

식물세포배양에 의한 *Corydalis Alkaloid*의 생산(I)

장정인 · 신승원 · 지형준*

덕성여자대학교 약학대학, 서울대학교 천연물과학연구소*

Production of *Corydalis Alkaloids* by Plant Cell Culture(I)

Jung-In Chang, Seung-Won Shin, Hyung-Joon Chi*

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

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-461, Korea

Abstract—*Corydalis remota* Fish. ex Max. (Papaveraceae) is a well known medicinal plant being used as anagesics or anticonvulsive in oriental medicine. As the alkaloid content is known to vary depending on the environmental factors, the technology of plant tissue culture can be adopted as a source of *Corydalis*-alkaloids. The present study describes an establishment of tissue cultures of *Corydalis* which produce alkaloids consistently.

Callus were induced from immature seeds of *Corydalis remota* by placing the seeds on MS static media containing NAA(0.25, 1.0 and 4.0 mg/l, respectively). The combined treatment of NAA(1.0 mg/l) with cytokinin(BAP 0.5 mg/l) improved the induction of callus. TLC scanning data followed by sequential extraction and purification revealed that the induced callus contains a significant amount of alkaloids. Cell suspension cultures were established by transferring the induced callus into the liquid media with the same condition of plant growth regulators as the callus culture.

Keywords—*Corydalis remota* · Papaveraceae · Aissue and cell culture · *Corydalis* alkaloid.

현호색속은 양귀비과(Papaveraceae)의 피불주머니아과(Fumarioideae)에 속하는 식물군으로 별개의 피불주머니과(Fumariaceae)로 취급하기도 한다¹⁻²⁾. 현호색(*Corydalis remota* Fish. ex Max.)³⁾은 우리나라 산야에 자생하는 다년생 초본으로 그 괴경을 현호색(玄胡索) 또는 연호색(延胡索)이라하여 진통, 진경제로 사용되어 왔고 현재도 안중산(安中散) 등의 생약제제에 널리 배합되고 있으며⁴⁾, 동의보감에서는 북방으로 70여 처방에 배오될 뿐만 아니라 단방으로도 쓰이는 중요한 한약재의 하나이다^{5,6)}.

현호색속 식물의 알칼로이드는 glaucine이 진

해제로서 제제화의 단계까지 진행되어 있는 것을 비롯하여^{7,8)}, tetrahydropalmatine(THP)은 진통 작용이 morphine보다 약하나 연속 사용에 있어서도 내성을 나타내지 않는 장점이 있어 중국에서는 이미 의약품으로 개발되어 사용되고 있다⁹⁾. Berberine을 비롯한 4급 알칼로이드에서는 항균 작용 외에 쥐의 장관과 자궁에 대한 강한 papaverine과 같은 작용이 보고되고 있다¹⁰⁾. 그 외 조직배양에 의한 노란색 색소 개발에 관한 특허도 등록되어 있다¹¹⁾.

이 논문에서는 한국에 자생하고 있는 현호색 식물의 미숙종자로부터 캘러스를 유도하고, 유도

된 켈러스를 적정배지에서 배양하여 켈러스에 생성, 축적된 알칼로이드 성분을 확인하고 세포현탁배양에 적합한 켈러스를 선정하고 세포선발을 거듭하여 *Corydalis alkaloid* 고생산 세포주를 확립하였으므로 이에 보고하는 바이다.

실험방법

실험재료 - 이 실험에 사용한 현호색 (*Corydalis remota* Fish. ex Max.) 식물은 경기도 광릉에서 1991년 4월에 채집하였고 그 표본은 서울대학교 천연물과학연구소에 보관하였다.

배지 - 배지조제는 기본영양소를 2차 증류수에 용해하여 사용하였으며, 모든 배지들은 pH를 5.8로 조정 후 121°C에서 15분간 가압멸균하였다.

배양 - 켈러스 유도를 위하여 현호색 식물의 잎, 줄기 및 미숙종자를 이용하였다. 잎, 줄기 및 미숙종자를 흐르는 물로 씻어 1%의 유효염소량을 함유한 sodium hypochlorite 용액에 5분동안 처리하여 살균시켰다. 재료를 멸균증류수로 5번 이상 씻은 후 식물생장조절제중 auxin류인 IAA(indole-3-acetic acid), IBA(indole-3-butyric acid), 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 및 NAA(α -naphthalenacetic acid) 등 4종류에 대하여 각각 0.25, 1.0 및 4.0 mg/l를 첨가시킨 MS 기본배지에 접종하고 26±1°C에서 암상태로 배양하였다.

유도된 켈러스의 성장과 기관분화에 대한 NAA와 cytokinin류의 조합 및 농도의 영향을 알아보기 위하여 NAA 0.25, 1.0 및 4.0 mg/l가 각각 첨가된 MS 기본배지에서 유도된 켈러스를 NAA 0.25, 1.0 및 4.0 mg/l 각각의 농도에 cytokinin류 중 kinetin과 BAP를 각각 0.1, 0.5 및 1.0 mg/l를 첨가시킨 MS 기본배지에 접종하여 26±1°C에서 암상태로 배양하였다.

현탁배양은 액체배지 80 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 각각 5반복씩 현호색의 미숙종자에서 유도한 켈러스를 현탁시켜 26±1°C에서 암상태로 100±10rpm로 회전 진탕배양하였다.

알칼로이드의 확인 및 정량 - 알칼로이드 분

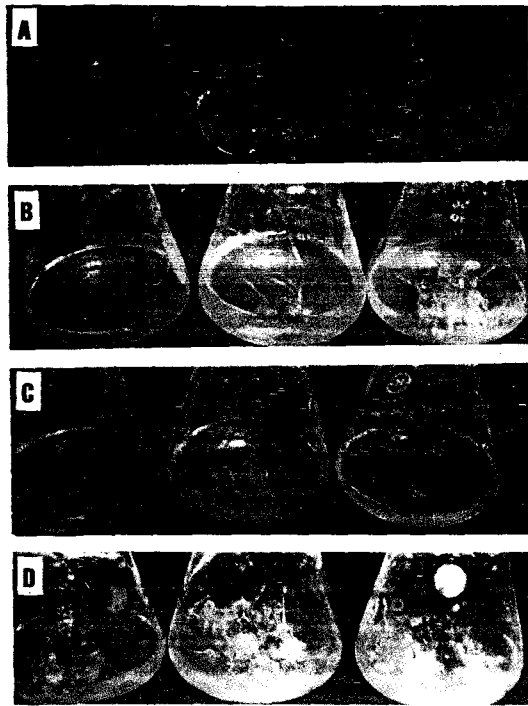
획을 TLC plate 상에서 cyclohexane:ethylether:methanol = 6:10:1(v/v), cyclohexane:diethylamine = 8:2(v/v) 및 toluene:ethanol:NH₄OH = 40:4:1.5(v/v)를 이동상으로 하여 전개시킨 후 Dragendorff시약을 분무하고 발색시켜 표준물질의 Rf값과 비교 확인하였다¹²⁻¹⁵.

총알칼로이드 정량에 사용한 TLC scanner 모델은 Camag TLC Scanner II이고 배양한 현호색 세포로부터 TLC scanner에 적용할 총 알칼로이드분획을 얻기 위하여 배양세포 분말 0.25 g에 NaCl 1.5 g, 7.5% NH₄OH 4 ml 및 Et₂O 5 ml를 가하여 잘 혼든 후 약 1시간 동안 방치하고 다시 1시간 동안 진탕하고 2000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 Et₂O층을 취하였다. 다시 수층에 Et₂O 5 ml를 가하여 동일 조작을 2회 반복한 다음 Et₂O 층을 모아 농축하여 시료로 사용하였다¹⁶. TLC의 전개제로는 cyclohexane:ethyl-ether:methanol = 6:10:1(v/v)를 사용하였고 Dragendorff 시약을 분무한 후 510 nm에서 scanning하였다¹⁷⁻²¹.

실험결과 및 고찰

식물생장조절제가 켈러스 유도 및 성장에 미치는 영향 - 켈러스 유도정도는 auxin류 중에서 NAA가 가장 효과적으로 0.25와 1.0 mg/l의 농도에서는 7.5%, 4.0 mg/l에서는 10%의 유도율을 나타내었으며(Fig. 1, Table 1), 2,4-D와 IAA는 비슷한 경향을 보였으나, IBA의 경우는 0.25 mg/l의 농도에서는 전혀 유도되지 않았고 1.0 mg/l, 4.0 mg/l의 경우는 5%의 유도율을 나타내었다.

유도된 켈러스의 성장과 기관분화에 대한 NAA와 cytokinin류의 조합 및 농도의 영향을 관찰한 결과 N1B-5(NAA 0.25 mg/l, BAP 0.5 mg/l), N2K-6(NAA 1.0 mg/l, kinetin 1.0 mg/l), N2B-5(NAA 1.0 mg/l, BAP 0.5 mg/l), N3B-4(NAA 4.0 mg/l, BAP 0.1 mg/l) 등의 배지에서 켈러스 뿐만 아니라 microtuber 모양의 조직도 형성됨을 관찰할 수 있었고, 켈러스 성장에 있어서도 이들 배지에서 양호한 결과를 나타내었으며, 일반적으로 켈러스 성장면에있어서는 NAA



A: Callus cultured in media containing 0.25, 1.0 and 4.0 mg/l of IAA
 B: Callus cultured in media containing 0.25, 1.0 and 4.0 mg/l of IBA
 C: Callus cultured in media containing 0.25, 1.0 and 4.0 mg/l of 2,4-D
 D: Callus cultured in media containing 0.25, 1.0 and 4.0 mg/l of NAA

Fig. 1. Effects of auxins on the induction of callus

와 kinetin의 조합보다는 NAA와 BAP와의 조합이 더 좋은 생장을 나타내었다(Fig. 2, Table II).

배양 캘러스에 생성된 알칼로이드의 확인 및 정량 - TLC scanning에 의해 캘러스와 microtuber모양의 조직에 생성 축적된 알칼로이드 함량을 비교 분석한 결과 N2B-5의 배지에서 자란 microtuber모양의 조직이 가장 높은 알칼로이드 생성물을 나타내었으며, N1B-5배지를 제외한 모든 경우에서 캘러스보다는 microtuber모양의 조직에서 알칼로이드 생성이 높게 나타났다.(Fig. 3).

유도된 캘러스의 증식 - 세포현탁배양에 적합한 세포주를 선정하기 위하여 식물생장조절제로 NAA 1.0 mg/l와 kinetin 1.0 mg/l(N2K-6 배양주), NAA 1.0 mg/l와 BAP 0.5 mg/l(N2B-5 배양주)가 함유된 MS배지에서 계대배양중인 캘러스 증생장이 좋고 부서지기 쉬운 형태를 갖춘 캘러스를 생중량으로 1 g을 정확히 취하여 동일한 배지에 접종시키고 5일 간격으로 생중량을 측정하여 40일 동안의 증식정도를 알아보았다. 이 실험 결과 NAA 1.0 mg/l와 kinetin 1.0 mg/l가 함유된 배지에서는 25일 정도에서 세포의 갈변화가 시작되며 35일까지 증식하다가 급격히 쇠퇴하는 경향을 보였으며, 반면에 NAA 1.0 mg/l와 BAP 0.5 mg/l가 함유된 배지에서는 30~40일 정도 까지도 증식이 되는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

Table I. Effects of auxins on induction and growth of callus

PGR	conc.(mg/l)	no. of plating	callus induced	induction ratio(%)	callus growth rate
IAA	0.25	40	2	5	+
	1.00	40	4	10	++
	4.00	40	3	7.5	++
IBA	0.25	40	0	0	-
	1.00	40	2	5	+
	4.00	40	2	5	+
2,4-D	0.25	40	3	7.5	+
	1.00	40	2	5	++
	4.00	40	2	5	+
NAA	0.25	40	3	7.5	++
	1.00	40	3	7.5	+++
	4.00	40	4	10	++

+: good, ++: very good, +++: excellent

PGR: Plant Growth Regulator

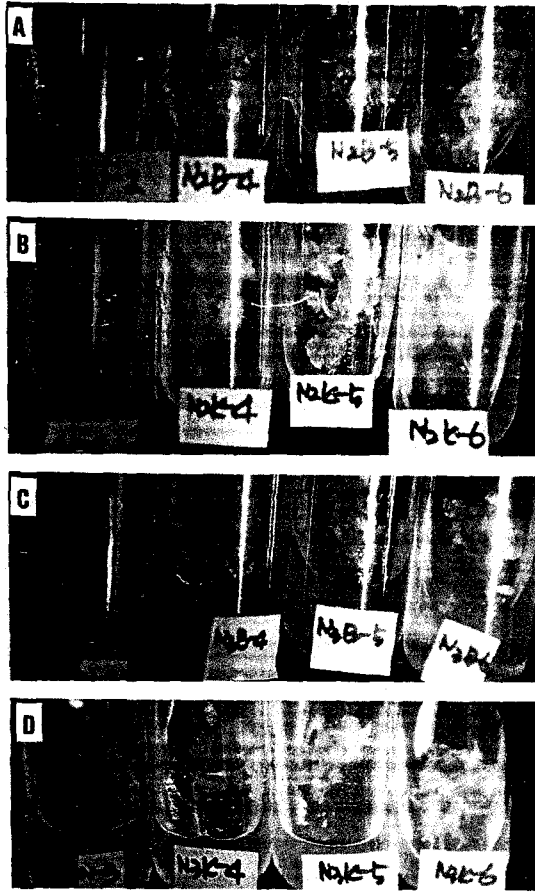


Fig. 2. Effects of combination of NAA with kinetin and BAP

세포현탁배양 - 현탁배양에 적합한 세포주로서 N2K-6 배양주와 N2B-5 배양주를 선정하여 동일조성의 식물생장조절제가 첨가되고 한천만을 제외시킨 액체배지 80 mg/l에서 배양을 실시하였다. N2B-5 배양주는 초기에는 일부 집괴에서 재분화되는 경향을 보였으나 계대를 거듭함에 따라 재분화 없이 2~3 mm 이하의 집괴 크기를 갖는 안정된 배양세포주 A를 얻었다. 한편, N2K-6 배양주로부터 현탁배양한 배양세포주 B는, A세포주와는 달리 미세한 가루모양의 집괴형태를 보였다(Fig. 5). 생장률은 B세포주가 정치배양에서와 현탁배양에서 모두 높은 생장율을 보였다(Fig. 6).

알칼로이드 고생산 세포주의 확립 - 생장률 비교에서는 B세포주가 A세포주보다 좋은 결과를 나타냈으나(Fig. 6), 알칼로이드 생산에 있어서는

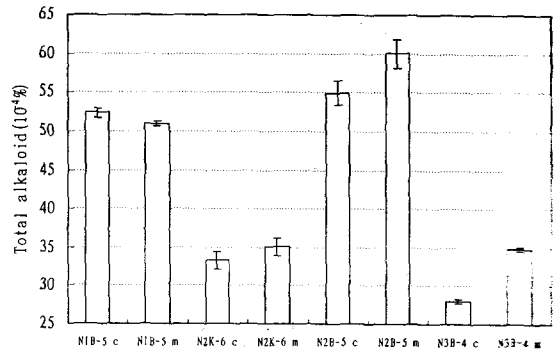


Fig. 3. Alkaloids contents in callus(c) and microtuber-like tissue(m) cultured on solid media

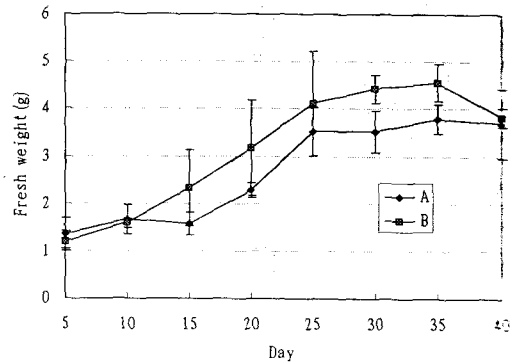


Fig. 4. Growth rate of cells cultured in N2B-5 solid media(A) and N2K-6 solid media(B)

A세포주가 훨씬 높은 생성률을 보였다(Fig. 7). 계속하여 두 세포주의 배지를 서로 바꾸어 3회의 계대배양을 거친 결과 A세포주는 알칼로이드의 생성이 다소의 증가를 나타낸 반면, B세포주는 여전히 극미량 밖에 생산하지 못하였다.

이상의 실험에서 알칼로이드 생산면을 고려해 볼때 현탁배양은 NAA 1.0 mg/l와 BAP 0.5 mg/l를 첨가한 배지에서 유도시킨 켈러스(세포주 A)를 NAA 1.0 mg/l와 kinetin 1.0 mg/l의 식물생장 조절제를 함유한 액체배지에서 배양하는 것이 효율적이라는 결과가 나타났다(Fig. 8).

Table II. Effects of various combinations of -naphthalenacetic acid (NAA) with kinetin or benzylaminopurine(BAP) on the growth of callus mass

Code	growth regulators(ppm)			growth of callus mass	characteristics of callus mass
	NAA	kinetin	BAP		
N1K-4	0.25	0.1	0	+	S,M
N1K-5	0.25	0.5	0	+	S,M
N1K-6	0.25	0	1.0	++	M
N1B-4	0.25	0	0.1	++	M
N1B-5	0.25	0.5	0	++	S,M
N2K-5	1.0	0.5	0	++	M
N2K-6	1.0	1.0	0	++	M
N2B-5	1.0	0	0.5	++	S,M
N2B-6	1.0	0	1.0	++	S,M
N3K-4	4.0	0.1	0	-	S
N3K-5	4.0	0.5	0	+	S,M
N3K-6	4.0	1.0	0	+	S,M
N3B-4	4.0	0	0.1	++	S,M
N3B-6	4.0	0	1.0	+	S,M

S: Shoot M: Microtuber ++: very good +: good -: poor

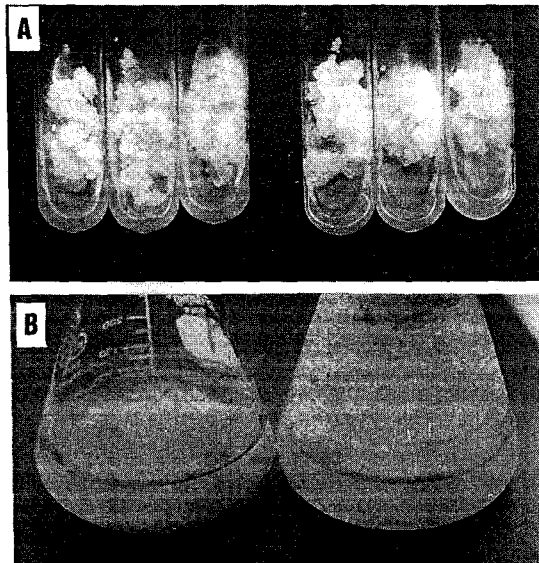


Fig. 5. Callus and cell suspension culture of *Corydalis remota*

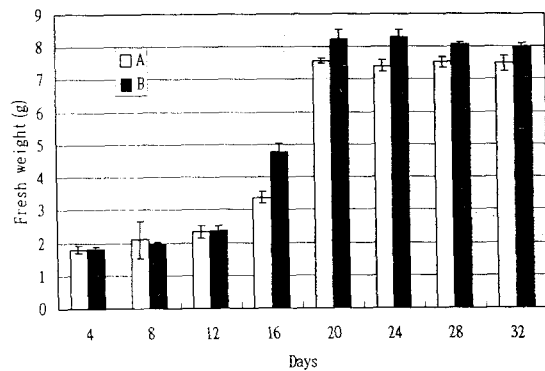


Fig. 6. Growth profile of cells cultured in N2B-5 liquid media(A) and N2K-6 liquid media(B)

결 론

1. 캘러스 유도에 적합한 조직을 얻기 위하여 현호색 식물의 잎, 줄기 및 미숙종자를 이용하여

캘러스 유도정도를 관찰해 본 결과 미숙종자에서 캘러스 유도가 양호하였다.

2. 캘러스유도에 미치는 식물생장조절제의 효과를 알아보기 위하여 IAA, IBA, 2,4-D 및 NAA를 각각 0.25, 1.0 및 4.0 mg/l 첨가시킨 MS기본 배지에 미숙종자를 치상하여 암배양한 결과, 캘러스 유도정도는 NAA가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

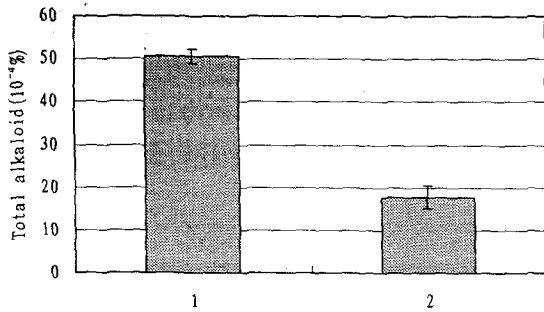


Fig. 7. Production of alkaloids in cell line A cultured in N2B-5 liquid media(1) and cell line B cultured in N2K-6 liquid media(2)

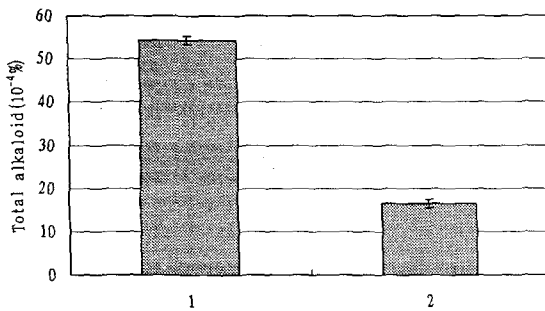


Fig. 8. Production of alkaloids in cell line A cultured in N2K-6 liquid media(1) and cell line B cultured in N2B-5 liquid media(2)

3. 유도된 캘러스의 생장과 기관 분화등에 대한 NAA와 cytokinin류의 조합 및 농도의 영향을 알아 본 결과 N1B-5, N2B-5, N2K-6, N3B-4 등의 배지에서 캘러스 생장과 기관 분화등에 양호한 결과를 나타내었다.

4. 현탁배양에 적합한 세포주를 선발하기 위하여 N2K-6와 N2B-5 배양주를 선정하여 동일조성의 식물생장조절제가 첨가된 액체배지에서 배양을 실시한 결과 현탁배양은 NAA 1.0 mg/l와 BAP 0.5 mg/l를 첨가한 배지에서 유도시킨 캘러스를 NAA 1.0 mg/l과 kinetin 1.0 mg/l의 성장조절제를 함유한 액체배지에서 암상태로 배양하는 것이 효율적인 것으로 나타났다.

〈1995년 11월 11일 접수〉

참고문헌

- Smith, A. C.: An appraisal of the orders and families of primitive extant angiosperms. *J. Indian Bot. Soc.*, olden jubilee Vol. 50A. 215. Cited in Takhtajan, 1980.
- Cronquist, A.: An Intergrated System of Classification of Flowering Plants, N.Y., 1981.
- 김윤식, 오병운: 한국산 현호색속(*Corydalis*)의 형태학적 형질에 의한 분류학적 연구, *Kor. J. Plant Tax.*, 17(2), 73, 1987.
- Yamahara, J., Kimura, H., Kobayashi, M., Sawada, H., Fujimura, H.: Pharmacological properties of "Anchusan(安中散)" a chinese herbal medicine, *Shoyakugaku Zasshi*, 40(2), 123, 1986.
- 약품식물학연구회, 약품식물학 각론, 진명출판사, 서울, 300, 1980.
- Mitsuhashi, H : *Shoyakaku*, Nangodo, Tokyo, 127, 1983.
- Kase, Y., Kawaguchi, M., Takahama, T., Miyata, I., Hitoshi, T., Okano, Y.: Pharmacological studies on *dl*-glucine phosphate as an antitussive, *Arznein- Forsch*, 33, 936, 1983.
- Kase, Y., Kawaguchi, M., Takahama, T., Miyata, I., Hitoshi, T., Okano, Y. : On the sites of antitussive action of *dl*-glucine phosphate. *Arznein-Forsch*, 33, 947, 1983.
- Tang, W. *et al.*: *Chinese Drugs of Plant Origine*, Springer-Verlag, 376, 1992.
- Imaseki, I., Kitabatake, Y., Taguchi, H.: Studies on effects of berberine alkaloids on intestine and uterus in mice, *Yakugaku Zasshi*, 81(9), 1281, 1961.
- Morimoto, N. *et al.*: Yellow pigment of *Corydalis turschanovii*, its preparration from callus culture, *Jpn. Kokai*, Tokyo, Koho, JP 02,171,191 (90, 171,191) (Cl. C12P/00), 02 Jul. 1990, 88/327,462,23 : 4pp, Dec. 1988.
- Kiryakov, H. G., Iskrenova, E., Daskalova, E.,Kuzmanov, B., Evstatieva, L.: Alkaloids of *Corydalis slivensis*, *Planta Med.*, 44, 168, 1982.
- Veznik, F. *et al.*: Alkaloids from the seeds of *Corydalis stricta*, *Planta Med.*, No.5 Oct., 469, 1985.
- Kiryakov, H. G., Iskrenova, E. S. : Minor alkaloids of *Corydalis bulbosa*, Structure of bulbo-

- dine, *Planta Med.*, No.2 Apr., 136, 1984.
15. Preininger, V., Dolejs, L., Smusl, B., Simanek, V. : Isolation and chemistry of alkaloids from plants of the Papaveraceae LXXV, *Planta Med.*, **36**, 213, 1979.
 16. Sagara, K., Ito, Y., Ojima, M., Oshima, T., Suto, K., Misaki, T., Itokawa, H. : Quantitative analysis of tertiary and quaternary alkaloids in *Corydalis* tuber by ion-pair high performance liquid chromatography and its application to an oriental pharmaceutical preparation, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(12), 5369, 1985.
 17. 河野通文 : 漢方製劑中 玄胡索 alkaloid의 定量法에 關한 研究. 大阪生藥會編, 漢方製劑의 分析技法, 大阪, 448, 1980.
 18. Ikuda, A., Kobayashi, A., Itokawa, H. : Studies on the quantitative of protoberberine alkaloids in Japanese, chinese and other countries *Coptis* rhizomes by Thin Layer Chromatograph- Densitometry, *Shoyakugaku Zasshi*, **38**(3), 279, 1984.
 19. Moriyasu, M., Ichimaru, M., Sawada, Y., Izutsu, K., Nishiyama, Y. and Kato, A. : Analysis of alkaloids in *Nandina domestica* by means of HPTLC and TLC-densitometry, *Shoyakugaku Zasshi*, **46**(2), 143, 1992.
 20. 지형준, 조희재, 송임숙, 오용자: 한국산 현호색속 식물의 화학적 분류, *Kor. J. Plant Tax.*, **18**(4), 263, 1988.
 21. Fu, X., Liang, W., Tu, G.: Alkaloids from *Corydalis remota*, *J.Nat. Prod.*, **51**(2), 262, 1988.