

시호 모상근 배양에서 생장과 시호 사포닌 생합성에 미치는 배지와 IAA 및 IBA의 영향

안준철* · 김응식 · 이현진¹ · 황 백¹
서남대학교 생명과학과 · ¹전남대학교 생물학부

Effects of IAA, IBA, and Media on Growth and Saikosaponin Biosynthesis in *Bupleurum falcatum* Hairy Root Culture

AHN, Jun Cheul* · KIM, Eung Sik · LEE, Hyun Jin¹ · HWANG, Baik¹

Department of Biological Sciences, Seonam University, Namwon, 590-170, Korea

¹Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT We examined the effects of various basal media and exogenous auxins on the growth and saikosaponin production in hairy root cultures of *Bupleurum falcatum*. Of the various media tested, 2RCM medium was superior for growth and saikosaponin content, in which saikosaponin a, c, and d was produced, however MS medium was resulted in extremely low level in saikosaponin production. By the treatment of 0.5 mg/L IBA, the growth rate was increased by about 60% in 2RCM medium, whereas both IAA and IBA showed a potent inhibition effect in saikosaponin biosynthesis by the treatment of 0.01 mg ~ 5 mg/L.

Key words: Basal media, growth, MS, 2RCM, inhibition effect

서 론

시호 (*Bupleurum falcatum*)는 미나리과에 속하는 다년생 초본식물로 한방에서 뿌리를 해열, 진통 및 해독 등의 처방에 많이 사용하여 왔으며, 여러가지 약리작용 때문에 오랫동안 생화학 및 약리학적 연구의 재료가 되어왔다. 그 결과 시호의 주요 생리활성성분으로는 뿌리에 함유되어 있는 saikosaponin a와 d인 것으로 밝혀졌고, c의 경우는 배당체가 분리된 aglicon의 형태로 활성이 있는 것으로 알려졌다 (Shibata et al. 1973). 그러나 시호는 제배시 약제로 사용되는 뿌리의 발달이 저조하고 1년 이상 재배하였을 경우 saponin 함량이 떨어지거나 야생시호와 달리 근부병 등에 의한 수확량이 감소되는 문제가 있다. 또한 시호의 유효성분은 지리적

분포 (Mizukami et al. 1991; Tanaka et al. 1988), 품종 (Shon et al. 1997), 토양비료 차이 (Minami and Sugino 1995) 및 식물체간 (Kim et al. 1995)에도 차이를 보이고 있다.

한편, 시호가 생성하는 유용물질을 보다 효과적으로 생산하기 위한 방안으로 조직배양을 이용한 연구가 있다. 그러나 탈분화된 세포배양에서는 saponin 생산이 매우 저조하며 (Katakura et al. 1991), 기관배양인 시호 부정근 또는 형질전환된 모상근 역시 느린 성장속도와 자연산 뿌리에 비교하여 낮은 함량을 나타내었다 (Jo et al. 1990; Ahn et al. 1993).

일반적으로 식물에서 유래하며 화학적 합성이 어려운 유용한 2차대사물질을 대량생산하기 위해서는 고생산과 품질이 안정된 식물을 효과적으로 재배하는 방법과 배양조건 및 배양기술의 개발에 의한 조직배양을 통하여 공장규모로 대량생산해 내는 방법이 있을 수 있다. 그러나 어느 쪽이던지 이러한 주요 2차대사물질의 대량 확보에는 생산성이 높은 식물의 육종 또는 고생산 세포주의 개발에 성패가 달려 있으며, 이를

*Corresponding author. Tel 0671-620-0256

E-mail jcahn@tiger.seonam.ac.kr

위해서는 특정성분 또는 식물을 대상으로 체계적이고 집중적인 생합성 과정의 이해가 선행되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 saikosaponin 생합성 과정의 이해를 위한 연구의 일환으로 시호 모상근을 재료로 하여 saikosaponin 생산에 적합한 기본배지를 선정하고 선정된 배지에 IAA와 IBA를 첨가하여 시호 모상근의 생장과 saikosaponin의 생산에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 최적 배지 선발

실험에 사용한 모상근은 저자들이 식시호 (*Bupleurum falcatum*)에 *Agrobacterium rhizogenes* A₄ 균주를 접종하여 유도한 모상근 중 saikosaponin 함량이 높은 클론 BFHR2를 사용하였다 (Ahn et al. 1993). 시호 모상근의 적정 배양조건을 규명하고자 RCM (White and Nester 1980), MS (Murashige and Skoog 1962)와 WP (Lloyd and McCown 1980) 배지와 배지성분 중 다량무기염원소의 양을 1.5배와 2배로 조정한 1.5RCM, 2RCM, 1.5MS, 2MS, 1.5WP 및 2WP 등에서 2주 동안 전 배양한 모상근의 약 1 cm의 길이의 근단 12개씩을 30mL 배지를 함유한 100 mL Erlenmeyer flask에 접종하고 10주간 배양한 후 48시간 동결건조하여 건중량을 측정하였다. 또한 MS 배지와 2RCM 배지에서의 생장과 saikosaponin의 생성 여부를 확인하고자 각각의 배지 30 ml에 0.5 g 씩 접종하여 4주간 배양하여 생장과 saikosaponin 생성양상과 함량을 조사하였다.

IAA와 IBA 효과

IAA와 Indole butyric acid (IBA)에 대한 조사는 2RCM 액체배지 (sucrose 3%, pH 4.8)를 기본배지로 하였으며, 0.5 g을 30 mL 배지에 대한 100 mL Erlenmeyer flask에 접종하여 25°C, 암조건에서 4주간 진탕배양 (100 rpm)하였다. 오옥신은 IAA와 IBA를 각각 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 mg/L 범위로 배지에 첨가하고 동일한 방법으로 4주간 배양한 다음 여과지로 물기를 충분히 제거한 후 생중량과 건중량 및 saikosaponin 함량을 조사하였다.

Saikosaponin 분석

Saikosaponin의 추출은 건물 중 200 mg을 5 mL의 2% NaOH-methanol (MeOH)에 넣고 20분간 sonication하여 추출하였고, 추출액은 Whatman (No. 2, 70 mm ϕ) 여과지로 여과한 다음 회전증발기에서 농축하였다. 농축액은 H₂O : ethyl ether (V/V:1/1)로 재용해시켜 수층만을 수집하고

butanol (BuOH)을 첨가하여 섞은 후 BuOH 층을 수확하여 질소가스를 사용하여 농축하였으며, 농축액은 150 μ l MeOH에 용해시켜 그 중 10 μ l를 HPLC 분석에 사용하였다.

HPLC 분석은 Waters 사의 system을 사용하였으며, μ -Bondapak C₁₈ column를 사용하여 실온에서 분석하였다. 용매로는 water : acetonitrile (7:3→3:7, 25 min. linear gradient)를 사용하여 유속 1.1 mL/min, column 온도 40°C로 하여 205 nm에서의 자외흡광도로 화합물을 검출하였다. 분석을 위해 사용한 saikosaponin a, c와 d 표준품은 일본 Wako사에서 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

모상근 생장과 saikosaponin 생산에 최적인 배지선발

30 mL의 배지가 함유된 100 mL 플라스크에 시호 모상근

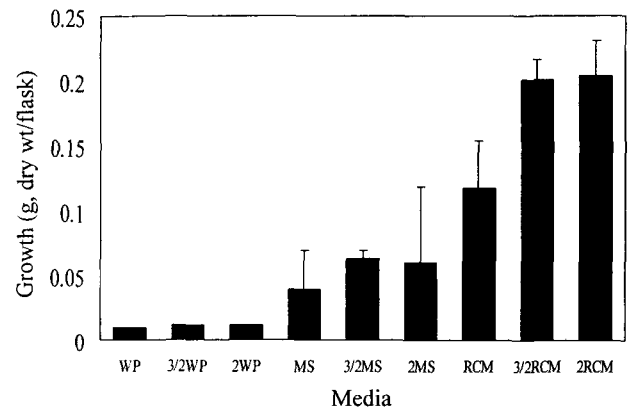


Figure 1. Effects of media on growth from hairy root clone BFHR2 of *Bupleurum falcatum*. Hairy roots cultured in various liquid media for 12 weeks at 25°C in the dark condition. Initial inoculum was 12 root tips. Bars represent standard error.

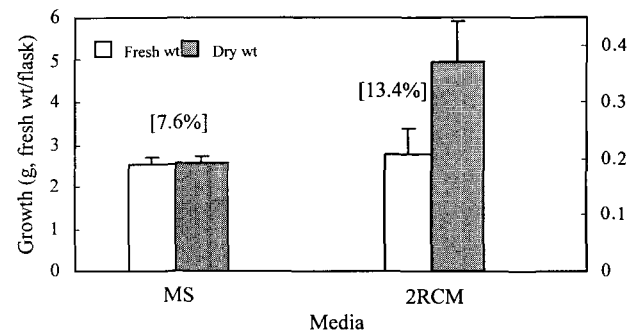


Figure 2. The growth of *Bupleurum falcatum* hairy root clone BFHR2 after 4 weeks culture in MS and 2RCM liquid medium at 25°C in the dark. Values in brackets show the percent ratio of dry weight to fresh weight. Initial inoculum was 0.5 g. Bars represent standard errors.

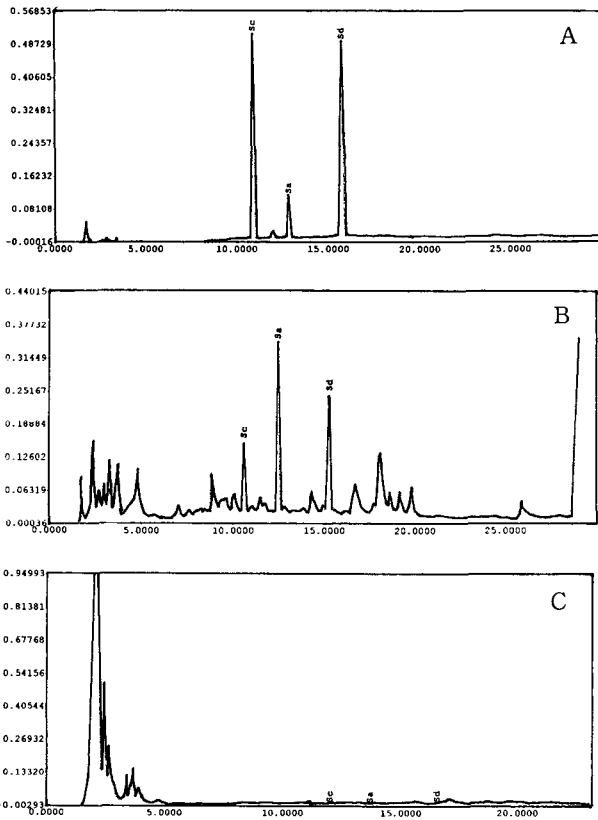


Figure 3. High performance liquid chromatogram of saikosaponin in *Bupleurum falcatum* hairy root line BFHR2. (A) standard; (B) 2RCM medium; (C) MS medium. Sc, saikosaponin c; Sa, saikosaponin a; Sd, saikosaponin d.

클론 BFHR2의 근단 12개씩을 접종하여 12주 배양하였을 때 RCM 배지가 WP와 MS 배지에서 극히 낮은 생장에 비교하여 무기 대량원소의 모든 농도 (1배, RCM; 3/2배, 1.5RCM; 2배, 2RCM)에서 빠른 생장을 보였으며, 그 중 2RCM 배지 (0.20 g, dry wt)가 가장 빠른 생장을 나타내었다 (Figure 1). 한편, 0.5 g 접종하여 4주간 배양한 결과는 2RCM 배지 (2.78±0.62, fresh wt; 0.37±0.07, dry wt)에 비교할 때 MS 배지 (2.52±0.15, fresh wt; 0.19±0.01, dry wt)에서도 비교적 빠른 생장을 나타내 초기 접종 양에 따라 배지별 생장패턴에 차이를 보였다 (Figure 2). 하지만 건중량/생중량의 비 (건중량 / 생중량 × 100)를 비교하면 2RCM 배지와 MS 배지가 13.4%와 7.6%로 각각 나타나 2RCM 배지의 경우가 수분함량이 적은 것으로 나타났다. 동량의 시료 (50 mg, dry wt)에서 추출한 조 saikosaponin의 생성양상과 함량을 비교해보면 Figure 3에서 보는 것처럼 MS 배지에서 배양한 모상근에서는 조 saikosaponin 분획 중 Sa, Sc 및 Sd가 분명하게 검출되지 않고 그 외의 peak도 없는 것으로 미루어 saponin의 생합성이 거의 이루어지지 않는 것으로 추정되는 반면에 2RCM 배지에서는 표품과 동일한 retention time에서 Sa, Sc 및 Sd의 생성을 확인할 수 있었다. 2RCM과 MS 배지에 있어서 배양체의 생장과 saikosaponin 생합성 차이는 두 배지

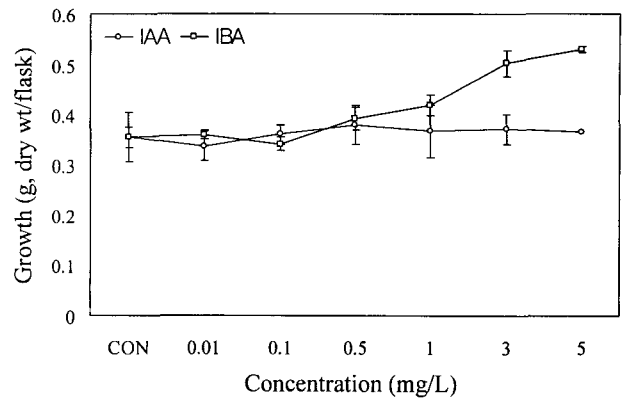


Figure 4. Effects of the IAA and IBA on growth of *Bupleurum falcatum* hairy root clone BFHR2 after 4 weeks culture in 2RCM medium at 25°C in the dark. Bars represent standard errors.

성분의 무기 대량원소 중 질소원 및 종류 (질산태 질소 또는 암모니아태 질소)와 인산염의 농도에 큰 차이에 따른 것으로 추정되었다.

모상근 생장과 saikosaponin 생성에 미치는 IAA와 IBA의 영향

시호 모상근의 경우, IAA는 모든 처리농도 (0.01~5 mg/L)에서 유의적인 생장촉진효과를 보이지 않았으나, IBA는 0.5 mg/L 이상의 농도에서 생장촉진 효과를 보였고 5 mg/L 에서 대조구에 비하여 약 60%의 생장촉진을 나타내었다 (Figure 4). 그러나 IAA, IBA 모두 모든 처리농도에서 saikosaponin의 생산에 저해효과를 보였으며, 뿌리형태의 외적인 변화를 일으키진 않았다. 특히 IAA의 경우 배지에 0.01 mg/L의 적은 농도로 첨가한 경우에도 대조구에 비교하여 총 saikosaponin이 1/3 수준으로 감소되었고 농도가 높아짐에 따라 saponin 생산의 저해효과도 비례하였다 (Figure 5). 한편, 시호 모상근은 2,4-D (>1 mg/L), NAA (>0.1 mg/L) 및 BA (>3 mg/L) 등의 호르몬 처리에서 뿌리생장의 촉진효과는 없고 일정 농도 이상에서는 뿌리의 일부 또는 전체가 탈분화를 일으키는 것으로 조사된 바 있다 (결과 미제시). 부정근 또는 모상근에 몇가지 식물생장조절물질을 처리하여 생장과 2차대사물질의 생산에 대해 조사한 보고에 의하면, *A. rhizogenes* A₄에 의하여 형질전환된 *Hyoscyamus albus* 모상근은 2~4 mg/L의 농도로 IAA를 첨가한 경우 생장의 감소와 함께 뿌리의 일부가 탈분화된 캘러스를 형성하기도 하였으며, alkaloid의 생산은 억제되었다 (Sauerwein et al. 1992). *Duboisia hybrid* 부정근은 NAA (0.1~0.5 mg/L)와 2,4-D (0.1 mg/L 이하)가 뿌리의 탈분화를 일으키고 alkaloid 합성을 저해하였으며, IAA (0.1 mg/L~0.5 mg/L)와 IAA 유도체인 IAA-Cl-IAA (0.01~0.1 mg/L)와 5,6-Cl₂-IAA (0.001~0.05 mg/L)는 생장촉진과 함께 총 alkaloid 생산을 향상시켰

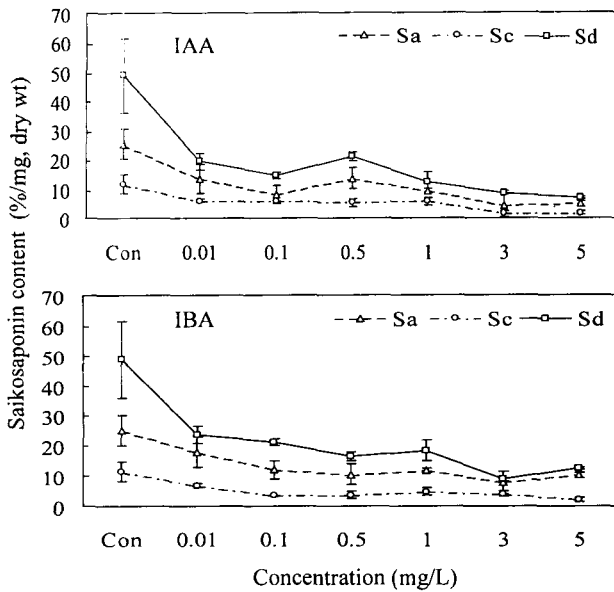


Figure 5. Effects of IAA (upper) and IBA (lower) on saikosaponin production of *Bupleurum falcatum* hairy root clone BFHR2 after 4 weeks culture in 2 RCM medium at 25 °C in the dark. Bars represent standard errors. Con, control; Sa, saikosaponin a; Sc, saikosaponin c; Sd, saikosaponin d.

다고 보고하였다 (Yoshimatsu et al. 1990). *Solanum aculeatissimum*의 모상근 배양에서는 IAA (0.1 mg/L)와 NAA (0.1 mg/L)가 steroidal saponin의 생산을 촉진시켰다고 보고한 바 있다 (Ikeyama et al. 1995). 이러한 결과로 볼 때 동일한 호르몬 종류일지라도 호르몬 각각은 식물과 2차대 사물질의 종 또는 종류에 따라 생장과 물질생산 등에 미치는 효과가 전혀 다르게 나타날 수 있는 것으로 사료된다. 시호 모상근의 경우 IAA와 IBA가 뿌리형태의 변화 없이 saikosaponin의 생성억제 작용을 보이는 점과 더불어 기본 배양액 성분의 차이 즉, MS와 2RCM 배지에서 배양한 모상근의 saikosaponin 생성능력에 현저한 차이를 보이는 점은 이후 saikosaponin 생합성 과정의 이해와 이에 관련된 유전자 파악 등의 연구에 있어서 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 RCM 배지에서의 비교적 활발한 saikosaponin 생합성은 앞으로 보다 자세한 배양조건의 확립 여하에 따라서는 모상근 배양이 saikosaponin 생산을 위한 효율적인 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

시호 모상근 (BFHR2 클론) 배양에서 생장과 saikosaponin 생산에 미치는 기본배지, 배지의 다량무기염농도 변화 및 IAA와 IBA의 효과를 조사하였다. 조사한 배양액 중 RCM 배지에 다량무기염농도를 2배로 증가시킨 배지에서 생장이 가장 양호하였다. 또한 2RCM 배지에서는 saikosaponin인 a,

c와 d의 생성을 확인하였으며, 반면에 MS 배지에서는 saikosaponin의 생성이 극히 저조하였다. IBA는 0.5 mg/L에서 약 60%의 성장촉진효과를 보였으나, IAA와 IBA 두 가지 모두 0.01 ~ 5 mg/L까지의 농도에서 뿌리형태의 외적인 변화 없이 saikosaponin 생성을 강하게 억제하는 작용을 나타내었다.

사사-본 연구는 교육부 지원 과학기술기초중점연구비 (98-015-D-00234)의 지원으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Ahn JC, Paek YW, Sung CK, Kang GH, Hwang B (1993) Production of saponin content by hairy root culture of *Bupleurum falcatum*. I. Comparison of saponin content and pattern in callus, adventitious root, hairy root and cultivated root. *Kor J Bot* 36:43-49
- Ikeyama T, Oyama T, Muranaka T (1995) Growth and steroidal saponin production in hairy root cultures of *Solanum aculeatissimum*. *Plant Cell Rep* 14:413-417
- Jo PH, Seong RS, Bae HH, Soh WY, Cho DY (1990) Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Kor J Pharm* 21:205-209
- Katakura M, Kimura T, Endo I (1991) Production of saikosaponin by tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. *Bioprocess Engineering* 7:97-100
- Kim KS, Seong NS, Chang YH, Lee ST, Lee JI, Oak HC, Chae YA (1995) Variation of plant characters and correlation analysis of its in *Bupleurum falcatum* L. *Kor J Med Crop Sci* 3:71-76
- Lloyd GB, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Comb Proc Intl Plant Propagators' Soc* 30:421-427
- Minami M, Sugino M (1995) Effects of mineral fertilizers on growth and saikosaponins content of *Bupleurum falcatum* L. (I) Effects of different levels of nitrogen, phosphoric acid and potassium on growth and saikosaponin contents of one-year-old plant. *Natural Med* 49:230-239
- Mizukami H, Matsunaga K, Ohashi H, Amano A, Maekawa T, Fujimoto K (1991) Variation in saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* L. of different geographical origins. *Shoyakugaku Zasshi* 45:342-344
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Sauerwein M, Wink H, Shimomura K (1992) Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. *J Plant Physiol* 140:147-152

- Shon TK, Totok ADG, Yoshida T** (1997) Variation and distribution and saikosaponin in *Bupleurum falcatum* L. J Fac Agr Kyushu Univ 42:17-22
- Shibata M, Yoshida R, Motohashis, Fukushima M** (1970) Pharmacological studies of *Bupleurum falcatum* L. IV. Some pharmacological effects of crude saikosides, Saikogenin h and Syrupy vesidue. Shoyakugak Zassi. 93:161-667
- Tanaka T, Sakai E, Mizuno M, Kawamura T, Hisata Y, Okuda K, Noro Y, Zheng XZ, Ding F** (1988) Cultivation and saikosaponin contents of Guangxi *Bupleurum falcatum*. Shoyakugaku Zasshi 42:236-239
- White FF, Nester EW** (1980) Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. J Bacteriol 141: 1134-1141
- Yoshimatsu K, Hatano T, Katayama M, Marumo S, Kamada H, Shimomura K** (1990) IAA derivative tropane alkaloid production in root cultures of a *Duboisia* hybrid. Phytochemistry 29: 3525-3528

(접수일자 1999년 4월 19일)