

## 참당귀 뿌리 배양에 있어서 root segmentation과 식물생장조절제가 뿌리 성장과 decursinol angelate 생산에 미치는 영향

김지연<sup>1</sup>, 조지숙<sup>1</sup>, 조종문<sup>1</sup>, 이용일<sup>1</sup>, 김익환<sup>2</sup>, 김동일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>인하대학교 공과대학 화공생명공학부, <sup>2</sup>고려대학교 생명공학원

전화 (032) 860-7515, FAX (032) 872-4046

### Abstract

Decursinol angelate, a new anticancer agent, was produced by root cultures of *Angelica gigas* Nakai. In addition, difference of specific yields between primary and secondary root was investigated. It was found that specific yield of secondary root was much higher than that of primary root at various conditions, so that it was thought that the formation and growth of secondary root were feasible. From this point of view, effects of root segmentation and plant growth regulators (NAA, IBA) on root morphology and decursinol angelate production were examined. Root segmentation increased secondary root mass and product formation. On the other hand, addition of NAA or IBA at various concentrations promoted secondary root formation and production of decursinol angelate significantly. Five-fold increase of production was obtained at 4 mg/L of IBA compared to control without NAA and IBA.

### 서론

참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 뿌리에서 기관 특이적으로 생성되는 decursin과 decursinol angelate는 폐암, 간암, 자궁암, 만성백혈병, 대장암 등의 다양한 암세포주에 대해 강한 치사작용을 나타내는 반면 정상세포에 대해서는 이들 암세포주에 비해 훨씬 낮은 치사작용을 나타냄이 밝혀지면서 이를 유효성분으로 포함하는 항암제뿐 아니라 암예방제로서의 개발 가능성이 제시되었다.<sup>1)</sup> 그러나 완전한 식물체에 서와 다르게 배양된 뿌리에서는 decursin의 생성이 거의 확인되지 않고 있으며 배양조건에 따라 일정량의 decursinol angelate만 생성됨이 확인되었다.<sup>2)</sup> 배양된 뿌리는 크게 primary root와 secondary root로 나눌 수 있다. 여기서 primary root는 부피가 성장하는 단계의 세포로 구성되어 끊어진 뿌리 부분을 말하며 secondary root는 분열 및 분화단계의 세포와 분열 후 부피성장 전 단계의 세포로 구성된 실처럼 가는 root hair를 말한다. 따라서 secondary root만을 분리하여 배양하면 secondary root가 많아질 뿐 아니라 분열단계의 세포가 일정 시간 후 부피성장단계로 접어들어 시간이 지남에 따라 primary root의 비율이 증가하게 된다.

본 연구에서는 한국산 참당귀 유래의 항암물질인 decursinol angelate를 뿌리 배양을 통하여 생산하였으며 secondary root의 생산성이 primary root에 비해 크게 높음을 확인하였다. 따라서 secondary root의 형성 및 성장 촉진은 decursinol angelate의 생산량 증진에 유리할 수 있으며 이러한 관점에서, 접종 초기 cutting에 의한 secondary root segment의 배양과 plant growth regulator(NAA, IBA)의 첨가가 참당귀 뿌리의 morphology와 decursinol angelate의 생산에 미치는 영향을 알아보았다.

### 재료 및 방법

참당귀 뿌리 배양을 위한 배지는 SH 액체 배지를 기본으로 하여 30 g/L sucrose, 1 mg/L 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 및 0.6 g/L casein hydrolysate를 첨가하였으며, pH를 5.8로 맞추어 후 가압증기멸균하여 사용하였다. 배양은 25°C, 110 rpm, 암조건에서 하였다. 20일 간격으로, 배양된 뿌리의 secondary root만을 핀셋과 메스로 취하여 1:4의 비율로 계대배양하여 유지하였으며 이를 본 실험을 위한 재료로 사용하였다. 실험을 위하여 40 mL 배지가 담긴 100 mL 삼각플라스크에 0.4 g의 secondary root를 분리하여 접종하였으며, 모든 실험은 2회 반복으로 수행하였다. Decursinol angelate의 추출 및 분석은 기존의 보고<sup>3)</sup>와 같은 방법을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 다양한 조건에서 primary root와 secondary root의 생산성 비교

배양된 뿌리를 primary root와 secondary root로 나누어 root segmentation(25°C)이나 저온(20°C) 및 고온(35°C) 처리한 후 2일간 배양하여 그 생산성의 차이를 알아보았다. 그 결과 모든 조건에서 secondary root의 생산성이 primary root에 비하여 크게 높았으며 대조구의 경우에는 8배 이상 높았다(Figure 1). 이는, 참당귀 뿌리 세포에서의 decursinol angelate 생산이 세포분화와 관련 있기 때문으로 여겨지며 따라서 분열 및 분화단계의 세포로 구성된 secondary root의 생산성이 부피성장단계의 primary root에 비해 높은 것으로 사료된다.

#### Root segmentation에 의한 성장 및 생산성 변화

접종 초기 root segmentation이 primary root와 secondary root의 형성 및 성장에 미치는 영향을 알아보았다. 배양된 뿌리에서 secondary root만을 분리하여 2 cm 또는 0.5 cm 이하의 길이로 접종하였으며 primary root와 secondary root를 분리, 건조시켜 각각의 dry weight(DW)를 측정하였다. 대조구에 비하여 cutting이 많이 되었을수록 뿌리의 총 DW 증가 속도는 낮았지만 최대농도는 증가하였다(Figure 2). 이는 cutting에 의하여 primary root의 형성이 억제된 반면(Figure 3-(a)) 상대적으로 부피가 작은 secondary root의 형성 및 생장이 유도되었으며(Figure 3-(b)) 이로

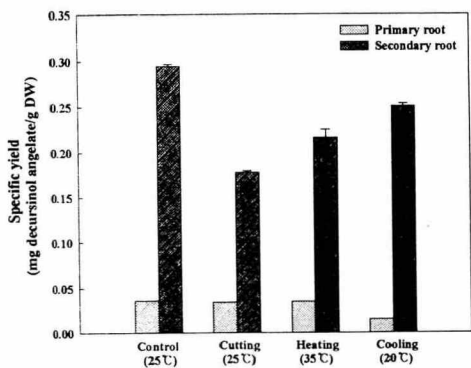


Figure 1. Comparison of specific yield between primary and secondary root at various conditions.

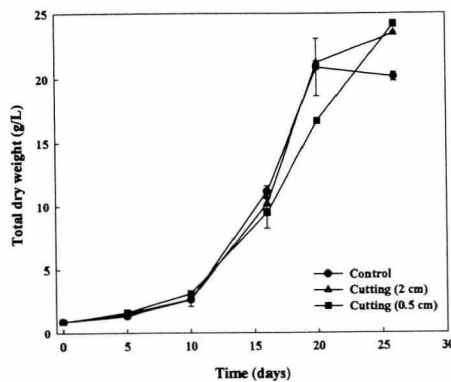
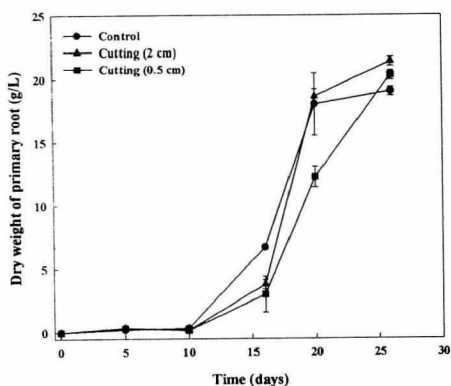
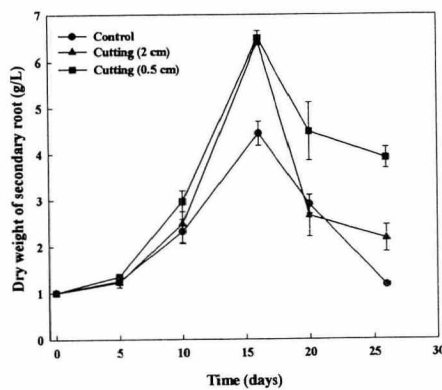


Figure 2. Time course changes of root growth according to cutting.



(a)



(b)

Figure 3. Time course changes of (a) primary and (b) secondary root growth according to cutting.

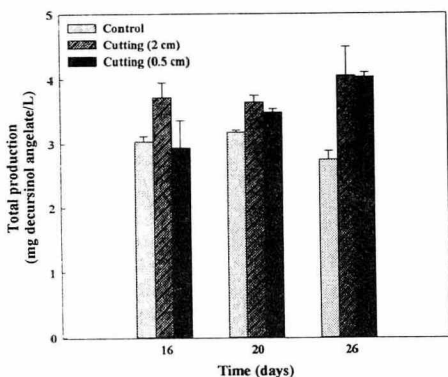


Figure 4. Effect of root tip cutting on decursinol angelate production in *A. gigas* Nakai root culture.

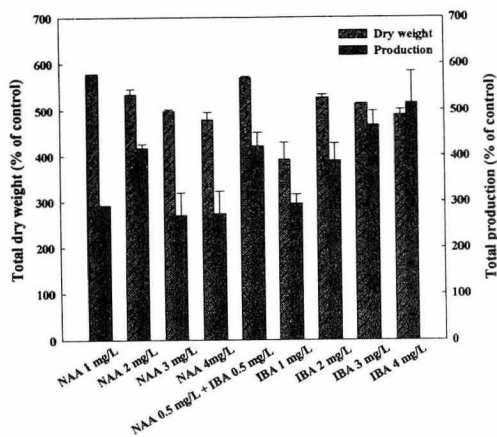


Figure 5. Effects of NAA and IBA on root growth and decursinol angelate production. Root was cultured for 25 days in the medium containing NAA (1-4 mg/L), IBA (1-4 mg/L) or both (each 0.5 mg/L). Values are expressed as percentages of control.

인한 F/D ratio의 감소가 뿌리가 자랄 수 있는 배지 내 공간을 제공해 주었기 때문 이라 여겨진다. 0.5 cm 또는 2 cm로 cutting 하였을 경우 26일째의 총 생산량은 약 4 mg/L로, 대조구에서 가장 많은 생산이 일어난 20일째 대조구에 비해 28% 증가하였 다(Figure 4). 이는 cutting이 수행되었을 경우 secondary root의 생산성은 감소하 지만(Figure 1) root hair 즉, secondary root의 형성 및 생장이 증가하였기 때문이 다(Figure 3-(b)).

### NAA와 IBA의 영향

1-4 mg/L의 농도범위에서 NAA 또는 IBA를 첨가하거나 NAA와 IBA를 0.5 mg/L 씩 함께 첨가하여 접종 25일째에 배양된 뿌리의 성장과 생산량을 측정하였다. Figure 5는 plant growth regulator(PGR)를 첨가하지 않았을 때를 기준으로 하여 총 DW와 생산량을 백분율로 나타낸 것이다. PGR을 첨가한 모든 경우 총 DW가 크게 증가하였으며 생산량 측면에서도 최대 516.8%(IBA 4 mg/L 경우)에 달하였다. NAA와 IBA를 첨가한 모든 경우 secondary root의 생성이 크게 유도되었다. 그러나 NAA가 IBA에 비하여 상대적으로 높은 비율의 primary root를 유도한 반면 IBA는 농도가 증가함에 따라 생산성이 높은 secondary root의 유도를 매우 강력하 게 자극하였기 때문에 처리된 농도 중 가장 높은 농도인 4 mg/L의 IBA는 decursinol angelate의 생산량을 5배 이상으로 증대시켰다.

### 요약

접종 초기 root segmentation은 뿌리의 성장 속도를 감소시키고 그 생산성을 저하 시키기도 하지만 F/D ratio를 감소시켜 뿌리가 자랄 수 있는 배지 내 공간을 제공 하기 때문에 고농도 배양에 유리할 뿐 아니라, 생산성이 높은 secondary root의 비 율을 증가시키기 때문에 decursinol angelate의 생산량을 증대시킨다.

참당귀 뿌리배양을 위한 plant growth regulator의 최적 조건으로 secondary root의 성장성 측면이나 decursinol angelate의 생산성 측면에서 4 mg/L 이상의 IBA 첨가 가 요구됨을 확인하였다.

### 참고문헌

1. Ahn, K. S. (1996), A Study on the Anticancer and Immunostimulating Agent from the Root of *Angelica gigas* Nakai, Ph.D. Dissertation, Dept. of Biology, Korea University, Seoul.
2. 김명환, “주목세포배양에서의 세포성장증진과 참당귀뿌리배양을 통한 항암물질 생산 연구”(2000), 인하대학교 생물공학과 석사학위논문.
3. 조지숙, “참당귀 조직배양을 이용한 Decursinol Angelate 생산 및 세포주 동결보 존방법 연구”(2001), 인하대학교 생물공학과 석사학위논문.