

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 현탁세포배양에서 Salidroside 생산을 위한 외재 호르몬의 영향 및 처리 농도의 최적화

최혜진^{1*}, 김수정², 황백¹, 안준철^{3,4}

¹전남대학교 생물학과, ²금호석유화학 연구소, ³서남대학교 생명과학과, ⁴(주)에스엠바이오

Optimization of Treatment Concentration and Screening of Exogenous Plant Growth Regulators for Improvement of Salidroside Yield in *Rhodiola sachalinensis* A. Bor Cell Suspension Cultures

Hye-jin Choi^{1*}, Su-jeong Kim², Baik Hwang¹, Jun-cheul Ahn^{3,4}

¹Dept. of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Kumho Life & Environmental science Lab, Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd, Gwangju 500-712, Korea

³Dept. of Life Science, Seonam University, Namwon, 590-711, Korea

⁴SM-bio Co., Gwangju, 500-757, Korea

ABSTRACT. To enhance salidroside productivity from a cell suspension cultures of *Rhodiola sachalinensis*, various combinations of auxin (NAA) and cytokinins (BA, Kinetin) concentration and addition of GA₃, TDZ, zeatin, spermine and spermidine at a hormone combination to be established were examined. NAA/BA combination is superior to NAA/kinetin combination in biomass and salidroside content. Maximum salidroside production (64.6 ± 8.9 mg/L medium) was obtained from 2B₅ medium with 1 mg/L NAA and 5 mg/L BA. The adding of GA₃ (0.01 mg/L~5 mg/L) was beneficial for salidroside accumulation and the highest productivity of salidroside, 90.3 ± 8.34 mg/L, was obtained from 2B₅ medium supplemented with 1 mg/L NAA, 5 mg/L BA and 0.1 mg/L GA₃. On TDZ, zeatin, spermine and spermidine, expectant results were not obtained except a little affirmative effect of spermidine (69 ± 2.88 at 1 mg/L).

Key words: Cell suspension culture, GA₃ (Gibberellic acid), salidroside

서 론

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 고산지대에서 자라는 다년생 초본 식물로서 돌나무과의 돌꽃속에 속한다. 홍경천이라는 별칭을 가지며 뿌리와 줄기를 약용한다 (Lee 1977). 대부분은 해발 1,700 - 2,300 m 사이의 주야간 온도차가 크고, 저온, 건조, 광풍, 강자외선과 같은 고산지대의 혹독한 환경에서 석회암이나 화강암 등의 암석사이에서 서식한다 (Jiang et al. 1994). 참돌꽃은 중국, 러시아

등에서는 오래전부터 진정제, 해열제, 수렴제 등의 민간약재로 사용되고 있으며, 전초를 약으로 쓸 수 있지만 대개 굵은 뿌리를 약으로 쓴다. 현대에 와서도 뿌리는 간장해독, 항피로, 신경증 및 고혈압 등에 약성이 있는 것으로 조사되었다 (Lee et al. 2002). 특히, 주요 약리 성분으로 밝혀진 salidroside는 무산소증, 극초단파방사성 및 피로환자의 치료효과와 (Ming 1986; Furmanowa et al. 1998) 중추 신경의 억제작용, 강심작용, 아드레날린 분비 촉진으로 인한 혈당조절 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Lee et al. 2000; Zong et al. 1991). 주요 약리 성분으로는 salidroside와 p-tyrosol, 배당체로 조사되었으며 (Linch et al. 2000), 이외에 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라보류 화합물과 미량의 휘

*Corresponding author Tel 062-530-0790 Fax 062-530-3409

E-mail: jcahn@seonam.ac.kr

발성 물질, 아스파라긴산, 트레오닌, 글루타민산, 글리신 등 20여종의 아미노산이 함유되었다 (Park et al. 1999). 또한 monoterpene glycoside, cyanoglycoside, phenethyl glycoside, aliphatic glycoside, phenylpropanoid, proanthocyanidin 등을 함유한다. 한편 *R. sachalinensis*로부터 kaempferol, kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside, herbacetin-7-O-L-rhamnopyranoside 및 flavolignan rhodiolinin 등의 flavonoid를 포함한 페놀성 화합물의 항산화 활성에 대하여 보고한 바 있다 (Lee et al. 2000; Zong et al. 1991). 이와 같이 참돌꽃은 제한된 지역에서만 자생하는 특성과 더불어 유효 생리활성물질을 함유하고 있어, 생리활성의 지속적 탐색 외 주요 생리활성물질의 안정적인고 효율 높은 생산을 이루어야 할 필요가 있다. 이러한 목적에서 본 연구팀은 참돌꽃 세포배양을 확대하고, 세포배양으로부터 각 생리활성물질인 salidroside를 분리·동정한 바 있다 (Kim et al. 2004a; Kim et al. 2004b). 본 연구를 통해서서는 이전의 보고 (Kim et al. 2004a)보다 참돌꽃 현탁세포배양에서 salidroside 함량 및 생산성을 개선하고자 세포의 성장을 조절하는 외재 호르몬의 양과 조합을 보다 정밀하게 조절하고자 하였으며, 기타 호르몬의 첨가 및 농도가 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)의 현탁배양세포는 Kim 등 (2004)이 유도하여 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 2B₅ 액체배지 (2B₅: B₅ 배지의 macro element가 두 배, 3% sucrose, pH 5.7)와 25°C의 암상태에서 100 rpm의 회전식 진탕배양조건에서 유지되고 있는 세포주를 사용하였다.

Salidroside 생산에 대한 외재호르몬 NAA와 BA/kinetin의 영향 및 처리 농도 최적화

호르몬 처리에 앞서 현탁배양세포는 상기 호르몬 조성을 갖는 새로운 배지에 이식하여 2주간 전배양 (preculture)한 다음 현탁세포를 20 μ m pore size의 sieve에 수확하고 무균증류수에 3회 세척 후 충분히 수분을 제거한다. 수분을 제거한 현탁세포는 무균대내에서 0.5 g (Fresh wt)씩 정량하여 이식하였다. 처리 조건은 30 ml liquid medium/100 ml erlenmeyer flask의 기본조건으로 3% sucrose, pH 5.7로 조정된 2B₅ 기본배지에 0.5 ~ 5 mg/L NAA와 0.5 ~ 5 mg/L BA 및 0.5 ~ 5 mg/L NAA와 0.5 ~ 5 mg/L kinetin으로 조합하였다. 3주간 배양한 후 현탁세포는 수확하여

여과지 (Whatman No. 2)로 충분히 습기를 제거한 다음 생중량을 측정하고, 액체질소로 급속동결 후 48 시간 동결건조기 (Ilsin Co., Korea)에서 동결 건조하여 건중량을 측정하였다. 모든 처리는 5회 반복하여 최대치와 최소치를 제거한 3처리구의 수치만으로 평균과 오차를 계산하였다.

Salidroside 생산에 대한 TDZ, GA₃, zeatin 및 polyamine의 영향

조사의 조건은 상기 조건과 동일하게 수행하였으며, 0.01 ~ 5 mg/L GA₃ (Gibberellic acid), 0.001 ~ 0.05 mg/L TDZ (thidiazuron), 0.01 ~ 5 mg/L zeatin, 1 ~ 100 mg/L spermine 및 1 ~ 100 mg/L spermidine으로 조성하여 3주간 배양하여 생중량, 건중량을 측정하였다.

Salidroside 분석

Salidroside의 함량을 정량분석 하기 위해서 현탁배양세포를 동결건조 시료 0.2 g을 실온에서 methanol (MeOH) 10 ml 씩 3회 반복 추출한 다음 여과지 (Whatman No. 2)로 여과하여 여과액을 합하고 rotary evaporator로 농축시켰다. 농축된 시료는 MeOH 3 ml로 재용해시켜 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC 분석은 Waters (Water Co., U.S.A)의 injector (600), pump (600), autosampler (717plus), detector (486 Tunable absorbance), integrator (Autochro-WIN, yoo-unclin)를 이용하였으며, 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈ (300 × 3.9 mm I.D., 10 μ m)을, 이동상으로는 20% MeOH (v/v)을 사용하였다. 시료 10 μ l 는 주입하였으며, 용매는 1 mL/min의 속도 및 214 nm에서 자외선 흡광도로 검출하였다.

결과 및 고찰

외재 호르몬의 처리에 따른 salidroside 생산의 최적화

참돌꽃의 세포를 유도하고 배양한 Kim 등 (2004a)은 현탁배양세포의 성장비를 기준으로 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 2B₅ 배지에서 가장 빠른 성장을 보이고 처리 조건에 따라 0.17 ~ 0.41%의 salidroside 함량 (% dry wt)을 보고하였으며, Xu 등 (1999)은 참돌꽃 현탁배양세포에서 호르몬의 조건과 탄소원의 농도 등을 조절하여 0.25 ~ 0.8%의 함량을 보고하여 두 경우 모두 참돌꽃 세포배양에서 salidroside의 생산이 자연산 근경 (0.17%)에 비교하여 우수하다고 하였다. 처리조건은 0.5 ~ 5 mg/L NAA와 0.5 ~ 5 mg/L의 BA의 조합과 0.5 ~ 2 mg/L NAA과 0.5 ~ 5 mg/L kinetin의 조합 및 GA₃ (0.01 ~ 5 mg/L), TDZ (0.001 ~ 0.05 mg/L), zeatin (0.01 ~ 5 mg/L), spermine (1 ~ 100 mg/L),

spermidine (1 ~ 100 mg/L)가 첨가된 2B₅ 액체배지에 0.5 g (Fresh wt)을 접종하여 3주간 배양하여 성장과 함량을 측정하였다. 그 결과, NAA/BA 조합이 NAA/kinetin 조합보다 함량과 생산성이 높다고 보고한 Xu 등 (1999)의 보고와 마찬가지로 NAA/BA 조합이 NAA/kinetin의 조합에 비교하여 성장과 함량이 높았다. 특히, 0.37 mg/L NAA 와 2.25 mg/L BA 에서 최대 %함량이 0.52 ± 0.04인 Xu 등의 결과에 비교하여 본 실험에서는 1 mg/L NAA 와 5 mg/L BA 의 조합에서 salidroside %함량은 0.65 ± 0.01으로 생산성이 64.6 mg/L medium에 이르는 보다 우수한 결과를 얻었다. 반면에 0.5 ~ 2 mg/L NAA와 0.5 ~ 5 mg/L kinetin의 조합에서는 NAA/BA 조합에 비교하여 성장속도의 전반적 감소와 salidroside %함량도 낮아 생산성이 19 ~ 23 mg/L에 불과하였다 (Figure 1). 한편, 1 mg/L NAA와 5 mg/L BA를 기본 호르몬 조건으로 설정하고 세포와 식물체의 생육 및 물질대사 등에 영향을 주는 주요 호르몬인 GA₃, TDZ, zeatin, spermine, spermidine 등의 salidroside 생산성에 미치는 효과를 조사하였다. GA₃는 0.01 mg/L에서 5

mg/L까지 처리한 결과, GA₃ 무처리구 (0.4 ± 0.03 g, dry wt)에 비교하여 생장은 감소하는 경향 (0.34 ± 0.01 ~ 0.4 ± 0.04 g, dry wt)이었으나, %함량에서는 대조구 0.46 ± 0.06%에 비교하여 0.62 ± 0.04% (GA₃ 5 mg/L) ~ 0.75 ± 0.11% (GA₃ 0.1 mg/L)로 증가하여, 생산성에서 최대 90 mg/L (GA₃ 1 mg/L 처리구)의 유의적인 증가를 나타내었다 (Figure 2). 그 외 TDZ는 *Centella asiatica*의 유식물체 배양에서 대조구에 비해 TDZ의 호르몬 처리가 asiaticoside의 생산성에서 3배의 증가를 보였다는 보고 (Kim et al. 2004)에 반하여 본 실험에서 TDZ는 0.001 ~ 0.05 mg/L 농도에서 대조구 (0.46 ± 0.06%)에 비교하여 생장 (0.01 mg/L에서 0.32 ± 0.07 ~ 0.05 mg/L에서 0.39 ± 0.01 g)에서는 유의적인 변화를 보이지 않아 TDZ %함량에서 약간의 증가

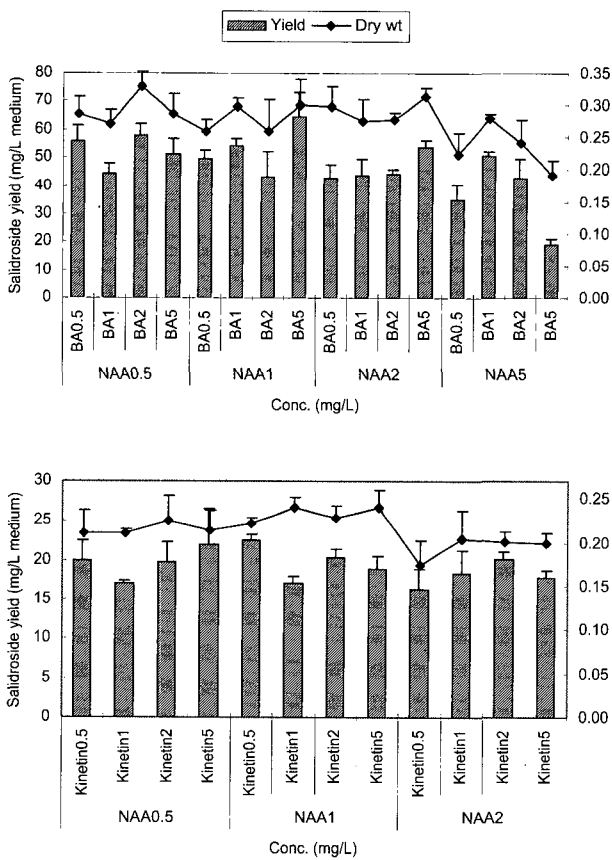


Figure 1. Effect of various NAA, BA, Kinetin concentrations on the salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* suspension cells in 2B₅ liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum : 0.5 g (fresh weight). Thirty milliliter liquid medium/100 ml erlenmeyer flask.

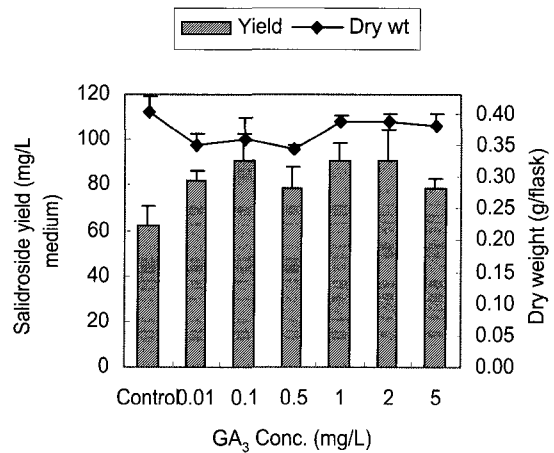


Figure 2. Effect of GA₃ on the salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* suspension cells in 2B₅ liquid medium containing 1 mg/L NAA and 5 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum : 0.5 g (fresh weight). Thirty milliliter liquid medium/100 ml erlenmeyer flask.

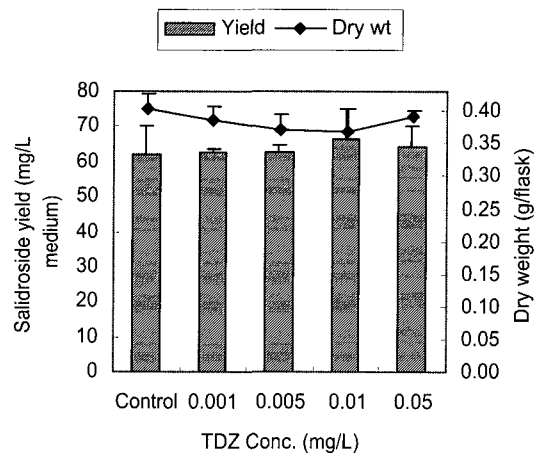


Figure 3. Effect of TDZ on the salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* suspension cells in 2B₅ liquid medium containing 1 mg/L NAA and 5 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum : 0.5 g (fresh weight). Thirty milliliter liquid medium/100 ml erlenmeyer flask.

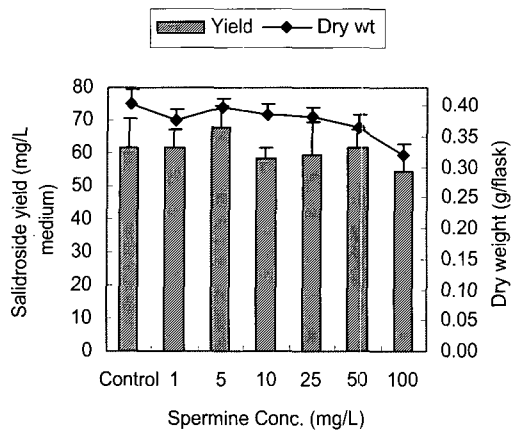


Figure 4. Effect of spermine on the salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* suspension cells in 2B₅ liquid medium containing 1 mg/L NAA and 5 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum : 0.5 g (fresh weight). Thirty milliliter liquid medium/100 ml erlenmeyer flask.

($0.49 \pm 0.05 \sim 0.54 \pm 15\%$)에도 불구하고, 생산성에 있어서 유의적인 변화를 보이지 않았다 (Figure 3). Spermine과 spermidine의 polyamine은 조직 배양에 있어서 세포의 생장의 영향을 미치는 것으로 보고 되었는데 (Han et al. 2000), 본 실험에서는 spermine은 농도가 높아질수록 생장이 감소하였으며, %함량에서는 약간의 증가가 있었으나, 생산성에서의 증감에서 유의적인 의미를 보이지 않았다 (Figure 4). Spermidine의 경우는 1 mg/L의 농도에서 약간의 유의적인 생산성 증가 (69.04 ± 2.88 mg/L)를 보였으나 5 mg/L 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 나타냈다 (Figure 5). Zeatin 역시 생장과 함량에서 증가를 보이지 않았다 (데이터 미제시).

이상의 결과로 참돌꽃 현탁세포배양으로부터 유효 생리 활성물질인 salidroside를 효율 높고 안정적으로 생산하고자 배양환경 중 호르몬 조합 및 농도에 대한 기본 조건이 설정되었다. 또한 이를 기반으로 보다 세밀한 화학적/물리적 배양환경의 조절이 필요하며, 이의 지속적인 기술의 배가에 따라서는 생물공학적인 방법으로 천연 이차대사 성분을 생산할 수 있는 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 현탁배양에서 salidroside 생산성을 개선하고자 auxin인 NAA와 cytokinin인 BA와 kinetin, 그 외에 GA₃, TDZ, zeatin, spermine과 spermidine을 조합하여 조사하였다. NAA/BA 조합은 NAA/kinetin조합과 비교했을 때 생장과 salidroside 함량이 증가하였다. Salidroside 함량의 증가에 의한 생산성 (64.6 ± 8.9 mg/L medium)은 1 mg/L NAA와 5 mg/L BA가 첨가

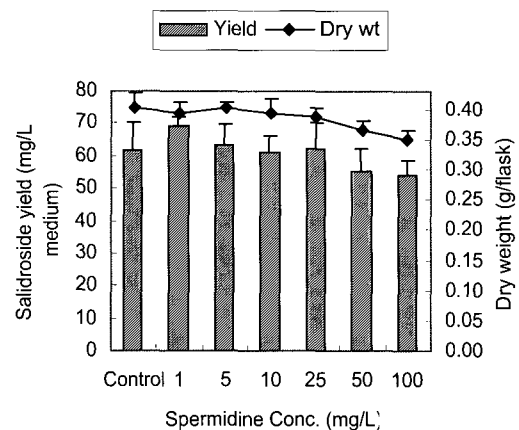


Figure 5. Effect of spermidine on the salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* suspension cells in 2B₅ liquid medium containing 1 mg/L NAA and 5 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum : 0.5 g (fresh weight). Thirty milliliter liquid medium/100 ml erlenmeyer flask.

된 2B₅ 배지에서 높게 나타났으며, 최대 salidroside의 생산성은 1 mg/L NAA, 5 mg/L BA와 1 mg/L GA₃이 첨가된 2B₅ 배지에서 90.3 ± 8.34 mg/L로 나타났다. 그 밖의 TDZ, zeatin, spermine과 spermidine 처리에서는 생산성에 있어서 증가를 보이지 않았으며, spermidine의 경우에 약간의 유의적인 생산성 증가를 보였다.

사 사

본 연구는 산업기술재단의 지역혁신인력양성사업과 중소기업기술혁신사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Furmanowa M, Skopinska-Rozewska E, Rogala E, Hartwich M (1998) *Rhodiola rosea* in vitro culture-phytochemical analysis and antioxidant action. Acta Soc Bot Pol 67: 69-73
- Han TJ, Hong JP, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (2000) Effect of polyamines on formation of adventitious roots, trichomes and calli by NAA in leaf segment cultures of *Arabidopsis thaliana*. Kor J Plant Tiss Cult 27: 117-123
- Jiang Miglan, Zhong Wentian, Han hong (1994) Studies on producing effective medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin J Shen Univ 25: 355-359
- Kim OT (2004) Production of triterpene saponins and cloning of oxidosqualene cyclases from *Centella asiatica* (L.) Urban. PhD thesis, Chonnam National University, Gwangju

- Kim SJ, Hwang B, Hwang SJ, Ahn JC (2004a) Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Kor J Plant Biotechnol 31: 89-94
- Kim SJ, Kim KS, Hwang SJ, Chon Su, Kim YH, Ahn JC, Hwang B (2004b) Identification of salidroside from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor and its production through cell suspension culture. Kor J Medicinal Crop Sci 12: 203-208
- Lee MW, Lee YH, Park HM, Tosh SH, Lee EJ, Jang HD, Kim YH (2000) Antioxidant phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch Pharm Res 23: 455-458
- Lee YA, Cho SM, Lee MW (2002) Flavonoids from the roots of *Rhodiola sachalinensis*. Kor J Pharmacogn 33: 116-169
- Lee YH (1977) Flora of Korea. Kyo-Hak publishing, Seoul, pp. 277
- Linch PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS (2000) Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. Arch Pharm Res 23: 349-352
- Ming HQ (1986) The synthesis of salidroside and its pharmacological properties. Chin J Pharm Bull 21: 373-375.
- Park SK, Han YK, Kim KS, Kim JI (1999) A medicinal herbs *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. of the secret. Jinsol publishing, Seoul, pp. 13-17
- Xu JF, Liu CB, Han AM, Feng PS, Feng, Su ZG (1998) Strategies for the improvement of salideroside production in cell suspension cultures of *Rhodiola sachalinensis*. Plant Cell Rep 17: 288-293
- Xu JF, Yang PQ, Han AM, Su ZG (1999) Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose. Plant Cell Tiss Organ Cult 55 : 53-58
- Zong Y, Lowell K, Ping JA, Che CT, Pezzuto JM, Fong HH (1991) Phenolic constituents of *Rhodiola coccinea* a tibetan folk medicine. Plana Med 57: 589

(접수일자 2005년 2월 2일, 수리일자 2005년 6월 2일)