

생물반응기 배양에서 성장조절제에 따른 섬오갈피 부정근 증식 및 Eleutheroside와 Chlorogenic Acid 생산

안진권^{1*}, 박소영¹, 이위영¹, 이정주²
¹국립산림과학원 생물공학과, ²유전자원과

Effects of Growth Regulators on Adventitious Root Growth and Eleutherosides and Chlorogenic Acid Accumulation in Air Lift Bioreactor Cultures of *Eleutherococcus koreanum*

Jin-Kwon Ahn^{1*}, So-Young Park¹, Wi-Young Lee¹, Jeong-Ju Lee²

¹Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

²Genetics Resources Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT The influence of different growth regulators on biomass of adventitious roots and secondary metabolites accumulation in bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum* was studied. The maximum growth of adventitious roots was observed in the presence of 2.0 mg/L IBA (6.7 g DW/L). However the productivity of eleutheroside E was not significantly different among IBA levels. High level of thidiazuron (TDZ) efficiently increased both root growth and secondary metabolites production. Especially when 0.1 mg/L TDZ was combined with 3.0 mg/L IBA, the highest eleutheroside E accumulation (3,327 µg/g DW) was observed. When the same TDZ level was treated in combination with 5.0 mg/L IBA, both chlorogenic acid and eleutheroside B were accumulated to maximum level. In contrast, zeatin remarkably suppressed the accumulation of both eleutheroside B and chlorogenic acid.

Key words: Chlorogenic acid, *Eleutherococcus koreanum*, eleutheroside, root culture

서 론

섬오갈피 (*Eleutherococcus koreanum*; syn. *Acanthopanax koreanum*)는 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 약용수종으로 오래전부터 민간에서 신경통, 류머티즘, 당뇨, 중풍, 고혈압 등에 사용되어 왔다 (Yook et al. 1998). 현재까지 섬오갈피에는 coumarin류 화합물인 eleutheroside B₁, steroid 및 triterpenoid류인 β-sitosterol, lignan류의 eleutheroside E와 B, saponin류로는 eleutheroside A, I, K, L, M, ciwujianoside A, B, C, D, E (Tang 1992) 이외에도 acanthoside

D와 acanthoic acid가 분리되었다 (Kang et al. 1996; Lee et al. 2001). 그 중 eleutheroside E와 B은 항스트레스, 항균 등에 있어 강한 생리활성을 갖고 있고 (Slacanin et al. 1991; Tang 1992), chlorogenic acid는 위궤양을 억제하며 eleutheroside E의 활성을 증가시키는 주된 물질로 알려져 있다 (Ahn et al. 2000; Slacanin et al. 1991; Fujikawa et al. 1996). 그러나 오갈피속 식물은 종마다 다소 차이는 있으나 대부분 극도의 미숙종자로 가시오갈피가 발아에 3년 이상이 소요되고 (Choi et al. 1999), 섬오갈피는 제주도에서만 자생하는 수종으로 서식지가 주로 해발 500 m 이상의 계곡이나 숲 등지이다. 또한 종자가 휴면성이 있어 발아에 2년 이상이 소요되어 국내외로 식물체 재생 (Choi et al. 1997)과 약용성분 (Choi and Kim 2002; Yook et al. 1998;

*Corresponding author Tel 031-290-1166 Fax 031-290-1020
E-mail AHNJK@foa.go.kr

Lee et al. 2001)에 관한 연구만 일부 보고되어 있을 뿐 아직 기내배양을 통한 이차대사산물 생산에 대한 연구는 미흡하다.

생물반응기는 대량생산과 생산비 절감에 초점을 맞추어 인삼 (Yu et al. 2002), *Hypericum perforatum* (Zobayed and Saxena 2003), *Beta vulgaris* (Suresh et al. 2004) 등 약용식물의 biomass 생산연구에 이용되었다. 모상근이나 부정근은 생물반응기 배양을 통한 biomass 대량생산시 연속적인 증식과 안정적인 공급이 가능한 배양재료이고 현탁배양 세포보다 유전적, 생화학적으로 안정적이어서 이차대사산물 생산에 적합한 재료로 여겨져 왔다 (Bourgau et al. 2001; Yu et al., 2002; Lazaridou et al., 2002; Paek and Chakravarthy 2003). 최근 생물반응기를 이용한 부정근 배양 시스템은 인삼을 모델로 하여 국내에서도 그 산업화 가능성이 제시되었다 (Seon et al. 1999).

이차대사산물을 생산하기 위해 세포나 부정근을 배양할 경우 생장과 이차대사산물의 생합성을 동시에 최대화해야 하는 것이 이상적이나 이를 동시에 최적화하기는 어렵다 (Bourgau et al. 2001). 당근 세포배양시 배지에서 2,4-D를 제거하고 광조건 하에 두면 anthocyanin이 생합성 되나 이때 세포의 증식은 멈추게 된다 (Takeda 1988). 따라서 biomass 뿐만 아니라 이차대사산물의 생합성을 증가시키기 위해서는 biomass 증식에 직접적인 영향을 미치는 성장조절제의 영향이 우선 구명되어야 할 것이다.

이러한 이유로 본 연구는 약용수종이나 자생지가 제주도 인근에 국한되어 있고 기외 재배시 이용에까지 오랜 기간이 소요되는 섬오갈피를 대상으로 부정근 증식과 유용 이차대사산물 생산에 미치는 성장조절제의 영향을 구명함으로써 부정근 대량생산을 체계화 하기위하여 실시되었다.

재료 및 방법

식물재료

섬오갈피 종자는 국립산림과학원 유전자원립 (수원)에서 채취하여 2년 정도 습윤 저온 저장한 것을 이용하였다. 종자는 2% NaOCl로 15분간 표면살균하고 멸균수로 3회 세척 후 미숙배를 적출하여 1.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 2개월간 암배양하여 배발생 캘러스를 얻었다. 배발생 캘러스는 다시 성장조절제가 제거된 1/2 MS 배지에 옮겨 체세포 배를 유도하였고, 동일한 배지에 계대배양하여 식물체로 발달시켰다. 2개월 후 체세포 배 유래 식물체로부터 뿌리를 절단하여 2-3 cm 길이로 자른 후 3.0 mg/L indolebutyric acid (IBA), 0.01 mg/L thidiazuron [TDZ: N-phenyl-N'-(1,2,3-thiadiazol-yl)urea]과 30 g/L sucrose가 첨가된

1/2 MS 액체배지에 접종하고 110 rpm 속도로 암배양 하였다. 부정근은 4주 간격으로 동종의 신선한 배지로 계대배양하여 생물반응기 배양을 위한 재료로 사용하였다.

생물반응기 배양

성장조절제에 따른 부정근 증식과 이차대사산물 생산 특성을 구명하기위해 1/2 MS 배지에 IBA를 1.0-5.0 mg/L 농도로 달리하여 단독 첨가하였고, IBA를 3.0 mg/L와 5.0 mg/L로 고정된 상태에서 TDZ 농도를 0.01, 0.05, 0.1 mg/L로, IBA 5.0 mg/L에 zeatin을 0.01, 0.05, 0.1 mg/L 조합 처리하였다. 생물반응기 배양은 20 L 풍선형 공기부양식 생물반응기 (Son et al. 2000)에 4 L의 액체배지를 첨가하고 1 cm 길이로 절단한 부정근 30 g을 각각 접종하였다. 이때 생물반응기내 공기공급량은 flowmeter (Dwyer Inc., IN, USA)로 0.1 vvm 되게 조절하였고, 배양은 23±1℃가 유지되는 배양실에서 암배양하였다. 배지는 절편체에서 부정근 원기가 형성되어 왕성하게 성장하는 4주 (Figure 1B)와 7주후에 동종의 신선한 배지를 각각 4 L씩 더 첨가하여 총 배지량이 12 L되게 하였다. 배양 9주 후 (Figure 1C)에 수확하여 생체중을 측정하고 다음 충분히 음건 (Figure 1D), 분쇄하여 eleutheroside E, Br와 chlorogenic acid 분석을 위한 시료로 사용하였다.

Eleutherosides와 chlorogenic acid 분석

Eleutheroside와 chlorogenic acid의 추출과 분석은 Ahn 등 (2000)의 방법에 따라 실시하였다. Eleutheroside 분석은 Spherisorb ODS column (4.6 mm × 250 mm, Jasco, Grob-Umstadt, Germany)에 UV detector (UV 3000 HR, TSP, USA)가 장착된 Thermo Separation Products HPLC system (TSP, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 이동상은 물과 acetonitrile을 초기 10, 30, 40, 45, 46, 50분에 각각 95:5, 90:10, 60:40, 50:50, 45:55과 95:5의 비율로, 0.6 mL/min의 속도로 흘러보냈다. 표준 eleutheroside E (liliodendrin), B (syringin)와 chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)는 Nakarai Inc. (Japan)와 Sigma (USA)로부터 구입하여 부정근에서 추출한 이차대사산물과 비교하였고, 220 nm 파장에서 검출하였다.

결과 및 고찰

부정근 30 g을 TDZ 0.01 mg/L에 IBA 1.0 ~ 5.0 mg/L가 농도별로 첨가된 1/2 MS 배지에서 20 L 공기부양식 생물반응기를 이용하여 9주간 암배양하였다. 배양 2주 후 모든 처리에서 뿌리표면에 형성된 부정근 원기를 관찰할 수 있었고, 3주가 지나면서 부정근은 길이와 부피 성장을 하였다

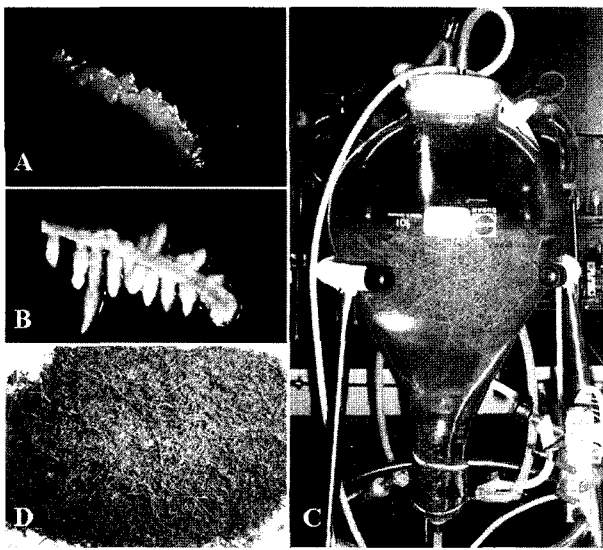


Figure 1. Adventitious root production of *E. koreanum* in a 20 L air-lift bioreactor. A, Protuberances of root primordia on a root explant surface on 1/2 MS containing 0.01 mg/L TDZ and 3.0 mg/L IBA after 2 weeks of culture; B, Adventitious root growth in the same medium after 4 weeks of culture; C, Well grown adventitious roots in a 20 L air-lift bioreactor after 7 weeks of culture; D, Harvested, then freeze dried adventitious roots.

(Figure 1). 배양 9주 후 IBA 농도에 따른 부정근의 생육을 조사하였다 (Figure 2). 부정근은 IBA 2.0 mg/L가 첨가된 배지에서 6.7 g DW/L로 증식에 가장 적합하였으며 그 이상 첨가하였을 때는 증식이 오히려 억제되었다.

IBA 농도에 따른 이차대사산물 생산을 보면 eleutheroside E의 함량은 IBA 농도에 관계없이 1,063~1,291 µg/g DW으로 유사한 수준이었으나 eleutheroside B와 chlorogenic acid는 생육이 저조한 IBA 4.0과 3.0 mg/L 처리구에서 각각 함량이 증가하였다. 이차대사산물 집적은 기내에서 종종 식물의 생장과 상반된 결과를 보여주는데 이는 식물의 이차대사산물이 세포증식과 이차대사 생합성에 동시에 이용되므로 경합에 의해 식물생장이 증가하면 이차대사산물의 생산이 감소하는 결과를 초래하는 것으로 여겨진다 (Bourgaud

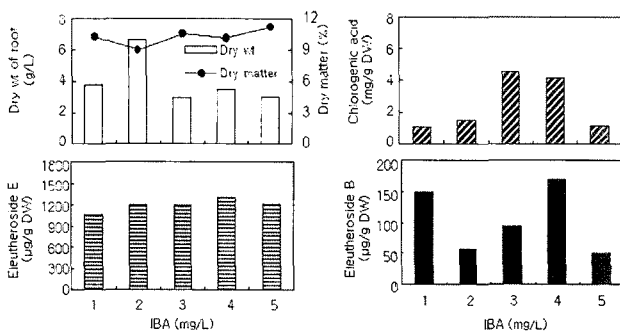


Figure 2. Effects of IBA concentrations on growth and secondary metabolites production of adventitious roots cultured in 20 L air-lift bioreactors after 9 weeks of culture in *E. koreanum*.

et al. 2001). 이차대사산물 생산을 위해 세포나 부정근의 증식을 위해 첨가하는 auxin 중에 IBA와 NAA는 이차대사산물 생합성에 크게 영향을 미치지 않고 2,4-D는 억제한다고 알려져 있으나 드물게 영향을 미치지 않는다는 보고도 있어 (Sahai and Shuler 1984) 식물 종에 따라 상이한 결과를 보이는 것으로 생각된다.

일반적으로 부정근의 biomass 증가는 일차근의 길이신장과 함께 발생하는 이차근의 수와 길이신장에 의해 증가한다 (Bais et al. 2000). 섬오갈피 부정근은 IBA 단독 처리구에서는 일차근의 생장이 느리고 이차 부정근의 발생을 또한 낮아 (결과 미제시) cytokinin 첨가가 요구되었다. IBA를 일정한 농도로 고정된 상태에서 TDZ 농도를 0.01, 0.05, 0.1 mg/L로 첨가한 처리구에서 부정근의 생장은 IBA 농도에 관계없이 TDZ 농도가 증가할수록 양호하였다 (Figure 3). Eleutheroside E의 함량은 IBA 3.0 mg/L와 TDZ 0.1 mg/L가 첨가된 배지 (3,327 µg/g DW)에서 가장 높아 20 L 생물반응기 (12 L working volume)에서 총 189.6 mg의 eleutheroside E 생산이 가능하였다. 이와 달리 chlorogenic acid 함량은 IBA 3.0 mg/L가 첨가된 TDZ 처리구에서 전반적으로 낮게 나타났다 (Figure 3A). IBA 5.0 mg/L에 TDZ 이 농도별로 첨가된 처리에서 eleutheroside E는 IBA 3.0 mg/L 첨가구와 유사하게 TDZ 농도가 가장 높은 0.1 mg/L 처리에서 높게 나타났다. 동종의 배지에서 건중량 eleuthero-

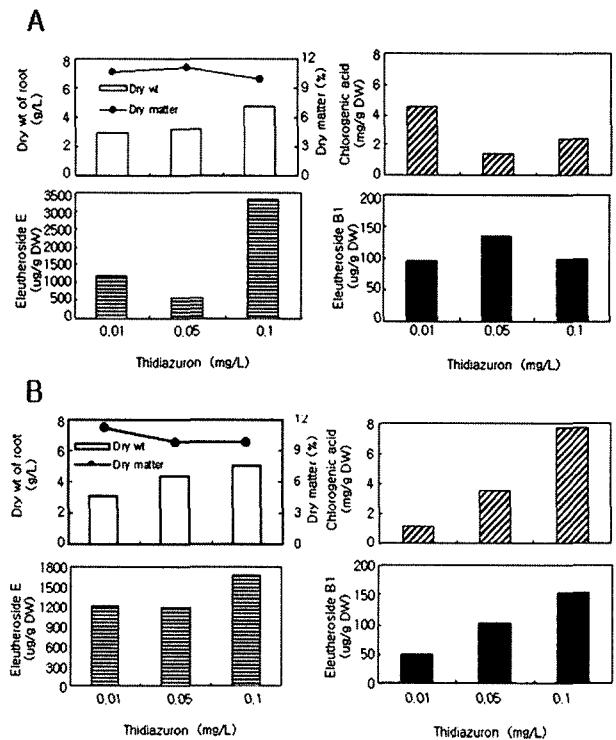


Figure 3. Effects of thidiazuron concentrations in the presence of 3.0 mg/L (A) and 5.0 mg/L (B) IBA on growth and secondary metabolite production of adventitious roots cultured in 20 L air-lift bioreactors after 9 weeks of culture in *E. koreanum*.

side B의 생산량 (153.0 $\mu\text{g/g DW}$)은 다른 처리에 비해 그다지 높지는 않으나 부정근의 생장이 양호하여 생물반응기당 생산하는 eleutheroside B의 함량은 9.1 mg으로 처리 중 가장 높게 나타났다. IBA 5.0 mg/L에 TDZ 0.1 mg/L이 첨가된 배지는 chlorogenic acid에 있어서도 건중당 생산량 (7.7 mg/g DW)과 생물반응기 생산량 (460.9 mg)이 가장 높게 나타나 eleutheroside B와 chlorogenic acid 생산 모두에 적합한 배지로 고려되었다 (Figure 3B).

Zeatin 첨가구에서 부정근의 생장은 0.05 mg/L 농도로 첨가했을 때 가장 좋았고 (5.1 g DW/L), eleutheroside E 함량은 저농도 zeatin에서 가장 높았다가 농도가 증가함에 따라 낮아졌다 (Figure 4). 특이할만한 점은 부정근 생장에 있어서는 다른 처리구와 전반적으로 유사하나, chlorogenic acid와 eleutheroside B의 함량은 zeatin 농도에 관계없이 매우 낮았다는 것이다 (Figure 4).

Narayan (2005) 등은 *Daucus carota* 세포배양 시 cytokinin 농도의 증가가 flavonoid계 수용성 색소인 anthocyanin 생산에는 아무런 영향을 미치지 않았다고 하였다. 그러나 본 실험에서 TDZ는 lignan류에 속하는 eleutheroside E의 함량을 증가시켰고, IBA 5.0 mg/L가 첨가된 배지에서 eleutheroside B와 chlorogenic acid 함량을 높이는 데 효과적이었다. 반면 같은 cytokinin류라 하더라도 zeatin은 농도가 증가할수록 eleutheroside E 함량을 감소시켰으며, eleutheroside B와 chlorogenic acid 생산을 억제하였다. 섬오갈피 부정근 배양에서 전반적으로 TDZ과 zeatin은 IBA와 혼합처리하여 부정근 생육을 촉진하였다. 그러나 TDZ과 zeatin의 농도에 따라 섬오갈피 부정근의 이차대사산물 생산에는 촉진적 혹은 억제적으로 작용하였다. 이는 이차대사산물 생산을 목적으로 하는 부정근 배양시 단지 부정근의 생장에만 초점을 맞추어 성장조절제 종류와 농도를 선발하여서는 곤란하다는 것을 의미한다. 부정근의 성장과 목적하는 이차대사물질의 함량이 가장 높은 최적배지를 선발한 다음 elicitor를 이용한 물질함량 증진이 이루어지는 것이 최종적으로 더 많은 양의 이차대사산물을 생산할 수 있을 것이다.

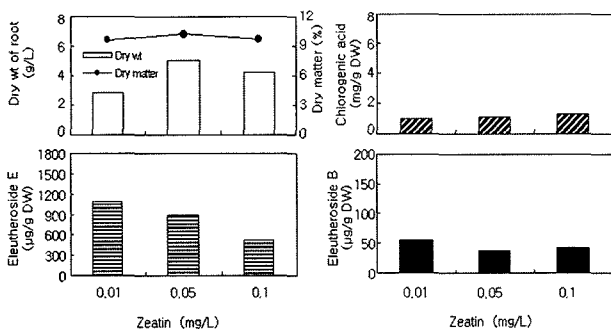


Figure 4. Effects of zeatin on growth and secondary metabolite production of adventitious roots cultured in 20 L air-lift bioreactors after 9 weeks of culture in *E. koreanum*.

이차대사 물질의 함량은 고체배지에서 배양했을 때 액체 배지에 비해 안정적으로 많은 양을 생산할 수 있으나 (Narayan et al. 2005), 대량생산을 위한 scale-up을 위해서는 액체배양이 적합하다. 본 실험에서도 20 L 공기부양식 생물반응기를 이용한 액체배양으로 배지에 따라 20 L 생물반응기 당 최대 80.4 g DW의 biomass, 189.6 mg의 eleutheroside E, 9.1 mg의 eleutheroside B와 460.9 mg의 chlorogenic acid 생산이 가능했으며, 이는 산업화를 위한 pilot scale의 생물반응기에도 적용될 수 있을 것이다. 그러나 섬오갈피는 가시오갈피와 비교하여 부정근의 생육이 왕성하다는 장점은 있으나 아직 eleutheroside류의 함량이 낮아 목적하는 유용물질의 생산 수율을 최대한 높이기 위한 elicitation 관련 연구가 남아있고, 오갈피속 식물중 유일하게 섬오갈피에서 분리되어 항염증 및 항섬유종에 효과가 있는 것으로 보고된 acanthoside D와 acanthoic acid에 대한 연구도 차후 진행되어야 할 것이다 (Kang et al. 1996).

본 결과는 IBA와 TDZ, zeatin 첨가에 따른 부정근의 생장을 조사함으로써 생물반응기 배양을 위한 섬오갈피 부정근의 생육최적 배지를 선발하였고, 생물반응기에서 수확한 부정근내 함유된 유용 이차대사산물을 분석함으로써 부정근 성장과 이차대사산물의 관계를 구명하여 목적하는 eleutherosides와 chlorogenic acid 생산에 적합한 배지를 밝혔는데 의미가 있다고 하겠다.

적 요

생물반응기를 이용한 섬오갈피 부정근 배양시 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도에 따른 부정근의 성장과 이차대사산물 생산과의 관계를 조사하였다. IBA 농도별 부정근 생장은 IBA 2.0 mg/L에서 6.7 g DW/L로 가장 높았으나, eleutheroside E 함량은 IBA 농도에 따라 차이가 없었다. TDZ 농도에 따른 부정근 생장은 농도가 증가함에 따라 성장도 증가하여 eleutheroside E 함량은 IBA 3.0 mg/L에 TDZ 0.1 mg/L 처리구에서 3,327 $\mu\text{g/g DW}$ 로 가장 생산량이 많았다. 이와 달리 eleutheroside B (153 $\mu\text{g/g DW}$)과 chlorogenic acid (7.7 mg/g DW)는 IBA 5.0 mg/L에 TDZ 0.1 mg/L 처리구에서 함량이 가장 높았다. Zeatin은 부정근 생육과 eleutheroside E 함량에는 크게 영향을 미치지 않으나 eleutheroside B와 chlorogenic acid 생산을 크게 억제하였다.

인용문헌

- Ahn JK, Lee WY, Oh SJ, Park YH, Hur SD, Choi MS (2000) The contents of chlorogenic acid and eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms. J Korean For Soc 89: 216-222

- Bais HP, Madhusudhan R, Bhagyalakshmi N, Rajasekaran T, Ramesh BS, Ravishankar GA (2000) Influence of polyamines on growth and formation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. *Acta Physiol Plant* 22: 151-158
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161: 839-851
- Choi YH, Kim JW (2002) Quantitative analysis of eleutheroside B and E using HPLC-ESI/MS. *Kor J Pharmacogn* 33: 88-91
- Choi YE, Kim JW, Soh WY (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Plant Cell Rep* 17: 84-88
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES (1999) Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 93-97
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S (1996) Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull* 19: 1227-1230
- Kang HS, Kim YH, Lee CS, Choi I, Pyun KH (1996) Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by acanthoic acid, (-) pimara-9 (11), 15-dien-19-oic acid, and its antifibrotic effects in vivo. *Cellular Immunol.* 170: 212-221
- Lazaridou A, Roukas T, Biliaderis CG, Vaikousi H (2002) Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme Microbial Tech* 31: 122-132
- Lee YS, Lee EB, Kim YH (2001) Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from *Acanthopanax koreanum* root bark. *J App Pharmacol* 9: 176-182
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15: 473-497
- Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N (2005) Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem* 40: 351-358
- Paek KY, Chakravarthy D (2003) Micropropagation of woody plants using bioreactor, in: S. M. Jain, K. Ishii (Eds) *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers, Dordresht, pp 735-755
- Sahai OP, Shuler ML (1984) Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 111-120
- Seon JH, Yu KW, Cui YY, Kim MH, Lee SJ, Son SH, Paek KY (1999) Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious roots cultures in *Panax ginseng*, in: Altman A (Ed), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 329-332
- Slacanin I, Marston A, Hostettmann K (1991) The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* 2: 137-142
- Son SH, Choi SM, Lee YH, Choi KB, Yun SR, Kim JK, Park HJ, Kwon OW, Noh EW, Seon JH, Paek KY (2000) Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Rep* 19:628-633
- Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA (2004) Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. *Process Biochem* 39: 2091-2096
- Takeda J (1988) Light-induced synthesis of anthocyanin production in carrot cells in suspension. I. Factors affecting the anthocyanin production. *J Exp Bot* 39: 1065-1077
- Tang W (1992) *Chinese drugs of plant origin*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp 1-12
- Yook CS, Kim IH, Hahn DR, Nohara T, Chang SY (1998) A lupane-triterpene glycoside from leaves of two *Acanthopanax*. *Photochemistry* 49: 839-843
- Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochem Eng J* 11: 211-215
- Zobayed SMA, Saxena PK (2003) In vitro grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. *Plant Sci* 165: 463-470

(접수일자 2004년 10월 12일, 수리일자 2005년 1월 21일)