

## 시호 모상근 배양에서 배지성분에 따른 사이코사포닌 함량과 조직학적 형태의 차이

안준철\*·정영재\*·이규배\*\*·김옥태\*\*\*·황백\*\*\*

### The Effect of Various Culture Media on Histological Anatomy and Saikosaponin Content in Hairy Root Culture of *Bupleurum falcatum*

Jun Cheul Ahn\*, Young Jae Jeong\*, Kyu Bae Lee\*\*, Ock Tac Kim\*\*\* and Baik Hwang\*\*\*

**ABSTRACT** : Growth rate and saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* hairy root on MS and RCM basal media were measured. And using hairy root cultured in those media, it was investigated whether some correlation between differences in growth rate and saikosaponin content and histological difference was or not. Results obtained showed that among media tested, MS and 3RCM medium which showed the faster growth in fresh weight and dry weight, respectively. And saikosaponin content of hairy root cultured in 3RCM was 2.2~5.5 times higher than that of 1 year cultivated roots, whereas that in MS was extremely low. On the other hand, histological differences of root tips and about 1 cm region from root tip cultured in both MS and 3RCM were not prominent, however, in mature region, a lot of cells only in 3RCM contained densely stained vacuoles or organelles which probably contain tannin, suggesting that development of those has a correlation with biosynthesis of secondary metabolites containing saikosaponin.

**Key words** : growth rate, saikosaponin, histological differences, MS, 3RCM

## 서 언

시호 (*Bupleurum falcatum*)는 미나리과에 속하는 다년생 초본식물로 뿌리를 한방에서 해열, 진통 및 해독 등의 처방에 많이 사용하여 왔으며, 활성 성분은 뿌리에 주로 함유되어 있는 사이코사포닌 a와 d이며 (Yamamoto, 1980; Shibata, 1980), 사이코사포닌 c의 경우는 배당체가 분리된 aglicon의

형태로 활성이 있는 것으로 알려졌다 (Shimata et al., 1982). 또한 이들 성분의 강력한 항염증 치료 (Yamamoto et al., 1975)와 간장해 개선작용 (Arichi et al., 1978)은 현대인의 주요질환 중 하나인 간질환 치료제로의 개발 가능성이 높다. 실제로 시호는 한국, 중국, 일본 등에서 상당량 재배되고 있고 97년 통계로 180 M/T가 수입되고 있는 주요 약용작물 중 하나이다.

그러나 시호는 재배시 약재로 사용되는 뿌리의

\* 서남대학교 생명과학과 (Department of Biological Sciences, Seonam University, Namwon, Korea 590 - 170)

\*\* 조선대학교 생물교육학과 (Department of Biological Science Education, Chosun University, Kwangju 501 - 759)

\*\*\* 전남대학교 생명과학부 (Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea 500 - 757)

< '99. 8. 25 접수 >

발달이 저조하고 1년 이상 재배하였을 경우 saponin 함량이 떨어지거나 야생시호와 달리 근부 병 등에 의한 수확량이 감소되는 문제가 있다. 또한 지리적 분포 (Mizukami et al., 1991; Tanaka et al., 1988), 품종간 (Shon et al., 1997), 토양비료 차이간 (Minami & Sugino, 1995), 계절변화 (Minami et al., 1995) 및 식물체간 (Kim et al., 1995) 에도 성분함량에 차이를 보여 균질한 품질의 공급에 어려움이 있다.

따라서 시호가 생성하는 유용성분을 보다 효율적으로 생산하고자 하는 목적으로 조직배양이 하나의 대안책으로 시도되었다. 그러나 탈분화된 세포에서는 물질생산이 거의 일어나지 않았으며 (Katakura et al., 1991), 기관배양인 부정근 또는 형질전환된 모상근 배양 등에서는 물질생산의 가능성은 확인하였으나 이 역시 자연산 재배뿌리에 비교하여 높지 않은 함량을 보였다 (Jo et al., 1990; Ahn et al., 1993). 그러나 뿌리배양의 경우 탈분화된 세포와 달리 뿌리형태 내 도관요소와 형성층 등 일반 어린뿌리 수준의 분화된 세포배열을 보이고 있고 (Webb et al., 1990; Ko et al., 1993), 인위적인 배양환경의 조절에 따라서는 사이코사포닌의 생산을 높일 수 있는 가능성을 보여 사포닌 생합성 과정 또는 뿌리 조직내 합성장소 등을 조사하는데 있어 좋은 실험재료가 될 것으로 추정되었다 (Ahn et al., 1999).

한편, 사이코사포닌은 뿌리 형성층의 바깥쪽 사부조직, 특히 내초와 그 주변의 유조직에 주로 분포하고 (Tani et al., 1986), 주근 보다는 측근에 높은 함량으로 존재한다고 보고된 바 있다 (Shon et al., 1997).

본 연구에서는 모상근 배양을 이용하여 배양성분중 주요 무기영양성분의 종류와 함량에서 큰 차이를 보이는 두 가지 배지, MS와 3RCM 배지조건 하에서 배양한 뿌리의 성장, 사이코사포닌 함량 및 뿌리 형태에서의 차이 등을 조사하여 무기영양성분의 차이가 뿌리생장과 사이코사포닌 함량에서의 차이로 나타나는지와 사이코사포닌 함량에서의 차이가 뿌리조직 내 세포 형태나 배열 등에서 차이의 상관관계 유·무를 알아보려 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 모상근은 안 등 (Ahn et al., 1993) 이 식시호 (*Buaplurum falcatum*) 를 재료로 *Agrobacterium rhizogenes* A4 균주 접종에 의해 유도한 모상근 중 선발된 line BFHR2를 실험재료로 사용하였다.

### 생장비 조사

시호 모상근의 생장비를 조사하기 위하여 MS (Murashige & Skoog, 1962) 배지와 대량 무기영양성분을 1/2로 희석한 1/2MS 배지, RCM (White & Nester, 1980) 과 대량무기영양원소를 2, 3배로 조정된 2RCM과 3RCM 배지를 사용하였다. 측정 방법은 각각 동일한 배지에서 2주동안 전 배양한 다음 모상근을 약 0.5g (생체중) 씩 무균적으로 절취하여 새로운 배지 (30mL/ 100mL Erlenmeyer flask) 에 이식한 후 6주간 배양하였다. 배양한 뿌리는 여과지를 사용하여 습기를 충분히 제거한 다음 생중량을 측정하고 48시간 동결건조하여 건중량을 측정하였다.

### 조직학적 관찰

모상근의 조직관찰을 위해서 MS 배지와 3RCM 배지에 상기한 조건에서 4주간 배양한 모상근을 뿌리 끝 0.2mm, 뿌리 끝 1cm 부근 및 뿌리 끝에서 떨어진 성숙한 부분을 각각 절취하여 재료로 사용하였으며, 채취한 재료를 2.5% glutaraldehyde- 2% paraformaldehyde (0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 6.8) 에 넣어 상온에서 3~4시간 고정하였다. 모든 재료는 1%  $O_3O_4$  (0.1 M sodium cacodylate buffer) 로 후 고정하고 acetone series로 탈수시켰다. 각 조직은 Spurr's 수지 (Spurr, 1969) 에 매몰하고 60°C에서 20~24시간 동안 중합한 다음 glass knife인 Porter-Blum MT-2 ultramicrotome으로 절단하였다. 절편은 0.05% toluidine blue로 염색하고 Olympus BH2로 관찰하였다.

### 사이코사포닌 분석

사이코사포닌의 추출은 200mg (건중) 을 2%

NaOH-MeOH 5mL에 넣고 20분간 sonication하여 추출하였고, 추출액은 Whatman (No. 2, 70 mm  $\phi$ ) 여과지로 여과한 다음 회전증발기에서 농축한다. 농축액은 H<sub>2</sub>O : ethyl ether (V : V)로 재 용해시켜 수층만을 수집하고 BuOH을 첨가하여 섞은 후 BuOH 층을 수확하여 질소가스를 사용하여 농축한다. 농축액은 1mL MeOH에 용해시켜 그 중 10 $\mu$ l를 HPLC 분석에 사용하였다.

HPLC 분석은 Waters 사의 injector (600), detector (486 Tunable absorbance), integrator (Autochro-WIN, Younglin)를 사용하였으며,  $\mu$ -Bondapak C18 column를 사용하여 실온에서 분석하였다. 용매로는 water : acetonitrile (7 : 3→3 : 7, 25min. linear gradient)를 사용하여 유속 1.1mL/min, column 온도 40 $^{\circ}$ C로 하여 205nm에서의 자외흡광도로 화합물을 검출하였다. 분석을 위해 사용한 사이코사포닌 a, c 와 d 표준품은 일본 Wako 사에서 구입하여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 생장비

시호 모상근은 대량 무기이온성분이 고농도인 MS 배지나 WP 배지보다는 오히려 대량 무기영양 성분이 저 농도로 함유된 RCM 배지에서 성장과 사이코사포닌 함량에서 가장 우수하다고 보고된 바 있다 (Ahn et al., 1999). 또한 RCM 배지를 시호 모상근 배양에 가장 적합한 기본배지로 설정하고 여러 가지의 대량 무기영양성분의 비를 1/2 ~ 8 배까지 조정 한 실험에서 2 또는 3배로 조정 한 배지에서 가장 높은 성장과 생산성을 확인하였다 (데이터 미 제시). 한편, Fig. 1에서 보는 것처럼 1/2MS (Fresh wt, 0.37; Dry wt, 0.01), MS (Fresh wt, 3.63; Dry wt, 0.28), 2RCM (Fresh wt, 2.67; Dry wt, 0.40) 및 3RCM (Fresh wt, 3.14; Dry wt, 0.44) 배지를 비교하였을 때 1/2MS 배지에서는 생장이 거의 일어나지 않은 반면에 MS배지에서 생중량이 가장 높았다. 그러나 건중량에서는 오히려 2RCM과 3RCM 배지에서 높아, 건중량에 대한 생중량의 비 (X 100)를 비교할 때 MS 배지와 3RCM 배지가 7.6%와 14%로 나타나 함수량에서 차이가

있고 또한 조직의 경도나 뿌리 성장형태 (예로 RCM 계열의 배지 보다 MS 배지가 측근 형성이 양호)에도 차이가 있었다 (데이터 미 제시).

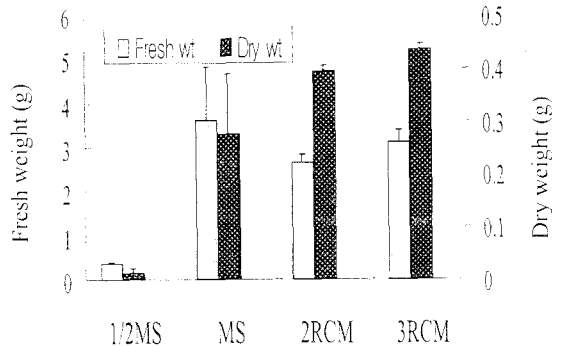


Fig. 1. The growth of *Buplurum falcatum* hairy root BFHR2 after 6 weeks culture in various liquid medium at 25 $^{\circ}$ C in the dark. Initial inoculum was 0.5g. Bars represent standard errors.

### 사포닌 함량

Fig. 2에서 보는 것처럼 MS 배지에서는 6주간 배양한 시료에서 사이코사포닌 a, c 및 d가 각각 0.03 $\pm$ 0.01, 0.06 $\pm$ 0.02 및 0.01 $\pm$ 0.00%로 총 함량 0.10 $\pm$ 0.02%인 반면에 3RCM 배지에서는 2.28 $\pm$ 0.14, 0.71 $\pm$ 0.20 및 1.14 $\pm$ 0.02%로 총 함량 4.13 $\pm$ 0.49%로 두 배지 사이에 현저한 차이를 나타내었다. 특히 3RCM 배지에서의 사이코사포닌 함량은 %함량을 기준으로 Shon et al. (1997)의 실험 결과 중 국내의 강원도 정선 (Sa, 0.62 $\pm$ 0.05; Sc, 0.38 $\pm$ 0.01; Sd 0.86 $\pm$ 0.08; total 1.86 $\pm$ 0.14)과 경기도 수원 (Sa, 0.33 $\pm$ 0.02; Sc, 0.18 $\pm$ 0.01; Sd 0.32 $\pm$ 0.05; total 0.82 $\pm$ 0.09)에서 재배한 1년 산 뿌리와 비교하여 각각 2.2배와 5.5배의 함량을 나타내었다. 이처럼 털뿌리 (root hair) 모양을 유지하면서 성장하는 배양뿌리가 고 함량을 보이는 것은, Tani et al. (1986)의 보고에서 시호 재배근 중 직경이 0.3 $\pm$ 0.1 mm인 털뿌리 부분, 1.0 $\pm$ 0.1 mm인 측근 및 8.4 $\pm$ 1.2 mm인 주근 상부의 사이코사포닌 함량이 각각 5.58 $\pm$ 1.71%, 1.89 $\pm$ 0.1% 및

0.54±0.09%으로 나타나 미세근에서 사이코사포닌 함량이 가장 높았던 것에 비교되는 결과로, 이는 주근 또는 뿌리 직경이 굵은 부분보다는 가는 뿌리에서 사이코사포닌 생합성이 활발함을 추정할 수 있다. 한편, 이러한 이유를 Tani et al. (1986)은 각 조직별 성분 분석을 통하여 형성층 안쪽의 목부보다는 형성층 바깥 쪽 사부에서 사이코사포닌 함량이 높아, 이는 목부/사부의 비에 따라 뿌리 부위별 함량 차이가 설명되었으며, 즉 주근 상부는 비가 크고 미세근 일수록 수치는 작은 것으로 보고하였다.

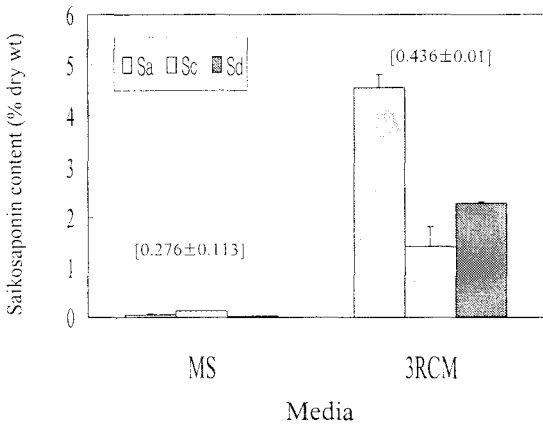


Fig. 2. Saikosaponins content (% dry wt) of *Buplurum falcatum* hairy root BFHR2 cultured in MS and 3RCM liquid media containing 3% sucrose concentration for 6 weeks at 25°C in the dark. Values in brackets show dry wt(g per 100 ml flask ± standard error). Initial inoculum was 0.5g Bars represent standard errors.

### 조직학적 관찰

배양액 중 MS 배지와 3RCM 배지의 대량 무기성분의 차이가 생장 형태, 함유물 및 사이코사포닌 생합성 능력에서 현저한 차이를 보이는 점에 착안하여 이러한 차이가 두 배양액에서 배양한 뿌리의 조직학적 차이와의 연관 여부를 알아보기로 하였다. 그림 3은 MS와 3RCM 배지에서 4주 배양한 뿌

리의 근단부(A, MS; B, 3RCM, x 200), 뿌리 끝 1 cm 부분(C, MS; D, 3RCM, x 200) 그리고 성숙대(E, MS; F, 3RCM, x 100)의 뿌리 조직을 보여주고 있다. 근단부의 경우 MS배지와 3RCM 배지 모두 형성층 내외를 구분할 수 없지만 유세포들의 크기가 일정하고 원주형으로 세포배열을 보이며 세포 내용물이 많아 짙은 염색을 나타내는 등 전형적인 근단 분열조직의 특징을 나타내었다. 3RCM의 경우 표피층 바깥쪽에 세포층이 있고 이들 세포층 일부의 탈리 현상이 관찰되었다. 뿌리 끝 1 cm 부분에서는 두 배지의 뿌리조직에서 분명한 피층과 유관속과의 경계가 분명하진 않으나 목부 사부의 발달이 시작되는 것을 관찰할 수 있으며 (▶, 목부;

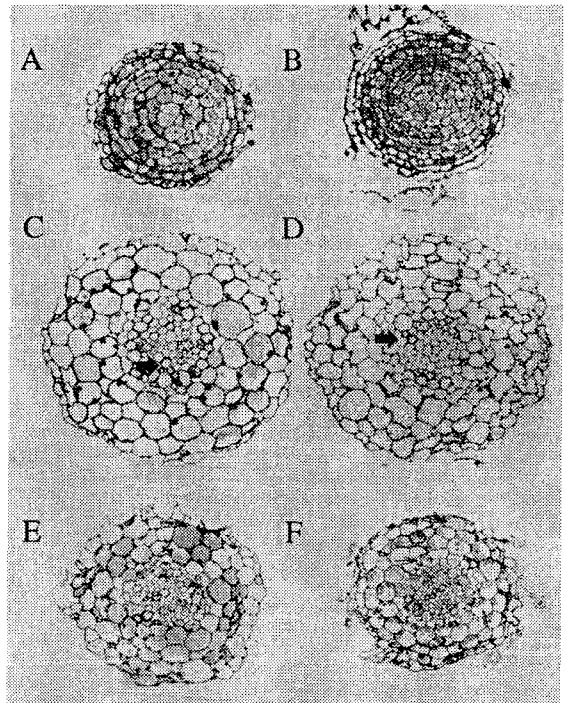


Fig. 3. Transverse sections of *Buplurum falcatum* hairy roots cultured in MS(A, root tip, x 200; C, 1 cm region from root tip, x 200; E, mature region of hairy root, x 100) and 3RCM(B, root tip, x 200; D, 1 cm region from root tip, x 200; F, mature region of hairy root, x 100) media.

⇒, 사부), MS 배지에서는 세포 간극이 있으나 3RCM 배지에서는 피층의 세포간 간극이 없는 것을 제외하고는 피층 유세포의 크기나 배열에서 큰 차이가 없었다. 한편 성숙대에서 3RCM 배지는 표피세포가 분명하고 털뿌리(root hair)의 발달이 간혹 일어나고 사부와 목부를 구성하는 세포들이 보다 조밀하고 세포의 염색이 진하게 되는 특징을 나타냈다. 특히 3RCM 배지에서는 표피층 세포를 제외한 거의 모든 세포에서 탄닌 축적 액포로 추정되는 진하게 염색되는 세포 소기관(→)이 관찰되었으나, MS 배지에서 배양한 시료에서는 이러한 염색 소기관이 거의 관찰되지 않았다. 이러한 차이가 MS배지와 3RCM 배지의 건중량/생중량의 비에 있어 차이를 설명할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 탄닌 성분의 다량 합성과 연관된 대사물질의 생합성이 활발한 것은 2차대사물질인 사이코사포닌 생합성 대사의 활성과도 연관이 있는 것으로 추정된다. 그렇지만 실험 전에 기대하였던 배양조건에 따른 특정 세포군의 발달이나 조직학적인 명확한 차이를 확인할 수 없어 뿌리 조직내 생합성 부위와 배양조건과 연관된 생합성 정도를 조직학적 비교로 결정하는 것은 어려웠으며, 이의 해결에는 Sa와 Sd의 항체 (Jung et al., 1998)를 이용한 in situ hybridization 등의 방법이 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

시호 모상근 배양에서 MS와 RCM 배지를 기본 배지로 하는 몇 가지 배지를 사용하여 성장과 사이코사포닌 함량을 비교하였으며, 그 중 MS와 3RCM 두 배지에서 보이는 성장과 성분 함량의 차이가 뿌리의 조직학적 차이와 연관이 있는지를 조사하였다. 모상근의 생장은 생중량은 MS배지가 건중량은 3RCM 배지가 각각 양호하였으며, MS와 3RCM의 건중량에 대한 생중량의 비가 각각 7.6%와 14%로 MS 배지가 함수량이 높았다. 사이코사포닌 함량은 MS배지에서는 극히 낮은 함량을 나타내었으나, 3RCM 배지에서는 총함량에서 국내 1년 산 재배근의 약 2.2~5.5배의 함량을 나타내었다. 한편, 두 배지에서 배양한 시료의 근단부와 뿌리끝

1 cm 부근에서는 조직학적인 큰 차이를 관찰할 수 없었으나, 성숙대에서는 MS 배지보다 3RCM 배지에서 목부 사부 세포들의 발달이 보다 뚜렷하고, 3RCM에서는 많은 세포에서 탄닌을 함유하는 것으로 추정되는 진한 염색의 액포 또는 세포 소기관이 관찰되었다. 따라서 이러한 세포 소기관의 발달은 사이코사포닌을 포함한 2차대사물질의 생합성과 연관이 있는 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 교육부 지원 과학기술기초중점연구비(99-015-D-00234)의 지원으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- Ahn, J. C., Y. W. Paek, C. K. Sung, G. H. Kang and B. Hwang. 1993. Production of saponin content by hairy root culture of *Bupleurum falcatum*. I. Comparison of saponin content and pattern in callus, adventitious root, hairy root and cultivated root. Korean J. Bot. 36 : 43-49.
- Ahn, J. C., E. S. Kim, H. J. Lee and B. Hwang. 1999. Effects of IAA and IBA on growth and saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum falcatum* hairy root culture. Korean J. Bot. 26 : 1-4.
- Arichi, S., H. Konishi and H. Abe. 1978. Studies on mechanism of action of saikosaponin effects of saikosaponin to hepatic injury induced by D-galactosamine. Acta Hepat. Japan 19 : 430-435.
- Jo, P. H., R. S. Seong, H. H. Bae, W. Y. Soh and D. Y. Cho. 1990. Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. Korean J. Pharmacogn. 21 : 205-209.
- Jung, D. W., M. Shibuya, Y. Ebizuka, K. Yoshimatsu, K. Shimomura and C. K. Sung. 1998. ELISA for the determination of saikosaponin a, an active component of *Bupleurum falcatum* radix. Chem. Pharm. Bull. 46 : 1140-1143.
- Katakura M., T. Kimura and I. Endo. 1991.

- Production of saikosaponin by tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. *Bioprocess Engineering* 7 : 97–100.
- Kim, K. S., N. S. Seong, Y. H. Chang, S. T. Lee, J. I. Lee, H. C. Oak and Y. A. Chae. 1995. Variation of plant characters and correlation analysis of its in *Bupleurum falcatum* L.. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 3 : 71–76.
- Ko, K. M., J. J. Song, B. Hwang and Y. H. Kang. 1993. Cytogenetic and histological characteristics of ginseng hairy root transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Korean J. Bot.* 36 : 75–81.
- Minami, M. and M. Sugino. 1995. Effects of mineral fertilizers on growth and saikosaponins content of *Bupleurum falcatum* L. (I) Effects of different levels of nitrogen, phosphoric acid and potassium on growth and saikosaponin contents of one-year-old plant. *Natural Medicines* 49 : 230–239.
- Minami, M., M. Sugino, M. Sadaoka, K. Ashida and K. Ogaki. 1995. Seasonal variation on growth and saikosaponin contents of *Bupleurum falcatum* L.. *Yakugaku Zasshi* 115 : 145–155.
- Mizukami, H., K. Matsunago, H. Ohashi, A. Amano, T. Maekawa and K. Fujimoto. 1991. Variation in saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* L. of different geographical origins. *Shoyakugaku Zasshi* 45 : 342–344.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473–497.
- Shibata M., R. Yoshida, S. Motohashi and M. Fukushima. 1973. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L.. IV. Some pharmacological effects of crude saikosides, saikogenin A and syrupy residue. *Yakugaku Zasshi* 93 : 1660–1667.
- Shon, T. K., A. D. G. Totok and T. Yoshida. 1997. Variation and distribution and saikosaponin in *Bupleurum falcatum* L.. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 42 : 17–22.
- Spurr A., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26 : 31–43.
- Tani, T., T. Katsuki, M. Kubo and S. Arichi. 1986. Histochemistry IX. Distribution of saikosaponin in *Bupleurum falcatum* root. *J. of Chromatography* 360 : 407–416.
- Tanaka, T., E. Sakai, M. Mizuno, T. Kawamura, Y. Hisata, K. Okuda, Y. Noro, X. Z. Zheng and F. Ding. 1988. Cultivation and saikosaponin contents of Guangxi *Bupleurum falcatum*. *Shoyakugaku Zasshi* 42 : 236–239.
- Webb, K. J., S. Jones, M. P. Robbins and F. R. Minchin. 1990. Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Science* 70 : 243–254.
- White, F. F. and E. W. Nester. 1980. Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 141 : 1134–1141.
- Yamamoto, M., A. Kumagai and Y. Yamamura. 1975. Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. (II). *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 25 : 1021–1023.
- Yamamoto, M. 1980. Biochemistry of *Bupleurum falcatum*. *Gendai Toyo Igaku* 1 : 41–44.
- Shibata, M. 1980. Pharmacological studies on *Bupleuri* Radix. *Gendai Toyo Igaku* 1 : 37–40.