

## 자리공(*Phytolacca esculenta* van Houtte) 모상근의 Betalain 및 Phytolaccosides 생성에 미치는 배지 및 Elicitor 영향

양덕조\* · 김용해 · 윤길영

충북대학교 자연과학대학 생명과학부

### Effects of Media and Elicitor on Betalain and Phytolaccosides Production in Hairy Root Cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte

YANG, Deok Cho\* · KIM, Yong Hae · YUN, Kil Young

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University,  
Cheongju, 361-763, Korea. \*Corresponding author.

The effects of media and elicitors on betalain, phytolaccoside G and D2 production were examined in the hairy roots of *Phytolacca esculenta* van Houtte induced by *Agrobacterium tumefaciens* A<sub>4</sub>T. Phytolaccoside G and D2 from *Phytolacca* hairy roots PEH2 were identified by TLC, HPLC, IR, Mass, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR. Among the culture media tested, SH medium was the best for hairy root growth of hairy roots. White medium was the most suitable medium for betalain production, while MS medium was for phytolaccoside G and D2 production. Although the growth of hairy roots was suppressed by light (1,000 Lux), the production of betalain, phytolaccoside G and D2 was enhanced by the same light treatment. Addition of elicitors such as NaF, chitosan, and yeast extract to the culture medium increased the content of betalain, phytolaccoside G and D2, suggesting the importance of culture condition for the production of those compounds.

**Key words:** *Phytolacca esculenta* van Houtte, Betalain, Phytolaccoside, Hairy roots, Elicitors

자리공(*Phytolacca esculenta* Van Houtte, Figure 1)은 중심 과목(Centrospermae) 자리공과(Phytolaccaceae)에 속하는 다년생 숙근초로서 商陸이라고 하며, 우리나라에서 부종(edema), 종양(tumor), 각기(beriberi) 그리고 관절염(rheumatism)등의 신경통치료 및 이뇨제로 사용하고 있다(Woo, 1975; Woo et al., 1976). 중국에서도 종양, 부종 그리고 기관지염의 치료에 사용해온 민간요법 식물체로 현재 자리공은 깊은 산속에서 간혹 발견되는 희소식물이므로 자리공의 유전자원 보존도 매우 중요하다. 자리공의 줄기 및 과실에는 자홍색의 색소인 betalain을 지니고 있다. Betalain은 chromo-alkaloid계 천연색소로서 상용되고 있으며, 항균(antifungal) 및 spermatocidal 효과가 있는 것으로 알려져

있다(Mabry, 1968). 자리공의 주요 생리활성 물질인 phytolaccosides는 triterpenoid 특히 lanostane 또는 cycloartane계 물질에서 생합성되는 phytosterol로 4종의 aglycon (esculentic acid, jaligonic acid, phytolaccagenic acid, phytolaccagenin)에 xylose 및 glucose가 결합되어 있는 구조를 가지며, aglycon에 결합되는 당의 종류 및 수에 따라 현재 phytolaccoside A-N이 밝혀졌다(Woo, 1975; Woo et al., 1976; Woo and Kang, 1975; Yi, 1990, 1992; Yi and Dai, 1991).

자리공의 phytolaccosides는 immune interferon (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2 (IL-2), lymphotoxin (LT)을 유도하거나, tumor necrosis factor (TNF)의 활성을 유도하며, 피부병, 매독, 암,

항염증에 활성이 있는 것으로 보고되고 있어 (Lee et al., 1985; Woo et al., 1976; Woo and Kang, 1974; Woo, 1978), 자리공의 이차대사산물은 생약 및 제약의 원료로 이용 가치가 매우 높다. 현재까지의 연구는 자리공으로 부터 유용 물질의 확인과 phytolaccosides의 효능에 관한 연구가 주로 수행되어 왔으며, 세포배양을 통한 phytolaccosides 생산에 관한 연구는 Woo와 Kang (1976)이 자리공 식물체의 뿌리와 줄기로부터 callus를 유기하여 지상부와의 성분을 비교한 바 있고, Yang 등 (1993a, b, c; 1995a, b)은 광이 자리공 모상근의 성장을 억제한 반면, betalain생성은 촉진한다는 보고가 있으나 생리활성물질의 생산을 위한 연구 특히 모상근에서 phytolaccosides의 생산에 관한 연구는 아직 초기 단계에 머물고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 자리공의 생리활성 물질인 betalain 및 phytolaccosides를 형질전환체인 모상근에서 동시에 생산하기 위한 기초자료를 수집하고, 생산성 증대를 위한 방안으로 세포의 성장과 물질 생산에서 가장 크게 작용하는 배지의 영향을 조사하였다. 또한 이차 대사산물(catharanthine, serpentine, ajmalicine, berberine)의 생합성은 elicitor의 종류 및 농도에 의하여 촉진된다는 연구 결과가 많이 보고되고 있지만 (Claudine et al., 1994; Eliert, 1987; Nef et al., 1991; Yun et al., 1993a), betalain 및 phytolaccosides의 생성에 미치는 영향에 대해서는 조사된바 없다. 따라서 본 연구에서는 자리공 모상근의 betalain 및 phytolaccosides생성을 촉진하기 위하여 배지 및 elicitor의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 사용균주

자리공 (*Phytolacca esculenta* van Houtte) 종자는 전라북도 무주군 용화면 용화리에서 채종하였으며, 종자를 2% NaOCl로 10분간 표면살균한 다음, 멸균수로 세척하여 1% agar plate에서 무균발아시켜 모상근 유기재료로 사용하였다. 사용된 균주는 *A. rhizogenes* A4 균주의 pRiA4 plasmid를 *A. tumefaciens* C58 균주에 도입한 *A. tumefaciens* A4T (Noda et al., 1987; Tanaka et al., 1985)로써 증류수 1 liter에 beef extract 5g, peptone 5g, yeast extract 1g, sucrose 5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 7.1으로 만든 YEB배지에서 24시간 동안 28℃, 암상태에서 배양하여 현탁액의 흡광도 (600 nm)를 1.0으로 조정된 후 사용하였다.

### 모상근의 유도 및 선발

무균 발아된 자리공의 잎을 주맥을 포함하도록 하여 1.5cm x 1.5cm 크기로 절편을 만든후 5μL의 *A. tumefaciens*

A<sub>4</sub>T의 현탁액을 주사바늘로 주맥에 상처를 낸 후 접종 하였다. 접종된 절편은 carbenicillin(1,000mg · L<sup>-1</sup>)이 포함된 호르몬 무첨가 MS(Murashige and Skoog, 1962) 고체배지에 치상 후 7-8일 사이에 유도된 모상근을 carbenicillin (500mg · L<sup>-1</sup>)이 포함된 호르몬 무첨가 SH(Shenk and Hilderbrandt, 1972) 액체배지 및 MS고체 배지로 옮겨서 균을 제거시킨 후 항생제 및 호르몬이 없는 SH배지에서 배양 하였다. 실험에 사용된 모상근은 SH 배지에서 25℃, 암상태로 진탕 배양(100 rpm)하면서, 계대배양 후 7-8일이 경과하여 새로 나온 모상근의 선단부위를 1.5 cm로 균일하게 잘라 사용하였다. 선발된 모상근의 형질전환체 확인은 Edwards 등(1991) 및 Yang 등(1996)의 방법에 준하여 수행하였다. *A. tumefaciens* A<sub>4</sub>T의 T-DNA상에 있는 *rolC* 유전자의 존재 여부를 확인하기 위하여 PCR(Biometra TI 1, Germany)을 수행하였다. *rolC* 유전자를 확인하기 위한 primer의 염기서열은 각각 22mer씩 5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTGTT-3'와 5'-TTAGCCGATTGCAAACCTTGCAC-3'를 사용하였다. 모상근 접종과정에서 광에 의해서 betalain이 생성되는 것을 최소화 하기 위하여 흐린 녹색광 (dim green light)하에서 접종하였다. 앞에서 유도된 모상근의 root tips (1.5cm) 10개를 SH 액체배지가 50mL 들어 있는 100mL 삼각플라스크에서 25℃, 암상태로 20일간 진탕 배양하여 전물중이 높은 세포주를 선발하였다.

### 배지 및 elicitor의 효과

자리공 모상근의 성장, phytolaccoside 및 betalain 생성에 미치는 배지의 효과를 알아보하고자 SH, MS, White (White, 1963) 배지를 사용하였다. 또한 elicitor의 효과를 조사하고자 agar (30μg/mL), cycloheximide (2×10<sup>-5</sup>M), chitosan (30μg/mL), phenylmercuric acetate (1mM), NaF (1mM), 밤버섯 추출물 (30 μg/mL), yeast extract (30 μg/mL)를 처리하였다. Yeast extract의 추출은 Hahn과 Albersheim (1978)의 방법에 의한 ethanol 침전법을 사용하였으며, 밤버섯의 배양 및 elicitor 추출은 Yun 등(1993)의 방법에 준하였다. 모상근의 배양은 암상태 및 광상태 (1,000 Lux)하에서 SH배지가 50mL 들어있는 100mL 삼각플라스크에서 25℃로 20일간 배양하였다.

### 모상근 phytolaccosides의 동정 및 분석

자리공 모상근에서 phytolaccosides 추출은 Woo와 Kang (1975)의 방법에 준하여 수행하였다. 모상근을 세절하여 동결 건조시킨 후 분말로 만든 다음 MeOH로 2회 온침 (60℃)한 후 농축하여 물을 가해 석출하는 침전물을 여과하였다. 석출된 침전물로부터 ether 용해성 물질만을 추출한 후 1M NaHCO<sub>3</sub>로 추출하였다. 이것을 산성 (pH 4)으로 만

든 후 ether 로 phytolaccosides을 추출하였다.

Phytolaccosides을 동정하기 위하여, phytolaccosides fraction 에 0.3mL MeOH로 녹여 silica gel plate(60F<sub>254</sub>, Merk)에 50  $\mu$ L 점적하고 MeOH : CHCl<sub>3</sub> : 7%HAc = 1 : 5 : 1 (v/v/v) solution과 MeOH : CHCl<sub>3</sub> : NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O = 30 : 60 : 3 : 4 (v/v/v) solution으로 전개하여 SbCl-CHCl<sub>3</sub> (Carr-Price reagent)로 발색하였다. TLC 및 HPLC로 얻어진 fractions은 IR, Mass, NMR등을 사용하여 phytolaccosides를 확인하였다. 적외선 흡수 스펙트럼(IR)은 Perkin-Elmer 298 적외선 분광 광도계를 사용하여 KBr disc에 시료를 첨가하여 측정 하였다. Mass는 기초과학연구원센터 ESI MS (VG Quattro, FISIONS Instruments)로 측정하였다. 수소 핵자기 공명 스펙트럼 (<sup>1</sup>H-NMR)은 Bruker NMR (Drx300) 300MHz 핵자기 공명 분광 광도계를 사용하였으며, tetramethylsilane(TMS)을 표준물질로 사용하여  $\delta$  값으로 측정하였다. 탄소 핵자기 공명 스펙트럼 (<sup>13</sup>C- NMR)도 수소 핵자기 공명 스펙트럼에 사용한 기기와 동일한 기기를 사용하였다.

Phytolaccoside G 및 D2의 분석은 RI-detector가 부착된 HPLC (Pharmacia LKB, Sweden)로 하였다. Pump는 Pharmacia사의 LKB HPLC PUMP 2248을 사용하였고, column은 Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column (5 $\mu$ m, Merk), detector는 KNAUER differential refractometer를, solvent는 acetonitrile : H<sub>2</sub>O : n-BuOH (80:20:10, v/v/v)를 사용하였으며, flow rate는1.0 mL · min<sup>-1</sup>, attenuator 1X의조건하에서chromatogram의 각 peak를 표준품과 비교하여 phytolaccoside G와 D2의 함량을 peak height로 계산하였다.

### 모상근의 성장률과 betalain 함량

모상근의 성장률은 SH 기본배지 50 mL을 함유한 100 mL flask에 모상근의 선단 (1.5 cm) 10개씩 접종하여 광상태와 암상태로 구분하여 20일간 배양한 후 동결건조시켜 건물중을 측정하였다. Betalain 함량을 측정하기 위하여 동결 건조 시킨 분말 20 mg에 80% methanol 1mL 첨가하였다. 이를 4℃ 에서 12시간 방치한 후, 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 분광계 (Hitachi U-3400, Japan)을 이용하여 532.5nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선과 대비하여 betalain을 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 모상근의 유기 및 선발

자리공으로부터 모상근을 유기하고자 무균발아된 식물체로부터 잎절편을 만든후 *A. tumefaciens* A4T를 접종하였던 바, 접종 7일 후 잎절편으로 부터 모상근이 유기되었고

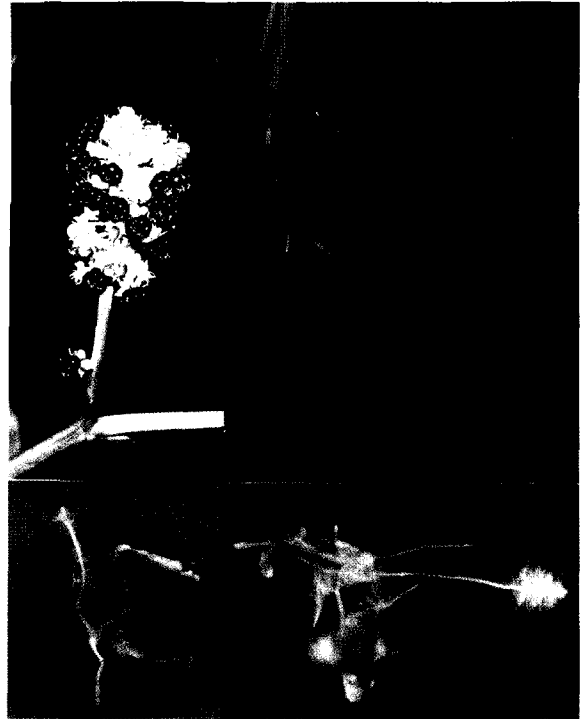


Figure 1. Photographs of fruit(A), aseptic plants(B), and hairy roots (C,D) induced from leaf segment of *P. esculenta* van Houtte. Hairy roots cultured in solid MS medium(C,D) supplemented with 500 mg · L<sup>-1</sup> carbenicillin.

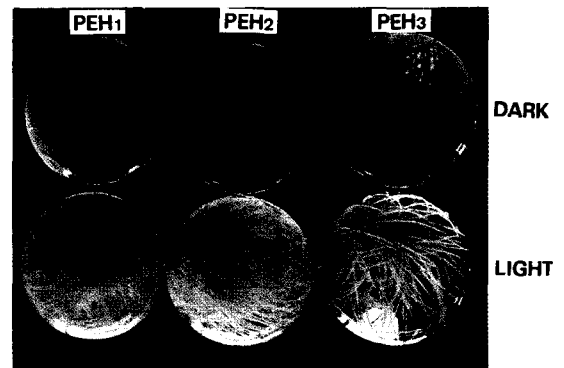
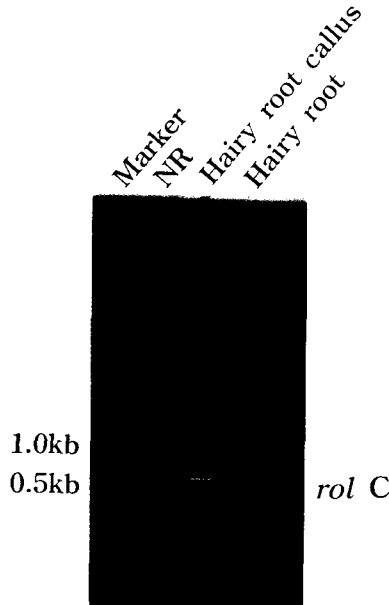


Figure 2. Characteristics of three hairy root clones, PEH1, PEH2 and PEH3. Hairy root clones cultured in 100 ml erlenmeyer flasks each containing 50 mL of SH medium under dark and continous light condition(1,000 Lux) for 4 weeks at 25℃ on rotary shaker(100 rpm).

(Figure 1), 유기된 모상근 clone은 SH 기본배지에 접종한 후 성장률이 우수한 세포주 PEH1, PEH2, PEH3를 선발하였다 (Figure 2). PEH1은 모상근의 직경이 약 1mm 정도이며 분지능이 높았고, PEH2는 모상근의 직경이 약 0.7mm로 가늘며 분지능이 높고 성장률이 암상태에서 20일간 배양하였을 때, 초기접종량의 139배로 높았으며, PEH3은 모상근의



**Figure 3.** Polymerase chain reaction analysis of hairy root and hairy root-derived callus transformed with *A. tumefaciens* A4T. NR, normal root. In the PCR, *rol C*-specific primer was used to examine whether or not T-DNA had been successfully transferred to plant cells.

직경이 1mm 정도로 분지능이 낮았다. 이와같은 다양한 모상근의 특성은 T-DNA가 도입된 세포에서 T-DNA의 발현의 현상이 삽입된 위치에 영향을 받으며, 유전자의 서열도 도입과정에서 변형되거나 유전자가 불활성화 되기도 하기 때문이며 (Weissing et al., 1988), 또한 숙주세포로 도입된 T-DNA의 copy수에 의해서도 영향을 받은 (Mano et al., 1989) 결과라고 생각된다. 선발된 clone이 형질전환체인 모상근임을 확인하기 위하여 *A. tumefaciens* A4T의 T-DNA 상에 있는 *rol C* 유전자의 존재여부를 PCR를 이용하여 확인하였던 바, 정상식물체의 뿌리에서는 *rol C*가 확인되지 않은 반면, PEH2 모상근 및 PEH2 모상근 유래 callus에서는 *rol C*가 확인되어 선발된 PEH2가 *A. tumefaciens* A4T에 의하여 형질전환된 모상근임을 확인하였다 (Figure 3).

**Phytolaccosides 동정**

자리공의 모상근이 생성한 phytolaccosides를 TLC 와 HPLC로 분리한 결과, 분리된 phytolaccosides는 phytolaccoside G와 D2로 동정되었다. Phytolaccoside G의 분자량은 648 이었으며, IR (KBr  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ) spectrum에서 3400 (OH), 1720 (ester), 1701 (acid), 1070 (C-O)을 동정하였다.  $CD_3+D_2O+CF_3COOH$ 에서  $^1H-NMR$  spectrum을 동정하였던 바, 5개의 tertiary methyl signal ( $\delta$  0.84-0.99),  $\delta$  3.64

**Table 1.**  $^{13}C-NMR$  spectral data of phytolaccoside G and D2 (300MHz, in  $C_5D_5N$ ) from hairy root clone, PEH2 of *P. esculenta*.

Carbon No.	Phytolaccoside G	Phytolaccoside D2
C- 1	44.1	39.0
C- 2	70.9	26.1
C- 3	82.8	82.8
C- 4	42.2	43.3
C- 5	48.5	48.5
C- 6	17.9	17.9
C- 7	33.0	32.9
C- 8	39.8	39.8
C- 9	47.7	48.5
C- 10	36.9	36.9
C- 11	23.9	23.9
C- 12	123.5	123.4
C- 13	144.4	144.4
C- 14	42.8	42.1
C- 15	28.3	28.3
C- 16	23.9	23.9
C- 17	47.7	46.1
C- 18	44.1	43.3
C- 19	42.7	42.7
C- 20	43.9	44.1
C- 21	30.8	30.8
C- 22	34.5	34.4
C- 23	65.2	65.2
C- 24	14.9	13.5
C- 25	17.4	17.2
C- 26	17.2	17.4
C- 27	26.1	26.1
C- 28	179.9	179.7
C- 29	29.1	28.4
C- 30	177.1	177.0
Xyl-1	106.8	103.5
Xyl-1	75.3	82.8
Xyl-1	78.5	78.1
Xyl-1	70.9	70.9
yl-1		67.2
Glc-1		106.4
Glc-2		76.3
Glc-3		78.1
Glc-4		71.7
Glc-5		78.9
Glc-6		62.6

에서 *O*-methyl signal이 동정되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum(Table 1)은 Yi (1992)의 보문과 같은 결과로서 phytolaccoside G는 aglycon으로 jaligonic acid를 가지고 xylose를 1개 가지고 있는 28-*O*-[β-D-xylo pyranosyl] jaligonic acid로 동정되었다.

Phytolaccoside D2의 분자량은 847이며, IR (KBr ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>) spectrum에서 3400 (OH), 1720 (ester), 1701 (acid), 1070 (C-O)을 동정하였다. CD<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O+ CF<sub>3</sub>COOH에서 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 동정하였던 바, 5개의 tertiary methyl signal (δ 0.85-1.00), δ 3.64에서 *O*-methyl signal, δ 4.54, 4.69에서 두개의 anomeric proton signal이 동정되었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Table 1)은 Kang과 Woo (1987)의 결과와 일치하는 경향으로 phytolaccoside D2는 aglycon으로 phytolaccagenic acid를 가지고 xylose와 glucose을 1개씩 가지고 있는 3-*O*-[β-D-glucopyranosyl(1-2)-β-D-xylopyranosyl] phytolaccagenic acid로 동정되었다.

배지별 모상근의 반응

성장률이 우수한 PEH2의 성장, betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생성에 미치는 배지별 효과를 조사한 결과 모상근의 성장은 SH에서, betalain생성은 White 배지 그리고 phytolaccosides의 생성은 MS배지에서 양호하였다. 모상근의 성장은 SH배지에서 암상태로 배양하였을 때, 0.48 g · flask<sup>-1</sup>로 MS 배지의 0.36 g DW · flask<sup>-1</sup> 및 White 배지의 0.067 g DW · flask<sup>-1</sup>보다 양호하였고, 광상태 배양시에도 SH배지에서 가장 양호하였다. 그러나 처리한 모든배지에서 암상태보다 광상태에서 모상근의 성장이 저조하였는데, SH배지의 경우에도 암상태에서 모상근의 성장이 0.29 g DW flask<sup>-1</sup>로

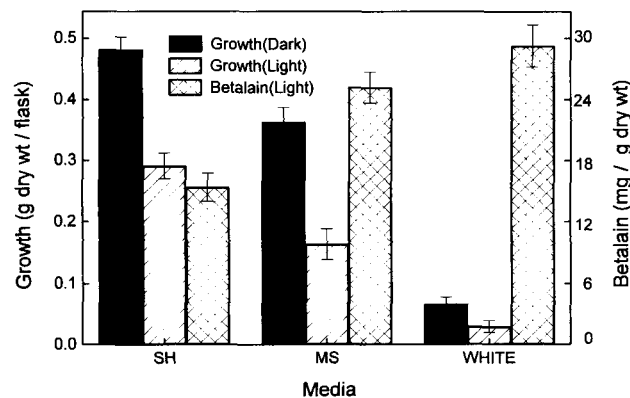


Figure 4 Effects of media and light(1,000 Lux) on growth and betalain production from hairy root clone, PEH2 of *P. esculenta*. The data represent the mean±SE of triplicates measured after 20 days of culture. The initial inoculum was 10 hairy root tips (size: 1.5 cm) per treatment.

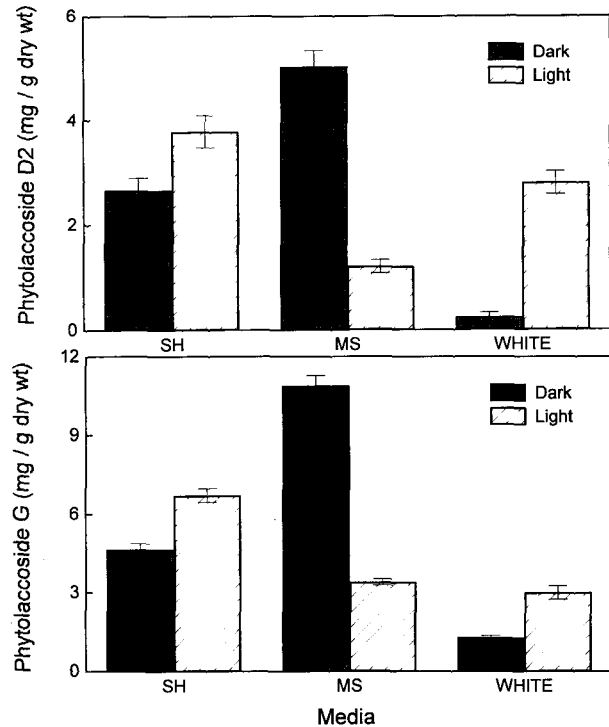


Figure 5. Effects of media and light(1,000 Lux) on growth, phytolaccoside G and D2 production from hairy root clone, PEH2 of *P. esculenta*. The data represent the mean±SE of triplicates measured after 20 days of culture. The initial inoculum was 10 hairy root tips (size ; 1.5 cm) per treatment.

광상태 보다 40% 정도 억제되었다 (Figure 4). Betalain의 생성은 White> MS> SH 배지순으로 양호하였는데, White배지에서의 betalain 함량은 29.26 mg · g DW<sup>-1</sup>로 성장율이 양호한 SH배지의 15.38 mg · g DW<sup>-1</sup>보다 47% 정도 높았다 (Figure 4). 이러한 결과에서 일정기간 동안 한 flask에서 생성된 betalain량을 비교해볼 때, SH배지는 4.47 mg · flask<sup>-1</sup>로 MS배지의 4.12 mg · flask<sup>-1</sup> 및 White배지의 0.88 mg · flask<sup>-1</sup>보다 양호하여 betalain 생성을 위한 최적배지는 SH배지가 적절할것으로 생각된다.

배지별 phytolaccoside G와 D2의 생성은 공히 MS배지에서 암상태로 배양하였을 때 가장 양호하였다 (Figure 5). Phytolaccoside D2의 함량은 암상태에서 5.03 mg · g DW<sup>-1</sup>로 가장 함량이 높았다. 반면, SH 및 White 배지에서는 암상태에서 배양한 것 보다 광상태에서 배양하였을 때 양호하였는데, SH배지의 경우 암상태의 2.66 mg · g DW<sup>-1</sup> 보다 광상태 3.78 mg · g DW<sup>-1</sup>로 암상태 보다 42% 높은 생성을 보였다. Phytolaccoside G는 MS 배지에서 암상태로 배양하였을 때 10.88 mg · g DW<sup>-1</sup>로 가장 양호하였다 (Figure 5). SH 및 White 배지에서는 암상태에서 배양한 것 보다 광상태에서 배양하였을 때 양호하였는데, SH배지의 경우 암상태의 4.64

mg · g DW<sup>-1</sup> 보다 광상태 7.71 mg · g DW<sup>-1</sup>로 암상태 보다 40% 높은 생성을 보였다. 배지별 자리공 모상근의 성장, betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생성에 미치는 광의 영향을 종합해 볼 때, 자리공 모상근의 성장은 광상태에서 억제되었지만 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생성은 광상태에서 촉진되는 것으로 확인 되었다. 그리고 phytolaccoside G와 D2의 생성은 배지와 광에 의해서 큰 차이를 보였는데 이부분의 세밀한 연구가 더 필요하다고 생각된다. 이러한 결과는 Fujita등 (1981)의 연구 결과에서 지치의 callus로부터 shikonin을 생산하기 위하여 성장을 위한 최적배지 (MG-5)와 색소 합성을 위한 최적배지 (M-9)를 달리 이용하여 생산 효율을 높인 것으로 볼 때, 자리공의 성장과 betalain 및 phytolaccosides G와 D2의 생성도 적절한 배지와 광을 이용하여 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

Betalain 및 phytolaccosides 생성에서 elicitor의 영향

자리공 모상근으로부터 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생산성 향상을 위한 최적 조건을 조사하였다. 자리공 모상근의 성장은 암상태 및 광상태에서 공히 agar 처리구를 제외한 모든 처리구에서 억제되었으나, betalain의 생성은

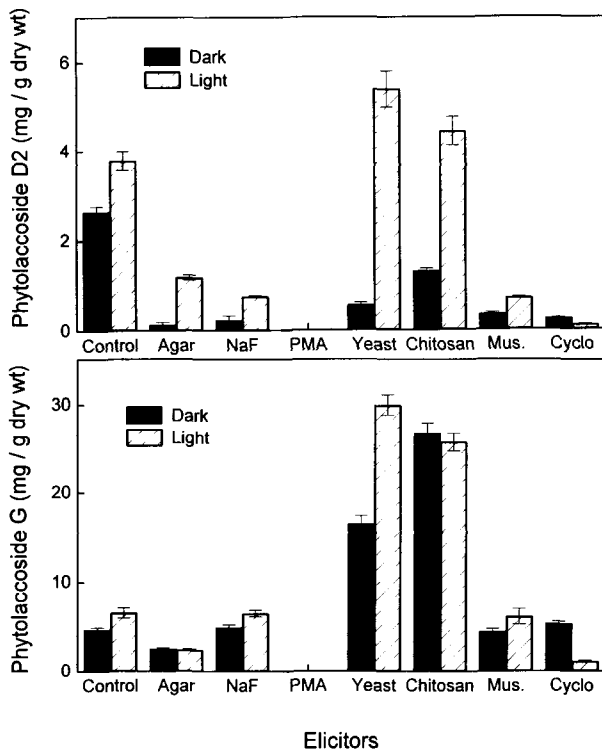


Figure 6. Effects of elicitors on growth and betalain production from hairy root clone, PEH2 of *P. esculenta*. The data represent the mean±SE of triplicates measured after 20 days of culture. The initial inoculum was 10 hairy root tips (size ; 1.5 cm) per treatment.

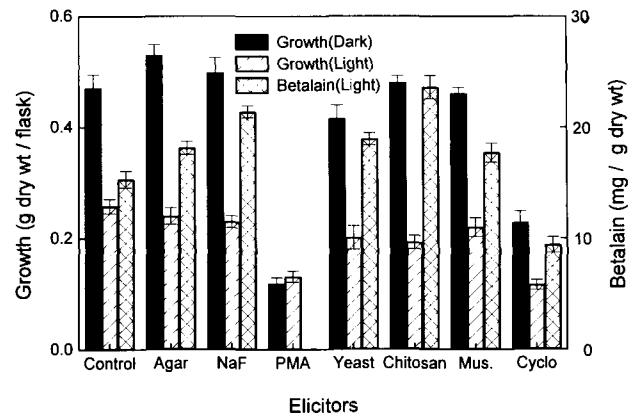


Figure 7. Effects of elicitors on phytolaccoside G and D2 production from hairy root clone, PEH2 of *P. esculenta*. The data represent the mean±SE of triplicates measured after 20 days of culture. The initial inoculum was 10 hairy root tips (size ; 1.5 cm) per treatment.

cycloheximide 및 PMA 처리구를 제외한 모든 처리구에서 촉진되었다 (Figure 6). Betalain의 생성은 chitosan 처리구에서 23.62 mg · g DW<sup>-1</sup>로 대조구의 15.33 mg · g DW<sup>-1</sup>보다 1.5배, NaF 처리구에서는 21.43 mg · g DW<sup>-1</sup>로 1.4배, yeast extract 처리구에서 18.94 mg · g DW<sup>-1</sup>로 1.2배 증가되었다.

Elicitor에 의한 phytolaccoside G의 생성은 암상태 및 광상태에서 공히 대조구보다 yeast 및 chitosan 처리구에서 높은 생성을 나타내었다. 광상태에서의 phytolaccoside G의 생성을 비교해 볼 때 암상태의 6.54 mg · g DW<sup>-1</sup>보다 yeast extract 처리구에서 29.94 mg · g DW<sup>-1</sup>로 4.5배, chitosan 처리구에서는 25.71 mg · g DW<sup>-1</sup> 4배 높은 phytolaccoside G의 생성이 촉진되었다 (Figure 7). Phytolaccoside D2의 생성에서도 유사한 경향을 나타내었는데 암상태의 3.78 mg · g DW<sup>-1</sup>보다 yeast extract 처리구에서 5.38 mg · g DW<sup>-1</sup>로 1.45배, chitosan 처리구에서는 4.43 mg · g DW<sup>-1</sup>로 1.2배 높은 phytolaccoside D2의 생성이 촉진되었으나, agar 및 PMA 처리구에서는 억제되는 경향을 나타내었다 (Figure 7). 이상의 결과를 정리하면 elicitor 처리하에 자리공 모상근의 성장은 억제되었지만 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생성은 촉진되는 양상을 나타내었고, 특히 phytolaccoside D2의 생성은 암상태 보다는 광상태에서 촉진되었으므로 phytolaccoside G와 D2의 생성을 높이기 위해서는 광주기하에서 적절한 elicitor 처리가 요구된다. Marques와 Brodelius (1988)은 식물세포배양에서 elicitor를 처리하여 L-tyrosine decarboxylase가 유도된다고 하였고, Koch 등(1990)은 chlorogenic acid와 caffeoyl shikimic acid 대사에서 광과 elicitor의 효과가 차이가 있다고 하였는데, 이러한 결과로 미루어 보아 자리공 모상근에서도 광 및 elicitor에 의한 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생합성 관련 효소의 유

도 및 활성이 증가되어 함량이 높아진 것으로 생각되며, 앞으로 보다 효과적인 elicitors의 개발이 요구된다.

### 적 요

자리공의 엽절편에 *Agrobacterium tumefaciens* A4T을 접종하여 암상태에서 초기 접종량의 130배로 분지능이 높고 성장이 우수한 모상근 세포주인 PEH2를 선발하였다. 선발된 모상근으로부터 생리활성 물질인 phytolaccoside G 및 D2를 IR, Mass, NMR등으로 동정하였다. 모상근 PEH2의 성장은 SH배지에서 가장 양호하였으며, 암상태 보다 광상태에서 배양하였을 때 40% 성장이 억제되었으며, betalain의 생성은 White배지에서 가장 양호하였다. 배지별 phytolaccoside G와 D2의 생성은 MS배지에서 암상태로 배양하였을 때 가장 양호하였으며, SH 및 White 배지에서는 암상태보다 광상태에서 높은 생성을 나타내어 phytolaccoside G와 D2의 생성은 광에너지에 의하여 조절됨을 확인하였다. 자리공 모상근에서 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생산성을 향상 시키기 위한 방안으로 처리한 elicitor를 처리하였던 바, 모상근의 성장은 억제 되었으나, chitosan 및 yeast extract에 의하여 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생성이 촉진되어 적절한 elicitor와 광의 조합처리는 자리공 모상근으로부터 betalain 및 phytolaccoside G와 D2의 생산성을 향상시킬수 있음을 확인하였다.

사사 - 이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

### 인 용 문 헌

- Claudine NF, Trouslot ME, Trouslot P, Chrestin H (1994) Long-term effects of a *Pythium* elicitor treatment on the growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Med* 60: 149-152
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plabt genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.
- Eilert U (1987) In: Constabel F, Vasil IK (eds) Cell culture and somatic cell genetics of plants. 4: Academic Press, New York, pp 153-196
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1: 61-63
- Hahn MG, Albersheim P (1978) Host-pathogen interactions XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol* 62: 107-111
- Koch U, Kuhn T, Conradt W, Wellmann E (1990) Differential effects of light and fungal elicitor on chlorogenic acid and caffeoylshikimic acid metabolism. *Plant Science* 70: 167-174
- Lee EB, Lee YS, Woo WS (1985) Antiinflammatory activity of americanin A. *Arch Pharm Res* 8: 139-147
- Mabry TJ, Dreiding AS (1968) The betalains In: TJ Mabry(ed) Recent advances in phytochemistry I. North-Holland Pub. Co., Amsterdam, pp 145-160
- Marques IA, Brodelius, PE (1988) Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. *Plant Physiol* 88: 46-51
- Mano Y, Ohkawa H, Yamada Y(1989) Production of tropane alkaloids by hairy root culture of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science* 59: 191-201
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nef C, Rio B, Chrestin H (1991) Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep* 10: 26-29
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Botany* 50: 199-204
- Weissing K, Schell J, Kahl G (1988) Foreign genes in plants: transfer structure expression and applications. *Annu Rev Genet* 22: 421-477
- White PR (1963) The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd. edition. Romald Press, New York
- Woo WS (1975) The structure of esculentic acid: A new triterpene from *Phytolacca esculenta*. *Phytochemistry* 14: 1885-1888
- Woo WS (1978) Triterpenoid saponins from the roots of *Phytolacca americana*. *Planta Medica* 34: 87-92
- Woo WS, Kang SS (1975) The occurrence and chemistry of *Phytolacca* triterpenoids. *J Pharm Soc Korea* 19: 189-208
- Woo WS, Chi HJ, Kang SS (1976) Constituents of *Phytolacca* species (IV): Comparative examination on constituents of the roots of *Phytolacca americana*, *P. esculenta* and *P. insularis*. *Kor J Pharmacog* 7: 51-54
- Woo WS, Shin KH, Kang SS (1976) Constituents of *Phytolacca* species ( I ): Antiinflammatory saponins. *Kor J Pharmacog* 7: 47-50
- Woo WS, Kang SS (1974) The structure and stereochemistry of Phytolaccagenic acid. *J Pharm Soc Korea* 18: 231-235
- Woo WS, Kang SS (1976) Constituents of *Phytolacca* species ( III ): Components of over ground parts and callus tissues. *Kor JPharmacog* 7: 95-97
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Monoda Y (1983) Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension cultures. *Agric Biol Chem* 47: 2185-2191
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Kang YH (1993a) Suspension culture of betalain producing cell-line and characteristics of hairy root of *Phytolacca esculenta* v. Houtte. *Korean J Biotechnol Bioeng* 8: 89-94
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Quae C (1993b) Blue light-dependent betalain synthesis of hairy root : Model system for the study on the photo-signal transduction. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 35-40
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Quae C (1993c) Blue light-dependent betalain synthesis of hairy root : Influences of the activators/inhibitors of signal transduction on the betalain synthesis. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 63-70
- Yang DC, Kim YH, Choi HY, Choi CH, Yang DC (1995a) Effects of antioxidants in growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 65-70
- Yang DC, Kim YH, Kwon JN, Choi CH, Yang DC (1995b) Effects of light on activities of antioxidative enzymes in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 71-76
- Yang DC, Kim YH, Choi HY, Yun KY, Yang DC (1996) Growth and ginsenosides production of hairy root (*Panax ginseng* C. A. Meyer) via

- light energy. Korean J Ginseng Sci **20**: 318-324
- Yi YH** (1990) Esculentoside L and K: Two new saponins from *Phytolacca esculenta*. *Planta Med* **56**: 301-303
- Yi YH** (1992) Two new saponins from the roots of *Phytolacca esculenta*. *Planta Med* **58**: 99-101
- Yi YH, Dai FB** (1991) A new triterpenoid and its glycoside from *Phytolacca esculenta*. *Planta Med* **57**: 162-164
- Yost FJ, Fridovich I** (1976) Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch Biochem Biophys* **175**: 5-9
- Yoshikawa T, Furuya T** (1987) Saponin production by cultures of Panax ginseng transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* **6**: 449-453
- Yun JH, Park IS, Kim DI** (1993) Effect of various elicitors on the production of berberine in Plant cell suspension cultures of *Thalictrum rugosum*. *Korean J Biotechnol Bioeng* **8**: 390-396

(1998년 9월 30일 접수)