

## 황금의 세포배양에 의한 Baicalin 생산 연구

신승원 · 이현경  
덕성여자대학교 약학대학

### Production of Baicalin by Cell Culture of *Scutellaria baicalensis*

Seung-Won Shin and Hyun Kyung Lee  
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract**—Callus was derived from the leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi. The productions of baicalin in the cultivated callus under various conditions, especially, the effects of the light sources and temperature were studied. In this experiment, the callus cultivated at 25°C showed higher production of baicalin than the callus cultivated at 21°C and 23°C. The illumination of light (fluorescence and UV) accelerated generally the growth of callus and the production of baicalin during the cultivation for three weeks. But, the illumination of light more than three weeks reduced the rate of production of baicalin in the callus.

**Keywords**—*Scutellaria baicalensis* · Labiatae · cell culture · baicalin · flavonoid · light source · temperature

황금은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본인 속썩은풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리의 주피를 벗긴 것으로 소염, 해열, 이뇨, 항균, 진정 등의 목적으로 사용되는 생약이다.<sup>1,2)</sup>

황금의 주된 약효성분으로 알려져 있는 flavonoid계 성분으로는 baicalin, baicalein, wogonin, wogonin glucuronide, oroxylin A, skullcapflavone II, chrysin, norwogonin, tenaxin I, II, scutebulin, viscidulin I, II, III, dihydrooroxylin A 등이 있고, 또한, 황금식물의 잎으로부터는 chrysin, wogonin, apigenin, scutellarin, salvigenin, isoscutellarein, isocarhamidin, carthamidin 등이 분리, 보고되었다.<sup>3-13)</sup>

식물세포의 flavonoid합성은 타 계열의 화합물보다 온도 및 광선조건에 따라 현격히 변화하며, 특히 광원의 종류나 강도에 영향을 크게 받는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, Hahlbrock<sup>14,15)</sup>

등은 *Petroselinum hortense*의 현탁 배양에서 광선 조건하에서 24가지의 flavone배당체와 flavonol을 생성시켰는데 특히, glucoside의 생성은 광에 의존적이라는 사실을 발견했으며, Wellmann<sup>16)</sup>은 320 nm (UV) 이하 파장의 조사가 flavone 합성의 촉진에 매우 효과적이며, 가시 광선만을 조사할 경우에는 별로 합성이 되지 않는다는 사실을 보고하였다.

황금의 조직 배양에 관한 연구로 Tomimori<sup>17,18)</sup> 등은 식물 성장 hormone과 carbon source가 황금 callus의 flavonoid 생성에 미치는 영향에 대해 보고한 바 있으나, 본 연구에서는 식물 세포 배양법에 의한 황금의 flavonoid생산에 있어서 보다 효율적인 조건을 추구할 목적으로 식물 세포내 flavonoid 생성이 다른 이차대사산물에 비해 특히 광선 및 온도의 영향을 많이 받는다는 사실에 근거하여 광선과 배양온도 조건에 따른 callus의 성장 및 baicalin 생성에 미치는

영향을 알아보기 위하여 황금종자의 어린싹으로부터 callus를 유도하여 각 조건에서 배양하고, 배양한 callus에 생성된 baicalin을 HPLC로 분석, 정량, 비교하여 이에 보고하는 바이다.

### 실험방법

**배지** - Linsmaier-Skoog's medium<sup>19,20)</sup> (LS medium)의 조성중 major 및 minor element를 용해시킨 후, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1ppm과 kinetin 1 ppm을 가하고, 3% sucrose를 첨가한 후에 0.1 N-NaOH 또는 0.1 N HCl로 pH를 5.70-5.85로 조절하였다. 여기에 0.8% agar를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하여 agar를 용해시킨 후, 24×150 mm의 test tube에 10 ml씩 분주하고, 이를 121°C에서 15분간 가압 멸균하여 사면으로 굳혀서 사용하였다.

**Callus 유도 및 배양** - 황금의 씨를 25-26°C의 incubator에서 5-7일 발아시킨 싹과, 4월 하순에 씨를 모판에 심어서 키운 황금의 어린싹을 절단한 후, clean bench내에서 멸균 증류수로 세척하여 70% ethanol로 2, 3초간 진탕하고, sodium hypochlorite(유효 염소량 1%)액에서 20초 동안 3회 진탕, 세척하여 멸균처리한 후, 멸균 증류수로 5회 세척하였다. 위의 재료를 clean bench내에서 배지에 이식하고 23°C, 암소에서 callus를 유도하였다. 유도된 callus를 평균 300 mg 정도의 크기로 절단하여 tube당 1개씩 이식하여 21°C, 23°C, 25°C의 각 온도조건의 배양(암소, 40일간)결과를 비교하고, 광선에 의한 영향을 측정할 실험에서는 온도조건을 23°C로 고정시키고 1) 암소에서 40일간 배양한 결과와, 2) 형광등(1000 Lux)을 조사하여 40일간 배양한 것, 3) UV 등(700 Lux)을 조사하여 40일간 배양한 것, 4) 암소에서 30일 배양한 후 이어서 광선(1000 Lux) 조사하여 10일간 배양한 것과의 결과를 비교하였다.

**Callus의 성장 속도 측정** - 배양중인 callus를 10일 간격으로 10개씩 배양 tube에서 꺼내어 중량을 측정한 후, 50% ethanol 10 ml로 30분간 수욕상에서 2회 환류 추출하여 여과한 후, EtOH 10 ml로 30분 간격으로 2회 환류 추출 여과하

고, 증발 농축하여 용매를 날려보낸 후, 잔류물의 중량을 측정하여 ethanol Ex의 양으로 하였다. 한편, 모식물 황금의 근경도 위와 같은 방법으로 처리하였다.

**Baicalin 확인 및 정량** - Callus의 EtOH extract와 baicalin 표준품의 MeOH 용액을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>COOH (100:8:0.8:0.4)로 전개시켜 장파장의 UV lamp하의 형광빛 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 의한 발색으로 Rf = 0.61에서, baicalin의 spot를 확인하였다.

Baicalin 정량에 사용한 HPLC model은 solvent delivery system 501(Waters)이었고, Column은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column (Waters, ID 3.9 mm×30 cm)을 사용하였고, mobile phase는 0.5% phosphoric acid:acetonitrile (73:27, v/v), flow rate, 1 ml/min로 하여 280 nm에서 측정하였다.

Baicalin 표준품(Wako, HPLC용, 99.0% 이상)으로 baicalin-ethanol용액의 각 농도에 따른 peak area를 측정하여 검량선을 작성하였다. 이 검량선의 회귀방정식은  $y = 0.4617x - 0.4598$ 이며 직선성을 검정한 결과 상관 계수가  $r = 0.999770$ 으로 1.0에 접근하여 baicalin량과 peak area간에 직선성이 인정되었다.

### 실험결과 및 고찰

**Callus 성장** - 25°C에서 배양한 callus는 배양 40일 후에 측정했을 때, callus중량이 1.61 g으로 21°C에서 배양한 경우의 약 2배, 23°C에서 배양한 경우의 약 1.2배나 되어, 실험한 세가지 온도 조건중 가장 높은 callus의 성장률을 나타내었다 (Fig. 1).

전반적으로 광선의 조사하에서 배양한 callus가 성장률이 높은 것으로 나타났는데, 배양 40일 후 측정된 결과에서 보면 암소에서 배양한 경우에 비해 1.3배의 성장률을 나타내어 광선은 황금 callus의 성장을 촉진한다는 사실을 알 수 있었다. 광선을 조사한 경우에는 암소에 배양한 것과 유사한 성장곡선을 보였으며, 40일 배양 후 UV를 조사하여 배양한 경우와 중량에 있어서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

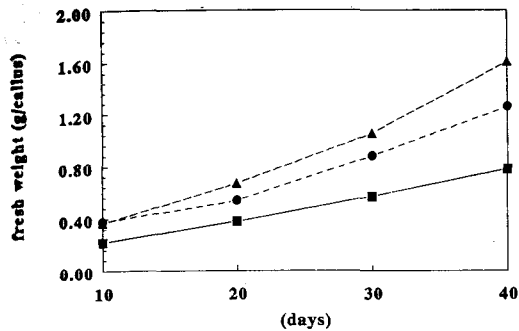


Fig. 1. The effects of culturing temperature on growth of callus from *S. baicalensis* in the dark. (■: callus cultivated at 21°C, ●: at 23°C, ▲: at 25°C)

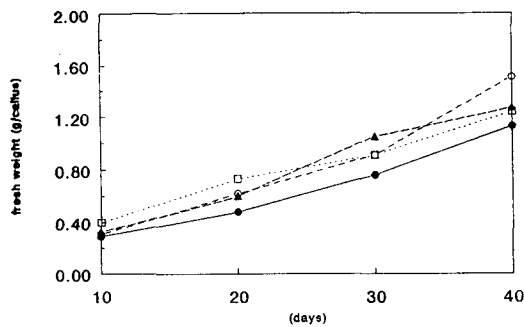


Fig. 2. The effects of illumination on growth of callus from *S. baicalensis* (●: callus cultivated for 40 days in the dark, ○: callus cultivated for 40 days under the flourescence light, ▲: callus cultivated for 30 days under the flourescence light and for 10 days in the dark, □: callus cultivated for 40 days under the UV-light)

Baicalin 생성 - 유도된 callus를 40일 배양한 후 baicalin 생성량을 측정 한 결과는 Table I 과 같다. 전반적으로 배양 기일에 따라 증가하는 경향을 나타내었는데, 40일 배양한 후의 callus 1개당 생성량을 비교해 볼때, 25°C에서 10.62 g으로 21°C에서 배양한 경우의 5.7배이며, 23°C에서 배양한 경우의 1.5배였다.

Baicalin 생성량을 callus 중량에 대한 백분율로 환산하여 비교한 결과는 보면, 40일 배양후 25°C에서 0.0154%로 21°C에서 배양한 경우의

Table I. The effects of culturing temperature on production of baicalin in callus

Temperature (°C)	baicalin (ug/callus)			
	10	20	30	40 days
21	0.66	0.45	0.42	1.87
23	0.76	0.48	0.45	7.09
25	0.47	0.38	1.63	10.62

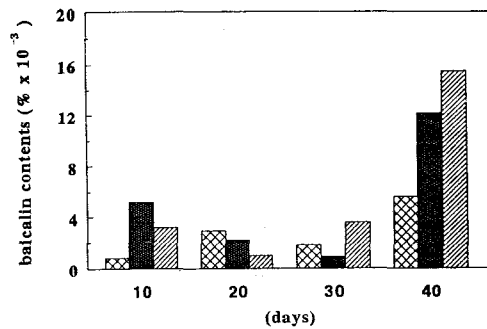


Fig. 3. Production of baicalin in the cultivated callus according to the variation of culturing temperature conditions. (⊗: callus cultivated at 21°C, ■: at 23°C, ▨: at 25°C)

2.7배, 23°C에서 배양한 경우의 1.3배로 나타났 다(Fig. 3).

광선 조사의 조건에 따라 각기 다른 baicalin 생성 증가의 pattern을 나타내었는데, 형광등을 조사하여 배양한 경우에는 20일까지는 증가하다가 20일 이후 차츰 감소하였다. UV 등 조사하에서는 20일 후에 감소했다가 그후 다시 증가하는 경향을 보였다.

배양 40일 후의 결과를 비교해 보면, 형광등 조사하에 배양한 것과 암소에서 배양한 것은 각각 1.32 g, 1.05 g/callus로 유사한 결과를 나타 내었고, 이 생성량은 30일간 암소 배양후 10일 간만 광선 조사한 것 또는, UV조사하에 배양한 callus에 비해 약 30% 정도에 해당된다. 암소에서 배양한 것은 광선 조사한 타조건에 비해 전반 적으로 baicalin 생성량이 적었으며, 암소에서 30 일간 배양한 후 다시 계속하여 광선 조사하에서 10일간 배양한 경우는 40일 경과 후 30일에 비

**Table II.** The effects of illumination on production of baicalin in callus

Condition	baicalin ( $\mu\text{g}/\text{callus}$ )			
	10	20	30	40 days
Dark(40 days)	1.01	0.61	0.84	1.32
Fluorescence (40 days)	0.92	2.14	1.54	1.05
Dark/fluorescence (30/10days)	0.75	3.86	0.83	4.33
UV(40 days)	1.10	0.68	2.64	4.06

해 5배이상의 높은 생성량을 보였다(Table II).

Callus중량에 백분율로 환산하여 비교하여 보면, 형광을 40일간 계속하여 조사하여 배양한 경우의 baicalin 생성비율이, 암소에서 30일 배양한 후 이어서 10일간 광선 조사한 경우나, UV를 조사하여 40일간 배양한 경우의 20%에 불과하고, 암소에서 배양한 경우는 30% 정도에 머무른 것으로 나타났다(Fig. 4)

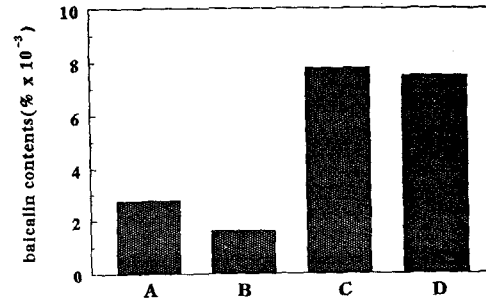
이상의 결과로 미루어 형광이나 UV는 baicalin의 생성을 촉진하나, 오랜 기간의 형광 조사는 baicalin의 생성을 감소시키므로, 높은 baicalin 생성에는 단기간의 형광 조사가 유리함을 알 수 있었다.

## 결 론

1. 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 조직 배양에 있어서 일정기간 동안의 형광조사는 세포의 증식속도 및 baicalin 생성량을 증가시켰고, 장기간의 조사는 오히려 억제시켰다. 반면 40일간의 UV 조사는 baicalin 생성을 증가시켰고, 배양 시간에 따른 baicalin 생성량 증가이 pattern은 형광조사의 경우나 암소에서 배양했을 때와 다른 것으로 나타났다.

2. Baicalin 생성량은 25°C에서 배양한 경우 21°C에서 보다 5.7배, 23°C에서의 경우 보다 1.5배로 온도에 따라 현격한 차이를 나타내어, 온도 조건은 황금세포의 baicalin 합성에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

(1995년 5월 19일 접수)



**Fig. 4.** Production of baicalin in the callus according to the variation of the light sources A: callus cultivated for 40 days in the dark, B: callus cultivated for 40 days under the fluorescence light, C: callus cultivated for 30 days under the fluorescence light and for 10 days in the dark, D: callus cultivated for 40 days under the UV-light

## 참고문헌

1. 이 창복: 한국식물도감, 향문사, p. 647 (1980).
2. Yu, L.J. et. al.: Chinese Herbal Medicine, Materia Medica, Eastland Press, p. 107 (1992).
3. Yun-Choi, H.S.: Flavonoid components in plants of genus *Scutellaria*, *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 201 (1992).
4. Takagi, S., Yamaki, M. and Inoue, K.: Studies on the water-soluble constituents of the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Yakugaku Zasshi* **100**, 1220 (1980).
5. Takagi, S., Yamaki, M., Inoue, K.: On the minor constituents of the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Yakugaku Zasshi* **101**, 899 (1981).
6. Tomimori, T., Miyaichi, Y. and Kizu, H.: On the flavonoid constituents from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. I, *Yakugaku Zasshi* **102**, 388 (1982).
7. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H. and Tanabe, Y.: Studies on the constituents of *Scutellaria* species II. On the constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi(2), *Yakugaku Zasshi* **103**, 607 (1983).
8. Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H. and Suzuki, C.: Studies on the constituents of *Scutellaria* species IV. On the constituents of

- the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi(4), *Yakugaku Zasshi* **104**, 529 (1984)
9. Tomimori, T., Jin, H., Miyaichi, Y., Toyofoku, S. and Namba, T.: Studies on the constituents of *Scutellaria* species. VI. On the constituents of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi (5), Quantitative analysis of flavonoids *scutellaria* roots by high-performance liquid chromatography, *Yakugaku Zasshi* **105**, 148 (1985).
  10. Takido, M., Aimi, M., Yamanouchi, S., Yasukawa, K., Tori, H. and Takahashi, S.: Studies on the constituents in the water extracts of crude drugs. II. On the leaves of *Scutellaria baicalensis*, *Yakugaku Zasshi* **96**, 381 (1976).
  11. Myaichi, Y., Imoto, Y., Saida, H. and Tomimori, T.: Studies on the constituents of *Scutellaria* species (X). On the flavonoid constituents of the leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 216 (1988)
  12. Sagara, K. Ito, Y. Oshima, T. Murayama, H. and Itokawa, H.: Determination of flavonoids of *Scutellariae Radix* in pharmaceutical preparations by ion-pair high-performance liquid chromatography, *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 84 (1986)
  13. Hwang, Y.S. Won, D.H., Yoon, T.B. Jo, J.H., Kang, S.J. and No, H.W.: Studies on quality control method of crude drug preparations (III), Studies on the analysis of preparations, Report of NIH Korea, **22**, 375 (1985).
  14. Hahlbrock, K. and Wellmann, E.: Light-induced flavone biosynthesis and activity of phenylalanine-ammonia-lyase and UDP-apiose synthetase in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*, *Planta* **94**, 236-239 (1970).
  15. Kreuzaler, F. and Hahlbrock, K.: Flavonoid glycosides from illuminated cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Phytochemistry* **12**, 1149-1153 (1973).
  16. Wellmann, E., and Schopfer, P.: Phytochrome-mediated de novo synthesis of phenylalanine-ammonia-lyase in cell suspension cultures of parsley, *Plant Physiol.*, **55**, 822-827 (1975).
  17. Yamamoto, H., Chatani, N., Kitayama, A. and Tomimori, T.: Flavonoid production in *Scutellaria baicalensis* callus cultures, *Plant Cell Tissue Organ Culture* **5**, 219 (1986).
  18. Yamamoto, H., Chatani, N., Watanabe, K. and Tomimori, T.: Effects of 5% maltose and plant growth regulators on the callus growth and flavonoid formation of some *Scutellaria baicalensis* stem callus lines, *Shoyakugaku Zasshi* **40**, 33 (1986).
  19. 김규원, 백기엽, 정근식, 정재동, 최광태: 식물 조직배양 기술, 향문사, p. 353 (1990).
  20. George, E.F., Puttock, D.J.M. and George, H.J.: *Plant Culture Media*, Eastern Press, p. 254 (1987).