

생물반응기를 이용한 적하수오 부정근의 바이오매스와 생리활성물질 대량생산

이경주 · 박영기 · 김자영 · 정택규 · 윤경섭 · 백기엽 · 박소영

Production of biomass and bioactive compounds from adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum* using air-lift bioreactors

Kyung-Ju Lee · Youngki Park · Ja-Young Kim · Taek-Kyu Jeong · Kyung-Seop Yun · Kee-Yoeup Paek · So-Young Park

Received: 9 March 2015 / Revised: 23 March 2015 / Accepted: 23 March 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was conducted to investigate the productivity of biomass and antioxidant compounds in *Polygonum multiflorum* by culturing explants in air-lift bioreactor containing Murashige and Skoog (MS) medium, by adding different concentrations of auxins [indole-3-butyric acid (IBA) and naphthalene acetic acid (NAA)], sucrose, methyl jasmonate (MeJA), and salicylic acid (SA). Results of this study revealed that the explants culturing on the medium supplemented with 9.84 μ M IBA and 50 g/L sucrose were observed to have higher productivity of biomass and bioactive compound than other treatments used. Thus, we expect that these results will be helpful for large-scale production of biomass and antioxidant compounds from *Polygonum multiflorum*.

Keywords Bioreactor, *Polygonum multiflorum*, Bioactive compounds, Adventitious root, Biomass

서 언

적하수오(*Polygonum multiflorum*)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본으로 한방에서는 그 덩이 뿌리를 ‘적하수오’라고 부른다. 적하수오는 장기복용시 혈압강하와 동맥경화 억제 등의 효과가 있어 예로부터 한방과 민간요법으로 많이 이용되어 왔으며, 항산화, 신경보호, 항노화, 항돌연변이 효과와 함께 관절통과 피부 감염 억제에 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Choi *et al.* 2012). 이러한 적하수오의 효능은 뿌리내에 축적된 emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone), chrysophanol, rhein, 6-OH-emodin, emodin-8- β -D-glucoside, polygoniminitin B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2- β -D-glucoside, gallic acid 등과 같은 다양한 생리활성 물질 때문으로 밝혀졌다(Lin *et al.* 2010). 그러나 식물체내 유효성분의 함량은 재배환경이나 수확시기 등에 따라 차이가 심하여 산업적인 규모에서 신약 혹은 한방화장품 등의 원료로 사용하기 위해서는 유효성분의 함량에 변화가 적으며 대량으로 생산 가능한 효율적인 생산시스템의 확립이 필요하다(Southwell and Bourke 2001).

식물의 조직 및 세포배양 기술은 약용식물의 유용한 생리활성물질을 대량생산 할 수 있는 방법중 하나이다(Verpoorte *et al.* 2002). 다양한 조직 및 세포배양법 중에서 부정근 배양법은 빠른 증식률과 안정적인 이차대사산물 생산이 가능하기 때문에 여러 조직 및 세포배양 방법 중 효율적인 방법으로 보고되고 있다(Murthy *et al.* 2008). 특히 액체배지를 이용하는 3 L 이상의 대용량 생물반응기 배양은 플라스크와 petri-dish를 이용하는 기존의 소규모 배양방식에 비해 연속적인 증식과 안정적인 바이오매스 공급이 가능하며, 상업적 대량화가 용이하다(Chakrabarty *et al.* 2003). 생물반응기 배양 시에는 많은 요인들에 의해

K.-J. Lee · K.-Y. Paek · S.-Y. Park (✉)
충북대학교원예과학과
(Department of Horticultural Science, Division of Animal, Horticulture and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea)
e-mail: soypark7@cbnu.ac.kr

Y. K. Park
국립산림과학원
(Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Republic of Korea)

J.-Y. Kim · T.-K. Jeong · K.-S. Yun
(주)사임당화장품
(Saimdang Cosmetics Co., Ltd, Ochang 143, Cheongwon-eup, Chungbuk 363-886, Republic of Korea)

부정근의 성장과 생리활성물질의 축적량이 달라진다(Murthy *et al.* 2008). 부정근을 이용한 생물반응기 배양시 바이오매스 생산량에 영향을 미치는 요인에는 배지의 염류 농도, auxin의 종류와 농도, sucrose의 농도, 공기공급량 등 다양한 요인들이 알려져 있다(Cui *et al.* 2011).

병충해 및 환경요인에 의해 식물의 방어기작으로 식물체 내에서 생성되는 이차대사산물은 주요 생리활성 물질로 이를 증가시키기 위해 사용되는 elicitor들은 식물체 내에서 phytoalexin 축적을 증가시킨다(Zhao *et al.* 2005). 따라서 생물반응기를 이용하여 부정근으로부터 유용한 생리활성물질을 생산할 때 elicitor를 이용하여 인위적으로 목적하는 생리활성 물질의 함량을 증가시켜 줄 수 있다(Rao and Ravishankar 2002).

최근에는 *Echinacea purpurea* (Abbasi *et al.* 2009), *Panax ginseng* (Sivakumar *et al.* 2006), *Hypericum perforatum* (Cui *et al.* 2010) 등의 다양한 식물에서 부정근을 이용한 생물반응기 대량생산 시스템이 보고 된 바 있다. 그러나 아직까지 국내외에서 생물반응기를 이용한 적하수오 부정근 성장과 생리활성물질 생산에 대한 연구는 보고 된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 적하수오 부정근과 생리활성물질 대량생산을 위한 생물반응기 배양 조건을 확립하고 이를 토대로 산업적 목적의 적하수오 대량생산을 하고자 하였다. 이를 위해 생물반응기 배양 시 배지 내 무기물 함량과 auxin의 종류와 농도, sucrose 농도가 적하수오 부정근의 성장과 총 phenolics와 flavonoids 함량에 미치는 영향을 조사하였으며, 배양 중 methyl jasmonate와 salicylic acid의 첨가가 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에는 약전시장에서 구매한 국내산 2년생 적하수오(*Polygonum multiflorum*)를 이용하였다. 적하수오는 2개월 동안 온실에서 재배한 후 활력있는 뿌리를 채취하여 70% 에탄올로 30초간 침지하였다가 2% NaOCl (Sodium hypochlorite) 용액으로 15분간 표면살균 한 다음 멸균수로 3회 세척하였다. 그 후 뿌리를 IBA 2.46 μ M와 sucrose 30 g/L가 첨가된 3/4 MS 배지에 치상하여 부정근을 유도하였다.

생물반응기 배양 및 부정근 증식

총 용적이 3 L인 풍선형 공기부양 생물반응기(Balloon-type air-lift bioreactor)에 IBA 4.92 μ M과 sucrose 30 g/L가 첨가된 3/4 MS 배지에 부정근을 배양하고 4주 간격으로 계대배양 하였다. 배지는 1 N NaOH를 이용하여 pH 5.8로

조정 후 121°C, 1.2 기압에서 35 분간 멸균하여 사용하였다. 배양은 4주간 배양한 부정근을 0.5~1 cm로 절단하여 생체중 5 g (배지 1당)를 초기접종하였다. 이때 생물반응기내 주입되는 공기공급량은 공기흐름 조절장치(air meter)와 미세필터(membrane filter)를 거친 후 배양 전 기간 동안 0.1 vvm으로 일정하게 공급하였다. 배양은 24 \pm 1°C 암배양실에서 4주간 유지되었다.

무기물 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 무기물 농도를 선정하기 위하여 1/4, 1/2, 3/4, 1 배로 농도를 달리한 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 IBA 4.92 μ M, sucrose 30 g/L를 첨가하여 4주간 배양하였다. 배지의 pH는 고압 멸균 전 pH 5.8로 조정하였으며, 생체중을 기준으로 5 g/L의 배양밀도로 부정근을 생물반응기에 배양한 후, 공기공급량을 0.1 vvm으로 조절하였다. 배양은 24 \pm 1°C의 암조건인 배양실에서 4주간 실시되었으며, 배양 4주 후에 흡습지를 이용하여 부정근에서 수분을 충분히 제거한 다음 생체중을 측정하고 부정근을 60°C로 조절한 건조기(FO-600M, Jeio Tech, Korea)에서 48시간 건조한 후 건물중을 측정하였다. 건물물은 최종 수확한 건물중을 최종 수확한 생체중으로 나누어 백분율로 표시하였다. 총 phenolics와 flavonoids 분석을 위해 건조된 부정근을 각 처리별로 1 g씩 채취하여 분석용 시료로 사용하였다.

Auxin의 종류와 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 auxin의 종류와 농도를 구명하기 위하여 sucrose 30 g/L가 첨가된 3/4 MS 배지에 IBA의 농도를 2.46, 4.92, 9.84, 19.68 μ M로 조절하고, NAA의 농도를 2.69, 5.37, 10.74, 21.48 μ M로 달리하여 4주간 배양하였다. 기타 배양조건과 조사항목은 무기물 실험과 동일하게 실시하였다.

Sucrose 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

Sucrose 농도가 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 IBA 4.92 μ M이 첨가된 3/4 MS 배지에 sucrose 농도를 15, 30, 50, 70 g/L로 달리 첨가하여 4주간 배양하였다. 기타 배양조건과 조사항목은 auxin 실험과 동일하게 실시하였다.

Elicitor 종류와 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

Elicitor 종류와 농도에 따른 부정근 내 총 phenolics와 flavonoids

의 변화를 조사하기 위하여 IBA 4.92 μM 과 sucrose 30 g/L가 첨가된 3/4 MS에서 부정근을 3 주간 배양한 다음 micro filter (0.2 μm)로 여과 살균한 methyl jasmonate (MeJA)와 salicylic acid (SA)의 농도를 0, 50, 100, 200, 400 μM 로 조정하여 배지 내 추가적으로 첨가한 후 1주간 배양을 더 진행한 다음 최종적으로 4주 후 수확하였다. 수확 후 부정근은 증류수에서 세척한 다음 건조하여 분석에 이용하였다. 이때 배양조건은 sucrose 실험과 동일하게 유지하였다.

추출물 조제 및 생리활성물질 분석

추출물 조제

건조한 1 g의 부정근을 80% (w/v) 에탄올에 침지하여 환류 냉각 추출장치(LS-2050-S10, LS-TECH, Korea)를 이용하여 80°C에서 1시간 추출하였다. 추출액은 여과지를 통과시킨 후, 15 mL로 정용하여 총 Phenolics와 flavonoids 분석을 위한 최종 추출물로 사용하였다.

총 phenolics 분석

추출액 0.1 mL와 표준물질용액(galic acid)에 각각 2.5 mL의 증류수를 넣어 혼합한 후 Folin-Ciocalteu reagent 2 N 0.1 mL를 첨가하였다. 6분 경과 후 20% Na_2CO_3 용액 0.5 mL를 첨가한 후 30분간 실온에서 방치하였으며 760 nm에서 spectrophotometer (UV-1650 PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질용액의 검량선으로부터 추출액의 phenolics 함량을 측정하였으며, 총 phenolics 함량은 mg/g DW로 표시하였으며, 생산성(productivity)은 mg/L medium으로 표시하였다(Ali *et al.* 2006a).

총 flavonoids 분석

추출액 0.25 mL와 표준물질용액(catechin)에 1.25 mL 증류

수를 첨가한 후 5% NaNO_2 를 0.75 mL 혼합하였다. 6분 후 5% AlCl_3 용액을 0.5 mL 첨가한 후, 이 혼합액의 총량이 2.5 mL가 되도록 증류수로 적정하였다. 510 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준물질용액의 검량선으로부터 추출액의 flavonoids 함량을 측정하였으며, Sakanaka *et al.* (2005)의 방법에 따라 총 flavonoids 함량은 mg/g DW로 표시하였으며, 생산성은 mg/L medium으로 표시하였다.

통계처리

통계처리는 SAS 프로그램(Software Version 9.3; SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 5% 유의수준에서 Duncan의 다중검정 처리하였다.

결과 및 고찰

무기물 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

적하수오 부정근의 성장에 적합한 배지 내 무기물 농도를 구명하기 위하여 MS 배지의 무기염류 농도를 1/4, 1/2, 3/4, 1 배로 달리하여 4 주간 배양한 결과 3/4 MS 처리구에서 생체중 77.58 g으로 가장 높았으며, 건물중은 1 배 MS 배지에서 10.5 g으로 가장 높았다(Fig. 1A). 전반적으로 무기물 농도와 비례하여 건물중이 증가하는 경향을 보여, 무기물 농도와 건물중이 상관관계를 가지고 있음을 알 수 있다(Fig. 1B). 식물의 세포 및 조직배양에 가장 많이 이용되는 배지는 Murashigh & Skoog (MS) 배지로 다른 배지에 비해 MS 배지는 총 질소 함량이 비교적 높다(George *et al.* 1988). 배지내 포함 된 무기물 농도는 식물의 기관형성 및 식물체 성장에 영향을 미치는데(Amiarouche *et*

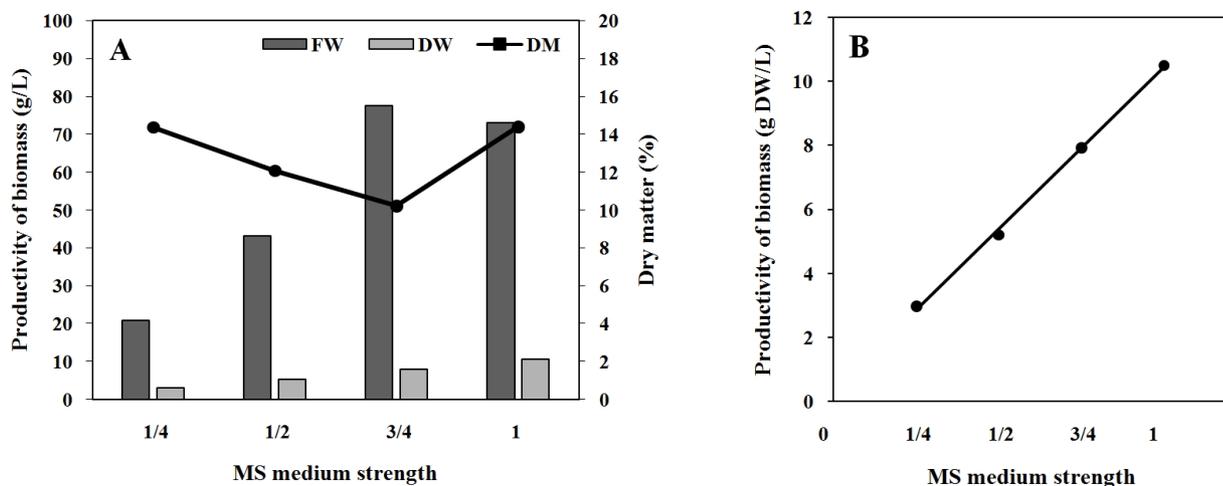


Fig. 1 Effect of MS medium strength on adventitious root culture of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. Effect of medium strength on adventitious root growth. B. Correlation between MS medium strength and productivity of biomass

al. 1985), 부정근 증식의 경우 식물에 따라 MS 농도에 대한 요구도 차이가 있다. *Panax ginseng* 배양 시 부정근의 성장량은 1 MS 배지에서 가장 높아 본 실험결과와 일치하였으나(Yu et al. 2000), *Echinacea angustifolia* 부정근(Murthy et al. 2014)과 *Hypericum perforatum* 부정근 배양(Cui et al. 2010)에서는 1/2 MS 농도에서 성장량이 가장 높아 낮은 농도의 MS 배지가 부정근의 성장에 적합하였다.

부정근의 건물중 1 g 당 총 phenolics와 flavonoids 함량은 성장량과 반대로 1/4 MS 처리구에서 각각 38.01 mg/g DW, 25.77 mg/g DW로 가장 높았다(Fig. 2A). Phenolics와 flavonoids는 다양한 스트레스 요인에 대해 식물체가 내성을 가질 수 있도록 한다(Izbianska et al. 2014). 본 실험에서는 무기물 함량이 적은 1/4 MS 처리구에서 스트레스를 받아 건물중 1 g 당 총 phenolics와 flavonoids 함량이 증가한 것으로 보인다. 그러나 배지 1 L 당 phenolics와 flavonoids의 생산성은 건물중 1 g 당 함유된 생리활성물질 함량이 조금 낮아도 부정근 성장량이 높은 1 MS 처리구에서 각각

186.46 mg/L medium, 113.07 mg/L medium으로 가장 높았다(Fig. 2B). 따라서 본 실험에서 적하수오의 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 최적의 MS 무기염류 농도는 1 배의 MS 배지였다.

Auxin의 종류와 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

Auxin의 종류와 농도를 달리하여 적하수오 부정근을 4주간 배양한 결과 생체중은 IBA 4.92 μM 처리구에서 80.49 g으로 가장 높았으며 건물중은 IBA 19.68 μM 처리구에서 8.91 g으로 가장 높았다(Fig. 3A). 부정근 유도 및 증식에 IBA 처리구가 NAA 처리구에 비해 효과적이었으며, NAA 농도가 높아질수록 생체중과 건물중이 감소하는 경향을 보였다. Hasan et al. (2014)은 *Labisia*의 부정근 유도에 IBA가 효과적이었는데 이는 IBA가 NAA에 비해 강력한 뿌리근원기 유도 효과가 있기 때문이라고 하였다. Auxin은 부

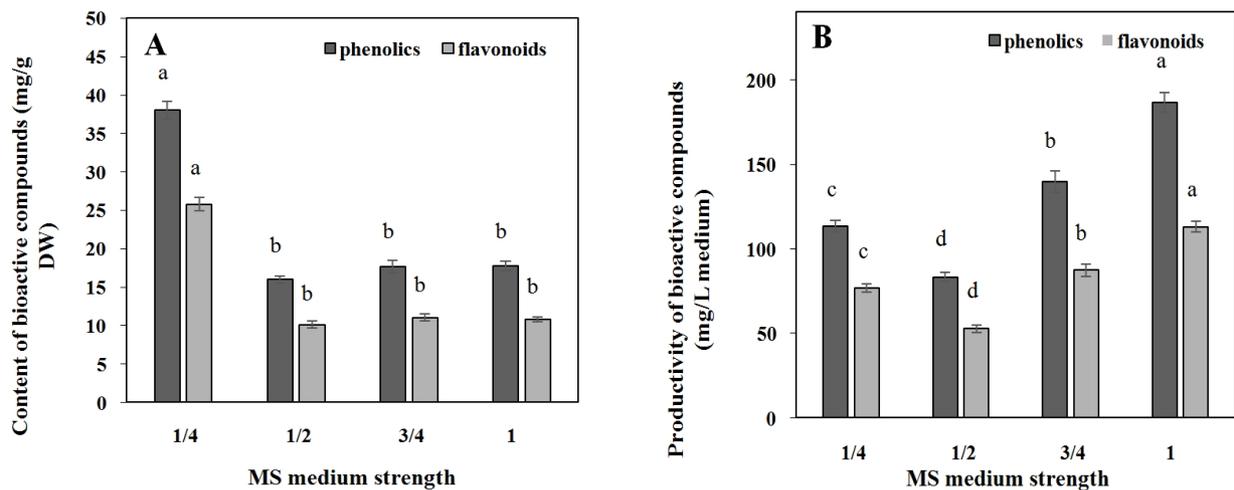


Fig. 2 Effect of MS medium strength on bioactive compounds in the adventitious root of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. Content of bioactive compounds (mg/g DW). B. Productivity of bioactive compounds (mg/L medium)

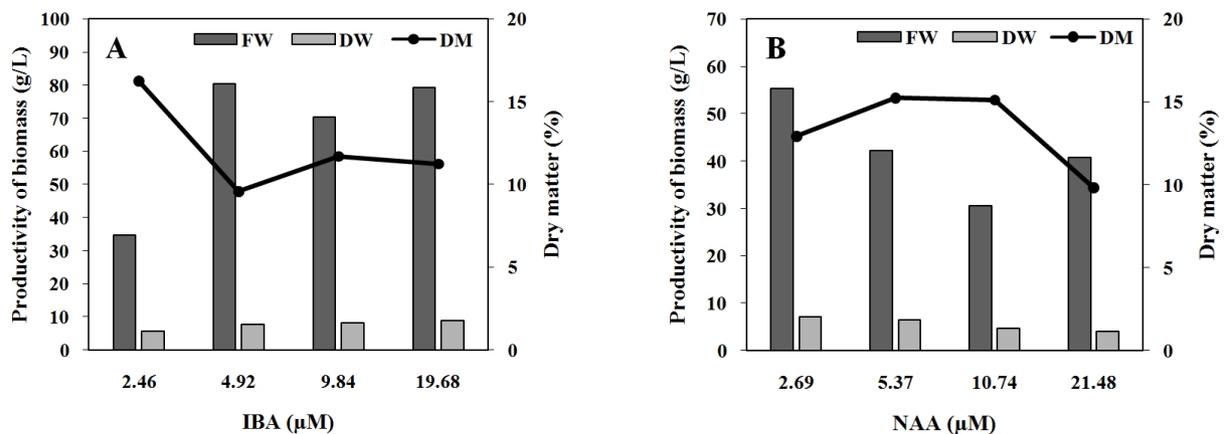


Fig. 3 Effect of auxins type and concentration on adventitious root growth of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. IBA. B. NAA

정근의 측근 형성과 길이 신장에 가장 큰 역할을 하는 생장조절 물질로 부정근에 미치는 영향은 auxin의 종류와 농도에 따라, 그리고 식물 종에 따라 다르게 나타난다(Lee *et al.* 2010). *Panax ginseng* (Jeong *et al.* 2009)과 *Echinacea augustifolia* (Wu *et al.* 2006)의 부정근 배양에서도 IBA는 측근의 형성과 길이신장을 촉진시켜 부정근 배양에 최적의 생장조절물질임을 시사하였다.

Auxin의 종류와 농도가 적하수용 부정근의 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사한 결과 부정근의 건물중 1 g 당 총 phenolics와 flavonoids 함량은 처리구별로 유의적인 차이가 보이지 않았으나, 배지 1 L 당 총 phenolics와 flavonoids 함량은 고농도의 IBA 처리구에서 가장 높았다(Fig. 4). IBA 19.68 μM 처리구에서 총 phenolics 함량과 총 flavonoids 함량이 각각 333.6 mg/L, 183.3 mg/L로 가장 높은 반면에 고농도의 NAA 처리구에서는 phenolics와 flavonoids의 함량이 감소하여 NAA 21.4 μM 처리구에서 총 phenolics 함량과 총 flavonoids 함량이 각각 183.3 mg/L, 67.7 mg/L로

가장 낮았다. 여러가지 auxin 종류에 따른 부정근의 생리활성물질 축적은 식물 종에 따라 다른 양상을 보이는데, 본 실험에서 고농도의 IBA가 총 phenolics와 flavonoids의 축적에 효과적이었던 반면에 *Hypericum perforatum* (Cui *et al.* 2010)와 *Echinacea augustifolia* (Wu *et al.* 2006) 부정근 배양에서 저농도의 IBA 처리구가 생리활성물질 축적에 효과적이었다. 그러나 NAA 처리구가 부정근의 생리활성물질 축적을 억제한다는 결과는 본 실험과 일치하였다. 앞선 실험들과 다르게 *Eleutherococcus koreanum* 부정근 배양(Lee *et al.* 2010)에서는 고농도의 NAA 처리구가 총 phenolics 함량과 flavonoids 함량을 크게 증가시켜 완전히 다른 경향을 보였다.

본 실험에서는 IBA 19.68 μM 처리구에서 적하수용 부정근의 생장과 생리활성물질 축적이 가장 높았으나 IBA 9.84 μM 처리구와 유의적 차이를 보이지 않아 경제성을 고려할 때 부정근 대량증식을 위해서는 IBA 9.84 μM 를 첨가해 주는 것이 가장 최적으로 생각된다.

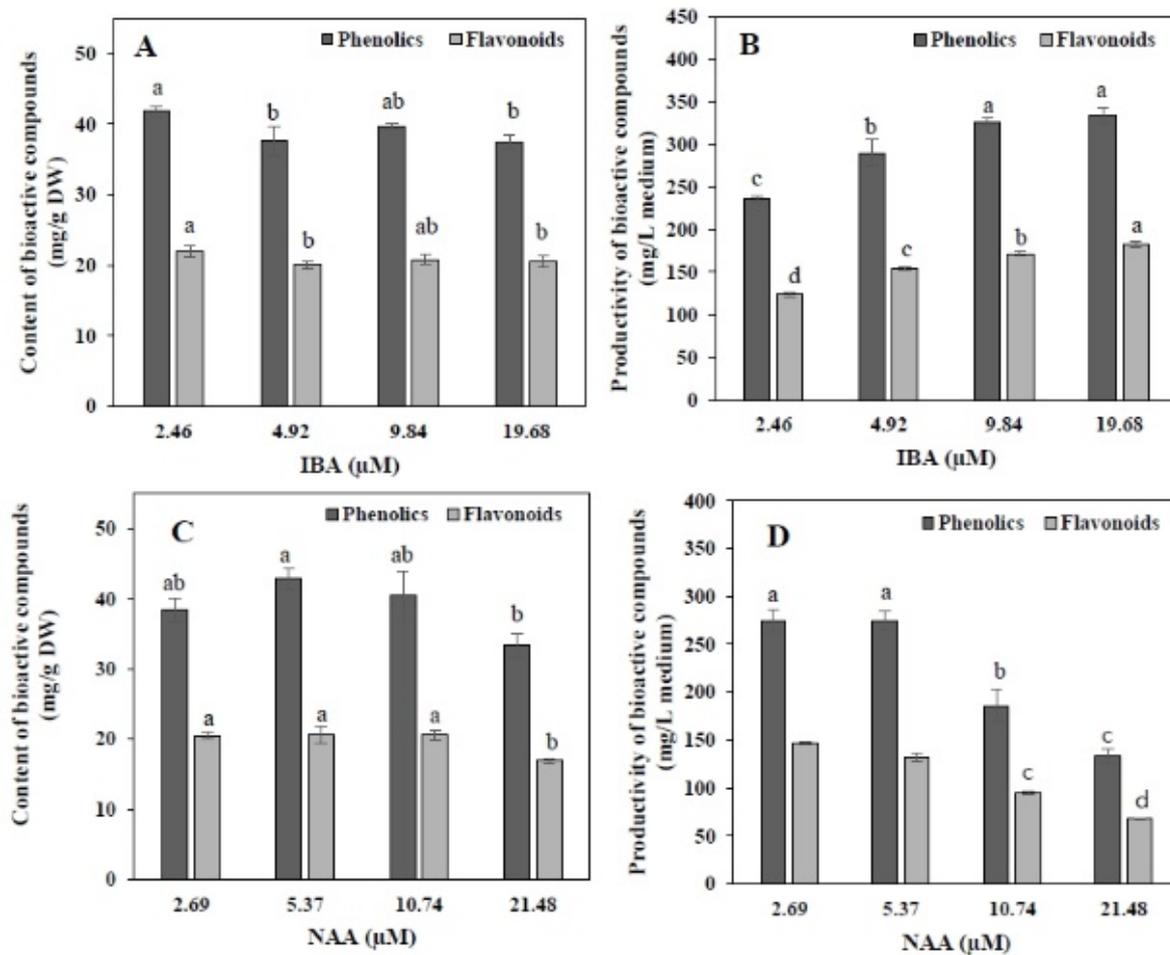


Fig. 4 Effect of auxins type and concentration on bioactive compounds in the adventitious root of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. Effect of IBA on content of bioactive compounds (mg/g DW). B. Effect of IBA on productivity of bioactive compounds (mg/L medium). C. Effect of NAA on content of bioactive compounds (mg/g DW). D. Effect of NAA on productivity of bioactive compounds (mg/L medium)

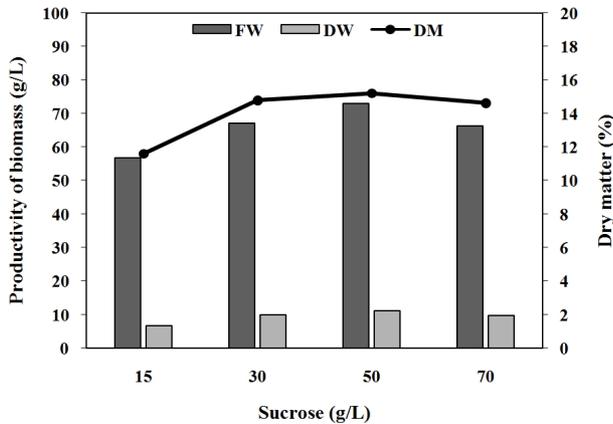


Fig. 5 Effect of sucrose concentration on adventitious root growth of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture

Sucrose 농도에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

배지 내 sucrose 농도가 적하수오 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 당 농도를 달리하여 4주간 배양한 결과 50 g/L 처리구에서 생체중과 건물중이 각각 72.98 g, 11.11 g으로 가장 높았다 (Fig. 5). 기내 배양 시 Sucrose는 탄소원으로 이용되며, 식물체의 성장과 형태형성뿐만 아니라 삼투압 조절의 기능을 한다. 그러나 높은 농도의 sucrose는 삼투압을 감소시켜 배양체의 성장을 억제하며, 스트레스 요인이 된다(Yaseen *et al.* 2013). 본 실험에서는 부정근의 생체중과 건물중, 건물물 모두 sucrose 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 나타냈으나 가장 높은 농도인 70 g/L 처리구에서는 생체중과 건물중이 감소하였다. *Panax ginseng* 부정근 배양 (Sivakumar *et al.* 2005)에서도 50 g/L 처리구에서 부정근의 성장량이 가장 높았으며, *Gymnema sylvestre* 세포 배양 (Lee *et al.* 2006)에서는 30 g/L 처리구에서 생산량이 가장

높았고 30 g/L 이상의 처리구에서는 오히려 생산량이 감소한다고 하였다.

부정근의 건물중 1 g 당 총 phenolics와 flavonoids 함량은 70 g/L 처리구에서 각각 24.0 mg/g DW, 13.5 mg/g DW로 가장 높았다(Fig. 6A). 이는 높은 농도의 sucrose가 삼투압 스트레스 요인으로 작용하여 총 phenolics와 flavonoids 함량을 증가시킨 것으로 보인다. 배지 1 L 당 총 phenolics의 생산성 또한 sucrose의 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6B). 그러나 배지 1 L 당 총 flavonoids 생산성은 가장 낮은 농도인 15 g/L 처리구를 제외한 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. *Echinacea angustifolia* 부정근 배양(Cui *et al.* 2013)에서도 sucrose의 농도가 증가함에 따라 총 phenolics와 flavonoids 함량이 증가하다가 70 g/L 이상의 고농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보여 본 실험과 다소 유사한 결과를 보였다.

Methyl jasmonate와 salicylic acid 처리에 따른 부정근의 성장과 생리활성물질 축적

적하수오 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 methyl jasmonate (MeJA)와 salicylic acid (SA)의 영향을 조사하기 위하여 부정근을 3주간 배양한 다음 MeJA와 SA의 농도를 달리 처리하여 1주일간 추가 배양을 하는 2단계 배양을 하였다. 부정근 생장은 elicitor의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보였으며, 특히 SA 처리구가 MeJA 처리구에 비해 부정근의 성장을 최대 1.8배 억제하였다 (Fig. 7). 식물은 환경적인 스트레스 상황에서 방어작용을 위해 생리활성물질을 축적한다(Ebel and Mithofer 1998). 본 실험에서는 MeJA와 SA가 적하수오 부정근의 스트레스 요인으로 작용하여 생장이 감소하였으며, *Panax ginseng* 부정근 배양(Ali *et al.* 2006b)에서도 MeJA와 SA 처리에 의해 부정근의 생장이 억제되었다.

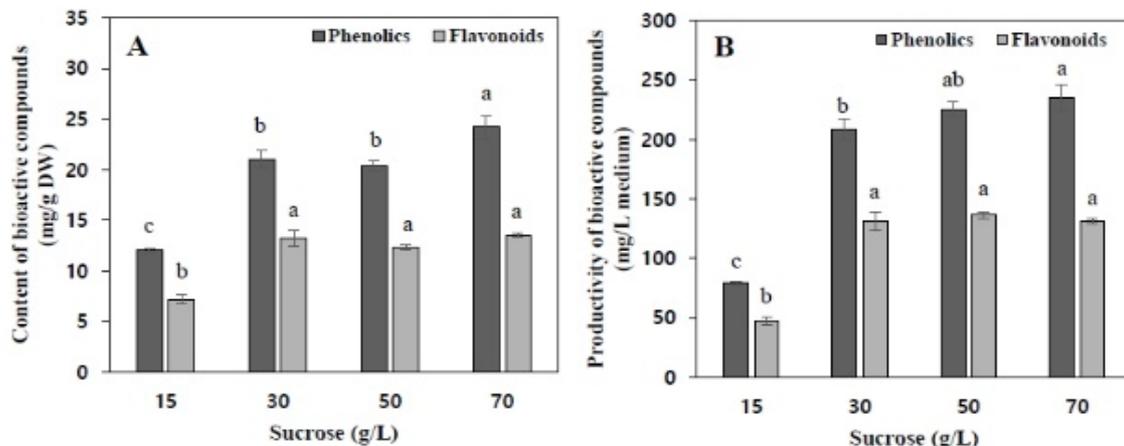


Fig. 6 Effect of sucrose concentration on bioactive compounds in the adventitious root of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. Content of bioactive compounds (mg/g DW). B. Productivity of bioactive compounds (mg/L medium)

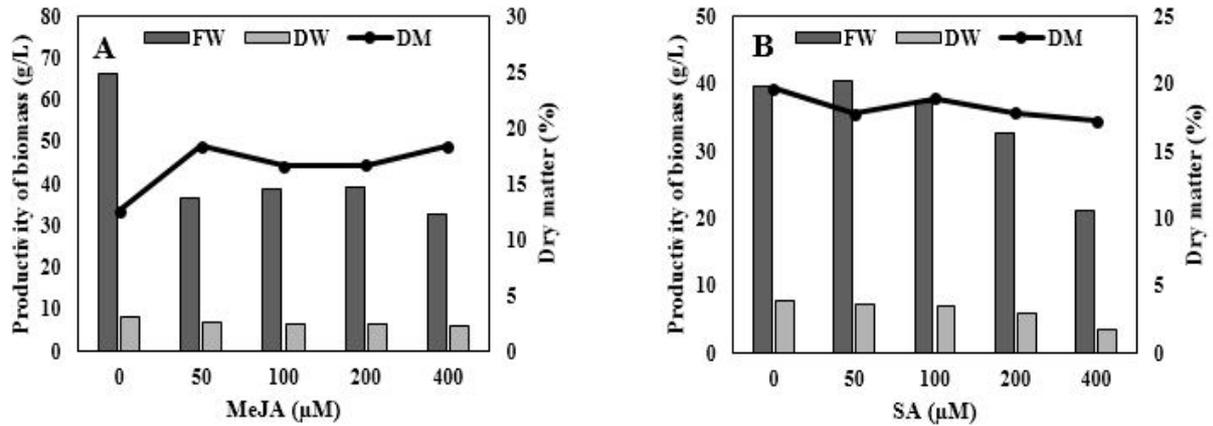


Fig. 7 Effect of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) concentrations on adventitious root growth of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. MeJA. B. SA

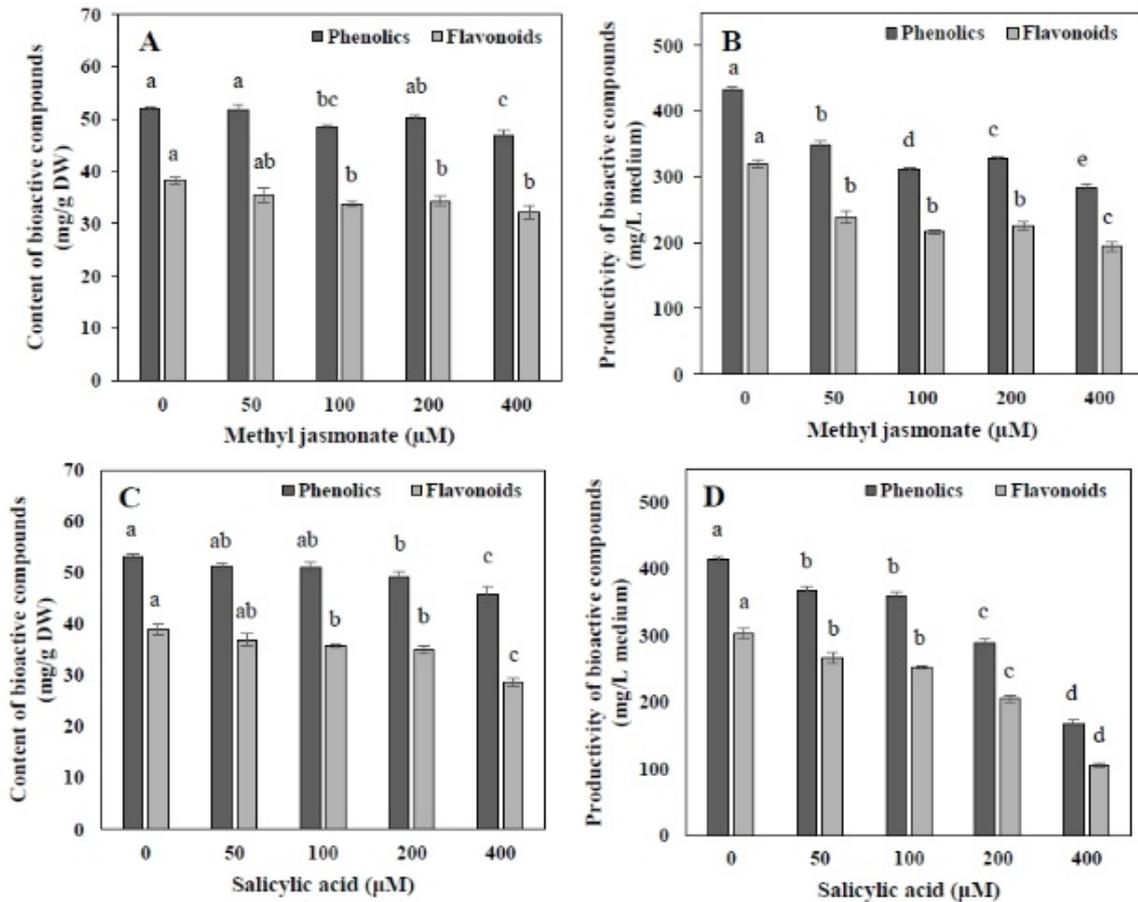


Fig. 8 Effect of methyl jasmonate and salicylic acids on bioactive compounds in the adventitious root of *P. multiflorum* after 4 weeks of culture. A. Phenolics and flavonoids content (mg/g DW) by methyl jasmonate treatment. B. Phenolics and flavonoids productivity (mg/L medium) by methyl jasmonate treatment. C. Phenolics and flavonoids content (mg/g DW) by salicylic acid treatment. D. Phenolics and flavonoids productivity (mg/L medium) by salicylic acid treatment

부정근 내 총 phenolics와 flavonoids 함량을 측정한 결과 모든 처리구에서 대조구에 비해 건물중 1 g 당 함량이 감소하였으며, SA 400 μ M 처리구에서 총 phenolics와 flavonoids가 각각 45.66, 28.77 mg/g DW으로 함량이 가장 낮았다 (Fig. 8). 배지 1 L 당 총 phenolics와 flavonoids의 생산성을

계산한 결과 또한 elicitor 농도가 높아질수록 감소하여, SA 400 μ M 처리구에서 총 phenolics와 flavonoids가 각각 166.7, 105.0 mg/L medium으로 가장 낮았다. *Hypericum hirsutum* 과 *Hypericum maculatum* 배양(Coste et al. 2011)에서는 MeJA와 SA 처리에 의해 생리활성물질인 hypericin이 증가하였으

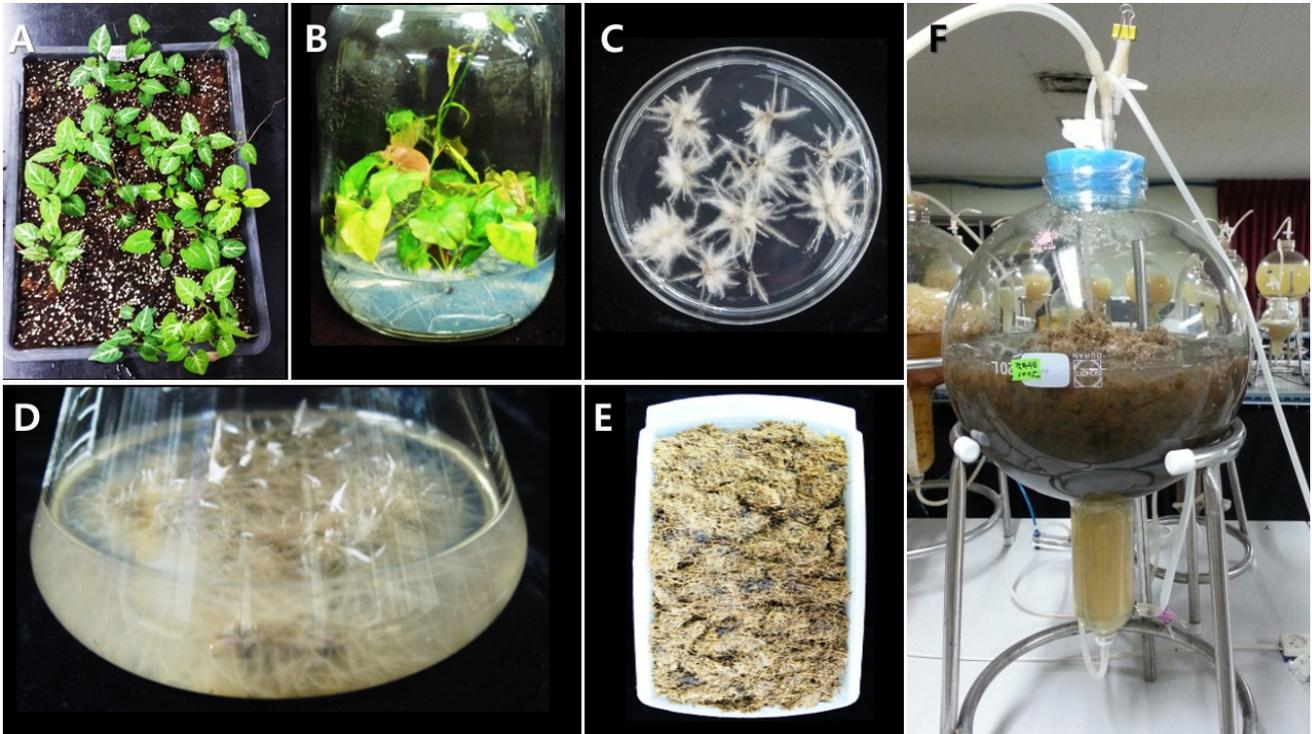


Fig. 9 Adventitious root culture of *P. multiflorum*. A. Mother plants in greenhouse, B. *In vitro* grown plantlets. C. Adventitious root culture on petri-dish, D. Adventitious root culture in 300 ml flask, E. Harvested root from liquid culture, F. Adventitious root culture in 3 L air-lift bioreactor after 4 weeks of culture

며, *Rhinacanthus nasutus* 모상근 배양(Cheruvathur and Thomas 2014)에서도 생리활성물질인 rhinacanthin 축적량이 증가하였다. 본 실험 결과는 이와는 달리 총 phenolics와 flavonoids 함량증가에 MeJA와 SA의 영향은 미미하였다.

적 요

본 연구는 약용식물인 적하수오의 부정근과 생리활성물질 대량생산을 위해 생물반응기 배양 조건을 확립하고자 실시되었다. 이를 위하여 생물반응기 배양 시 배지 내 무기물 함량과, auxin의 종류와 농도, sucrose 농도가 적하수오 부정근의 성장과 총 phenolics와 flavonoids 함량에 미치는 영향을 조사하였으며, 배양 중 methyl jasmonate (MeJA)와 salicylic acid (SA)의 첨가가 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 9.84 μM IBA와 50 g/L sucrose가 첨가된 1배 MS배지에서 최적의 부정근 생장이 이루어졌으며 생리활성물질 축적도 가장 높았다. MeJA와 SA 처리시 적하수오 부정근의 성장과 생리활성물질 축적은 오히려 감소하였다. 본 연구 결과는 산업적 목적을 위한 적하수오의 부정근과 생리활성물질 대량생산시 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 산업통상부의 지역특화사업 연구과제(No. R0002314)의 지원을 받아 수행하였습니다.

References

- Abbasi BH, Liu E, Saxena PK, Liu CZ (2009) Cichoric acid production from hairy root cultures of *Echinacea purpurea* grown in a modified airlift bioreactor. *J Chem Technol Biot* 84 : 1697-1701
- Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006a) Antioxidative responses of *Echinacea angustifolia* cultured roots to different levels of CO₂ in bioreactor liquid cultures. *Enz Microb Tech* 25 : 1122-1132
- Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006b) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep* 25 : 613-620
- Amiarouche L, Stuchbury T, Matthews S (1985) Comparisons of cultivar performance on different nutrient media in a routine method for potato micropropagation. *Potato Res* 28 : 469-478
- Chakrabarty D, Hahn EJ, Yoon YJ, Paek KY (2003) Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. *J Hort Sci Biotech* 78 : 605-609

- Cheruvathur MK, Thomas TD (2014) Effects of plant growth regulators and elicitors on rhinacanthin accumulation in hairy root cultures of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. *Plant Cell Tiss Org* 118 : 169-177
- Choi JW, Lee HS, Kim YG, Kim BM, Kim IH, Lee CH (2012) Effect of *Polygonum multiflorum* Thunberg Extract on Lipid Metabolism in Rats Fed High-Cholesterol Diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41 : 957-962
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G (2011) Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tiss Org* 106 : 279-288
- Cui XH, Chakrabarty D, Lee EJ, Paek KY (2010) Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technol* 101 : 4708-4716
- Cui XH, Murthy HN, Jin YX, Yim YH, Kim JY, Paek KY (2011) Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. *Bioresource Technol* 102 : 10072-10079
- Cui HY, Baque MA, Lee EJ, Paek KY (2013) Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Plant Biotechnol Rep* 7 : 297-308
- Ebel J, Mithofer A (1998) Early events in the elicitation of plant defense. *Planta* 206 : 335-348
- George EF, Puttock DJM, Geroge HJ (1988) *Plant culture media: Commentary and analysis*. Vol. 2. Exegetics Ltd, Edington, UK
- Hasan NA, Hussein S, Ibrahim R (2014) Plant growth regulator effect on adventitious roots induction of *Labisia pumila*. *Malaysian J Fundamental Appl Sci* 10 : 49-52
- Izbianska K, Jelonek MA, Deckert J (2014) Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotox Environl Safe* 110 : 61-67
- Jeong CS, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2009) Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Acta Physiol Plant* 31 : 219-222
- Lee EJ, Mobin M, Hahn EJ, Paek KY (2006) Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. *J Plant Biol* 49 : 427-431
- Lee EJ, Kim MK, Paek KY (2010) Auxin and cytokinin affect biomass and bioactive compound production from adventitious roots of *Eleutherococcus koreanum*. *Kor J Hort Sci Technol* 28 : 678-684
- Lin HT, Nah SL, Huang YY, Wu SC (2010) Potential antioxidant components and characteristics of fresh *Polygonum multiflorum*. *J Food Drug Anal* 18 : 120-127
- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2008) Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese J Biotechnol* 24 : 711-716
- Murthy HN, Kim YS, Park SY, Paek KY (2014) Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of *Echinacea* species. *Appl Microbiol Biot* 14 : 5962-5966
- Rao SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotech Adv* 20 : 101-153
- Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem* 89 : 569-575
- Sivakumar G, Yu KW, Paek KY (2005) Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Eng Life Sci* 5 : 333-342
- Sivakumar G, Yu KW, Paek KY (2006) Enhanced production of bioactive ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor culture. *J Hortic Sci Biotech* 81 : 549-552
- Southwell LA. and Bourke CA (2001) Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 56 : 437-441
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1 : 13-25
- Wu CH, Dewir YH, Hahn EJ, Paek KY (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *J Plant Biol* 49 : 193-199
- Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A, Hafiz IA (2013) Review: rol of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Mol Biol Rep* 40 : 2837-2849
- Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2000) Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. *Korean J Plant Tiss Cult* 27 : 309-315
- Zhao J, LC Davis, R Verpoorte (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23 : 283-333