

## 은행(*Ginkgo biloba* L.)의 세포배양에 의한 Flavonoid류의 검출

김 광 수 · 백 윤 웅 · 고 경 민 · 황 성 진 · 김 영 준 · \*정 상 진 · †황 백  
전남대학교 생물학과 호르몬연구센터, \*청주대학교 유전공학과

### Detection of flavonoid compounds by cell culture of *Ginkgo biloba* L.

Gwang-Soo Kim, Yun-Woong Paek, Kyeong-Min Ko, Sung-Jin Hwang,  
Young-Jun Kim, Sang-Jin Chung\*, and Baik Hwang†

Hormone Research Center, Department of Biology, Chonnam National University,  
Kwangju 500-757, Korea

\*Department of Genetic Engineering, Chongju University, 360-764, Korea

#### ABSTRACT

Calli induced from *Ginkgo biloba* L. were cultured to investigate optimal culture conditions and identify the possibility production of useful compounds. Calli were obtained from leaves and stems of *Ginkgo biloba* seedlings and embryos on WP medium supplemented with 2mg/ℓ NAA and 5mg/ℓ kinetin. Chlorophyll-riched green callus was induced in MS liquid medium containing 1mg/ℓ NAA and 0.1mg/ℓ kinetin under light as 3 clones selected with origin. Embryo derived callus showed the highest growth rate. Analysis for flavonoids and their precursor was performed by TLC and EMS. A specific precursor of flavonoid was identified in callus, not in natural leaves. These findings indicate that tissue culture may produce flavonoids.

#### 서 론

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 은행나무과(*Ginkgoaceae*)에 속하는 현존하는 유일한 식물로써 예로부터 민간 한방 처방에 사용되어 왔으며 잎에서 약리작용을 하는 수많은 화합물들이 점차 밝혀지고 있다(1). 잎에 함유된 성분으로는 flavonoid, diterpene, sesquiterpene, polyphenol, polysaccharide 및 유기산 등이 보고되었고(2-4), 은행잎 엑기스는 많은 생물 활성 및 약리작용이 있는 것으로 밝혀졌으며(5), 현재 프랑스와 독일을 비롯한 유럽 지역과 한국 등에서 상품화되어 시판되고 있으나 아직도 새

로운 성분 및 약리작용을 밝히기 위한 연구가 진행되고 있는 실정이다(6). 특히, 이들 화합물들 중 flavonoid계 화합물은 은행잎의 엑기스 중 대략 50% 정도 함유되어 있으며(5), 주로 kaempferol, quercetin, isorhamnetin의 glycoside 화합물로서 일부는 식물로부터 흔히 발견되는 물질이다(7). 이들의 약리효과로는 quercetin lycoside가 혈관류의 확장, 혈액순환 촉진 등의 효과가 있고 kaempferol glycoside는 노폐물의 용해 및 혈류 증가에 효과가 있으며 isorhamnetin glycoside는 노폐물의 흡착 및 혈액의 점도 저하 등에 효과가 있다고 보고되었다(8). 한편, diterpene 화합물인 ginkgolide는 A, B, C, J 및 M으로 이루어지며 특히 ginkgolide B는 PAF an-

† Corresponding Author

tagonistic activity가 뛰어나(9) 이에 관련된 혈액 순환계 이상, 노인성 치매, 천식, 쇼크, 이식 거부, 알러지 등 다양한 질환에 대한 약효가 우수하여(10) 수요가 급등할 것으로 예상되며, 약효가 입증된 성분들을 상업적 차원에서 대량 생산하려는 연구가 관심의 초점이 되고 있다.

그러나, 유효 성분 함량이 비교적 높은 것으로 알려진 우리 나라 은행나무도 온실효과로 인한 이상 기온과 급격한 경제발전으로 인한 대기오염에 의한 은행잎의 기형화로 인한 함량의 변화와 잎의 공급지의 감소, 목본인 관제로 재배 시간의 장기화, 또한 어린 나무와 암, 수그루 간의 함량의 차이, 계절의 변화에 따른 함량의 변화로 유효 성분 함량이 가장 높은 가을에 한 번 밖에 수확할 수 없는 수확 시기의 제한, 잎 자체의 함량이 미량인 관계로 잎의 수거를 위한 노동력과 저장을 위한 비용이 많이 들고, flavonoid의 구조가 복잡하기 때문에 화학 합성에는 많은 시간과 경비가 드는 단점 등을 가지고 있다. 따라서, 이러한 단점을 극복하고 유용 성분으로 알려진 flavonoid의 안정적인 생산에 의한 국민 보건향상을 위하여 자연 환경의 제약을 받지 않는 기내에서 유용 물질의 생합성 능력을 조사하고, 이를 기초로 생합성 능력을 향상시킬 수 있는 방법들을 찾는 연구가 활발히 진행되었다(11). 본 연구에서는 은행의 세포배양시 유용 물질로 알려진 flavonoid류의 성분들이 함유되어 있는지를 알아보고 이러한 성분의 생산 가능성을 타진하고자 은행의 각 조직 별로 캘러스를 유도하고 캘러스의 생장에 미치는 여러 가지 조건들을 조사했으며, flavonoid의 생합성 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

은행(*Ginkgo biloba* L.) 종자의 종피를 제거한 다음 70% (v/v) ethanol에 10분 7% (v/v) NaOCl 용액에 15분간 표면 살균하고 무균수로 4회 세척한 다음 MS 기본배지(12)에 치상하여 기내에서 무균 발아시켰다. 이렇게 하여 은행 종자에서 발아된 유식물체의 잎과 줄기, 그리고 표면 살균된 종자에서 적출한 미성숙 배를 각각 캘러스 유도에 사용하였다.

### 캘러스 유도, 배양 및 세포주 선발

무균 발아시킨 유식물체의 잎과 줄기의 절편 그리고 종자에서 적출한 배(embryo)를 2mg/l NAA

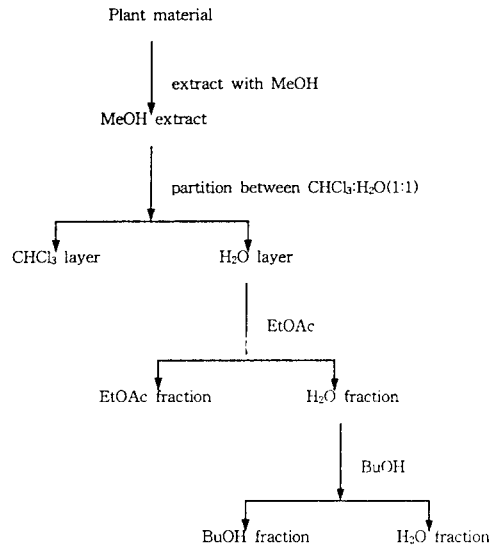


Fig. 1. Schematic diagram for extraction of flavonoids.

와 5mg/l kinetin이 첨가된 WP 배지(30g/l sucrose, pH 5.8)에 치상하여 26°C, 암조건 하에서 캘러스를 유도하고, 유도된 캘러스는 세포 기원에 따라 세포주를 선발하여 1mg/l NAA와 0.1mg/l kinetin이 첨가된 MS 배지로 계대배양하였으며, 계대배양 4개월 후 동일한 조건의 액체 배지를 이용하여 광조건(16hr light, 2500 Lux) 하에서 130rpm으로 현탁배양하였다. 그리고 세포의 기원에 따라 선발된 세포주 중 광조건 하에서 가장 빠른 생장을 나타내는 세포주만을 2차로 선발하였다.

### 배양 조건에 따른 캘러스의 생장을 비교

캘러스의 생장에 미치는 여러 가지 배양 조건을 규명하기 위해 위의 조건에서 선발된 세포주 중 성장 속도가 가장 빠른 배(embryo)에서 유도된 캘러스를 사용하여 배양 배지, 빛, 탄소원의 종류 및 농도, NAA의 농도 등을 변화시켜 조사하였다. 이때 배양 배지는 각각 1mg/l NAA와 0.1mg/l kinetin이 첨가된 MS, WP(13), NN(14), N6(15), B5(16), White(17) 액체 배지를 사용하였으며, 탄소원으로서 glucose, fructose, sucrose를 각각 3%씩 처리하여 생장율을 비교하였고, 이 중 sucrose 농도는 1~7% 까지 변화시켜 생장율을 측정하였다. 또한 NAA의 농도가 캘러스의 생장에 미치는 영향을

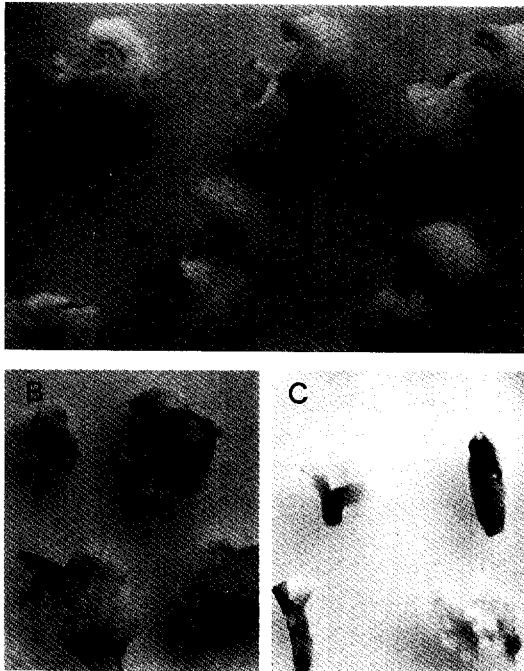


Fig. 2. Callus induced from embryos(A), leaves (B) and stems(C) in WP medium containing 2mg/l NAA and 5mg/l kinetin.

알아보기 위해 MS 배지에 kinetin을 0.1mg/l 로 고정하고 NAA의 농도를 1~10mg/l 로 변화시켜 캘러스의 생장에 미치는 효과를 조사하였다

#### Flavonoid의 추출 및 분석

Flavonoid의 추출은 전남대학교내에서 자란 은행 잎과 기내에서 배양된 green callus를 Kang 등(3-4)의 방법(Fig. 1)에 의하여 methanol로 3시간 씩 6회 추출한 후 농축하여 methanol 엑기스를 얻었다. 이 엑기스에 물과  $\text{CHCl}_3$ 의 혼합액을 가하여 지용성 물질 및 polyphenol 성분들을 제거하고, 수층을 다시 EtOAc로 추출하여 EtOAc분획을 얻었으며 남아 있는 수층은 계속해서 BuOH로 추출하여 BuOH 분획을 얻었다. EtOAc 분획 및 BuOH 분획은 silica gel 컬럼(Merck, No. 9385)에 가해서 각각 EtOAc, 수포화EtOAc : EtOAc (1:1), 수포화 EtOAc, 수포화 EtOAc : MeOH(100:3), 수포화 EtOAc : MeOH (20:1) 및 수포화 EtOAc, 수포화 EtOAc : MeOH(100:3), 수포화 EtOAc : MeOH (20:1), 수포화 EtOAc : MeOH(15:1)의 순서로

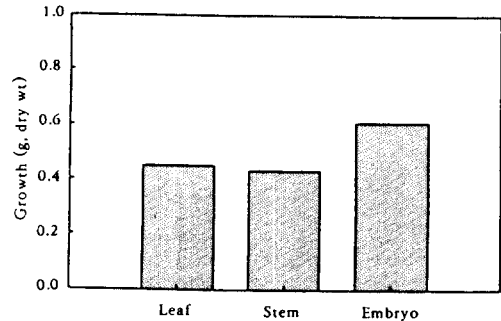


Fig. 3. Growth of three different clones in MS liquid medium containing 1mg/l NAA and 0.1mg/l kinetin after 2 weeks culture. Callus(2g fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures.

용출하여 감압 농축하였다. 그 후 농축액을 소량의 methanol에 용해시켜 Kartnig 등(18)의 방법에 의하여 EtOAc : EtOME : HCOOH conc. : H<sub>2</sub>O(50:30:10:10)의 전개 용매에 silica gel plate(Merck, No. 5554)로 전개시킨 후 UV 365 nm에서 관찰하였다. 또한 flavonoid aglycone을 분석하기 위해 위의 EtOAc 및 BuOH 분획의 농축액을 7% HCl로 가수분해한 후 toluene : HCOOEt : HCOOH conc. (5:4:1)의 전개 용매로 전개하여 UV 365nm에서 관찰하였다. Electrospray Mass Spectrometry (EMS)는 analyzer로 SCIEX TAGA Model 6000E triple Quadrupole mass spectrometer를 사용하였고, solvent는 MeOH : H<sub>2</sub>O(1:1)로 조성한 후 sample을 직접 solvent에 용해시켜 direct infusion 방법으로 실시하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 캘러스 유도, 배양 및 세포주 선발

은행 유식물체의 각 조직 부위와 배를 캘러스 유도 배지에 치상하여 4~5주 경과 후 각기 다른 형태와 색상을 가진 캘러스가 유도되었다. 배에서 유도된 캘러스는 우유빛에 숨털 같은 형태로 유도되었고, 잎에서 유도된 캘러스는 엽록소를 함유하여 약간 녹색을 띤 투명하고 거친 표면을 이루는 세포괴를 형성하였으며, 줄기에서는 수분을 많이 함유한 흰색 세포괴를 형성하였다(Fig. 2). 이렇게 유도된 캘러스들은 세포가 유래된 기원에 따라 세포주를 선별하여 캘러스 배양 배지인 1mg/l NAA와 0.1mg/l kin-

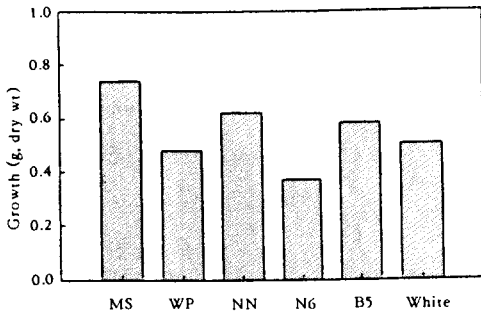


Fig. 4. Effect of media on the growth of callus after 2 weeks culture in various liquid media containing  $1\text{mg}/\ell$  NAA and  $0.1\text{mg}/\ell$  kinetin. Callus ( $2\text{g}$  fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures.

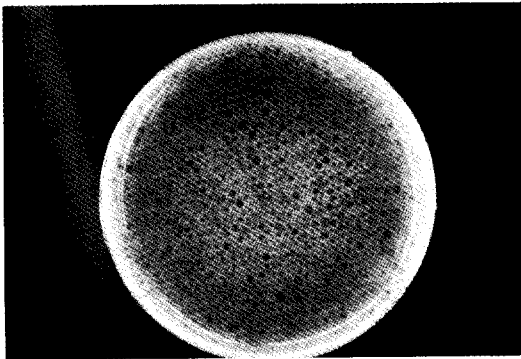


Fig. 5. Callus cultured in WP liquid medium containing  $1\text{mg}/\ell$  NAA and  $0.1\text{mg}/\ell$  kinetin.

etin이 첨가된 MS 배지( $30\text{g}/\ell$  sucrose, pH 5.8)로 계대배양하였으며 이로부터 2차로 고 성장능 세포 클론을 선발하였다. 그 결과 잎과 줄기에서 유도된 캘러스에 비하여 배에서 유도된 캘러스의 성장능이 우수하였다(Fig. 3). 이러한 우수 세포주의 선발은 Smith 등(19)과 Tremouillaux-Guiller 등(20)의 보고와 같이 얻고자 하는 유용성분의 생산성을 높이기 위해 성장이 우수한 세포주의 선발은 무엇보다도 필요한 선행 과정이라고 생각되어진다.

#### 배양 조건에 따른 캘러스의 성장을 비교

비교적 생장이 빠른 배유도 캘러스의 성장을 조사하기 위해 각각  $1\text{mg}/\ell$  NAA와  $0.1\text{mg}/\ell$  kinetin이 첨가된 배지에 접종 후 2주간 배양한 결과 캘러스의 성장율은 MS 배지에서 자란 캘러스가 WP

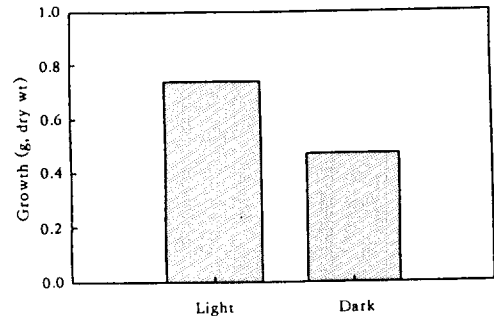


Fig. 6. Effect of light on the growth of callus after 2 weeks culture in MS liquid medium containing  $1\text{mg}/\ell$  NAA and  $0.1\text{mg}/\ell$  kinetin. Callus ( $2\text{g}$  fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures.

배지의 1.5배, NN 배지의 1.1배, N6 배지의 2.0배, B5 배지의 1.2배, White 배지의 1.5배의 성장율을 보여 MS 배지가 캘러스의 성장에 가장 적합한 배지임을 알 수 있었다(Fig. 4). 특히 목본성 식물 재료에 많이 사용되는 WP배지에서는 세포들끼리의 응집력이 강하여 자발적으로 고정화된 세포를 형성하여 세포괴의 지름이  $2\sim 3\text{mm}$ 에 달하였는데(Fig. 5), Fuller와 Bartlett(21)는 이러한 응집 현상을 Naturally Immobilized Cell Systems (NICS)라 하였으며, 연속 배양시에 세포의 성장을 저지시키고 원하는 유용 2차대사산물만을 특이적으로 많이 생산하게 하는 세포 고정화 기술 중의 하나로 알려져 있다(22). 또한 캘러스의 성장에 미치는 빛의 영향을 알아보기 위해  $1\text{mg}/\ell$  NAA와  $0.1\text{mg}/\ell$  kinetin이 첨가된 MS 액체배지에 접종하여 2주간 명과 암의 조건에서 배양한 후 성장율을 측정해 본 결과, 빛의 존재 하에서 엽록소의 합성이 양호한 green callus가 엽록소가 소실되어 미색을 나타내는 암상태의 캘러스보다 1.5배 정도 성장율이 좋게 나타나(Fig. 6) Carrier 등(11)에 의하여 행하여진 은행 세포배양에서와 같은 결과를 보였다. 한편 NAA의 농도가 캘러스의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 MS 배지에 kinetin을  $0.1\text{mg}/\ell$ 로 고정하고 NAA의 농도를  $1\sim 10\text{mg}/\ell$ 로 변화시켜 2주간 배양 후 성장율을 측정된 결과 NAA 농도가 높아질수록 성장율은 역비례하였으며, NAA가  $5\text{mg}/\ell$  이상의 농도에서는 캘러스가 갈변하는 것으로 보아 Carrier 등(11)의 보고와 같이 NAA를  $1\text{mg}/\ell$  처리한 것이 생장

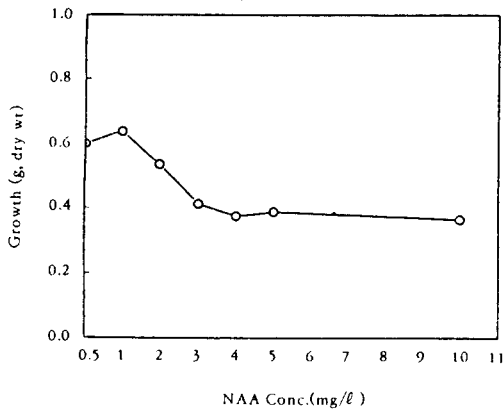


Fig. 7. Effect of NAA concentration on the growth of callus after 2weeks culture in MS liquid medium\*. Callus(2g fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures. \* Kinetin concentration, 0.1mg/l.

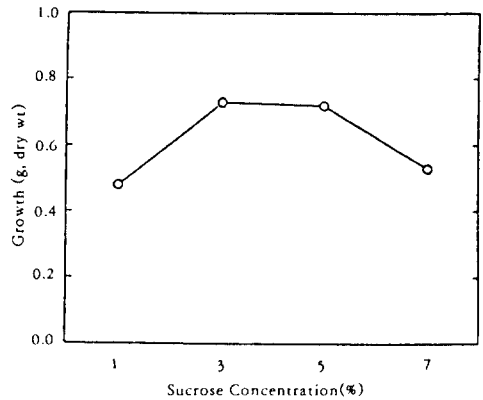


Fig. 9. Effect of sucrose concentration on the growth of callus after 2weeks culture in MS liquid medium containing 1mg/l NAA and 0.1mg/l kinetin. Callus(2g fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures.

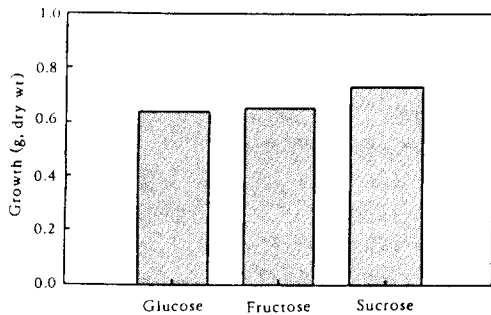


Fig. 8. Effects of various carbon sources on the growth of callus after 2weeks culture in MS liquid medium containing 1mg/l NAA and 0.1mg/l kinetin. Callus(2g fr. wt) was added to the medium at initiation of the cultures.

율이 가장 좋았다(Fig. 7). 또한 식물체내에서 에너지원 및 삼투조절제로서 사용되어 세포의 성장 속도와 2차대사산물의 생성과 밀접한 관계가 있는 탄소원의 종류 및 농도의 변화에 따른 캘러스의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위해 1mg/l NAA와 0.1mg/l kinetin이 첨가된 MS 액체배지에 glucose, fructose, sucrose를 각각 3%씩 처리하여 성장율을 비교한 결과, glucose, fructose에 비하여 식물 세포 배양시 가장 널리 사용되는 탄소원인 sucrose를 처

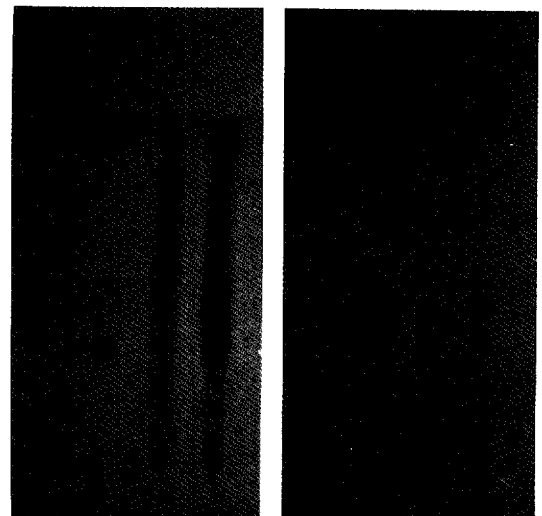


Fig. 10. Thin layer chromatograms for flavonoids before hydrolysis(A) and after hydrolysis (B). Lane S, standard flavonoid(R, rutin; K, kaempferol; Q, quercetin); Lane C, callus; Lane L, natural leaves.

리하였을 때 가장 높은 성장율을 나타냈으며(Fig. 8), 이를 기초로 하여 sucrose의 농도를 1~7%까지 변화시켜 성장율을 조사한 결과 대부분의 세포 배양에서와 같이 3~5%의 농도에서 성장율이 가장 좋았

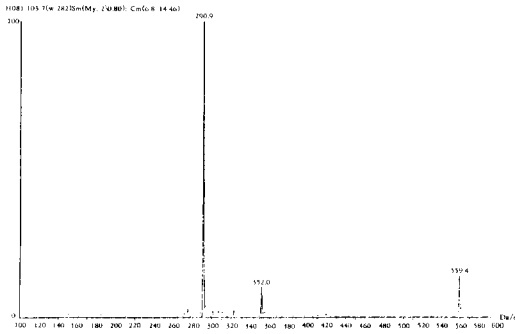


Fig. 11. Electrospray mass spectrum of flavonoid for callus.

다(Fig. 9).

#### Flavonoid의 검출

기내에서 배양된 캘러스와 자연 상태에서 자란 잎을 Kang 등(3-4)의 방법에 의해 추출하여 TLC에 의해 살펴본 flavonoid glycoside band의 양상은 서로 다르게 나타났다(Fig. 10. A). 특히 추출된 flavonoid glycoside를 HCl로 가수분해하여 TLC로 조사한 결과 flavonoid aglycone의 band 양상도 다르게 나타났다(Fig. 10. B). Fig. 10. B에서와 같이 표품과 비교시 잎에서는 kaempferol과 quercetin이 다량 생성됨을 보인 반면 캘러스에서는 kaempferol과 quercetin이 소량 생성되고 이와는 다른 물질이 생성됨을 알 수 있었다. 이 물질은 Electrospray Mass Spectrometry(EMS)를 이용한 분자량의 측정(Fig. 11) 및 TLC 상에서 FeCl<sub>3</sub>에 대한 양성 반응을 보이는 것으로 볼 때 표품과는 다른 flavonoid 혹은 그 생합성 전구물질로 추정되었다. 이러한 상이성은 Payne 등(23)의 보고와 같이 분화되어 있는 원식물체에서 flavonoid의 생합성과 합성된 flavonoid의 이동 및 축적의 부위가 달라 탈분화된 캘러스에서는 flavonoid의 생합성, 이동 및 축적 등의 기작이 다른 것으로 사료된다.

#### 요 약

은행(*Ginkgo biloba* L.) 세포의 최적 배양 조건과 유용 성분의 생산 가능성을 규명하기 위해 은행의 각 부위로부터 캘러스를 유도, 배양하였으며 유용 성분을 검출, 분석하였다. 기내에서 무균적으로 받아시킨 은행의 유식물체로부터 잎과 줄기, 그리고 은행 성

숙 종자로부터 배(embryo)를 적출하여 2mg/ℓ NAA와 5mg/ℓ kinetin이 첨가된 WP 고형배지에서 캘러스를 유도시켰다. 세포 기원 별로 선발된 3 종류의 캘러스를 각각 1mg/ℓ NAA와 0.1mg/ℓ kinetin이 첨가된 MS 액체배지(3% sucrose, pH 5.8)에서 16시간 광주기로 계대배양하였을 때 염록소를 다량 함유한 green callus를 형성하였고, 배유래의 캘러스가 가장 빠른 성장을 나타냈다. TLC 및 EMS를 이용하여 flavonoid 및 그 전구물질 등의 유용물질을 확인한 바, 잎에서 검출되지 않은 flavonoid의 전구물질 등이 캘러스에서 확인되었다.

#### 감 사

본 연구는 한국과학재단 지원 호르몬연구센터의 일부 지원(과제번호 95-0202-3)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

1. J. D. Keys (1976), Charles, E., Tuttle CO., Tokyo. p.30.
2. H. Huh, E. J. Staba and J. Singh (1992), *J. Chromatogr.*, **600**, 364.
3. S. S. Kang, J. S. Kim, W. J. Kwak and K. H. Kim (1990), *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**, 111.
4. S. S. Kang, J. S. Kim, W. J. Kwak and K. H. Kim (1990), *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**, 148.
5. A. Agnoli, J. R. Rapin, V. Scapagnini and W. V. Weitbrecht (1984), *John Libbey & Company Ltd.* London pp. 1.
6. O. Sticher (1993), *Planta Med.* **59**, 2.
7. J. Harborne and C. A. Williams (1975), Part 1. Academic Press, New York. pp. 376.
8. W. K. Lee, Y. W. Ryu, S. Y. Byun and H. G. Chung (1993), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 55.
9. S. L. Scriber, J. A. Porco, R. C. Hawley and D. Desmaele (1987), *New Methods in Drug Research.* **3**, 22.
10. P. Braquet (1987), *Drugs of the Future.* **12**, 643.
11. D. J. Carrier, G. Cosentino, R. Neufeld, D. Rho, M. Weber and J. Archambault (1990), *Plant Cell Reports.* **8**, 635.

12. T. Murashige and F. Skoog (1962), *Physiol. Plant.* **15**, 473.
13. G. Lloyd and B. Mccown (1981), *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* **30**, 421.
14. C. Nitsch and J. P. Nitsch (1967), *Planta.* **72**, 355.
15. C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun., C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu. and F. Y. Bi (1975), *Scientia Sinic.* **18**, 659.
16. O. L. Gamborg, R. A. Miller and K. Ojima (1968), *Exp. Coll. Ros.* **50**, 151.
17. P. R. White (1963), *The Cultivation of Animal and Plant Cells*(2nd. ed.), The Ronald Press CO., New York.
18. T. Kartnig, G. Kogl and B. Heydel (1992), *Planta Med.* **59**, 537.
19. J. I. Smith, N. J. Smart, M. Misawa, W. G. Kurz, S. G. Tallevi and F. Dicosmo (1987), *Plant Cell Reports.* **6**, 142.
20. J. Tramouillaux-Guiller, H. Koja, F. Andreu, J. Creche, J. C. Chenieux and M. Rideau (1988), *Plant Cell Reports.* **7**, 456.
21. K. W. Fuller and D. J. Bartlett (1985), *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **26**, 229.
22. A. C. Hulst and J. Tramper (1989), *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 546.
23. G. Payne, V. Bringi, C. Prince and M. Shuler (1992), *Hanse publishers, New York* pp. 1.