

한약자원 품목별 표준시료와 기내 생산 부정근의 FT-IR 스펙트럼 기반 대사체 동등성 신속 비교

안명숙 · 민성란 · 지은이 · 소은진 · 최소연 · 문병철 · 강영민 · 박소영 · 김석원

Rapid comparison of metabolic equivalence of standard medicinal parts from medicinal plants and their *in vitro*-generated adventitious roots using FT-IR spectroscopy

Myung Suk Ahn · Sung Ran Min · Eun Yee Jie · Eun Jin So · So Yeon Choi · Byeong Cheol Moon · Young Min Kang · So-Young Park · Suk Weon Kim

Received: 27 August 2015 / Revised: 16 September 2015 / Accepted: 16 September 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To determine whether metabolite fingerprinting for whole cell extracts based on Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy can be used to discriminate and compare metabolic equivalence, standard medicinal parts from four medicinal plants (*Cynanchum wilfordii* Hemsley, *Atractylodes japonica* Koidz, *Polygonum multiflorum* Thunberg and *Astragalus membranaceus* Bunge) and their *in vitro*-produced adventitious roots were analyzed by FT-IR spectroscopy. The principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) from the FT-IR

spectral data showed that the whole metabolic pattern from *Cynanchum wilfordii* was highly similar to *Astragalus membranaceus*. However, *Atractylodes japonica* and *Polygonum multiflorum* showed significantly different metabolic patterns. Furthermore, adventitious roots from *Cynanchum wilfordii* and *Astragalus membranaceus* also showed similar metabolic patterns compared to their standard medicinal parts. These results clearly show that mass proliferation of adventitious roots may be applied to acquire novel supply of standard medicinal parts from medicinal plants. However, the whole metabolic pattern from adventitious roots of *Atractylodes japonica* and *Polygonum multiflorum* were not similar to their standard medicinal parts. Furthermore, FT-IR spectroscopy combined with multivariate analyses established in this study may be applied as an alternative tool to discriminate the whole metabolic equivalence from several standard medicinal parts. Thus, we suggest that these metabolic discrimination systems may be applied for metabolic standardization of herbal medicinal resources.

[†]These authors contributed equally to this work.

M. S. Ahn[†] · S. R. Min[†] · E. Y. Jie · E. J. So · S. Y. Choi
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Korea)

S. W. Kim (✉)
한국생명공학연구원 미생물자원센터
(Microbial Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Korea)
e-mail: kimsw@kribb.re.kr

B. C. Moon · Y. M. Kang
한국한의학연구원 K-herb 연구단
(K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Korea)

S.-Y. Park
충북대학교 원예학과
(Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Life & Environment Science, Chungbuk University, Cheongju 28644, Korea)

Keywords Adventitious root, Fourier transform – infrared spectroscopy (FT-IR), Partial least square discriminant analysis (PLS-DA), Principal component analysis (PCA), Medicinal plants

서론

최근 국내 생산 기반이 미약한 한약자원의 경우 외국 수입이 크게 증가하고 있는데, 이들 수입 한약재에 대한 사회적 우려 가운데 가장 중요한 것은 수입 약재들의 재배, 유통과정에서 발생할 수 있는 농약이나 중금속 오염에 대한 우려이다. 또 다른 사회적 관심은 수입약재와 국내산 약재의 가격차이에 따라 수입산 한약재를 국내산으로 불법 표기함으로써 발생하는 유통질서 문란이다. 사실 많은 한약재들이 가루나 절편 형태로 유통이 이루어지기 때문에 육안으로 원산지를 판별하는 것은 매우 어려운 일이다. 또한 최근에는 인삼 등의 경우 국내산과 동일한 품종의 종자를 직접 재배하여 국내에 유통함으로써 국내산과 유전적으로 동일한 한약자원 수입되고 거래되고 있는 상황이다. 따라서 국내 한약산업의 발전과 보다 안전한 한약재의 공급을 위해서는 한약자원의 대사체 수준에서 표준화 체계를 구축하고 이를 통해 신속하고, 정확한 한약자원 진위 판별 및 원산지 식별기술 개발이 매우 시급한 실정이다(Korea Health Industry Development Institute 2013).

식물조직배양 기술은 식물의 조직을 인공배양조건에서 무균배양하는 기술로 약용식물의 기내 대량 증식은 물론 주요 약용부위(부정근 및 소피경 등)를 직접적으로 대량 생산할 수 있는 수단으로 활용이 가능하다(Sridhar and Aswath 2014). 기내에서 생산된 한약자원의 약용부위는 무균으로 배양이 이루어지면 인공배양배지 조건에서 생산이 이루어지기 때문에 약용식물의 재배과정에서 이루어지는 농약이나 기타 중금속 등 인체 유해 요인을 완벽하게 배제한 상태에서 생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 인삼이나 산삼의 경우 기내에서 유도된 부정근을 대규모 인공배양기에서 생산하고, 기내에서 생산된 인삼 부정근에 존재하는 ginsenosides 성분들이 재배된 인삼과 차이가 거의 없어 인삼 뿌리를 원재료 사용되는 화장품, 기능성 식품의 소재로 사용이 이루어지고 있다(Paek et al. 2009). 따라서 식물조직배양을 통한 한약자원 약용부위의 대체 생산은 보다 안전하고 균일한 한약자원 대체공급수단으로 잠재적 활용 가능성이 매우 크다고 볼

수 있다. 그러나 식물조직배양을 통한 약용식물의 주요 약용부위를 생물반응기 등 기내에서 대량생산하고 이를 한약재의 대체 공급수단으로 활용하기 위해서는 기내에서 생산된 주요 약용부위와 약용으로 사용되고 있는 표준 약용부위와 대사체 수준에서 동등성 검증이 필수적으로 요구된다.

대사체 분석기술은 대사체 수준에서 시료간의 양적, 질적 패턴 차이를 조사하는 연구 분야로 시료의 전 세포 추출물을 FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy), ¹H NMR (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy) 및 MS (mass spectrometry) 등의 분석장비를 이용하여 스펙트럼을 조사하고 다변량 통계분석 기법(principal component analysis, discriminant analysis)을 통해 분석할 수 있다(Krishnan et al. 2005). 이들 기술들은 식물 종과 품종의 신속한 식별(Kim et al. 2004; Kim et al. 2009), 돌연변이주의 신속한 선별수단(Ward et al. 2003) 등 식물 연구에 다양하게 적용되고 있다. 특히 FT-IR을 이용한 분석법은 높은 감도를 가지며 다수의 시료로부터 얻어진 스펙트럼을 쉽고 간편하게 조사할 수 있는 장점을 가지고 있다. 최근 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기술은 유연관계가 높은 미생물종의 식별(Goodacre et al. 1998; Timmins et al. 1998; Wenning et al. 2002), 고등식물의 종 구분(Kim et al. 2007; Kwon et al. 2011) 및 품종 식별(Kwon et al. 2014)에 활용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법을 이용하여 대표적인 한약자원(백수오, 백출, 하수오, 황기)의 표준 약용부위와 이들 한약자원의 식물조직배양 기술을 통해 생산된 기내배양 부정근으로부터 대사체 수준 신속 식별 및 대사체 수준 동등성 평가체계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

한약자원 약용부위 표준시료 확보 및 기내 부정근 생산

본 연구에 사용된 백수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley),

Table 1 List of standard medicinal parts and their adventitious roots from four medicinal plants

Medicinal plants	Sample types	Sample label
<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley (Asclepiadaceae)	Standard medicinal parts Adventitious root	<i>C. wilfordii</i> -S <i>C. wilfordii</i> -AR
<i>Atractylodes japonica</i> Koidz. (Compositae)	Standard medicinal parts Adventitious root	<i>A. japonica</i> -S <i>A. japonica</i> -AR
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg (Polygonaceae)	Standard medicinal parts Adventitious root 1 Adventitious root 2	<i>P. multiflorum</i> -S <i>P. multiflorum</i> -AR1 <i>P. multiflorum</i> -AR2
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge (Leguminosae)	Standard medicinal parts Adventitious root	<i>A. membranaceus</i> -S <i>A. membranaceus</i> -AR

백출(*Atractylodes japonica* Koidz), 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg) 및 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)의 약용부위 표준 시료는 한국한의학연구원 한약표준표본관(KIOM)으로부터 제공받은 것을 사용하였다(Table 1). 이들 한약자원 표준시료로부터 metabolite의 추출을 위해 건조파우더 시료들은 한번 더 막자와 막자사발을 이용하여 미세한 분말로 분쇄하여 사용하였다. 또한 이들 4종류의 한약자원의 기내 부정근 생산을 위해 먼저 한국한의학연구원 K-herb 연구단으로부터 한약자원 품목별로 진위 판정이 이루어진 표준 생체시료를 확보한 다음 각 품목별로 부정근 유도 및 증식체계를 확립하였다. 백수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley), 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg) 및 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)의 부정근은 기내 식물체의 뿌리 절편을 1 mg/L IBA가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체배지에 치상하여 25°C, 암조건에서 유도하였으며 유도된 부정근은 동일 조성의 액체배지에 현탁배양을 통해 대량증식체계를 확립하였다. 백출(*Atractylodes japonica* Koidz) 부정근은 잎 절편을 0.1 mg/L BA 및 1 mg/L NAA가 첨가된 MS 배지에 치상하여 유도하였으며, 유도된 부정근은 1 mg/L IBA가 첨가된 MS 고체배지에서 증식한 후 동일조성의 액체배지에 현탁배양을 통해 대량증식체계를 확립하였다. 현탁배양에서 증식된 각각의 부정근은 동결건조 후 미세한 분말로 분쇄하여 사용하였다. 또한 생물반응기를 통해 1 mg/L IBA가 첨가된 3/4MS 배지에서 대량증식된 하수오 부정근(Lee et al. 2015) 역시 동결 건조 후 미세한 분말로 분쇄하여 사용하였다.

한약자원 약용부위 및 기내 부정근으로부터 metabolite의 추출 및 FT-IR 스펙트럼 분석

확보된 한약자원 품목별 건조 분말 시료 20 mg을 tube에 넣고 20% methanol 용액을 200 μ L씩 첨가하여 잘 섞어주었다. 각 tube를 50°C 수조에서 20분간 반응시킨 다음 13,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상징액을 새로운 tube에 옮겼다. 회수한 상징액은 원심분리과정을 반복하여 찌꺼기가 들어가지 않도록 조심스럽게 새로운 tube로 상징액을 옮겼다. 회수된 상징액은 -20°C에서 보관한 다음 FT-IR 스펙트럼 조사에 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 조사는 Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany)를 사용하였고, DTGS (deuterated triglycine sulfate) 검출기로 분석하였다. 추출된 각각의 시료 5 μ L를 384-well silicon plate에 분주하여, 37°C hot plate에서 약 20분간 건조하였다. 건조된 silicon plate는 Tensor 27에 장착된 HTS-XT (Bruker Optics GmbH) 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 시료의 스펙트럼은 총 4,000-400 cm^{-1} 범위에서 그리고 4 cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복 측정된 평균 스펙트럼을 분석에 사용되었다. 각 시료의 FT-IR

스펙트럼은 통계적 분석을 위해 각각 5반복 측정하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 데이터 변환에 사용된 프로그램은 Bruker에서 제공하는 OPUS Lab (ver. 6.5, Bruker Optics Inc.)를 사용하였다.

FT-IR 스펙트럼 데이터 다변량 통계분석

FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 위해 먼저 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 전처리 과정을 R 프로그램 (version 2.15.0, Auckland, New Zealand)을 이용하여 수행하였다. Baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점(1,800-800 cm^{-1})의 흡광도를 0으로 조정하였으며 실험상의 오차를 최소화하기 위하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering 과정을 거쳐 1차 미분을 수행한 다음 전처리가 완료된 스펙트럼 데이터를 다변량 통계분석 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다. 가공된 FT-IR 스펙트럼 데이터는 NIPALS 알고리즘(Wold et al. 2001)을 이용하여 R 프로그램(version 2.15.0)에서 PCA (Principal component analysis)와 PLS-DA (Partial least square discriminant analysis) 분석 (Fiehn et al. 2000; Trygg et al. 2007)을 수행하였다.

결과 및 고찰

한약자원 표준 약용부위 시료의 대사체 지문분석을 통한 비교 분석

대표적인 한약자원 식물인 백수오, 백출, 하수오 및 황기의 표준 약용부위 시료로부터 얻어진 전세포추출물의 FT-IR 스펙트럼 데이터로부터 다변량 통계분석 기법을 이용하여 신속하고, 간편한 한약자원의 대사체 수준 비교 및 평가체계를 확립하였다. 백수오, 백출, 하수오 및 황기의 표준 약용부위 추출물의 FT-IR 스펙트럼을 비교 분석한 결과 FT-IR 스펙트럼의 양적, 질적 패턴 변화가 크게 이루어진 부위는 1,700-1,500, 1,450-1,200, 그리고 1,100-900 cm^{-1} 부위임을 알 수 있었다(Fig. 1A). FT-IR 스펙트럼상의 이 부위들은 amide I, II 그리고 carbohydrates 계열의 화합물들의 양적, 질적인 정보를 반영하는 부위이다(Wolkers et al. 2004; Lopez-Sanchez et al. 2010). 따라서 한약자원별로 표준 약용부위시료들은 유리아미노산, 탄수화물, 배당체 등의 전체 대사체 수준에서 차이가 크게 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

한약자원 약용부위 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 PC 1과 2 score의 설명력은 각각 31.6%와 8.8%로

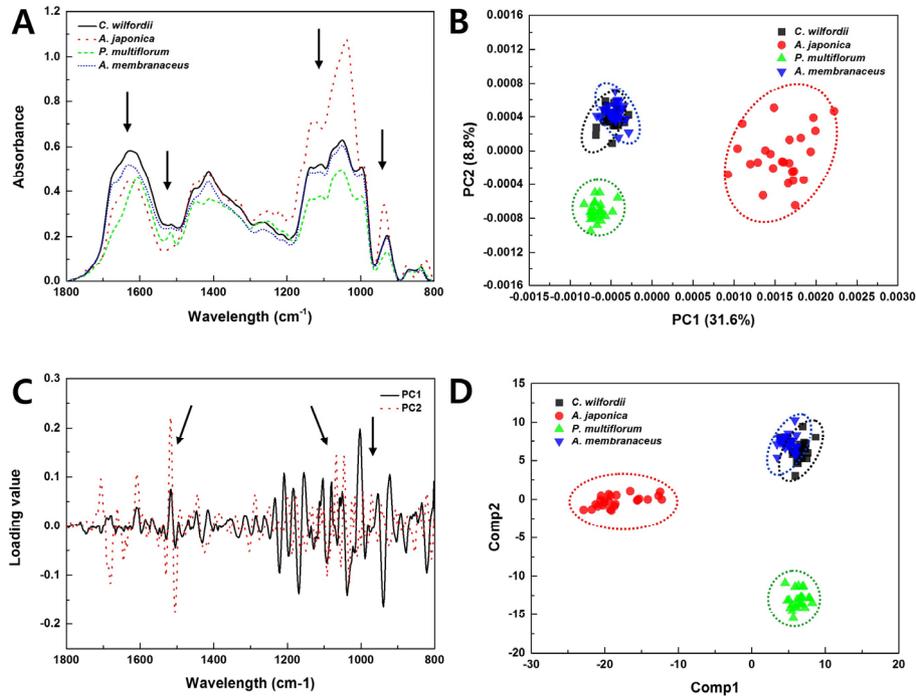


Fig. 1 Multivariate analysis of FT-IR spectral data from whole cell extracts of standard medicinal parts. (A) Representative FT-IR spectra of four standard medicinal parts. Arrows indicate the FT-IR regions showing significant spectral variations between four standard medicinal parts. (B) A two-dimensional PCA score plot of FT-IR spectral data for four standard medicinal parts. (C) A PC loading plot based on PCA data of four standard medicinal parts. Solid line and dotted line represent the PC 1 and PC 2 score, respectively. Arrows indicate the FT-IR spectral regions that play important roles in discrimination of standard medicinal parts. (D) PLS-DA score plot of FT-IR spectral data of four standard medicinal parts. Dotted circles represent each boundary for the four standard medicinal parts (B, D)

전체 변이량의 40.4%를 반영하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1B). 또한 PC 1과 PC 2를 축으로 한 PCA score plot상에서 한약자원 표준 약용부위 시료들의 분포를 조사한 결과 PC 1을 축으로 백수오, 황기, 하수오 시료는 좌측에 그리고 백출 시료는 우측에 각각 별도의 그룹을 형성하며 분포함을 알 수 있었다(Fig. 1B). 특히 백수오와 황기 약용부위 시료들의 경우 분포 범위가 거의 중첩되어 분포함을 알 수 있었다. 이 결과는 이들 시료들의 경우 전세포추출물의 FT-IR 스펙트럼 기반 대사산물의 질적, 양적 패턴이 매우 유사함을 나타내는 결과라 사료된다. 아직 국내에서 사용되고 있는 모든 한약자원 품목의 약용부위에 대한 지표성분 및 주요 약용 유효성분들에 대한 명확한 식별체계가 확립되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서 사용한 전세포추출물의 FT-IR 스펙트럼 분석은 핵심 지표성분이나 유효 약용성분만을 특이적으로 분석하는 기술이 아닌 식물조직에 존재하는 다양한 화합물들의 질적, 양적 패턴을 비교 분석하는 기법이다. 또한 매우 소량의 시료로 추출물 비교분석이 이루어지기 때문에 상대적으로 함량이 높은 배당체나 유리아미노산 그리고 유기산 성분의 양적패턴 변화에 크게 영향을 받을 수 있다. 따라서 백수오 및 황기의 경우 지표성분이나 유효성분의 종류나 함량 차이가 있음에도 불구하고 상대적으로

함량이 높은 일차대사산물의 패턴이 유사하기 때문에 PCA score plot상에서 인접하여 분포한 것으로 추측된다. PCA score plot상에서 하수오 및 백출의 경우 별도의 그룹을 형성하여 분포하는 것으로 나타났다. 따라서 이들 시료의 경우 주요 대사산물의 양적, 질적 패턴이 백수오와는 크게 상이할 것으로 예상된다. 한약자원 표준 약용부위의 식별에 중요한 FT-IR 스펙트럼 부위를 조사하기 위해 PV loading values를 조사한 결과 주요 스펙트럼 부위는 1,700-1,500 그리고 1,200-900 cm^{-1} 부위임을 알 수 있었다 (Fig. 1C). 이 결과는 한약자원 약용부위의 대사체 수준 구분 및 식별에는 FT-IR 스펙트럼의 1,700-1,500 cm^{-1} 과 1,200-900 cm^{-1} 부위 즉 amide I, II 계열의 화합물들의 양적, 질적인 차이가 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 결과라 사료된다.

PLS-DA 분석의 경우 PCA 분석보다 더욱 명확하게 4종류의 한약자원 표준 약용부위 시료들을 구분할 수 있었다(Fig. 1D). 백출시료는 PLS-DA score plot의 좌측에 분포하였으며 백수오, 황기, 그리고 하수오 시료는 우측에 분포하였다. PCA 분석결과와 마찬가지로 백수오와 황기 시료는 거의 중첩되어 분포하였으며 하수오 시료는 우측 하단에 별도의 그룹을 형성하며 분포함을 알 수 있었다. PCA분석에 비해 PLS-DA 분석에서는 각 시료 집단의 분

포 범위가 더욱 좁아져 각 시료간에 구분이 보다 분명하게 이루어짐을 알 수 있었다. 본 연구 결과를 통해 한약 자원 표준 약용부위 시료의 전세포추출물 FT-IR 스펙트럼 분석을 통해 전체 대사산물의 질적, 양적 패턴차이로 한약자원의 식별 및 비교 분석이 쉽게 가능함을 알 수 있었다. 본 연구그룹에서는 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법을 활용하여 고등식물의 종 구분(Kim et al. 2004)은 물론 일일초(Kim et al. 2007), 딸기(Kim et al. 2009) 그리고 인삼(Kwon et al. 2014)의 품종 식별이 대사산물의 비교를 통해 가능함을 보고한 바 있다. 따라서 보다 다양한 한약자원 약용부위 시료들의 분석이 이루어진다면 이들 한약자원 시료의 대사체 수준 비교분석 및 평가 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

한약자원 표준 약용부위와 기내 생산 부정근 시료의 대사체 비교 분석

한약자원 약용부위와 이들 기원식물 유래 기내 생산 부정근 시료를 대상으로 전세포추출물의 FT-IR 스펙트럼 데이터로부터 다변량 통계분석 기법을 이용하여 신속하고, 간편한 한약자원의 대사체 수준 비교분석체계를 확립하였다. 백수오 표준 약용부위 시료와 기내에서 생산된 백수오 부정근 시료의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 결과 표준 약용부위 시료에 비하여 부정근 시료의 FT-IR 스펙트럼 흡광도가 약간 감소하였으며, 1,700-1,500 cm^{-1} 부위

에서 스펙트럼 모양의 일부 변화를 제외하고는 전체적으로 대사체 패턴은 거의 유사한 것으로 나타났다(Fig. 2A). 이 결과는 백수오 표준 약용부위와 기내에서 생산된 백수오 부정근 사이에 전체적인 대사체 패턴이 매우 유사함을 보여주는 결과라 사료된다. 그러나 백출(Fig. 2B) 및 하수오(Fig. 2C) 시료의 경우 백수오 시료에 비해 표준 약용부위와 기내 생산된 부정근 사이에 스펙트럼의 차이가 크게 이루어지는 것으로 나타났다. 특히 백출(Fig. 2B)의 경우 유리아미노산이나 단백질들이 주로 검출되는 1,700-1,500 cm^{-1} 부위에서는 스펙트럼 패턴이 유사하지만 탄수화물이나 배당체 성분들이 주로 검출되는 1,200-900 cm^{-1} 부위에서 전반적인 패턴 차이가 크게 이루어지는 것으로 나타났다. 하수오(Fig. 2C) 시료의 경우도 1,200-900 cm^{-1} 부위에서 표준 약용부위와 기내 생산 부정근 사이의 전반적인 패턴 차이가 크게 이루어지는 것으로 나타났다. 황기 부정근 시료의 경우는 다른 한약자원 품목과 달리 표준 약용부위에 비해 기내 생산 부정근에서 스펙트럼의 흡광도가 더 높음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 아울러 전반적인 황기 부정근 시료의 대사체 패턴은 표준 약용부위 시료와 큰 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서는 각 한약자원 품목별로 지표 및 유효성분들에 대한 정량 및 정성 분석을 실시하지 않아서 표준 약용부위 시료와 부정근 시료에 존재하는 주요 약리성분에 대한 직접적인 비교는 할 수 없었다. 비록 백출이나 하수오 시료의 경우 표준 약용부위와 기내생산 부정근 시료 사이에 전체적인

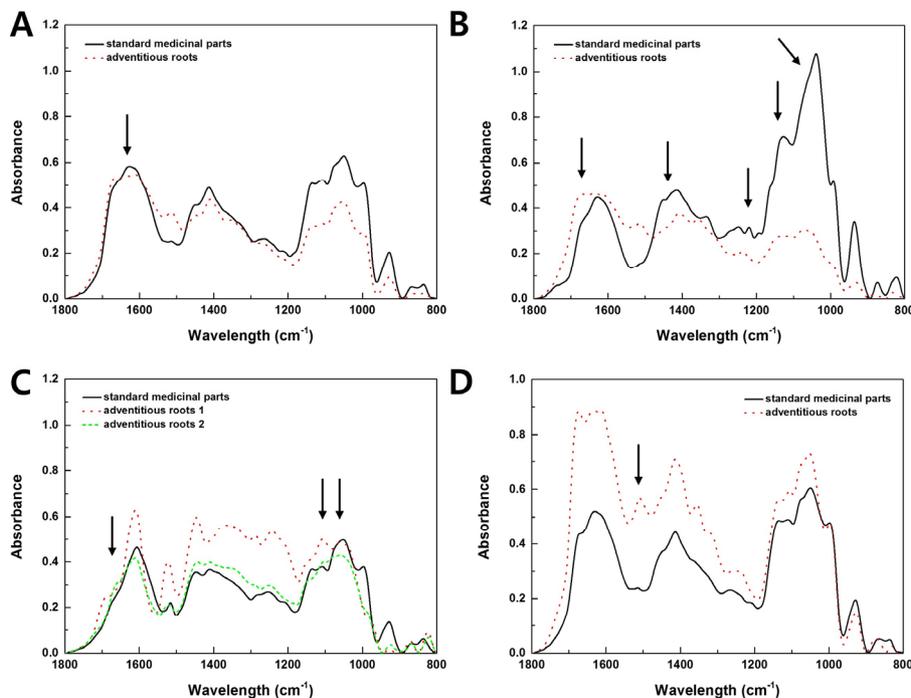


Fig. 2 Comparison of FT-IR spectra from whole cell extracts of standard medicinal parts and their adventitious roots. (A) *Cynanchum wilfordii* (B) *Atractylodes japonica* (C) *Polygonum multiflorum* (D) *Astragalus membranaceus*. Arrows indicate the FT-IR regions showing significant spectral variations between standard medicinal parts and their adventitious roots

대사체 패턴 차이가 크게 이루어지지만 백수오나 황기 부정근의 경우 기내에서 생산된 부정근과 표준 약용부위 사이에 전반적인 대사체 패턴 차이가 크지 않음을 알 수 있었다. 향후 이들 한약자원 품목의 부정근 시료에서 지표성분이나 유효성분의 함량분석이 이루어진다면 기내에서 생산된 부정근 시료를 한약자원 약용부위의 대체 공급 수단으로 활용이 가능함을 암시하는 결과라 사료된다.

부정근 시료에 대한 한약자원 약용부위 대체 공급수단으로 활용 가능성을 조사하기 위해 백수오, 백출, 하수오 및 황기의 표준 약용부위 추출물의 FT-IR 스펙트럼 데이터와 이들의 기내생산 부정근 시료들에 대한 FT-IR 스펙트럼 데이터로부터 다변량통계분석을 실시하였다(Fig. 3). 한약자원 약용부위 및 부정근 시료들에 대한 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 PC 1과 2 score의 설명력은 각각 26.2%와 15.4%로 전체 변이량의 41.6%를 반영하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3A). 또한 PC 1과 PC 2를 축으로 한 PCA score plot상에서 한약자원 표준 약용부위 시료들의 분포를 조사한 결과 PC 1을 축으로 황기 부정근 시료들이 우측에 분포하며, 나머지 시료들은 좌측에 위치함을 알 수 있었다. PC 2축 기준으로 상단에 백출 표준 약용부위 시료들이 위치하며 백출 부정근 시료를 포함하여 대부분 시료가 하단에 위치함을 알 수 있었다. 흥미로운 결과는 FT-IR 스펙트럼 비교분석에서 보여진 것처럼 백수오 및 황기의 경우 표준 약용부위 시료와 기내생산 부정근 시료들의 분포가 매우 인접하여 이루어짐을 알 수 있었으며 이는 이들 시료의 경우 전체적인 대사체 패턴이 매우 유사함을 보여주는 결과라 사료된다. 하수오나 백출의 경우 표준 약용부위 시료와 기내생산 부정근 시료들의 별도의 그룹을 형성하면서 분포가 이루어짐을 알 수 있었다. 이 결과는 이들 시료의 경우 표준 약용부위와 부정근 사이에 전체적인 대사체 패턴 차이가 크

게 이루어짐을 보여주는 결과라 사료된다. 하수오 부정근의 경우 생산 조건이 상이한 2개의 부정근 시료들이 표준 약용부위와 비교분석이 이루어졌으며 생물반응기를 통해 대량생산된 하수오 부정근 시료들이 현탁배양에서 생산된 부정근 시료에 비해 표준 약용부위 시료들의 분포범위에 더 가까워짐을 알 수 있었다. 이는 부정근의 기내생산 조건들을 달리하게 되면 표준 약용부위와 유사한 대사체 패턴으로 대사체 성분 변화가 가능함을 보여주는 결과라 사료된다. 국내에서 상업적 활용이 이루어지고 있는 인삼 부정근 배양의 경우도 jasmonic acid 처리를 통하여 ginsenoside 함량 변화가 이루어짐을 보고한 바 있다(Yu et al. 2002). *Lithospermum* 현탁배양세포에서도 배양과정에 methyl jasmonate 처리를 하게 되면 rosmarinic acid, shikonic 및 dihydrochinoxifuran 함량 변화가 이루어진다(Mizukami et al. 1993, Yazaki et al. 1997). 따라서 기내배양과정에서 여러 elicitor 처리나 배양 환경 변화를 통하여 기내생산 부정근의 대사체 변화를 유도하여 표준 약용부위 시료와 대사체 수준에서 동등성이 높은 시료의 확보가 가능할 것으로 기대된다.

PLS-DA 분석의 경우 PCA 분석과 마찬가지로 4종류의 한약자원 표준 약용부위 시료와 이들의 기내생산 부정근 시료들 사이의 유연관계를 더욱 명확하게 구분할 수 있었다(Fig. 3B). PCA와 마찬가지로 황기 부정근 시료들이 우측에 나머지 시료들은 좌측에 위치하였으며, 백출 표준 약용부위시료는 좌측 상단에 그리고 하단에 나머지 시료들이 분포함을 알 수 있었다. PLS-DA분석의 경우 PCA분석에 비해 각 시료 집단의 분포 범위가 보다 분명하게 구분됨을 알 수 있었다. 본 연구 결과를 통해 한약자원 표준 약용부위 시료와 이들의 부정근 시료의 전체 포추출물 FT-IR 스펙트럼분석을 통해 전체 대사산물의 질적, 양적 패턴차이로 한약자원의 식별 및 비교 분석이

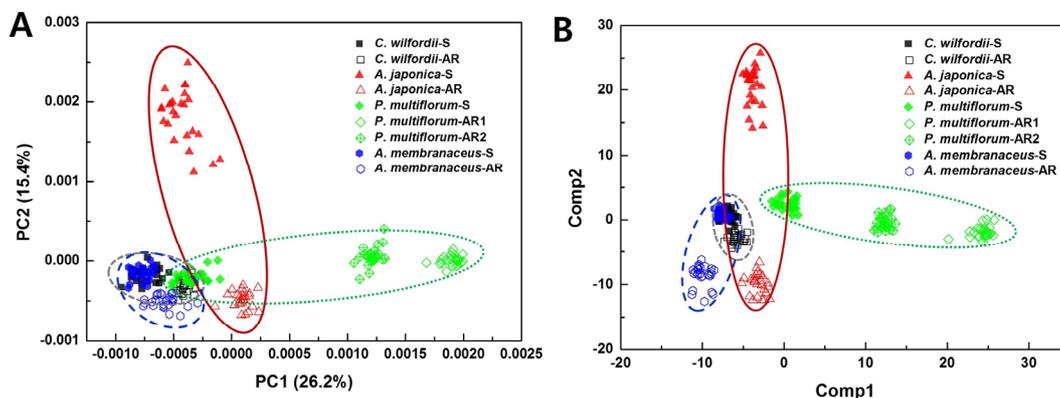


Fig. 3 Multivariate analysis of the FT-IR spectral data from whole cell extracts of standard medicinal parts and their adventitious roots. (A) A two-dimensional PCA score plot of the FT-IR spectral data for four standard medicinal parts and their adventitious root. (B) The PLS-DA score plot of the FT-IR spectral data of four standard medicinal parts and their adventitious roots. Dotted circles represent each boundary for the four standard medicinal parts (A, B). *P. multiflorum* AR2 roots were produced from the pilot plant (200 L). Each closed symbol represents four standard medicinal parts and open symbols represent their adventitious roots

쉽게 가능함을 알 수 있었다. 본 연구결과를 통하여 백수오나 황기의 경우 표준 약용부위 시료와 기내 생산 부정근 시료 사이의 전체적인 대사체 성분들의 양적 변화는 이루어지지만 전체적인 대사체 패턴이 거의 유사함을 알 수 있었다. 이는 생물반응기나 여러 식물조직배양 기법을 통해 대량생산된 한약자원 약용부위가 현재 시중에서 사용되고 있는 한약자원 약용부위의 새로운 대체 공급수단으로 활용이 가능성이 매우 높음을 의미하는 결과라 사료된다. 따라서 보다 다양한 한약자원들에 대한 기내 생산 약용부위 분석이 이루어진다면 일부 한약품목의 경우 성공적으로 대체 공급이 가능할 것으로 기대된다. 더 나아가 본 연구에서 확립된 기술은 한약자원 표준시료는 물론 다양한 시료의 대사체 수준 비교분석 및 평가 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구에서는 식물조직배양기법을 통해 생산된 부정근과 이들의 표준 한약자원 약용부위에서 추출된 전세포추출물의 FT-IR스펙트럼 분석을 통해 대사체 수준에서의 동등성을 비교 분석함으로써 보다 안전하고, 균일한 한약자원 약용부위의 대체 공급수단을 개발하고자 하였다. 이를 위해 대표적인 한약자원 품목인 백수오(*Cynanchum wilfordii*), 백출(*Atractylodes japonica*), 히수오(*Polygonum multiflorum*), 그리고 황기(*Astragalus membranaceus*) 등 4 종류 약용식물의 표준 한약자원 약용부위와 기내에서 생산된 이들의 부정근들을 FT-IR 분석에 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA (principal component analysis)와 PLS-DA (partial least square discriminant analysis) 분석결과 백수오와 황기의 표준 약용부위 시료들 사이에서 전체 대사체 패턴이 매우 유사함을 알 수 있었다. 특히 이들 한약자원 품목들의 경우 기내생산 부정근 시료들과도 전체 대사체 패턴이 매우 유사함을 알 수 있었다. 본 결과로 미루어볼 때 백수와 황기의 경우 기내에서 대량생산된 부정근이 이들 한약자원 품목의 약용부위에 대한 새로운 공급수단으로 활용이 가능함을 보여주는 결과라 사료된다. 그러나 백출과 히수오의 부정근 시료들의 경우 전체 대사체 패턴이 이들의 표준 약용부위 시료들과 차이를 보였다. 또한 본 연구를 통하여 다양한 한약자원 품목들의 약용부위 시료들로부터 빠르고 간편하게 전체 대사체 수준에서 유사도 비교가 가능함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확립된 FT-IR 스펙트럼기반 다변량통계분석 기술은 다양한 한약자원 약용부위 시료들의 대사체 수준 동등성을 식별하는 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 더 나아가 본 기술이 한약자원품목들의 성분 표준화에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 ‘생명공학기술 기반 한약자원 생산 다양화 기술 개발’(K14418)과제의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Fiehn O, Kopka J, Drmann P, Altmann T, Trethewey R, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18:1157-1161
- Goodacre R, Timmins M, Burton R, Kaderbhai N, Woodward AM, Kell DB, Rooney PJ (1998) Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* 144:1157-1170
- Kim SW, Ban SH, Chung H, Cho SH, Chung HJ, Choi PS, Yoo OJ, Liu JR (2004) Taxonomic discrimination of higher plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data. *Plant Cell Rep* 23:246-250
- Kim SW, Cho SH, Chung H, Liu JR (2007) Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by multivariate analysis of fourier transform infrared spectroscopy data. *J Plant Biotechnology* 34:201-205
- Kim SW, Min SR, Kim JH, Park SK, Kim TI, Liu JR (2009) Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. *Plant Biotechnol Rep* 3:87-93
- Korea Health Industry Development Institute (2013) An Empirical Study for the Growth of Korean Traditional Medicine Industry
- Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot* 56:255-265
- Kwon YK, Kim SW, Seo JM, Woo TH, Liu JR (2011) Prediction and discrimination of taxonomic relationship within *Orostachys* species using FT-IR spectroscopy combined by multivariate analysis. *J Plant Biotechnol* 38:9-14
- Kwon YK, Ahn MS, Park JS, Liu JR, In DS, Min BW, Kim SW (2014) Discrimination of cultivation ages and cultivars of ginseng leaves using Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *J Ginseng Res* 38:52-58
- Lee KJ, Park YK, Kim JY, Jeong TK, Yun KS, Paek KY, Park SY (2015) Production of biomass and bioactive compounds from adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum* using air-lift bioreactors. *J Plant Biotechnol* 42:34-42
- Lopez-Sanchez M, Ayora-Canada MJ, Molina-Diaz A (2010) Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. *J Agric Food Chem* 58:82-87
- Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*

- cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 12:706-709
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-493
- Paek KY, Murthy HN, Hahn EJ, Zhong JJ (2009) Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 113:151-176
- Sridhar TM, Aswath CR (2014) Review on Medicinal Plants Propagation: A Comprehensive Study on Role of Natural Organic Extracts in Tissue Culture Medium. *American Journal of Plant Sciences* 5:3073-3088
- Timmins EM, Howell SA, Alsberg BK, Noble WC, Goodacre R (1998) Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 36:367-374
- Trygg J, Holmes E, Londstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 6:467-479
- Ward JL, Harris C, Lewis J, Beale MH (2003) Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62:949-957
- Wenning M, Seiler H, Scherer S (2002) Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 68:4717-4721
- Wold S, Sjostrom M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chem Int Lab Syst* 58:109-130
- Wolkers, WF, Oliver AE, Tablin F, Crowe JH (2004) A fourier transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carb Res* 339:1077-1085
- Yazaki K, Takeda K, Tabata M (1997) Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydrochinofuran production in *Lithospermum* cell cultures. *Plant Cell Physiol* 38:776-782
- Yu KW, Gao WY, 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