

은행(*Ginkgo biloba* L.)의 잎 유래 캘러스의 항산화능력 및  
플로보놀 배당체 검정김정숙, 박혜정, 박현용\*  
조선대학교 자연과학대학 생물학과Antioxidative Activity and Flavonol Glycosides Analysis in  
Callus Derived from Leaf Tissue of *Ginkgo biloba* L.

Jung-Suk Kim, Hye-Jeong Park and Hyeon-Yong Park\*

Department of Biology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**Abstract** - This study was carried out to establish an *in vitro* culture method of callus having a high antioxidant activity from *Ginkgo biloba* L. Leaf explants were cultured on Murashige and Skoog's medium supplemented with various growth regulators. The explants were incubated in the dark or 3,000 lux cool-white light. Methanol extracts from incubated callus were evaluated for scavenging activity of the free radicals using DPPH. The best callus growth rate was achieved in MS medium combined with 10  $\mu$ M NAA and 5  $\mu$ M kinetin in the light condition. Total antioxidant activity of cell aggregates in suspension culture [MS medium supplemented with 10  $\mu$ M NAA in the light] was up to 80% of ascorbic acid. By means of HPLC analysis, quantification of the quercetin dehydrate and keamperol profiles from suspension callus was compared. Contents of quercetin dehydrate and keamperol from leaf extracts were 0.07 and 2.24  $\mu$ g/20 $\mu$ l, and those from callus 0.56 and 0.18  $\mu$ g/20 $\mu$ l, respectively.

**Key words** - *Ginkgo biloba* L., Callus, Plant tissue culture, DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), Antioxidant activity

## 서 언

살아있는 화석이라 불리는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 약효를 가지는 주성분으로 flavonol glycosides, proanthocyanidins, organic acid, bilobalide, ginkgolide A, B, C, J 등이 보고되고 있다(Van Beek *et al.*, 1991; Hasler *et al.*, 1992; Petkov *et al.*, 1993; Jacobs and Browner, 2000). 특히, 은행 잎 추출액은 anoxia와 같은 자유라디칼 관련 질환과 뇌와 심장 허혈, 그리고 동맥경화와 암과 같은 질환치료에 이용되고 있다(Altiook *et al.*, 2006; Stefanovits-Banyai *et al.*, 2006). 이러한 약효성을 가지는 은행잎 추출물의 활성은 주로 항산화능을 가지는 플라보노이드 함량으로 결정된다. 은행잎의 유효성분 생산은 은행의 노지재배에 의존하고 있는데, 은행잎의 유효

효성분 함량은 은행나무의 생태습성, 모양, 색, 심지어 은행잎의 크기에 따라 다르다고 보고되었다(ElInain-Wojtaszek *et al.*, 2002). 뿐만 아니라, 지리적 기후 차에 따른 불안정한 생산성은 의약품으로 사용될 은행잎의 충분한 원료 확보에 지장을 초래한다.

이러한 가운데 식물세포와 조직을 기내에서 배양하여 유효성분을 계획적으로 균일하게 생산하기 위한 연구가 다양하게 시도되고 있다(Huh and Staba, 1993; Jeon *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2004; Oh and Koh, 2005; Yoon *et al.*, 2005). 은행나무의 기내배양에 관한 연구는 은행나무 정단부를 이용한 조직배양에서 소량의 ginkgolide 생합성이 보고되었으며(Huh and Staba, 1993; Jeon *et al.*, 1993), 기내배양에서 사용된 은행나무의 조직 부위에(Kim *et al.*, 1996; Laurain *et al.*, 1997) 배지(Park *et al.*, 2004), 성장조절제, 빛, 그리고 배양온도 등에 따라(Kim *et al.*, 1998) 세포 성장량과 유효성분의 함량이 다름이 보

\*교신저자(E-mail) : hypark@chosun.ac.kr

고된 바 있다. 그러나 이러한 은행나무의 기내배양에 관한 연구결과는 극히 제한적인 배양환경에서 이루어져 왔으며, 유효성분의 낮은 생산성으로 인해 실용화하기에는 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 은행나무의 잎 기내 배양을 다양한 환경조건에서 시도하여 우선적으로 생장률이 높은 배양조건을 확립하고자 하였다. 또한, 생장률이 높은 캘러스의 methanol 추출액에 대한 항산화능을 조사함으로써 생장량과 항산화능이 높은 배양조건을 구명함과 동시에 은행나무 잎과 캘러스에서 생합성되는 flavonol glycosides의 함량을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

식물재료는 조선대학교 교내 및 인근에 가로수로 생육중인 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)에서 은행잎이 돋아나기 시작하는 4월 말부터 8월까지 은행나무 높이 3 m 정도의 약 30년생 전후의 나무로부터 배양용 시료를 채취하여 사용하였다. 배양에 사용된 식물부위는 생장하는 가지의 정단부로부터 4~5마디 사이의 엽병을 제외한 잎의 길이가 3 cm 이상의 잎을 실험에 사용하였다.

### 캘러스의 유도

잎 조직을 70% 에탄올에 넣어 1분간 살균한 후, 2% 락스에서 6분간 살균한 다음 3차 멸균수로 3회 수세하였다. 엽병을 제거한 잎 조직을 5 × 5 mm 크기로 잘라 배지에 치상하여 캘러스를 유도하였다. 캘러스 유도배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% sucrose, 0.3% phytagel, 0.01% myo-inositol 및 생장조절제를 첨가하고 pH를 5.8로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압으로 증기 멸균하여 직경 55 mm 배양접시에 분주하여 사용하였다. 26°C 암조건과 3,000 lux cool-white 광 조건으로 배양하였으며 생장조절제로는 auxin계열인 alpha-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid(2,4-D)와 cytokinin 계열로 benzylaminopurine(BA), kinetin을 사용하였다. 0, 1, 10, 100 µM의 auxin계열 생장조절제와 0, 0.5, 5, 50 µM의 cytokinin계열의 생장조절제를 각각 조합 처리하였다. 살균된 은행나무 잎의 절편은 각 배양조건에 4개씩 치상하여 4회 반복 실행하였으며, 4주 후 캘러스 형성율을 접종시 절편 면적대비 확장 면적 부분을 %로 수치화하였다.

또한, 유도된 캘러스는 4주 간격으로 계대 배양하여 유지시켰다.

### 현탁배양 및 생장곡선

예비실험에서 조직배양으로 유도된 1.5 g의 캘러스를 phytagel이 첨가되지 않은 조직배양과 동일한 조건의 현탁용 배양액 20 ml을 100 ml의 크기의 삼각 플라스크에 담고 100 rpm, 3,000 lux 광조건, 1주 1회 계대 배양시 가장 양호한 생장을 나타내어 현탁배양의 기본배양조건으로 결정하였다(결과 미제시). 현탁배양의 생장곡선은 조직배양에서 가장 양호한 생장을 나타낸 생장조절제 조합인 10 µM NAA 단독처리구와 10 µM NAA와 0.5 µM BA 혼합 처리구, 10 µM NAA와 0.5 µM kinetin의 혼합 처리구에서 3개월 배양된 캘러스 0.2 g을 채취하여 10 ml의 배지가 담긴 50 ml의 삼각플라스크에 접종하여 3일 간격으로 생장량을 조사하며 30일간 연속 배양하여 작성하였다. 3일 간격으로 수거된 배양체는 3 mm whatman filter paper(No. 1)를 이용하여 배양액을 즉시 제거하고 25°C에서 24시간 건조시켜 건체중을 측정하였다.

### DPPH assay

배양환경에 따른 캘러스의 항산화능을 비교하고자 하였다. 조직배양과 현탁배양이 양호한 상기 기술된 세 가지 생장조절제 조합으로 4주간 배양된 캘러스와 20주간 배양된 현탁 배양체의 항산화능을 비교하였다. 이 가운데 가장 우수한 항산화능을 보이는 10 µM NAA 단독 처리구를 대상으로 암조건과 3,000 lux로 달리하여 배양한 후 은행잎과 함께 항산화능을 비교하였다. 시료의 준비는 배양된 캘러스를 배양 후 즉시 수거하여 멸균수로 수세하고 60°C dry oven에서 24시간 건조시켰다. 은행잎 및 은행잎 유래 캘러스를 곱게 갈아 0.5 mm 체에 걸렀다. 걸러진 캘러스 분말을 각각 0.01 g 취하여 methanol 10 ml과 섞어 상온에서 24시간 추출하였다. 추출액을 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2 µM membrane filter로 여과하였다. 여과액을 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1 ml 취하여 총량이 1 ml이 되도록 methanol로 희석하였다. 준비된 농도별 추출물은 측정 전까지 냉장보관 하였다. 대조군으로 사용될 ascorbic acid 0.01 g을 취하여 3차 증류수 10 ml에 용해시켰다. 이를 캘러스 추출액과 동일한 양을 취하여 3차 증류수에 희석하여

11가지 농도로 제조하여 측정 전까지 냉장보관 하였다. 항산화능의 비교는 DPPH assay를 이용하였다. DPPH 10 mg에 methanol 60 ml를 첨가하여 DPPH용액을 제조하였다. DPPH 용액은 시료측정 24시간 전에 준비하여 냉장보관 하였으며, 측정 전 methanol로 희석하여 OD를 0.9~0.95 사이의 값으로 맞추어 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 DPPH(CNB300267)는 CALBIOCHEM에서 구입하였으며, 대조구로 사용된 ascorbic acid(A5960)는 Sigma사 제품을 사용하였다. 1 ml cuvette에 0.9~0.95 범위의 OD값을 갖는 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액을 0.8 ml 주입 후, 준비된 농도별 추출액(0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75 ml/ml MeOH)을 각각 0.2 ml 첨가하였다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer (Mecasys, Optizen 2120UV)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 각 시료당 3회 반복하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 식을 이용하여 구하였다.

$$(1 - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

### Flavonol glycosides 함량

Flavonol glycosides는 HPLC(Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector, Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters<sup>TM</sup>717 plus Autosampler)를 이용하여, UV 365 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전개용매로는 methanol과 1% 인산용액을 사용하였는데 초기의 methanol 부피 비율은 30%였으며, 30분 후 70%가 되도록 증가시켰다. Column은 C-18(CAPCELL PAK C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm)을 사용하였으며, 표준물질은 quercetin dehydrate(98%, Q0125, Sigma Chemical, USA) 및 kaempferol(90%, K0133, Sigma Chemical, USA)을 사용하였다. 이동상 및 시료는 측정 전 0.2  $\mu$ m membrane filter를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 시료의 추출은 Lee *et al.*(1993)의 방법을 응용하여 실행하였다. 즉, 60°C dry oven에서 24 시간 건조시킨 은행잎과 은행잎 유래 캘러스를 곱게 갈아 0.5 mm 체에 걸렀다. 걸러진 분말을 0.3 g 취하여 3차 증류수 4 ml에 넣고, 65°C에서 90분 동안 균질화 시켰다. 여기에 4 ml의 methanol을 첨가하여 5분 동안 섞어준 후, 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 여기에 2 ml의 methanol과 35% HCl 0.5 ml을 첨가하여 90분 동안 sonicate하며 가수분해시킨 다음,

0.2  $\mu$ m의 membrane filter를 이용하여 여과한 시료를 HPLC 분석에 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스의 유도

암과 광조건 하에서 생장조절제(NAA, 2,4-D, BA, kinetin)에 따른 캘러스 형성율을 조사한 결과는 Table 1, 2에서와 같다. 암과 광조건 모두에서 생장조절제를 처리하지 않은 실험구와 BA 또는 kinetin 단독 처리구에서 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았으며, 계대배양과 무관하게 배양 8주 이내에 모두 괴사하였다. 상기 조건을 제외한 NAA와 2,4-D 단독처리구와 BA와 kinetin의 조합처리 배양시 생장조절제 조합과 광조건에 따른 배양효율의 영향은 다음과 같다. 즉, 암조건에서 1~100  $\mu$ M NAA 단독처리시 또는 1~100  $\mu$ M 2,4-D 단독처리시 캘러스 형성율은 평균 50%와 35%였으며, 광조건 하에서는 각각 50%와 35%로 암과 광조건 모두에서 NAA가 2,4-D 처리 조건보다 우수한 캘러스 성장을 나타냈다. 또한, NAA와 2,4-D 단독이 아닌 1~100  $\mu$ M의 NAA 또는 2,4-D를 단독이 아닌 0.5~50  $\mu$ M BA와 혼합처리한 경우에는 암조건에서 평균 39%와 43%를, 광조건에서 58%와 34%의 캘러스 성장률을 나타냈으며, 1~100  $\mu$ M의 NAA 또는 2,4-D를 단독이 아닌 0.5~50  $\mu$ M kinetin과의 혼합처리한 경우에는 암조건에서 평균 58%와 39%를, 광조건에서 62%와 30%의 성장률을 나타내었다. 이러한 결과는, Jeon *et al.*(1993)이 4종류의 auxin(IAA; Indoleacetic acid, IBA; 3-indolebutyric acid, 2,4-D, NAA)을 0.1~4 mg/L 첨가하여 은행잎으로부터 캘러스를 유도한 결과 NAA 처리시 캘러스 유도율이 가장 높게 나타나 NAA가 가장 효과적이며, NAA를 단독으로 처리하는 것보다 kinetin을 함께 처리하는 것이 캘러스 유도에 더 효과적이었다는 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 또한, Lee *et al.*(1993)은 0.1~10 ppm 범위에서 NAA의 농도에 따른 캘러스 성장을 조사하여 NAA의 농도가 증가할수록 성장이 촉진되는 것으로 보고한 바 있다. 본 실험에서 캘러스 유도에 가장 효과적인 NAA 농도는 Lee *et al.*(1993)의 결과와 같이 10  $\mu$ M로 나타났으나, 고농도(100  $\mu$ M)로 처리하였을 경우 캘러스 유도가 오히려 저하되어 캘러스 유도에 효과적이지 못하였다. 그러나 암조건인 경우 1, 10, 100  $\mu$ M NAA와 0.5  $\mu$ M BA 조합처리구를 제외한 다른 조건에서는 평균 캘러스 유

Table 1. Rate of callus formation from Ginkgo leaf disks in the light condition

Plant Growth Regulators		Percentage of Callus Formation	Plant Growth Regulators		Percentage of Callus Formation	
NAA( $\mu$ M)	BA( $\mu$ M)		2,4-D( $\mu$ M)	BA( $\mu$ M)		
0	0	0	0	0	0	
		0			0.5	0
		0			5	0
		0			50	0
1	0	40	1	0	30	
		40			0.5	30
		50			5	20
		20			50	10
10	0	80	10	0	80	
		70			0.5	70
		60			5	70
		30			50	70
100	0	30	100	0	10	
		40			0.5	30
		10			5	40
		10			50	50
NAA( $\mu$ M)	Kinetin( $\mu$ M)		2,4-D( $\mu$ M)	Kinetin( $\mu$ M)		
0	0	0	0	0	0	
		0			0.5	0
		0			5	0
		0			50	0
1	0	50	1	0	20	
		60			0.5	20
		50			5	20
		30			50	0
10	0	70	10	0	90	
		70			0.5	70
		80			5	80
		50			50	40
100	0	50	100	0	10	
		50			0.5	40
		60			5	60
		40			50	30

<sup>z</sup>Callus were grown on MS medium supplemented with various growth regulators after 4 weeks of culture in the light.

<sup>y</sup>Each value represents the average of 4 determinations.

<sup>x</sup>Index of callus formation rate(%) was estimated from the proportion of callus to leaf explant area.

도율이 낮게 조사되었지만 전반적으로 광조건과 유사한 양상을 나타냈다. 결과적으로 암조건의 경우 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M BA에서 캘러스 형성율이 80%로 가장 높게 나타났으며, 광조건에서는 10  $\mu$ M NAA와 5  $\mu$ M BA, 0.5  $\mu$ M kinetin을 조합 처리시 캘러스 유도율이 90%로 가장 높게 나타났다.

은행잎으로부터 유도된 캘러스는 암조건에서 황색계열의, 광조건에서 녹색계열의 캘러스가 형성되었으며 광의 유무와 성장조절제의 종류와 무관하게 부스러지기 쉬운 형태의 캘러스를 형성하였다(Fig. 1. A~H). 2,4-D와 NAA의 농도가 증가할수록 표면 수분함량이 증가했으며, BA와 kinetin을 첨가 농도가 높아질수록 촉촉함이 감소하면서 표

Table 2. Rate of callus formation from Ginkgo leaf disks in the dark condition

Plant Growth Regulators		Percentage of Callus Formation	Plant Growth Regulators		Percentage of Callus Formation	
NAA( $\mu$ M)	BA( $\mu$ M)		2,4-D( $\mu$ M)	BA( $\mu$ M)		
0	0	0	0	0	0	
		0			0.5	0
		5			5	0
		50			50	0
1	0	30	1	0	20	
		60			0.5	10
		60			5	40
		50			50	10
10	0	70	10	0	70	
		70			0.5	80
		70			5	70
		60			50	50
100	0	20	100	0	20	
		50			0.5	10
		50			5	20
		60			50	20
NAA( $\mu$ M)	Kinetin( $\mu$ M)		2,4-D( $\mu$ M)	Kinetin( $\mu$ M)		
0	0	0	0	0	0	
		0			0.5	0
		5			5	0
		50			50	0
1	0	30	1	0	30	
		50			0.5	10
		50			5	10
		50			50	10
10	0	70	10	0	10	
		80			0.5	40
		80			5	50
		70			50	50
100	0	40	100	0	20	
		50			0.5	40
		30			5	40
		40			50	20

<sup>z</sup>Callus were grown on MS medium supplemented with various growth regulators after 4 weeks of culture in the light.

<sup>y</sup>Each value represents the average of 4 determinations.

<sup>x</sup>Index of callus formation rate(%) was estimated from the proportion of callus to leaf explant area.

면이 부스러지기 쉬운 형태로 바뀌었다. Park *et al.*(2004)의 은행나무 잎의 엽병에서 유도된 캘러스가 흰색, 노란색, 갈색의 다양한 색의 캘러스가 형성었으나 형태는 모두 부스러지기 쉬운 캘러스가 형성되었다는 결과와 유사한 결과로, 유도된 캘러스는 그 기원에 상관없이 수분을 많이 함유한다는 보고와도 일치하였다(Carrier *et al.*, 1990; Laurain

*et al.*, 1997). Huh and Staba(1993)는 녹색계열의 캘러스로부터 계대배양을 지속함에 따라 반투명한 캘러스가 형성된다고 보고한 바 있는데, 본 실험에서도 절편체 치상 후 5~6주 경과하여 녹색의 캘러스에서 반투명 캘러스가 형성되었다(Fig. 1F). 그러나 광조건에서 캘러스의 반투명화 현상은 은행잎 유래 캘러스를 배양하는 동안 캘러스 유도 초

기에 발생하는 현상으로 지속적으로 유지되지는 않았다. 반면 100  $\mu\text{M}$  NAA와 0.5  $\mu\text{M}$  kinetin 혼합처리의 경우 흰색에 가까운 묽은 캘러스가 형성되고(Fig. 1D) 이 캘러스는 3~4회 계대배양 후 다량 증식과 유지가 가능하였다. 광조건 하에서는 10  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  kinetin 조합 처리시 Fig. 1의 E에서 보는 것과 같이 녹색의 캘러스가 형성되며 수분 함유량이 높아 부수어지기 쉬운 형태를 나타냈다. 암 조건에서는 노란색을 띄는 흰색의 캘러스가, 광조건에서는 암 조건에서보다 조금 빠른 배양 3주경과 시점에서 녹색의 캘러스가 형성하기 시작하여 Kim *et al.*(1996)이 광조건에서 캘러스 증식이 암조건보다 1.5배 빠르다고 보고한 결과와 동일하게 나타났다. 유도된 캘러스는 광조건의 경우 6주, 암조건의 경우 8주가 경과하면 캘러스가 갈변하기 시작하여 계대배양이 요구되었다. 암조건의 1~100  $\mu\text{M}$  NAA 단독 처리구에서 유도된 캘러스는 계대배양이 지속되면서 갈변양이 늘어나 3~4회 계대배양 후 괴사하였고 광조건에서도 갈변 후 괴사하는 양상이 나타나 NAA 단독처리 조건에서는 캘러스 배양 및 증식이 불가능하였다. Carrier *et al.*(1990)이 보고한 내용과 같이 캘러스의 갈변화는 계대배양 횟수가 늘어감에 따라 증가하였다. 광조건의 경우 계대배양 3~4회째부터 계대배양 후 3주가 경과하면 갈변이 시작되어 암조건에 비교하여 빠르게 나타났다. 따라서 광조건의 경우 3~4주, 암조건의 경우 5주가 경과하면 계대배양이 요구되었다. Lee *et al.*(1993)은 Ginkgo biloba 세포배양에서 광조건의 경우 암조건에 비해 당의 소모가 빠름을 보고한 바 있다. 이와 같은 결과는 세포의 증식이 광조건에서 더 빠르게 이루어지는 결과와 관련성이 있는 것으로 보이며, 또한, 세포의 갈변이 광조건에서 더 빠르게 진행되는 이유도 당을 비롯한 양분의 소비가 암조건에 비교하여 빠르기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다. 광조건에서 갈변은 캘러스 상부에서 발생되었으며, 암조건에서 갈변은 캘러스 상부에 형성되거나 캘러스 색이 전체적으로 연한 갈색으로 변하면서 진행되었다.

Park *et al.*(2004)은 2,4-D, NAA를 처리한 MS배지에서 은행잎 엽병으로부터 캘러스를 유도한 결과 유도된 캘러스의 지속적인 유지를 위해서는 캘러스가 갈색으로 형성되는 2,4-D보다 노랑색이나 흰색을 띄며 형성되는 NAA가 캘러스 유도 및 유지에 효과적임을 보고 하였다. 본 실험에서도 2,4-D가 첨가된 기본 MS배지에서 유도된 은행 잎 유래 캘러스 또한 갈색의 캘러스 형성량이 많아지면서 2~3

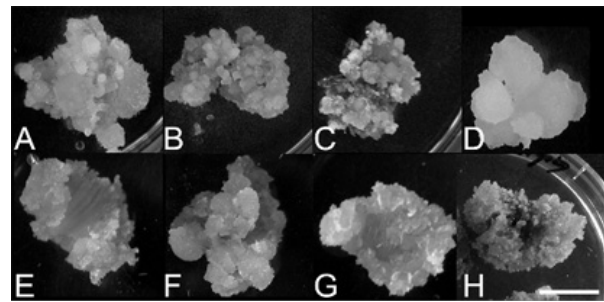


Fig. 1. Various morphology of callus derived from Ginkgo leaf cultured in the dark (A~D) and in the light (E~H). (Bar = 0.5 cm).

A~H: friable callus formation; B, C: small ball shaped callus induced from 10  $\mu\text{M}$  NAA in the dark; D: white and friable callus induced from 100  $\mu\text{M}$  NAA in the dark; E: friable callus induced from 10  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  kinetin in the light; F: translucent callus induced from 10  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  kinetin in the light; G and H: Browning of callus after 3~4 times subcultures.

회 계대배양시 완전 괴사하여 지속적인 유지에는 유용하지 못하였다. 고농도의 cytokinin 처리 역시 지속적인 캘러스 유지에는 부적합하였다. 광조건의 경우 10, 100  $\mu\text{M}$  NAA, 10  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  BA, 100  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  BA, 10  $\mu\text{M}$  NAA/5  $\mu\text{M}$  BA, 10  $\mu\text{M}$  NAA/5  $\mu\text{M}$  kinetin 조합처리구에서 은행잎 유래 캘러스가 지속적으로 유지되었다. 암조건의 경우 10  $\mu\text{M}$  NAA 단독처리, 10~100  $\mu\text{M}$  NAA/0.5  $\mu\text{M}$  BA, kinetin 조합처리, 100  $\mu\text{M}$  NAA/5  $\mu\text{M}$  BA, 10  $\mu\text{M}$  NAA/5  $\mu\text{M}$  kinetin 처리구에서 지속적으로 캘러스가 유지되었다.

### 현탁배양 및 성장곡선

고체배지에서 캘러스 유도 후 지속적인 유지가 가능한 생장조절제 조건으로 현탁 배양하였다. 10~100  $\mu\text{M}$  NAA와 0~5  $\mu\text{M}$  BA, kinetin이 조합 처리된 조직배양 중인 녹색계열의 캘러스를 phytigel이 제거된 동일 조성의 액체 배지로 계대배양한 후 1주가 경과하면 녹색의 캘러스가 갈색 및 연두색으로 변하였다. Huh and Staba(1993)는 은행나무의 줄기 정단부에서 유래된 캘러스로 현탁 배양한 결과 밝은 녹색의 캘러스가 1주 후 노란빛을 띄는 갈색으로 변하며, 현탁 배양이 지속됨에 따라 세포집합체 크기가 커진다고 보고 하였다. 캘러스의 이러한 초기 갈변현상은 현탁 배양 체제로의 변화에 있어서 교반기의 회전이 캘러스에 스트레스로 작용하여 나타난 현상으로 사료된다. 액체배

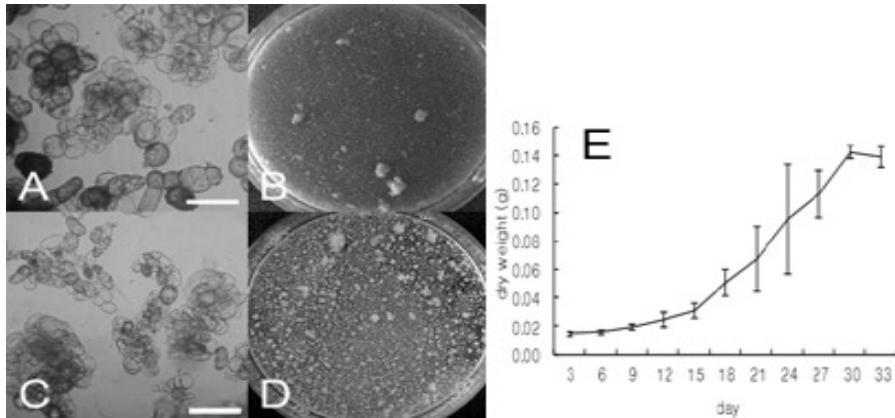


Fig. 2. Microscopic view in suspension cultures in the light and dark. Callus was cultured in MS medium supplement with 10 μM NAA.(A, B); Cell aggregates in the dark(C, D); Cell aggregates in the 3,000 lux. A and C are expanded to 100 times of B and D.(E) Growth curves of callus induced from Ginkgo leaf disks in MS medium supplemented with 10 μM NAA(A).

양으로 전환 후 캘러스의 변화양상은 NAA의 농도에 따라 다르게 나타났다. 10 μM NAA 처리시 2~3주가 경과하면 증식이 활발히 이루어지면서 갈색 및 연두색으로 변화했던 캘러스가 녹색으로 변하기 시작하였다. 캘러스 크기는 직경 1 mm 이하의 작은 입자형(Fig. 2A)과 2~4 mm의 밀집된 캘러스로 변화되었고(Fig. 2B) 최대 직경 5 mm까지 관찰되었다. 10 μM NAA에 0.5 μM BA 또는 kinetin을 조합 처리한 경우 10 μM NAA 단독처리구에 비해 캘러스가 진한녹색을 띄며, 크기가 큰 밀집형 캘러스를 형성하였다. 3~4회 계대배양 후 1 mm 이하의 작은 입자형 캘러스가 증식되어 4~5회 계대배양 후 10 μM NAA 단독처리구와 유사한 상태로 유지되었다. 100 μM NAA 처리시 1주경과 후 캘러스의 상태는 10 μM NAA 처리구와 유사하였으나 2주 경과 후 녹색 캘러스가 증가하는 10 μM NAA 단독처리구 또는 10 μM NAA에 0.5 μM BA 또는 kinetin 조합처리구와 달리 캘러스 색이 갈색으로 지속되었으며, 증식되지 않았다. 이후 3~4주 경과하여 캘러스가 괴사하여 100 μM NAA 이상 첨가시 배양이 불가능함을 확인하였다. 10 μM NAA에 5 μM의 BA 또는 kinetin을 조합 처리하였을 경우 0.5 μM BA 또는 kinetin 처리구에 비해 갈색 및 연두색으로 변한 캘러스가 다시 녹색으로 변화되는 기간이 2주로 더 오랜 배양기간에 이루어졌다. 또한 캘러스가 녹색으로 변해가는 과정에서 배양액이 흰색으로 탁해지는 특징을 보였으며, 이와 동시에 캘러스 표면이 거칠어지면서 연두색으로 변화하였다. 결국 캘러스 증식은 이루어지지 않고 5~6주 후 괴사하였다. 은행잎 유래 캘러스를 이용한 현탁배양시 고체배양

에서 유지가 가능하였던 100 μM NAA 단독처리구 및 10, 100 μM NAA와 5 μM BA 또는 kinetin의 조합 처리구에서 캘러스가 유지되지 못하고 괴사하였다. 고체배양에 비해 현탁 배양의 경우 캘러스와 배지의 접촉면이 넓어 세포의 대사활성이 빨라진다. 따라서 고농도의 성장조절제가 곧바로 흡수되어 캘러스에 독성으로 작용하여 괴사하는 것으로 사료된다. 결과적으로, 10 μM NAA, 10 μM NAA/0.5 μM BA, 10 μM NAA/0.5 μM kinetin 3가지 성장조절제 조성에서 은행잎 유래 캘러스의 현탁 배양이 가능하였으며, 20회 이상 계대배양 후에도 증식이 활발하였다. NAA에 BA 또는 kinetin이 조합 처리된 경우 20회 이상 계대배양 후 직경 1 mm 이하의 미세한 캘러스가 직경 2~4 mm의 밀집형 캘러스에 비해 2배 이상 빠르게 증가하였다. 1 mm 이하의 캘러스만 분리하여도 증식이 계속되어 cell line 유지가 가능하였으며(Fig. 2), 현미경으로 관찰한 결과 한 개의 미세한 캘러스는 7~20개의 세포가 세포괴를 형성하고 있는 것으로 나타났다. 35회 계대배양 후 캘러스가 전체적으로 미세한 입자형 캘러스로 전환되었으며 2주 후 2배로 증식하였다. 10 μM NAA 단독처리시 30회 이상 캘러스 유지 및 증식이 가능하였고 증식율도 2~3주에 2배로 나타나 BA, kinetin 조합처리구와 유사하였다. 그러나 BA, kinetin 조합처리구에서 나타난 미세 캘러스의 증식은 저조하였으며, 30회 이상 계대배양시 배양액이 흰색으로 탁해지기 시작하였다. 배양이 지속되면서 캘러스가 거칠어지고 결국 갈변하여 유지되지 못하였다. 10 μM NAA, 10 μM NAA/0.5 μM BA 처리구의 경우 배양기간 중 캘러스 사이즈가 다시 증가하

기도 하였으나, 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M kinetin 조합처리구의 경우 40회 이상 계대배양 후에도 미세한 입자형 캘러스의 상태가 지속적으로 유지되었다. 이는 세포수를 증가시키는 cytokinin의 영향으로 사료되며, BA에 비해 kinetin이 강력하게 작용하는 것으로 사료된다. 결과적으로 은행잎 유래 캘러스의 현탁배양에서 캘러스의 지속적인 유지를 위한 효과적인 성장조절제 농도는 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M BA, 혹은 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M kinetin으로 나타났다.

**DPPH assay**

캘러스 조직으로부터 항산화능을 측정하기 위하여 광조건에서 10  $\mu$ M NAA, 10  $\mu$ M NAA에 0.5  $\mu$ M BA 또는 kinetin이 조합처리된 기본 MS 배지에서 현탁배양한 캘러스를 이용하여, 각각 0.15, 0.2, 0.25 ml/ml 농도에서 라디칼 소거능을 측정한 결과 80% 이상의 라디칼 소거능을 나타냈다. 그러나, 은행잎의 경우 0.5 ml/ml 농도에서도 라디칼 소거능이 12%로 낮게 나타나 DPPH assay에 의한 항산화능 측정결과 모본식물체의 항산화능보다 기내배양으로 유도한 캘러스가 현저히 높은 항산화능을 나타냈다. 특히, 10  $\mu$ M NAA가 단독 처리된 배지에서 자란 캘러스의 경우 추출액을 0.026 ml/ml 처리시 ascorbic acid 0.01 ml/ml과 같은 효과를 보여 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 같은 농도의 ascorbic acid가 갖는 항산화능의 약 50%에 해당한다. 또한, 육안으로 확인되는 캘러스의 형태 및 색상이 동일하게 나타나도 항산화능은 조합 처리된 cytokinin의 종류에 따라 다르게 나타났다. 10  $\mu$ M NAA에 0.5  $\mu$ M의 kinetin 조합처리 구에서 자란 캘러스 추출물 0.046 ml/ml을 처리하였을 때 ascorbic acid 0.01 ml/ml과 같은 효과를 나타내어 ascorbic acid의 약 25%에 해당하는 항산화능을 보였다. BA 조합 처리구에서 자란 캘러스의 경우 0.102 ml/ml을 처리하였을 때 같은 효과를 나타내어 ascorbic acid가 갖는 항산화능의 약 10%에 해당하는 항산화력을 보였다. 따라서 항산화능 관련물질 생산에 BA 보다 kinetin을 처리하였을 때 2배 이상 효과적이었다(Fig. 3). 10  $\mu$ M NAA 단독 처리시에도 캘러스의 배양방식에 따라 항산화능은 다르게 나타났다. 현탁 배양의 경우 0.15 ml/ml, 고체 배양의 경우 0.5 ml/ml을 처리하였을 때 라디칼 소거능이 80%를 넘어 캘러스를 현탁배양 하였을 때 고체배양에 비하여 약 4배 높은 항산화력을 보였다. 식물체에서 항산화 작용을 하는 식물성 화학물질로서 flavonoids는 자외선 또

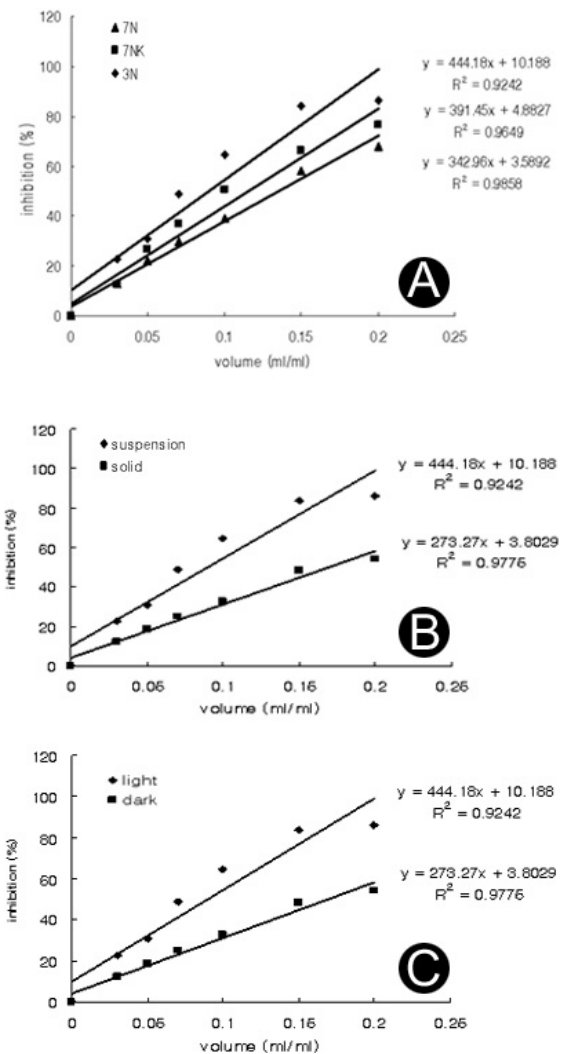


Fig. 3. Inhibition rate of hydrogen donor activity measured by DPPH method. Callus was grown in MS medium supplemented with three growth regulators combinations.(a) 7N;10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M BA, 7NK;10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M kinetin, 3N;10  $\mu$ M NAA(b) antioxidant effect according to the suspension and solid medium culture of 3N(c) antioxidant effect according to the light condition of 3N.

는 온도, 가뭄과 같은 환경적 스트레스에 대한 방어기작으로 작용한다(ElInain-Wojtaszek *et al.*, 2003). 캘러스 현탁배양의 경우 교반기에 의한 회전 또한 환경적 스트레스의 하나로 작용하여 고체배지에서 배양한 캘러스에 비해 현탁배양한 캘러스 추출물에서 항산화력이 높게 나온 것으로 사료된다. 일반적으로 flavonoids는 빛에 의해 생성이 촉진된다고 보고되고 있으며(Kim *et al.*, 1998), Lee *et al.*(1993)은 Ginkgo biloba 세포배양에서 flavonol glycosides 생합성



량을 조사한 결과 암조건에 비해 광조건이 최대 10배 높게 나타남을 보고하였다. 본 실험에서도 성장조절제의 농도가 동일하게 나타나도 빛 조건에 따라 항산화능이 다르게 나타났다(Fig. 3). 광조건인 경우 0.15 ml/ml, 암조건인 경우 0.5 ml/ml을 처리하였을 때 라디칼 소거능이 80%를 넘어 광조건이 암조건에 비해 약 4배 높게 나타났다. 또한, 암조건에서 현탁배양한 경우 광조건에서 현탁배양한 켈러스 추출물의 항산화능 보다 낮은 것으로 보아 켈러스 배양조건 중 빛 조건이 배양 방식 및 성장조절제 농도에 비해 1차적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 결과적으로 은행잎 유래 켈러스 추출물의 항산화력은 광조건에서 10  $\mu$ M NAA가 처리된 기본 MS배지에 켈러스를 현탁배양 하였을 때 가장 높게 나타났다.

### Flavonol glycosides 함량

Quercetin dehydrate 및 kemperol을 표준물질로 사용하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 각각 28.997, 30.386 분에 pick가 나타나 두 물질의 분리가 가능함을 확인하였다. 즉, 시료 20  $\mu$ l를 주입하여 HPLC spectrum을 분석한 결과, 은행 잎의 경우 quercetin dehydrate가 0.072  $\mu$ g/20  $\mu$ l 검출되어 시료의 0.013%를 차지하였으며, keamperol은 2.24  $\mu$ g/20  $\mu$ l 검출되어 시료의 0.39%를 차지하였다(Fig. 4). 은행 잎 유래 켈러스의 경우 quercetin dehydrate, keamperol 이 각각 0.556, 0.157  $\mu$ g/20  $\mu$ l 검출되어 시료의 0.97, 0.027%

를 차지하였다(Fig. 5). Lee *et al.*(1993)은 quercetin에 비해 keamperol의 생성에 빛의 영향이 크다고 보고하였으며, 광 조건에서 현탁배양한 결과 약 0.06 mg/L의 keamperol을 검출하였다고 한다. Kim *et al.*(1998)은 은행잎 유래 callus를 이용한 현탁 배양에서 0.015 mg/L의 keamperol이 검출됨을 보고하였다. 또한, 빛, 온도, UV 등이 flavonol glycoside 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 keamperol 생성량이 약 0.05 mg/L로 향상됨을 보고한 바 있다. 그러나 본 실험에서 검출된 keamperol은 0.785 mg/L로 Lee와 Kim이 건조하지 않은 켈러스 2 g을 추출시료로 사용한 것을 감안할 때 약 7배 높은 함량을 나타냈다. 은행잎 추출물의 경우 표적물질 외 다른 불순물이 많이 포함되어 있으나(Fig. 4), 은행잎 유래 켈러스의 경우는 다른 불순물이 비교적 적게 함유되어 있어(Fig. 5) 표적물질의 순수 분리가 용이할 것으로 사료된다. 은행잎 추출물의 경우 quercetin dehydrate에 비해 keamperol 함량이 31배 높게 나타났다. 이에 비해 은행잎 유래 켈러스의 경우 quercetin dehydrate가 keamperol에 비해 3.5배 정도 높게 나타나 두 표준물질의 함량비가 은행 잎 추출물과 다른 양상을 보였다. 이와 같이 은행잎과 은행잎 유래 켈러스에서 나타나는 유효성분의 함량 차이는 Kim *et al.*(1996)이 보고한 바와 같이 분화되어 있는 원식물체에서 flavonoid의 생합성과 합성된 flavonoid의 이동 및 축적의 부위가 달라 탈분화된 켈러스

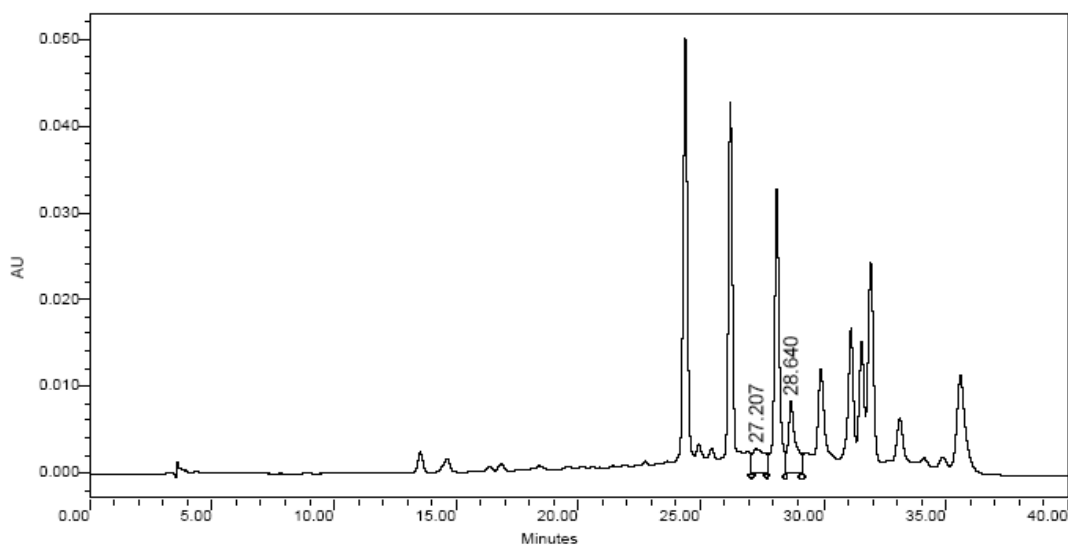


Fig. 4. HPLC chromatogram of quercetin dehydrate and keamperol in the extract of Ginkgo leaves. Column: C-18 (5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm); injection volume: 20  $\mu$ l; injection concentration: 29 mg/ml; flow rate: 1 ml/min; peak identification: quercetin, RT = 27.2; keamperol, RT = 28.6.

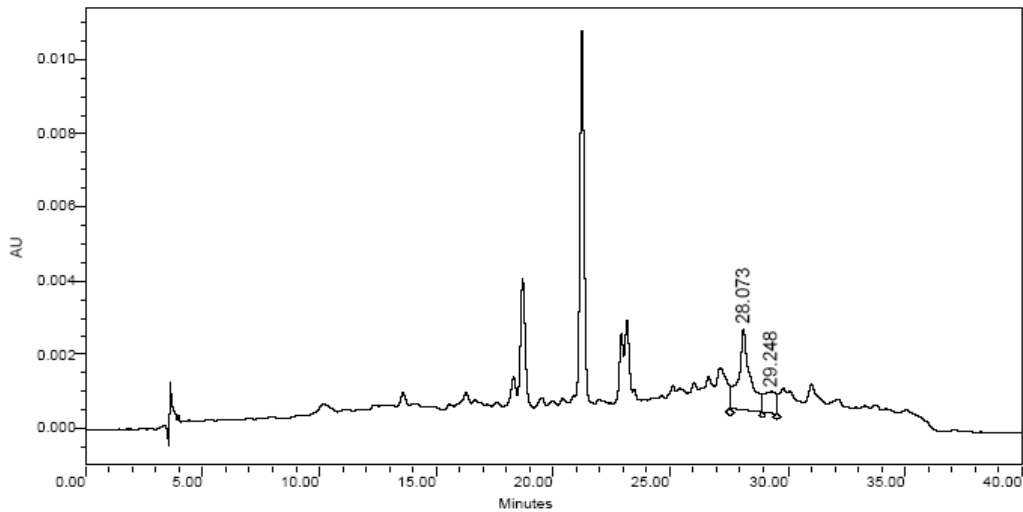


Fig. 5. HPLC chromatogram of quercetin dehydrate and keamperol in callus extract. Callus induced from *Ginkgo* leaf disks in MS medium supplemented with 10  $\mu$ M NAA on light in suspension culture. Coloum: C-18 (5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm); injection volume: 20  $\mu$ l; injection concentration: 29 mg/ml; flow late: 1 ml/min; peak identification: quercetin, RT = 28.1; keamperol, RT = 29.2.

에서는 flavonoid의 생합성, 이동 및 축적 등의 활성기작이 다르기 때문인 것으로 추측된다.

### 적 요

본 연구에서는 조직배양을 통해 은행나무 잎으로부터 캘러스를 유도하였고, 최대 성장량과 항산화능이 우수한 배양조건을 확립하였다. 즉, 은행잎을 이용하여 조직배양한 결과 암과 광조건에서 모두 NAA 첨가 조건이 2,4-D 첨가 조건에 비교하여 양호한 캘러스 성장을 나타냈다. 가장 우수한 캘러스 성장을 나타낸 배양조건은 광조건의 10  $\mu$ M NAA와 5  $\mu$ M kinetin의 조합 처리시였다. 따라서 현탁배양에서 캘러스의 지속적인 유지를 위한 효과적인 성장조절제는 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M BA, 10  $\mu$ M NAA/0.5  $\mu$ M kinetin으로 나타났다. 또한 은행잎 유래 캘러스 추출물의 항산화능은 광조건에서 10  $\mu$ M NAA가 처리된 기본 MS배지에 캘러스를 현탁 배양하였을 때 가장 높게 나타났다. HPLC를 통한 flavonol glycosides를 분석한 결과 10  $\mu$ M NAA가 처리된 조건에서 현탁 배양된 녹색 캘러스에서 quercetin dehydrate와 keamperol이 각각 0.556, 0.157  $\mu$ g/20  $\mu$ l 검출되었다. 잎 추출물에 비해 표적물질을 제외한 불순물이 적어 표적물질의 순수생산이 가능할 것으로 기대되며, 특히 keamperol의 경우 기존의 연구보고에 비해 약 7배 높은 함량이 검출되었다.

### 사 사

이 논문은 2010년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었습니다.

### 인용문헌

- Altioik, N., M. Ersoz, V. Karpuz and M. Koyuturk. 2006. *Ginkgo biloba* extract regulates differentially the cell death induced by hydrogen peroxide and simvastatin. *Neurotoxicology* 27:158-163.
- Carrier, D., G. Cosentino, R. Neufeld, D. Rho, M. Weber and J. Archambault. 1990. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. *Plant Cell Rep.* 8:635-638.
- Ellnain-Wojtaszek, M., Z. Kruczynski and J. Kasprzak. 2002. Variations in the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves in the period of complete development of green leaves to fall of yellow ones. *Food Chem.* 79: 79-84.
- Ellnain-Wojtaszek, M., Z. Kruczynski and J. Kasprzak. 2003. Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. *Fitoterapia* 74:1-6.
- Hasler, A., O. Sticher and B. Meier. 1992. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by

- high-performance liquid chromatography. J. Chromatogra A. 605:41-48.
- Huh H. and E.J. Staba. 1993. Ontogenic aspects of Ginkgolide production in *Ginkgo biloba*. Planta Med. 59:232-239.
- Jacobs, B.P. and W.S. Browner. 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. American J. Med. 108:341-342.
- Jeon, M.H., S.H. Sung, S.H. Jeon, H. Huh and Y.C. Kim. 1993. Ginkgolides production in embryo-derived *Ginkgo biloba* plantlets. Korean J. Pharmacogn. 24(4):304-308 (in Korean).
- Kim, G.S., Y.W. Paek, K.M. Ko, S.J. Hwang, Y.J. Kim, S.J. Chung and B. Hwang. 1996. Detection of flavonoid compounds by cell culture of *Ginkgo biloba* L. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 11:1-7 (in Korean).
- Kim, M.S., W.K. Lee, H.Y. Kim, C. Kim and Y.W. Ryu. 1998. Effect of Environmental factors on flavonol glycoside production and phenylalanine ammonialyase activity in cell suspension cultures of *Ginkgo biloba*. J. Microbiol. Biotechn. 8:237-244.
- Laurain, D., J. Trmouillaux-Guiller, J.C. Chonieux and T.A. van Beek. 1997. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*. Phytochemistry 46:127-130.
- Lee, W.K., Y.W. Ryu, S.Y. Byun and H.G. Chung. 1993. Effects of nutrients and culture conditions on the cell growth and the flavonol glycosides production in cell cultures of *Ginkgo biloba*. Korean J. Biotechnol. Bioeng 8:55-61 (in Korean).
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497.
- Oh, S.J. and S.C. Koh. 2005. Improvement of catechin productivity in callus cultures of *Camellia sinensis* leaves. Korean J. Plant Res. 18(2):351-358 (in Korean).
- Park, H.J., C.E. Lim, C.W. Park and H.C. Cha. 2004. Analysis of flavonols extracted from leaves of various grapevine cultivars by HPLC. J. Korean Soc. Hort. Sci. 45:138-142.
- Park, Y.G., S.J. Kim, H.Y. Jung, Y.M. Kang, S.M. Kang, D.T. Prasad, S.W. Kim and M.S. Choi. 2004. Variation of ginkgolides and bilobalide contents in leaves and cell cultures of *Ginkgo biloba* L. Biotechnol Bioproc E. 9:35-40.
- Petkov, V.D., R. Kehayov, S. Belcheva, E. Konstantinova, V.V. Petkov, D. Getova and V. Markovska. 1993. Memory effects of standardized extracts of *Panax ginseng*(G115), *Ginkgo biloba*(GK501) and their combination Gincosan (PHL-00701). Planta Med. 59:106-114.
- Stefanovits-Banyai, E., K. Szentmihalyi, A. Hegedus, N. Koczka, L. Vali, G. Taba and A. Blazovics. 2006. Metal ion and antioxidant alterations in leaves between different sexes of *Ginkgo biloba* L. Life Sci. 78:1049-1056.
- Van Beek, T.A., H.A. Scheeren, T. Rantio, W.C. Melger and G.P. Lelyveld. 1991. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. J. Chromatogra A. 543:375-387.
- Yoon, J.H., W.S. Song, M.S. Lee and D.C. Yang. 2005. The effects of various chemicals on the production of polyacetylene in ginseng callus *in vitro* culture. Korean J. Plant Res. 18(1):57-63 (in Korean).

(접수일 2011.6.14; 수정일 2011.8.2; 채택일 2011.8.9)