

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 캘러스로부터 형성된 부정근의 Saikosaponin 함량

김성길 · 조덕이*¹ · 소응영

전북대학교 자연과학대학 생물학과, ¹전주우석대학교 생물학과

Saikosaponin Content in Adventitious Root Formed from Callus of *Bupleurum falcatum* L.

Sung Gil KIM, Duck Yee CHO*¹, and Woong Young SOH

Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756; and

¹Department of Biology, Chonju Woo Suk University, Chonbuk, 565-800. *Corresponding author.

This study was carried out to analyse saikosaponin contents in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. The induction of adventitious roots from callus of 4 weeks of culture was most favorable to MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D. The adventitious root formation ratio per callus was highest when the size of callus was 900 to 1,000 μ m. The content of saikosaponin a and d was $2089 \pm 124 \mu$ g and $4778 \pm 214 \mu$ g at 150 days of culture respectively, on the basis of g dry root wt, whereas that of saikosaponin c was $3492 \pm 123 \mu$ g at 60 days of culture.

Key words: 2,4-D, HPLC

산형과에 속하는 다년생 초본식물인 시호의 뿌리에는 진통, 소염 및 해열 등의 약리작용이 있는 oleanane계 saponin인 saikosaponin a, c, d가 함유되어 있다(Yamamoto et al., 1975; Kimata et al., 1982). 시호는 재배기간이 길고, 지역 및 계절적인 영향을 많이 받아 노지 생산성의 한계가 있어, 세포, 조직 및 기관배양을 이용하여 이차대사산물을 생산하려는 연구가 시도되고 있다(Hiraoka et al., 1986). 시호의 부정근배양의 이차대사산물 함량은 노지에서의 경우와 거의 동일하다는 보고가 있으며(Hiraoka et al., 1986), 캘러스로부터 유도된 부정근의 saikosaponin 함량은 노지재배 식물보다 높다는 보고도 있다(Kutney et al., 1980; Jo et al., 1990). 세포 및 조직배양 실험계에서 이차대사물질의 생산성은 생장 조절물질, 배지조성 등의 배양조건에 따라서 조절될 수 있다(Franke and Boehm, 1982; Gonzalez et al., 1991). 캘러스로부터 부정근 생산을 통해서 이차대사산물을 생산하기 위해서는 부정근의 형성 및 이차대사산물의 함량 등을 증진시키는 방법의 개발이 선결문제이지만 아직 이에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 시호를 실험재료로 사용하여 캘러스로부터 형성된 부정근으로부터 saikosaponin의 생산을 위한 실험

을 수행하였다.

재료 및 방법

부정근 형성

시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 종자를 Bae 등(1994)의 방법으로 발아시켜 유식물의 잎절편체(5 × 5 mm)를 30 g/L 서당, 8 g/L 한천, 0.1 mg/L 2,4-D를 함유한 MS배지에 치상하여 1,900 lux의 16시간 광주기와 25 ± 1°C에서 2개월간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 형성된 캘러스로부터 부정근 형성에 미치는 계대배양의 효과를 구명하기 위하여 캘러스유도 후 1, 4, 8, 12, 16 및 20주된 것을 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS액체배지에 5일간 전처리한 후 MS 기본액체배지에서 4주간 100 rpm으로 진탕배양하여 캘러스의 생중량, 부정근의 수 및 길이를 측정하였다. 또한 캘러스의 크기에 따른 부정근 형성율을 조사하기 위하여 스테인레스망으로 캘러스를 걸러서 크기별로 선별하여 100 mL 삼각플라스크당 1 g씩 넣고 100 rpm으로 진탕배양하여 부정근의 수,

길이 및 생장율을 측정하였다. 또한 0.1 mg/L 2,4-D로 5일 간 전처리후 배양기간에 따르는 부정근 형성율을 조사하였다.

Saikosaponin의 함량분석

캘러스로부터 형성된 부정근을 30, 60, 90, 120 및 150일 간격으로 채취하여 40°C에서 24시간 건조시킨후 유발에서 마쇄하여 saikosaponin 함량분석에 사용하였다. 마쇄시킨 분말시료 5 g을 취하여 50 mL 메탄올을 넣고 6시간 실온에서 정치시켜 2회 추출 하였다. Evaporator로 감압농축된 시료를 1 mL의 메탄올로 용해시켜 membrane filter (ϕ 0.45 μ m, Millipore)로 여과한 후 Spectra Physics SP8800 역상 고속액체크로마토그래피로 정량분석하였다. 분석 조건으로는 column은 μ -Bondapak C18 column (Waters, ID 3.9 mm \times 30 cm), 이동상은 메탄올과 물(67:33)을 사용하여 자외선 검출기로 254 nm에서 측정하였다. 각 peak성분의 함량은 표준품의 saikosaponin의 검량선으로부터 구하였다. Saikosaponin 표준품(Wako Chemical Co., Japan) a, c, d 2 mg씩을 5% HCl를 함유한 메탄올 1 mL에 용해시킨 후 사용하였다(Jo et al., 1990).

결 과

부정근 형성

시호의 잎절편을 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 이식한 2주부터 잎절편이 부풀기 시작하여 연노랑색의 캘러스가 유도되었다. 캘러스의 생중량은 4주간 배양된 캘러스

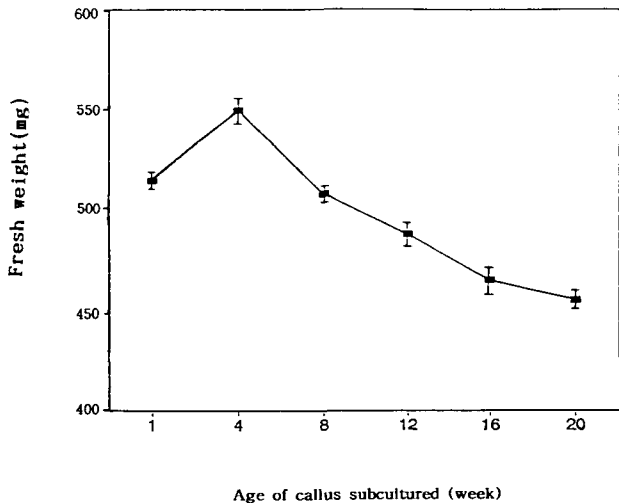


Figure 1. Effect of callus age on callus proliferation. Data were collected after 4 weeks of culture on MS basal liquid medium.

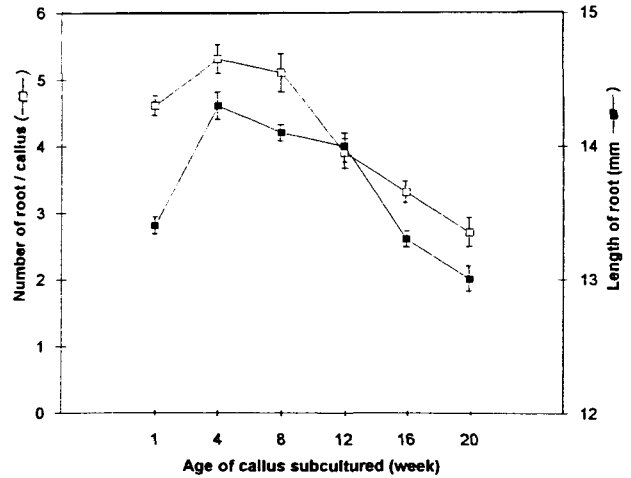


Figure 2. Effect of callus age on adventitious root formation. Data were collected after 0.1 mg/L 2,4-D pretreatment subsequently for 4 weeks of culture on hormone-free MS liquid medium.

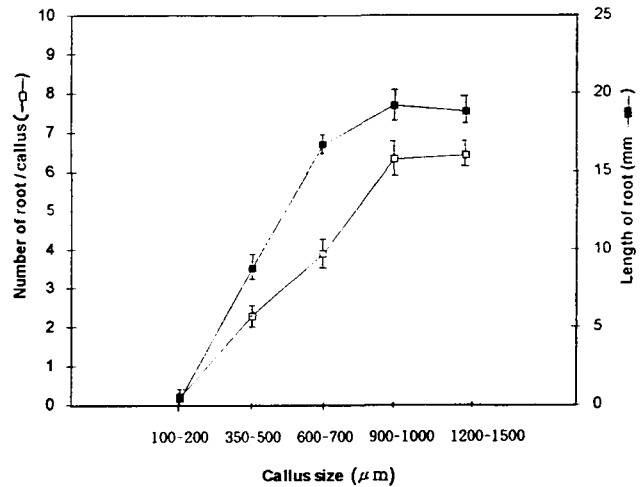


Figure 3. Effect of callus size on adventitious root formation. The callus was cultured in MS basal liquid medium for 4 weeks after pretreatment of 0.1 mg/L 2,4-D for 5 days.

에서 가장 높았고 오래된 캘러스일수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 4주간 배양한 캘러스에서 부정근은 5.3개로 가장 많이 형성되었고 오래된 캘러스일수록 감소하였다. 또한 부정근의 길이는 4주된 캘러스가 14.3 mm로 가장 길었으며 4주 이후 배양기간에 따라서 점차적으로 길이가 감소하였다(Fig. 2). 캘러스 크기별로 형성된 부정근의 수는 직경이 900-1000 μ m 크기의 캘러스가 평균 6.3개로서 가장 많았으며, 100-200 μ m의 캘러스에서는 0.2개로 가장 적게 형성되어, 캘러스가 클수록 더욱 많은 부정근을 형성하였다(Fig. 3).

또한 캘러스별 부정근길이는 900-1,000 μ m 크기에서 19.2 mm로 가장 길었고, 100-200 μ m는 0.4 mm로서 가장 짧았다 (Fig. 3). 이상의 결과로 배양기간, 캘러스의 크기 등 부정근

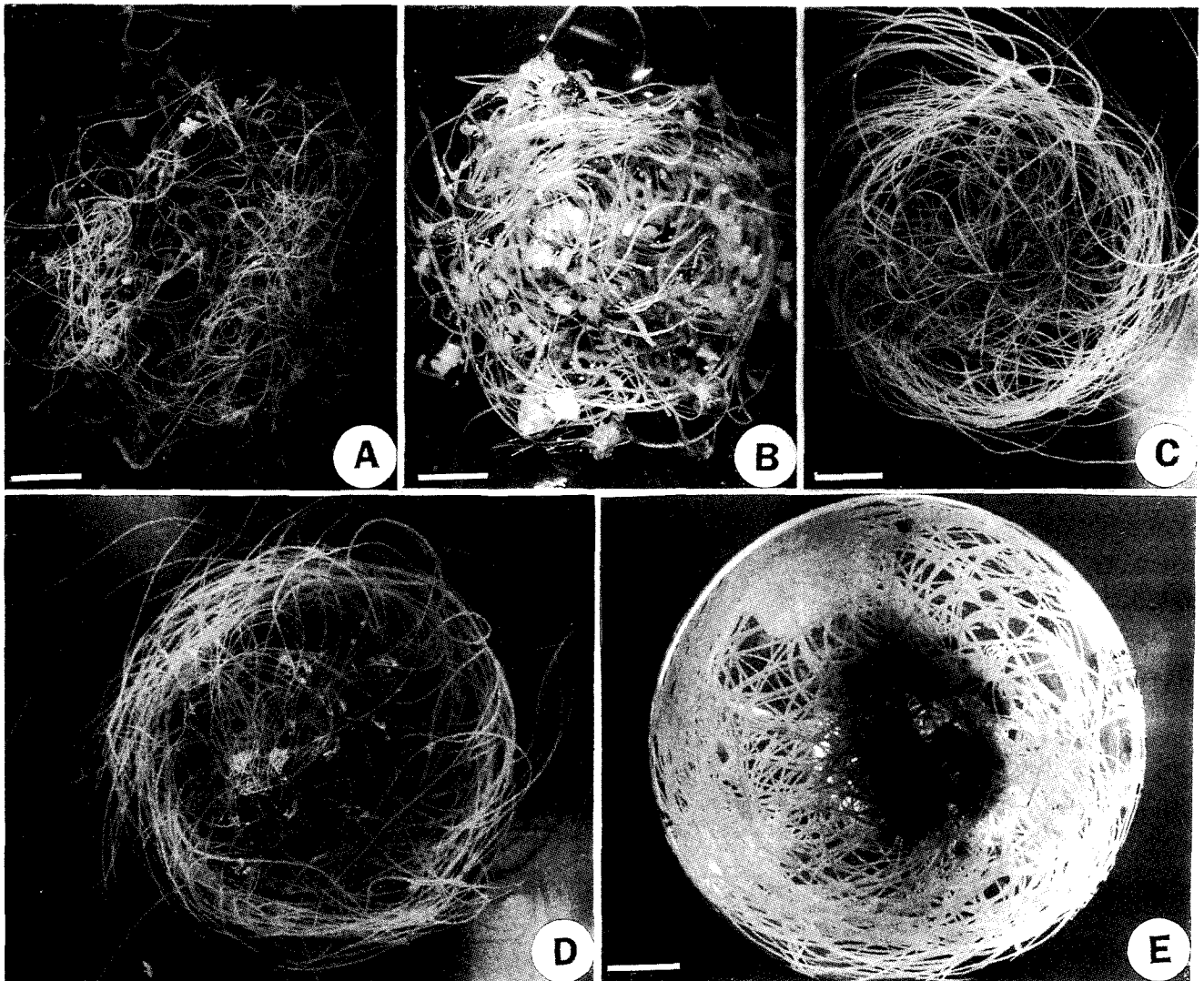


Figure 4. Adventitious roots formed from callus of *Bupleurum falcatum*. (A: 30 days: B: 60 days: C: 90 days: D: 120 days: E: 150 days of culture).

형성의 최적 조건으로 부정근을 유도한후 2,4-D가 제거된 배지에서 30, 60, 90, 120 및 150일간 액체배양하였을때, 부정근의 수는 큰 차이가 없었으나, 부정근 길이는 30일 배양한 것이 24.8 mm이었고, 배양기간에 비례하여 점진적으로 증가하여 150일 배양한 것이 160.7 mm로서 가장 길었다(Fig. 4, 5).

Saikosaponin의 함량

배양기간별로 부정근을 채취하여 메탄올로 추출한 후 HPLC로 saikosaponin 함량을 분석한 결과(Fig. 6) g 건조중량당 saikosaponin a는 30일 배양시 327 μg 에서 배양기간이 길어짐에 따라 계속 증가하여 150일 배양은 2089 μg 이었다. 한편 saikosaponin c의 경우는 60일 배양시 3492.3 μg 으로 가장 높았고 배양시간의 경과에 따라서 감소하였다.

Saikosaponin d는 a와 비슷한 경향으로 배양시간 경과에 비례하여 함량이 증가하여 150일 배양에서 4778 μg 이었다 (Fig. 7).

고찰

기내에서 1-4주동안 배양된 캘러스가 8주 이상 유지된 캘러스에 비하여 부정근형성율이 높았으며, 특히 4주동안 배양한후 얻어진 캘러스에서 가장 효과적이었다. 이러한 현상은 오래된 캘러스일수록 기관형성능이 저하되는 것에서 기인된다. 또한 캘러스의 크기가 클수록 부정근형성이 양호하였다. Gonzalez 등(1991)이 *Corylus avellana*의 자엽을 2, 3, 5, 7 mm 크기로 치상하여 최대의 발근 형성능을 갖는 최소 크기를 찾는 실험에서 5 mm 및 7 mm 크기의 절편체에서

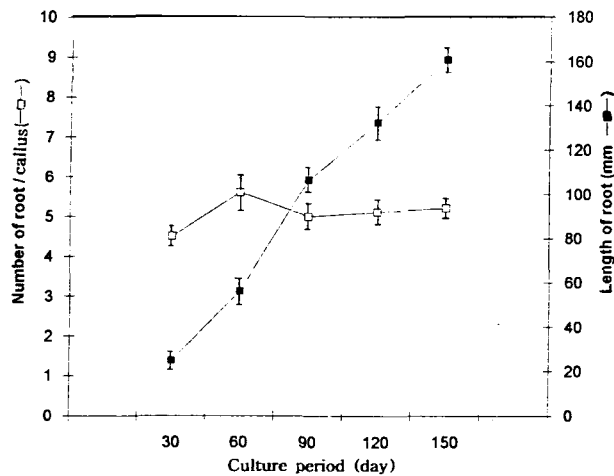


Figure 5. The effect of culture period on the number and length of adventitious root. The adventitious roots were cultured in MS basal liquid medium after pretreatment in MS medium containing 0.1 mg/L 2,4-D for 5 days.

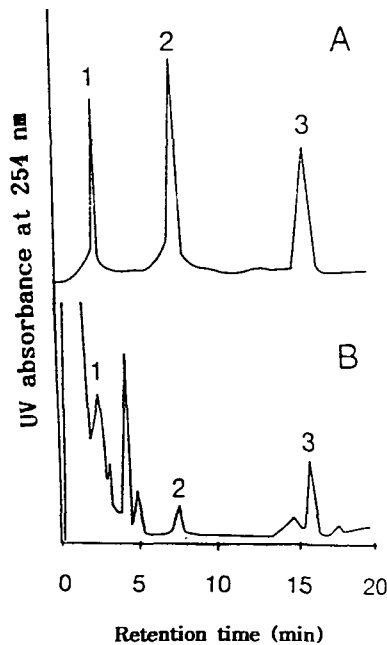


Figure 6. HPLC analysis of saikosaponins in adventitious roots formed callus of *Bupleurum falcatum* L. A: Standard saikosaponins: B: Adventitious roots (Peaks: 1, saikosaponin c: 2, saikosaponin a: 3: saikosaponin d).

부정근이 많이 형성되었다는 연구 결과와 같은 현상이다.

Ficus pumila (Davies and Joiner, 1980)와 *Solanum carolinense* (Reynolds, 1986)로부터 기관분화시에 적정농도 이상의 옥옥신은 뿌리의 길이, 수 및 뿌리의 신장을 감소시켰으나 옥옥신 (2,4-D) 첨가배지에서 적정기간 배양후 호르몬이 첨가되지 않은 MS 기본배지로 옮겨 주었을때 촉진적이라는 연구결과처럼 계대배양기간이 짧은 캘러스가 기내에서 오랫동안 유지된 캘러스에 비해 기관분화능이 높고 캘러스로부터 근원기형성에는 적정농도의 옥옥신(2,4-D)이 요구되지만 이러한 근원기로부터 뿌리신장단계에는 필수적

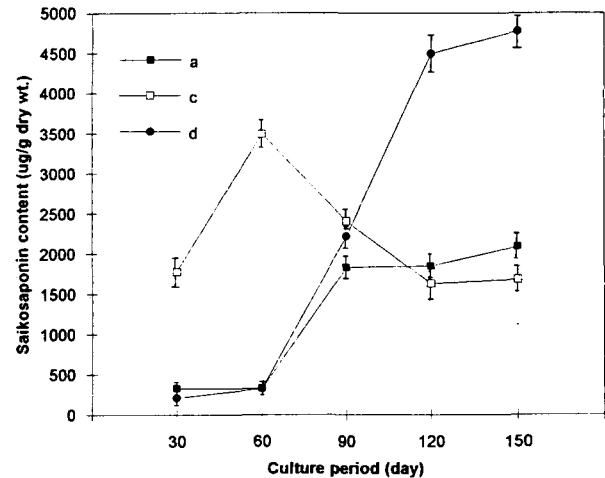


Figure 7. Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum*.

으로 옥옥신을 제거해야 하는 것으로 사료된다(Bae et al., 1994). 이러한 결과는 고구마의 경단부(1-2 mm)를 2,4-D가 첨가된 배지에 1주일동안 배양한 후 호르몬이 첨가되지 않은 MS 기본배지에 옮겼을때 경단부 절편으로부터 캘러스 형성 없이 부정근이 형성되었으며 4주 이상 배양후 MS 기본배지에 옮겼을때는 부정근이 형성되지 않았다는 연구결과(Liu et al., 1992) 및 2,4-D 첨가배지에서 배양기간이 길어질수록 기관분화능이 억제된다는 연구 결과(Smith and Street, 1974)와 유사한 경향을 보여주었다. 이와 같이 부정근형성에 대한 2,4-D의 최적처리시간이 필요하며 2,4-D에 오래 노출될수록 부정근형성능이 저하된다고 사료된다. 부정근형성은 식물재료에 따라서 옥옥신 노출시간이 다르다. 포플러(Pythoud et al., 1986)에서는 IBA 또는 Vitamin D₃를 24시간 처리하였을때 최적시간이었다. 옥옥신 최적 노출시간이 다르다는 것은 식물재료에 따라서 내재옥옥신의 함량이 다르며 또한 감수성이 다른 것에 기인되는 것으로 사료된다.

Saikosaponin 함량을 측정된 결과 saikosaponin a와 c는 배양 60일째까지는 낮게 나타났으나 배양 90일 이후부터는 함량이 높게 나타났다. 이러한 현상은 Saikosaponin c와 d는 종자로부터 증식된 식물체보다 체세포배에서 더 많이 추출되었고(Hiraoka et al., 1986), saikosaponin a와 c는 체세포배 유래 1년근에서 높게 나타나며 saikosaponin d는 기관배양 부정근에서 가장 높게 나타난다는 Jo 등(1990)의 연구결과와 유사한 경향을 보였으나, 이들의 연구결과에서 saikosaponin a, c 및 d는 3개월 배양한 부정근에서 18 µg, 20 µg, 62 µg이었으나 본 연구진의 연구결과로서는 1830 µg, 2404 µg 및 2213 µg으로 매우 높은 함량을 나타내었다. 그리고 노지재배 1년근에서 분석된 saikosaponin a, c 및 d는 18 µg, 8 µg, 6 µg으로서 노지재배 1년근보다 saikosaponin a는 100배, c는 300배, d는 370배로서 대량배양이 가능하면 경제

성이 있다고 사료된다. Saikosaponin a와 d의 함량은 부정근의 생중량이 급속히 증가하는 90일 배양시에 그 함량도 증가하였으나, saikosaponin c의 경우는 60일 배양시 함량이 증가하여 saikosaponin a와 d는 반대 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 saikosaponin의 생합성과 관련하여 대단히 재미있는 것으로 이에 대한 자세한 연구가 요구된다.

적 요

시호 캘러스로부터 유도된 부정근의 saikosaponin 함량을 분석하였다. 캘러스로부터 부정근 발생은 0.1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 가장 양호하였으며, 배양기간에 따른 부정근 형성은 오래된 캘러스에 비해 4주 배양한 캘러스가 효과적이었다. 캘러스당 부정근 형성율은 캘러스의 크기가 900-1000 μm 에서 가장 높았다. Saikosaponin의 총 함량은 배양기간이 길어 짐에 따라 현저히 증가하였다. Saikosaponin a와 d의 함량은 배양 150일에서 g 부정근 건물 중량당 각각 $2089 \pm 124 \mu\text{g}$ 과 $4778 \pm 214 \mu\text{g}$ 이었으며 saikosaponin c의 함량은 60일 배양에서 $3492 \pm 123 \mu\text{g}$ 으로 높았다.

인 용 문 헌

Bae HH, Cho DY, Kim SG, Soh WY, Seong RS. (1994) Effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on adventitious root formation from callus of *Bupleurum falcatum* L. and its histological observation. Korean J Plant Tissue Culture 21: 41-46

Davies FJ, Joiner JN (1980) Growth regulator effects on adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila* L. J Amer Soc Sci 105: 91-95

Franke J, Boehm H (1982) Accumulation and excretion of alkaloids by *Macleaya microcarpa* cell cultures. Biochem Physiol Pflanz 177: 501-507

Hiraoka N, Kodama T, Oyanagi M, Nakano S, Tomita Y, Yamada N, Iida O, Satake M (1986) Characteristic of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. Plant Cell Report 5: 319-321

Gonzalez A, Casares A, Sanchez TR, Rodriguez R (1991) Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices *in vitro* cell. Dev Biol 279: 125-131

Jo PH, Seung RS, Bae HH, Soh WY, Cho DY (1990) Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. Kor J Pharmacogn 21: 205-209

Kimata M, Kasai R, Tanaka O (1982) Saponins of juksihoo and roots *Bupleurum longerradiatum* Turcz L. Chem Pharm Bull 30: 4373-4377.

Kutney JP, Beale MH, Salisbury PJ, Sindelar RD, Stuart KL, Worth BR (1980) Tripdiolide from tissue culture of *Tripterygium wilfordii*. Heterocycles 14: 1465-1467

Liu JR, Min SR, Yang SG (1992) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). Korean J Plant Tissue Culture 19: 167-170

Phythod F, Buchala AJ, Schmid A (1986) Adventitious root formation in green cuttings of *populus tremula*: Characterisation of the effect of vitamin D and indolebutylic acid. Physiol Plant 68: 93-99

Reynolds TL (1986) Somatic embryogenesis and organogenesis from callus culture of *Solaum crolinense*. Amer J Botany 73: 914-918

Smith SS, Street H (1974) The decline of embryogenesis potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann Bot 38: 223-241

Yamamoto M, Kumagai A, Yamamura Y (1975) Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Antiinflammatory actions of saikosaponin. Arzein Forsch (Drug Res) 25: 1021-1023

(1994년 12월 14일 접수)