깔대기에 증류수 500 ml를 넣고, 극성이 낮은 n-hexane 500 ml를 첨가하여 24시간 이상 교반하여 분획, 추출하였고, 다음으로 methylenechloride 500 ml, ethylacetate 500 ml, n-butyl alcohol 500 ml로 순차적으로 반복 추출하여 용매별 분획물을 획득하였다. 이 분획물을 감압 농축하여 완전히 건조시킨 후, 냉동 보관하면서 각 생리활성 실험에 사용하였다.

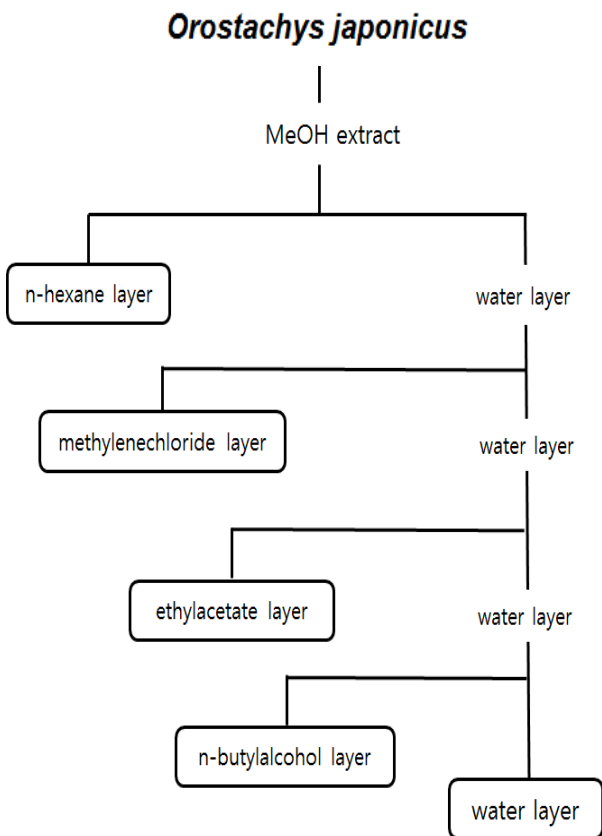


Fig. 1. Schemes of solvent fractionation from *Orostachys japonicus*.

총 폴리페놀 함량 측정

Folin-Denis 방법(1912)에 따라 외송 분획 추출물에 대한 총 폴리페놀의 함량을 측정하였다. 분획 추출물은 98% methanol에 1 mg/ml로 용해하여 25 μl , 10배 희석한 folin-ciocalteu reagent 500 μl 를 혼합하여 상온에서 5분간 반응시킨 후, 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3) 500 μl 를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액을 water bath (BUCHI, Switzerland)에서 37°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 외송의 분획별 추출물의 총 폴리페놀 함량을 정량하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

Jia와 Tang의 방법(1998)에 따라 외송 분획 추출물에 대한 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 분획 추출물을 98% 메탄올에 1 mg/ml농도로 용해하여 100 μl , diethylene glycol 1000 μl , 1N NaOH 10 μl 를 넣어 잘 혼합한 후, water bath에서 37°C 로 60분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 425 nm에서 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 표준물질로 naringin (Sigma, USA)을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 이를 기준으로 외송의 분획별 추출물의 총 플라보노이드 함량을 정량하였다.

항산화능 분석

DPPH radical 소거활성

Blois 방법(1958)에 따라 와송의 분획 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 분획 추출물을 98% 메탄올을 용매로 하여 희석시켜 실험에 이용하였다. 시료 100 μ l와 100 μ m의 DPPH 용액 900 μ l를 혼합한 후, 암소에서 30분간 반응시켜주었다. Spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 radical의 감소를 정량하였다. 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도 백분율로 나타냈다.

ABTS radical 소거활성

Re *et al.*의 방법(1999)에 따라 와송의 분획 추출물의 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di ammonium salt) radical 소거활성을 측정하였다. 와송 분획 추출물을 메탄올을 용매로 하여 희석시켜 실험에 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. 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도 백분율로 나타냈다.

아질산염 소거활성

와송 분획 추출물의 아질산염 소거활성 능력 측정은 Kato *et al.* (1987)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 NaNO₂ 20 μ l와 pH buffer 140 μ l를 사용하였다. 이 반응액을 37°C에서 50분간 반응시킨 후, 2% acetic acid 1,000 μ l, Griess reagent 80 μ l를 첨가하여 혼합한 후, 빛을 차단한 암소에서 15분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염 소거능을 백분율로 나타냈다.

항산화 효소 활성 분석

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 Bradford 방법(1976)에 따라 BSA를 표준물질로 사용하여 정량하였다.

Catalase(CAT) 활성의 측정

Catalase(CAT)활성은 Mishra *et al.* (1993)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.

Ascorbate peroxidase(APX) 활성의 측정

Ascorbate peroxidase (APX) 활성은 Chen과 Asada (1989) 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.

Peroxidase(POX) 활성의 측정

Peroxidase (POX) 활성은 Chance와 Maehly (1995)의 방법에 따라 측정하였다. 효소액 100 μ l와 80 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9) 500 μ l, 15 mM guaiacol 100 μ l, 65 mM H₂O₂ 100 μ l를 혼합하였다. Tetra guaiacol 형성을 spectrophotometer를 이용하여 470 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 단백질 1 mg당 형성된 tetra guaiacol을 μ mol로 표기하였다.

항균활성 분석

와송의 분획 추출물의 항균활성 효과를 측정하기 위하여 한천배지확산법(disc agar plate diffusion method)을 이용하였다. 사용한 균주는 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa* 등 총 6가지를 선발하였으며, 위 균주들은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 각 균주에 적합한 한천 배지(Table 1)를 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

Table 1. List of strains and cultivation conditions used for the screening of antimicrobial activity

Strains	Cultivation conditions
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	37°C, Nutrient Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C, Nutrient Agar
<i>Listeria monocytogenes</i>	37°C, Brain Heart Infusion Agar
<i>Escherichia coli</i>	37°C, Trypticase Soy Agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37°C, Nutrient Agar
<i>Malassezia furfur</i>	37°C, YM Agar+1% Olive oil

(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. 이 때 각 분획물의 처리농도는 10 mg/ml로 하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양하여 생성되는 저해환을 측정하였다.

인체 암세포에 대한 세포독성

Hansen *et al.* (1989)의 방법에 따라 MITT assay법에 의해 외송 추출물의 암세포 증식 억제 효과를 분석하였다. 실험에 사용된 암세포주는 한국 세포주 은행에서 분양받은 인간 유래 폐암 세포주 Calu-6 (KCLB No.10002), 유방암 세포주 MCF-7 (KCLB No.30022), 대장암 세포주 HCT-116 (KCLB No.10247)를 실험에 이용하였다. 각 세포주를 3×10⁴ cell/ml 밀도가 되도록 조정하여 96 well microplate에 98 μ l/well 씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 습윤 세포 배양기에서 24시간 incubation하여 세포를 부착시켰다. 각 well에 외송의 분획별 추출물을 2 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그리고 각 well에 5 mg/ml의 MITT solution (sigma, USA)을 10 μ l씩 첨가하여, 4시간 동안 반응 시킨 후, 상층액을 제거하였다. 그리고 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 15분간 shaking 시켰다. Micro plate spectrophotometer (BIO RAD, xMark, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 추출물 무첨가군을 100%로 하여 암세포 증식 억제율을 구하였다.

통계처리

외송의 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. 외송의 용매별 분획추출물의 생리활성에 대한 각 실험은 3회 실시하였으며, 결과 값은 평균±표준오차로 표기하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

외송의 총 polyphenol 함량과 flavonoid 함량은 Table 2에 나타났다. 외송 분획추출물의 polyphenol 함량은 ethylacetate가 634.48 μ g/mg로 가장 높았으며, 다음으로 n-butylalcohol 351.14 μ g/mg, n-hexane 148.37 μ g/mg, methylenechloride 124.38 μ g/mg, water 8.40 μ g/mg 순으로 나타났다. 또한 총 flavonoid 함량은 polyphenol과 동일하게 ethylacetate 분획에서 205.20 μ g/mg 로 가장 높았으며, 다음으로 n-hexane 98.54 μ g/mg, n-butylalcohol 97.85 μ g/mg, methylenechloride 74.63 μ g/mg, water 5.67 μ g/mg 순으로 나타났다. Kim *et al.* (2012)의 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/g 로 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. 그리고 Hwang *et al.* (2014)은 안토시아닌 함량과 폴리페놀 함량이 높아 10대 슈퍼푸드라 선정되어 건강기능성 식품으로 널리 이용되고 있는 아로니아 관련 연구에서, 열풍건조한 아로니아의 폴리페놀 함량은 757.6 mg/g로, 플라보노이드 함량은 62.9 mg/g로 보고하였다. 이와 같은 결과와 비교하여 볼 때, 외송의 ethylacetate 분획추출물의 polyphenol의 함량은 634.5 μ g/mg로 비수리 및 애엽 등의 3배 이상으로 매우 높은 함량을 확인할 수 있었으며, 플라보노이드 함량 또한 ethylacetate 분획추출물의 경우 비수리의 2배, 애엽, 참나무 겨우살이, 질경이의 5배 이상 높게 나타난 것을 확인하였다. 아로니아의 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량과 비교할 때, 외송 ethylacetate 분획추출물의 폴리페놀 함량은 0.16배 낮지만, 플라보노이드 함량은 외송 ethylacetate 분획추출물이 3.3배 높게 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때, 외송의 폴리페놀과 플

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of solvent extracts from *O. japonicus*

Solvent	Total polyphenol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total flavonoid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
n-hexane	148.37 \pm 2.26 ^{cz}	98.54 \pm 3.61 ^b
methylenechloride	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 ^c	5.67 \pm 1.16 ^d

^zResults are mean \pm SE (n=3).

Table 3. DPPH radical scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

Solvent	DPPH radical scavenging activity, % of control						
	Concentration (mg/ml)						
	0.25	0.5	1	2.5	5	10	IC ₅₀
n-hexane	17.06 \pm 0.99 ^{cz}	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	15.24 \pm 0.12 ^c	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	48.27 \pm 0.39 ^a	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	32.71 \pm 0.19 ^b	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	6.41 \pm 0.31 ^d	9.90 \pm 1.38 ^d	11.77 \pm 0.96 ^d	19.32 \pm 0.74 ^d	25.16 \pm 1.17 ^c	40.34 \pm 0.36 ^d	12.93
Ascorbic acid	97.01 \pm 0.02	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

^zResults are mean \pm SE (n=3).

라보노이드 함량은 상대적으로 높다는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 현재 피로회복과 심혈관 질환 예방으로 출시된 폴리페놀 건강기능성 식품, 노화방지 화장품 등에 와송의 천연폴리페놀을 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

항산화 활성

DPPH radical 소거능

와송의 분획 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Table 3에 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 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 12.93 mg/ml 순으로 나타났다. Lee (2008)의 유자를 이용한 연구에서 1 mg/ml의 농도에서 유자과육은 50.93%, 과피는 93.12%의 DPPH radical 소거능을 보고하였는데, water추출물을 제외

한 와송 분획추출물은 유자 과피에 비해 낮지만 5 mg/ml 이상의 농도에서 대부분 85% 이상의 DPPH radical 소거능을 나타내고 있으며, 건강기능성 식품으로 널리 이용되는 홍삼보다 2배의 DPPH radical 소거능이 확인된 바, 체내 항산화 기능성제품 제조에 이용 할 수 있을 것으로 사료된다.

ABTS radical 소거활성

와송의 ABTS radical 소거활성은 Table 4에 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% 순으로 나타났다. 특히 ethylacetate는 1 mg/ml에에서도 95.59%의 소거능을 보이며 대조구로 이용한 ascorbic acid와 비슷하게 효과를 보이는 것으로 나타났다. Ju *et al.* (2006)은 약용식물의 ABTS radical 소거활성 실험에서 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/ml 농도에서 63.76%의 ABTS radical 소거활성을 보이는 값과 유사하거나 낮은 것으로 나타났다. 와송의 ethylacetate

Table 4. ABTS radical scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

Solvent	ABTS radical scavenging activity, % of control						
	Concentration (mg/ml)						
	0.25	0.5	1	2.5	5	10	IC ₅₀
n-hexane	5.02 ± 0.36 ^{sz}	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	1.94 ± 0.14 ^e	2.63 ± 0.17 ^c	9.24 ± 0.39 ^{cd}	42.18 ± 0.57 ^c	74.02 ± 0.41 ^c	98.21 ± 0.13 ^a	4.26
ethylacetate	47.47 ± 0.59 ^a	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	17.55 ± 0.61 ^b	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	3.14 ± 0.24 ^d	4.19 ± 0.16 ^d	13.29 ± 0.90 ^{dc}	13.54 ± 0.58 ^c	50.80 ± 1.38 ^c	59.88 ± 1.59 ^d	7.39
Ascorbic acid	96.37 ± 0.01	98.43 ± 0.00	98.59 ± 0.03	98.53 ± 0.20	98.59 ± 0.03	98.45 ± 0.01	<1

^zResults are mean ± SE (n=3).

Table 5. Nitrite scavenging activities of solvent extracts from *O. japonicus*

Solvent	Nitrite scavenging activity, % of control		
	Concentration (mg/ml)		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
n-hexane	25.13 ± 0.90 ^{sz}	18.70 ± 1.62 ^c	NDd
methylenechloride	36.67 ± 1.54 ^d	15.94 ± 1.07 ^c	NDd
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

^zResults are mean ± SE (n=3).

분획추출물은 1 mg/ml의 농도에서 90% 이상의 소거능이 측정되어 천연 항산화제로서 충분한 기능을 할 것으로 사료된다.

아질산염 소거활성

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(Chow and Hong, 2002). 이러한 nitrite의 소거능은 nitrosamine이라는 발암물질의 생성억제와 메트헤모글로빈증 등의 질병을 예방할 수 있는 것으로 보고되었다(Boo *et al.*, 2009). 외송의 분획추출물 10 mg/ml을 아질산나트륨 용액에 첨가하여 아질산염에 대한 소거능을 조사한 결과를 Table 5에 나타냈다. 아질산 소거능은 pH에 매우 농도의존적으로 나타났으며, 즉 pH 1.2에서 n-hexane 25.13%, methylenechloride 36.67%, ethylacetate 81.68%, n-butylalcohol 74.00%, water 47.14%의 소거활성을 보였으며, ethylacetate 분획에서 가장 높은 아질산 소거활성을 나타냈다. 그리고 pH 4.2에서는 n-hexane 18.70%, methylenechloride 15.94%, ethylacetate 66.19%, n-butylalcohol 55.75%, water 17.44%

의 아질산염 소거활성을 보였다. pH 1.2에서와 마찬가지로 ethylacetate 분획추출물이 가장 높은 소거능을 확인하였다. 그리고 pH 6.0에서는 ethylacetate 47.15%, n-butylalcohol 29.09%, water 7.99%의 아질산염 소거활성을 보였으며, n-hexane과 methylenechloride 분획에서는 활성이 나타나지 않았다. Ethylacetate 추출물은 pH 농도가 증가해도 분획추출물 중 비교적 높은 아질산염 소거능을 나타냈다. 이는 왕고들빼기의 메탄올 추출물의 아질산 소거능을 연구한 Park(2014)의 결과와도 유사한 결과이다. 한국 재래약초의 항균 및 항산화성에 대해 연구한 Park(2001)의 연구에서 약모밀, 소목, 마디풀, 육계나무의 아질산염 소거능이 높게 나타났는데, pH 1.2에서 가장 활성이 좋았으며, pH 4.2, pH 6.0으로 농도가 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. 이와 같은 결과들로 비교하여 볼 때, 외송의 ethylacetate 분획추출물의 경우 pH 1.2, 4.0에서 81.68%, 66.19%로 높게 나타났으며, pH 6.0에서도 47.15%로 소목, 마디풀 보다 30% 더 높은 아질산염 소거활성을 확인할 수 있었는데,

이는 현재 육가공 식품에 품질 유지와 풍미를 위해 전반적으로 많이 쓰이고 있어 발암물질 논란이 되고 있는 아질산염의 소거제로서 이용 가능성을 기대할 수 있다고 본다.

항산화 효소 활성

와송 분획 추출물에 있어서의 APX, CAT, POX 효소 활성에 대한 결과를 Figs. 2~4에 나타냈다. APX 효소 활성은 ethylacetate가 1125.89 μ mol ascorbate oxidized/min/mg protein으로 가장 높게 나타났다(Fig. 2). Ethylacetate는 Park (2014)의 왕고들빼기 생리활성 연구에서 뿌리 660.76 μ mol ascorbate oxidized/min/mg protein보다 2배 가까이 높은 값을 보였다. CAT 효소 활성은 ethylacetate 119.87 mmol H₂O₂ decomposed/min/mg protein으로 가장 높게 나타났으며, n-butylalcohol 34.80 mmol H₂O₂ decomposed/min/mg protein으로 측정되었다(Fig. 3). Park (2014)의 연구에서 왕고들빼기의 catalase 효소활성은 13.88 mmol H₂O₂ decomposed/min/mg protein로 뿌리가 가장 높게 나타났는데, 와송의 ethylacetate추출물은 왕고들빼기 뿌리의 9배 이상, n-butylalcohol은 2배 이상의 활성을 나타내 높은 활성을 갖는 것으로 확인되었다. POX 효소활성은 n-butylalcohol 2.71, ethylacetate 2.35 mmol tetraguaiacol/min/mg protein 순으로 나타났다(Fig. 4). Park (2014)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 수치를 보였다. 와송은 분획별 추출물 중 ethylacetate 분획추출물에서의 APX, CAT 효소 활성이 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 나타냈다. 이는 와송의 분획 추출 용매에 따라 효소 활성에 많은 차이가 있음을 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.

항균활성 효과

Agar diffusion assay를 이용하여 측정한 와송 분획별 추출물의 항균활성에 대한 결과를 Fig. 5와 Table 6에 나타냈다. 공

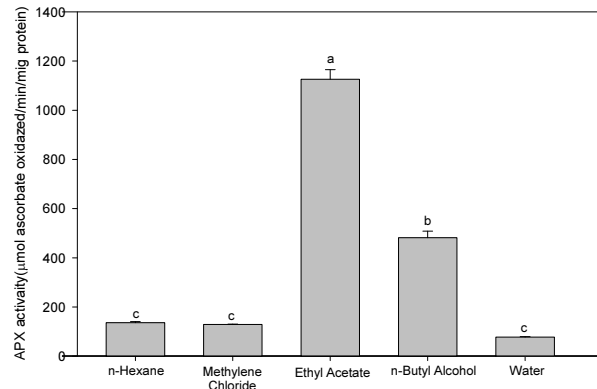


Fig. 2. APX activities of solvent extracts from *O. japonicus*. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

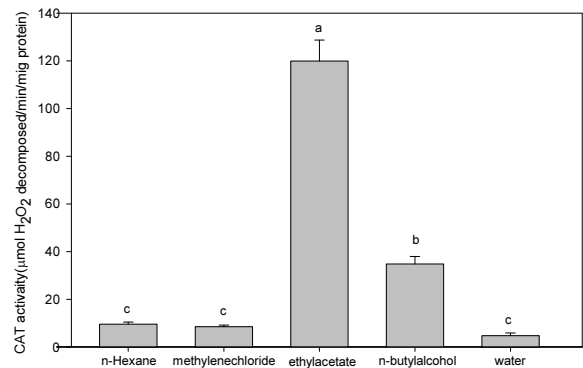


Fig. 3. CAT activities of solvent extracts from *O. japonicus*. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

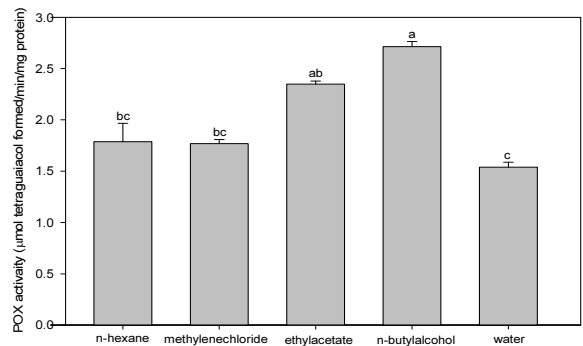


Fig. 4. POX activities of solvent extracts from *O. japonicus*. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Table 6. Inhibition zone size against the microorganism by agar diffusion method of solvent extracts from *O. japonicus*

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

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

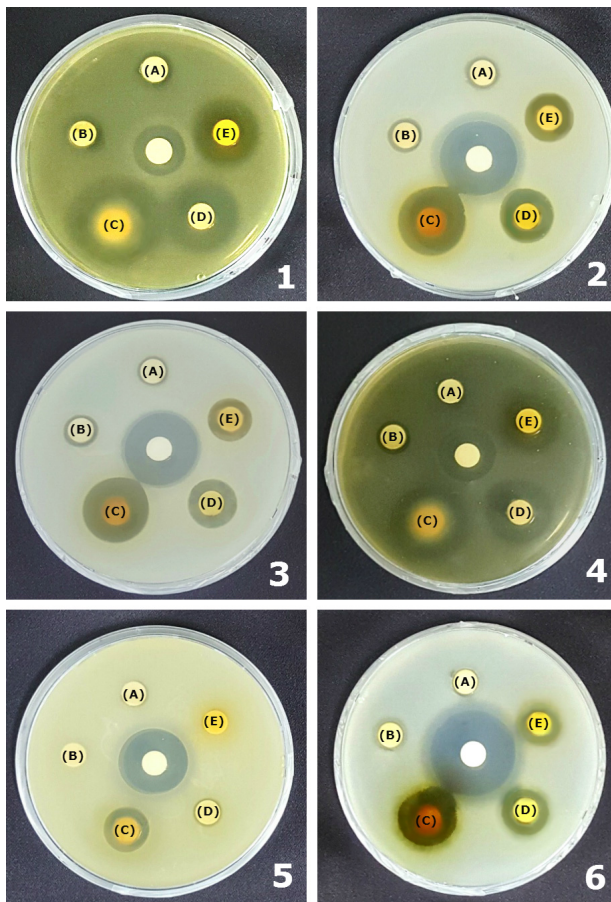


Fig. 5. Inhibition activity of the *O. japonicus* against the microorganism in paper disc diffusion assay.

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

시한 6종의 균주(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) 모두에서 항균활성이 있는 것으로 나타났으며, 특히 ethylacetate 분획추출물에서 항균활성이 가장 높았고, n-butylalcohol, water 분획에서도 다소 높은 활성을 확인할 수 있었다. 그러나 n-hexane 및 methylenechloride 분획추출물에서는 저해환이 거의 형성되지 않아 항균활성이 미미한 것으로 나타났다.

Sung (2004)의 은행잎 추출물, Kwon (2003)의 동백나무잎 추출물의 항균성 연구결과를 외송추출물의 결과와 비교하였을 때, 대부분 균주에서 외송추출물이 다른 식물추출물에 비해 높은 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다. 특히 ethylacetate 분획 추출물의 경우 공시한 대부분의 균주에서 큰 저해환을 형성하여 높은 항균활성을 갖는 것으로 나타나 천연항균제, 천연보존료 개발에 유익한 원료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

MIT assay에 의한 인체 암세포 생존율

MIT assay에 의한 외송의 용매분획별 추출물의 폐암, 유방암, 대장암 세포주의 세포증식억제 효과에 대한 결과를 Figs. 6~8에 나타냈으며, 세포 사멸율 50%의 추출물 농도를 나타내는 IC₅₀값은 Table 7에 나타냈다. 외송 추출물농도 1000 µg/ml에서 폐암 세포주(Calu-6)의 생존율은 n-hexane 33.11%, methylenechloride 40.74%, ethylacetate 40.43%, n-butylalcohol 70.33%, water 87.33%로 나타났다. Chon *et al.* (2011)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 보고하였는데, 이는 외송 분획별 추출물이 인삼보다 높은 세포증식 억제활성을 나

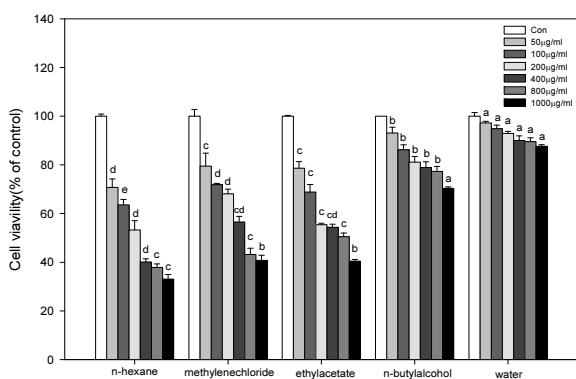


Fig. 6. Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of Calu-6 cell. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

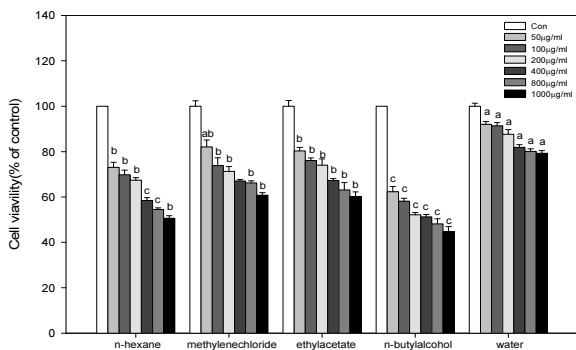


Fig. 7. Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of MCF-7 cell. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test. (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

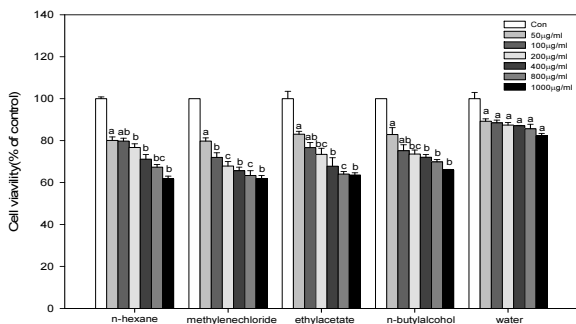


Fig. 8. Effects of solvent extracts from *O. japonicus* on cell viability of HCT-116 cell. Bar represent the standard error of the mean. Means separation was conducted with by Duncan's multiple range test (P=0.05). Means followed by same letters are not significantly different.

Table 7. IC₅₀ (µg/ml) of solvent extracts from *O. japonicus* on three human cancer cell lines

Cell line	IC ₅₀ ^z (µg/ml)				
	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

^zExtract concentrations, which show 50% cell viability of solvent extract from *Orostachys japonicus*.

타냄을 알 수 있었다. 또한 유방암 세포주(MCF-7)의 경우를 보면, n-hexane 50.63%, methylenechloride 60.80%, ethylacetate 60.15%, n-butylalcohol 44.77%, water 80.06%의 생존율을 보였으며, water추출물을 제외한 대부분 추출물에서 세포증식 억제효과를 나타냈다. Im *et al.* (2015)의 연구에서 황칠나무 추출물을 50, 100 µg/ml로 처리하였을 때 90% 이상 생존하였고, 500 µg/ml로 처리하였을 때 41.7%의 세포 생존율을 보고하였는데, 50 µg/ml 및 100 µg/ml 농도에서는 와송 추출물이 낮은 세포생존율을 보이지만 500 µg/ml 농도에서는 황칠나무 추출물에 비교하여 세포생존율이 더 높게 나타나 와송 추출물은 높은 농도보다 낮은 농도에서 황칠나무 추출물에 비해 높은 세포증식억제 효과를 나타냈다. 그리고 대장암 세포주(HCT-116)에서의 생존율은 n-hexane 61.79%, methylenechloride 61.84%, ethylacetate 63.58%, n-butylalcohol 65.97%, water 82.17%로 나타났다. Hong *et al.* (2014)의 길경추출물에 의한 대장암 세포주에 관한 연구에서는 1000 µg/ml의 농도일 때 약 80%의 세포 생존율을 보고하였는데, 와송의 분획별 추출물의 경우도 길경의 결과와 비교하여 대장암 세포주에서 비슷한 암세포증식 억제활성을 갖는 것으로 사료된다. 와송 분획별 추출물은 특히 폐암 세포주(Calu-6)에서 세포증식 억제 활성이 큰 것으로 나타났다. 또한 n-hexane 분획추출물의 경우 1000 µg/ml의 농도에서 33%의 생존율을 보여 높은 암세포증식억제활성을 보였다. 유방암 세포주(MCF-7)의 경우 n-butylalcohol 분획추출물에서 높은 암세포증식 억제 활성을 나타냈다. 그러나 대장암 세포주(HCT-116)의 경우는 5가지 분획추출물 1000 µg/ml 농도에서 60% 이상의 생존율을 보여 폐암, 유방암 세포주보다 세포증식 억제활성이 낮은 것으로 나타났다. 와송의 경우 분획별 추출물에 따라 암세포 증식 억제율에 차이가 있었으며, 암 세포주의 종류에 따라서도 추출물의 증식억제 효능에 편차가 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과를

종합하여 볼 때, 향후 외송을 이용하여 폐암이나 유방암 예방 및 치료 소재로서의 개발 가치가 있을 것으로 사료된다.6

적 요

외송 ethylacetate 분획추출물의 폴리페놀 함량은 634.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 플라보노이드 함량은 205.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 나타났다. 또한 항산화 활성을 보면, ethylacetate 분획추출물의 1 mg/ml 농도에서 DPPH radical, ABTS radical 소거능은 95% 이상으로, ascorbic acid 의 97%의 소거능과 거의 유사한 결과를 보여 높은 항산화능을 확인할 수 있었다. 항산화효소 활성의 경우, APX 및 CAT 효소 활성은 1125.89 $\mu\text{ mol ascorbate oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$, 119.87 mmol H_2O_2 decomposed/min/mg protein 으로 높은 것으로 나타났다. 항균활성은 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur* 균주에서 항생제 kanamycin보다 큰 저해환을 형성하여 높은 항균력이 확인되었다. 또한 외송의 용매분획별 추출물의 인체암 세포주에 대한 세포증식억제 효과는 특히 ethylacetate 분획추출물에서 폐암, 유방암에 대해 높은 효과를 나타냈다. 이와 같은 결과들을 종합하면 외송의 ethylacetate 분획추출물을 이용한 천연 항산화제와, 천연 항균제로서의 개발 가치가 높은 것으로 기대되어 경제성 있는 천연소재가 될 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 2016년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었음.

References

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

Boo, H.O., H.H. Lee, J.W. Lee, S.J. Hwang and S.U. Park. 2009. 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.* 17(1):15-20 (in Korean).

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

Chance, B. and A.C. Maehly. 1995. Assay of catalase and

peroxidase. *Methods Enzymol.* 2:764-775.

Chen, G.X. and K. Asada. 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.

Chon, S.U. and Y.M. Kim. 2011. Differential Physiological Activity in Different Ages of *Panax ginseng*. *Kor. J. Crop Sci.* 56(1):80-87 (in Korean).

Chow, C.K. and C.B. Hong. 2002. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology* 180: 195-207.

Folin, O. and W. Denis. 1912. On Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12:239-243.

Hansen, M.B., S.E. Nielsen and K.Re. Berg. 1989. Examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119:203-210.

Hong, S.H., C. Park, M.H. Han, J.H. Kim, M.H. Lee and Y.H. Choi. 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 (in Korean).

Hwang, E.S. and N.Do Thi. 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 (in Korean).

Im, K.J., S.B. Jang and D.Y. Yoo. 2015. Anti-cancer effects of *Dendropanax morbifera* extract in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *J. Korean Obstet Gynecol.* 28(2):26-39 (in Korean).

Jeon, S.H., D.O. Hong, C.W. Lee, H.Y. Kim, S.C. Shin and J.H. Kang. 2006. Growth and flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger affected by transplanted seedling size. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 14(3):153-157 (in Korean).

Jia, Z., M. Tang and J. Wu. 1998. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4):555-559.

Ju, J.C., J.H. Shin, S.J. Lee, H.S. Cho and N.J. Sung. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 35(1):7-14 (in Korean).

Jung, E.J. 2011. *Orosotachys japonicus* induces apoptosis through caspase-dependet on human colon cancer cells. Department of Nutrients Education, MS Thesis, Suncheon Univ., Korea (in Korean).

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.
- Kim, E.J., J.Y. Choi, M.R. Yu, M. Kim, S.H. Lee and B.H. Lee. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44(3):337-342 (in Korean).
- Kim, E.S. 2015. Development of loquat leaf-derived anti-obesity product and establishment of loquat leaf mass production system. Jeonnam Agricultural Research & Extension Services (in Korean).
- Kim, S.G., J.W. Choi, H.J. Park, S.M. Lee and H.J. Jung. 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.
- Kim, S.H. 2010. Effects of the combination of *Umbilicaria esculenta* extract and anticancer drugs on human cancer cells. Department of Biological and Chemical Engineering, MS Thesis, Energy Korea Polytechnic Univ., Korea (in Korean).
- Kim, S.S. and H.C. Cha. 2017. Comparison of the total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of four kinds of sand dune plants living in Taean, Korea. *Korean J. Plant Res.* 30(1):8-16 (in Korean).
- Kwon, M.K. 2003. (A)study on the antimicrobial activities of the extract of *Camellia japonica* L. leaves. Department of Food Nutrition, MS Thesis, Sungshin Women's Univ., Korea (in Korean).
- Lee, S.J., J.K. Seo, J.H. Shin, H.J. Lee and N.J. Sung. 2008. Antioxidant activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J. Korean Soc Food & Nutr.* 37(5):605-611 (in Korean).
- Mishra, N.P., R.K. Mishra and G.S. Singhal. 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.
- Oh, C.H., J.B. Bae, N.S. Kim, H.Jeon, K.S. Han, M.J. Lee and J. Kwon. 2009. Effect of *Orostachys japonicus* A. verger on apoptosis induction of human leukemia HL60 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 40(2):118-122.
- Park, J.H. 2014. A study on physiological activity of wild *Lactuca indica*. Department of Life Science, MS Thesis, Chosun Univ., Korea (in Korean).
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and RE. Catherine. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloraztion assay. *Free Radical Biol Med.* 26:1231-1237.
- Suk, D.H. 2011. Inhibitory effect of the extracts from *Orostachys japonicus* on inflammation. Department of Biomedical Laboratory Science, Ph.D. Thesis, Inje Univ., Korea (in Korean).
- Sung, G.O. 2004. Antimicrobial activities of the extract of *Gingo biloba* L. leaves on the food-borne pathogens. Department of Food Nutrition, MS Thesis, Sungshin Women's Univ., Korea (in Korean).
- Won, Y.S., J.H. Lee, S.J. Kwon, D.U. Ahn, D.Y. Shin and K.I. Seo. 2014. Anticancer effects of cultivated *Orostachys japonicus* on human prostate cancer cell. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 41(1):67-73 (in Korean).

(Received 18 January 2017 ; Revised 9 March 2017 ; Accepted 13 April 2017)