

백화사설초의 현탁세포배양에 의한 oleanolic acid 생산

이용일, 조지숙, 김동일*

인하대학교 공과대학 화공생명공학부
전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Oleanolic acid is a triterpenoid compound that exists in *Oldenlandia diffusa*. Recently, oleanolic acid has been noted for antitumor effect. Application of both plant growth regulators, 2,4-D and kinetin, was found to be essential for the induction of callus and suspension cells. Optimum induction condition for callus and suspension cells of *Oldenlandia diffusa* was determined to be 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin. Chromatographic separation of oleanolic acid from its derivatives was achieved using Rexchrom S5-100-ODS column. The retention time of oleanolic acid was 12.6 min and the specific content of oleanolic acid was 0.41 mg/g dry weight.

서론

중국 약용 식물들은 중국에서 전통적으로 많은 질병을 예방하거나 치료하는데 쓰여 왔다. 중국 약용 식물 중의 하나인 백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년 생 초본인 쌍낚시돌풀 *Oldenlandia diffusa*(Willd.) Roxb.의 전초로서 항암효과, 소염작용 등의 효능이 있다. 이는 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남성 및 양자강 남쪽지방에 주로 분포하며, 우리나라에서는 전남의 백운산 및 제주도에 자생하고 있으며 진주에서 재배하고 있다¹⁾. Triterpenoid 화합물인 oleanolic acid와 ursolic acid는 이성질체이며 백화사설초에 포함되어 있다. 이들은 간보호, 항염증, 항암, 항체형성 촉진 등의 효과가 알려져 있다²⁾.

식물세포배양은 직접적인 식물재배와는 달리 지리적, 환경적 영향을 받지 않으면서 다양한 유용물질들을 생산할 수 있다. 식물세포배양의 장점은 식물체에 비하여 생장이 빠르므로 유전적으로 균일한 개체의 급속 증식이 가능하며, 성장 조건의 조정, 유전자 조작 등으로 여러 가지 변화를 줄 수 있다는 것이다.

본 연구에서는 oleanolic acid의 생산을 위해 백화사설초의 현탁세포를 유도하여 배양하였고, oleanolic acid의 추출 및 분석 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

무균 조건하 발아

백화사설초의 종자를 70% 알코올에 1분간 살균 후, 멸균한 증류수로 세척하였다. 세척한 종자를 1% NaOCl에 15분간 멸균 후, 멸균한 증류수로 3회 세척하였고, 성장조절제가 없는 MS, SH, White 배지에서 발아시켰다.

캘러스 및 현탁세포 유도

무균 조건 하에서 발아된 백화사설초의 잎에 상처를 낸 다음, 2,4-D와 kinetin을 농도별로 첨가한 MS, SH 배지에서 캘러스를 유도하였다. 캘러스를 SH 배지에 넣고 25℃, 100 rpm, 암조건에서 배양하여 현탁세포를 유도하였다.

Oleanolic acid의 추출 및 분석

건조량을 측정된 현탁세포를 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 추출에 사용하였다. 현탁세포 1.5 g에 70% ethanol을 10 mL 첨가하여 50℃ 항온수조에서 1시간 동안 추출하였으며, 상등액 5 mL를 취하여 ethanol을 증발시킨 뒤 chloroform을 2 mL 첨가한 후 섞어 주었다. 여기서 1 mL의 chloroform 층을 회수하여 농축시킨 후 다시 1 mL의 methanol에 녹여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. Oleanolic acid의 분석을 위해 Rexchrom S5-100-ODS column을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water를 80:20으로 하였으며, 1.0 mL/min의 유속조건으로 200 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

백화사설초의 캘러스를 유도하기 위하여 먼저, 백화사설초의 종자를 표면멸균을 하여 발아시켰다. 무균 조건하에서 발아시킨 백화사설초의 잎을 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D와, 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 SH배지에서 캘러스를 유도하였다. 또한 동일한 배지를 사용하여 캘러스로부터 현탁세포를 유도하였다(Figure 1).

Oleanolic acid가 소수성 물질이라는 것에 착안하여 역상 컬럼을 사용한 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼으로는 Rexchrom S5-100-ODS column, Metasil 5 μ ODS column, Capcell Pak C18 column이며, 이 중에서 Rexchrom S5-100-ODS column의 분리능이 가장 좋았다. Photodiode array detector로 oleanolic acid의 최적 UV 파장을 검색한 결과, 200 nm에서 최적의 UV 흡광도가 나타났다. 이동상은 acetonitrile과 water를 80:20으로 하고, 유속은 1.0 mL/min로 결정하였다. 백화사설초의 현탁세포 추출물의 oleanolic acid 추정 피크, oleanolic acid, ursolic acid의 retention time은 각각 12.6분, 12.6분, 12.9분이었다. 백화사설초의 현탁세포 추출물의 추정 피크가 맞다는 것을 명확하게 하기 위해 현탁세포 추출물에 같은 농도가 되도록 oleanolic acid를 첨가하여 분석하였다(Figure 2). 한편, 현탁세포 추출물에

같은 농도가 되도록 ursolic acid를 첨가하여 분석하였다(Figure 3).

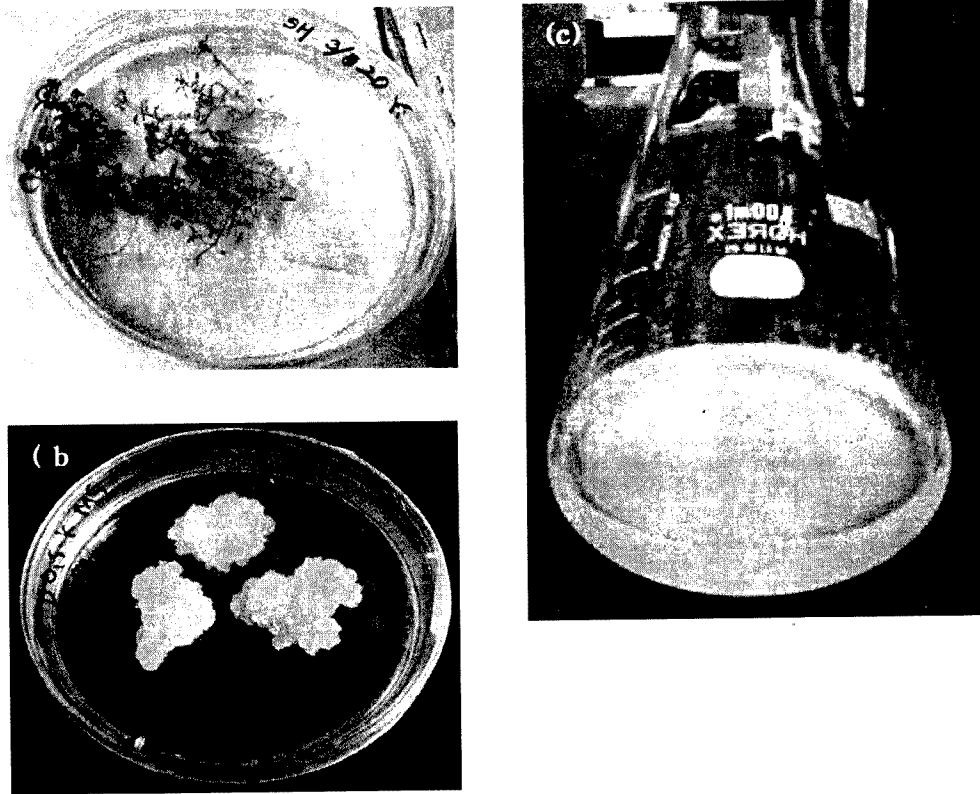


Figure 1. Plantlet (a), callus (b), suspension culture (c) of *Oldenlandia diffusa*

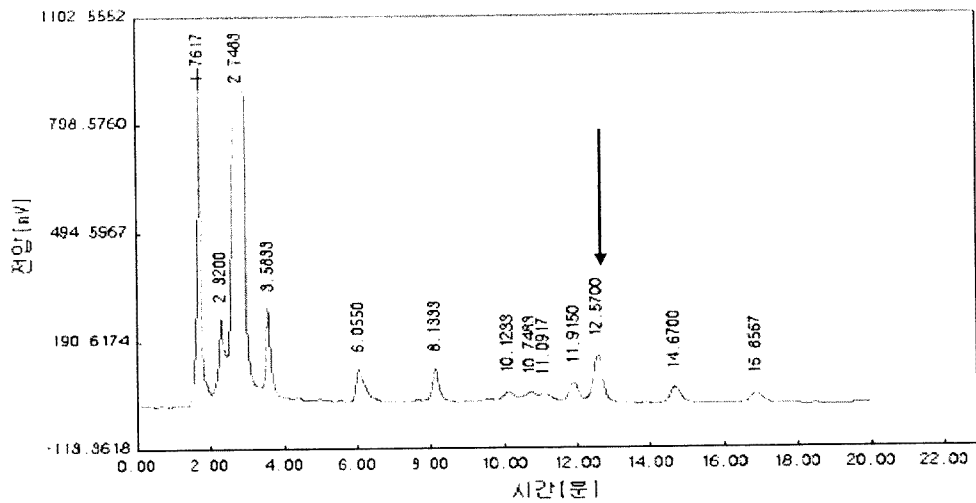


Figure 2. HPLC chromatogram of *O. diffusa* suspension cell extracts spiked with oleanolic acid

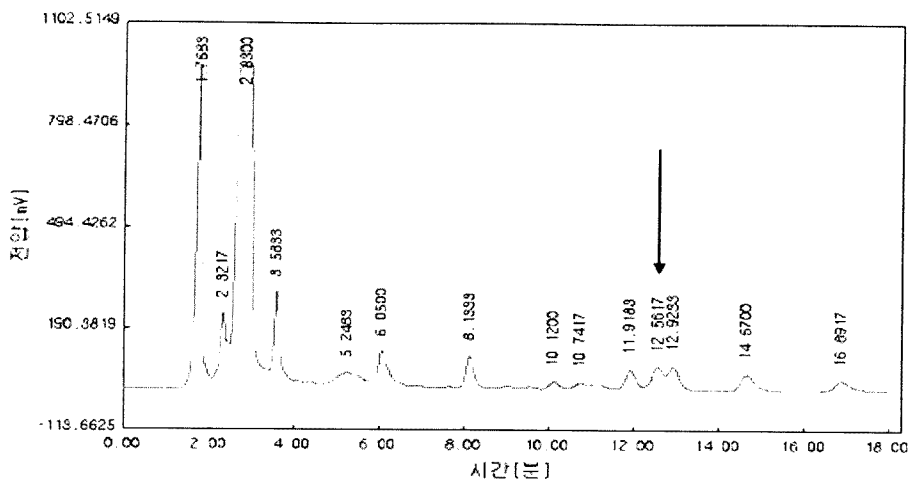


Figure 3. HPLC chromatogram of *O. diffusa* suspension cell extracts spiked with ursolic acid

백화사설초 현탁세포 추출물에 oleanolic acid를 첨가하여 분석하였을 경우, oleanolic acid의 retention time인 12.6분에서의 피크 면적이 증가하였다. 한편, 백화사설초 현탁세포 추출물에 ursolic acid를 첨가하여 분석하였을 경우에는 12.6분과 12.9분에서 두 개의 피크가 나왔다. 따라서 백화사설초 현탁세포에서 oleanolic acid가 생산된다고 결론을 내렸다. 정량 분석 결과, 건조 세포 1 g 당 0.41 mg의 oleanolic acid가 생산되었다.

요 약

백화사설초에 함유되어 있는 oleanolic acid를 세포배양을 이용하여 생산하기 위한 연구를 수행하였다. Oleanolic acid를 생산하기 위해, 백화사설초의 캘러스와 현탁세포를 2,4-D 0.5 mg/L, kinetin 0.1 mg/L가 포함된 SH 배지에서 유도하였다. Oleanolic acid의 분석을 위해, Rexchrom S5-100-ODS column을 사용한 HPLC를 이용하였다. 분석 결과, oleanolic acid의 retention time은 12.6분 이었고, 그 양은 0.41 mg/g dry weight였다.

참고 문헌

1. 김성훈, “백화사설초로부터 항암활성 물질분리와 항암성 평가” (1996), 충남대학교 약학과 박사학위논문.
2. Liu, J., “Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid” (1995), *J. of Ethnopharmacol.*, 49, 57-68.