

오미자의 형질전환된 근으로부터 리그난 화합물의 검출

황성진*† · 표병식* · 황 백**

*동신대 식품생물공학과, **전남대 생물학과

Detection of Lignans from Transformed Root Cultures of *Schisandra chinensis* Baillon

Sung Jin Hwang*†, Byoung Sik Pyo*, and Baik Hwang**

*Dept. of Food & Biotechnology, Dongshin Univ. Naju 520-714, Korea.

**Dept. of Biology, Chonnam Natl. Univ., Gwangju 530-757, Korea.

ABSTRACT : Transformed roots of *Schisandra chinensis* were obtained following co-cultivation of *in vitro* cultivated plantlet segments with *Agrobacterium rhizogens* ATCC15834. This root was examined for its growth and gomisin J contents under various culture conditions. Among the six basal culture media tested, WPM (Lloyd & McCown, 1980) medium supplemented with 5% sucrose was the best roots growth 6.2 (g D.W./flask) and gomisin J accumulation 1.56 ($\times 10^{-3}$ ug/g D.W). Initial inoculum size correlated with the yield of biomass while gomisin J contents was not affect. Gomisin J production was influenced by the initial sucrose concentration and the highest production yield was achieved at the concentration of 7%. The optimal shaking speeds for roots growth and gomisin J production was 120 and 140 rpm, respectively.

Key words : *Schisandra chinensis*, transformed root cultures, gomisin-J

서 언

오미자 (*Schisandra chinensis*)는 중국, 대만, 일본, 그리고 한국에 자생하는 자원식물로 관상용 또는 약용을 목적으로 널리 재배되어지고 있다. 민가나 한방에서는 주로 열매를 음경 (陰莖), 해수 (咳嗽), 단독 (丹毒), 자양 (滋養), 수검 (收檢), 수체 (瘦體) 등의 약제로 사용하고 있다. 오미자에서 생합성되는 주요 약리성분으로는 citrol, schizandrin, schizandrol, r-schizandrin, gomisin A-H, gomisin J, gomisin K, gomisin O, angeoylgomisin Q, pregomisin 등이 있으며, 이들은 항산화작용, 간장해역제작용, 항암작용, 항균작용, 그리고 중추신경계에 있어서의 작용을 하는 것으로 알려지고 있다 (Hancke *et al.*, 1999).

다양한 형질전환 기술과 분자생물학적 기법, 식물조직배양기술등을 이용하여 자원식물로부터 고부가치의 약리물질을 생산하려는 연구전략은 생태환경에 의존적인 기존의 노지재배나 인위적인 유기합성등의 한계점을 극복할 수 있을뿐만 아니라 생물변환 (biotransformation)을 통한 특정 물질의 획득이나 식물조직 자체를 일종의 생체반응기시스템으로 활용하여 저비용으로 고부가가치 약리물질을 생산해내는 산업화기반기술로써 인식되어지고 있다. *Agrobacterium rhizogenes*는 토양에 서식하는 그램음성 세균으로 식물호르몬과 아미노산유도체의 생합성에 관련된 유전자를 포함하는 T-DNA를 숙주식물의 게놈내로 전이시켜 부정근 (일명 모상근이라 부름)을 유도하는 것으로 알려지고 있다 (Chilton *et al.*, 1982; Brillanceau *et al.*, 1989). *A. rhizogenes*에 의해 형질전환된 부정근은

† Corresponding author : (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com

Received July 16, 2004 / Accepted November 6, 2004

세포내 호르몬의 생합성량의 급격한 증가로 인해 형태적으로 매우 가늘고 분지화가 급속히 이루어지는 특징을 보여준다. 이와같이 정상적인 뿌리에 비해 빠른 성장속도는 배양과정에서 배가시간 (doubling time)을 현저하게 단축시키게 됨은 물론 세대간 유전적인 안정성이 유지되고, 이차대사물질의 생합성능 또한 탈분화된 배양세포에 비해 매우 높기 때문에 약용자원식물로부터 유용물질을 얻는데 널리 활용되어지고 있다 (Chilton *et al.*, 1982; Hamill *et al.*, 1987; Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993; Arellano *et al.*, 1996). 형질전환된 뿌리의 배양을 통한 천연약리소재의 생산은 탈분화된 체세포조직을 이용할 때와 달리 배지내에 합성호르몬을 첨가할 필요는 없지만 물질의 생산성을 극대화 하기 위해서는 기본적으로 다양한 물리화학적 배양조건들 가령, 배지성분, 초기 pH, 온도조건, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조건에 대한 검토가 필요하다.

본 연구에서는 국내에 자생하는 오미자에 대한 형질전환을 통하여 부정근을 유도하고, 이를 배양하여 약리효과가 입증된 단리물질인 gomisin J의 생합성을 검정함으로써 오미자로부터 생합성되는 특정 약리소재의 대량생산을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 형질전환

기내 (*in vitro*)에서 무균발아 후 8주 정도 자란 오미자의 유묘의 각 부위를 절취한 후 감자추출물배지에서 24시간 동안 배양된 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834와 36시간 암소 (25±1°C)에서 공조배양 하였다. 균이 감염된 조직절편은 무균수에서 2회 세척 후 300 mg/cefotaxime sodium (Claforan, Handok Pharm., Korea)이 첨가된 1/2MS배지에 치상 하였다 (Hwang *et al.*, 2002).

2. 형질전환근의 증식

공조배양된 조직절편으로부터 유기된 부정근은 절취하여 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2MS배지에 300 mg/cefotaxime sodium이 첨가한 기본배지에 치상한 후 4주 동안 배양하면서 균을 완전히 제거한 후 정단부위로부터 1.5 cm 가량을 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige & Skoog, 1962) 고형배지로 옮겨 증식 시켰다. 한편, 숙주식물의 조직절편으로부터 유기된 부정근에 대한 형질전환 유무는 opine분석과 PCR 방법을 이용하여 확인하였다 (Hwang *et al.*, 2002).

3. 형질전환근의 배양

형질전환된 뿌리의 성장과 물질의 생산성을 극대화 할

수 있는 배양조건을 찾기 위해서 기본배지로는 MS배지, 1/2MS배지, MS배지의 미량원소를 B₅배지의 성분으로 교체한 MB5배지, WPM (Lloyd & McCown, 1980)배지, B5 (Gamberg *et al.*, 1968)배지, 그리고 N₆배지 (Chu *et al.*, 1972)를 사용하였으며, 배지내 탄소원의 농도는 1%부터 7%까지 처리 하였다. 또한 초기접종 농도에 의한 영향을 확인하기 위하여 정단부위를 중심으로 0.1, 0.5, 1, 2 g (F.W)을 각각 절취하여 40 ml 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종하였다. 모든 배양은 80, 100, 120, 140 rpm 속도로 진탕배양기 (26±1°C) 내에서 수행하였으며, 2주간격으로 1/3 가량을 새로운 배지로 교환 해주었다.

4. 세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 8주 동안 배양된 형질전환근을 여과지에서 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량 (F.W)과 냉동건조기에서 48시간 건조한 후 측정된 건물중량 (D.W)으로 나타내었다.

5. 물질분석

오미자의 형질전환근으로부터 리그난 성분의 분석은 8주 배양된 뿌리를 수집하여 냉동건조 후 막자사발에서 마쇄한 다음 분말시료 0.5 g에 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 가열하여 추출하였다. 3회 연속 같은 방법으로 얻은 메탄올 추출물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 Table 1과 같은 조건하에서 HPLC (Shimazu, Tyokyo, JAPAN)를 이용하여 분석하였다. 이때 gomisin J의 표준시료는 임업연구원에서 단리한 것을 분양 받아 사용하였다.

Table 1. Operational conditions of HPLC for analysis of Gomisin J in suspension cell cultures of *Schisandra chinensis*.

Instrument	HPLC (Shimazu, Tokyo, Japan)
Column	Cellpak C18
Mobile phase	Acetonitrile : water (1:1)
Flow rate	1 ml/min.
Detection	UV 252 nm
Sensitivity	0.05 AUFS

6. 통계처리

통계처리는 SAS (Statistical analysis system) package를 이용하여 ANOVA test를 시행한 후 유의수준 p<0.05 범위에서 결과들의 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

기내 (*in vitro*)에서 발아된 유묘는 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에서 8주간 배양한 다음 뿌리를 제외한 줄기와 잎을 절취하여 Ri-plasmid를 갖는 *A. rhizogenes* ATCC15834를 처리하였다. 균과의 동조배양 시간을 24시간에서부터 72시간까지 늘려가면서 처리하였을 때 36시간 동조배양한 실험구에서 부정근이 유기되었다. 동조배양 시간이 48시간 이상 주어질 경우 식물조직의 괴사현상이 심하게 나타나 상처부위의 재생능력이 크게 감퇴하였다. *Agrobacterium* spp.에 의한 형질전환율은 접종방법, 박테리아의 종류, 숙주식물체의 유전적 특성이나 조직의 상태, 배양조건과 같은 다양한 요인들에 의해 차이를 나타낸다 (Failla *et al.*, 1990). 오미자의 조직절편으로부터 부정근의 유기율은 10% 이하로 매우 낮았으나 형성된 부정근의 90% 이상에서 opine의 생합성과 계놈내 T-DNA의 삽입을 확인할 수 있었다 (data not shown). 조직절편으로부터 유기된 부정근은 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/2MS배지로 옮겨 초기 배양을 행하였다. 야생형 *A. rhizogenes* 균주에 의해 형질전환된 부정근의 경우 대부분 성장속도가 매우 빠르고 분지화가 지속적으로 이루어지기 때문에 형태상으로 뿌리의 굵기가 매우 가늘며 배가시간이 1일에서 일주일 정도로 나타나는 게 일반적인 특징이다 (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993; Arellano *et al.*, 1996). 그러나 오미자의 형질전환된 부정근의 경우에는 성장속도가 매우 느리고 분지화가 활발하지 않은 반면 성장부의 직경은 1 mm 가량으로 비대한 편이었다 (Fig. 1). 형질전환근의 성장과 이차대사물질

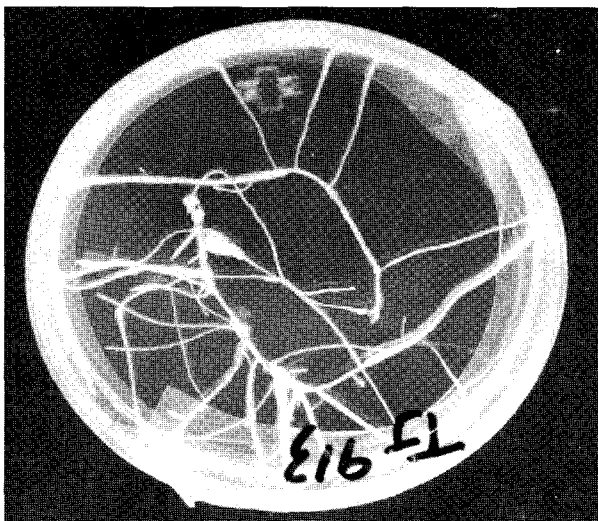


Fig. 1. Transformed roots of *S. chinensis* cultured on hormone-free WPM medium.

의 생산성을 극대화하기 위해서는 세포의 현탁배양에서처럼 적절한 배지의 선택이 무엇보다도 중요하다 (Sakato & Misawa, 1974; Giri *et al.*, 1997; Giri & Narasu, 2000). Nussbaumer 등 (1998)은 *D. candida* X *D. aurea*의 형질전환근의 배양에서 3종의 기본배지들 중 무기염의 농도가 MS배지에 비해 낮은 B₅배지에서 alkaloids의 생산성과 최적 성장을 유도한 바 있다. 오미자의 경우 고형배지에서 일차적으로 증식된 형질전환근을 근단 부위로부터 1.5 cm 가량 절취하여 MS배지, 1/2MS배지, MB5배지, WPM배지, B₅ (Gamberg *et al.*, 1968)배지, 그리고 N₆배지의 성분이 들어있는 액체배지에 0.5 g (F.W) 씩을 각각 접종하였다. 암소에서 8주동안 배양한 후 건물중량을 조사한 결과 6종의 배지들중 WPM배지에서 flask당 6.2 g (D.W)으로 성장률이 가장 좋았다 (Fig. 2). 그러나 gomisin J의 함량은 MS배지와 WPM배지 모두에서 유사한 결과를 보여주었다 (Fig. 3). 한편, 초기 접종농도에 의

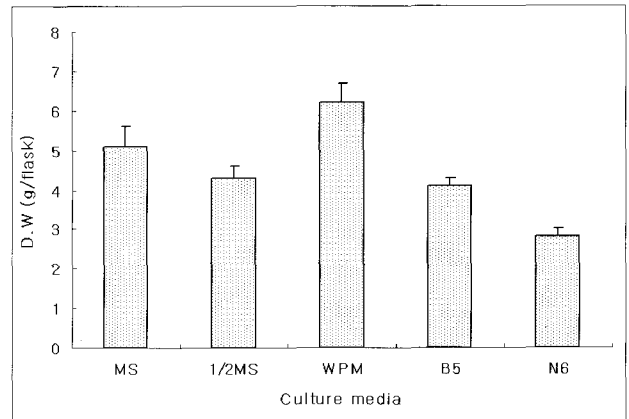


Fig. 2. Effects of culture media on growth of transformed root in shake flask cultures of *S. chinensis*.

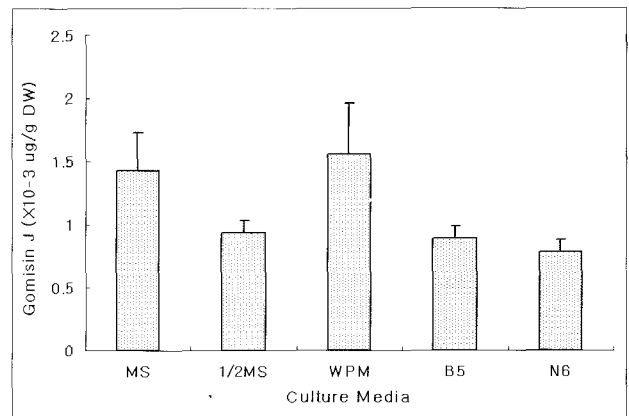


Fig. 3. Effects of culture media on gomisin J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots.

오미자의 형질전환된 근으로부터 리그난 화합물의 검출

한 형질전환근의 성장곡선 변화에 따른 생중량의 차이를 확인하기 위해 40 ml 배지에 0.1 g (F.W)에서부터 2 g (F.W)까지 접종하였다. 0.1 g을 접종한 실험구를 제외하고 모든 실험구에서 8주 후 생중량의 비교에서 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 또한, 초기 접종 농도가 물질의 생산성에 있어서 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (data not shown). 세포현탁배양에서는 초기접종 농도가 생중량이나 물질의 생산성에 영향을 미치는 경우가 많으나 (van Gulit *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1995), 형질전환근의 경우 초기접종에 사용하는 부정근의 수나 배지의 양 보다는 정단부위를 포함한 부정근의 길이에 의해 건물중의 차이를 가져오기도 한다 (Bhadra & Shanks, 1993).

배지에 다량으로 첨가하는 탄소원은 광합성능이 거의 없는 세포나 뿌리와 같은 기관배양에 있어서 중요한 에너지원인 동시에 삼투조절에 관여하기 때문에 세포의 증식은

물론 이차대사물질의 생합성에 영향을 주게 된다 (Do & Cormier, 1990; Mukherjee *et al.*, 1991). 오미자의 경우 WPM 기본배지에 sucrose의 농도를 1%부터 7%까지 처리 한 결과 건물중은 5%에서 gomisin J는 7%에서 각각 가장 높게 나타났다 (Fig 4, 5). 현탁배양시 배지에 첨가하는 탄소원의 농도는 배양조직의 상태나 배양목적에 따라 1%에서부터 12%까지 매우 다양하다 (Misawa, 1985; Knobloch & Berlin, 1980; Berlin *et al.*, 1983). Nussbaumer 등 (1998)은 *D. candida* X *D. aurea*의 형질전환근 배양에서 5% 농도로 sucrose를 처리할 경우 3% 처리구에 비해 건물중량이 두배이상 증가하기도 하였으나, 물질의 생산성에 있어서는 유의적인 차이를 확인하지 못했다. Nin 등 (1997)은 *Artemisia absinthium*의 형질전환근의 배양에서 4% sucrose 처리가 형질전환근의 성장에 최적임을 확인한 바 있었으나, sucrose의 농도를 3% 이상 높였을 때 오히려 형질전환근의 성장이 저하되거나 분지화가 억제 되면서 캘러스화되는 현상을 보이는 경우도 있다 (Hamill *et al.*, 1986; Nguyen *et al.*, 1992).

액체배양에 있어서 교반속도는 산소의 공급을 원활하게 하여 세포조직의 성장을 촉진시켜주는 물론 시료와 배양용기 사이에 마찰 (shear stress)에 의한 자극으로 이차대사물질의 생합성을 촉진 시키는 효과를 주게 된다 (Zhong *et al.*, 1992). Wu 등 (2003)은 세포의 현탁배양에서 물질 생산성을 위해 150 rpm까지 교반속도를 높여 줄 필요가 있다고 한 바 있다. 오미자의 형질전환근의 성장과 gomisin J의 생산성은 140 rpm이상에서 감소하는 경향을 보여주었으며, 초기성장을 위해서는 80~100 rpm의 속도로 유지하고 물질의 생산성을 높이기 위해 130 rpm까지 점차 속도를 높여주는게 바람직 할 것으로 보였다 (Fig. 6, 7).

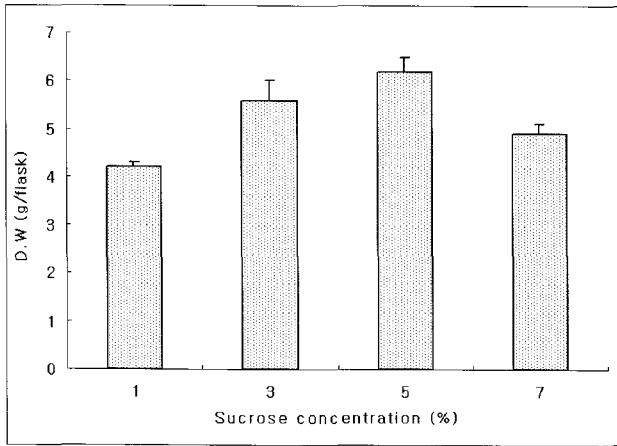


Fig. 4. Effects of sucrose concentration on transformed root growth in shake flask cultures of *S. chinensis*.

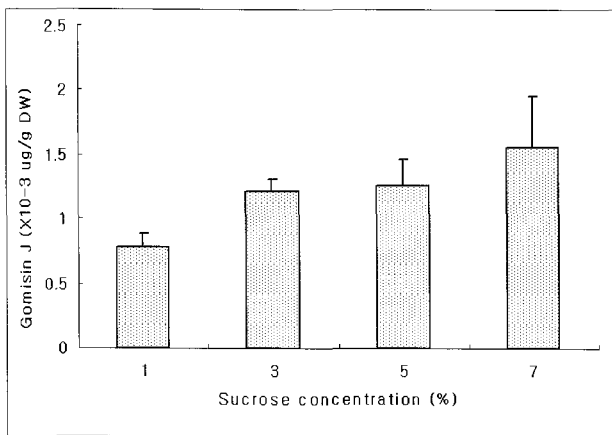


Fig. 5. Effects of culture media on gomisin J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots.

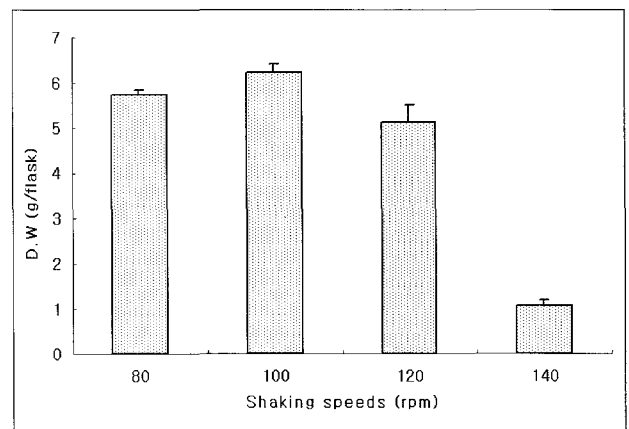


Fig. 6. Effects of shaking speeds on transformed root growth in shake flask cultures of *S. chinensis*.

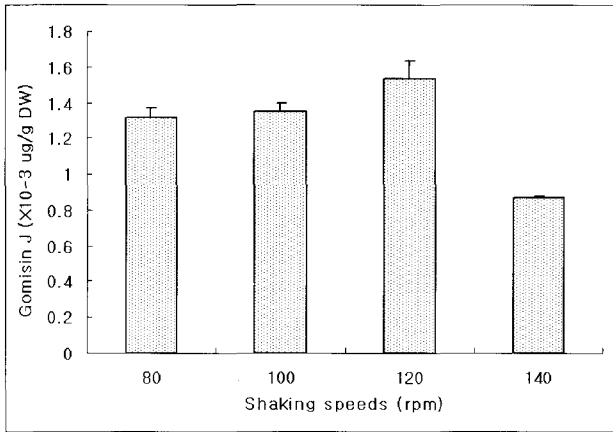


Fig. 7. Effects of shaking speeds on gomisin J contents in shake flask cultures of *S. chinensis* roots.

사 사

본 연구는 2001년도 농림기술개발 기획연구과제와 바이오그린21 사업 연구비 지원에 의해 수행되었음.

LITERATURE CITED

- Arellano J, Vasquez F, Villegas T, Hernandez G (1996) Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone. *Plant Cell Rep.* 15:455-458.
- Bhadra R, Vani S, Shanks JV (1993) Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:581-592.
- Berlin J, Forche E, Wray V, Hammer J, Hosel W (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z. Naturforsch.* 38:346-352.
- Brillianceau MH, David C, Tempe J (1989) Genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 8:63-66.
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295:432-434.
- Chu CC, Wang CS, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin* 18:659-668.
- Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape(*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 9:143-146.
- Failla MC, Maimone F, De Paolis A, Costantino P, Cardarelli M (1990) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. *Nestle Research News* 1986/87:92-103.
- Gamberg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:148-151.
- Giri A, Banerjee S, Ahuja PS, Giri CC (1997) Production of hairy root cultures in *Aconitum heterophyllum* wall. Using *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant* 33:280-284.
- Giri A, Narasu L (2000) Transgenic hairy roots :recent trends and applications. *Biotech. Adv.* 18:1-22.
- Hamill JD, Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 5:111-114.
- Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ (1987) New route to plant secondary products. *Bio/Technology* 5:800-804.
- Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F (1999) *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill. *FITOTERAPIA* 70:451-471.
- Hwang SJ, Pyo BS, Chae HJ, Hwang B (2002) Anthroquinone production in transformed roots of *Rheum undulatum* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10:88-92.
- Knobloch KH, Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. *Z. Naturforsch.* 35C:551-556.
- Lloyd GB, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot top culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-437.
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 33:321-329.
- Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. (*In* Fiechter A eds.) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Berlin, Springer-Verlag p. 59-88.
- Mukherjee SK, Sabapathi RB, Gupta N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* 25:13-16.
- Murashige T, Skoog F (1969) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nguyen C, Bourgaud F, Forlot P, Guckert A (1992) Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Rep.* 11:424-427.
- Nin S, Bennici A, Roselli G, Mariotti D, Schiff S, Magherini R (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. and production of secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* 16:725-730.
- Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P (1998) Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea* : effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 17:405-409.
- Sakato K, Misawa M (1974) Effects of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Agric. Biol. Chem.* 38:491-498.

- van Gulik WM, Nuutila AM, Vinke KL, ten Hoopen HJG, Heijnen JJ** (1986) Effects of carbon dioxide, air flow rate, and inoculation density on the batch growth of *Catharanthus roseus*, cell suspensions in stirred fermentors. *Biotechnol. Prog.* 10:335-339.
- Wu S, Zu Y, Wu M** (2003) High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. *J. Biotechnology* 106:33-43.
- Zhong JJ, Seki J, Kinoshita S, Yoshida T** (1992) Physiological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1256-1262.
- Zhong JJ, Yoshida T** (1995) High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production : Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1073-1079.