

쑥의 잎과 기내 배양세포로부터 약용물질의 탐색

신동호* · 인준교** · 유상렬* · 최관삼*†

*충남대학교 농생대 응용생물화학식품학부, **(주)바이오피아 생명공학연구소

Investigation of Medicinal Substances from *in vitro* Cultured Cells and Leaves of *Artemisia princeps* var. *Orientalis*

Dong Ho Shin*, Jun Gyo In**, Sang Ryul Yu*, and Kwan Sam Choi*†

*Dept. of Applied Biology, Chungnam Natl. Univ., Daejeon 305-764, Korea.

**Biopia Co. Ltd, 384-4, Singal-ri, Kiheung-eup, Yongin 449-701, Korea.

ABSTRACT : The young leaves of *A. princeps* have been a well known for a crude medicine and used in treatment of colic pain, vomiting and menstrual irregularity. Based on TLC and HPLC and used an artemisinin, an anti-malarial compounds which is believed to be detected only in *A. annuaup* so far can be biosynthesized in *A. princeps*. To investigate the production of secondary metabolites like artemisinin in cultured cells, the cell culture of *A. princeps* was established. Callus and suspension cultured cells of *A. princeps* were induced and grown highest in MS media containing 0.2 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BAP and 2% sucrose. Different metabolites from *in vitro* cultured cells (callus and suspension cultured cell) and intact plants were analyzed by TLC analysis. As a result, we can confirm that *in vitro* culture has a potential for mass production of secondary metabolites from *A. princeps*.

Key words : *Artemisia princeps*, artemisinin, medical compound, tissue cultured cells, TLC

서 언

쑥 (*Artemisia. princeps* var. *orientalis*)은 국화과의 쌍자엽 식물로서 서구에서는 wormwood 또는 mugwort라고 한다. 전 세계의 북반구 건조지역을 중심으로 2,000 여종이 자생하는데 우리나라에서는 약 300 여종이 자생한다고 알려져 있다. 예로부터 우리나라에서는 이른 봄의 어린잎을 식용으로 하거나, 성숙한 잎을 상처에 처리하여 지혈을 하는데 사용하였다. 또한, 그늘에서 말렸다가 열병을 치료하는 목적으로 사용하였으며, 복통이나 구토 그리고 월경불순 등의 부인병 치료에도 많이 사용하여 왔다.

쑥에는 47가지의 monoterpenoids, 26종의 aromatic compound, 19종의 aliphatic esters, 18종의 aliphatic alcohols, 17종의 monoterpenes, 17종의 sesquiterpenes, 13종의 sesquiterpenoids, 12종의 aliphatic aldehydes, 8종의 aliphatic hydrocarbons, 7종의 aliphatic ketones 그리고 9종의 miscellaneous compounds 등 약 192 종류의 기화성 화합물이 포함되어 있는 것으로 보고되어져 있다 (Umano *et al.*, 2000). 쑥의 다양한 약리작용적인 효과로는 Penicillium이나 Aspergillus 같은

곰팡이에 대한 antifungal activity (Gundidza, 1993), antioxidant activity (Burits *et al.*, 2001), 암세포에 대한 항암효과 (Efferth *et al.*, 2001), antileishmanial activity (Hatimi *et al.*, 2001), anti-HIV (Wu *et al.*, 2001), 세포 apoptosis 유도 (Hu *et al.*, 2000) 등에 대하여 연구되어졌으며, 특히, 개똥쑥 (*Artemisia annua*) 등에서 열병 (말라리아)의 치료효과를 나타내는 주요 성분이 바로 artemisinin인 것으로 오늘날 밝혀졌다 (Klayman, 1984).

최근, 우리나라에서도 제3 국가에서 문제가 되고 있는 말라리아병 환자가 해마다 크게 늘어나고 있으며, 오랫동안 이 병 원성 원충의 특효약으로 사용해왔던 약제인 chloro-quinine에 대해 내성을 가지는 돌연변이 원충의 발생으로 인해 이 성분을 대신할 수 있는 새로운 약제로써 쑥의 성분인 artemisinin 이 크게 주목을 받게 되었다 (Hassan *et al.*, 1992; Woerdenbag *et al.*, 1993; Geldre *et al.*, 1997).

Artemisinin은 peroxide 고리를 가지고 있으며, terpenoid계의 sesquiterpene lactone의 일종이다. Sesquiterpene lactone은 성숙한 식물체의 화기와 잎의 선모 (glandular hair) 등에서도 발견되며, 초식성 곤충들과 포유동물에게 강한 기피작용을 일

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5766 (E-mail) kschoi@cnu.ac.kr

Received January 9, 2005 / Accepted March 31, 2005

오킬 뿐만이 아니라 말라리아 같은 병원성 원충에게는 치명적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Klayman *et al.*, 1984; Picman, 1986). 또한, 이 물질은 항 종양작용, 항균작용, 알레르기유발 등의 작용도 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Klayman *et al.*, 1984; Phillipson & O'Neil, 1989).

그러나, 쑥에서 artemisinin의 함량은 건조중량의 1% 이하로 광, 온도, 수분, 염 등 환경조건과 품종, 조직에 따라 그 함량은 크게 변화하는 것으로 알려져 있다 (Geldre *et al.*, 1997). 따라서, artemisinin에 대한 화학적 구조가 완전히 밝혀진 후, 많은 연구자들을 통해 화학적 합성을 위한 노력이 시도되었으나 (Schmid & Hofheinz, 1983; Avery *et al.*, 1992; Landbury & Nowak, 1992) 합성과정의 매우 복잡하고 비용이 많이 들며 낮은 합성효율 등으로 아직 좋은 결과를 얻지 못하고 있다 (Dhingra *et al.*, 2000). 따라서, 식물 세포공학 등을 통한 artemisinin의 대량생산에 관련된 연구가 활발히 이루어 졌다 (He *et al.*, 1983; Fulzele *et al.*, 1991). Park & Hu (1989)도 개똥쑥의 shoot (줄기)의 조직배양을 통해 artemisinin의 생합성 연구를 시도하였으며, Tawfiq *et al.* (1989)은 조직배양에서 얻은 생합성 물질을 말라리아 병원충 (*Plasmodium falciparum*)에 직접 처리하여 생리 활성을 검증하였다. Paniego & Giuletti (1994)는 개똥쑥의 잎으로부터 조직 및 세포배양에 대한 연구를 하였으며, callus로부터 artemisinin의 존재를 확인했으나 세포현탁배양계에서는 확인하지 못했다. Cai *et al.* (1995)은 Ri-plasmid를 이용한 개똥쑥의 hairy root 배양을 통해 artemisinin 대량배양 가능성을 제시하였다. 최근에는 분자생물학적 방법을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, Vergauwe *et al.* (1996)은 개똥쑥의 형질전환을 연구하여 형질전환 식물체를 얻었고, Chen *et al.* (2000)은 farnesyl diphosphate synthase 유전자의 형질전환을 통해 artemisinin의 양을 2-3배 증가시켰다. 그러나, 아직 artemisinin 생합성이 알려진 개똥쑥에 있어서도 아직까지 경제성이 있는 변이 세포주 및 대량배양계의 확립에 대한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구는 우리나라에서 오랜 기간 민간요법으로 사용되어 왔고 가장 많이 자생하고 있는 약용식물인 쑥의 자원적 가치와 그 효능을 살펴보기 위해 먼저 쑥으로부터 artemisinin 성분의 생합성 여부를 확인하였고, 야생 쑥으로부터 유도한 세포배양을 통하여 artemisinin을 안정적이고 대량으로 생산하기 위한 세포배양계를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 쑥으로부터 artemisinin의 확인

쑥으로부터 artemisinin의 추출은 개똥쑥에서 이루어진 방법과 동일하게 추출·정제를 실시하였다 (Klayman *et al.*, 1984). 먼저 야생 쑥 300 g을 채취하여 증류수로 세척한 후 증류수 300 ml를 첨가하여 blender로 균질화한 후 거즈로 1차

여과하고 여과지로 2차 여과하였으며, 동일한 volume의 n-hexane으로 2회 추출하여 n-hexane 추출물을 얻었다. 추출물은 농축 후 silica column chromatography를 실시하였으며 n-hexane, n-hexane-diethyl ether (9:1, 7:3, 1:1)로 용출하였다. 각 분획의 artemisinin 존재 여부는 서울대학교 농업생명과학대학 김수언 교수로부터 제공 받은 표준품과 n-hexane-diethyl ether (6:4)를 전개 용매로 하여 TLC 상에서 비교하여 확인하였다.

한편, anisaldehyde-H₂SO₄에 양성 반응을 보이며 표준품과 동일한 Rf 값을 갖는 물질이 확인된 분획을 농축하였다. Artemisinin의 순도를 높이기 위하여 60% MeOH를 용매로 하여 C18 column chromatography를 실시하였으며, fraction collector로 40 ml씩 분획하였다. HPLC에 의한 artemisinin의 확인은 3.9×300 mm의 분석용 ODS column를 사용하여 60% CH₃CN으로 실시하였으며 유속은 분당 0.5 ml로 190 nm 파장에서 검출하였다.

2. 야생 쑥으로부터 기내배양계의 확립

야생 쑥 (*Artemisia princeps* var *orientalis*)의 종자 채취는 충남대학교 부근에 자생하는 식물체에서 1992년 가을에 맺은 종자를 1993년 2월에 수확하여 육안으로 충실한 종자를 선별하였다. 쑥의 종자를 70% 에탄올로 10초간 살균한 후 멸균 증류수로 3회 세척하고, 10% hypochlorite 용액에 15분간 침지한 후에 다시 멸균 증류수로 3회 세척하고, 호르몬을 첨가하지 않은 MS기본 배지 (Murashige & Skoog, 1962)에서 발아시켜 새로운 배지에 이식한 후 2개월간 기내에서 배양하였다.

발아 후 2개월 된 식물체의 잎과 줄기를 잘라 MS 배지에 auxin계 호르몬 2,4-D와 IAA 그리고 cytokinin계 호르몬 BAP, kinetin을 혼합 처리한 배지에 sucrose 20 g, gellite 0.4%를 넣은 고체 배지 (pH 5.7) 상에서 캘러스 유도 배양을 실시하였다. 배양 조건은 28°C 배양기에서 부드럽고 부서지기 쉬운 캘러스를 얻기 위해서 암배양을 실시하였다. 잎의 경우는 잎의 주맥부분을 중심으로 약 5 mm씩 잘라 배지에 조심스럽게 치상하였다. 줄기의 경우, 정단 조직으로부터 5 cm 이내의 목화 되지 않은 부분을 약 5 mm 크기로 절단하여 배지에 치상하였다. 호르몬처리에 따른 callus 유도 상황을 조사하기 위해 MS 기본배지에 다양한 농도의 2,4-D (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/l)와 IAA (0, 1, 5, 10, 15 mg/l), BAP (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/l)와 kinetin (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l)를 처리한 후, 20일 동안 해부 현미경하에서 유도된 캘러스의 수를 백분율로 조사하였다. 이들 callus는 다양한 조성의 호르몬이 처리된 배지 (0.2 mg/l 2,4-D; 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/l BAP)로 옮겨 성장상태를 조사하였다.

현탁세포배양계를 확립하기 위해 연한 캘러스 조직을 분리하여 배지에 2,4-D 0.2 mg/l와 BAP 0.1 mg/l가 첨가된 액체

배지에 넣은 후 120 rpm로 진탕배양하여 유도하였으며, 25일 간격으로 계대배양하여 안정화된 현탁배양계를 확립하였다. 한편, 현탁배양세포로부터 배양세포액 500 μ l를 세포벽 분해 효소용액 (0.7 M Sorbitol, 2% Driselase, 0.1% Pectriase)에 처리하여 배양세포의 원형질체를 나출시킨 후 hemocytometer (KAYAKAKI IRIKAKOGYO CO., LTD)를 이용하여 현미경 하에서 세포 수를 측정함으로써 현탁배양 세포들의 성장율을 조사하였다.

3. 야생 쑥과 기내배양 세포간의 이차대사산물 분석

성숙한 개똥쑥, 성숙한 쑥, 어린 쑥, callus, 그리고 현탁배양 세포 간의 이차대사물질의 생합성 양상을 비교하기 위하여 각각 생체 중 100 g을 100 ml의 증류수와 함께 마쇄하여 여과하였다. 이들 증류수 추출물을 n-hexane과 BuOH로 추출한 후, 농축하여 TLC의 시료로 사용하였다. 각각의 n-hexane 추출물을 TLC (Merck, F-256)를 이용하여 전개한 후, higher alcohol과 lactones에 특이적으로 녹색과 청색을 나타내는 발색 시약인 vanillin-sulfuric acid를 처리하여 higher alcohols과 lactones의 양상을 비교·분석하였다. 또한, steroids와 terpenoid에 특이적으로 청색을 나타내는 발색 시약인 anisaldehyde-sulfuric acid를 처리하여 steroids와 terpenoid 계통의 화합물을 비교분석 하였다. 한편, amino acids와 amines계 화합물의 양

상을 조사하기 위해 각각의 시료를 BuOH로 추출한 후 TLC를 이용하여 전개하였다. 이들을 amino acids와 amines에 특이적인 ninhydrin으로 발색하여 amine계 화합물들을 상호 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 야생 쑥으로부터 artemisinin의 분석

쑥에서 artemisinin의 존재를 확인하기 위해 일차적으로 쑥과 개똥쑥의 잎을 n-hexane으로 추출한 후, 그 crude extracts를 역상TLC를 통해 분석하였다. 그 결과, 개똥쑥에서는 artemisinin standard와 같은 Rf. 값 0.25를 갖는 거자 색의 물질이 확인되었으나, 쑥 추출물에서는 비슷한 물질이 확인되지 않았다. 이는 쑥에 있어서 artemisinin 함량이 적어 TLC로는 확인할 수 없거나, 본 용매에서는 쑥의 경우 artemisinin과 비슷한 Rf. 값을 가지는 물질이 많아 TLC 분석으로는 존재를 판별할 수 없는 것으로 사료되었다 (Fig. 1). 따라서, HPLC분석을 통한 좀 더 세밀한 분석을 위하여 column chromatography를 통한 정제 과정을 실시하였다.

그 결과, 개똥쑥의 경우 14번째 분획에서 가장 높은 artemisinin의 함량을 보인 반면 쑥에서는 9번째 분획에서 artemisinin과 비슷한 Rf. 값 (0.25)을 보이는 물질이 나타나 이를 농축하였다 (Fig. 2). 이들 농축액을 다시 HPLC를 이용

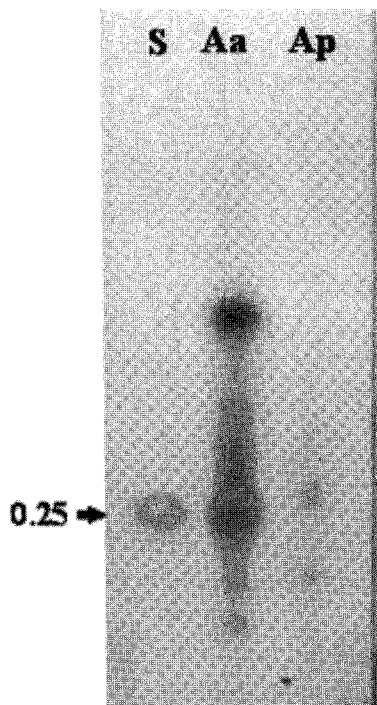


Fig. 1. TLC detection of artemisinin from *A. annua* and *A. princeps*. Crude extracts from two *Artemisia* spp. with n-hexane were subjected for TLC analysis on 60% MeOH and stained by anisaldehyde-H₂SO₄. S: standard; Aa: Hexane extracts of *A. annua* Ap: Hexane extracts of *A. princeps*.

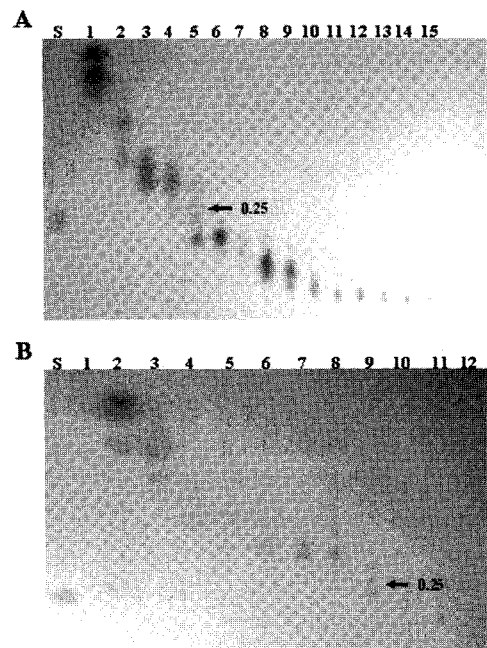


Fig. 2. Chromatographic behavior of n-hexane extract from *A. annua* (A) and *A. princeps* (B). n-hexane extracts of *Artemisia* spp. is fractionated through column chromatography and each fractions are subjected for TLC analysis on 60% MeOH and stained by anisaldehyde-H₂SO₄. S: standard; 1-15: fraction numbers of column chromatography.

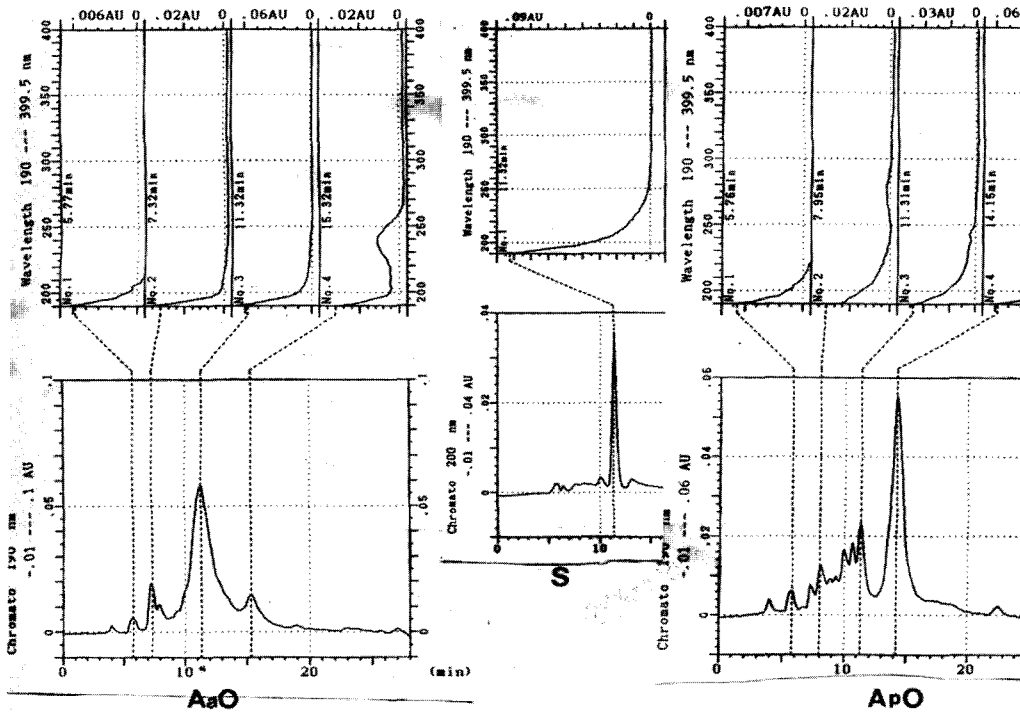


Fig. 3. HPLC chromatograms for artemisinin-like compound extracted from *A. annua* and *A. princeps*. Aa: artemisinin extracts of *A. annua*, Ap: artemisinin extracts of *A. princeps*. S: standard of artemisinin.

하여 분석한 결과 개똥쑥에서만 보고되어졌던 artemisinin이 쑥에서도 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 쑥의 경우 HPLC상의 UV spectrum이 artemisinin과 약간 다르게 나타났기 때문에 이를 확인하기 위하여 HPLC상에서 분취, 농축하여 TLC분석을 실시한 결과 artemisinin과 똑같은 spot를 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 위의 결과를 통해, 비록 양적으로 차이가 있을지라도 일반 쑥에도 개똥쑥에 존재하는 것으로 알려진 항말리아 약제인 artemisinin이 존재함을 확인할 수 있었다.

2. 야생 쑥으로부터 callus 유도 및 최적 배양조건 확립

일반적으로 artemisinin은 쑥의 종류와 환경 조건에 따라 건조량의 0.01%~0.5% 정도 포함되어 있기 때문에 개똥쑥을 40 ha 재배했을 경우 대략 6 kg 정도 얻을 수 있었다 (Hien & White, 1993). 따라서, 식물생명공학기술을 이용하여 대량 생산을 위해서 조직배양, 세포배양, 다양한 돌연변이종의 선발 및 형질전환체 개발 등이 다양하게 시도되고 있는 실정이다. 우리는 쑥의 기내 대량배양시스템을 확립하기 위해 쑥의 어린 식물체로부터 기내 배양조직 및 세포 배양계를 확립하고자 하였다.

쑥의 종자를 70% EtOH와 10% hypochlorite를 이용하여 멸균한 후, MS 기본배지에서 무균 발아시켜 식물체를 확보하였다. 이들 무균 식물체로부터 잎과 줄기를 절단하여 Nair *et al.* (1986)의 방법에 따라 callus를 유도하여 안정된 세포 배양계를 확립하였다 (Fig. 5). Callus 유도에 있어 auxin계 호르

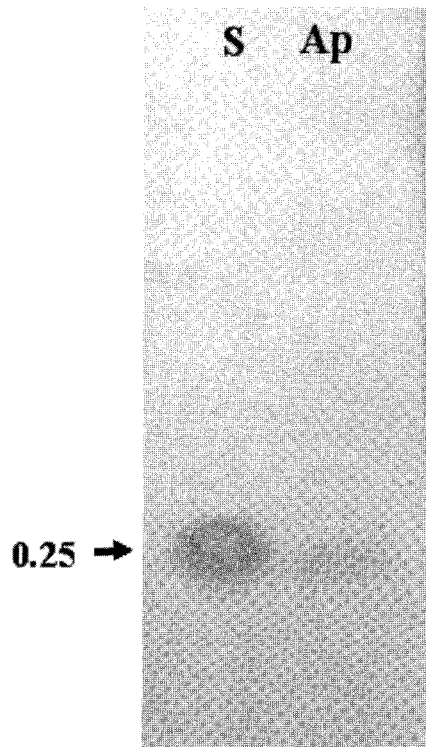


Fig. 4. TLC analysis for artemisinin from *A. princeps*. Crude extracts from *A. princeps* was purified and concentrated through column chromatography and HPLC, and subjected for TLC analysis on 60% MeOH and stained by anisaldehyde-H₂SO₄. S: standard; Ap: artemisinin extracts of *A. princeps*.

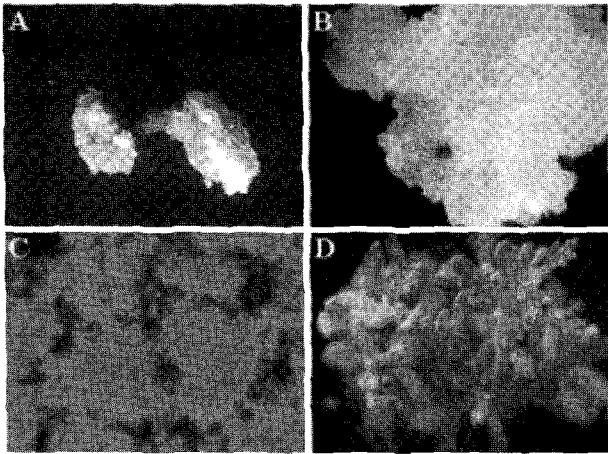


Fig. 5. Photographs of *in vitro* cultured cells of *A. princeps*. A: callus induced from stem; B: callus growing on the solid medium; C: suspension cells growing on the liquid medium; D: multiple shoots regenerated from callus.

몬의 영향을 살펴보기 위해 BAP를 0.1 mg/l로 고정한 후, 대표적인 auxin계 호르몬인 2,4-D를 다양한 농도 (0~1 mg/l)로 처리하였다. 그 결과, 2,4-D의 농도가 최소한 0.2 mg/l 이상이 첨가되었을 때 캘러스 유도가 잘되었고, 잎보다는 줄기에서 4배 이상 callus 유도가 관찰되었다 (Fig. 6A).

한편, cytokinin계 호르몬의 영향을 살펴보기 위해 2,4-D를 0.2 mg/l로 고정한 후 다양한 농도의 BAP (0~10 mg/l)를 처리하였다. BAP의 경우 1 mg/l까지는 잎과 줄기 모두 캘러스 유도에 큰 영향을 주지 않았지만, 2 mg/l 이상이 처리되었을 경우 강력한 억제 작용을 보여 10 mg/l에서는 모든 조직에서 callus의 형성을 볼 수가 없었다 (Fig. 6B).

일반적으로 식물세포의 분열 및 분화는 세포내 auxin계 호르몬과 cytokinin계 호르몬의 균형에 따라 좌우되며, auxin계 호르몬이 높을 경우 세포분열이 촉진되나 cytokinin계 호르몬이 높을 경우 세포분화가 촉진된다. 개똥쑥의 조직배양에서는 BAP가 0.5 mg/l가 첨가되었을 때 가장 왕성하게 callus가 유도되었으나 (Nair *et al.*, 1986), 본 실험 결과에서는 2,4-D만 0.2 mg/l를 첨가한 배지에서 가장 왕성하게 callus 유기가 되었으며 cytokinin 호르몬은 그다지 callus 유기에 영향을 주지 않았고 오히려 2 mg/l의 고농도로 첨가하였을 경우에는 세포 분화를 촉진하여 callus 유도를 억제하는 결과를 가져왔다. 그러나, callus의 성장에 있어서는 0.2 mg/l의 2,4-D와 0.1 mg/l의 BAP가 첨가된 배지에서 가장 왕성하게 성장하였다.

3. 야생 쑥의 세포 현탁배양계의 확립

야생 쑥으로부터 유도한 callus 배양계로부터 세포현탁배양 시스템의 확립을 위해 계대배양 중인 callus로부터 연한 조직을 분리하여 2,4-D 0.2 mg/l와 BAP 0.1 mg/l가 첨가된 MS 액체배지로 옮겨 진탕배양기 (shaking incubator)에서 120 rpm으로 진탕 배양하여 세포 현탁배양계를 유도하였다. 안정

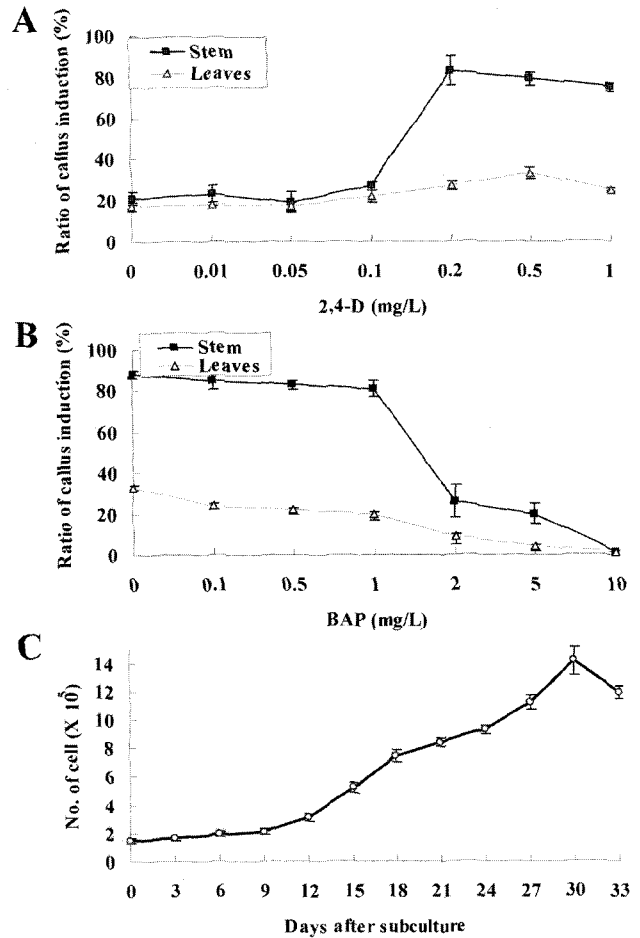


Fig. 6. Hormone effects of 2,4-D (A) and BA (B) on callus induction and cell growth on the cell suspension culture (C) of *A. princeps*. A: stem or leaf explants were cultured on the media treated a different concentration of 2,4-D (0~1 mg/l) with 0.1 mg/l BAP. B: stem or leaf explants were cultured on the media treated a different concentration of BAP (0~10 mg/l) with 0.2 mg/l 2,4-D; C: Cell growth on the suspension cultured cells was calculated for 1 month after subculture.

된 세포 배양계의 확립을 위해 24주기로 새로운 액체 배지에 계대배양을 하면서 유지하였다. 쑥의 현탁 배양한 세포의 생장을 측정하기 위해 배양중인 세포로부터 원형질을 나출 시킨 후, hemocytometer를 이용하여 세포수의 증가를 조사하였다. 그 결과, 쑥의 현탁배양 세포는 계대배양 후 10일 이후부터 대수증가기를 거쳐 30일경에 안정기에 접어드는 긴 성장곡선을 나타냈다 (Fig. 6C). 이는 포도와 미국자리공의 세포배양계가 각각 10일과 8일인데 비해 (Choi *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1995) 비교적 긴 성장곡선을 보이는 것이었으며, 세포의 수에 있어서도 안정기에 접어들었을 때 1.3×10^6 로 포도세포 (1.2×10^7 cell)의 1/10 정도로 생장이 낮았다. 이는 비교적 긴 정지기(10일 이상)를 지난 후, 대수 성장기에 들며 30일경에 안정기에 돌입하는 성장 곡선을 가지는 개똥쑥으로부터 유도한 배양세포와 유사한 결과를 나타내었다 (Tawfiq *et al.*, 1989).

4. 배양 세포로부터 다양한 대사물질의 분석

개똥쑥을 포함한 많은 쑥의 잎에는 항 말라리아 약용성분인 artemisinin 외에 다양한 약용물질이 포함되어 있어 예로부터 산통, 구토, 설사, 불규칙적 자궁출혈 등의 치료를 위해 한의 학에서 많이 되어왔고 쑥으로부터 다양한 항암물질 및 약용물질을 분석 추출하려는 연구가 오랫동안 이루어져 왔다 (Hayashi *et al.*, 1997). 특히, 대량재배 및 이들 물질의 화학적 합성의 어려움에 때문에 세포 및 조직배양을 통한 대량배양 연구가 꾸준히 진행되어 왔으나, 세포의 대량배양체계는 조직 세포의 기원, 배양조건 및 환경 등에 따라 물질의 생합성이 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Geldre *et al.*, 1997). 따라서 우리는 개똥쑥, 성숙한 쑥, 어린 쑥, callus cell, 그리고 현탁배양세포 간의 몇 가지 대사물질 생산 양상을 비교 분석하였다. 각각 시료들을 증류수와 함께 마쇄한 후, n-hexane과 BuOH로 추출·농축하였다. 이들 각각의 추출물을 TLC (Merck, F-256)를 이용하여 전개한 후, 특정 화합물들을 특이적으로 발색시키는 발색시약을 이용하여 분석을 실시하였다.

우선적으로 higher alcohol과 lactone에 양성 반응을 나타내는 vanillin-H₂SO₄를 처리하여 비교한 결과 Rf 값 0.21, 0.42 부근에서 callus와 현탁배양 세포에서만 특이적인 물질이 발견되었다 (Fig. 7A). 한편, anisaldehyde-H₂SO₄ 발색을 통한 steroid와 terpenoids물질을 비교하였을 때, Rf 값 0.47 부근의 물질은 단지 쑥의 유식물체에서만 검출되었다 (Fig. 7B).

Amino acid와 amines류의 물질을 분석하기 위해 각 시료를 BuOH로 추출한 후, 특이적인 발색시약인 ninhydrin를 처리하여 발색시킨 결과, 현탁배양 세포에서만 발견되는 3종류 이상 (Rf 값 0.25, 0.3, 0.69)의 물질이 확인되었다 (Fig. 7C).

이상의 결과에서 알 수 있듯이 대사물질의 생합성 양상은 개똥쑥과 쑥의 차이보다는 성숙한 쑥과 어린 유식물체 사이에서 더 현격한 차이를 나타냈다. 이는 물질의 생산 양상이 식물체의 발달 단계에 따라 매우 다양해지고 다양한 환경적 변이에 따라 달라 질 수 있음을 보여주었다. 또한, 식물체와 기내 배양한 세포 사이에는 많은 대사물질의 생합성 차이를 보였는데, 특히 amino acid와 amines 류의 분석에서 배양세포에서 더욱 다양한 물질이 검출되는 것은 세포분열 및 발달, 분화와 밀접한 관계가 있을 것으로 여겨진다. 즉 callus 및 현탁배양 세포는 완전한 식물체에 비해 세포의 분열이 왕성한 조직이기 때문에 아미노산 대사가 활발해 질 것이고 이에 따라서 다양한 아미노산들이 포함되어 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 비록 어떤 정확한 유용물질의 종류나 분석을 할 수 없었지만, 쑥에도 개똥쑥과 같은 artemisinin이 존재함을 확인할 수 있었고 현탁배양 세포계를 통한 유용물질의 대량생산 가능성을 제시하였다. 앞으로 좀 더 효과적인 기내 배양기술의 발달 및 공정기술, 유용물질 생산 변이주의 개발 및 분자생물학적 기술이 적극 활용된다면 기내 배양계를 이용하여 쑥으로부터 유용물질의 대량생산이 가능할 것으로 사료된다.

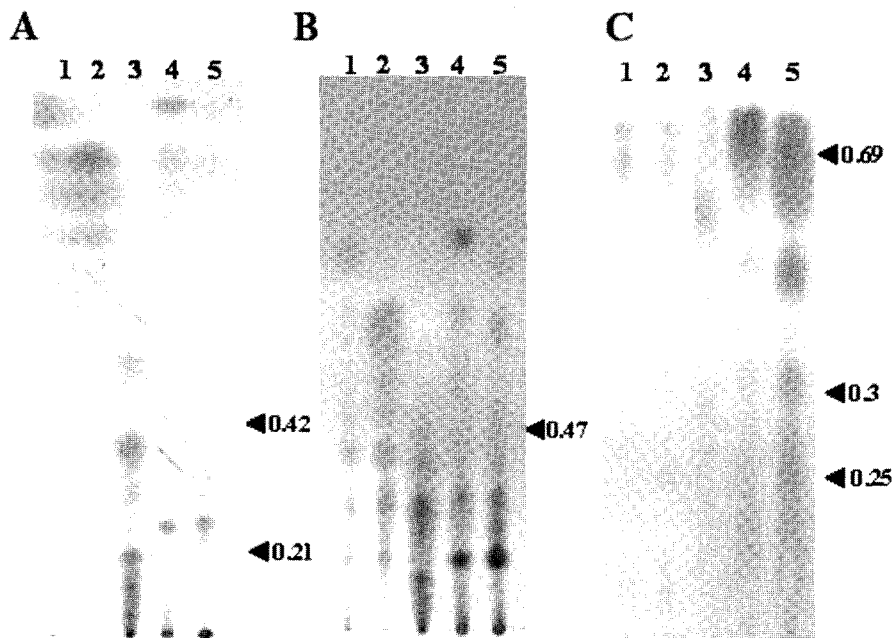


Fig. 7. Thin layer chromatogram analysis of extracts from 5-type materials of *Artemisia* spp. Lane 1: extracts from old plant of *A. annua*, lane 2: extracts from old plant of *A. princeps*; lane 3: extracts from young plant of *A. princeps* lane 4: extracts from callus tissues of *A. princeps*; lane 5: extracts from suspension cultured cells of *A. princeps*. n-Hexane (A and B) or BuOH extracts (C) from each materials were developed in n-hexane diethyl ether (6:4, vol/vol) and irradiated with long wavelength UV light (254 nm). A) Vanillin-H₂SO₄ stain for higher alcohol and lactone compounds; B) Anisaldehyde-H₂SO₄ stain for steroids and terpenoid compounds; C) Ninhydrin stain for amino acid and amines compounds.

적 요

쑥의 어린 잎은 민간요법에서 복통이나 구토, 월경불순 등의 치료에 사용되어 온 귀중한 약재로 최근에는 항 말라리아 효과를 나타내는 artemisinin 성분이 주목을 받고 있다. 국내에 자생하는 야생 쑥에 대한 자원식물로서의 가능성을 제시하기 위하여 야생쑥과 이로부터 유도한 기내배양세포로부터 artemisinin의 생합성 여부를 조사하였다. 그 결과 그 동안 개똥쑥에서만 존재하는 것으로 알려진 artemisinin이 국내 야생 쑥에서도 생합성되는 것을 확인하였다. Artemisinin 및 유용한 이차대사산물의 기내 배양을 통한 대량생산의 가능성을 조사하기 위해 쑥의 어린 식물체로부터 조직 및 현탁 세포배양계를 확립하였다. Callus와 현탁배양 세포의 유도 및 성장은 0.2 mg/l 2,4-D와 0.1 mg/l BAP가 처리되고 2% sucrose를 첨가한 MS 배지에서 가장 좋게 나타났다. 이들 callus와 현탁배양 세포 그리고 식물체에 존재하는 다양한 대사물질들을 비교하기 위해 TLC 분석을 실시한 결과, 기내배양세포에서 특이적인 페놀 화합물, 테르펜화합물, 아미노산 등이 존재하고 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 쑥의 기내 배양계를 통해 다양한 유용물질의 대량생산에 대한 가능성을 제시하고 있다.

LITERATURE CITED

Avery MA, Chong WKM, Jennings-White C (1992) Stereoselective total synthesis of (dextro)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. J. Am. Chem. Soc. 114:974-979.

Burits M, Asres K, Bucar F (2001) The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytother. Res. 15(2):103-108.

Cai GQ, Li GZ, Ye C, Li GF (1995) Hairy root culture of L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. Chin. J. Biotechnol. 1:315-320.

Chen DH, Ye HC, Li GF (2000) Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Science 155:179-185.

Choi KS, In JG, Lee YB (1994) Effect of light production of anthocyanin and betacyanin through cell suspension culture systems in *Vitis vinifera* L. and *Phytolacca americana* L. Korean J. Plant Tiss. Cult. 21:47-53.

Dhingra V, Rao VK, Narasu ML (2000) Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. Life Sciences 66(4):279-300.

Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR (2001) The anti-malarial artesunate is also active against cancer. Int J. Oncol. 18(4):767-73.

Fulzele DP, Sipahimalani AT, Heble MR (1991) Tissue cultures of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production. Phytother. Res. 5:149-153.

Geldre EV, Vergauwe A, Eeckhout EV (1997) State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in

plant. Plant Molecular Biology 33:199-209.

Gundidza M (1993) Antifungal activity of essential oil from *Artemisia afra* Jacq. Cent. Afr. J. Med. 39(7):140-142.

Hassan AM, Bjakman A, Landberg LA, Ashton M (1992) The effect of artemisinin, its derivatives and nefloquine against chloroquine resistant strains of *P. falciparum* in vitro. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 86(4):356-367.

Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N, Idrissi NG (2001) In vitro evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba alba*. Asso. Bull. Soc. Pathol. Exot. 94(1):29-31.

Hayashi T, Hayakawa Y, Hayashi T, Sasaki H, Sakuragawa N (1997) Sulfated polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps* activates heparin cofactor II independently of the lys173 and arg189 residues of heparin cofactor II. Thrombosis Research 87(1):105-112.

He XC, Zeng ZY, Li GF, Liang Z (1983) Callus induction and regeneration of plantlets from *Artemisia annua* and changes in qinhausu contents. Acta Bot. Sinica 25:8790.

Hien TT, White NJ (1993) Qinghaosu. Lancet 341:603-608.

Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J (2000) Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. Jpn. J. Cancer Res. 91(1):113-117.

Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhaus WK, Theodorides AD, Dobek AS (1984) Isolation of artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J. Nat. Prod. 47:715-717.

Landbury PT, Nowak DM (1992) An efficient partial synthesis of artemisinin and deoxoartemisinin. Tetrahedron Lett. 33:1029-1032.

Murashige M, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nair MSR, Acton N, Klayman DL, Kendrick K, Basile DV, Mante S (1986) Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua* J. of National Products 49(3):504-507.

Panigo NB, Giuletti AM (1994) *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36:163-168.

Park JM, Hu WS (1989) Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. Biotechnology & Bioengineering 34:1209-1213.

Phillipson JD, O'Neill MJ (1989) New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. Acta pharmaceutica Nordica 50(1):131-144.

Picman AK (1986) Biological activity of sesquiterpene lactones. Biochem. Syst. Ecol. 14:225-281.

Schmid G, Hofheinz W (1983) Total synthesis of qinghaosu. J. Am. Chem. Soc. 105:624.

Shin DH, Ryu SR, Choi KS (1995) Effects of salicylic acid on anthocyanin synthesis in cell suspension culture of *Vitis vinifera* L. Korean J. Plant Tiss. Cult. 22:59-64.

Tawfiq NK, Anderson LA, Roberts MF, Phillipson JD, Warhurst DC (1989) Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. Plant Cell Reports 8:425-528.

- Umano K, Hagi Y, Nakahara K, Shoji A, Shibamoto T** (2000) Volatile chemicals identified in extracts from leaves of Japanese mugwort (*Artemisia princeps* Pamp.). *J. Agric. Food Chem.* 48(8):3463-3469.
- Vergauwe A, Cammaert R, Vanberghe D, Genetello C, Montagu MV, Eeckhout E Van den** (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 15:929-933.
- Woerdenbag HJ, Luers JFJ, Uden WV** (1993) Production of the new antimalaria drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 32(2):247-257.
- Wu TS, Tsang ZJ, Wu PL, Lin FW, Li CY, Teng CM, Lee KH** (2001) New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. *Bioorg. Med. Chem.* 9(1):77-83.