

천궁의 세포배양에 의한 정유성분의 생산

신승원# · 박봄희

덕성여자대학교 약학대학

(Received January 26, 1994)

The Production of Essential Oils by Tissue Culture of *Cnidium officinale*

Seung-Won Shin# and Bommoi Park

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714

Abstract—Callus was derived from the shoots of *Cnidium officinale*. The growth rate of callus and the production of essential oils were studied under different culture conditions. The essential oils in the rhizome of *Cnidium officinale* and the cultivated callus were analyzed and compared by gas chromatography and mass spectrometry. It appeared that NAA induced higher growth rate and production of essential oils than 2,4-D. The compositions of essential oils were influenced by the illumination. Butyl phthalide, cnidilide, senkyunolide, butylidene phthalide, ligustilide, grandisol, tricosane, 3-methylphenol and 2-pentylthiophene were identified in the cultivated callus.

Keywords □ *Cnidium officinale*, cell culture, essential oils, GC-MS, butyl phthalide, cnidilide, senkyunolide, butylidene phthalide, ligustilide.

천궁은 Umbelliferae에 속하는 다년생 초본으로 중국이 원산지이며, 강장, 진정, 진통, 구어혈 등의 작용이 있어서 빈혈 및 냉증, 월경장애 등 각종 질환에 사용되어 왔다.¹⁾ 근래에 와서는 특히 천궁성분의 혈관확장 작용에 대해 많은 관심이 모아지고 있으며, 그외 피부에서의 약물흡수 보조작용 등, 여러 방향의 약효에 대해 많은 연구가 진행되고 있다.^{2,3)} 천궁(*Cnidium officinale* Makino)의 성분으로는 cnidilide, ligustilide, neocnidilide, senkyunolide, butyl phthalide, butylidene phthalide 등의 정유성분과 그외 pregnenolone, vanillin, coniferyl ferulate, ferulic acid 등이 알려져 있다.⁴⁻⁸⁾ Shimomura 등은 천궁의 callus 배양에 의한 번식방법에 대해 보고한 바 있으나, 이방법에 의한 정유생산에 대해서는 지금까지 연구된 바가 없었다.⁹⁾

정유생합성의 precursor중의 하나인 mevalonic acid는 일반적으로 C₄-C₂ 단위의 결합에 의해 합성

되지만 일부는 leucine으로 부터 복잡한 경로 거쳐 합성되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ *Perilla*속 식물의 세포배양에 있어서는 mevalonic acid나 mevalonic acid lactone의 첨가에 의해서는 정유합성이 증가되지 않으나 *L*-leucine의 첨가에 의해서는 현저히 증가하는 것이 보고된 바 있다.¹¹⁾ 천궁의 정유는 phthalide계 성분이 주류를 이루고 있으며, 일반적으로 이 계열의 성분은 polykedide 경로로 합성되어지는 것으로 알려져 있으나, 천궁정유의 생합성과정에 대하여는 정확히 밝혀진 바가 없다.

본 논문에서는 세포 배양법에 의해 천궁의 정유성분을 생산하는 방법에 대해 연구하기 위해 천궁의 어린싹으로부터 callus를 유도하여 계대배양한 후 배지내의 성장hormone의 농도, 정유 생합성의 첨가, 광선및 배양온도가 callus의 성장 및 정유함량에 미치는 영향을 조사하였고 배양한 callus에서 생성된 정유의 조성을 gas chromatography 및 gas chromatography-mass spectrometry의 방법으로 비교분석하고 결과를 보고하는 바이다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험 방법

정유의 분석—강원도 평창군 진부면에서 재배중인 천궁의 지하부를 채취하여 마쇄한 후 정유추출장치를 이용하여 장치에 ether를 2 ml 가하고 4시간 동안 수증기 증류하여 정유를 얻었다. 각 조건에서 배양한 callus는 10일 간격으로 10개씩 시험관에서 꺼내 wet weight을 측정후, 유발에 갈고 callus 중량의 약 2배 정도의 물과 혼합하여 round bottomed flask에 넣고 장치에 연결한 후 4시간 가열한 후 ether층을 취하여 정유병에 넣고 rotary evaporator를 사용하여 용매를 날려보낸 후 중량을 측정하였다. 이렇게 얻어진 정유를 0.01 ml씩을 취하여 ether로 희석하여 1% 용액으로 만들어 GC분석용 시료로 하였다. Hewlett-Packard 5890A GC-MS 장치에서 HP-1 capillary column(25 m×0.2 mm×0.53 m)을 사용하여 측정된 MS data의 분석으로 조성을 확인하였다. 한편 Hewlett Packard 5890 GC에서 분석하여 나타나는 각 성분 peak의 면적비율을 비교하여 배양조건에 따른 정유조성의 변화를 측정하였다.

배지—천궁 callus의 유도 및 배양에 사용한 배지는 B₅ medium¹²⁾의 조성을 기본으로 하고 여기에 3%의 sucrose와 0.1%의 casein을 첨가하여 제조하였다. 여기에 실험에 따라 일정비율의 식물생장 hormone 및 정유생합성 전구체를 첨가한 후, 0.1N-NaOH와 0.1N-HCl을 사용하여 pH를 5.5~5.6로 조절했고, 0.8%의 한천을 가하고 100°C에서 15분간 가열하여 용해시킨 후, 24×150 mm의 시험관에 10 ml씩 분주하여 121°C에서 15분간 가압 멸균후 사면으로 굳혀서 사용했다.

Callus 유도 및 배양—천궁근경에서 자라난 어린 싹을 0.2 mm의 길이로 자른 후, clean bench내에서 sodium hypochlorite(유효염소량 2%)액에 담그어 30 초 동안 소독한 후, 멸균 증류수로 4~5회 세척하여 재료로 사용하였다. 위의 재료를 2,4-dichloro phenoxy acetic acid(2,4-D)와 kinetin을 각각 1 ppm씩 첨가한 배지에 이식하고, 6~8주간 callus를 유도시킨 후, 약 4주간씩 2차 계대배양한 후 0.3~0.4 g의 크기로 잘라 배지에 이식하고 aluminium foil로 입구를 단단히 봉한 후 각 조건에서 배양하였다. 온도비교 실험이외의 다른 실험에서의 배양온도는 예비실험 결과 천궁 callus 생장이 가장 빠른 것으로 나타난 23°C로

하였다.

식물생장 hormone에 따른 callus생장 및 정유생성 비교실험—B₅ medium의 조성에 생장hormone을 (A) 2,4-D 1 ppm, kinetin 1 ppm, (B) 2,4-D 2 ppm, kinetin 0.2 ppm(C) NAA 1 ppm, kinetin 1ppm (D) NAA 2 ppm, kinetin 0.2 ppm를 각각 첨가한 배지를 조제하여, 각각의 배지에 같은 중량의 callus를 이식하여 23°C, 암소에서 배양하였다.

배양온도비교—NAA 1 ppm과 kinetin 1 ppm를 첨가한 B₅ medium에 callus를 이식한 후 각각 21°C, 23°C, 25°C, 27°C로 온도를 조절한 4개의 incubator에 각각 넣고 광선이 없는 상태에서 배양하여 비교하였다.

광조건—NAA 1 ppm, kinetin 1 ppm을 첨가한 medium에서 (1) 40일간 1000 Lux의 fluorescene light를 조사, (2) 30일간 암소에서 배양한 후, 10일간 1000 Lux의 fluorescene light를 조사, (3) 40일간 계속 암소에서 배양하여 비교하였는데 배양온도는 3가지 경우 모두 23°C로 조정하였다.

정유생합성의 precursor—23°C 암소에서 NAA와 kinetin을 각각 1 ppm씩 첨가한 medium에서 배양한 callus를 대조군으로 하고, 이 medium에 leucine을 1 g/l, 0.1 g/l씩 각각 첨가한 경우와 비교하였다.

실험결과 및 고찰

배양조건이 callus의 정유생성량에 미치는 영향—정유생성량은 40일 배양후 측정하였을 때, NAA 1 ppm과 kinetin 1 ppm을 첨가한 것이 2,4-D 1 ppm, kinetin 1 ppm이 첨가된 medium에서 이식한 callus보다 약 2배정도 많았고, 정유생성은 전반적으로 20일 이후 증가하였다(Fig. 1). 정유생성량을 callus의 무게로 나눈 정유생성율에 있어서는 40일 배양했을 때 2,4-D 1 ppm, kinetin 1 ppm을 함유한 것이 1.47%로 NAA 1 ppm과 kinetin 1 ppm을 첨가한 것보다 높았다.

온도조건을 21°C, 23°C, 25°C, 27°C로 각각 비교하였을 때, 정유생성량은 27°C에서 배양한 callus를 제외하고 모두 20일 이후에 현저히 상승하였고, 27°C의 경우에는 계속 낮은 정유생성량을 보이다가 30일 이후 감소하였다(Fig. 2). Callus 무게당 정유생성율은 전반적으로 10일 이후 감소하는 경향이 있으며 23

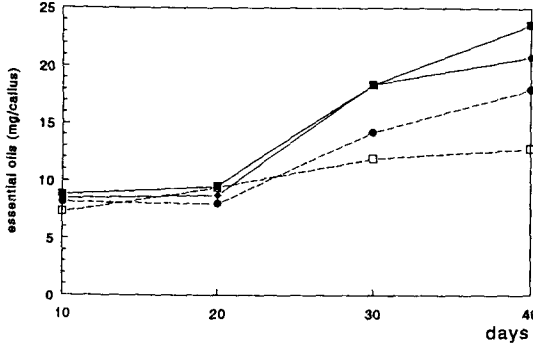


Fig. 1—Effects of plant growth regulators on production of essential oils in the callus induced from the shoots of *Cnidium officinale* cultivated on B₅ medium containing 1 ppm 2,4-D and 1 ppm kinetin(-□-), 2 ppm 2,4-D and 0.2 ppm kinetin(-●-), 1 ppm NAA and 1 ppm kinetin(-□-) and 2 ppm NAA and 0.2 ppm kinetin(-◆).

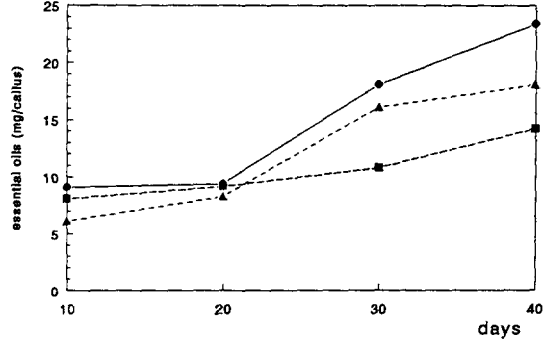


Fig. 3—Effects of illumination on production of essential oils in the callus cultivated in the dark for 40 days(-●-), in the light(fluorescens light, 1000 lux) for 10 days after culturing in the dark for 30 days(-▲-) and in the light for 40 days(-■-).

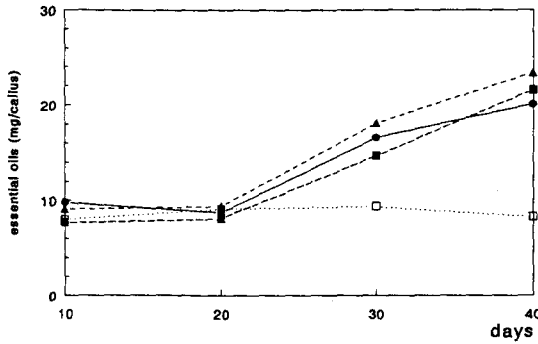


Fig. 2—Effects of temperature on production of essential oils in the callus cultured at 21°C (-▲-), 23°C (-●-), 25°C (-■-) and 27°C (-□-).

℃에서 배양한 callus는 30일까지는 높은 정유생성율을 보이다가 30일 이후 급격히 감소하였다. 전반적으로 가장 높은 정유생성량을 보인 조건은 23℃였으며 40일 배양시 정유생성율이 가장 높은 조건은 25℃로 1.33%였다.

광선이 정유의 생성량에 미치는 영향은 Fig. 3에서와 같이 암소에서 배양한 callus의 정유는 20일 이후 급격히 증가하였으나 fluorescens light를 조사한 callus의 정유량은 완만한 증가를 보이고 있으며 30일 암소배양한 후 fluorescens light를 조사한 callus의 경우는 30일 이후 정유생성량이 약간 증가하였다.

가장 높은 정유생성율을 보인 조건은 23℃에서 40일간 암소배양한 callus로 40일 배양시 정유함량은 1.25%였다.

정유 생합성 경로의 초기 단계 중간체로 알려진 leucine을 첨가하여 정유생성량을 증가시킬 수 있는가를 실험하여 보았으나, 정유생성량에서 볼 때 leucine을 1g/l 첨가한 것과 0.1g/l를 첨가한 것 모두 유사한 pattern을 보였지만 leucine의 첨가에 의한 정유생성량의 증가는 없었다.

정유의 조성비교—천궁의 지하부 및 NAA 1ppm과 kinetin 1ppm을 함유한 배지에서 배양한 callus에서 추출하여 얻은 정유의 gas chromatogram이 거의 같은 pattern을 나타내어 callus에 형성된 정유 조성의 유사성이 높음을 알 수 있었다. 그러나, 30일간 암소에서 배양한 후 10일간 광선을 조사한 callus의 정유는 pattern이 다르며, 40일간 광선은 계속 조사한 상태에서 배양한 callus의 정유와도 pattern이 다른 것으로 나타났다(Fig. 4).

천궁정유의 특유의 주성분 계열로 알려진 phthalide의 peak area를 비교했을 때, 천궁 모식물 근경의 정유의 GC에서는 cnidilide(H) 25.9%, ligustilide 22.6%(J), senkyunolide 10.2%(I), buthyl phthlide 6.9%(F), buthylidene phthalide(5.0%)의 비율로 나타났고 NAA 1ppm, kinetin 1ppm을 첨가하고 40일간 계속 암소에서 배양한 callus의 정유도 이와 유사한 편적

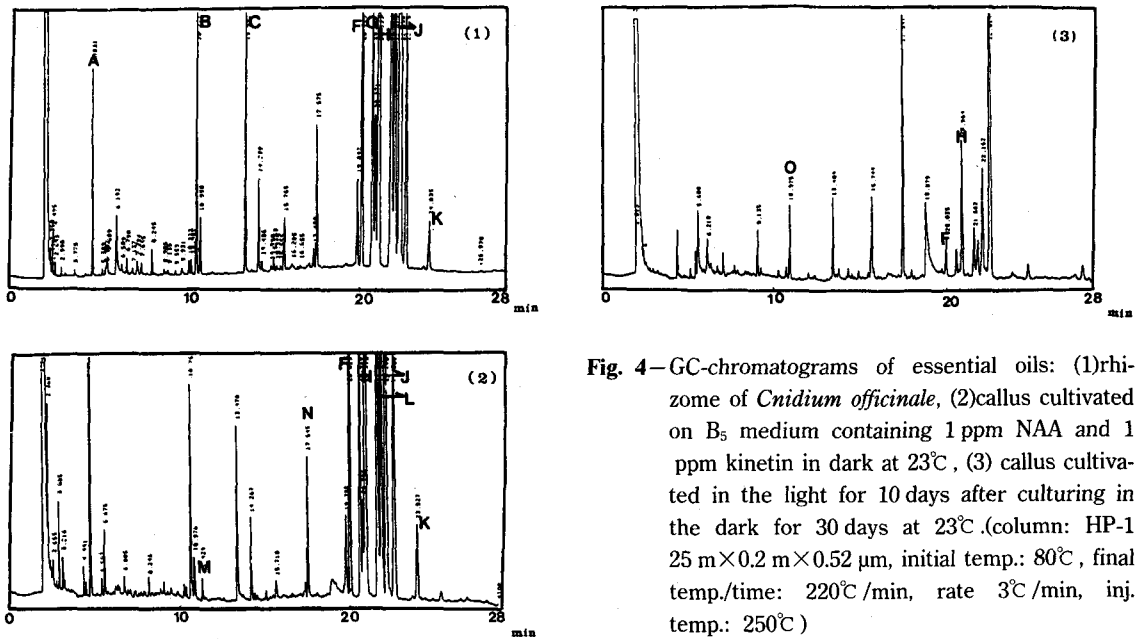


Fig. 4—GC-chromatograms of essential oils: (1)rhizome of *Cnidium officinale*, (2)callus cultivated on B₅ medium containing 1 ppm NAA and 1 ppm kinetin in dark at 23°C, (3) callus cultivated in the light for 10 days after culturing in the dark for 30 days at 23°C.(column: HP-1 25 m×0.2 m×0.52 μm, initial temp.: 80°C, final temp./time: 220°C/min, rate 3°C/min, inj. temp.: 250°C)

비를 나타내었다. 그러나 30일간 암소에서 배양한 후 10일간 광선조사하에서 배양한 callus의 정유는 cnidilide 7.6%, ligustilide 7.2%, senkyunolide 3.1%의 비율을 나타내어 앞의 경우에 비해 현저히 낮은 phthalide 생성을 나타내었다(Fig. 4).

천궁 모식물의 뿌리 및 각 배양조건에서 배양한 ca-

llus로부터 추출한 정유를 GC-MS로 분석하여 측정된 Mass의 fragmentation의 해석을 위하여 Yamagish 등이 발표한 천궁의 phthalide성분에 대한 논문을 참조하였으며, 그의 Mass-Databank(PBM Search of Library file)의 standard spectrum과의 비교 결과 및 그의 이미 발표된 문헌상의 spectrum과 대조하였다.¹³⁾

Table I—Compounds in essential oils identified by GC-MS

Peak	Compounds	M ⁺	Distinctive ions(m/e)	Identified sample
A	styrene	104	51,77,89	root
B	terpinen-4-ol	154	71,93,111	root
C	4-vinylguaiacol	150	51,77,107	root
D	ethyl phthalide	162	51,77,105	root
E	2,6-bis[1,1-dimethylethyl]-4-methylphenol	205	145,177,189	root, callus
F	butyl phthlide	190	51,77,133	root, callus
G	butylidenphthalide	188	77,103,159	root, callus
H	cnidilide	194	77,79,93	root, callus
I	senkyunolide	192	77,105,107	root, callus
J	ligustilide	190	77,105,148	root, callus
K	3-methyl-3-cyclohexen-1-ol	112	57,97,123	root, callus
L	3-methylphenol	108	53,65,79	root, callus
M	grandisol	180	57,68,97	callus
N	2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol	164	57,103,131	callus
O	cycloheptane	124	57,88,97	callus
P	tricosane	155	57,85,127	callus

그 결과 Table I에 정리해 놓은 바와 같이 천궁근경의 정유에서는 styrene, terpinen-4-ol, 4-vinylguaiacol, butyl phthalide, butylidene phthalide, cnidilide, senkyunolide, ligustilide 등의 성분이 확인되었으며, 이들 성분중 butyl phthalide, butylidene phthalide, cnidilide, senkyunolide, ligustilide 등은 callus의 정유에서도 확인되었다. 그외 callus로부터 획득한 정유에서는 grandisol, tricosane, 3-methylphenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol, cycloheptane 등이 확인 되었다.

결 론

(1) 천궁의 조직배양에 있어서 식물생장호르몬의 조성에 따라 정유생성량에 있어서 2배 이상의 차를 나타냈으며, leucine의 첨가에 의한 정유생성율의 증가는 보이지 않았다.

(2) 천궁으로부터 유도된 callus의 정유를 GC-MS로 분석한 결과, butylphthalide, cnidilide, senkyunolide, butylidene phthalide, ligustilide, grandisol, tricosane, 3-methylphenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol, 3-methyl-3-cyclohexene-1-ol 등이 확인 되었다.

(3) 천궁 callus에 생성된 정유의 조성은 천궁모식물의 정유와 유사하였고, 광선 조사에 의해 천궁 callus의 phthalide 생성량은 감소하였다.

문 헌

- 1) 이창복: 한국식물도감, 향문사, p.583 (1980).
- 2) Hatano, K., Nishiika, I. and Iwasa, S.: On the sterility of *Cnidium officinale* Makino, *Shoyakugaku Zasshi* **24**, 81 (1970).
- 3) Namba, T. Sekiya, K., Kakota, S., Hattori, M., Katayama, K. and Koizumi, T.: The effects of senkyu

extracts as skin penetration enhancer, *Yakugaku Zasshi* **112**, 638 (1992).

- 4) Yamagishi, T. and Kaneshima H.: Structure of senkyunolide and GC-MS spectrometry of the related phthalide, *Yakugaku Zasshi* **97**, 237 (1977).
- 5) Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C. and Svendsen, A. B.: Occurrence and prevention of isomerization of ligustilide during Gas Liquid Chromatography on packed column, *Chromatographia* **14**, 452 (1981).
- 6) Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C. and Svendsen, A. B.: Analysis of phthalides from umbelliferae by combined gas-liquid chromatography, *Chromatographia* **15**, 358 (1982).
- 7) Bohrmann, H., Stahl, E. and Mitsuhashi, H.: Chromatographic studies on the constituents of *Cnidium officinale* Makino, *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1606 (1967).
- 8) Lee, S. Y., Kim, M. J., Yim, D. S., Chi, H. J. and Kim, H. S.: Phthalide content of *Cnidium rhizome*, *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 69 (1990).
- 9) Shimomura, K. Teshima, D. and Shoyama, Y.: Studies on the breeding of *Cnidium officinale* Makino. I. The production of plants regenerated from shoot tips(1), *Shoyakugaku Zasshi*, **34**, 306 (1980).
- 10) Staba, E. J.: Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals, Boca Raton, Florida CRC Press, p.67 (1980).
- 11) Nabeta, K. and Sugisawa, A.: Volatile components produced by callus tissues from three *Perilla* plants, *Instrumental Analysis of Foods*, **1**, 65 (1983).
- 12) Gamborg, O. L. and Wetter, L. R.: Plant Tissue Culture Methods, National Research Council of Canada, pp.4-5 (1975).
- 13) McLafferty, F. W. and Stauffer, D. B.: NBS Registry of Mass Spectral Data (1988).