한국생물공학회지 제19권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 19, No. 6, 471-477(2004)

백화사설초의 현탁세포배양에서 Elicitation에 의한 Oleanolic acid 생산성 증대

이 용 일 · † 김 동 일
인하대학교 공과대학 생명화학공학부
(접수 : 2004. 12. 2., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

Enhanced Production of Oleanolic Acid by the Elicitation in *Oldenlandia diffusa* Suspension Cell Cultures

Yong-Il Lee and Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2004. 12. 2., Accepted : 2004. 12. 23.)

Oldenlandia diffusa is a Chinese medicinal herb with antitumor activity capable of suppressing the growth of some cancer cell lines. Oleanolic acid and ursolic acid are triterpenoid compounds that exist in *Oldenlandia diffusa*. Recently, these have been noted for anti-inflammatory, anti-cancer, and hepato-protective effects. Application of both plant growth regulators, 2,4-D and kinetin, was found to be essential for the initiation of callus and suspension cells. Leaf blades of *Oldenlandia diffusa* was transformed into callus on Schenk and Hildebrandt medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin, while optimum initiation condition for suspension cells of *Oldenlandia diffusa* was determined to be 0.75 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. Analytical conditions for oleanolic acid were determined as follows: flow rate at 1.0 mL/min, UV length at 200 nm and mobile phase of 80% acetonitrile and 20% water. Production of secondary metabolites was found to be increased by the treatment with elicitors or signal transducers. The maximum production of oleanolic acid was 99.6 mg/L in cultures with 0.5 mM salicylic acid. It is 1.74 times higher than that of control.

Key Words : Oleanolic acid, *Oldenlandia diffusa*, elicitor, callus initiation, plant cell culture

서 론

식물들은 예로부터 의약품, 향료, 색소, 건축 재료 등의 원료로 많이 이용되어 왔다. 식물 유래의 화합물의 직접적인 추출에 의한 방법은 생태계의 파괴에 의한 자연환경 손실의 문제점, 극소량의 물질을 분리 및 정제한다는 어려움과 그 과정에서 고비용을 요구한다는 문제 등을 보여주었다. 이에 따라 생물공학의 발달에 의한 세포배양을 통한 식물 유래의 부가가치가 높은 여러 이차대사산물의 생산과 이의 산업화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1).

중국의 약용 식물들은 중국에서 전통적으로 많은 질병을 예방하거나 치료하는데 쓰여 왔다. 특히 자기면역 장애증과 암에 사용되었다(2). 백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 쌍낚시돌풀 *Oldenlandia diffusa*의 전초로서 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광동, 광서, 운남 및 양장강 남쪽지방에 주로 분포하며, 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 있으며 진주에서 재배하고 있다(3). 백화사설초는 위암이나 간암, 식도암, 직장암, 방광암 등의 암 치료에 특효가 있는 것으로 임상결과에서 드러나 있고, 갖가지 종양과 염증치료에도 매우 뛰어난 효과가 있다. 특히 면역력을 증가시키는 항체 형성을 촉진시키는 힘이 탁월하다. 또한 백화사설초는 약효도 탁월할 뿐 아니라 장기 복용이나 대량 복용에도 독성이 없고 부작용이 없다는 것이 큰 장점이다.

Triterpenoid 화합물인 oleanolic acid와 ursolic acid는 이성질체이며 백화사설초에 포함되어있다(4). 최근 이러한 화합물들에서 나타나는 생물학적 활성 때문에 치료제로서 관심이 집중되고 있다. 특히 oleanolic acid는 항진균(5), 항염증(6), anti-HIV(7), 이뇨제(8), 혈당저하(9), 항암(10) 효과 등

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

이 알려져 있다. 또한, oleanolic acid는 간이 화학적인 요인에 의해 상처받는 것을 막아주는 효과가 있다(11). CYP2E1은 독성 대사물질의 활성과 관련이 있는 중요한 isoenzyme이다. Oleanolic acid는 CYP2E1의 발현을 억제하여 독성이 있는 대사물질의 형성을 막아주기 때문에 간을 보호하는 효과가 있다(12). Ursolic acid는 항암(13), 항염증(14), 간보호(15) 효과 등으로 잘 알려져 있다. 특히, ursolic acid는 암세포의 성장과 전이에 필수적인 비정상적인 신혈관형성을 막아준다(16).

식물은 pathogen 침입이나 외부의 환경변화를 인지하고 이러한 환경으로부터 받은 신호를 세포내의 언어로 전환하는 기능을 가지고 있다. 대부분의 이차대사산물은 세포가 영양의 고갈이나 환경의 변화 또는 다른 미생물에 의한 오염과 같은 스트레스를 받을 때 축적되기 시작하는 것이 보통이다. 식물세포배양에 있어서 이차대사산물의 수율을 향상시키기 위한 방안으로 외부 인자를 배양액에 첨가함으로써 식물세포의 대사과정을 변환시키는 것이 있다. Elicitation은 배양된 세포의 다양한 스트레스에 대한 반응을 말한다. 그 예로는 식물의 병원균에 대한 방어작용, heat shock와 같은 물리적 stress에 대한 반응, 효소 처리에 의한 산물의 유도 등이 있다. 외부 자극 물질 (pathogen)에 의한 외부 신호가 gene expression, cell division, cell suicide 등과 같은 세포내 반응으로 전환되는 과정에 관여하는 물질을 signal transducer라 한다. 그 예로 reactive oxygen species (ROS), salicylic acid, jasmonic acid, ethylene 등이 있다(17). 특히, salicylic acid와 methyl jasmonate는 식물세포배양이나 식물체에서 이차대사산물의 생합성을 유도하는 신호 물질로 알려져 있다(18).

본 연구에서는 백화사설초로부터 대량배양이 가능한 현탁세포를 유도하고 세포의 생장 및 oleanolic acid 생산에 최적인 배지조건을 결정하였다. 또한 oleanolic acid를 이성질체인 ursolic acid로부터 분리하여 정량하기 위한 HPLC 분석조건을 최적화하였다. 확립된 배양 및 분석조건을 이용하여 oleanolic acid의 생산을 증대시키기 위해 다양한 signal transducer와 abiotic elicitor 들을 처리하였으며 세포배양을 위한 생산 가능성을 조사하였다.

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, 생장조절제가 없는 Murashige와 Skoog (MS), Schenk와 Hildebrandt (SH), 및 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 25℃, 암조건 하에 캘러스를 유도하였다. 2,4-D와 kinetin을 농도별로 첨가한 SH 배지에 캘러스를 넣고 25℃, 100 rpm의 회전식 진탕배양기에서 암조건 하에 배양하여 현탁세포를 유도하였다.

현탁세포배양 및 생장배지

생장배지로는 SH 배지에 30 g/L sucrose, 0.1 mg/L kinetin, 0.75 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D)를 첨가하여 사용하였으며 pH를 5.8로 맞춘 뒤 121℃, 1.2 기압에서 가압증기 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 회전식 진탕배양기에서 25℃, 120 rpm, 암조건으로 유지하였고, 계대배양은 7일 간격으로 수행하였다.

세포중량 측정

세포의 생장을 측정하기 위해서 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100- mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨 담아 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW 측정후 60℃의 drying oven에서 24시간 동안 항량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

Oleanolic acid의 추출

건조량을 측정한 현탁세포를 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 추출에 사용하였다. 현탁세포 1 g에 70% ethanol을 10 mL 첨가하여 50℃ 항온수조에서 1시간 동안 추출하였다. 그 후 상등액 5 mL를 취하여 질소를 이용한 증발기를 이용하여 증발시킨 뒤 chloroform을 2 mL 첨가한 후 섞어 주었다. 여기서 1 mL의 chloroform 층을 회수하여 농축시킨 후 다시 0.5 mL의 methanol에 녹여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

Signal transducer와 abiotic elicitor의 제조 및 처리

Signal transducer로 methyl jasmonate, salicylic acid, hydrogen peroxide를 abiotic elicitor로는 $HgCl_2$, $CuCl_2$, vanadyl sulfate를 모액을 제조하여 0.20 mm의 membrane filter로 여과멸균한 뒤 사용하였다. 모든 signal transducer와 abiotic elicitor 들은 배양 6일째 첨가하였다.

결과 및 고찰

백화사설초 캘러스 및 현탁세포의 유도

캘러스 유도에 가장 적합한 식물 생장조절제 농도는 식물의 종류에 따라 다르거나 외식체의 생리적 조건에 따라 다르기 때문에 옥신과 시토키닌의 농도를 변화시켜 최적조건을 만들어 내야 한다. 2,4-D와 kinetin은 캘러스와 현탁세포를 유도하기위한 기본적인 식물 생장조절제이다. 백화사설초의 캘러스를 유도하기 위하여 먼저, 백화사설초의 종자를 표면멸균을 하여 발아시켰다(Fig. 1a). 무균 조건하에서 발아시킨 백화사설초의 잎을 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose가 첨가된 SH 배지에서 캘러스를 유도하였다(Fig. 1b). 캘러스가 유도되었던 배지와 동일한 0.5 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin이 포함된

SH 배지에서 백화사설초 현탁세포를 유도하였다(Fig. 1c). 유도된 현탁세포는 30 g/L의 sucrose 농도에서 접종 후 2일째까지는 세포의 생장이 거의 관찰되지 않는 지연기를 보였다. 또한, 배양 8일째 17.1 g/L의 최대세포건조중량을 보였고, 배양 10일째 이후로 세포 사멸기에 들어갔다(Fig. 2). 세포의 수분 함량을 나타내는 세포크기지수인 FCW/DCW ratio (F/D ratio)의 경우 19 부근의 값을 보였다. 가장 잘 알려진 담배 현탁세포의 F/D ratio가 보통 20 정도의 값을 가지는 것에 비춰볼 때, 백화사설초와 담배의 현탁세포는 세포의 크기가 비슷하다는 것을 알 수 있다. 배양 8일째 세포를 수확하여 분석한 결과, 건조 세포 1 g 당 0.41 mg의 oleanolic acid가 생산되었다.

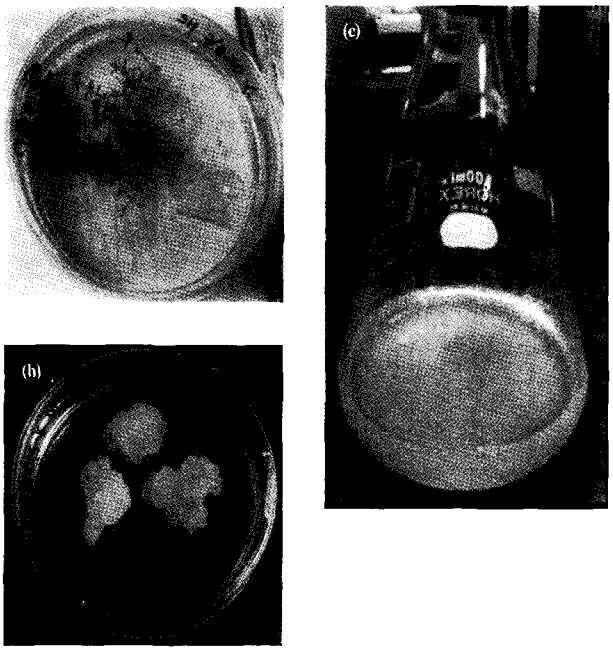


Figure 1. Plantlet (a), callus (b), and suspension culture (c) of *Oldenlandia diffusa*.

백화사설초 현탁세포배양을 위한 기본 배지 및 생장조절제의 선별

백화사설초 현탁세포배양시 생장속도를 높이기 위하여 일반적으로 알려진 식물세포배양용 기본 배지들 중에서 최적의 배지를 찾고자 하였다. MS, SH, AR (Anderson's Rhododendron), White 배지를 기본 배지로 하여 14일간 세포 생장을 관찰하였다(Fig. 3). 비교한 네 가지 배지 중에서 SH 배지에서 가장 빠른 생장속도를 보였고, low salt 배지인 White 배지와 AR 배지는 백화사설초 현탁세포배양에 적절하지 못함을 확인하였다. 이상의 결과로부터 백화사설초 현탁세포배양에 적합한 배지는 SH 배지라고 결론을 내렸으며, 이후 연구에서 전과 같이 SH 배지를 기본 배지로 사용하였다. 생장조절제는 극소량으로도 식물의 생장과 발생에 영향을 미친다. 따라서 생장조절제의 농도를 최적화하면 백화사설초 현탁세포의 생장 효율을 높일 수 있다. 백화사설초 캘러스로부터 현탁세포를 유도할 때, 생장 효율과 생산성이 좋은 현탁세포를 얻기 위해 식물의 생장과 현탁세포유도에 관련된 기본적인 생장조절제인 2,4-D와 kinetin을 여러 농도로 사용하여 백화사설초 현탁세포에 최적인 조건을 찾았다.

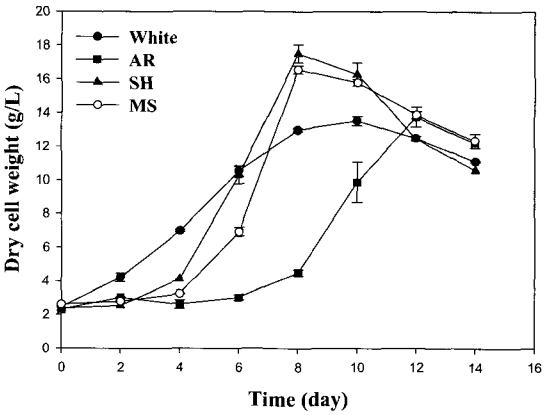
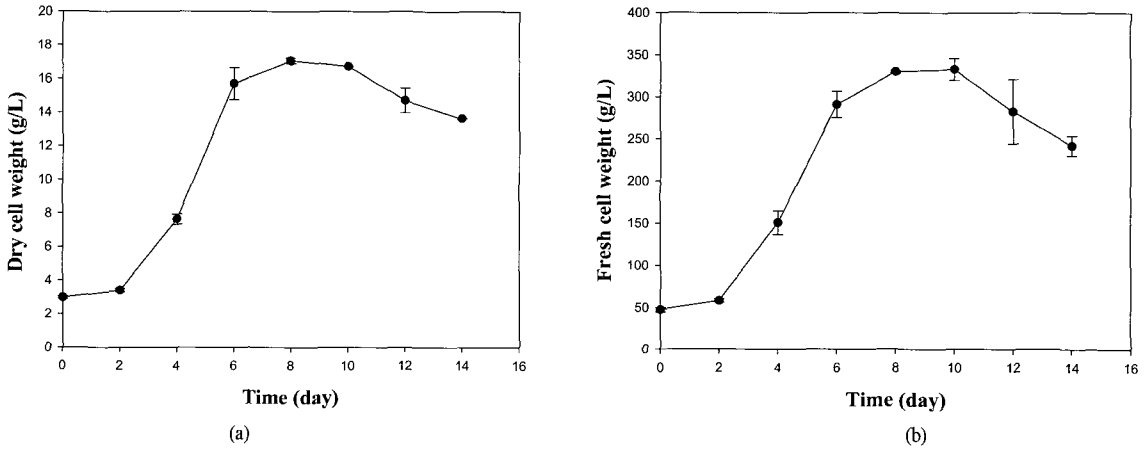


Figure 3. Effect of basal media on cell growth.



(a) (b)

Figure 2. Time course changes of *Oldenlandia diffusa* suspension cell growth with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin.

2,4-D 농도를 0.25, 0.5, 0.75 mg/L로, kinetin 농도를 0, 0.05, 0.1 mg/L로 하여 총 9가지 농도에서 현탁세포를 유도해 보았다(Table 1). 그 결과, 0.75 mg/L의 2,4-D와 0.1 mg/L의 kinetin 농도에서 가장 빨리 현탁세포가 유도되었다. 이 때, 유도된 백화사설초의 현탁세포는 30 g/L의 sucrose 농도에서 접종 후 2일째까지는 세포의 생장이 거의 관찰되지 않는 지연기를 보였다. 또한 배양 6일째 22.8 g/L의 최대세포건조중량을 보였고, 배양 8일째 이후로 세포 사멸기에 들어갔다(Fig. 4). 또한 F/D ratio는 11 정도로 세포의 부피가 작아진 것을 알 수 있었다. 새롭게 유도한 현탁세포는 캘러스를 유도할 때와 같은 조건으로 유도한 현탁세포에 비해 생산성이 좋았다. 두 가지의 생장조절제 조건에서 백화사설초 현탁세포의 생장과 oleanolic acid 생산성을 비교한 것을 Table 2에 나타내었다. 두 조건 모두 배양 8일째에 현탁세포의 특성을 관찰하였다. 2,4-D 0.5 mg/L와 kinetin 0.1 mg/L를 첨가한 (A) 조건에서의 세포건조중량은 17.1 g/L인 반면, 2,4-D 0.75 mg/L와 kinetin 0.1 mg/L를 첨가한 (B) 조건에서는 21.9 g/L로 (A) 조건에 비해 4.8 g/L 증가하였다. 이러한 차이는 다른 농도의 생장조절제와 초기 접종량에서 기인한 것으로 보인다. 일반적으로 사용하는 접종 방법과 같이 Whatman No. 1 filter paper를 이용하여 걸러진 fresh cell을 직접 접종하였는데, 두 조건에서 유도된 현탁세포의 F/D ratio가 크게 달라 초기 접종량 (dry cell weight)이 (A), (B) 조건에서 각각 3.0, 5.8 g/L로 차이가 있었다. F/D ratio는 (B) 조건에서 10.6으로 (A) 조건에서의 19.3보다 크게 작아졌다. 이것은 (B) 조건에서 유도한 현탁세포가 (A) 조건의 현탁세포보다 물을 적게 함유하고 있어 부피가 작다는 것을 의미한다. F/D ratio가 작으면 세포의 부피가 작아서 고농도 배양에 유리하다. Oleanolic acid의 생산량은 (A), (B) 조건에서 각각 7.01, 43.4 mg/L로, (B) 조건에서의 생산량이 (A) 조건보다 6.2배 증가되었다. 따라서, 백화사설초 현탁세포배양에 사용할 생장조절제로 0.75 mg/L의 2,4-D와 0.1 mg/L의 kinetin을 사용하였다.

Table 1. Initiation of *Oldenlandia diffusa* suspension cells with various concentrations of 2,4-D and kinetin (Initiation rates of suspension cells: - ; It wasn't initiated, +; low, ++ ; middle, +++ ; high)

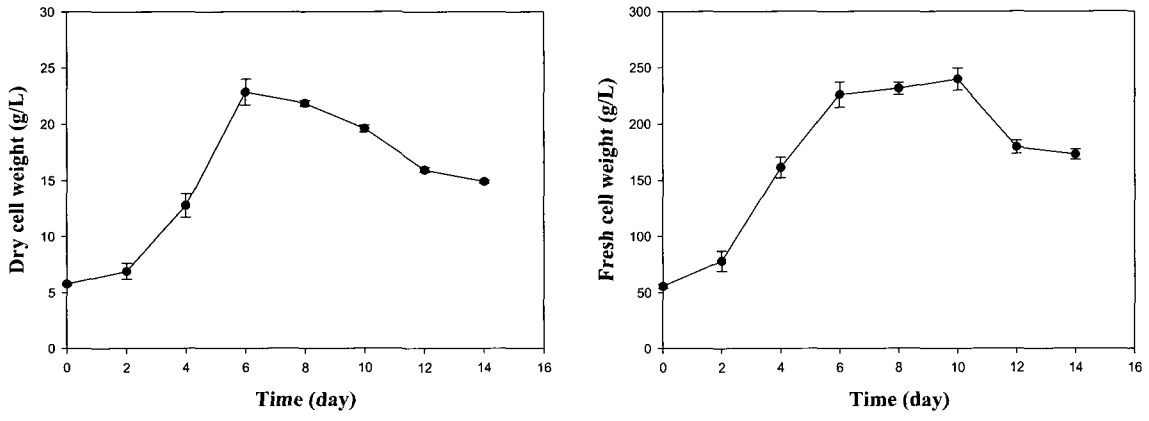
2,4-D \ Kinetin	0 mg/L	0.05 mg/L	0.1 mg/L
0.25 mg/L	-	-	-
0.5 mg/L	+	+	+
0.75 mg/L	++	++	+++

Table 2. Effect of 2,4-D and kinetin on *Oldenlandia diffusa* suspension cells at day 8

	(A) 2,4-D 0.5 mg/L, Kinetin 0.1 mg/L	(B) 2,4-D 0.75 mg/L, Kinetin 0.1 mg/L
Dry cell weight g/L	17.1	21.9
Specific yield mg (oleanolic acid)/g (dry cell weight)	0.41	1.98
Oleanolic acid mg/L	7.01	43.4
F/D ratio (fresh cell weight)/(dry cell weight)	19.3	10.6

Oleanolic acid의 분석 조건 확립

생약재 백화사설초로부터는 oleanolic acid와 ursolic acid가 생산되나, 이 두 가지 물질은 isomer로서 분리하기가 어렵다. 백화사설초 현탁세포배양을 통해서 oleanolic acid와 ursolic acid를 생산하기 위해서는 이들을 분리하여 정량 분석할 수 있어야 할 것이다. Oleanolic acid가 소수성 물질이라는 것에 착안하여 역상 컬럼을 사용한 HPLC로 분석하였다. Reversed phase C18 column인 Rexchrom S5-100-ODS column, Metasil 5μ ODS column, Capcell Pak C18 column을 사용하여 oleanolic acid를 분석하였는데, 이 중에서 Rexchrom S5-100-ODS column의 분리능이 가장 좋았다. Spectrophotometer와 photodiode array detector를 사용하여 oleanolic acid와 ursolic acid의 최적 UV 파장을 검색한 결



(a) (b)

Figure 4. Time course changes of *Oldenlandia diffusa* suspension cell growth with 0.75 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L kinetin.

과, 200 nm에서 최적의 UV 흡광도가 나타났다. 이상의 실험으로부터 결정된 Rexchrome S5-100-ODS column을 이용하고, 이동상으로는 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(Fig. 5). 한편, 현탁세포 추출물에 같은 농도가 되도록 ursolic acid를 첨가하여 분석하였다(Fig. 6). 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. Oleanolic acid의 standard가 양에 따라 비례적으로 정량 분석이 가능한지 확인하기 위하여 oleanolic acid의 standard를 100, 200, 300, 400, 500 mg/L로 제조하여 HPLC로 분석하였다. Standard 양의 증가에 따라 peak의 면적이 비례적으로 증가하였으므로 정확한 정량 분석이 가능했다.

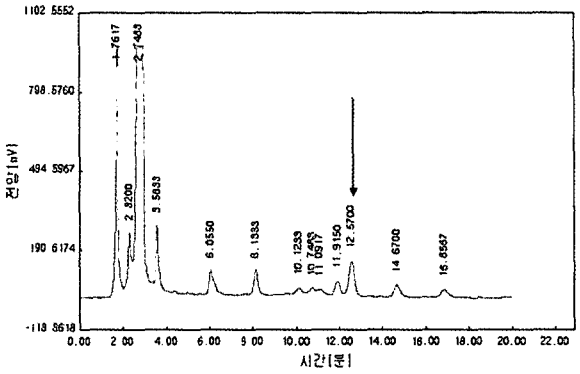


Figure 5. HPLC chromatogram of *Oldenlandia diffusa* suspension cell extracts spiked with oleanolic acid.

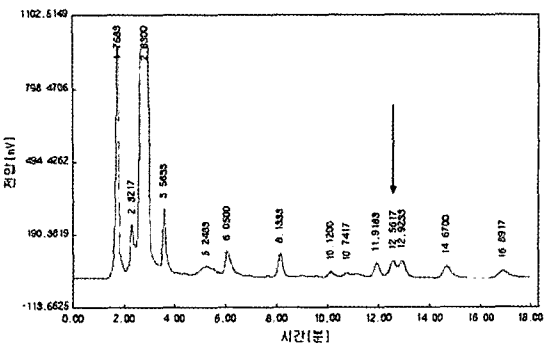


Figure 6. HPLC chromatogram of *Oldenlandia diffusa* suspension cell extracts spiked with ursolic acid.

Elicitation에 의한 oleanolic acid의 생산성 증진

Oleanolic acid의 생산을 증대시키기 위해 signal transducer와 abiotic elicitor를 배양 6일째 첨가하였고, 배양 10일째 수확하였다. Signal transducer로 methyl jasmonate (MJ), hydrogen peroxide (HP), salicylic acid (SA)를, abiotic elicitor로 $HgCl_2$, $CuCl_2$, vanadyl sulfate (VS)를 사용하였다.

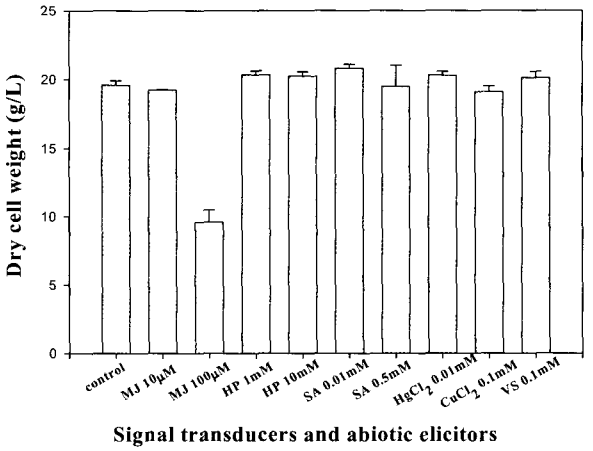


Figure 7. Effect of signal transducers and abiotic elicitors on cell growth after 10 days.

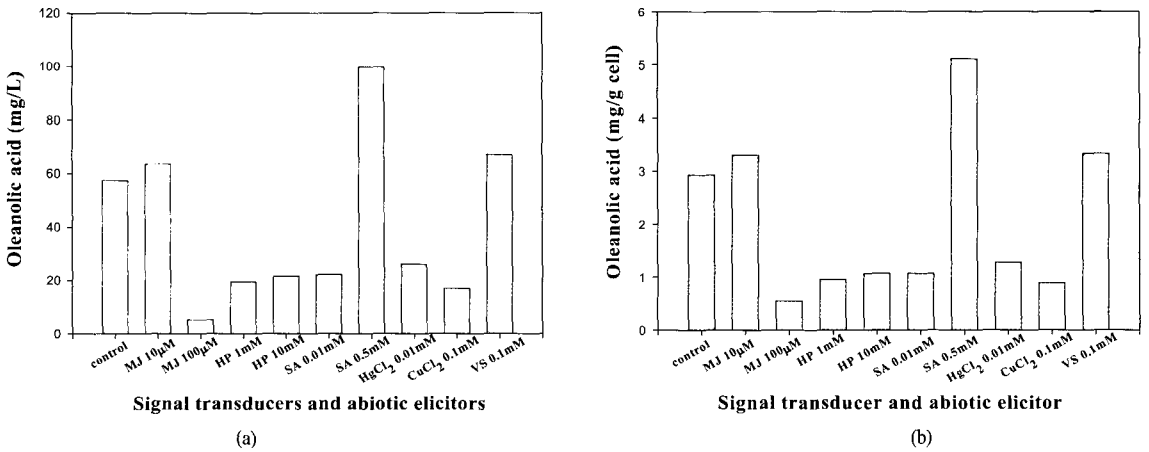


Figure 8. Oleanolic acid production (a) and specific yield (b) in 10-day-old suspension cultures of *Oldenlandia diffusa* after elicitation.

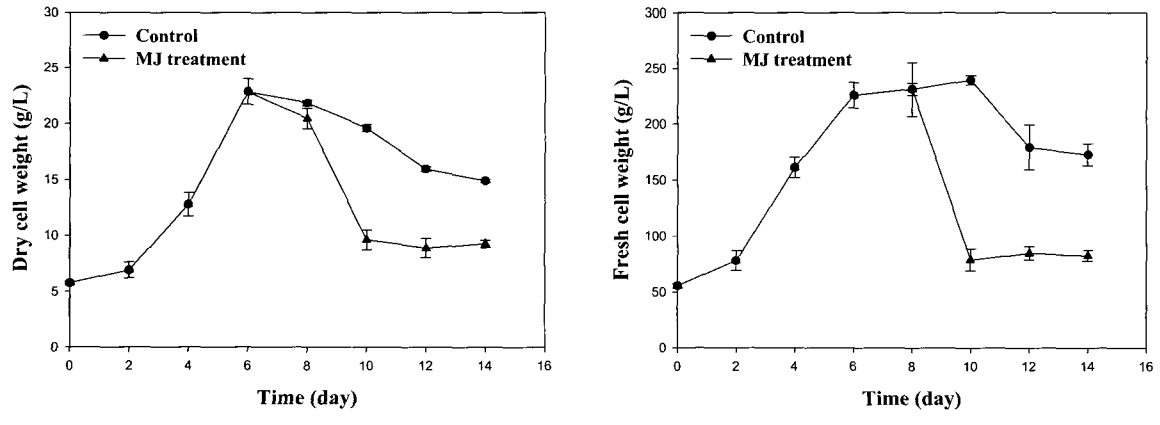
Table 3. Effect of 100 mM methyl jasmonate on *Oldenlandia diffusa* suspension cells at day 8

	Control	Methyl jasmonate treatment
Dry cell weight g/L	21.9	20.5
Specific yield mg(oleanolic acid)/g(dry cell weight)	1.98	4.59
Oleanolic acid mg/L	43.4	94.1
F/D ratio (fresh cell weight)/(dry cell weight)	10.6	11.3

Signal transducer와 abiotic elicitor를 처리한 경우, 세포생장은 MJ를 100 mM의 농도로 처리했을 때를 제외하고는 elicitor를 처리하지 않은 control과 별 차이가 없었다. 반면에 MJ를 100 mM의 농도로 처리했을 경우, 세포들이 대부분 사멸되었다(Fig. 7). 10 mM의 MJ를 처리했을 때 control과 세포생장이 차이가 거의 없는 것과 비교해보면, MJ의 농도에 따라 세포생장이 크게 달라진 것을 볼 수 있다. 10 mM의 MJ, 0.5 mM의 SA, 0.1 mM의 VS를 처리했을 경우, 각각 63.6, 99.6, 67.0 mg/L의 oleanolic acid가 생산되었고, 이것은 control (57.4 mg/L)에서 생산된 것보다 높았다. 특히, 0.5 mM의 SA를 처리한 경우는 control에 비해 1.74배로 증가하였다(Fig. 8a). 건조세포 1 g 당 포함된 oleanolic acid의 양도 0.5 mM의 SA를 처리했을 때가 5.1 mg으로 가장 높았다(Fig. 8b). 100 mM의 MJ 농도에서는 세포가 죽어서 oleanolic acid를 생산하지 못했지만, 10 mM의 MJ 농도에서는 control보다 많은 양의 oleanolic acid를 생산하였다. MJ 100 mM을 배양 6일째 첨가했을 때의 세포생장 변화를 보면, 첨가 후 2일이 지나면서부터 세포의 양이 크게 감소하기 시작하여 첨가 4일 후부터는 변화가 없었다. 따라서 MJ 100 mM 처리 후 4일이 지나면 세포가 모두 죽는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 9). MJ 100 mM을 첨가한 후 4일째에 수확한 세포로부터 나온 oleanolic acid의 양은 5.3 mg/L로 매우 적었다. 반면에 첨가 후 2일 째에 수확한 세포로부터 나온 양은 94.1 mg/L로 어떤 것도 처리하지 않은 control (43.4 mg/L)에 비해 2.17배로 증가되었다. 이 때의 세포건조중량은 20.5 g/L로 control (21.9 g/L)과 별 차이가 없었으나, 건조세포 1 g 당 포함되어있는 oleanolic acid의 양은 4.59 mg으로 control (1.98 mg)에 비해 2.32배로 증가하였다(Table 3). 위 결과를 종합해 볼 때 SA와 MJ의 처리가 oleanolic acid 생산에 크게 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 따라서 SA 및 MJ의 최적 처리 농도를 찾으면 더 높은 수율로 oleanolic acid를 얻을 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

중국의 약용 식물들은 중국에서 전통적으로 많은 질병을 예방하거나 치료하는데 쓰여 왔다. 백화사설초는 항암활성을 지닌 중국의 약용 식물 중의 하나이다. Triterpenoid 화합물인 oleanolic acid와 ursolic acid는 이성질체이며 백화사설초에 포함되어있다. 이들은 간 보호, 항염증, 항암, 항체형성 촉진 등의 효과가 알려져 있다. 유용물질을 생산할 목적으로 식물세포배양을 이용할 경우에는 배양조건을 제어함에 따라 유용물질을 포함한 세포를 효율적으로 얻을 수 있으며 수확도 쉽다. 따라서 백화사설초로부터 현탁세포를 유도하기 위해 기본적인 생장조절제인 2,4-D와 kinetin을 사용하였다. 무균 조건하에서 발아시킨 백화사설초의 잎을 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose가 첨가된 Schenk 및 Hildebrandt 배지에서 캘러스를 처음으로 유도하였다. 백화사설초의 현탁세포 유도와 oleanolic acid의 생산성을 위한 최적의 생장조절제 조건은 0.75 mg/L의 2,4-D와 0.1 mg/L의 kinetin이 첨가된 경우였다. Oleanolic acid가 소수성 물질이라는 것에 착안하여 역상 컬럼을 사용한 HPLC로 분석하였는데, Rexchrom S5-100-ODS column의 분리능이 가장 좋았다. Spectrophotometer와 photodiode array detector를 사용하여 oleanolic acid와 ursolic acid의 최적 UV 파장을 검색한 결과, 200 nm에서 최적의 UV 흡광도가 나타났다. 이동상은 acetonitrile과 water를 80 : 20으로, 유속은 1.0 mL/min로 결정하였다. Oleanolic acid의 생산을 증대시키기 위해 signal transducer와 abiotic elicitor를 배양 6일째 첨가하였고, 배양



(a) (b)

Figure 9. Time course changes of *Oldenlandia diffusa* suspension cell growth with 100 mM methyl jasmonate.

10일째 수확하였다. 10 mM의 methyl jasmonate, 0.5 mM의 salicylic acid, 0.1 mM의 vanadyl sulfate를 처리했을 경우, 각각 63.6, 99.6, 67.0 mg/L의 oleanolic acid가 생산되었고, 이것은 control에서 생산된 양 (57.4 mg/L)보다 높았다. 특히, 0.5 mM의 salicylic acid를 처리한 경우는 control에 비해 1.74배로 증가하였다. Methyl jasmonate 100 mM을 배양 6일째 첨가했을 때의 세포생장 변화를 보면, 첨가 후 2일이 지나면서부터 세포의 양이 크게 감소하기 시작하여 첨가 4일 후부터는 변화가 없었다. 따라서 methyl jasmonate를 처리 후 4일이 지나면 세포가 모두 죽는다는 것을 알 수 있었다. Methyl jasmonate 100 mM을 첨가한 후 4일째에 수확한 세포로부터 나온 oleanolic acid의 양은 5.3 mg/L로 매우 적었다. 반면에 첨가 후 2일째에 수확한 세포로부터 나온 양은 94.1 mg/L로 control (43.4 mg/L)에 비해 2.17배로 증가되었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sahai, O. P. and M. L. Shuler (1984), Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 111-120.
2. Chu, D. T., W. L. Wong, and G. M. Mavligit (1993), Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. I. Immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractionated *Astragalus membranaceus in vitro*, *Immunology* **25**, 119-123.
3. Koh, S. B., B. C. Han, H. J. Lee, J. H. Park, Y. M. Cho, B. E. Heo, H. Y. Ann, J. K. Kang, and Y. H. Seong (2000), General pharmacology of *Oldenlandia diffusa*, an herbal component of a newly developing antihepatitic agent composed of several medicinal plants, *J. Vet. Med. Biotechnol.* **1**, 84-94.
4. Liu, J. (1995), Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68.
5. Tang, H. Q., J. Hu, L. Yang, and R. X. Tan (2000), Terpenoids and flavonoids from *Artemisia species*, *Planta Med.* **66**, 391-393.
6. Jeong, T. S., E. I. Hwang, H. B. Lee, E. S. Lee, Y. K. Kim, B. S. Min, K. H. Bae, S. H. Bok, and S. U. Kim (1999), Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*, *Planta Med.* **65**, 261-263.
7. Kashiwada, Y., T. Nagao, A. Hashimoto, Y. Ikeshiro, H. Okabe, L. M. Cosentino, and K. H. Lee (2000), Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl ursolic acid derivatives, *J. Nat. Product* **63**, 1619-1622.
8. Alvarez, M. E., A. O. Maria, and J. R. Saad (2002), Diuretic activity of *Fabiana patagonica* in rats, *Phytotherapy Research* **16**, 71-73.
9. Yoshikawa, M. and H. Matsuda (2000), Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs, *Biofactors* **13**, 231-237.
10. Li, Y., H. Matsuda, and M. Yoshikawa (1999), Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice, *Bioorganic Medicinal Chem.* **7**, 1201-1205.
11. Jeong, H. G. (1999), Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury, *Toxicol. Lett.* **105**, 215-222.
12. Tanaka, E., M. Terada, and S. Misawa (2000), Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicologoical role, *J. Clinical Pharm. Therapeutic,* **25**, 165-175.
13. Es-saady, D., A. Simon, M. Ollier, J. C. Maurizis, A. J. Chulia, and C. Delage (1996), Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest, *Cancer Lett.*, **106**, 193-197.
14. Baricevic, D., S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, B. Simonovska, A. Krasna, and A. Zupancic (2001), Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* **75**, 125-132.
15. Saraswat, B. S., P. K. S. Visen, R. Dayla, D. P. Agarwal, and G. K. Patnaik (1996), Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats, *Indian J. Pharmacol.* **28**, 232-239.
16. Sohn, K. H., H. Y. Lee, H. Y. Chung, H. S. Young, S. Y. Yi, and K. W. Kim (1995), Anti-angiogenic activity of triterpene acids, *Cancer Lett.*, **94**, 213-218.
17. Stratmann, J. (2003), Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways, *Trends Plant Sci.* **11**, 526-533.
18. Chen, H. and F. Chen (1999), Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on cell growth and crytotanshinone formation in Ti transformed *Salivia miltiorrhiza* cell suspension cultures, *Biotechnol. Lett.* **21**, 803-807.