

2007년 2월

석사 학위 논문

Rosmarinic acid의 생합성 및 효과에 관한 연구

- 배초향 모상근을 통한 rosmarinic acid 생산과
항산화, 항암효과

조선대학교 대학원

생물학과

오 은 정

Rosmarinic acid의 생합성 및 효과에 관한 연구

- 배초향 모상근을 통한 rosmarinic acid 생산과
항산화, 항암효과

Biosynthesis and effects of rosmarinic acid

2007년 2월 23일

조선대학교 대학원

생물학과

오은정

Rosmarinic acid의 생합성 및 효과에 관한 연구

- 배초향 모상근을 통한 rosmarinic acid 생산과
항산화, 항암효과

지도교수 김 종 세

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2006년 10월

조선대학교 대학원

생물학과

오 은 정

오은정의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수 _____ (인)

위 원 조선 대학교 교수 _____ (인)

위 원 조선 대학교 교수 _____ (인)

2006년 11월 (석사)

조선대학교 대학원

목 차

Abstract	
I . 서론	1
II . 재료 및 방법	4
1. 식물재료	4
2. 박테리아 배양	4
3. 모상근 유도	4
4. 배초향 추출물의 항산화 활성	5
(1) 시료의 추출	5
(2) 항산화 활성 검정	5
5. 배초향추출물(근뿌리, 모상근)의 인체 암세포에 대한 저해효과	6
(1) 세포주 및 세포배양	6
(2) 암세포 증식 억제 효과	6
III . 결과	8
1. 모상근 유도 및 배양	8
(1) <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 종류에 따른 모상근 유도효과	8
(2) 식물생장조절제가 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향	10

2. 배초향(<i>Agrobacterium rogusa</i>)의 항산화 활성	-- 18
3. 배초향의 세포독성도	----- 21
(1) 폐암세포(Calu-6)에 대한 독성도	----- 21
(2) 위암세포(SNU-601)에 대한 독성도	----- 22
(3) 유방암세포(MCF-7)에 대한 독성도	----- 23
(4) 대장암세포(HCT-116)에 대한 독성도	----- 24
IV. 고찰	----- 26
V. 참고문헌	----- 32

Abstract

Biosynthesis and effects of rosmarinic acid

Oh Eun Jeong

Advisor : Prof. Kim Jong-se Ph.D.

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

Agastache rugosa Kuntze belonging to Korean mint family (Labiatae) is a perennial herb and is widely distributed in the East Asian countries with important role in the traditional medicine of several Oriental cultures. One of the main active constituents of Korean mint is rosmarinic acid which contains attributes like antioxidant and allelochemical properties.

Agrobacterium rhizogenes is a genus of gram-negative soil bacteria belonging to the *Rhizobiaceae*. *A. rhizogenes* can transfer T-DNA, excised from Ri(root inducing)-plasmids several hundred kb in size on the bacterial in the plant cell. It is the causal agent of 'hairy root' diseases in plants and used for the production of hairy root cultures from a multitude of species. Hairy root cultures of *Agastache rugosa* K. were established by infecting leaf explants with *Agrobacterium rhizogenes* R1000. Hairy roots were cultured in MS liquid medium and the maximum growth (219mg dry wt/

flask) was already reached by 30 days of culture with content of rosmarinic acid (0.14g/g dry wt). This result demonstrates that Korean mint hairy culture can be a valuable alternative approach for the production of rosmarinic acid.

Hairy root cultures from plants have attracted considerable attention because of their genetic and biochemical stability, rapid growth rate and ability to synthesize secondary products at levels comparable to the original plants.

서 론

식물에서 생산되는 유용물질(색소, 향, 약품 등)을 모상근(뿌리배양체)에서 생산하고자 하는 연구는 1980년대부터 활발히 진행되어 왔다(Chilton, 1982). 모상근 배양은 본 식물체 보다 더 많은 양의 천연물질(rosmarinic acid)을 생산할 수 있으며 빠른 시간 내 물질을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 그리고 물질 생산 및 뿌리 생육의 극대화를 위해 배지 조성 및 물질생산을 촉진 할 수 있는 물질 첨가(토양미생물, Gibberellin acid(GA), 질산은, putrescine) 등 배양 환경의 최적 조건을 확립하면 기내에서도 효과적으로 유용물질을 연중 생산 할 수 있다.

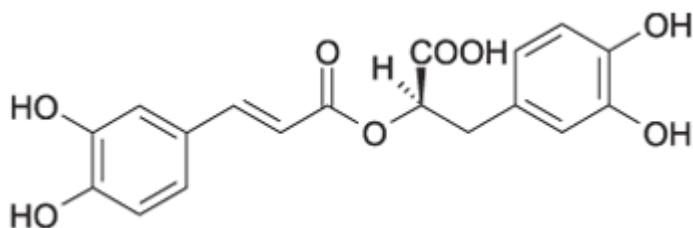


Fig.1 Rosmarinic acid의 구조

Rosmarinic acid(RA)는 꿀풀과(*Lamiaceae*)와 다른 식물에서 생산되는 다기능성 페놀릭 계통의 물질로 항산화, 항염, 아스마와 관절염 억제, 심장기관 보호 등의 효과를 가지고 있다. Rosmarinic acid의 항산화 능력은 Vitamin E(Vit E) 보다도 뛰어난 것으로 알려져 있으며, 세포손상이나 노화억제 효과가 뛰어나 북미에서는 건강보조제(알약형태) 또는 화장품의 원료로 이용되고 있다.

토양미생물 중 *Agrobacterium rhizogenes*가 식물체에 침입하여 그 토양미생물이 가지고 있는 Ri(Root induction)-플라스미드(Ri-plasmid) 내에 식물호르몬 옥신(auxin) 생산 관련 유전자가 들어있는 Transferred DNA(T-DNA)가 식물 염색체에 들어가 발현하면 자발적인 병증상의 하나로 잔뿌리가 발생하는데 착안 하여 기내에서 모상근을 이용한 식물 유용물질을 생산하는 연구가 현재도 활발하며 최

근에는 모상근에 유용물질 관련 유전자를 도입하여 유용물질의 생산량을 증대시키는 대사공학(metabolic engineering) 연구도 활발하게 이루어지고 있다.

*Agrobacterium tumefaciens*가 식물체에 감염되면 종양(tumor)을 유기시키는데 비하여 *Agrobacterium rhizogenes*은 모상근(hairy root)를 유지시키는데 이러한 현상은 이 균이 갖고 있는 플라스미드에 의한 것임이 밝혀졌다(White and Nester, 1980). 이와 같은 *Agrobacterium rhizogenes*는 토양미생물로서 chromosomal DNA 외에 Ri-plasmid를 가지고 있으며 (Moore *et al*, 1979), 식물체의 상처부위에 이 균이 감염되면 Ri-plasmid의 일부인 T-DNA가 식물체 게놈 내에 삽입되어 형질 전환된 모상근이 유도된다(Chilton *et al*, 1982 ; Tepfer, 1984).

모상근은 정상식물에서는 합성되지 않는 agropine 이나 mannopine 등의 opine 류가 합성되는데 이러한 opine의 합성은 *Agrobacterium rhizogenes* 균주가 갖고 있는 plasmid 내의 opine 합성유전자가 식물체내로 도입되어 발현되기 때문인 것으로 알려졌다 (Petit *et al*, 1983). 이와 같은 모상근은 호르몬 공급 없이 빠른 생장을 보이며 유전적, 생화학적으로 안정성이 있고 (Arid *et al*, 1988), 성분도 모식물체와 동일하거나 오히려 높아 경우도 있어 이차대사산물의 생산에 좋은 재료로 사용할 수 있어 그 가능성이 높은 것으로 알려졌다(Parr *et al*, 1988; Hamill *et al* 1986).

실제로 모상근 배양을 통하여 alkalioids , 색소 , 사포닌 등의 다양한 이차대사산물을 얻고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다(Yonemitsu *et al*, 1990; Parr *et al*, 1988; Sauerwein *et al*, 1991; Mukundan and Hjorto, 1991; Yoshikawa and Furuya, 1987).

외국에서는 Korean mint로 알려진 배초향(*Agastache rugosa*)은 꿀풀과에 속하는 우리나라 자생식물로 전체에서 강한 향기를 풍기는 방향성 식물이다. 배초향의 방향 정유의 주된 향기성분으로는 methylchavicol, limonene, eugenol, β -caryophyllene 등이 보고 되었으며, 이 중 methylchavicol의 함량이 가장 많다고 알려져 있다(kim *et al*, 2001).

본 연구는 조직배양 기술을 이용하여 배초향의 옆조직에서 모상근(뿌리배양체)을 유도하여 Rosmarinic acid 생산을 시도 하였으며, 지금까지 결과에 의하면 보통 다른 꿀풀과 식물(박하, 세이지, 레몬밤등) 들이 약 3 %의 Rosmarinic acid를 생산해 내는 것처럼 배초향(*Agastache rugosa*)도 식물체 전체에서 약 3 %를 차지

하는 것으로 알 수 있었다.

항산화제는 세포손상을 일으키는 Free radical로부터 세포를 보호하는 물질로서 serum이나 serum albumin 및 다른 고분자 물질들이 부족한 배양액에서 독소를 제거시켜준다(Lee *et al*, 2002). 이런 성질의 물질들은 우리 몸에 해를 주는 활성 산소(reactive oxygen species; ROS)를 제거한다는 측면에서 생물학자들 뿐 아니라 의학자들에게도 관심의 대상이 되고 있다.(Halliwell *et al*, 1995).

항산화 물질은 산화 가능한 물질의 산화를 지연 또는 방지 시킬 수 있는 물질이라고 넓게 해석해야 할 것이다(Halliwell and Gutteridge, 1990). 세포막에 손상을 주며 단백질과 핵산 등을 변성시키는 free radical은 singlet oxygen, superoxide anions, hydroxyl radicals 및 hydrogen peroxidase 등이 있다(Freeman *et al*, 1982).

천연 항산화 물질은 두류, 종실류, 향신류가 포함된 많은 식품이나 및 가수분해된 동식물 단백질과 비효소 갈색화 반응 생성물 등에서 발견되며 합성항산화제와 마찬가지로 환원제, free radical chain의 방해제 및 singlet oxygen quencher 또는 산화촉진 금속의 불활성제로 작용한다(Beak and Woo, 1993).

가장 널리 알려진 항산화 물질은 Vit E(α -tocopherol), Vit C(ascorbic acid), β -carotene (provitamin A), Squalene 등이 있으며 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 최근에는 Selenium, Soybean의 genestein, Oat의 caffeic & ferulic acid, Tomato의 lycopene, Green-tea의 catechin, Chocolate clovamid (CLV) 등 과 같은 다양한 polyphenol류가 항산화제로서 각광을 받고 있다(Lee and Kim, 2002).

한편 항산화 활성 측정법으로 실제 기질에 응용하는 방법 중의 하나인 racimat를 이용하여 돈지와 식물성유지 팜유에서 rosmarinic acid가 Vit E나 인공합성물질 BHT(butylated hydroxytoluene)에 비해서 월등히 우수한 항산화 활성을 나타냈다(Debra *et al*, 1997).

따라서 본 연구는 모상근 유도 및 배양 rosmarinic acid의 추출과 그 추출물을 이용한 항산화 효과와 암세포 증식억제에 대한 효과를 실험하여 항산화제 생산, 암세포 증식 억제 등을 검증하여 건강 보조제와 암치료 생산의 기초 자료에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료

배초향(*Agastache rugosa*) 종자를 70 % 에탄올에 1분간 침지하고 다시 2 % sodium hypochlorite 용액에 침지 후 10분간 천천히 흔들어주며 종자 소독을 마치고 멸균수로 3회 세척하였다. 약 7개의 종자를 25 mL의 MS 고체배지가 든 Petri dishes (100 x 15 mm)에서 배양을 하였다. 배양실 조건은 25 ° C에 백열등 하에서 16시간 광상태로 유지되었다.

2. 박테리아 배양

모상근 유도를 위해 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이용하였으며 배양은 Luria-Bertani 액체배지 (1 % [w v⁻¹] tryptone, 0.5 % [w v⁻¹] yeast extract, and 1 % [w v⁻¹] NaCl, pH 7.0)에서 16시간 동안 암 상태로 28 ° C의 진탕배양기에서 180 rpm으로 배양을 하였다. 배양된 박테리아는 원심분리기를 이용하여 1,500 rpm에서 10분간 회전 후 모아진 박테리아를 MS 액체배지로 밀도를 $A_{600} = 1.0$ 이 되게 조절하였다.

3. 모상근 유도

배초향 종자로부터 발아하여 7일 정도 자란 유식물체의 자엽을 잘라서 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 희석한 MS 액체배지에서 약 15분간 공동 배양을 한 후 멸균된 거름종이에서 박테리아를 어느 정도 제거 후 호르몬이 처리되지 않은 MS 고체배지에서 옮긴 후 이틀간 암 상태에서 공동 배양을 하였다.

이들간 공동 배양 후 멸균수를 이용하여 3회 세척을 하여 박테리아를 제거 후 호르몬이 처리되지 않고 항생제 timentin 200 mg/l이 처리된 MS 고체배지(MS salts and vitamins, 3 % (w v⁻¹) sucrose, and 8 g L⁻¹ Phytagar)에서 배양을 하였다. 배양 일주일 후 자엽에서 모상근이 유도되기 시작을 하였으며 유도된 모상근은 항생제가 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한 번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체 배지로 옮겨 배양을 하였다. 모상근 (100 mg) 은 40 mL 의 MS 액체배지가 든 삼각플라스크(125 mL)에서 암상태로 28 ° C의 진탕배양기에서 100 rpm으로 2 주간 배양을 하였다. 생육은 3일 마다 한 번씩 건물 중으로 조사를 하였다.

호르몬종류에 따른 모상근의 생장과 rosmarinic acid 함량을 조사하기 위하여 IAA, IBA, NAA,(0, 0.1, 0.5, 1 mg/l)를 사용하였으며, 또한 그 외 식물생장조절물질인 GA, 질산은, putrescine이 모상근의 생장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 30 ml의 배지에 100 mg의 모상근을 접종하여 진탕배양기에서 (27 °C, 100 rpm) 2주간 배양한 후 생체량과 색소함량을 측정하였다.

4. 배초향 추출물의 항산화 활성

(1) 시료의 추출

배초향의 근뿌리 및 모상근을 분쇄하여 건물량의 10배에 해당하는 에탄올을 첨가하여 상온에서 2회 추출하였다. 이 추출액을 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과 후 rotary vacuum evaporator로 감압농축한 후 동결 건조하여 항산화 활성검정에 사용하였다.

(2) 항산화 활성 검정

항산화활성 검색은 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois의 방법 약간 변형하여 측정하였다. 1×10^{-4} M DPPH와 농도별 추출물을 각각 100 μ l씩 취하여 혼합한 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 ELISA Reader(Bio-RAD, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정

하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(Scavenging activity)으로 표시하며, 50 % Recovery Concentration(RC₅₀)은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μg)으로 나타내었으며 항산화 물질로 잘 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)와 Vitamin C(ascorbic acid)와 비교하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = (1 - \text{As}/\text{Ac}) \times 100$$

Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

5. 배초향 추출물(근뿌리, 모상근)의 인체암세포에 대한 저해효과

(1) 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 인간유래 암세포주로서 폐암 세포인 Calu-6, 위암세포인 SNU-601, 유방암세포인 MCF-7, 대장암세포인 HCT-116을 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 RPMI 1640을 사용하였고 10 % Fetal Bovine Serum과 항생제(Antibiotic antimycotic)을 첨가하여 37 °C, 5 % CO₂의 습윤화된 Incubator에서 적응시켜 배양하였다. 세포는 dish의 80 % 정도 자랐을 때 PBS로 세척하여 Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)을 처리하여 2~3일마다 계대배양하였다.

(2) 암세포 증식 억제 효과

배초향 추출물에 의한 세포성장 억제 활성을 측정하기 위하여 4종의 암세포에 대해 MTT(Tetrazolium-based colorimetric) assay를 통한 세포독성능을 실험하였다. 96 well plate의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 인체암세포를 3×10^4 cell/mL의 농도가 되도록 조절하여 90 μL 씩 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 24시간동안 preincubation시킨 후 각 추출물을 농도별로 투여하였다. 세포주와 배초향 추출물이 처리된 plate를 CO₂ 배양기에서 3일간 배양시킨 후 MTT용액(5 mg/mL PBS) 10 μL 씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간 더 배양하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO 150 μL 로 잘 녹여서

Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 암세포주를 50 % 사멸하는데 필요한 세포 성장 저해농도(IC₅₀ ; 50 % inhibitory concentration)를 산출하였다. 측정된 흡광도는 아래의 방법으로 생존한 세포의 비율을 구하였다.

$$\text{Percent of viable cells (\%)} = \frac{\text{optical density with cytotoxic drug}}{\text{optical density without cytotoxic drug}} \times 100$$

결 과

1. 모상근 유도 및 배양

(1) *Agrobacterium rhizogenes* 종류에 따른 모상근 유도효과

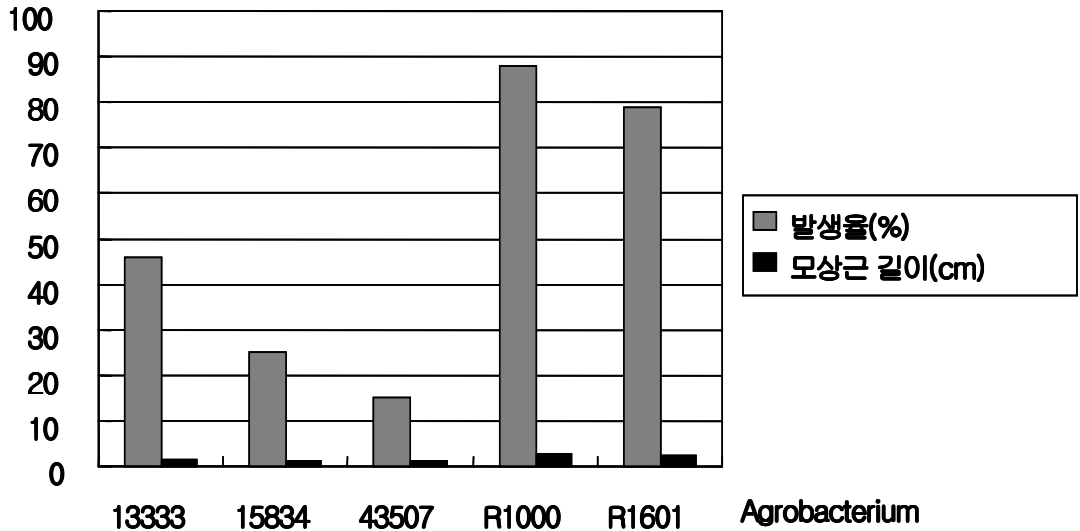
모상근 유도 및 배양

모상근을 유도하는 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* 5종(13333, 15834, 43507, R1000, R1601)을 이용하여 먼저 배초향에서 어떤 종류의 토양미생물이 모상근 유도와 생장에 가장 효과적인지를 조사하였다. 서로 다른 5종의 *Agrobacterium rhizogenes*을 이용하여 배초향 잎으로부터 모상근을 유도하였다. 토양미생물과 공동배양 후 항생제가 처리된 MS 고체배지에서 자엽을 배양한 결과 7일 후 모든 처리구의 앞에서 모상근이 유도되기 시작하였다.

Table 1. *Agrobacterium rhizogenes* 종류가 모상근 유도와 뿌리 생장에 미치는 효과

Agrobacterium	발생율(%)	모상근 길이(cm)
13333	46±4	1.4±0.2
15834	25±2	1.2±0.1
43507	15±1	1.1±0.1
R1000	88±9	2.6±0.2
R1601	79±6	2.4±0.2

Fig.2. *Agrobacterium rhizogenes* 종류가 모상근 유도과 뿌리 생장에 미치는 효과



4 주후 모상근의 유도율을 조사한 결과 대부분의 처리구에서 모상근 유도가 이루어졌으며, 그 중 *Agrobacterium rhizogenes* R1000이 가장 효과적이었다. 그래서 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이용하여 유도된 모상근으로 다음 실험들을 수행하였다.

Agrobacterium rhizogenes R1000을 이용하여 유도된 모상근은 항생제가 처리된 MS 고체배지에서 2주에 한번씩 계대배양을 약 2달간 지속하였으며, 빨리 자라는 모상근을 선발하여 MS 액체 배지로 옮겨 배양하였다.

(2) 식물생장조절제가 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향

식물생장조절제가 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 농도의 auxin을 처리하여 MS 액체 배지에서 배양 2주 후 생체 중과 rosmarinic acid 함량을 조사하였다.

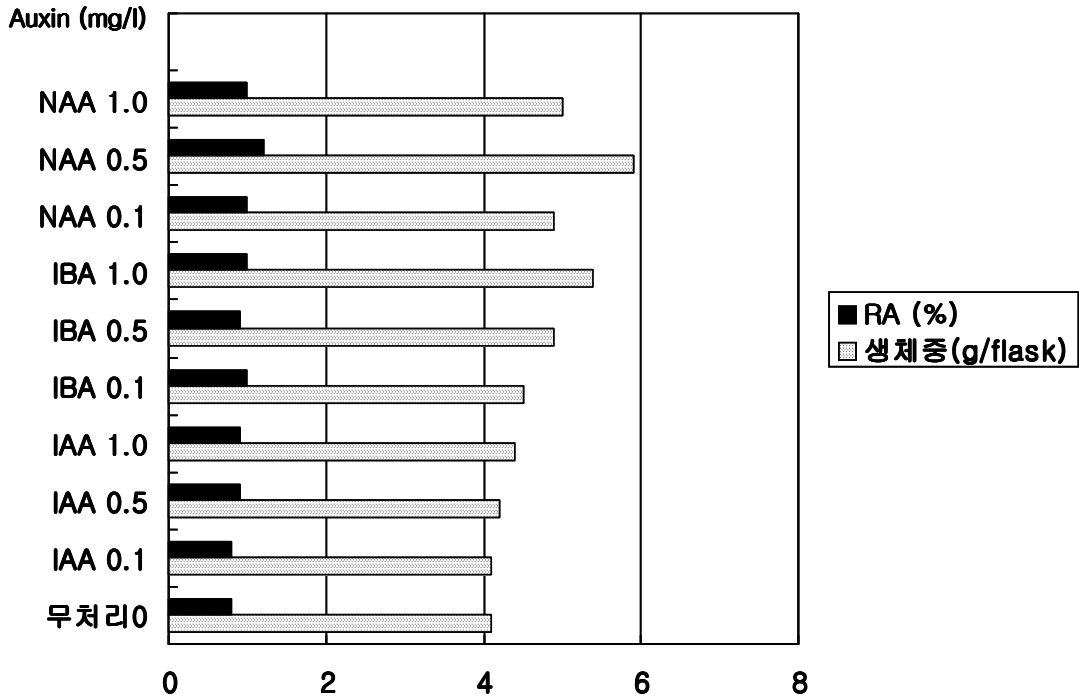
Table 2. 식물호르몬(auxin)이 배초향 모상근 성장과 RA생산에 미치는 영향
(MS 액체배지에서 2주간 배양)

Auxin (mg/l)	생체중 (g/flask)	RA (%)
무처리 0	4.1±0.4	0.8±0.1
IAA 0.1	4.1±0.3	0.8±0.1
IAA 0.5	4.2±0.5	0.9±0.1
IAA 1.0	4.4±0.4	0.9±0.1
IBA 0.1	4.5±0.3	1.0±0.1
IBA 0.5	4.9±0.5	0.9±0.1
IBA 1.0	5.4±0.6	1.0±0.1
NAA 0.1	4.9±0.5	1.0±0.1
NAA 0.5	5.9±0.6	1.2±0.1
NAA 1.0	5.0±0.5	1.0±0.1

RA(rosmarinic acid) , IAA(indoleacetic acid)

IBA(indole-butyllic acid), NAA(naphthalene acetic acid)

Fig.3. 식물호르몬(auxin)이 배초향 모상근 성장과 RA 생산에 미치는 영향
(MS 액체배지에서 2주간 배양)



RA(rosmarinic acid) , IAA(indoleacetic acid)

IBA(indole-butyllic acid), NAA(naphthalene acetic acid)

배양 3주후 대부분의 auxin 처리구에서 모상근 생육을 촉진시키는 것으로 나타났으며, IAA는 효과가 다른 옥신에 비하여 저조하였으며, 특히 NAA 0.5 mg/l 처리에서 5.9 g/flask로 가장 좋은 생육을 보였다(Table 2, Fig.3) rosmarinic acid 생산 역시 대부분의 auxin 처리구에서 증가되었지만, IAA 처리 효과가 다른 옥신에 비하여 저조하였으며, NAA 0.5 mg/l 처리에서 1.2 %로 가장 좋은 결과를 보였다.

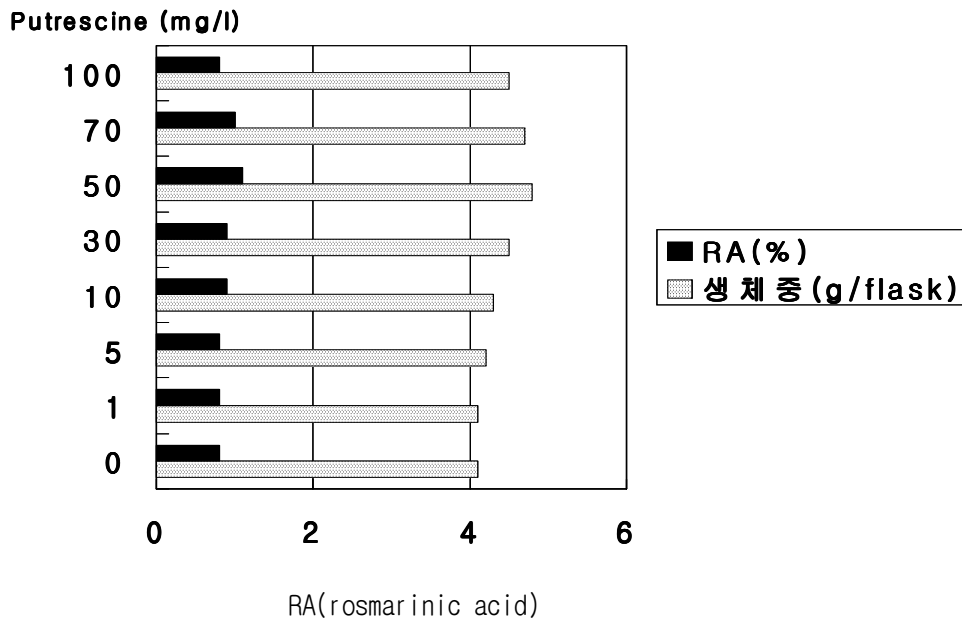
배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산을 향상시키기 위해 putrescine, 질산은, GA을 처리하여 MS 액체 배지에서 생체중과 rosmarinic acid 함량을 조사하였다.

Table 3. Putrescine이 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향

Putrescine (mg/l)	생체중 (g/flask)	RA(%)
0	4.1±0.4	0.8±0.1
1	4.1±0.4	0.8±0.1
5	4.2±0.4	0.8±0.1
10	4.3±0.4	0.9±0.1
30	4.5±0.5	0.9±0.1
50	4.8±0.5	1.1±0.1
70	4.7±0.4	1.0±0.1
100	4.5±0.5	0.8±0.1

RA(rosmarinic acid)

Fig.4. Putrescine이 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향



폴리아민의 일종인 putrescine은 세포분열을 촉진하고 뿌리 발육을 촉진하는 특성을 가진 식물생장조절제로 모든 처리구에서 전반적으로 뿌리 발육을 촉진하였으며, rosmarinic acid 생산량도 조금 증가시켰다. putrescine 50 mg/l 처리가 모상근 생장과 rosmarinic acid 생산에 가장 효율적인 것으로 나타났다(Table 3, Fig 4).

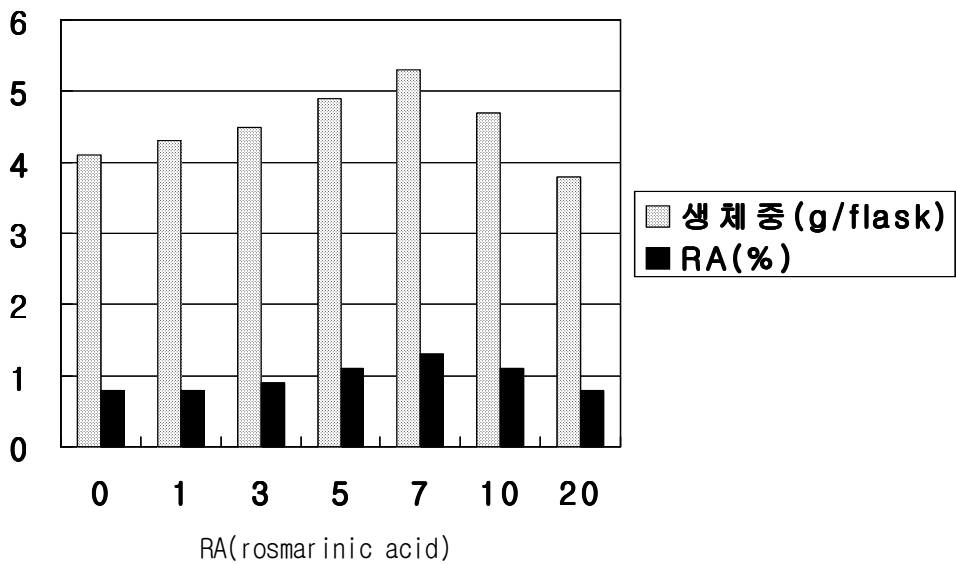
Table 4 . 질산은이 배초향 모상근 성장과 RA(rosmarinic acid) 생산에 미치는 영향

질산은 (mg/l)	생체중 (g/flask)	RA(%)
0	4.1±0.4	0.8±0.1
1	4.3±0.4	0.8±0.1
3	4.5±0.5	0.9±0.1
5	4.9±0.6	1.1±0.1
7	5.3±0.5	1.3±0.1
10	4.7±0.5	1.1±0.1
20	3.8±0.4	0.8±0.1

RA(rosmarinic acid)

Fig. 5. 질산은이 배초향 모상근 성장과 RA(rosmarinic acid) 생산에 미치는 영향

질산은 (mg/l)



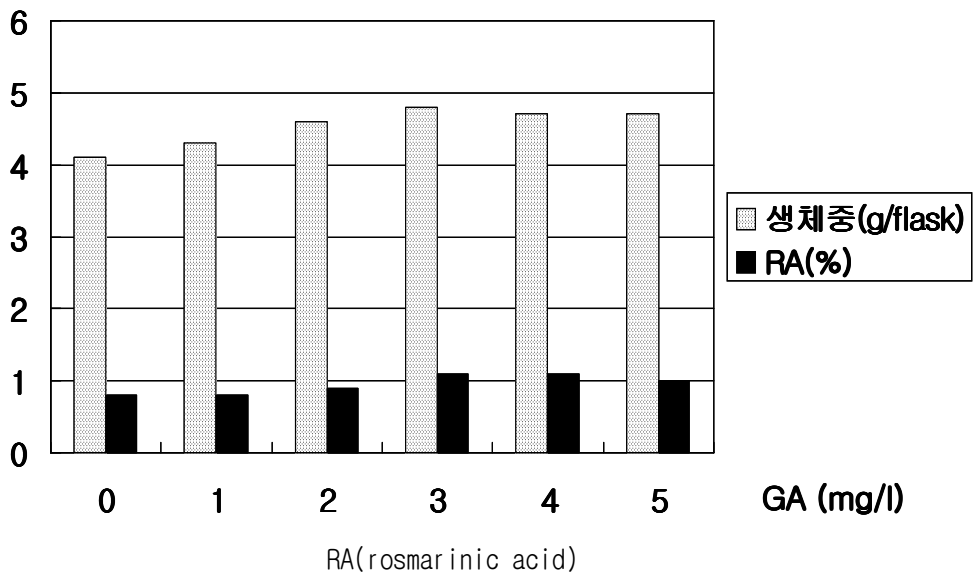
질산은은 기내 배양 시 에틸렌 가스의 생성을 억제하고 뿌리생육을 촉진하는 식물생장 조절로 putrescine과 마찬가지로 모든 처리구에서 전반적으로 뿌리 발육을 촉진하였으며, rosmarinic acid 생산량도 조금 증가시켰다. 하지만 putrescine 처리보다 효과가 뛰어났으며 7 mg/l 처리가 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 가장 효율적인 것으로 나타났다(Table 4, Fig.5).

Table 5. GA(gibberellin acid)가 배초향 모상근 성장과 RA(rosmarinic acid) 생산에 미치는 영향

GA (mg/l)	생체중 (g/flask)	RA(%)
0	4.1±0.4	0.8±0.1
1	4.3±0.5	0.8±0.1
2	4.6±0.5	0.9±0.1
3	4.8±0.4	1.1±0.1
4	4.7±0.5	1.1±0.1
5	4.7±0.4	1.0±0.1

RA(rosmarinic acid)

Fig. 6. GA(gibberellin acid)가 배초향 모상근 성장과 RA(rosmarinic acid) 생산에 미치는 영향



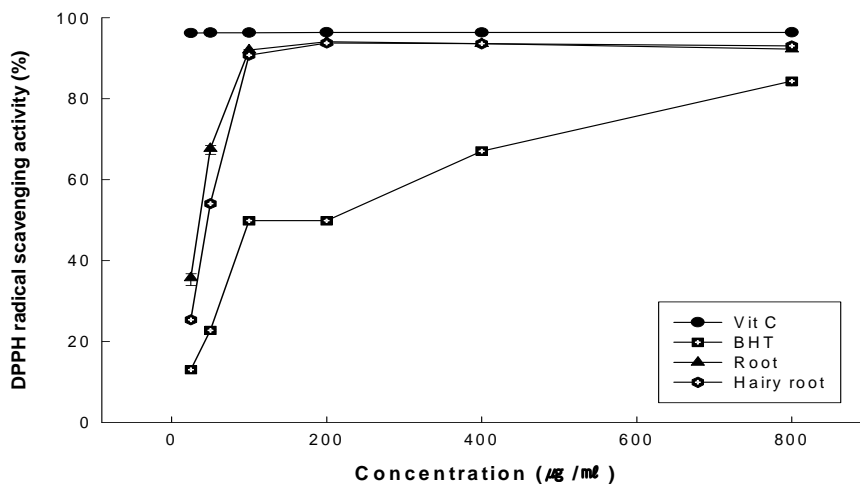
GA(gibberellin acid)는 일반적으로 세포분열을 촉진하며 식물체의 줄기 신장을 촉진하는 특성을 가지고 있으며 모든 처리구에서 전반적으로 뿌리 발육을 촉진하였으며, rosmarinic acid 생산량도 조금 증가시켰다. 3 mg/l 처리가 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 가장 효율적인 것으로 나타났다. (Table 5, Fig.6)

위의 결과 배초향 배양을 통해 rosmarinic acid 생산의 가능성을 탐색 할 수 있었으며 추후 rosmarinic acid 생합성 관련 유전자를 활용하여 대사공학을 추진하여 더 많은 rosmarinic acid 생산을 할 수 있는 배초향 개발을 시도할 계획이다.

2. 배초향(*Agastache rugosa*)의 항산화 활성

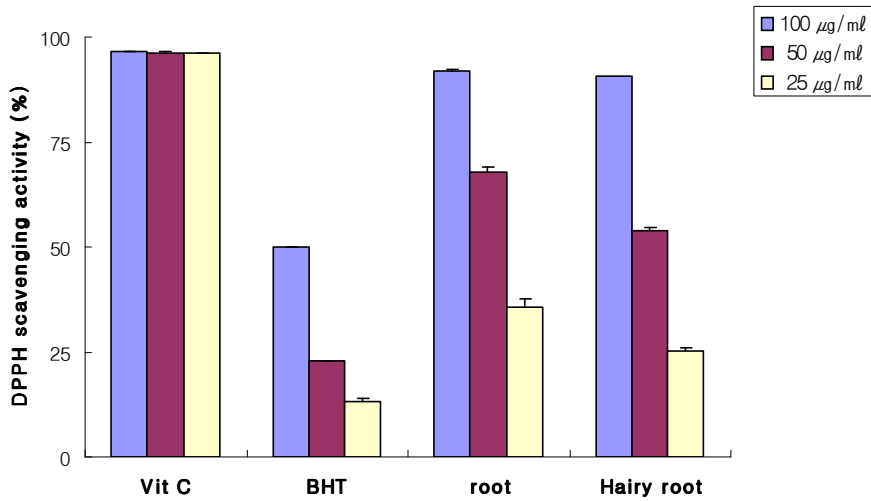
배초향의 근뿌리와 모상근 추출물의 항산화 작용을 DPPH법에 의해 측정된 결과 Fig. 7~8 과 Table 6에 나타내었다.

Fig.7. DPPH 라디칼 소거능을 이용한 배초향의 항산화 측정



Vit C(ascorbic acid) , BHT(butylated hydroxytoluene)
DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Fig. 8. DPPH 라디칼 소거능을 이용한 배초향의 항산화 측정



Vit C(ascorbic acid) , BHT(butylated hydroxytoluene)
 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

25~800 µg/ml의 각 농도별 항산화 활성을 측정한 결과 800~100 µg/ml의 농도에서 근뿌리 및 모상근 추출물은 90 % 이상의 높은 소거율을 보였다. 100 µg/ml 이하의 농도에서는 각 추출물의 항산화 활성을 확인한 결과 Fig. 8에서 보듯이 BHT를 제외한 Vit C, 근뿌리 및 모상근은 100 µg/ml의 농도에서 90 % 이상의 소거율을 보였다. 그리고 50 µg/ml의 농도에서 근뿌리와 모상근의 항산화 효과를 구체적으로 비교할 수 있었는데 근뿌리가 모상근에 비하여 13 % 이상 높은 소거율을 보여 더 높은 항산화효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Table. 6. DPPH법을 이용한 배초향의 항산화 활성도

<i>Agastache rugosa</i>		RC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
Root		35.66		
Hairy root		49.15		
Control group				
Vit C		≤ 25		
BHT		201.25		

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Vit C	BHT	root	Hairy root
800	96.38 \pm 0.04	84.33 \pm 1.13	92.27 \pm 0.07	93.08 \pm 0.08
400	96.36 \pm 0.08	67.04 \pm 0.64	93.61 \pm 0.08	93.58 \pm 0.07
200	96.40 \pm 0.00	49.84 \pm 0.79	94.05 \pm 0.04	93.74 \pm 0.04
100	96.33 \pm 0.00	49.84 \pm 0.79	92.04 \pm 0.27	90.79 \pm 0.07
50	96.31 \pm 0.04	22.73 \pm 0.27	67.64 \pm 1.41	54.03 \pm 0.69
25	96.20 \pm 0.07	13.03 \pm 0.76	35.67 \pm 1.89	25.33 \pm 0.55

RC_{50} (50% Recovery Concentration)

Vit C(ascorbic acid) , BHT (butylated hydroxytoluene)

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

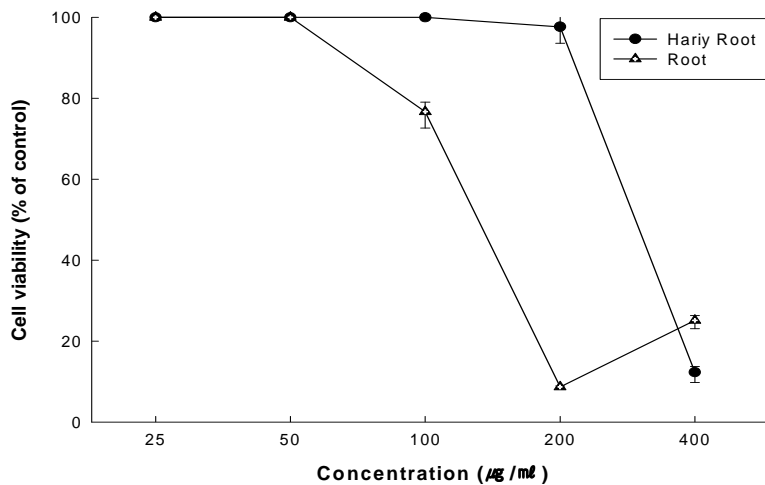
최저농도인 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 근뿌리는 35.67 %, 모상근은 25.33 %의 소거율을 보여 근뿌리에 의한 항산화 효과가 10 % 정도 높게 나타났다. DPPH 농도를 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양인 RC_{50} 값으로 비교해보면 근뿌리는 35.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 모상근은 49.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 근뿌리가 더 낮은 농도에서 RC_{50} 값을 보여 더 효과가 높은 것으로 확인되었다. 또한 대조군인 Vit C는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 RC_{50} 값이 나타날 것으로 확인되었으며 합성항산화제인 BHT는 201.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 확인되어 배초향의 모상근 및 근뿌리 추출물에 의한 항산화 활성이 월등히 높은 것으로 확인되었다.

3. 배초향의 세포독성도

(1) 폐암세포(Calu-6)에 대한 독성도

인간유래 암세포 중 폐암세포인 Calu-6에 배초향 추출물(근뿌리, 모상근)을 처리하여 각 추출물이 암세포의 생존에 미치는 영향을 비교한 결과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도일 때 근뿌리 추출물은 약 10%의 생존율을 보였고 모상근 추출물은 95% 이상의 생존율을 보여 근뿌리 추출물에 의해 Calu-6세포의 억제효과가 더 높음을 확인할 수 있었다. IC_{50} 값 또한 근뿌리의 경우 138.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 모상근 311.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 훨씬 낮은 농도에서 나타났다.

Fig. 9. 인간암세포 Calu-6에 대한 배초향에서의 MTT assay



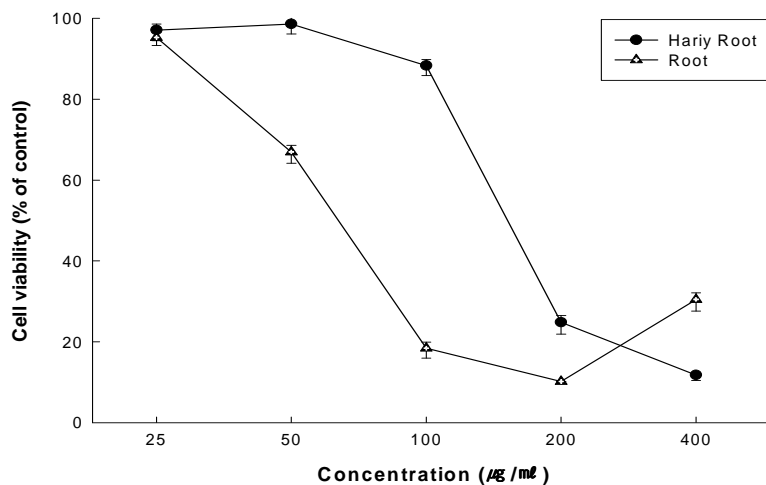
MTT(Tetrazolium-based colorimetric)

Calu-6(Human pulmonary carcinoma)

(2) 위암세포(SNU-601)에 대한 독성도

인간유래 암세포 중 위암세포인 SNU-601에 배초향 추출물(근뿌리, 모상근)을 처리하여 각 추출물이 암세포의 생존에 미치는 영향을 비교한 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 근뿌리 추출물은 약 80 %의 억제효과를 보였으나 모상근 추출물은 약 10% 정도 억제효과 보였다. IC_{50} 값을 살펴보면 근뿌리는 67.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 모상근은 160.83 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 4종의 암세포 중 위암의 억제효과가 가장 높게 나타났다.

Fig. 10. 인간암세포 SNU-601에 대한 배초향에서의 MTT assay



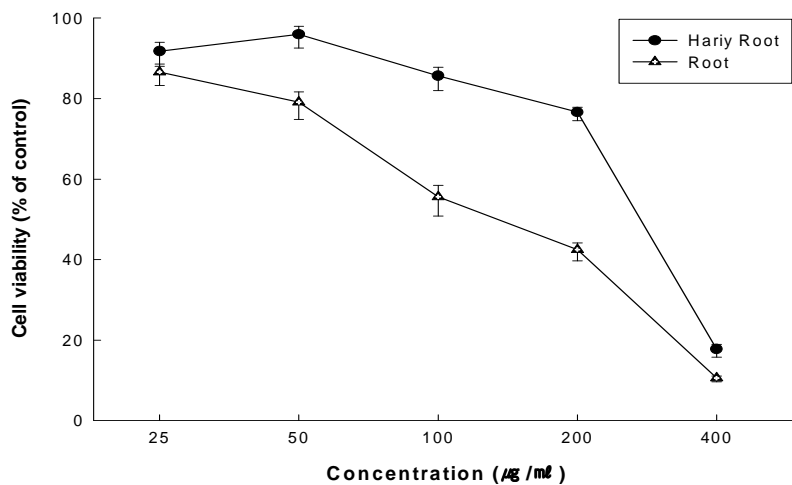
MTT(Tetrazolium-based colorimetric)

SNU-601(Human gastric carcinoma)

(3) 유방암세포(MCF-7)에 대한 독성도

인간유래 암세포 중 유방암세포인 MCF-7에 배초향 추출물(근뿌리, 모상근)을 처리하여 각 추출물이 암세포의 생존에 미치는 영향을 비교한 결과 각 농도에서 근뿌리 추출물이 모상근 추출물에 비해 세포생존을 억제하는 것으로 확인되었다. 그 중 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 근뿌리 추출물은 약 58 %의 억제효과를 보였으나 모상근 추출물은 약 23 % 정도 억제효과를 보였다.

Fig.11. 인간암세포 MCF-7에 대한 배초향에서의 MTT assay



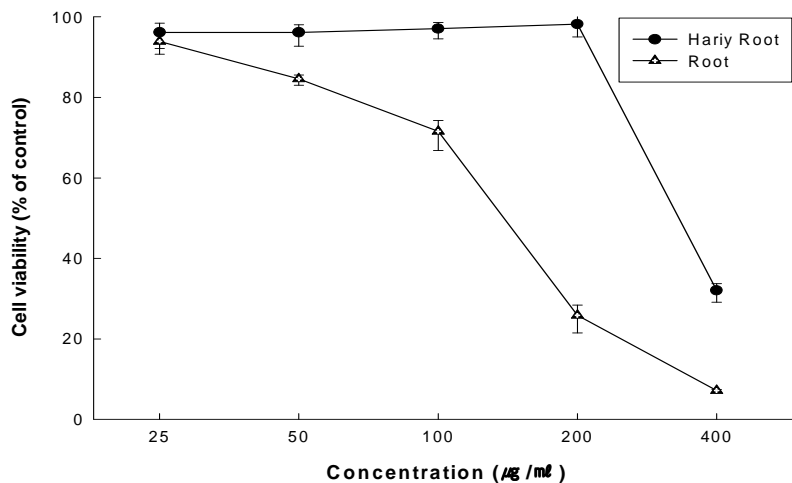
MTT(Tetrazolium-based colorimetric)

MCF-7(Human breast cancer)

(4) 대장암세포(HCT-116)에 대한 독성도

인간유래 암세포 중 대장암세포인 HCT-116에 배초향 추출물(근뿌리, 모상근)을 처리하여 각 추출물이 암세포의 생존에 미치는 영향을 비교한 결과 HCT-116세포도 모상근 추출물보다 근뿌리 추출물에 의해 생존억제효과가 더 높게 나타났다. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 근뿌리 추출물은 약 80%의 억제효과를 보였으나 모상근 추출물은 대부분의 세포가 생존하여 유의할 만한 효과가 없었다. IC_{50} 값을 통해 비교해보면 근뿌리는 147.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 모상근은 346.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 확인되어 SNU-601에 이어 다음으로 효과가 좋았다.

Fig.12. 인간암세포 HCT 116에 대한 배초향에서의 MTT assay



MTT(Tetrazolium-based colorimetric)

HCT 116(Human colon carcinoma)

Table 7. 인간 암세포 Calu-6, SNU-601, HCT116, MCF-7에 대한 배초향의 항암활성효과

Cell Line	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/ml)	
	Hairy Root	Root
Calu-6 ²⁾	311.49	138.85
SNU-601 ³⁾	160.83	67.71
HCT-116 ⁴⁾	346.13	147.48
MCF-7 ⁵⁾	289.77	142.83

Each value was expressed as mean ± standard deviation (n=3).

1) Extract concentrations which inhibit 50% growth of the cells.

2) Human pulmonary carcinoma 3) Human gastric carcinoma

4) Human colon carcinoma 5) Human breast cancer

인간 유래 암세포 중 Calu-6, SNU-601, HCT-116, MCF-7의 IC₅₀값을 비교한 결과 Calu-6인 폐암세포는 근뿌리에서 138.85 μg/ml, 모상근에서 311.49 μg/ml, SNU-601 위암세포는 근뿌리에서 67.71 μg/ml, 모상근에서 160.83 μg/ml, 대장암세포 HCT는 근뿌리에서 147.48 μg/ml 모상근에서 346.13 μg/ml, 유방암세포 MCF-7은 근뿌리에서 142.83 μg/ml 모상근에서 289.77 μg/ml로 나타났다(Table 7).

이로 미루어 보아 배초향 추출물이 암세포에 미치는 영향은 4종 암세포 모두 모상근 추출물보다 근뿌리 추출물에 의해 세포생존을 억제하는 것으로 확인되었고 위암세포에서 가장 큰 억제효과를 보였으며 유방암세포, 폐암세포, 대장암세포의 순으로 나타났다.

고 찰

처음 두 명의 이탈리아 화학자인 Scapati and Oriente(1958)가 rosmarinic acid를 순수한 합성물로 분리한 이후 지금까지 rosmarinic acid에 관한 연구는 계속되고 있다. 본 연구 역시 배초향에서 토양미생물 중 *Agrobacterium rhizogenes*을 이용하여 모상근을 유도하고 Auxin, Putrescine, 질산은을 이용하여 가장 효율적으로 rosmarinic acid를 생산할 수 있는 방법을 연구하였다. rosmarinic acid는 ester of caffeic acid와 3,4-dihydroxyphenyl-lactic acid이며 rosmarinic acid는 항바이러스, 항박테리아, 항염증, 항산화 등 흥미로운 생물학적 활성을 가진다 (Maiké and Monique, 2003).

rosmarinic acid를 생산하기 위해서는 모상근 배양이 이루어져야 하는데 모상근을 유도하는 토양미생물은 본 연구에서 사용된 *Agrobacterium rhizogenes* 13333, 15834, 43507, R1000, R1601뿐 아니라 LBA 94-1, NCIB 8196, C58C1, A₄CUS 등 여러 가지가 있는데 *Pueraria phaseoloides*는 agropine형의 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834를 사용함으로써 모상근 배양이 이루어졌으며 가장 높은 유도율은 감염 후 30일이 지난 후에 약 70 %정도로 보여졌다(Shi and Kintzios, 2003). *Lithospermum canescens*(Michx.)는 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, LBA 9402, NCBI 8196으로 모상근을 유도하였고 *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402는 사용 후 11일 째에 첫 뿌리가 자랐으며 6주 후에는 55개의 뿌리를 관찰할 수 있었다. 이는 ATCC 15834, NCBI 8196를 사용했을 때는 22일 째에 3개의 뿌리만 자라난 것과 비교하였을 때 LBA 9402가 더 높은 효과가 있었다는 것을 알 수 있었으며(Pietrosiuk *et al*, 2006) *Pinus nigra*에도 *Agrobacterium rhizogenes* 8196, 15834, C58C1로 감염시켰을 때 모든 배지(solid, solid+AC(activated charcoal), liquid, liquid+AC)에서 *Agrobacterium rhizogenes* 8196이 가장 높은 감염률을 보였으며 C58C1, 15834의 순으로 15834의 감염률이 가장 낮게 나타났다(Mihaljevic, Stipkovic and Jelaska, 1996). *Paulownia elongata*는 모상근 배양

을 위해 *Agrobacterium rhizogenes* R1601를 이용하였을 때 감염부위에서 33%의 모상근 생산량을 보였으며(Bergamnn, Lin and Whetten, 1999) *Lobelia inflata* 역시 *Agrobacterium rhizogenes* R1601을 이용하여 모상근을 배양하였다(Balvanyos *et al*, 2004). *Gentiana macrophylla*를 1/2 MS와 B₅가 첨가된 배지에서 *Agrobacterium rhizogenes* A₄CUS, R1000, LBA 9402, ATCC 11325를 감염시켰을 때 R1000이 32%로 가장 높은 생산률을 보였고(Tiwari *et al*, 2006) 인삼은 1/2 배지에 500 mg/l의 cefotaxime이 첨가된 배지를 사용하고 *Agrobacterium rhizogenes* 8196, 13257, 13264, 15834, R1000, A₄ 사용하여 모상근을 배양하였을 때 R1000 및 A₄가 가장 좋은 효과를 보였다(Yang *et al*, 1999). 본 연구에서는 *Agrobacterium rhizogenes* 15834는 낮은 효과를 보였지만 *Pueraria phaseoloides*를 이용한 Shi and Kintzio의 보고에서는 높은 모상근 배양이 이루어졌고 *Lithospermum canescens* (Pietrosiuk *et al*, 2006) 와 *Pinus nigra*(Mihaljevic, Stipkovic and Jelaska, 1996)의 보고에서는 낮은 효과를 보여 본 연구와 비교했을 때 *Agrobacterium rhizogenes* 15834가 다른 토양미생물에 비해 25 % 발생률로 낮은 효과를 보이는 것과 유사했다. *Paulownia elongata*(Bergamnn, Lin and Whetten, 1999)와 *Lobelia inflata* (Balvanyos *et al*, 2004)의 보고에서 *Agrobacterium rhizogenes* R1601를 사용하였을 때 높은 유도율을 보였는데 본 연구에서도 *Agrobacterium rhizogenes* R1601이 R1000 다음으로 높은 유도율을 보였으며 *Agrobacterium rhizogenes* R1601 역시 모상근 배양에 효과적이라고 사료된다. *Gentiana macrophylla*(Tiwari *et al*, 2006)와 인삼(Yang *et al*, 1999)을 이용한 보고에서는 *Agrobacterium rhizogenes* R1000이 높은 유도율이 보였으며 본 연구에서 *Agrobacterium rhizogenes*의 종류에 따른 모상근 유도율과 뿌리 생장에 미치는 효과를 알아보기 위해 *Agrobacterium* 13333, 15834, 43507, R1000, R1601를 사용하였으며 *Agrobacterium* R1000이 가장 탁월한 효과가 있었던 결과와 유사하며 R1000이 모상근 배양에 가장 효과적이라 사료되어 진다.

식물 생장 조절제가 배초향 모상근 성장과 rosmarinic acid 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 0, IAA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l), IBA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l), NAA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l)를 처리하였고 NAA 0.5 mg/l를 사용하였을 때 생체중과 rosmarinic acid가 가장 좋은 생육을 보였는데 *Panax ginseng*과 *Panax*

*quinquefolium*에서 0, BSAA(benzoselenienyl acetic acid, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), IAA(10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), IBA(10^{-7} , 10^{-6} M)를 사용하여 뿌리를 배양 시켰을 때 BSAA 10^{-6} M에서 가장 높은 생산량을 보였다(Kevers *et al*, 1999). *Hyoscyamus muticus*에 IAA, IBA, NAA 각각에 2.5 μ M을 사용하였을 때 NAA에서 가장 높은 증가율을 보였고(Biondi *et al*, 1997) *Taraxacum platycarpum*에서 부정근 형성을 위하여 본 연구와 같은 농도의 식물 조절제의 비율 0, IAA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l), IBA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l), NAA(0.1, 0.5, 1.0 mg/l)를 사용하였을 때 0.5 mg/l NAA를 첨가 구에서 가장 높은 78.3 ± 5.9 %의 부정근이 형성되었고(Lee *et al*, 2004) *Camptotheca acuminata*의 모상근 형성에서도 0.5 mg/l NAA가 모상근 생장에 가장 큰 효과를 보였다(Lorence *et al*, 2004). *Panax ginseng*와 *Panax quinquefolium* (Kevers *et al*, 1999)를 이용한 식물 성장조절제의 모상근 생장을 보았을 때 본 연구에서는 BSAA를 사용하지 않았지만 BSAA 역시 뿌리 생장에 효과적일 것으로 사료되며 *Hyoscyamus muticus*(Biondi *et al*, 1997), *Taraxacum platycarpum*(Lee *et al*, 2004), *Camptotheca acuminata*(Lorence *et al*, 2004)에서의 보고는 본 연구와 아주 유사하며 NAA가 뿌리 생장에 큰 효과를 보이는 것으로 생각되어 진다.

Cichorium intybus L. cv. Lucknow Local(Wioloof Chicory)에서 putrescine이 모상근 생장에 미치는 영향에 관한 보고에서 putrescine 1.5 mM에서 대조구(11 ± 0.9 cm)와 비교했을 때 1차근은 (18.3 ± 1.4 cm)로 큰 증가율을 보였으며 2,3차근 역시 많은 증가를 보였다(Bais, Sudha and Ravishankar, 1999). 앞에서 언급한 바와 마찬가지로 폴리아민 일종인 putrescine은 세포분열을 촉진하고 뿌리발육을 촉진하는 특성을 가지며 본 연구에서 putrescine 50 mg/l일 때 가장 효과가 좋았다.

질산은은 기내 배양 시 에틸렌 가스의 생성을 억제하고 뿌리 생육을 촉진하는 식물 성장 조절제로 1998년 Castillo 등의 보고에 의하면 질산은은 식물체의 재분화를 촉진하였으나 질산은이 10 μ M가 포함된 배지에서 뿌리 생장이 감소하였다. 이는 본 연구에서도 일정농도 이상(10, 20 mg/l)에서는 모상근 생장이 감소한 것으로 보아 비슷한 결과를 보였으며 본 연구에서 질산은이 7 mg/l 처리하였을 때 가장 높게 나타났다.

Gibberellin acid(GA)는 일반적으로 세포 분열을 촉진하며 식물체의 줄기 신장

을 촉진하는 것으로 Lenton (1994) 등의 보고에 의하면 gibberellin acid(GA)가 잎의 길이 생장과 뿌리의 성장을 보였으며 Ford (2002)등에 의하면 *Prunus avium* (cherry)에 gibberellin A₃(GA₃)를 0, 10, 30, 50 µg을 처리하였을 때 50 µg이었을 때 가장 높은 뿌리 성장을 보여 농도가 증가할수록 뿌리성장 역시 증가하였으나 본 연구에서는 gibberellin acid를 0, 1, 3, 4, 5 mg/l를 처리하였을 때 3 mg/l에서 가장 효율적으로 나타났다.

그 외에도 rosmarinic acid는 세포 현탁 배양이나 줄기배양에 의해서도 합성되는데 *Agastache rugosa*의 잎으로 캘러스와 현탁 배양 하였을 때 현탁 배양의 성장은 접종 후 15일후에 최대가 되었는데 세포에서 rosmarinic acid의 함량은 천천히 증가되었고 배양의 정점 단계에서 접종 후 18일 후 최대 (0.42 mg g⁻¹ dry weight)가 되었다(Kim *et al.*, 2001). *Anchusa officinalis*의 세포 현탁 배양에서도 rosmarinic acid를 합성하였고(Mizukami and Ellis, 1991) *Salvia officianlis. L.*의 세포 현탁 배양을 했을 때 자연적인 항산화제인 rosmarinic acid가 생산되었다(Hippolyte *et al.*, 1992). Sweet basil(*Ocimum basilicum L.*)에서 잎으로부터의 현탁 배양을 통한 rosmarinic acid의 축적은 1 g당 10 mg의 dry weight이고 그 식물체의 잎 또는 캘러스배양보다 그 가치가 11배 높았다(Kintzios *et al.*, 2003).

*Mentha arvensis*의 줄기 배양에서 Rosmarinic acid 합성은 다양한 설탕의 농도와 KH₂PO₄의 다른 양 그리고 페닐알라닌이나 펩톤 같은 시약의 첨가 등 4개의 다른 배지에서 평가되었다. 줄기의 성장은 3 %의 설탕과 30 mg l⁻¹의 페닐알라닌이 첨가된 액체 MS배지에서 가장 많은 rosmarinic acid (0.21 mg g⁻¹)가 생산되었다. 이것은 *Mentha arvensis*의 줄기 배양에서 rosmarinic acid 합성에 관한 최초의 논문이다(Phatak and Heble, 2002).

또한 여러 동식물에 의한 항산화와 항암작용도 활발한 연구가 진행 되었는데 로즈마리의 항산화 활성은 식물생장조절물질에 따라 다른 경향을 보였고, 2,4-D 0.1 mg/l를 첨가하여 배양된 캘러스에서 43 µg(RC₅₀)으로 가장 높았고 라벤더의 항산화 활성은 잎의 경우 2,4-D 0.1 mg/l를 첨가하여 배양된 캘러스에서 37.6 µg(RC₅₀)으로 잎 보다 2배 정도 강한 항산화 활성을 보였으며 다른 처리구 에서도 잎 보다 강한 활성을 보였다(Yoon *et al.*, 2006). 참당귀(*Angelica gigas*) 추출물

1mg/ml의 농도에서 열수추출물의 free radical 소거 효과는 메탄올 추출물보다 높게 나타났으며 농도 의존적으로 DPPH free radical 소거 효과가 상승하는 것을 관찰하였다(Kang *et al*, 2004). 주름 미더덕(*Styela plicata*)에 methanol, ethanol, acetone, 물을 가하여 추출물을 제조하여 항산화 활성과 항암활성을 조사하였을 때 신선 주름 미더덕 추출물의 경우에는 acetone 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며 동결건조 주름 미더덕 분말로부터 추출한 경우에는 ethanol 추출물의 높은 활성을 나타내었다. 대장암 세포주 HT-29에 대한 주름 미더덕 추출물의 암세포 증식 억제 효과는 동결건조 주름 미더덕 추출물에서 높은 활성을 보였다(Kim *et al*, 2005). 무릇에서 암세포의 증식을 억제하는 물질인 nortriterpenoid oligosaccharide인 scillalloside E-3와 E-1을 분리하였을 때 두 화합물의 암세포 증식 억제능은 비슷한 정도를 나타내었다(Lee *et al*, 2001). 인삼에 관한 항암연구도 1970년대에 이미 활발하게 연구되었고(Han and Park, 1978) 한국산 겨우살이 추출물(KM110)에서도 여러 암세포주에 폭넓은 세포독성 효과를 나타냈으며 정제된 galactose 특이적인 lectin(MLI)은 이보다 1,000배 정도 강한 세포독성을 나타내었다(Lee *et al*, 1995). 특히 polyphenolic 화합물은 식물계에 다량으로 존재하며 생체 내에서 노화방지와 항산화, 항암, 항바이러스 및 항염 같은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Benavente-Garcisa *et al*, 1997). 본 연구에서 배초향 근뿌리의 항산화와 항암효과가 높았는데 초석잠(*Stachys sieboldii* MIQ)에서도 뿌리 추출물이 항산화 작용을 하였고(Beak *et al*, 2004) 겨우살이(*Viscum album*)와 칩뿌리(*Pueraria radix*)에서도 겨우살이와 칩뿌리 추출물은 동일 농도 10mg에서 Vit C의 항산화 효과보다 높은 항산화 활성을 보였고 라디칼 소거활성에 대하여 칩뿌리 추출물이 겨우살이 추출물보다 동일한 농도에서 강한 소거활성을 나타냈다(Song *et al*, 2004). 그리고 어성초(*Houttuynia cordata*) 뿌리의 에탄올 추출물은 Gram 양성균에 대하여 항균활성이 강하게 나타났다(Song *et al*, 2003). 이는 배초향 모상근 추출물에서의 항산화, 항암효과도 입증되었으나 근뿌리에서 조금 더 항산화, 항암에 관한 효과가 높았던 이유는 polyphenolic 화합물의 함유량이 각 식물체마다 다르기 때문이라고 추측되며 이에 관한 연구가 시행되어져야 할 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서는 화학적 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 이

용하여 배초향 잎으로부터 모상근을 효과적으로 유도하였다. Auxin 처리의 경우 모상근 생장과 rosmarinic acid 생산이 전반적으로 양호한 것은 NAA 0.5 mg/l 처리였다. Putrescine 50 mg/l, 질산은 7 mg/l, GA 3 mg/l 처리가 모상근 생장과 rosmarinic acid 생산에 가장 효율적인 것으로 나타났다. 또한 배초향 모상근 및 근뿌리 추출물에 의한 항산화 활성과 항암작용을 확인하였다.

연구 결과를 종합하면 배초향 모상근 배양을 통해 rosmarinic acid 생산의 가능성을 탐색 할 수 있었으며 추후 rosmarinic acid 생합성 관련 유전자를 활용하여 대사공학을 추진할 수 있는 기틀을 마련하였으므로 계획대비 더 좋은 연구 성과를 거둔 것으로 확신한다. 모상근 배양의 향상과 생리적인 조건을 달리하여 rosmarinic acid 생산량을 높일 수 있는 연구에 치중하고 생물반응기를 통해 모상근 대량배양시스템 구축 및 rosmarinic acid 생산량을 증대하여 향후 제품의 경제성 및 품질분석을 통한 우수성을 홍보 하고, 직접적으로는 천연 염색관련 상품으로 판매하면 천연염색회사, 화장품회사, 등과 원료공급계약 등을 시도하고 대량생산체계에서 정기적인 수요를 창출할 수 있을 것이다 사료된다.

모상근 배양에서 rosmarinic acid 생산이 성공하여 이 기술을 바탕으로 한국에 자생하는 염료식물에 신기술을 도입하여 자생식물의 상업화를 기대하며 본 연구를 수행하면서, 기업과 연구센터의 우수 연구진들이 산·학 연구공동체를 형성하여 다양한 종류의 정보수집과 교류를 통해 국내생물분야의 주축이 될 전남지역의 생물 산업 분야의 활성화를 기대할 수 있다.

생명공학 기술로 향상된 rosmarinic acid 생산 성공 시 싼 가격으로 원료를 생산할 수 있으며 이 원료를 바탕으로 천연염색의 신상품 제조 시, 국내 시장은 물론 외국 시장에서도 가격경쟁에서 유리한 위치를 차지하여 많은 시장을 점유할 수 있을 것으로 예상된다. 개발된 기술과 관련된 논문 및 학회지발표를 통하여 개발자의 업적을 쌓고, 나아가 지적 재산권 획득으로 국내 또는 외국 기업에 기술이전 또는 특허 실시권 등을 팔 수 있는 경우 지적재산권의 수출 효과도 예상된다.

참 고 문 헌

- Arid, E. L. H., Hamill, J. D. and Rhodes, M. J. C. 1988. Cthogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 15:47-57.
- Bais, H. P., Sudha, G. and Ravishankar, G. A. 1999. Putrescine influences growth production of coumarins in hairy root cultures of Witloof chicory(*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local). *J Plant Growth Regul.* 18:159-165.
- Balvanyos, I., Kursinszki, L., Banyai, P. and Szoke, E. 2004. Analysis of polyacetylenes by HPLC in hairy root cultures of *lobelia inflata* cultivated in bioreator. *Chromatographia Supplement.* 60:S235-S238.
- Beak, H. S., Na, Y. S., Kim, D. H., Lee, C. H., Ryu, B. H. and Song, S. K. 2004. Antioxidant activites of *Stachys sieboldii* MIQ roots. *Jonarnal of Life Science.* 14(1):1-7.
- Beak, S. E. and Woo, S. S. 1993. Antioxidant Activity of Crude Gingerol. *KOREAN J.SOC. FOOD SCI.* 9(1).
- Benavente-Garcisa, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A. and Rio, J. A. D. 1997. Uses and properities of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45:4505-4515
- Bergmann, B. A., Lin, X. and Whetten, R. 1999. Susceptibility of Paulownia elongata to *Agrobacterium* and production of transgenic calli and hairy roots by *in vitro* inocilation. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 55:45-51.
- Biondi, S., Lnezi, C., Baraldi, R. and Bagni, N. 1997. Hormonal effects on growth and morphology of normal and hairy roots of *Hyoscyamus muticus*. *J. Plant Growth Gegul.* 16:159-167.
- Castillo, A. M., Egafla, B., Sanz, J. M. and Cistue, L. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain.

- Plant Cell Report.* 17:902-906.
- Chen, H., Chen, F., Zhang, Y. L. and Song, J. Y. 1999. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 22 (3): 133-138.
- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., David, C., Casses-Delbort, F. and Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant cells. *Nature.* 295:432-434.
- Constable, F., Shyluk, J. P. and Gamborg, O. L. 1971. The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Planta.* 96:306-313.
- Daviould, E., Kan, C., Quirion, J. C., Das, B. C. and Husson, H. P. 1989. Epialloyohimbine derivatives isolated from *in vitro* hairy root cultures of *Catharanthus trichophyllus*. *Phytochemistry.* 28(5):1383-1389.
- Debra, P. A., Edwin, N. F., Robert, A., and Bruce, J. G., 1997. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 45:578-582.
- Ford, Y. Y. Taylor, J. M. Blake, P. S. and Marks, T. R. 2002. Gibberellin A₃ stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry(*Prunus avium*). *Plant Growth Regulation.* 37:127-133.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. 1982. free radical and tissue injury. Lab. Invest., *Biology of disease.* 47(5):412-26.
- Granicher, F., Christen, P. and Kapetanidis, I. 1992. High-yield production of valepotriates by hairy root culture of *Valerina officinalis* L. var. *Sambucifolia Mikan.* *Plant Cell Reports.* 11:339-342.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *methods in enzymology.* 186:1-85.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Aruoma, O. I. 1995. The

- characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxic.* 33(7):601-617.
- Hamill, J. D., Parr, A., Robins, R. J. and Rhodes, M. J. C. 1986. Secondary products formation by cultures *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Report.* 5:111-114.
- Han, B. H. and Park, M. H. 1978. Studies on the antioxidant components of Korean ginseng(II). *Kor. J. Pharmacog.* 9(4):169-171.
- Hinderer, W., Petersen, M. and Seitz, H. U. 1984. Inhibition of flavonoid biosynthesis by gibberellic acid in cell suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta.* 160:544-549.
- Hippolyte, I., Marinb, B., Baccou, J. C. and Jonard, R. 1992. Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Reports.* 11(3):109-112.
- Huang, L. D. and Van, S. J. 2002. *Salvia chameleagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid. *South African Journal of Botany.* 68(2):177-180.
- Jung, K. H., Kwak, S. S., Kim, S. W., Choi, C. Y. and Riu, J. R. 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Bitechnology Letters.* 14(8):695-700.
- Kang, S. A., Han, J. A., Jang, K. H. and Choue, R. W. 2004. DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui(*Angelica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33(7):1112-1118.
- Karam, N. S., Jawad, F. M., Arikat, N. A. and Shibli, R. A. 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 73(2):117-121.
- Kevers, C., Jacques, Ph., Thonart, Ph. and Gaspar, Th. 1999. *In vitro* root cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Plant Growth Regulation.* 27:173-178,

- Kim, H. K., Oh, S. R., Lee, H. K. and Huh, H. 2001. Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Biotechnology Letters*. 23(1): 55-60.
- Kim, J. J., Kim, S. J., Kim, S. H., Park, H. R. and Lee, S. C. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 34(7):937-941.
- Kim, T. H., Shin, J. H., Baek, H. H. and Lee, H. J. 2001. Volatile flavor compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* (Korean mint). *J. Sci. Food Agric*. 81:569-575.
- Kinnersley, A. M. and Dougall, D. K. 1980. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. *Planta*. 149:200-204.
- Kintzios, S., Makri, O., Panagiotopoulos, E. and Scapeti, M. 2003. In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnology Letters*. 25(5):405-408.
- Lee, M. H., Yoon, E. S., Jeong, J. H. and Choi, Y. E. 2004. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Plant Cell Report*. 22:822-827.
- Lee, S. C. and Kim, H. K. 2002. Effects of acute antioxidants administration on enzyme activity after exercise in rats. *The Korean Journal of Physical Education*. 41(5):991-999.
- Lee, S. M., Lee, H. J., Chun, H. K., Lee, C. H., Kang, S. J., Maeng, H. Y. and Kho, Y. H. 2001. Cytotoxicity and Quantitative Analysis of Nortriterpenoid glycoside from *Scilla scilloides*. *Kor. J. Pharmacogn*. 32(3): 189-192.
- Lee, S. W., Jung, Y. S., Yoon, T. J., Kim, S. H. and Kim, J. B. 1995. The Cytotoxic effect of Korean Mistletoe extracts on the various tumor cell line. *Korea. J. Pharmacogn*, P6.
- Lenton, J. R., Appleford, N. E. J. and Temple-Smith, K. E. 1994. Growth retardant

- activity of paclobutrazol enantiomers in wheat seedlings. *Plant Growth Regulation*. 15:281-291.
- Lorence, A., Medina-Bolivar, F. and Nessler, C. L. 2004. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. *Plant Cell Report*. 22:437-441.
- Malike, P. and Monique, S. J. S. 2003. Rosmarinic acid. *Pytochemistry*. 62:121-125.
- Mihaljevic, S., Stipkovic, S. and Jelaska, S. 1996. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria. *Plant Cell Report*. 15:610-614.
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B. E. 1992. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension culture by yeast extract. *Plant Cell Reports*. 11: 480-483.
- Mizumikami, H. and Ellis, B. 1991. Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotrasferase isoforms in *Anchusa-officalis* cell suspension culture. *Plant Cell Reports*. 10(6-7): 321-324.
- Mizumikami, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B. E. 1992. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum-Erythrorhizon* cell suspension culture by yeast. *Plant Cell Reports*. 11(9) : 480-483.
- Moore, L., Warren, G. and Strobel, G. 1979. Involvement of plasmid in the hairy root disease of plant caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*. 2:617-626.
- Mukundan, U. and Hjortso, M. A. 1991. Growth and thiophen accumulation by hairy root cultures *Tagetes patula* in media of varying initial pH. *Plant Cell Reports*. 9:627-630.
- Nozue, M. and Yasuda, H. 1985. Occurrence of anthocyanoplasts in cell suspension cultures of sweet potato. *Plant Cell Reports*. 4:252-255.
- Parr, A. J., Peerless, A. C., Hamill, J. J. D., Walton, N. J., Robins, R. J. and Rhodes, M. J. C. 1988. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*. 7:309-312.

- Petit, A., David, C., Dahl, G., Ellis, J., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Tempe, J. 1983. Further extension of the opine concept : plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Gen.* 190:204-214.
- Phatak, S. V. and Heble, M. R. 2002. Rosmarinic acid synthesis in shoot cultures of *Mentha arvensis* Linn. *Indian Journal of Biotechnology.* 1(4): 381-385.
- Pietrosiuk, A., Syklovska-Baranek, K., Wiedenfeld, H., Wolinowska, R., Furmanowa, M. and Jaroszyk. 2006. The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens*(Michx.) lehm. *Plant Cell Report.* 25:1052-1058.
- Reid, D. M. and Carr, D. J. 1967. Effects of a dwarfing compound, ccc, on the production and export of gibberellin-like substances by root systems. *Planta.* 73:1-11.
- Sauerwien, M., Yamazaki, T. and Shimomura, K. 1991. Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. *Plant Cell Reports.* 9:579-581.
- Scarpati, M. L. and Oriente, G. 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric. Sci.* 28:2329-2333.
- Shi, H. P. and Kintzios, S. 2003. Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Report.* 21:1103-1107.
- Shimomura, K., Sudo, H., saga, H. and Kamada, H. 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermim erythorhizon*. *Plant Cell Reports.* 10:282-285.
- Shin, S. H., Kim, H. K. and Chi, H. J. 1991. Production of Giant Hyssop Oil by Plant Tissue Culture. *Kor. J. Pharmacogn.* 22(2):91-94.
- Song, E. H., Lee, K. S. and Song, B. K. 1999. A Study on the Anticoagulative, Anitiinflammatory, Analgestic and Antioxidative effects of Kwuichulpajing -tang Aqua-acupuncture. 慶熙大學校 論文集.

- Song, H. S., Park, Y. H., Kim, S. K., Moon, W. K., Kim, D. W., Moon, K. Y. 2004. Downregulatory effect of extracts from Mistletoe(*Viscum album*) and Pueraria root(*Pueraria radix*) on cellular NF- κ B activation and their antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33(10):1594-1600.
- Song, J. H., Kim, M. J., Kwon, H. D. and Park, I. H. 2003. Antimicrobial activity of fraction extracts from *Houttuynia cordata* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 32(7):1053-1058.
- Szabo, E., Telen, A. and Petersen, M. 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports.* 18: 485-489.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of high plant by *Agrobacterium rhizogenes* sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell.* 37:959-967.
- Tiwari, R. K., Trivedi, M., Guang, Z. C., Guo, G. Q. and Zheng, G. C. 2006. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports.*
- White, F. F. and Nester, E. W. 1980. Hairy root: plasmid encodes virescence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant cell report.* 6:449-453.
- Wysokinska, H., Chmiel, A. and Grabias, B. 1999. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences.* 54(1-2):11-16.
- Yang, D. C., Kim, Y. H., Yang, D. C., Shin, S. L. and Choi, K. T. 1999. The Optimum conditions for induction of Ginseng hairy root. *Korean J. Plant. Res.* 12(1):1-9.
- Yonemitsu, H., Shimomura, K., Satake, M., Mochida, S., Tanaka, M., Endo, T. and Kaji, A. 1990. Lobelline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Reports.* 9:307-310.
- Yoon, J. H., Lee, J. I., Oh, C. K., Chen, z., Yang, S. Y. and Song W. S. 2006.

Effect of plant growth regulator on antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *lavandula spica* L. *Korean J. Plant Res.* 19(2):315-322.

Yoshikawa, T. and Furuya, T. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports.* 6:449-453.

감 사 의 글

4년간의 학부생활을 끝내고 설레고 떨리는 마음으로 대학원을 입학한지가 엇그제 같은 데 벌써 세월이 흘러 졸업을 눈앞에 두고 있습니다.

돌이켜보면 힘들었지만 보람되고 알찬 대학원 생활이었고 아쉬움이 앞서지만 왠지 모를 뿌듯함에 가슴이 벅차오릅니다.

논문지도에 힘써주시고 대학원 생활에 잘 적응하게 도와주신 지도교수님인 김종세 교수님께 머리 숙여 감사의 말씀을 전하며 논문 심사에 수고해주신 노영복 교수님, 최영복 교수님께 감사드립니다. 그리고 생물학과 전 교수님과 실험에 많은 도움을 주신 박상언 교수님, 이숙영 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

대학원 생활을 하면서 가장 많이 얻어가는 부분 중에 하나는 좋은 선후배를 많이 만난 것이 아닐까 생각합니다. 엄하지만 자상하신 정민주 선생님, 항상 친절하신 이현화 선생님, 남부대학교에 이준행 선생님, 이쁜 아가를 가지신 나윤영 선생님(순산하세요), 친언니처럼 아껴주고 도와준 기윤 선생님(졸업축하해요), 동갑내기 친구로 대학원 생활을 같이하며 많은 도움을 준 박연선 선생님(졸업축하해요), 항상 든든한 손수진 선생님 그리고 생물학과 학부생 모두에게 감사의 말씀을 드립니다.

공부보단 사람이 먼저 돼야 한다고 말씀하시는 아빠(당신은 우리 가족의 기둥입니다), 따뜻한 사랑과 보살핌으로 아껴주시는 엄마(당신이 있어 우리 가족이 있습니다), 예쁘고 사랑스러운 여동생 은주(하고 싶은 일 꼭 이뤄내길 빈다), 막내지만 듩직한 남동생 승재(지금처럼만 잘해주면 좋겠다) 언제나 내편이 있다는 건 정말 기쁜 일 같습니다. 나의 삶의 원동력인 가족들이 있어 정말 행복합니다. 평소엔 쑥스러워 잘 전하지 못하지만 사랑한다고 그리고 감사하다는 말씀을 전하며 이 논문을 바칩니다.

----- 석사과정을 마무리하며 오은정 드림 -----

저작물 이용 허락서

학 과	생물학과	학 번	20057052	과 정	석사
성 명	한글: 오은정 한문 : 吳恩貞 영문 : Oh Eun-jeong				
주 소	광주 광역시 동구 지산동 405-8번지 3층				
연락처	E-MAIL : oej9171@hanmail.net				
논문제목	한글 : Rosmarinic acid의 생합성 및 효과에 관한 연구				
	영문 : Biosynthesis and effects of rosmarinic acid				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제,
기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는
1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한
권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의
전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2007년 2월 23일

저작자: 오 은 정 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하