

인삼 캘러스의 Polyacetylene 생산에 미치는 여러 가지 화학물질의 효과

윤재호, 송원섭¹⁾, 이미숙²⁾, 양덕춘³⁾*

구례야생화 연구소, ¹⁾순천대학교 농업생명과학대학,

²⁾한남대학교 식품영양학과, ³⁾경희대학교 생명과학부

The Effects of Various Chemicals on the Production of Polyacetylene in Ginseng Callus *in vitro* Culture

Jae-Ho Yoon, Won-Seob Song¹⁾, Mee Sook Lee²⁾, Deok Chun Yang³⁾*

Institute of KuRae Wild Flower, Kurae 542-800, Korea

¹⁾College of Agriculture and Life Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²⁾Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

³⁾College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

ABSTRACT

In order to develop the mass production method of anticancer compound-polyacetylene from tissue culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer, these studies were carried out for the effects of various chemicals used as precursor and elicitor *in vitro*. Ginseng callus cultured on the growth medium containing 5mg/l L-phenylalanine was well grown and detected polyacetylene compounds as well as panaxydol and panaxynol. But same media containing α -methyl-D.L.methionine and D.L.-norleucine was not detected any polyacetylene. Panaxydol, one of polyacetylene and active anticancer compound, was detected in calli cultured on media with upper 1mg/l chitosan used as elicitor, but panaxynol was not detected. Nigera used as active elicitor, caused to decrease the growth of ginseng callus, and don't work as elicitor on the biosynthesis of polyacetylene from ginseng callus.

Key words: anticancer, callus culture, chitosan, L-phenylalanine, polyacetylene, panaxydol.

서언

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 재배기간이 매우 길며 병충해 및 연작장해등을 아직 완전히

극복하지 못해 값싸고 안정적인 원료를 공급하는데 다소 문제점이 있다. 그러나 기내세포배양에 의해서 원료를 공급할 경우 우선 안정적으로 필요한 시기에 적절히 원료를 공급할 수 있으며, 원료에 사용된 세

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

포군에서도 유용한 이차대사산물의 함량을 대량으로 높일 수 있어 최근에는 인삼세포의 대량생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Furuya *et al.*, 1983; Kwon *et al.*, 1997; Yang and Yang, 2000; Yang *et al.*, 2001).

인삼에 대한 화학적연구는 주로 인삼사포닌(ginsenoside)에 대해서 연구가 집중되었으나(Osamu, 1977), 근래에 비사포닌계열 화학물질도 관심을 갖게 되었으며 그중에서도 항암성분으로 알려진 polyacetylene에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(Kwon *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1990; Matsunaga *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1983). 인삼의 항암성분연구는 석유에틸추출물로부터 부분정제된 일부 분획이 항암작용을 나타낸다고 보고된 후(Hwang *et al.*, 1984; Hwang *et al.*, 1987), 인삼의 지용성 성분중에서 항암효과를 나타내는 polyacetylene 성분들을 분리, 그 구조를 밝히고 *in vitro* 실험결과 L1210세포에 대해 뚜렷한 세포독성을 나타냈음을 보고 하였다(Ahn *et al.*, 1985). 인삼의 polyacetylene성분에 대한 연구는 1964년 Takahashi등에 의해 처음으로 연구보고되었고, 1974년에 Wrobel등이 새로운 polyacetylene 성분을 분리하기도 하였다.

한편 식물조직배양기술의 발달로 기내에서 인삼 배양세포를 배양한 결과 배양세포에서도 여러 종류의 생리활성물질이 재배삼과는 다소 차이가 있으나 거의 유사하게 합성되고 있음이 보고 되었으며(Yang *et al.*, 2001), 인삼 callus의 기내배양에 의해서 항암물질을 대량생산하기 위한 연구의 일환으로 인삼우수계통으로부터 기내에서 callus를 유기하여 polyacetylene 고함유 세포주를 선발하고, 인삼 callus의 polyacetylene생산에 미치는 식물호르몬 및 배지의 영향을 조사하였으나 그 함량이 매우 미미하였다(Yang *et al.*, 2001).

기내배양 방법에서는 배양조건을 달리해 줌으로써 식물배양세포의 성장과 유효성분의 함량을 조절할 수 있지만 대개 이 두가지 요소는 상호 반비례 관계에 있기 때문에 적절한 생산성(성장량 × 생산율)을 구해서 사용함으로써 유효성분의 최대생산을 극대화시킬 수 있다. 일반적으로 유효성분의 생성에

영향을 미치는 배양조건으로는 (1)배지내에 무기물, 유기물 및 식물호르몬의 첨가, (2)생산코자하는 유용물질의 전구물질 및 elicitor첨가, (3)고온, 저온, UV, γ -ray등의 물리적인 자극, (4)herbicide, salt, heavy metal등과 5-methyltryptophan, aminopterin, potassium chlorate, α -methyl-D.L. methionine, D,L-norleucine, D.L.-*p*-fluorophenylalanine등의 화학적인 자극이 이용되고 있다(Hagimori *et al.*, 1982; Kurz *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1987; Walton and Belshaw, 1988; Yang *et al.*, 2001).

따라서 본 연구는 기내배양을 통해서 인삼 callus에 각종 화학물질을 처리하여 항암물질인 polyacetylene의 증대여부를 조사하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

인삼 callus의 성장과 polyacetylene 생성을 위한 L-phenylalanine, α -methyl -D.L. methionine, D.L.-norleucine의 처리

인삼 callus의 성장과 polyacetylene의 생성여부를 조사하기 위해서 CPA 2mg/l 첨가된 MS배지에 전구물질로써 L-phenylalanine의 농도를 0, 5, 10, 30, 50, 80, 100, 200mg/l씩 처리하여 30일간 고체배양한 후 callus의 성장량을 조사하였으며, TLC에 의해서 polyacetylene 생성여부를 조사하였다.

인삼 callus의 성장과 polyacetylene 생성을 위한 chitosan과 nigeran의 처리

Elicitor의 효과를 조사하기 위해서 상기 chitosan의 농도를 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10, 20, 50, 200mg/l로 처리하였으며, CPA 2mg/l 첨가된 MS배지에 nigeran의 농도를 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0mg/l로 처리하여 30일간 고체배양하여 callus의 성장량과 polyacetylene 생성여부를 조사하였다.

인삼 배양세포로부터 TLC를 이용한 polyacetylene 분석

Table 1. Effect of L-phenylalanine on the growth and production of polyacetylene in ginseng callus*

Conc. of L-phenylalanine (mg/l)	Fresh weight (g/flask)	Polyacetylene	
		Panaxynol	Panaxydol
0	9.425 ± 1.129	**	-
1	10.522 ± 1.004	+	+
5	12.413 ± 0.484	+	+
10	10.005 ± 0.997	+	++
20	10.892 ± 0.666	+	++
50	10.159 ± 0.574	+	++
Fresh ginseng root		+++	+++++

* Callus was cultured on the basal medium with 2mg/l CPA for 30days

** - : Not detected, + : detected, ++ : fair, +++++ : excellent.

인삼 callus로부터 polyacetylene 함유 여부를 신속히 확인하기 위해서 thin layer chromatogram(TLC)방법에 의해서 polyacetylene의 검출 여부를 조사하였다. 냉동건조된 인삼 callus 0.5g를 석유에틸과 에틸이 4 : 1로 혼합된 용매에서 15시간 추출, 다시 농축한 후 동용매 500μL로 희석하여 그중 50μL를 TLC에 적용하였다. TLC 전개용매는 석유에틸과 에틸이 8 : 2로 혼합된 용매를 사용하였으며, 전개 후 anisaldehyde sulfuric acid로 발색시켰다.

결과 및 고찰

인삼 callus 성장 및 polyacetylene 생산에 미치는 L-phenylalanine, α-methyl -D.L. methionine과 D.L.-Norleucine의 영향

인삼 callus 성장과 polyacetylene 합성에 미치는 L-phenylalanine의 효과를 조사하기 위해서 L-phenylalanine 농도별로 배양한 결과, callus 생장은 L-phenylalanine을 첨가한 처리구가 첨가하지 않은 처리구에 비해서 양호한 경향을 보였으며, 특히 L-

Table 2. Effect of α-methyl-D.L. methionine on the growth and production of polyacetylene in ginseng callus*

Conc. of α-methyl-D.L.methionine(mg/l)	Fresh weight of callus (g/flask)	Polyacetylene	
		Panaxynol	Panaxydol
0	8.426 ± 0.473	-	-
5	5.872 ± 0.395	-	-
10	4.462 ± 0.670	-	-
30	5.288 ± 0.465	-	-
50	6.594 ± 0.684	-	-
80	4.973 ± 0.468	-	-
100	4.925 ± 0.457	-	-
Fresh ginseng root		++++	+++++

* Callus was cultured on the basal medium with 2mg/l CPA for 30days.

** - : Not detected, +++++ : excellent.

Table 3. The effect of D.L.-norleucine on the growth of callus and production of polyacetylene in ginseng callus*

Conc. of D.L.-norleucine(mg/l)	Fresh weight of callus (g/flask)	Polyacetylene	
		Panaxynol	Panaxydol
0	8.426±0.473	**	-
5	8.451±0.858	-	-
10	6.314±0.583	-	-
30	5.455±0.673	-	-
50	5.937±0.981	-	-
80	4.573±0.490	-	-
100	3.750±0.164	-	-
200	1.701±0.103	-	-
Fresh ginseng root		++++	+++++

* Callus was cultured on basal medium with 2mg/l CPA for 30days

** - : Not detected, +++++ : excellent.

phenylalanine 5mg/l 첨가시 callus 생체중이 12.413g/flask로서 가장 좋았다(Table 1). 또한 L-phenylalanine 첨가시에는 polyacetylene이 검출되었고 panaxynol뿐만아니라 panaxydol도 검출되었고, 특히 L-phenylalanine 10mg/l이상 첨가시 panaxydol이 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

인삼 callus 성장과 polyacethylen 합성에 미치는 α -methyl-D.L. methionine 효과를 조사하기 위해서 0-

200mg/l까지 농도를 처리하여 30일간 배양하여 생체중을 조사하였던 바, 처리농도에 관계없이 처리구 callus 생장이 무처리구에 비해 감소하였으며, polyacetylene은 panaxynol뿐만 아니라 panaxydol도 전혀 검출되지 않았다(Table 2).

또한 인삼 callus의 성장과 polyacethylen 생성에 미치는 D.L.-Norleucine의 효과를 조사한 결과 D.L.-Norleucine농도가 10mg/l이상 처리구에서부터는 농

Table 4. Effect of nigeran on the growth and production of polyacetylene in ginseng callus*

Conc. of nigeran (mg/l)	Fresh weight of callus (g/flask)	Polyacetylene	
		Panaxynol	Panaxydol
0.00	8.426±0.473	-	-
0.02	7.083±1.711	-	-
0.04	6.709±0.745	-	-
0.08	6.081±1.059	-	-
0.10	7.765±0.785	-	-
0.20	6.151±0.943	-	-
0.50	7.642±0.673	-	-
1.00	6.079±1.137	-	-

* Callus was cultured on the basal medium with 2mg/l CPA for 30days.

** - : Not detected.

Table 5. Effect of chitosan on the growth and production of poly- acetylene from ginseng callus*

Conc. of chitosan(mg/l)	Fresh weight(g/flask)	Panaxynol	Panaxydol
0.0	8.426±0.473	**	-
0.1	8.820±0.223	-	-
0.5	8.518±0.424	-	-
1.0	6.903±0.963	-	+
10.0	5.325±9.462	-	++
20.0	2.968±0.388	-	++
50.0	1.112±0.037	-	++
200.0	1.032±0.084	-	++
Fresh ginseng root		++++	+++++

* Callus was cultured on the basal medium with 2mg/l CPA for 30days.

** - : Not detected, + : detected, ++ : fair, +++++ : excellent.

도가 증가할수록 callus의 성장량은 감소되었으며 80mg/l에서는 절반으로 감소되었다(Table 3). 또한 polyacetylene도 농도에 관계없이 어느 처리구에서나 전혀 검출되지 않았다(Table 3).

인삼 callus 성장 및 polyacetylene생산에 미치는 nigeran과 chitosan의 영향

인삼 callus 성장과 polyacethyleneproductions에 미치는 elicitor으로써 nigeran의 농도를 0-1mg/l까지 처리하여 배양하였던 바, 무처리구에 비해 nigeran 처리구에서 callus의 생장이 다소 감소 되긴 하였으나 거의 영향을 미치지 못했으며 polyacetylene은 어느 처리구에서나 검출되지 않았다(Table 4).

인삼 callus 성장과 polyacethyleneproductions에 미치는 elicitor으로써 chitosan을 처리하여 성장량을 조사한 결과 chitosan 농도가 0.5mg/l까지는 성장에 거의 영향을 미치지 못했으며 polyacetylene도 전혀 생성되지 않았다. 그러나 chitosan 1mg/l이상 처리구에서는 callus 생장이 감소하였으나, polyacetylene중 panaxydiol이 검출되었으며 panaxynol은 어느 농도에서도 검출되지 않았다. 또한 chitosan 10mg/l에서는 callus의 생장이 약 35%가량 감소되었지만 panaxydiol이 상당량 검출되었으며 20mg/l 이상에서는 비록 panaxydiol은 검출되었지만 callus의 생장이

매우 불량하였으며 50mg/l 이상에서는 거의 생장이 되지 않았다(Table 4).

Polyacetylene성분은 두개의 삼중결합을 가지고 있는 C₁₇의 화합물로서 현재까지 백삼 및 홍삼으로부터 9종이 분리, 동정되었는데 이 중에서 panaxynol과 panaxydiol이 인삼 polyacetylene성분의 총 90% 이상을 차지하며 panaxytriol은 거의 홍삼에만 함유되어 있는것으로 보고되고 있다(Shin *et al.*, 1983). 본 실험결과 생성된 panaxydiol은 매우 강력한 항암효과를 나타내며(Matsunaga *et al.*, 1994), 인삼 callus에서도 panaxydiol이 생성되고 있음을 TLC를 통해서 확인하였으며, 기내배양기에서 뿌리의 형태로 성장되는 인삼모상근에서도 panaxydiol이 생성되고 있음이 이미 보고되었고, 여기에서 추출된 panaxydiol이 쥐의 간 ACAT을 억제하는 효과가 있음을 보고한 바 있다(Kwon *et al.* 1997). 따라서 본 연구는 nitric oxide synthase에 의해서 nitrite의 생성의 저해작용을 하며(Wang *et al.*, 2000), L1210 암세포에 강력한 cytotoxicity을 갖는 panaxydiol(Matsunaga *et al.*, 2000)을 기내 배양에 의해서 생산할 수 있음을 입증하였으며, 특히 L-phenylalanine을 배지에 첨가하거나, elicitor으로써 chitosan를 처리함으로써 배양세포에서 panaxydiol의 함량을 증대시킬 수 있음을 제시하였다.

적요

인삼 callus의 기내배양에 의해서 항암물질을 대량생산하기 위한 연구의 일환으로 인삼 callus의 polyacetylene생산에 미치는 전구물질 및 elicitor의 효과를 조사하였다. 5mg/l의 L-phenylalanine첨가배지에서 인삼 callus의 생장과 polyacetylene합성이 가장 양호하였으며 panaxynol뿐만 아니라 panaxydol도 형성되었다. 반면에 α -methyl-D.L.methionine과 D.L.- norleucine 첨가구에서는 polyacetylene이 전혀 생성되지 않았다. Elicitor로 사용되는 nigeran은 농도가 높아질수록 인삼 callus의 생장을 억제시키지만 polyacetylene생성에는 전혀 영향을 미치지 못했다. 그러나 chitosan은 0.5mg/l의 농도에서는 인삼 callus의 생장과 polyacetylene의 생성에 영향을 주지 못하였으나, 1mg/l 이상 처리구에서는 panaxynol은 검출되지 않았지만 panaxydol은 검출되었다.

감사의 글

본 연구는 Biogreen 21(사포닌 합성관련 유전자의 조절을 통한 신기능성 물질개발) 연구비로 일부 수행된 연구결과입니다. 연구비 지원에 대해서 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Ahn, B. Z. and I. S. Kim. 1985. Antineoplastic natural products and the analogue vi Arch. Pharm. Res. 8:283.

Furuya, T., T. Yoshikawa, T. Ishii and K. Kajii. 1983. Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta Medica* 47:183-187.

Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Obi. 1982. Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol.* 69:653-656.

Hwang, W. I. and S. K. Oh. 1984. A study on the anticancer activities of lipid soluble ginseng extract and ginseng saponin derivatives against some cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.* 8:153-159.

Hwang, W. I., K. H. Park and J. M. Paik. 1987. A cytotoxic activity of *Panax ginseng* extract against some cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Korean J. Ginseng Sci.* 11:173-179.

Kurz, W. G. W., K. B. Chatwon, F. Constabel, J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart and B. R. Worth. 1981. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures VIII. Characterisation of the PRL/200 cell line. *Planta Med.* 42:22-24.

Kwon, B. M., S. H. Ro, J. Y. Nam, H. J. Jung, I. R. Lee and Y. K. Kim. 1997. Polyacetylene analogs, isolated from hairy roots of *Panax ginseng*, inhibit Acyl-CoA : cholesterol acyltransferase. *Planta Med* 63:552-553.

Matsunaga, H., M. Katano, H. Yamamoto, H. Fujito and M. Mori. 1990. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Chem Pharm Bull* 38:3480-3482.

Matsunaga, H., T. Saita, F. Nagumo, M. Mori and M. Katano. 1994. Relationship between antiproliferative activity of acetylenic alcohol, panaxydol, and its affinity for target cell membrane. *Gan To Kagaku Ryoho* 21:2585-2589.

Osamu, T. 1977. Recent studies on the chemistry of ginseng saponins. *Korea. J. Ginseng Sci.* 2(1):9-15.

Shin, S. C., H. Y. Koh and B. H. Han. 1983. Polyacetylenes from *Panax ginseng* roots. *Phytochemistry* 22(8):1817-1818.

Suzuki, T., T. Yoshioka, M. Tabata and Y. Fujita. 1987. Potential of *Datura innoxia* cell suspension cultures for glucosylating hydroquinone. *Plant Cell Reports* 6:275-278.

Walton, N.J. and N.J. Belshaw. 1988. The effect of cadaverine on the formation of anabasine from lysine in hairy root cultures of *Nicotiana hespeois*. *Plant*

- Cell Report 7:115-118.
- Wang, C. N., Y. J. Shiao, Y. H. Kuo, C. C. Chen and Y. L. Lin. 2000. Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *saposhnikovia divaricata* and *Panax quinquefolium*. *Planta Med* 66:644-647.
- Wrobel, J. T., Z. Dabowski, J. K. Gielzynska, A. Iwanow, K. Kabzinska, J. Poplawski and J. Ruzkowska. 1973. *Tluszcz Srodki Piorace Kosmet.* 17, 163.
- Yang, D. C. and K. J. Yang. 2000. Patterns and contents of ginsenoside in normal root parts and hairy root lines of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Plant Tissue Culture* 27:485-489.
- Yang, D. C., N. H. Song, K. J. Yang and C. H. Bae. 2001. Analysis and culture conditions for biosynthesis of polyacetylene from callus of ginseng superior lines. *Korean J. Plant Tissue Culture* 28(3):123-128.
- Yoo, B. S., H. J. Lee, S. R. Ko, D. C. Yang and S. Y. Byun. 2000. Studies on the extraction of polyacetylene from Korean ginseng using supercritical carbon dioxide. *Korean J. Biotechnol Bioen.* 15:80-83.

(접수일 2004. 10. 30)

(수락일 2004. 12. 05)