

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 모상근 배양을 통한 Saponin 생산

I. 캘러스, 부정근, 모상근과 재배근의 Saponin 양상과 함량 비교

安俊徹·白允雄·成忠基*·康根亨*·黄秬

(전남대학교 자연과학대학 생물학과, *약학대학 제약학과)

Production of Saponin by Hairy Root Culture of *Bupleurum falcatum* L.

I. Comparison of Saponin Content and Pattern in Callus, Adventitious Root, Hairy Root and Cultivated Root

Ahn, Jun Cheul, Yun Woong Paek, Chung Ki Sung*
Geun Hyung Kang* and Baik Hwang

(Department of Biology, and

*Department of Manufacturing Pharmacy, Chonnam National University, Kwangju)

ABSTRACT

In order to survey possibility to produce saikosaponin from *in vitro* hairy root culture, culture of callus, adventitious root, and hairy root of *Bupleurum falcatum* L. were established, and quantitative and qualitative aspects in saikosaponin extracted from these were compared with those of cultivated root. Callus grew well in MS medium containing 0.9 μ M 2,4-D. In contrast, both of adventitious root and hairy root grew well in hormone-free MS medium. However, hairy root showed more rapid growth with extensive lateral root branches, characteristics of lower content of water and softer than in adventitious root. Among the selected lines of adventitious root and hairy root were observed difference in the growth rate. Mannopine, one of opine synthesized in the transformed tissue with *Agrobacterium rhizogenes* A₄ were detected in the extract of hairy root lines. Pattern and content of crude saponin from adventitious and hairy root showed no difference, but somewhat difference from those of cultivated root. However, in callus, distinct production-aspect of saponin was not observed.

서 론

시호는 미나리과에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리는 한방에서 해열, 진통, 해독 및 소염 등의 처방에 많이 사용되어 왔으며, 시호의 뿌리를 주성분으로 하는 시호탕의 경우 현대인의 주요 질병인 간장질환의 예방과 치료약으로서의 약효가 입증되고 있어 최근 수요가 급증하고 있는 중요한 생약이다. 시호의 약리작용으로는 현저한 해열작용, 간장해독작용, 혈압강화작용, 항염증작용, 항알러지작용 등이 연구 보고되었고, 생화학적으로는 간단백질 생합성촉

진작용, 간 glycogen 합성촉진작용, 혈장 cholesterol, triglyceride, 인지질 등의 농도상승억제작용 등이 보고되어, 결국은 강력한 항염증작용에 기인한 간장해 개선작용을 보이는 것으로 생각되고 있다(Shibata and Tagaki, 1969). 이와 같은 작용을 보이는 시호의 약리성분은 olenane계 saponin인 saikosaponin a와 d에 의한 것으로 많은 연구에 의해 입증이 되고 있으며(Kimata *et al.*, 1982; Shimaoka *et al.*, 1975), saikosaponin c의 경우에도 당을 제거한 saponin이 동일한 약리작용을 보이는 것으로 밝혀져 있다(Yammamoto *et al.*, 1975).

시호는 국내에서도 수출을 목적으로 많은 양이 재배되고 있지만 약재로 사용되는 뿌리의 발달이 저조하고 야생시호에 비하여 1년 이상 재배시에는 뿌리내부가 목화되어 saponin의 함량이 떨어지며 근부병(root rotting disease)에 따른 수확량 감소 등의 문제점을 가지고 있다. 뿐만 아니라 최근에는 saikosaponin를 주성분으로 하는 생약제제로서 간해독제 및 해열제로서의 약제화 가능성이 부각되고 있어 그 어느 약용식물보다 잠재수요가 대단히 클 것으로 기대되고 있다. 따라서 이러한 자연재배에 의존하는 단점을 극복하기 위하여서는 최적의 재배조건의 규명은 물론 조적배양을 이용한 saikosaponin 생산 가능성의 조사가 요망된다 하겠다.

한편, 식물조직배양에서 일반적으로 행하여지고 있는 탈분화된 캘러스 또는 세포현탁배양의 경우는 *Lithospermum erythrorhizon*에서의 shikonin 생산(Fujita *et al.*, 1981)을 제외하고는 일반적으로 미분화된 세포의 유전적, 생화학적 이질성에 기인하여 2차대사산물을 기대하는 수준만큼 얻는데 많은 어려움을 겪고 있다(Taya *et al.*, 1989). 하지만, 80년대 후반부터 시작된 root-inducing plasmid(Ri-plasmid)가 내재된 *Agrobacterium rhizogenes*라는 토양미생물을 감염하여 유도한 형질전환된 모상근 배양을 통하여 여러 가지 유용한 2차대사물질의 획득에 있어 주목할 만한 결과를 보여주고 있다(Knopp *et al.*, 1988; Matsui *et al.*, 1986; Sakamoto *et al.*, 1992). 이들 모상근은 계놈내에 삽입되어 있는 Ri-plasmid의 일부 유전자(T-DNA)에 존재하는 식물 성장호르몬의 생합성에 관여하는 일부 유전자가 발현되므로써 외재호르몬의 공급이 없이도 빠른 성장을 보이고 오랜 배양기간에 있어서도 유전적으로 안정하며(Aird *et al.*, 1986; Christen *et al.*, 1989), 특히 뿌리나 근경에서 합성되는 일부 2차대사산물의 경우에 있어서는 원식물의 뿌리에 비교되는 질적, 양적인 수준의 함성을 보여주고 있다. 그 중 *Panax ginseng* 모상근의 경우는 현재 일본에서 상업화에 이용되고 있기도 하다.

따라서 본 연구에서는 이러한 모상근의 기내배양을 통하여 saikosaponin를 얻을 수 있는지의 여부를 확인하고자 하는 목적으로 일차적으로 시호에서 모상근을 유도하고 배양하였으며, 배양된 모상근에 있어서 saikosaponin의 생성 양상과 함량을 캘러스와 부정근 그리고 포장에서 재배된 시호 1년근과 비교조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 균주. 시호(*Buplerum falcatum* L.)는 국내에서의 주요 재배 품종인 식시호의 종자를 무균 발아시킨 다음 유식물체를 1~2 cm의 길이로 절편화하여 본 실험의 재료로 사용하였다. 사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes*

A₁ strain 이며, 감자추출배지(potato 2%, sucrose 1.5%, agar 1.5%)로 27°C 암소에서 2일간 배양하여 무균수로 약 10⁸ bacteria/mL가 되게 희석하여 사용하였다.

캘러스 유도 및 배양. 무균 발아된 유식물체의 절편을 2,4-D 2 mg/L이 첨가된 MS 고형배지(sucrose 3%, pH 5.8)에 치상하여 캘러스를 유도하였으며 유도된 캘러스는 동일배지에서 3주 간격으로 계대배양하였다.

부정근 유도 및 배양. 유식물체의 절편을 2,4-D 2 mg/L이 첨가된 MS 액체배지에서 10일 정도 현탁배양한 후 무균수로 배지를 충분히 세척한 다음 호르몬이 첨가되지 않은 MSO 고형배지에 치상하여 부정근을 유도하였다. 유도된 부정근은 각각을 따로 절취하여 MSO 액체배지를 사용하여 3주 간격으로 계대배양하였으며, 그 중 간혹 재분화가 일어나면서 부정근의 생장이 활발한 BFOR1과 재분화가 일어나지 않으며 보다 저조한 성장을 보이는 BFOR2로 명명된 두개의 부정근 line을 선별하였다.

모상근 유도 및 배양. 2,4-D 2 mg/L이 첨가된 MS 액체배지에서 균과 유식물체의 절편을 2일간 coculture 한 후 무균수로 균과 호르몬을 철저히 세척한 다음 항생제인 cefotaxime 300 mg/L이 들어있는 MSO 고형배지에 절편을 치상하여 균의 제거와 동시에 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 각각을 따로 절취하여 부정근 배양과 동일한 방법으로 진탕배양하였으며, 활발히 자라는 많은 모상근 line 중에서 BFHR1 과 BFHR2를 임의로 선별하여 이들을 부정근 line인 BFOR1, BFOR2와 비교하여 성장비율 조사하였다. 성장비 측정방법으로는 각 측정구 0.5 g(fr wt)을 30 mL의 배지에 접종하여 2주간 배양한 후 여과지로 물기를 충분히 제거한 다음 생중량과 55°C 건조기에서 2일간 건조하여 건중량을 측정하였다.

형질전환 확인. 모상근의 형질전환 확인은 Petit 등(1986)의 방법에 따라 paper electrophoresis를 이용하여 opine의 합성여부를 조사하였다.

Saikosaponin의 추출 및 분석. 30 mL의 배지에 각 0.5 g(fr wt)씩 접종하여 4주간 배양한 캘러스, 부정근(BFOR1), 모상근(BFHR2) 그리고 1년간 재배된 시호뿌리를 55°C에서 2주일간 건조한 다음 잘게 마쇄하여 캘러스는 1 g(dry wt) 그 외 시료는 각 0.2 g(dry wt)를 분석시료로 하였다. 마쇄된 조직은 약탕관을 이용하여 3% pyridine-MeOH(30 mL씩, 각 1시간)로 3회 추출한 후 그 혼합액을 50°C에서 감압농축하였다. 농축한 MeOH 추출액은 물 30 mL와 ether 50 mL씩으로 3회 추출하여 ether 층은 버리고 불층만을 합하였다. 물층은 다시 1-butanol(30 mL씩)로 3회 분리하고 butanol 층만을 합하여 감압농축하였다. 농축액은 1 mL의 MeOH로 용해시킨 후 0.45 µm인 membrane filter(millipore)로 여과한 다음 -20°C에 보관하여 TLC, HPLC 분석의 시료로 사용하였다.

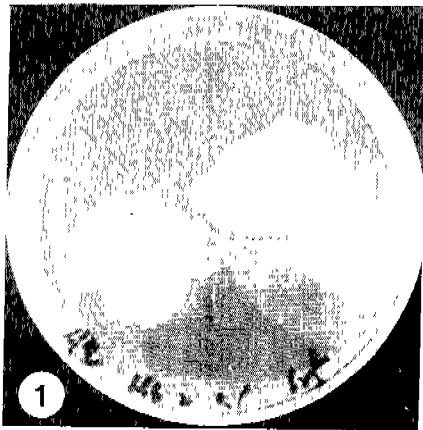


Fig. 1. Callus proliferation on MS agar medium supplemented with 0.9 μM 2,4-D.



Fig. 2. Adventitious root induced from segments of *B. falcatum*.

표준인 saikosaponin a(Sa)와 saikosaponin d(Sd)(Wako Co. Japan)는 각각 4 mg을 10 mL의 methanol에 용해시켜 표준액으로 사용하였다.

TLC 분석은 silica gel GF₂₅₄ precoated TLC plate를 이용하여 20 μL의 시료를 점적한 후 AcOEt : EtOH : H₂O(8 : 2 : 1, v/v/v)를 전개용매로 TLC 하였으며, 10%-H₂SO₄의 분무에 이은 105°C에서 약 5분간 가열하여 발색 과 R_f치를 비교하였다.

HPLC 분석은 각 시료 5 μL를 주입하였으며, 장치로는 Waters의 injector(V6K), detector(Tunable Absorbance detector), integrator(746 Data module)를 사용하였으며 column은 실온에서 Waters의 Bondapak C₁₈ column(10 μm, 3.9 mm×300 mm)을 사용하였다. 이동상으로는 acetonitrile : H₂O(40 : 60, v/v/v)를 1.2 mL/min의 속도로 하였으며 203 nm에서의 흡광도로 검출하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 배양. 치상된 절편으로부터 캘러스 형성에는 약 4~5주의 기간을 필요로하였으며, 초기 캘러스 형성시의 더딘 세포분열에 비하여 직경이 4~5 mm 정도 됐을 때 이들을 분리하여 동일배지에서 3주간격으로 연속적인 계대배양을 한 결과 배지와 첨가한 2,4-D 농도에의 적응으로 생각되는 비교적 빠른 세포분열을 보여주었다 (Fig. 1). 유사한 결과로 시호 캘러스의 유도과 배양에 있어 2,4-D, IAA, NAA, kinetin를 단독 또는 복합처리한 결과 2,4-D의 단독처리가 가장 효과적이었다는 Cho 등(1990)의 보고를 들 수 있다.

부정근 유도 및 배양. 배지에 치상하여 4주 후에는 절편에서 캘러스가 형성되기 시작하며 5주 후에는 형성된

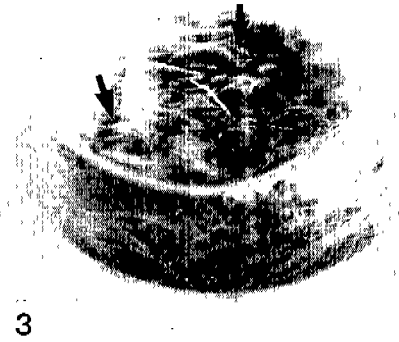


Fig. 3. Adventitious root cultured in hormone-free MS liquid medium. Arrow mark: regenerative shoots from some adventitious roots.

캘러스에서 기관형성(organogenesis)에 따른 부정근이 유도되었다(Fig. 2). 대조구로서 10여일의 2,4-D 처리 기간 없이 동일 배지에 치상한 절편에서는 캘러스는 물론 부정근의 형성을 전혀 보여주지 않았다. 이러한 결과는 2,4-D가 첨가된 배지에서 배양중인 캘러스를 2,4-D가 제거된 배지로 옮겨 배양함으로써 부정근을 유도하였다는 Cho 등(1990)의 결과를 고려할 때 시호의 잎이나 근경의 절편에서 부정근이 형성되기 위해서는 2,4-D 농도의 감소는 물론 조직세포들의 탈분화 상태로의 전환이 우선되어야 하는 것으로 사료되었다. 유도된 부정근 각각은 외재 호르몬의 첨가 없이도 MS 배지 등에서 오랜 배양기간 동안 비교적 안정된 성장을 보였으며, 이들 부정근 중 일부 부정근 line은 dim light 하에서 자발적으로 소수의 shoot가 형성되었다(Fig. 3).

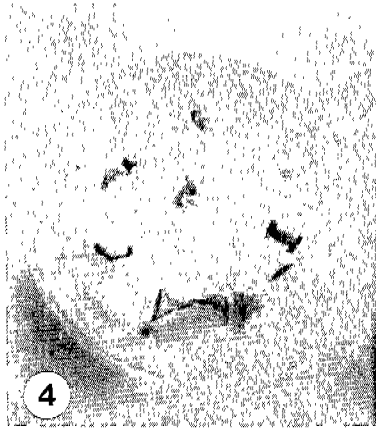


Fig. 4. Hairy root induced from segments of *B. falcatum*.

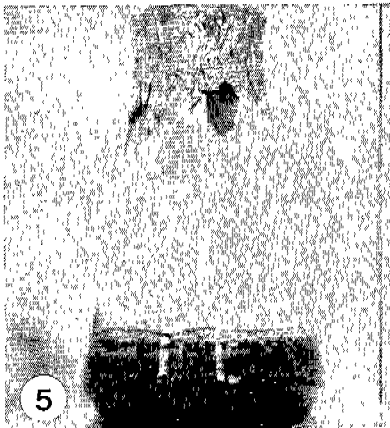


Fig. 5. Hairy root cultured in hormone-free MS liquid medium.

모상근 유도 및 배양. 균을 접종하고 4주 정도 경과 하면 절편의 감염부위 특히, 일의 기부쪽에서 작은 tumor의 형성에 이어 모상근이 유도되었다(Fig. 4). 모상근 형성에 있어 2,4-D의 효과를 보기 위하여, 대조구로서 2일간의 2,4-D 처리기간 없이 치상한 절편의 경우는 상처부위에서부터 인접세포로의 갈변화가 일어나고 모상근의 형성을 보여주지 않았다. 이러한 결과로 보아 시호의 어린조직은 상처치유조직(wounding tissue)의 생성능력이 낮아 T-DNA에 의하여 형질전환이 되었다 하더라도 tumor나 모상근의 형성이 쉽지 않은 것으로 보이며, 따라서 상처를 낫과 동시에 짧은 기간의 외재호르몬, 특히 2,4-D의 처리로 감염세포의 활성을 높여주는 과정이 필요하다고 해석할 수 있을 것 같다. 유도된 모상근은 부정근과의 외관상 형태적인 차이점을 구분하기는 힘들었으며, 부정근과 마찬가지로

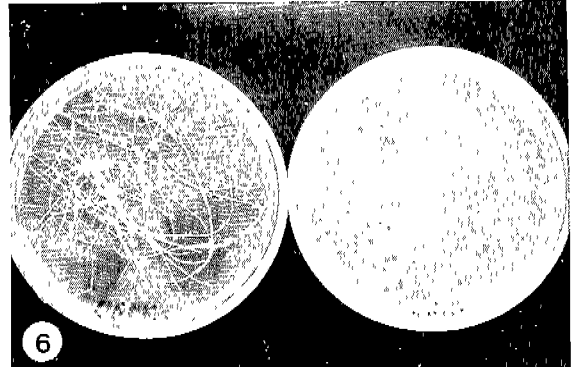


Fig. 6. Adventitious root[BFOR1(left)] and hairy root [BFHR2(right)] cultured in a MS agar medium.

Table 1. Growth and dry/fresh weight ratio of adventitious root and hairy root lines in MS liquid medium

Line	BFOR1	BFOR2	BFHR1	BFHR2
Fresh weight ^a	0.975	0.754	1.228	1.439
Dry weight ^a	0.099	0.080	0.101	0.115
% (dry wt/fr wt)	10.2%	10.7%	8.3%	8.0%

The first inoculum ca. 0.5 g(fr wt), 2 weeks culture.

^aMean of typically 3 replicates.

호르몬이 없는 MS배지에서 활발히 성장하였다(Fig. 5). 그러나 Fig. 6에서 보는 것처럼 부정근에 비교하여 모상근이 뿌리의 분지능에서 훨씬 앞서며, 결과적으로 액체진탕배양에서의 성장비에 있어서도 상당한 차이를 보여주고 있다. 이들 부정근과 모상근 line 각각에 있어서도 성장비는 차이가 있었으며, 생중량에 대한 건중량의 비가 부정근에서는 평균 10.5%와 모상근에서는 8.2%로 부정근이 보다 낮은 함유율을 보였고 모상근에 비하여 뿌리가 약간 단단한 편이었다(Table 1). 3주간 배양한 부정근과 모상근의 성장비가 60배를 보인 *Atropa belladonna*(Kamada *et al.*, 1986), 20배인 *Beta vulgaris*와 35배인 *Nicotiana rustica*(Hamill *et al.*, 1986) 그리고 약 3배인 *Panax ginseng*(Furuya and Yoshikawa, 1987) 등과 비교하여 시호의 경우에는 2주간의 배양에서 약 1.7배의 차이를 보였다. 이러한 시호의 부정근과 모상근의 성장비가 큰 차이를 보이지 않는 이유로는, 시호 모상근의 생장이 더디하기 보다 이들 부정근이 생장이 안되거나 극히 저조한 것에 비하여 상대적으로 시호 부정근은 외재호르몬의 공급이 없어도 비교적 활발한 성장을 보여주기 때문으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 부정근과 모상근의 성장비에 있어 차이는, 첫째 모상근의 계승상에



Fig. 7. Paper electrophoresis of extracts from adventitious root (lane O1, BFOR1; lane O2, BFOR2) and hairy root (lane H1, BFHR1; lane H2, BFHR2) of *B. falcatum*. M, authentic mannopine; A, authentic agropine.

삽입되어 있는 T-DNA의 호르몬대사에 관여하는 일부 유전자의 발현에 따라 뿌리 성장점의 분열이 촉진되는 점(Tepfer, 1984)과 둘째로 형태적인 면으로 *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*(Webb et al., 1990)과 *Panax ginseng* (Hwang, 투고중) 모상근의 경우처럼 정상뿌리에 비하여 세포간격이 크고 느슨한 세포배열을 보이는 껍층과 구분 가능한 표피의 부재에 따라 측뿌리의 형성이 보다 유리할 수 있다는 두 가지 측면에서 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 물론 시호의 모상근에 있어서도 *Scopolia japonica* (Matsui et al., 1986), *Beta vulgaris*(Hwang et al., 미발표) 모상근 line간의 생장에 있어서 차이를 보이는 것과 마찬가지로 임의로 선발된 두 line간의 성장비에 있어서 차이가 있음을 알 수 있었다. 부정근인 BFOR1의 경우는 고품배 지상에서나 진탕배양시 낮은 빈도지만 간혹 shoot가 자발적으로 유도되고 있으며 뿌리의 생장이 BFOR2에 비하여 양호한 결과로 나타났다.

Opine 분석. 이들 모상근은 agropine type인 *A. rhizogenes* A에 의하여 형질전환된 모상근에서만 특이적으로 합성되는 아미노산 변이체인 agropine과 mannopine 중에서 mannopine만을 합성하고 있는 것으로 확인하여(Fig. 7). *Lobelia inflata*(Hiroshi et al., 1990)와 *Cucurbita pepo*(Ve-

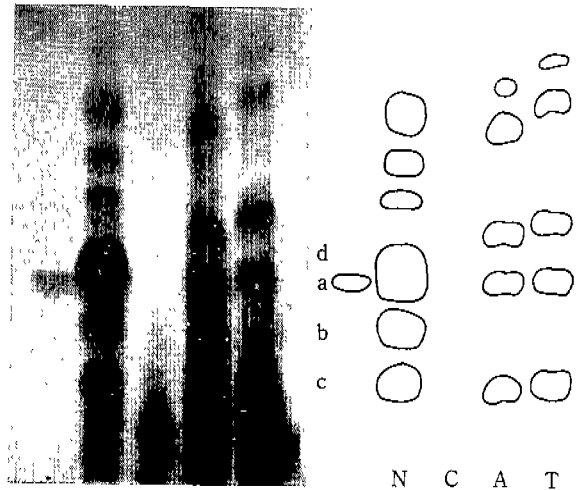


Fig. 8. Thin layer chromatogram of saikosaponin isolated in cultivated root(lane N), callus(lane C), adventitious root (lane A) and hairy root(lane T) of *B. falcatum*. a, b, c, d; saikosaponin a, b, c, d.

sna et al., 1991) 등의 모상근에서도 mannopine만을 검출하였다는 결과와 일치하였다. 표품인 agropine과 동일한 지점에서는 부정근과 모상근 모두에서 silver nitrate 염색에서 하얀색을 띄는 미지물질이 동일 R_f치 부근에 분리됨에 따라 agropine의 합성여부를 판단하기가 힘들었다. 부정근 line인 BFOR1, BFOR2에서는 opine이 검출되지 않았다.

Saikosaponin의 분석. 동일기간 배양한 캘러스, 부정근, 모상근 그리고 시호 1년근에서 추출한 saikosaponin 분획은 AcOEt : EtOH : H₂O(8 : 2 : 1, v/v/v)의 전개용매로 TLC하여 10% H₂SO₄의 분무에 의한 발색과 R_f 값을 조사한 결과 Fig. 8에서 보는 것처럼 재배근에서는 7~8개, 부정근과 모상근에서는 6~7개의 spot을 관찰할 수 있었으며, 대부분 자색으로 발색되어 saponin 성분으로 추정할 수 있었다. 반면에 캘러스는 5배나 많은 양의 시료로 추출하였음에도 불구하고 명확히 구분되는 spot가 전혀 나타나지 않았다. 전개양상에 있어서 부정근과 모상근의 경우는 거의 일치하였으며, 이들과 재배근을 비교하였을 때 몇몇 spots의 R_f치는 물론 각 spot의 크기와 발색의 정도로 추정할 양적인 면에서도 다소의 차이를 보여주었다. saikosaponin a와 d는 표품과 비교하여 R_f치가 각각 0.26과 0.28로 큰 차이가 없어 단일 spot로 나타나며, 재배근에서는 한국서수입한 식시호근의 경우 중국산이나 자국산에 비하여 전체 saponin 분획 중 Sa와 Sd의 비율이 가장 높았다는 Aka-hori와 Kagawa(1980)의 결과에 일치하는 spot의 크기와 발색의 진하기를 보여주었다. 부정근과 모상근에 있어서 Sa는 표품과 동일한 R_f치를 갖는 spot가 확인되며 Sd의

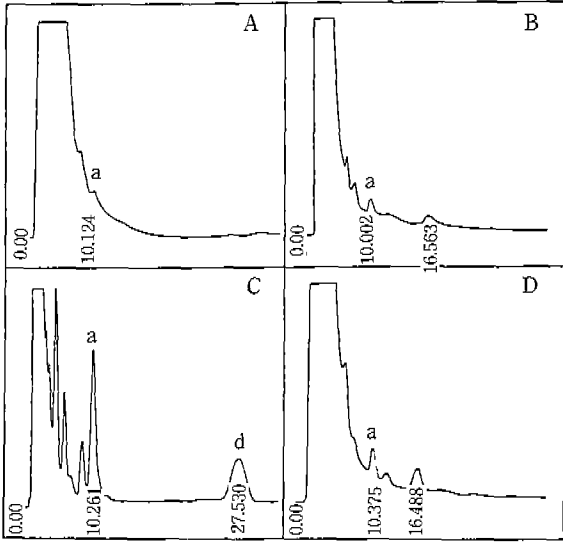


Fig. 9. High performance liquid chromatogram of saiko-saponin isolated in callus(A), adventitious root(B), cultivated root(C), and hairy root(D) of *B. falcatum*. a, d; saiko-saponin a, d.

경우는 관찰이 어려웠다. R_f 값이 0.19인 Sb의 경우는 재배근에 비하여 모상근에서는 희미하게 나타났다. R_f 값이 0.13인 Sc의 경우는 부정근과 모상근에서 재배근과 비슷한 정도의 발색범위를 보여주었다.

Fig. 9는 동일시료를 μ -Bondapak C₁₈ column을 이용하여 acetonitrile : H₂O(40 : 60, v/v)를 이동상으로 한 역상크로마토그래피 방법으로 HPLC한 것으로서 Sa와 Sd는 retention time이 각각 10분과 27분 정도에서 분리되었으며, Sc의 경우는 6~7분 내에서 분리되는 것으로 추정되나 동일 retention time 부근에서 많은 흡수대가 있어 분조전으로는 정확한 분리가 어려웠다. 켈러스는 UV 검출기의 감응도를 최대로 하였을 때 Sa와 Sd가 전혀 검출되지 않았던 TLC에 비하여 Sa의 경우 작은 peak로 검출되었다. 부정근과 모상근은 Sa가 각각 재배근의 1/6과 1/4 정도의 함량으로 분리되었다. 반면에 Sd는 재배근에서 retention time 27에서 분리되었으나 부정근과 모상근에서는 Sd가 검출되지 않았으며 16분 정도에서 재배근에는 존재하지 않는 peak가 분리되었다.

이러한 결과를 종합하여 몇 가지로 요약하면 첫째, *Panax ginseng* 모상근에서 saponin 검출에 대한 Hwang 등(1991)의 보고와 마찬가지로 시호의 경우에서도 saponin의 기내생산을 위해서는 탈분화된 세포인 켈러스보다는 미세근으로서의 뿌리형태를 일정하게 유지하는 부정근이나 모상근이 보다 적절한 것으로 사료된다. 둘째, 부정근과 형질

전환된 모상근이 거의 동일한 saponin 양상과 함량을 보여주고 있어 동일배양기간시 생장비가 훨씬 앞선 모상근 배양에 의하여 Sa 등을 대량생산 하는 것이 보다 적합할 것으로 사료된다. 셋째, 모상근은 형질전환된 원식물체 각각의 유전적 특성은 물론이고 T-DNA가 식물세포의 계층 내에 무작위로 삽입됨(Chyi *et al.*, 1986)에 따라서 유도된 개개의 모상근은 각기 다른 line으로 구분 지을 수 있을 것이며 이에 따른 물질생산 능도 다양하기 때문에(Shimomura *et al.*, 1991), 생장과 saponin의 생성능이 최적인 모상근 line의 선발과정이 선행되어야 할 것으로 사료된다. 넷째, 재배근과 기내배양한 미세근과의 saponin 성분의 양적, 질적인 차이는 뿌리의 발달 단계 또는 재배시의 다양한 자연의 환경변화와 기내배양시 일정한 배양조건에서 오는 saponin의 생성성에 관련된 효소발현의 차이인지는 분명하지 않지만, 현재 본 실험실에서 진행하고 있는 몇몇 배양조건의 조정에 의하여 saponin 함량 증가할 수 있음을 보여주어 앞으로 saponin 생성에 최적인 배양조건의 확립 여하에 따라서는 Sd의 생성에 이은 전체적인 saponin 함량을 상당부분 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 유식물체를 재료로 켈러스와 부정근을 유도, 배양하였으며 *A. rhizogenes* A₁를 접종하여 유도된 모상근 배양을 확립하였다. 각각 임의 선발된 부정근 line인 BFOR1, BFOR2와 모상근 line인 BFHR1, BFHR2의 생장비를 조사하였으며, 모상근의 경우는 형질전환 여부를 확인하기 위하여 opine 분석을 수행하였다. 켈러스, 부정근, 모상근 그리고 재배근에서의 saponin 양상과 함량을 TLC와 HPLC를 이용하여 분석하였다. 켈러스는 2,4-D가 0.9 μ M이 첨가된 MS배지에서 잘 자랐으며, 부정근과 모상근은 부정근이 보다 흡수율이 낮아 목질화되어 있는 특징을 보였으나 외관상 큰 차이점을 보이지는 않았으며 둘다 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지에서 빠른 성장을 나타내었다. 부정근과 모상근 선발 line간의 생장비는 차이가 있었으며, 전체적으로 부정근에 비하여 모상근이 활발한 분지와 뿌리 생장점 부위의 빠른 분열에 의한 높은 생장비를 보여주었다. Paper electrophoresis를 통한 Opine 검정결과, 형질전환된 모상근에서만 mannopine의 확인이 가능하였다. TLC와 HPLC를 이용한 부정근과 모상근에서 추출한 saponin의 전개양상과 함량은 거의 동일하였으며, 재배근에서 추출한 saponin의 전개양상 및 함량과는 약간의 차이를 보여주었다. 반면에 켈러스에서는 뚜렷한 saponin의 생성양상을 보이지 않았다. 부정근과 모상근은 재배근에 비교하여 Sa는 각각 재배근의 1/6과 1/4 수준으로, Sc의 경우는 재배근과 비슷한 수준의

생산성을 보이는 것으로 확인되었으며, 반면에 Sb와 Sd의 경우에는 부정근과 모상근에서는 극히 소량이 생성되거나 합성되지 않는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- Aird, E.L.H., J.D. Hamill and M.J.C. Rhodes. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **15**: 47-57.
- Akahori, A and K. Kagawa. 1974. Quantitative determination of Saikosaponins in *Bupleurum* extract. II. Thin-layer chromatogram separation of Saikosaponins. *Shoyakugaku Zasshi* **28**: 122-126.
- Cho, D.Y., R.S. Seong, H.H. Bae, W.Y. Soh and P.H. Jo. 1990. Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 205-209.
- Christen, P., M.F. Roberts, J.D. Phillipson and W.C. Evans. 1989. High-yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* **8**: 75-77.
- Chyi Y.S., R.A. Jorgensen, D. Goldstein, S.D. Tanksley and F. Loaiza-Figueroa. 1986. Locations and stability of *Agrobacterium* mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 64-69.
- Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* **1**: 61-63.
- Furuya, T. and T. Yoshikawa. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* **6**: 449-453.
- Hamill J.D., A.J. Parr, R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* **5**: 111-114.
- Hiroshi, Y., K. Shimomura, M. Satake, S. Mochida, M. Tanaka, T. Endo and A. Kaji. 1990. Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Reports* **9**: 307-310.
- Hwang, B., K.M. Ko, K.H. Hwang, S.J. Hwang and Y.H. Kang. 1991. Production of saponin by hairy root cultures of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Korean J. Bot.* **34**: 289-296.
- Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* **5**: 239-242.
- Kimata, M., R. Kasai and O. Tanaka. 1982. Saponins of Juk-siho and roots of *Bupleurum longeradiatum* Turcz L. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 4373-4377.
- Knopp, E., A. Strauss and W. Wehrli. 1988. Root induction on several *Solanaceae* species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloid content. *Plant Cell Reports* **7**: 590-593.
- Matsui, C., Y. Mano, S. Nabeshima and H. Ohkawa. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2715-2722.
- Petit, A., Berkaloff and J. Tempe. 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet.* **161**: 67-76.
- Sakamoto, S., K. Sato, S. Iwakami, Y. Goda, T. Maitani, M. Takeda, K. Yoshihira, T. Saito and H. Kamada. 1992. The identification of pungent components in hairy roots and regenerated plants of Horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Tissue Culture Letters.* **9**: 43-46.
- Shibata, M. and K. Tagaki. 1969. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. II. Antiinflammatory and other pharmacological actions of crude Saikosides. *Yakugaku zasshi* **89**: 1367-1378.
- Shimaoka, A., S. Seo and H. Minato. 1975. Saponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. components of Saikosaponin b. *J. C. S Perkin I* **5**: 2043-2048.
- Shimomura, K., M. Sauerwein and K. Ishimaru. 1991. Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of *Solanaceous* plants. *Phytochemistry* **30**: 2275-2278.
- Taya, M., A. Yoyama, R. Nomura, O. Kondo, C. Matsui and T. Kobayashi. 1989. Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system. *J. of Fermentation and Bioengineering* **67**: 31-34.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* **37**: 959-967.
- Vesna K., S. Jelaska, T. Bakran-Petricioli and C. David. 1991. Host-tissue differences in transformation of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **24**: 35-42.
- Webb, K.J., S. Jones, M.P. Robbins and F.R. Minchin. 1990. Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, and *Trifolium pratense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Science* **70**: 243-254.
- Yamamoto, M., A. Kumagai and Y. Yamamura. 1975. Structure and action of Saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Antiinflammatory actions of Saikosaponins. *Arzein. Forsch. (Drug Res.)* **25**: 1021-1023.