생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
27(4) : 354~358(1996)

L-Phenylalanine이 시호 캘러스의 Saikosaponin 함량에 미치는 영향

성락선

식품의약품안전본부 생약규격과

Effects of L-Phenylalanine on the Saikosaponin Content of *Bupleurum falcatum* Callus

Rack Seon Seong

Department of Herb Drug Standardization, Korea Food and Drug Administration, Choongbuk, 373-850, Korea

Abstract – This experiment was conducted to find out the effects of L-phenylalanine on the saikosaponin content of callus induced from *Bupleurum falcatum* leaf segments. In the fresh and dry weight of callus, the addition of 2,4-D than L-phenylalanine was significantly effective. However, the L-phenylalanine treatment rather than 2,4-D was effective for high saikosaponin accumulation in the callus of *Bupleurum falcatum*.

Key words – *Bupleurum falcatum*; L-phenylalanine; saikosaponin.

미나리과(*Umbelliferae*)에 속하는 다년생 초본인 시호(*Bupleurum falactum* L.)는 한국, 중국, 일본 등에서 중요하게 사용되는 약용식물로서 항염증작용, 진통작용, 거담작용, 항알레르기 작용 등의 약리작용을 가지고 있다고 알려져 있다.[1] 주요 성분은 saikosaponin a, c, d 등 oleanane계의 saponin이며 약리작용은 주로 saikosaponin a와 d에 의한 것으로 보고되어 있다.[2,3] 타가수정식물인 시호는 재배지역, 기후 및 토질에 따라 변이가 많이 일어날 수 있고,[4-6] 따라서 형태는 물론 염색체수에 있어서도 2n=20, 26, 28, 32 등으로 지역간은 물론 지역내에서 조차 약간씩의 차이를 보이고 있으며[7,8] 이차대사산물인 saikosaponin의 함량에 있어서도 재배지역에 따라서는 2배 이상의 차이가 있다.[9,10,11] 한편, 식물의 배양계에 있어서 이차대사산물의 합성량은 합성경로의 대사활성과 전구물질의 공급량에 따라 영향을 받는 것으로 보고되어 있다. 안토시아닌을 비롯한 플라보노이드는 phenylalanine을 전구물질로 해서 합성되는데 포도의 배양시에 phenylalanine의 양을 가감해 줄 경우 이차대사산물인 안토시아닌의 함량에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, 지치의 배양시에 L-phenylalanine 첨가에 의해 shikonin생산을 3배 이상 올릴 수 있다는 보고[12]도 있으나 시호의 경우에는 아직 없는 것 같다.

따라서 본 실험은 시호의 잎절편캘러스로부터 saikosaponin생산에 있어서 L-phenylalanine의 첨가가 이차대사산물의 축적에 영향을 미칠 수 있는지를 밝히기 위하여 시도되었다.

교신저자 : Fax 0475-33-9118

재료 및 방법

캘러스의 유도 및 배양 – Jo 등[13]의 실험에 사용한 시호(*Bupleurum falcatum* L.) 종자를 24시간동안 증류수에 침지시킨 뒤 vermiculite를 채운 화분에 파종하여 온도 25±1℃, 1,900 lux 연속형

광하에서 50일간 재배하여 엽장이 40~50mm정도 된 엽을 채취하여 70% 에칠알콜에 1분간 일차살균한 후 2% sodium hypochlorite에 10분간 표면살균시킨 다음 멸균수로 씻어 절편의 크기를 4×5 mm로 하여 MS기본배지[14]에 치상하였다. Agar 8 g/L, sucrose 30 g/L를 첨가하여 조제된 배지는 pH 5.6으로 조정한 후 121 ℃에서 15분간 멸균한 다음 250 mL 삼각프라스크에 50 mL씩 분주하여 치상하였다. 배양조건은 종자 파종시와 동일하게 하였다.

생장조절물질과 전구물질의 영향을 조사하기 위하여 MS기본배지에 2,4-D는 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L의 농도로, L-phenylalanine은 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L로 단독처리하였으며, 또한 2,4-D 0.1 및 1.0 mg/L와 L-phenylalanine 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L를 조합처리하여 8주간 배양한 후 캘러스의 생장상태 및 saikosaponin 분석을 실시하였다.

Saikosaponin의 정량분석 - 각각의 조건에서 배양된 캘러스를 채취하여 59 ℃에서 24시간 건조시킨 후 가루로 한 다음 500 mg씩 칭량하여, 암모니아 메탄올 혼합액 35 mL를 넣어 3시간 동안 가열환류하였다. 식힌 다음 메탄올로 50 mL가 되도록 하고 원심분리하여 상징액 30 mL를 취하여 감압농축하여 용매를 제거하였다. 잔류물에 메탄올 5 mL를 넣어 용해시킨 다음 0.45 μm 여과지로 여과하여 정량분석용 시료로 사용하였다. 표준액으로서 표준품 saikosaponin a, c 및 d(Nacalai Tesque Co., Japan) 각각 10 mg을 칭량하여 메탄올 50 mL에 녹여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 분석하였다. 분석조건으로는 column은 μ-Bondapak C_{18}(Merck사(USA), φ4 mm×250 mm), 이동상은 물·아세토니트릴(65:35)을 사용하여 자외선 검출기로 203 nm(Flow rate:1.0 ml/min, Injection Volume:20 μl)에서 실온측정하였다. 분석에 사용한 HPLC기종은 Waters Model 244, Detector는 Waters 486, Dater module은 Waters 746, System controller는 Waters 720을 사용하였다.

결과 및 고찰

생체중 및 건물중 - 유도된 캘러스를 2,4-D와 L-phenylalanine을 처리하여 4주간 배양한 것의 생체중과 건물중을 조사하여 본 결과 2,4-D 0.1 mg/L의 농도에 L-phenylalanine처리구에서 전반적으로 생체중 및 건물중이 높게 나타났으며 L-phenylalanine의 농도가 높아짐에 따라서 건물중비율이 높아짐을 알 수 있었다(Table I). 2,4-D 0.1 mg/L 처리구에 있어서 L-phenylalanine의 농도가 낮을수록 생체중이 높았으나 건물중비율에 있어서는 그와 역비례하는 경향을 나타내었다.

이와는 대조적으로 2,4-D 1.0 mg/L의 처리구에 L-phenylalanine을 처리한 것에서는 대체적으로 캘러스 형성만 활발하였으며, 대부분의 캘러스에서 anthocyanine 색소형성이 활발하였다. 특히 L-phenylalanine 5.0 mg/L의 고농도 처리시에는 anthocyanine의 형성이 0.1 mg/L의 저농도에서보다 촉진적인 것으로 관찰되었다.

이와 같은 현상은 이차대사산물의 축적은 세포분열과 반대되는 속성으로서 포도배양세포에서 세포증식의 정지와 anthocyanine과 같은 이차대사산물의 축적과는 높은 부의 상관관계가 존재한다[15]는

Table I. Effect of combined levels of L-phenylalanine and 2,4-D on the callus production of *Bupleurum falcatum*

PAL (mg/L)	2,4-D(mg/L)					
	0.1			1.0		
	FW(g)	DW(g)	D/F(%)	FW(g)	DW(g)	D/F(%)
0.1	8.54	0.45	5.26	1.94	0.19	9.75
0.5	6.09	0.47	7.80	4.27	0.31	7.15
1.0	5.08	0.42	8.29	4.04	0.30	7.40
3.0	4.44	0.36	8.49	3.84	0.27	7.11
5.0	5.56	0.52	9.35	2.90	0.23	8.18

PAL: L-phenylalanine concentration, FW: Fresh weight, DW: Dry weight, D/F: Dry/Fresh weight ratio.

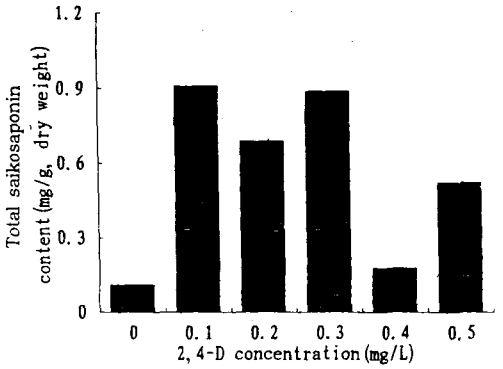

Fig. 1. Effect of 2,4-D on the total saikosaponin contents in the callus of *Bupleurum falcatum*.

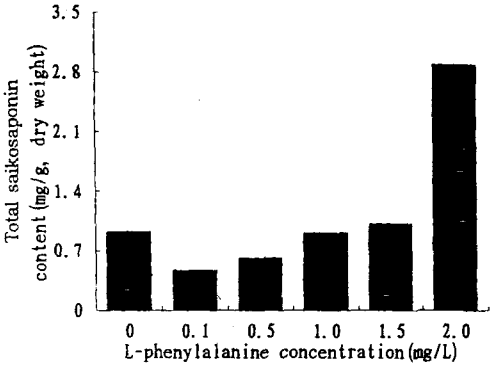

Fig. 2. Effect of L-phenylalanine on the total saikosaponin contents in the callus of *Bupleurum falcatum*.

보고와 유사한 경향이었다. 일반적으로 배양세포는 배지중에 영양원이 부족하게 되면 세포주기상에 있는 어느 점에서 분열이 정지하게 되는데 이때 L-phenylalanine을 공급하게 되면 효소활성을 유도시켜 anthocyanine의 합성이 증가하게 된다는 보고[16]와 비슷한 결과라고 생각된다.

Saikosaponin함량 - 2,4-D 처리에 있어서는 농도가 높을수록 비록 불규칙적이긴하지만 saikosaponin 총함량은 낮아지는 경향이었다(Fig. 1). 반면에 L-phenylalanine을 처리하였을 경우는 농도가 높아감에 따라 saikosaponin의 총함량도 일정하게 높아지는 경향을 보였다(Fig. 2). 특히 L-phenylalanine의 농도가 2.0 mg/L로 높아질 경우 2,4-D에서 보다 saikosaponin함량이 약 3배정도 높아지는 현상을 보이고 있다. 이와 같은 현상은 Hay 등[17]과 Merillon 등[18]이 이차대사산물을 축적하는 세포계에 전구물질을 투여하면 합성계의 대사활성이 높아져 대사산물을 합성하게 되는 것이라고 하였으며, Yamakawa 등[19]은 포도 배양세포에서 세포증식이 활발히 이루어질 동안에는 전아미노산량이 감소하며 다시 세포증식이 정지하면 축적을 계속하게 되는 것과 같은 현상으로서 안토시아닌의 합성이 시작되면 축적된 페닐알라닌이 감소하기 때문에 축적된 페닐알라닌이 안토시아닌의 재료로서 소비되는 결과와 유사한 현상이라고 생각된다.

또한 2,4-D의 농도를 다르게 한 후 L-phenylalanine과 조합처리하였을 경우 캘러스내의 saikosaponin형성에 미치는 영향을 조사 한 결과(Table II), 2,4-D 0.1 mg/L에 L-phenylalanine을 농도별로 처리한 것에서는 대체적으로 saikosaponin이 검출되었으나 2,4-D 1.0 mg/L에 L-phenylalanine을 처리한 것에서는 saikosaponin a, d 모두 검출되지 않으므로서 2,4-D가 saikosaponin 등의 이차대사산물의 축적에 영향을 미치고 있는 것으로 생각된다. 대체적으로 단독처리한 것보다 조합처리할 경우 saikosaponin함량은 낮게 나타났다. 이러한 현상은 Ozeki와 Komamine[20]가 당근배양세포에서 이차대사와 형태적인 상관관계에 있어서 배지 중에 2,4-D를 제거하면 안토시아닌이 유도되고 이를 다시 2,4-D를 첨가한 배지에 옮기면 cell elongation만 유도되므로서 2,4-D가 안토시아닌 유도에 저해적이라고 보고하고 있는 것과 마찬가지로 본 실험에서도 2,4-D의 첨가가 saikosaponin 형성에 저해적으로 작용하고 있는 것이라고 판단된다. 또한 이러한 현상에 대하여 Ozeki 등[21]이 인삼배양세포에서 안토시아닌합성 유도를 위하여 PAL

Table II. Saikosaponin contents from the callus treated with combined of L-phenylalanine and 2,4-D levels in *Bupleurum falcatum*

PAL (mg/L)	2,4-D(mg/L)			
	0.1	1.0	0.1	1.0
	Saikosaponin a (mg/g, dry weight)		Saikosaponin d (mg/g, dry weight)	
0.1	ND	ND	ND	ND
0.5	0.215	ND	0.204	ND
1.0	0.219	ND	0.295	ND
3.0	0.106	ND	ND	ND
5.0	0.219	ND	0.126	ND

PAL: L-phenylalanine, ND: Not detected.

(phenylalanine ammonia-lyase)에 대한 효소활성을 조사해 본 결과 2,4-D를 함유한 배지에서는 PAL에 대한 mRNA, PAL단백질 등의 활성이 나타나지 않았으나, 2,4-D를 함유하지 않은 배지의 어느 캘러스에서도 PAL mRNA가 유도되어 PAL단백질이 합성되며 PAL의 활성이 상승하는 것과 마찬가지로, 본 실험의 경우에 있어서 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합처리할 경우 2,4-D에 의하여 대사활성을 제어하는 작용이 있기 때문에 캘러스내에 saikosaponin의 축적을 저해하는 것이라고 판단된다. 또한 Uomori와 Tomita[22]가 10^{-5} M 2,4-D만을 처리하여 1년간 계대배양시켜 안정화된 시호 캘러스를 TLC를 통해 성분검색하였을 경우 saikosaponin이 전혀 검출되지 않아 시호 캘러스에는 saikosaponin의 생합성능이 없다고 보고하고 있는 바, 본 실험의 시호 캘러스배양에 있어서 2,4-D에서 생체중 및 건물중에는 고도의 유의성을 보이고 있는 반면 L-phenylalanine의 첨가에서는 유의차가 인정되지 않는 것에서와 마찬가지로 saikosaponin함량에 있어서도 2,4-D가 생장조절물질로서 캘러스의 유도 및 증식에는 효과적이지만 캘러스내에서의 saikosaponin생합성에 미치는 이차대사에는 큰 영향을 하지 않는 것으로 판단된다. 따라서 세포내 효소활성을 촉진시킬 수 있는 L-phenylalanine을 첨가하므로서 세포의 이차대사활동을 돕게 되는 것이라고 추정되나, 이러한 현상에 대해서는 계속적으로 검토되어져야 할 것으로 생각된다. 또한 각 처리구에 L-phenylalanine 1.0 mg/L 첨가된 시험구에서는 saikosaponin함량이 다른 처리구에 비하여 높게 나타났으나 L-phenylalanine의 농도가 3.0-5.0 mg/L로 높아질 경우는 약간씩 떨어지는 경향을 나타내므로서 saikosaponin의 함량에 L-phenylalanine이 어느 정도 작용하고 있는 것으로 추정해 볼 수 있다.

결 론

시호의 잎배양에 있어서 saikosaponin의 형성에 미치는 L-phenylalanine의 영향을 조사하고 이를 HPLC로 분석하였다. 캘러스의 생체중 및 건물중 모두 L-phenylalanine보다 2,4-D 0.1 mg/L의 저농도 처리에서 높게 나타났다. Saikosaponin의 함량은 2,4-D 보다 L-phenylalanine 처리에 의해서, 또한 L-phenylalanine의 농도가 높아짐에 따라 높게 검출되었다.

인용문헌

1. Hiraoka, N., Kodama, N., Oyanagi, M., Nakano, S., Tomita, Y., Yamada, N., Iida O. and Satake, M. (1986) Characteristics of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. *Plant Cell Rep.* 5: 319-321.
2. Abe, H., Sakaguchi, M., Konishi, H., Tani, T. and Arichi, S. (1978) The effects of saikosaponins on biological membranes: 1. The relationship between the structures of saikosaponins and haemolytic activity. *Planta Medica* 34: 160-166.
3. Shibata, S., Kitagawa, I., Takahashi, R. and Fujimoto, H. (1966) The chemical studies on oriental plant drugs. XIV. The constituents of *Bupleurum* spp. (1). *Yakugaku Zasshi* 86: 1132-1137.
4. Hosoda, K., Noguchi, M., Hisata, Y. and Noro, Y. (1993) Studies on the cultivation of *Bupleurum falcatum* L. III. Effect of soil ventilation on the root morphology. *Shoyakugaku Zasshi* 47: 17-21.
5. Hosoda, K., Noguchi, M., Hisata, Y. and Noro, Y. (1995) Studies on the cultivation of *Bupleurum falcatum* L. VII. Effect of physical properties of soils on the flowering and lignification of root. *Natural Medicines* 49: 4-17.
6. Hosoda, K., Noguchi, M., Ikenaga, T., Hista, Y. and Noro, Y. (1995) Studies on the cultivation of *Bupleurum falcatum* L. VI. Variation in lignification index of *B. falcatum* of different geographical orgins. *Natural Medicines* 49: 11-13.
7. Amano, A., Fujimoto, K., Ohashi, H., Matsunaga, K. and Mizukami, H. (1989) Chromosome number variation in *Bupleurum falcatum* plants regenerated through somatic embryogenesis of callus cultures. *Shoyakugaku Zasshi* 43: 13-18.
8. Amano, A., Fujimoto, K., Ohashi, H., Sato, M. and Mizukami, H. (1989) Geographical variation in somatic chromosome numbers of *Bupleurum falcatum* L. *Shoyakugaku Zasshi* 43: 192-194.

9. Hiraoka, N., Kodama, T. and Tomita, Y. (1983) *In vitro* propagation of *Bupleurum falcatum*. *Shoyakugaku Zasshi* 37: 62-67.
10. Mizukami, H., Matsunaga, K., Ohashi, H., Amano, A. Maekawa, T. and Fujimoto, K. (1991) Variation in saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* L. of different geographical origins. *Shoyakugaku Zasshi* 45: 342-344.
11. Shimokawa, Y., Okuda, I., Kuwano, M. and Ohashi, H. (1980) Cultivation and breeding of *Bupleurum falcatum* L. VI. Geographical variation of *B. falcatum*. *Shoyakugaku Zasshi* 34: 239-244.
12. Mizukami, H., Konoshima, M. and Tabata, M. (1977) Effect of nutritional factors in shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures. *Phytochem.* 16: 1183-1185.
13. Jo, P. H., Seong, R. S., Bae, H. H., Soh, W. Y. and Cho, D. Y. (1990) Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 205-209.
14. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
15. Hirose, M., Yamakawa, T., Kodama, T. and Komamine, A. (1990) Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 31: 267-271.
16. Sakuta, M., Takagi, T. and Komamine, A. (1986) Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.* 125: 337-343.
17. Hay, C. A., Anderson, L. A., Roberts, M. F. and Phillipson, J. D. (1986) *In vitro* cultures of *Cinchona* species. *Plant Cell* Rep. 5: 1-4.
18. Merillon, J. M., Doireau, P., Guillot, A., Chenieux, J. C. and Rideau, M. (1986) Indole alkaloid accumulation and tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* cells cultured in three different media. *Plant Cell Rep.* 5: 23-26.
19. Yeoman, M. M., Lindsey, M., Miedzybrodzka M. B. and Laychlan, W. R. (1982) Accumulation of secondary products as a fact of differentiation in plant cell and tissue cultures. *In* Differentiation *in vitro*. British Soc. for Cell Biology Symposium 4, 65-82. Cambridge University Press.
20. Ozeki, Y. and Komamine, A. (1981) Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differention with morphological differention. *Physiol. Plant* 53: 570-577.
21. Ozeki, Y., Komamine, A. and Tanaka, Y. (1990) Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme priteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4-D. *Physiol. Plant* 78: 400-408.
22. Uomori, A. and Tomita, Y. (1974) Studies on the constituents in tissue cultures of *Bupleurum falcatum*. *Shoyakugaku Zasshi* 28: 152-160.

(1996년 12월 6일 접수)