藥作誌 (Korean J. Medicinal Crop Sci.) 7(4) : 275 ~ 281 (1999)

더덕의 체세포배로부터 식물체 재생과 사포닌 함량 변화

최명석*·최필선**

Plant Regeneration and Saponin Contents in *Codonopsis lanceolata* L.

Myung Suk Choi* and Pil Son Choi**

ABSTRACT : Embryogenic calli of *Codonopsis lanceolata* were cultured on MS agar medium containing various concentrations of sucrose as a carbon source. Upon transfer to MS basal medium, somatic embryos of cotyledonary stage converted to plantlets. When sucrose was added with greater than 4%, the number of shoots and roots regenerated from somatic embryo increased. However, the growth of shoots and roots was retarded in agar medium with more than 2% sucrose, but promoted in medium with lower concentration of sucrose. Saponin contents of shoots regenerated from somatic embryos, embryogenic calli, non-embryogenic calli, and native roots were determined by HPLC. Saponin contents of native root was variable, depending on regenerant, embryogenic calli, and cotyledonary embryos. The saponin contents of regenerated roots in medium with high sucrose was similar to native roots. Saponins content based on cell differentiation to shoot and root was dramatically decreased. This results could be effectively controlled for the production of useful secondary metabolites.

Key words : embryogenic calli, *Codonopsis lanceolata*, saponins, sucrose, HPLC, differentiation

緖　　論

식물 이차대사산물은 식품, 향, 염료, 의약품으로 오래전부터 이용되었으며, 식물 기내배양기술은 이러한 유용물질을 생산하는 효과적인 방법이 될 수 있다 (Verpoorte et al., 1993). 그러나 유용물질 생산에 기내배양기술이 적용되어진 식물은 많지만 산업화한 예는 거의 없다. 산업화의 장애요인은 물질을 생산하는 세포주의 수율이 모식물체에 비해 낮거나, 세포주의 생산성이 불안정하기 때문이다 (Misawa and Nikanishino, 1988).

세포주의 불안정성은 탈분화된 조직이 배양기간이 경과함에 따라 점차 세포가 분화하려는 특성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Suzuki et al., 1987). 식물세포로부터 생산되는 이차대사산물의 생합성능은 분화 조직과 탈분화조직에 따라 양적 질적으로 매우 다르다. 이차대사산물은 세포가 분

* 임업연구원 생물공학과 (Biotechnology Division, Forest Research Institute, Suwon 441 - 350, Korea)
** 국립환경연구원 환경위해성연구과 (Environmental Risk Accessment Division, National Institute of Environmental Research, Seoul, 122 - 030, Korea)
〈 '99. 9. 14 접수 〉

화함에 따라 생합성이 촉진되는 경우와 억제되는 경우로 크게 나눌 수 있다(Mantell and Smith, 1984). 세포분화에 따라 이차대사산물의 생산을 촉진하는 식물은 *Atropa belladonna* (Thomas and Street, 1970), *Papaver bractetum* (Kamimura and Nishikawa, 1976) 및 *Nicotiana tabacum* (Pearson, 1978) 등이 있으며, 물질생산능이 감소하는 예는 *Dioscorea deltoides* (Kaul et al., 1969), *Rauwolfia serpentina* (Stockgt et al. 1981) 등이 있다. 그러나 세포분화와 이차대사산물 생합성의 관계는 현재까지 확실히 구명되어 있지 않아 물질생산 향상을 위해서는 세포분화기작에 대한 체계적인 연구가 반드시 수행되어져야 할 것이다.

더덕은 초롱꽃과에 속하는 다년생 초본식물로, 주근은 한국, 일본 및 중국 등에서 주로 약용과 식용으로 이용되고 있다. 특히 최근에는 건강식품 및 채소작물로써 더덕의 이용성은 날로 증대되어지고 있으나 유용성분에 관한 자세한 연구는 거의 미비한 실정이다. 본 연구에서는 더덕의 체세포배로부터 식물체 재분화에 관여하는 sucrose의 영향을 밝히고, 더덕의 주성분인 saponin계 물질 함량변화를 측정하여 분화과정에 따르는 이차대사산물의 합성능을 조사하였다.

材料 및 方法

1. 배양재료 및 식물체 재생

더덕의 종자로부터 체세포배 발생은 Min 등(1992)의 방법으로 행하였다. 체세포배 발생을 통하여 얻은 자엽시기의 체세포배를 sucrose가 첨가되지 않은 MS고체배지(Murashige and Skoog, 1962)와 1, 2, 4, 8, 16 및 32% (w/v)가 첨가된 MS배지에 각각 10개씩 이식하여 3개월 동안 2000 lux, 25℃, 16시간 광주기하에서 배양하였다. 이때 모든 배지의 pH를 5.8로 맞추고, 121℃, 1.2기압에서 15분간 멸균한 후 87 x 15 mm 크기의 페트리디쉬에 절편을 치상하였다. 배양 3개월 후 체세포배로부터 얻어진 개체의 줄기수, 길이 및 생중량을 측정하였다.

Saponin계 물질 분석을 위해서 더덕의 성숙배로부터 유래한 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 분리하였고, 체세포배로부터 재분화된 식물체의 줄기와 뿌리 그리고 2년생된 실생뿌리를 각각 1그램씩 준비하였다.

2. Saponin계 물질 추출 및 분석

Saponin의 추출 및 분석은 Furuya 등 (1983)의 방법을 변형하여 행하였다. 분석하려는 샘플을 막자사발에 넣고 액체질소로 얼린 후 methanol 30ml를 첨가하면서 분쇄하였다. 추출샘플과 메탄올이 든 튜브는 3시간 동안 초음파 파쇄 하였고, 5000rpm으로 원심분리하고 상등액을 2회 추출하였다. 추출액은 40℃에서 감압농축하였고, 5ml의 증류수와 diethyl ether 5ml을 첨가하여 잘 혼합하고, 30분간 방치한 후 물층만을 취하여 다른 튜브에 옮겼다. 이 과정을 3회 반복하여 물층만을 모은 후 15ml의 포화 butanol을 첨가하고 잘 혼합하여 butanol층만을 취하였다. Butanol층을 감압농축한 후 200μl methanol로 녹여낸 후 0.45μm FH-type Millipore filter로 여과하고, Sepak C_{18} column (Waters Associates, USA)을 통과시킨 후 분석에 사용하였다.

Saponin계 물질의 TLC 분석은 silica plate (60F 254, Merck)에 10μl의 추출액을 점적하여 n-butanol-ethyl acetate-water (5 : 1 : 4)의 혼합으로 전개하였다. 분리된 saponin은 10% 황산용액과 vallinin 용액을 각각 분사한 후 105℃, 10분간 가열한 후 육안 및 254nm UV하에서 확인하였다.

HPLC분석은 인삼의 saponin 분석법을 약간 변형하여 행하였다. Lichrosorb-NH_2 column (250 x 4.6 m, 5μm)이 장착된 quarternery pump (Waters™ 600)에 acetonitrile, water, butanol을 80 : 20 : 10로 혼합한 용매를 분당 1.0 ml 속도로 용출하였고, 검출은 RI detector (Waters, USA)를 사용하여 행하였다. 이들 saponin계 물질의 정량은 각 분획을 분취하여 검량선을 작성하여 행하였다.

結果 및 考察

1. 식물체 재생에 미치는 sucrose의 영향

자엽시기의 체세포배를 여러농도의 sucrose가 첨가된 배지에 배양한 결과 처리구마다 각기 다른

반응을 보였다. 줄기의 발생수는 처리구간에 큰 차이를 보이지는 않았으며, 3% 처리에서 가장 높았다(Figure 1). 뿌리의 유도에 가장 적합한 sucrose의 농도는 8%로 9개의 뿌리가 유도되었으며, 줄기유도는 3% 처리구에서 개체당 약 5개 정도가 유도 되었다. 일반적으로 sucrose는 탄소원과 삼투안정제로 배양세포의 생장에 중요한 에너지 원이며, 그외에 다자엽 체세포배 형성을 촉진하기도 한다(Kageyama et al., 1990). 실제로, 더덕의 체세포배 발생캘러스를 여러농도의 sucrose가 첨가된 MS액체배지에서 배양할 경우, 저농도(0.5%이하)에서 보다 고농도(2%)에서 2개 이상의 자엽을 갖는 다자엽 체세포배가 많이 형성되었으며, 이러한 다자엽 체세포배를 조직학적으로 관찰 했을때 유경조직이 2개인 경우가 관찰 되었다(데이타 미제시). 본 연구에서 하나의 자엽기 체세포배로부터 2개 이상의 줄기가 발생된 결과는 2가지 가능성에 의해 해석될 수 있다. 첫째로 2개 이상의 유경조직을 갖는 비정상적인 체세포배를 시험재료로 이용 하였을 가능성과, 둘째로 배지에 첨가된 sucrose의 영향으로 각각 자엽기 체세포배로부터 2개 이상의 줄기가 발생한 것으로 추측된다. 그러나 sucrose농도에 의해 줄기와 뿌리의 발생수가

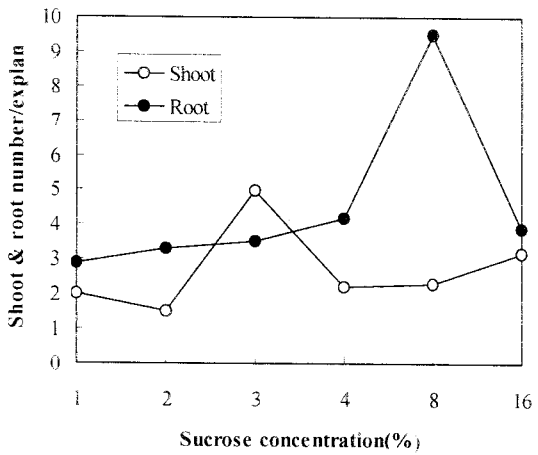

Fig. 1. Effect of sucrose concentration on shoot and root regeneration of cotyledonary somatic embryo of *Codonopsis lanceolata.*

현저한 차이를 보이고 있는 점으로 보아 비정상적인 체세포배의 이용 가능성 보다는 오히려 sucrose농도에 의한 영향으로 보는 것이 옳을 것이다. 이와같이 sucrose는 비정상적인 형태의 체세포배를 유도할 뿐 아니라, 체세포배로 부터 식물체로의 전이과정에서도 줄기와 뿌리의 발생수를 결정하는 중요한 요인이 될 수 있기 때문에(Kageyama et al., 1990) 식물세포 및 조직배양시 적정한 sucrose농도 첨가는 매우 중요함이 시사된다.

Sucrose는 재생된 줄기와 뿌리의 생장에도 영향을 미쳤다 (Figure 2). 4%까지는 뿌리의 생장이 증가하였으나, 그 이상의 고농도에서는 줄기의 길이가 감소하였다. 줄기의 생장은 3%까지는 증가하다가 그 이상의 농도에서는 급격히 감소하였다. 줄기의 생장에 가장 양호한 sucrose는 3%로 평균 16cm 정도의 생장을 보였으며, 뿌리의 생장은 4% 처리구에서 12cm로 가장 좋았다.

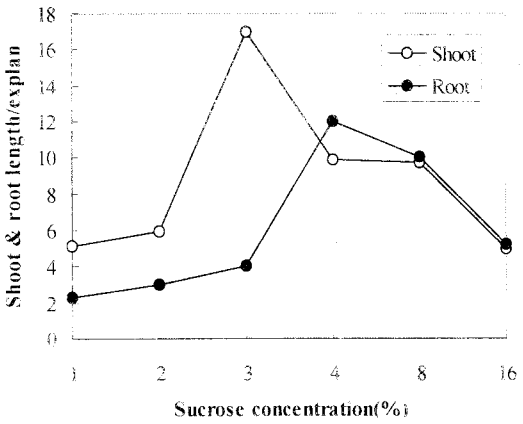

Fig. 2. Effect of sucrose concentration on the length of shoot and root in plantlets regenerated from cotyledonary somatic embryo of *Codonopsis lanceolata.*

개체당 줄기와 뿌리의 생중량에 미치는 sucrose의 영향을 조사한 결과, 저농도(0~2%)에서 보다는 고농도(4~8%)에서 생중량이 높았다(Figure 3, 4). 줄기의 생중량은 2%이상에서 급격히 증가하다가 4%이상의 농도에서는 감소하였다.

뿌리의 생중량도 2%농도 이상에서는 급격히 증가하다가 4%농도에서 최고생장을 보이다가 8%부터

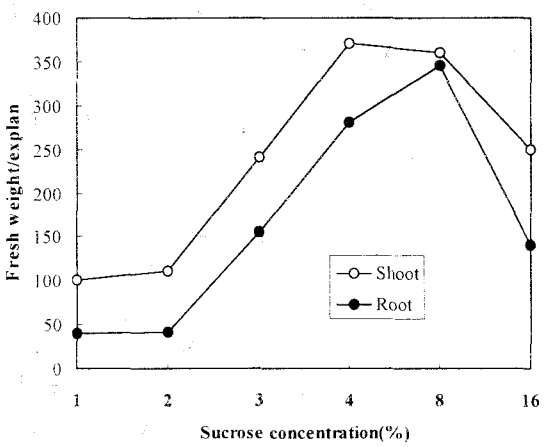

Fig. 3. Effect of sucrose concentration on fresh weight of cotyledonary somatic embryo of *Codonopsis lanceolata*.

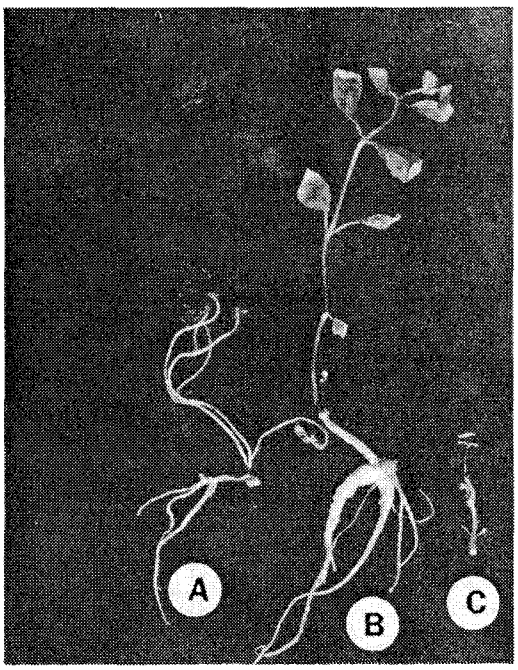

Fig. 4. Plants regenerated from somatic embryos on MS basal medium containing no sucrose (A), 8% sucrose (B), and 32% sucrose (C).

는 감소하였다. 이상의 결과로 미루어 볼때 sucrose 첨가는 체세포배로부터 줄기와 뿌리의 수뿐 아니라 생중량을 증가 시키는데는 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다. Jay-Allemend와 Cornu (1986)는 호도나무의 접합배의 뿌리생장에는 8% 농도에서 증가하였고, 배발육은 16%농도까지 증가하였다고 하였다.

2. Saponin계 물질 함량 분석

2년생 자연산 더덕뿌리 및 배발생 캘러스, 자엽기의 체세포배, 재분화 개체의 줄기와 뿌리 조직의 추출물을 TLC로 분리하고 vanillin-sulfuric acid 용액에 반응시킨 결과 연분홍색으로 나타나 saponin의 존재를 확인할 수 있었다 (데이타 미제시). 더덕의 화학적 구성물은 인삼과는 다른 것으로 알려져 있다. Wong 등(1983)은 중국산 더덕 뿌리 추출물을 TLC한 결과 12가지의 화합물이 분리되고, 이들 중 4가지 물질이 인삼과 유사하다고 하였고, 나머지는 상이하다고 하였다. 더덕의 saponin 물질은 teraxeryl acetate, friedelin, taraxorol로 알려져 있으며, 미량의 alkaloids, neolignan 배당체와 같은 lignan 성분이 밝혀져 있다(Woung et al., 1983; Yuda et al., 1990). 각 조직으로부터 정제된 추출물은 HPLC로 분리하고 vanillin-sulfuric acid 용액에 반응시킨 결과 모두 saponin계 물질로 나타났다. HPLC 결과 각 시료간의 차이는 있지만 대체로 10개 정도의 물질이 검출되었다(Figure 5). 본 연구에서 분석된 더덕 saponin은 butanol가용성 saponin으로 물층으로 이행되는 saponin들은 정량 대상에서 제외하였다.

Figure 6은 2년생 자연산 더덕 뿌리와 여러농도의 sucrose가 참가된 배지에서 재분화된 뿌리에서의 saponin계 물질 함량을 비교한 것이다. Saponin계 물질의 함량은 sucrose 처리구간에 큰 차이를 보였으며, 각 saponin계 물질간에도 함량 차이를 보였다. 자연산 뿌리와 다양한 sucrose농도에서 분화된 식물체간에도 saponin계 물질의 함량 차이를 보였다. Saponin계 물질의 함량은 2% sucrose 농도까지는 실생뿌리에 비해 다소 적었으나, 4% 이상부터는 전반적으로 높았다. 4%에서는 특히 Fr 3이 8.6배로 높았으며, 8%에서는 Fr

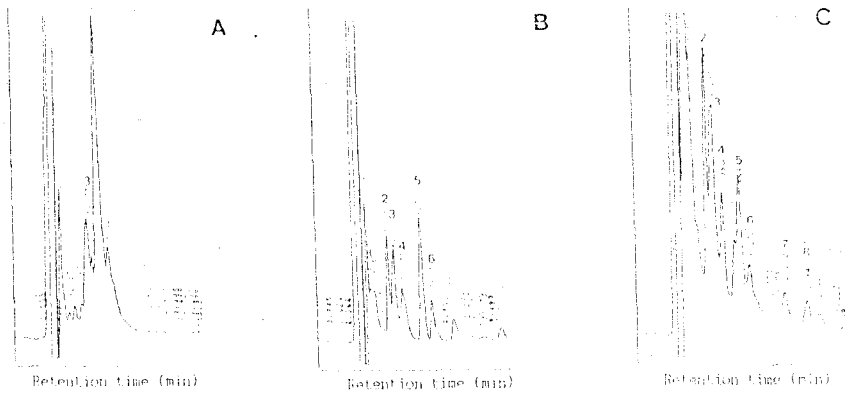

Fig. 5. HPLC chromatogram of isolated saponins. A : embryogenic calli, B : regenerated root, C : native root, No. 1-8 : saponin fraction, HPLC condition (column : Lichrosorb NH_2, injection volume : 10ul, detector : RI)

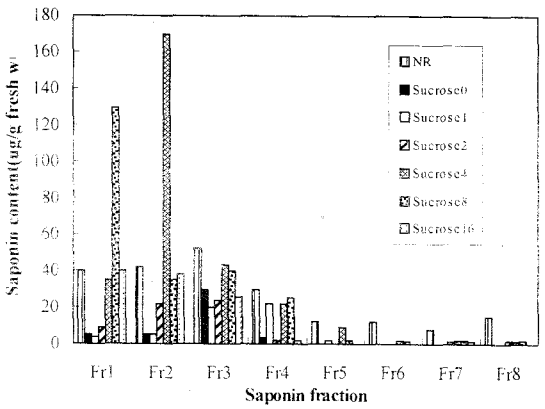

Fig. 6. Saponin content of on sucrose concentration on shoot and root regeneration of cotyledonary somatic embryo of *Codonopsis lanceolata.*

1이 실생뿌리에 비해 약 7배로 현저히 높았다. 전체 saponin계 물질의 함량이 가장 높았던 처리구는 4%로 나타났다.

Sucrose 고농도 배지에서 재분화된 뿌리의 saponin계 물질의 함량이 실생뿌리 보다 높은 것은 매우 주목할만 하다. 일반적으로 세포배양에서 sucrose의 첨가는 세포의 biomass나 이차대사산물의 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Fowler and Stepan-Sarkissian, 1985). 세포내에서 sucrose의 흡수는 가수분해에 의하거나, 비가수분해에 의해 흡수되는 것으로 알려져 있다. 식물조직배양 시 첨가해 주는 sucrose는 식물세포내로 들어오면 세포벽에 위치한 invertase에 의해 fructose와 glucose와 같은 단당류로 가수분해되거나, cytosol에서 단당류로 분해되어 식물이 이용하게되는 것으로 알려져 있다. 더덕의 체세포 유래 식물체를 고농도의 sucrose 함유 배지에 3개월간 배양하였을 때 saponin계 물질의 함량이 증가한 것은 앞서 언급한 식물세포배양의 경우와 맥락을 같이 하는 것으로 사료된다.

Figure 7은 2년생 뿌리 및 각 배양조직에서 saponin계 물질의 함량을 비교한 것이다. 배발생 캘러스(EC)와 비배발생 캘러스(NC) 간의 saponin계 물질의 함량 차이를 비교한 결과 이들 물질의 함량은 비배발생 캘러스에서 높았다 (Figure 7). 배발생 캘러스와 재분화 개체간의 saponin계 물질의 함량은 재분화 개체가 월등히 높게 나타났다. 재분화 개체의 뿌리와 자연산 더덕의 뿌리의 saponin계 물질의 함량은 비슷하게 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 더덕은 세포가 분화됨에 따라 saponin계 물질 생합성이 억제되다가 식물체의 형태가 갖추어지면 물질의 생합성이 증가한다고 판단되어진다. 그러나 본 연구에서 구명한 saponin계 물질은 대체로 뿌리에서는 많이 존재하

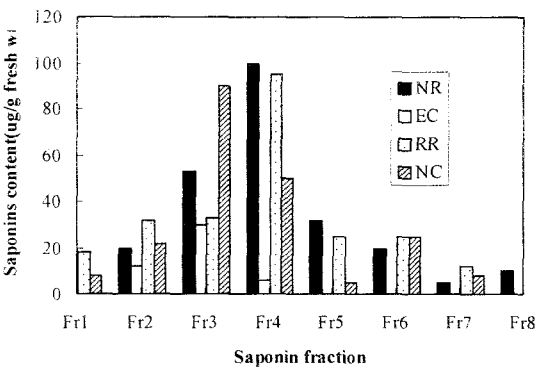

Fig. 7. Saponin contents in native root (NR) and regenerated root cultured on MS basal medium containing various concentration of sucrose. (NR : native roots, EC : embryogenic callus, RR : Regenerated Root, and NE : non-embryogenic callus)

지만 캘러스와 같은 미원시세포에서는 적게 함유된 것을 볼 수 있다.

식물조직은 배양기간이 경과하면서 점차 분화하려는 특성을 가지고 있다. 이러한 세포분화(cytodifferentiation)와 물질생합성과의 관계는 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있지만 아직 분명치 않다. 지금까지의 연구 결과는 분화된 조직에서 이차대사산물의 생합성능이 일반적으로 낮아지는 것으로 보고되어지고 있다 (Endress, 1992). Sharma와 Khanna (1980)에 의하면 *Dioscorea deltoides*와 *Agave wightii*의 탈분화 조직에서 steroid sapogenin의 함량이 건물중 당 1-2%인데 반해 분화된 조직에서는 거의 검출되지 않았다고 보고한 바 있다.

분화된 조직에서 물질 생합성능이 낮아지는 것은 물질생산에 관여하는 효소나 기질이 존재부위(compartmentation)가 다르거나 생산물의 세포내 저장장소가 다르기 때문으로 보인다(Butcher, 1977). 더덕의 경우에도 saponin계 물질의 종류에 따라서 다소 차이는 있지만 체세포배로부터 분화된 뿌리의 물질 함량이 같거나 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 더덕은 유용한 약용식물임에도 불구하고, 생리활성에 대해서는 인삼 등에 비해 매우 적게 연구가 수행되었다. 그러나 더덕의 saponin을 비롯한 유용물질의 존재는 항암 효과, 항피로 효과, 고혈압 치료 효과 등 생체 대사에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 유용물질을 더덕의 자연산 뿌리와 재분화 개체에서 확인함으로써 자연 상태의 재배 기술에 의존하지 않고, 모상근배양 및 세포배양과 같은 기내배양기술을 이용하여 다량 획득하는 것이 가능할 것이다. 앞으로의 연구는 배양체에서의 분리된 saponin들을 화학구조를 확인하고 생리활성에 관한 연구를 수행할 예정이다. 또한 세포분화기작과 이차대사산물의 생합성의 관계를 연구하여 물질 생산 효율을 높여야 한다. 이상의 결과로 미루어보아 더덕의 체세포배로부터 줄기재분화에는 배지내 첨가해주는 sucrose의 영향이 매우 크며, 이러한 결과는 약용식물의 기관분화에 기초자료를 제공하여 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 세포분화에 따른 물질생산과의 관계를 구명하여 물질 생산을 효율적으로 행할 수 있을 것으로 기대된다.

摘　　要

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)의 자엽기의 체세포배는 생장조절제를 함유하지 않은 MS고체배지에 배양하였을 때 완전한 식물체로 분화되었다. 체세포배로부터 줄기 재분화에는 2% sucrose가, 뿌리의 분화에는 8% sucrose가 가장 좋았다. 줄기의 생장은 2% sucrose가, 뿌리의 생장은 4% sucrose 농도에서 가장 좋았다. 자연산 더덕뿌리, 재분화 개체의 뿌리, 배발생 캘러스, 비배발생 캘러스에서의 saponin계 물질의 함량을 HPLC로 조사한 결과 각 조직간의 물질 함량은 커다란 차이를 보였으며, 고농도의 sucrose 함유 배지에서 재분화된 뿌리의 saponin계 물질의 함량은 자연산뿌리와 비슷하였다. 세포분화가 진행됨에 따라 saponin계 물질의 함량은 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 식물의 유용물질 생산에 효율적으로 활용될 수 있을 것이다.

LITERATURE CITED

Butcher, D. N. 1977. Secondary products in tissue

cultures. In. J Reinert and Y. P. S. Bajaj, eds, Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture, Springer-Berlag, Berlin, p. 668 - 693.

Fowler, M. W. and Stephan-Sarkissian 1985. Carbohydrates source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. *In* D Neumann, ed, Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer-Verlag, Berlin, p. 135.

Furuy, A. T., T. Yoshikawa, T. Ishii, and K. Kajii. 1983. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. Plant Med. 47 : 200 - 204.

Endress, R. 1994. Plant cell as producers of secondary compounds. In. R. Endress, ed, Plant cell biotechnology. Springer-Verlag, p. 121 - 255.

Jay-Allemnd, C. and D. Cornu. 1986. Culture in vitro d'embryons isoles de noyer commun (*Juglans regia* L.) Ann. Sci. For. (Paris) 43 : 189 - 198.

Kageyama, K., T. Komatsuda, and K. Nakajima. 1990. Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. Plant Tissiue Culture Lett. 7 : 108 - 110.

Kamimura, S. and M. Nishikawa. 1976. Growth and alkaloid production of the cultured cells of *Papaver bractetum*. Agric Biol Chem 40 : 907 - 911.

Kaul, B., S. J. Stohs, and E. J. Staba. 1969. *Dioscorea* tissue cultures. III. Influence of various factors of diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cultures. Lloydia 32 : 347 - 359.

Mantell, S. H. and H. Smith. 1984. Production of commercially useful compounds by plant cell cultures. In. S. H. Mantell. and H. Smith, Plant biotechnology, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 1 - 75.

Min, S. R., S. G. Yang, J. R. Liu, P. S. Choi, and W. Y. Soh. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Codonopsis lanceolata*. Plant Cell Rep. 10 : 621 - 623.

Misawa, M. and T. M. Nakanishio. 1988. Antitumor compounds. Production by plant cell culture. In. Y. P. S. Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 199 - 207.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant 15 : 473 - 497.

Pearson, D. W. 1978. Nicotine production by tabacco tissue cultures. Ph. D. Thesis, Nottingham Univ.

Sharma, R. 1985. Yearly review : Phytohormone regulation of enzyme activity in higher plants. Phytochem. Photobiol. 41 (6) : 747.

Stockigt, J., A. Pfizer. and J. Firl. 1981. Indole alkaloids from suspension cultures of *Rauwolfia serpentinna* Benth. Plant Cell Rep. 1 : 36 - 39.

Suzuki, M., K. Nakagawa, H. Fukui, and M. Tabata. 1987. Relationship of berberine-producing capability between *Thalictrum* plants and their tissue cultures. Plant Cell Rep. 6 : 260 - 264.

Tomas, E. and H. E. Street. 1970. Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar lactea Doll. Annals of Botany 34 : 657 - 669.

Verpoorte, R., R. Van Der Heijden, J. H. C. Hoge, and H. J. G. Ten Hoopen. 1993. Regulation of secondary metabolism in plant cell cultures of some terpenoid indole alkaloid production plant species. *In.* Soh, W. Y., J. R. Liu, and A. Komamine, eds, Adv. in Developmental Biology and Biotech. of Higher Plants, pp 439 - 453.

Wong, M. P., T. Chiang, and M. Chang. 1983. Chemical studies on danshen the root of *Codonopsis pilosula*. Planta Med. 49 (1) : 60.

Yuda, M., K. Obtani, K. Mizutani, R. Kasai, O. Tanaka, M. Jia, Y. Ling, X. Pu, and Y. Saruwatari. 1990. Neolignan glycosides from roots of *Codonopsis tangshen*. Phytochem. 29 (6) : 1989 - 1993.