

병풀 (*Centella asiatica* L. Urban) 식물체 배양을 이용한 Triterpene Glycoside 생산

김옥태* · 김민영 · 박윤정 · 홍민희 · 안준철¹ · 오만호² · 황 백
전남대학교 생물학과, ¹서남대학교 생명과학과, ²대한제당 중앙연구소

Production of Triterpene Glycosides from Whole Plant Cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban

KIM, Ok Tae* · KIM, Min Young · PARK, Yun Jung · HONG, Min Hee · AHN, Jun Cheul¹ ·
OH, Man Ho² · HWANG, Baik

Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Department of Life Sciences, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

²TS R&D Center, 6-14, 1Ka, Buksung-Dong, Jung-Gu, Incheon 400-201, Korea

ABSTRACT Whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban *in vitro* were established and the effects of basal media, some macro elements and sucrose concentration on productivity of triterpene glycosides (madecassoside and asiaticoside: M&A) were investigated. Among the media (MS, B5, RCM) tested, MS and 0.5 RCM medium were the best for plant growth and M&A production, respectively. However, taking into account the M&A productivity, B5 medium was superior (M&A: 14.28 mg/g dry wt.). Major macronutrients of B5 medium adjusted with the concentration of 25 mM KNO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂ and 1 ~ 10 mM MgSO₄, caused elevated or optimized levels of M&A. On sucrose concentration, the highest yields of M&A were obtained from 6 % sucrose.

Key words : Asiaticoside, *Centella asiatica*, triterpene glycosides, whole plant cultures

서 론

Gotukola, India pennywort 또는 Mandookparni-brahmi라 불리는 병풀 (*Centella asiatica* L. Urban)은 식용, 피부치료제, 상처치료제, 기억력 증강제 및 강장제 등 다양한 용도에 이용되고 있다 (Sharan and Khare 1991; Moharana and Moharana 1994). 병풀의 주요성분은 madecassoside와 asiaticoside (M&A) 그리고, madecassic acid, asiatic acid, brahminoside, brahmoside 등이며, 그 중 주요 생리활성을 보이는 것으로 asiaticoside는 항박테리아 및 항곰팡이 성질을 가지고 있으며,

상처, 위궤양, 다양한 피부질병, 정신질환, 결핵, 정맥질환, 치매 등에 대해 치료 효과가 있는 것으로 조사되었다 (Boiteau et al. 1951; Chopra et al. 1956; Abou-Chaar 1963; Rao 1973; Mesnard 1975; Montecchio et al. 1991; Hausen 1993; Inhee et al. 1999). 국내에서도 의약품, 화장품, 기능성 식품등의 분야에서 병풀을 사용하고 있지만, 주요 서식지역이 열대에서 아열대 지방으로 국한되고, 국내에서는 남부지방에 소량 자생하고 있어 국외로부터 전량수입에 의존하는 실정이다 (Baek 1997).

기존에 대량증식 방법은 측아의 미세번식과 캘러스 배양을 통한 병풀 재분화 방법으로 확립되었다(Kavindra et al. 2000; Patra et al. 1998). 하지만, 병풀의 주요 생리활성물질인 M&A의 생산을 목적으로 하는 기내 배양은 몇몇 연구가 진행되었다. 그 중 Baek (1997)은 병풀의 염병 절편체에 *Agrobacterium*

*Corresponding author Tel 062-530-0790 Fax 062-530-3409
E-mail kimot@korea.com

*rhizogenes*를 감염시켜 모상근을 유도하였지만, 형질전환된 이들 모상근에 M&A는 야생에 서식하는 병풀에 비해 1/12 수준이라고 보고와 미분화된 세포인 캘러스에서는 M&A가 발견되지 않았다고 보고만 들 수 있다.

본 연구에서는 캘러스와 뿌리배양에서는 주요 성분의 생합성이 비효율적이므로 잎 조직이 필요한 whole plant의 배양의 필요성을 인식하고, 병풀의 대량 액체배양에 의한 증식여부를 확인하고, 병풀의 식물체 성장과 M&A의 생성패턴 사이의 변화와 총생산에 최적인 배양조건의 탐색을 목적으로 몇 가지 기본 배지와 sucrose 농도변화에 따른 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

제주도에서 종자를 채집하여 70% 에탄올에 수초간 침지한 후 1~2방울의 Tween 20을 첨가한 2% sodium hypochlorite 용액에서 5분간 표면살균하고 멸균수로 4~5회 세척하여 멸균된 여과지로 물기를 제거한 후 3% sucrose, 0.8% agar, pH 5.8로 조종된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 치상하였다. 4주 후 발아된 식물체는 4주씩 계대배양하여 뿌리와 신초를 제거한 배축을 실험재료로 사용하였다.

고체와 액체배지에서 성장 및 M&A 비교

식물체의 고체와 액체 배양하여 각각의 성장을 및 M&A를 비교하기 위하여 sucrose 3%가 포함된 MS 배지에 0과 0.25% gellan gum를 첨가하여 pH를 5.8로 조종한 뒤 습식 가압멸균하여 신초와 뿌리를 제거한 배축을 한 개씩 접종하여 5주간 배양하였다. 액체배양은 고체와 같은 조건하에서 광량 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 광주기 16 light/8 dark 시간, 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 100 rpm에서 배양하였다.

병풀 식물체의 최적배양을 위한 기본배지 설정 및 대량원소의 최적화

병풀 식물체의 성장에 가장 적합한 배지를 선정하기 위하여 MS, B5 (Gamborg et al. 1968)와 RCM (White and Nester 1980) 배지의 대량원소를 0.5, 1, 2 및 3배로 조정된 액체배지 (30 mL)를 Erlenmeyer flask에 넣고 신초와 뿌리를 제거한 배축을 한 개씩 이식하여 5주간 배양 (100 rpm)하였다. 1차 실험의 결과로 B5 배지를 기본배지로 설정하고 B5배지의 대량원소인 KNO_3 , NaH_2PO_4 , CaCl_2 및 MgSO_4 를 각각 0~100, 0~10, 0~50 그리고 0~50 mM 농도로 조정하여 신초와 뿌리를 제거한 배축을 한 개씩 이식하여 액체배지에서 5주간 배양하였다. 각 식물체들은 여과지로 수분을 충분히 제거한 다

음 생증량을 측정하였으며, 동일시료를 12시간 동결건조하여 건중량을 각각 측정하였다. 건조시료중 일부는 M&A의 분석에 사용하였다.

Sucrose 농도가 M&A의 생산에 미치는 효과

배지내 sucrose 농도에 따른 병풀의 성장 및 M&A 함량을 알아보기 위하여 B5 액체배지를 기본배지로 하여 sucrose 농도를 2%에서 7%까지 변화시킨 다음 뿌리와 신초를 제거한 배축을 한 개씩 이식한 후 5주간 배양하였다. 각 식물체들은 여과지로 수분을 충분히 제거한 다음 생증량을 측정하였으며, 동일시료를 12시간 동결건조하여 건중량을 각각 측정하였다. 건조시료 중 일부는 M&A의 분석에 사용하였다.

M&A의 추출 및 분석

추출은 Booncong (1989)의 방법을 약간 변형시켜 수행하였다. 각각의 마쇄된 건조 분말 100 mg을 5 mL의 70% ethanol에 넣고 20분간 초음파처리로 추출하였고, 추출액은 Whatman (No. 1, 70 mm ϕ)여과지로 여과한 다음 회전증발기에서 농축하였다. 농축액은 petroleum ether로 재용해시켜 수층만을 수집하고 -5°C acetone을 첨가하여 섞은 후 수층만을 수집하여 질소가스를 사용해서 농축하였으며, 농축액은 1 mL methanol에 재용해시켜 그 중 10 μL 를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC 분석을 위한 장치로는 Waters사의 injector (600), detector (486 Tunable absorbance)를 사용하였으며, μ -Bondapak C_{18} column (10 μm , 3.9 mm \times 300 mm)을 사용하여 26°C 에서 분석하였다. 용매로는 methanol : water (60 : 40, v/v)를 사용하여 유속 0.8 mL/min로 하여 214 nm에서의 자외흡광도로 화합물을 검출하였다.

결과 및 고찰

고형 배양과 액체 배양에서의 성장 및 M&A 함량 비교

조직배양을 이용한 식물체 증식에는 많은 종이 고체배지를 이용하고 있으나, 여러 종에서 액체배양이 시간절약과 노동력 및 생산비용이 감소되는 과정을 갖는다 (Hosokawa et al. 1998). 개똥쑥 (*Artemisia annua*) 경우는 유리화 현상 없이 액체배지에서 성장하며, 고체배지에 비교하여 매우 빠른 성장을 보여주었다 (Jorge et al. 1996). 병풀의 whole plant 배양의 시작단계로, 고체배지와 액체배지의 배양에서 성장과 유용물질 (M&A) 함량을 비교하였다 (Table 1). Gellan gum이 첨가된 고형배지에서는 신초와 뿌리를 제거한 배축을 이식하였을 때 신초 발생 등 생장은 더디지만 M&A 함량은 높은 수준이었다. 하지만, 액체배지에서는 성장 속도가 빨라 생산성을 고려

한 M&A 생산은 고체배지에서 배양한 식물체보다 1.39배가 더 높았다.

병풀 식물체의 최적배양을 위한 기본 배지 및 대량원소의 적정 농도 규명

조직배양에 있어서 배지 성분은 배양체의 성장은 물론 분화에 관여하는 가장 중요한 요소이며, 이차대사물질의 형성에 또한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 (Toivonen et al. 1991; Weathers et al. 1997). 병풀 식물체의 배양에 적합한 기본배지를 찾기 위해서 MS, B5 및 RCM 배지와 이들의 대량원소를 각각 0.5, 1, 2 및 3배로 조정한 배지에서 5주간 배양하여 식물체의 성장률을 조사하였다 (Table 2). 대량원소의 농도가 0.5배로 조정된 0.5 RCM 배지에서 가장 높은 M&A 함량을 보여주었고, MS 배지에서 가장 높은 성장을 나타내었다. 하지만, M&A 생산성은 병풀 식물체를 B5 배지에서 MS와 0.5 RCM보다 각각 1.16배, 3.6배 더 높아 B5 배지가 병풀 식물체 성장과 M&A의 생합성에 적합한 기본배지로 잠정적으로 선발하였다. 다음은 B5 배지를 기본배지로 설정하고, B5 배지를 이루는 주요 대량원소인 KNO_3 , NaH_2PO_4 , $CaCl_2$, $MgSO_4$ 를 각각 농도별로 조정하여 M&A 생산을 위해 최적의 농도를 조사하였다. 그 결과 KNO_3 (24.8 mM), NaH_2PO_4 (1.08 mM) 및 $CaCl_2$ (1 mM)는 B5 기본배지의 농도와 일치하는 농

Table 1. The comparison of dry weight and triterpene glycosides contents between solid and liquid cultures of *Centella asiatica* after 5 weeks.

Gellan gum concentration (%)	Dry weight (g/flask)	Contents (mg/g dry wt)	
		Madecassoside	Asiaticoside
0	0.2907	5.67	6.3
0.25	0.1288	9.48	11.3

Table 2. The effect of various culture media on the growth and the triterpene glycosides in whole plant cultures of *Centella asiatica* for 5 weeks.

Media	Strength of macro nutrients	Dry weight (g/flask)	Contents (mg/g dry wt)	
			Madecassoside	Asiaticoside
MS	0.5	0.2282	5.93	5.52
	1	0.3447	5.26	5.4
	2	0.213	4.78	4.51
	3	0.2608	4.55	4.35
B5	0.5	0.2325	7.12	7.74
	1	0.2997	6.98	7.3
	2	0.2289	6.46	6.89
	3	0.3081	6.72	6.59
RCM	0.5	0.1002	8.93	9.14
	1	0.1136	7.80	8.47
	2	0.1224	7.92	8.79
	3	0.1278	6.98	8.06

도에서 M&A의 생산성이 가장 높게 나타났다. 반면, $MgSO_4$ 는 B5 기본배지의 농도 (1 mM)보다는 높은 1~10 mM에서 높은 생산성을 보여주었다 (Figure 1~4).

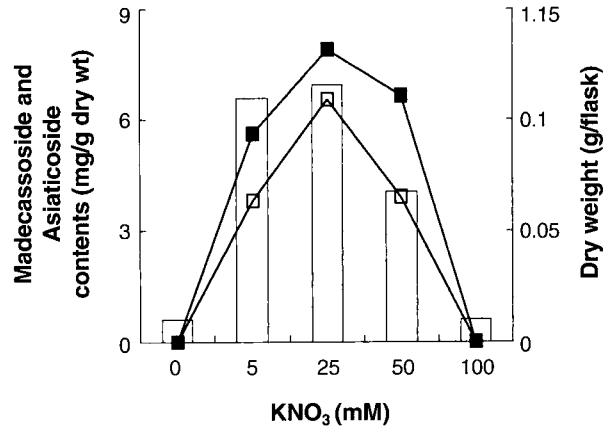


Figure 1. Effect of nitrogen (KNO_3) concentration on the growth and the madecassoside and asiaticoside contents of *C. asiatica* plantlet (■ : madecassoside, □ : asiaticoside).

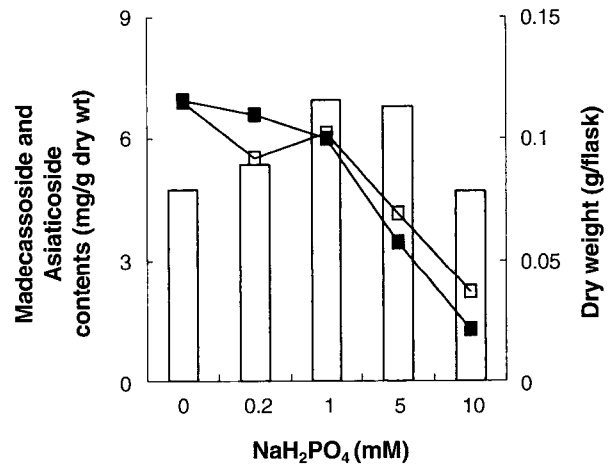


Figure 2. Effect of phosphate (NaH_2PO_4) concentration on the growth and the madecassoside and asiaticoside contents of *C. asiatica* plantlet (■ : madecassoside, □ : asiaticoside).

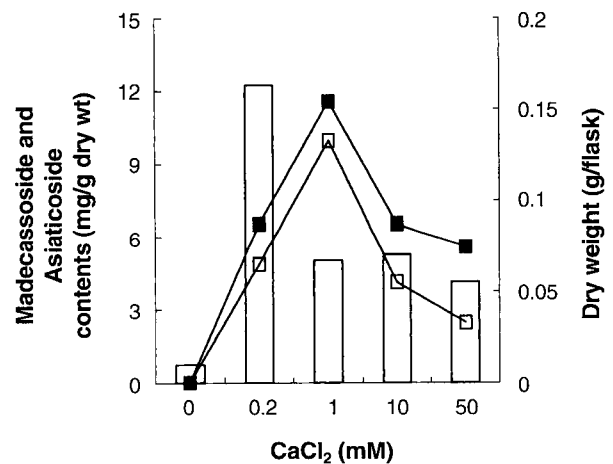


Figure 3. Effect of calcium ($CaCl_2$) concentration on the growth and the madecassoside and asiaticoside content of *C. asiatica* plantlet (■ : madecassoside, □ : asiaticoside).

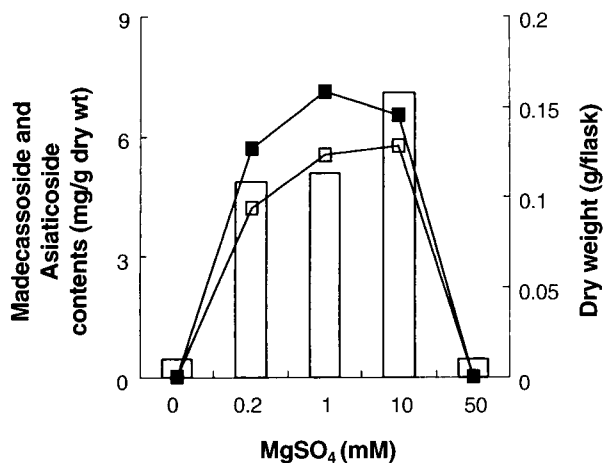


Figure 4. Effect of magnesium ($MgSO_4$) concentration on the growth and the madecassoside and asiaticoside content of *C. asiatica* plantlet (■: madecassoside, □: asiaticoside).

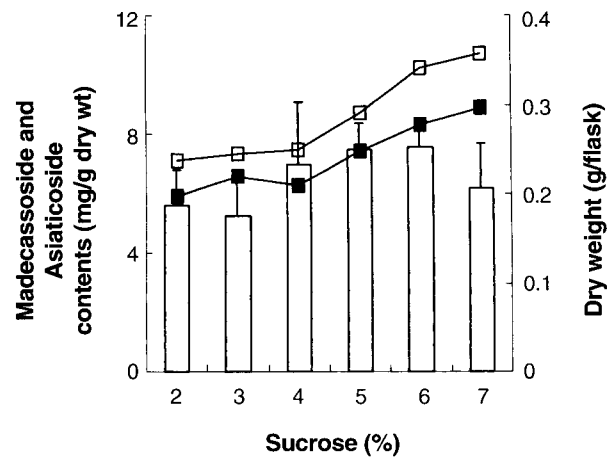


Figure 5. Effect of sucrose concentration on growth and madecassoside and asiaticoside contents of *Centella asiatica* plantlet (■: madecassoside, □: asiaticoside).

Sucrose 농도가 M&A의 생산에 미치는 효과

배지내 탄소원의 농도는 타가영양체인 배양세포의 성장에 크게 영향을 줄 뿐만 아니라 대사물질의 합성에도 중요한 영향을 미치게 된다 (Weathers et al. 1997). 따라서, 최적의 유용물질 축적을 위해 B5 배지에 sucrose를 2~7%까지 변화시켜 병풀 식물체 성장과 M&A 함량을 조사하였다. Sucrose 농도가 5%에서 가장 높은 성장을 나타냈고, 7%의 농도에서 함량 (madecassoside, 8.9 mg/g; asiaticoside, 10.24 mg/g dry wt.)이 가장 높은 값을 보여주었다 (Figure 5). 유사한 결과로는 시호의 모상근 배양에 있어 sucrose 농도가 5%일 때 tropane alkaloid 생산이 가장 높았으며 (Ahn et al. 1998), Hwang 등 (2000)은 대황의 모상근을 배양했을 때 sucrose 농도가 5%일 때 가장 높은 tannin 생산을 보고한 예가 있다. 이와는 반대로 저농도 탄소원인 1%의 sucrose 농도에서 운향 (*Ruta graveolens*)의 신초배양에서 furanocoumarins 생산이 가장 높았다 (Massot et al. 2000). 성장과 M&A 함량을 고려한 생산성을 고려해 볼 때 최적의 sucrose 농도는 6%로 결정되었다. 한편, 형태학적 특징으로, sucrose가 고농도 (4% 이상)로 배지에 첨가할 경우 병풀 잎의 엽록소 일부 분해로 잎이 노란색으로 변화했다. 반대로, sucrose 농도가 저농도 (2% 이하)일 경우 잎의 색깔이 더 푸른색을 보여주는데 그 이유는 sucrose를 저농도로 처리한 결과 식물의 조직에서 광합성 능력이 증가했기 때문이다. *Artemisia annua* plantlet와 *Prunus cerasifera* shoot 배양에서도 이러한 현상을 보여주었다 (Woerdenbag et al. 1993; Morini et al. 1992). 위의 결과로 sucrose 농도가 고농도로 첨가되었을 때 잎의 엽록소가 감소되었음에도 M&A가 증가하였고, 그와 반대로 저농도일 때 M&A는 감소하여 M&A 합성과 엽록소 합성의 상관관계는 없는 것으로 추정할 수 있다.

적 요

기내에서 병풀의 식물체 배양을 확립하였고 기본배지 설정 및 대량원소들, sucrose 농도가 triterpene glycoside (Madecassoside와 Asiaticoside: M&A) 생산에 대한 영향을 조사하였다. 병풀 식물체가 각각의 배지에서 배양되었을 때, MS와 RCM 배지는 각각 식물체 성장과 M&A 생산에 대해 가장 좋은 결과를 나타냈다. 하지만, M&A에 대해 가장 높은 생산성은 B5 배지로 나타내었다. B5 배지의 대량영양소인 KNO_3 는 25 mM, NaH_2PO_4 는 1 mM, $CaCl_2$ 는 1 mM 그리고 $MgSO_4$ 는 1~10 mM에서 M&A 생산이 최적을 이루거나 증가시켰다. Sucrose를 농도별로 처리했을 때, 6% sucrose 농도에서 가장 높은 M&A 생산을 얻을 수 있었다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Abou-Char CI (1963) New drugs from higher plants recently introduced into therapeutics. *Lebanese Pharma J* 8:15-37
- Ahn JC, Yang SJ, Pyo BS, Choi JW, Hwang B (1998) Improvement of tropane alkaloid productivity by optimization of sucrose concentration and addition of hydroxyapatite in hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Korea J Plant Tissue Cult* 25:21-25
- Baek YW (1997) Micropropagation of *Centella asiatica* (L.) Urban by in vitro cultures and production of triterpene glycosides. PhD thesis, Chonnam University, Kwangju
- Boiteau P, Nigeon-Dureuil M, Ratsimamanga AR (1951) Action of

- asiaticoside on the reticuloendothelial tissue. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de la Vie*. **232**:760-762
- Booncong P** (1989) A pharmacognostic and taxonomic study of *Centella asiatica* (Apiaceae). PhD thesis, Miami University, Ohio
- Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC** (1956) Glossary of Indian medicinal plants. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**:195-202
- Hausen BM** (1993) *Centella asiatica* (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weaker sensitizer. *Contact Dermatitis* **29**:175-179
- Hosokawa K, Y Oikawa, S Yamaura** (1998) Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium. *Plant Cell Rep* **17**:747-751
- Hwang SJ, MS Na, BS Pyo, JB Lee, Hwang B** (2000) Production of tannin from hairy root cultures of *Rheum undulatum* L. *Korea J Med Crop Sci* **8**:250-258
- Inhee MJ, Shin JE, Yun SH, Huh K, Koh JY, Park HK, Jew SS, Jung MW** (1999) Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *J Neurosci Res* **58**:417-425
- Jorge FS, Ferreira J, Jules J** (1996) Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tissue Org Cult* **63**:179-185
- Kavindra NT, Nilesh CS, Vaibhav T, Brahma DS** (2000) Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. *Plant Cell Tissue Org Cult* **63**:179-185
- Massot B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A** (2000) Optimized culture conditions for production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue Org Cult* **62**:11-19
- Mesnard P** (1975) Venotonic drugs with terpene active principles three recent acquisitions. *Israel Pharma J* **18**:330-337
- Moharana D, Moharana S** (1994) A clinical trial of metal in patients with various types of epilepsy. *Probe* **33**:160-162
- Montecchio GP, Samaden A, Carbone S, Vigotti M, Siragusa S, Piovela F.** (1991) *Centella asiatica* Triterpenic Fraction (CATTFF) reduces the number of circulating endothelial cells in subjects with post phlebotic syndrome. *Haematologica* **76**:256-259
- Morini S, Sciutti R, Fortuna P** (1992) In vitro growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. *Plant Cell Tissue Org Cult* **28**:245-248
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Patra A, Rai B, Rout GR, Das P** (1998) Successful plant regeneration from callus culture *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Growth Regul* **24**:13-16
- Rao A, Srinivasan K, Rao K** (1973) The effect of mandukpami (*Centella asiatica*) on general mental ability (Medhya) of mentally retarded children. *Res Indian Med* **8**:9-16
- Sharan R, Khare R** (1991) A clinical trial of Mentat in children with behavioural problems. *Probe* **31**:12-22
- Toivonen L, Ojala M, Kaupinnen V** (1991) Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol and Bioeng* **37**:673-680
- Weathers PJ, Hemmavanh DD, Walcerz DB, Cheetham RD, Smith TC** (1997) Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **33**:306-312
- White FF, Nester EW** (1980) Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. *J Bacteriol* **141**:1134-1141
- Woerdenbag HJ, Luers JFJ, van Uden W, Pras N, Malingre TM, Alfermann AW** (1993) Production of the new antimalarial drug artemisin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* **32**:247-257

(접수일자 2002년 10월 14일)