

쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 켈러스 배양을 통한 *achyranthes saponin* 생산
작물과학원 목포시험장 : 김광수*, 박윤정, 김용범, 장영석, 방진기

Production of *achyranthes saponin* through *Achyranthes japonica* callus culture

Mokpo Experiment Station, NICS, RDA, Muan, Korea

Kwang-Soo Kim*, Yun-Jeong Park, Yong-Bum Kim, Young-Seok Jang, Jin-Ki Bang

실험목적

쇠무릎(*A. japonica*)은 비름과에 속하는 다년생 식물로서 뿌리에는 oleanolic계 saponin과 steroid계 inosterone, ecdysterone 등의 성분이 함유되어 있어 예로부터 뿌리를 우슬(牛膝)이라 하여 귀중한 한약재로 사용되고 있으며 약리효과로서는 진통작용, 자궁수축작용, 이뇨작용, 진경작용, 혈압강하작용 등이 있어, 고혈압, 류마티스 및 관절통과 같은 울혈의 치료제, 이뇨제 및 강장제로 사용되고 있다. 본 연구는 수요량이 지속적으로 증가하고 있는 쇠무릎의 켈러스 배양을 통하여 유용 생리활성물질인 *achyranthes saponin*의 기내 생산 가능성을 알아보기 위하여, 쇠무릎의 각 부위로부터 켈러스를 유도하고 유용물질 고생산성 세포주의 선발 및 배양적정 조건을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

쇠무릎의 종자를 70%의 ethanol에 수 초간 침지하고, 2%의 sodium hypochlorite 용액으로 5분간 표면 살균하여 멸균수로 3-4회 세척한 후, 기내에서 발아시켜 배양 중인 식물체를 사용하였다.

○ 실험방법

기내에서 배양 중인 식물체의 줄기, 뿌리(0.5 - 1 cm 길이)와 잎(0.5 × 0.5 cm)을 절취하여 켈러스 유도 배지에 치상하여 온도 25±1℃, 암조건에서 배양하였다. 켈러스 유도배지는 3%의 sucrose가 첨가된 MS 기본배지를 사용하였으며 성장조절제로는 NAA, 2,4-D 및 BA를 단독 또는 조합 첨가하여 식물체 절편에 따른 켈러스 유도율 및 켈러스 배양조건을 구명하였으며, *achyranthes saponin*의 생산여부는 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Waters사의 injector(600), detector(486 Tunable absorbance) 및 integrator (Autochro-WIN, Young)를 사용하였으며 고정상으로 TSK-GELODS 120A column(0.46×25 cm), 이동상으로 MeOH-H₂O-AcOH (82:18:0.2 v/v)를 사용하였고, 유속은 0.8 ml/min으로 하여 207 nm에서의 자외선 흡광도로 화합물을 검출하였다.

주저자 연락처 (Corresponding author) : 김광수 E-mail : ajuga@rda.go.kr Tel : 061-450-0133

실험결과

쇠무릎의 기내배양을 통한 saponin의 생산 가능성을 조사하기 위해 기내에서 배양 중인 쇠무릎의 유식물체로부터 잎, 줄기 및 뿌리를 절취하여 캘러스를 유도한 결과 1 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 가장 좋았으며. 잎 절편보다 줄기 절편에서 좋은 결과를 보였으며, 생장률 또한 높게 나타났다. 캘러스의 증식을 위한 배양조건은 1 mg/L 2,4-D, 3%의 sucrose와 질소원으로는 24.8 mM KNO₃가 인원으로는 5.2 mM의 NH₄H₂PO₄가 첨가된 SH 액체배지에서 25℃로 배양하였을 때 세포의 생장률이 가장 좋았다. 기내에서 배양된 캘러스의 achyranthes saponin 합성 여부를 HPLC로 조사한 결과, Methyleanolate β-D-glucopyranoside가 0.039%, Chikusetsusaponin IVa methyl ester가 0.021%, Chikusetsusaponin V methyl ester가 0.005%가 함유되어 있는 것으로 나타났다.

* 시험성적

Table 1. Major achyranthes saponin content of callus from leaf, stem and selected callus line of *A. japonica*.

Origin	Content of saponin			Total saponin
	MG ^a	CIVM ^b	CVM ^c	
Leaf	0.011	0.018	0.004	0.035
Stem	0.013	0.021	0.005	0.039
SC ^d	0.024	0.061	0.018	0.103

^aMethyleanolate β-D-glucopyranoside; ^bChikusetsusaponin IVa methyl ester;

^cChikusetsusaponin V methyl ester; ^dSelected callus line