

백두산 자생 참들꽃의 생육과 이용 I. 배양세포 유도과 유리아미노산 조성

오 인 숙 · 소 상 섭* · 許 明 子¹

전북대학교 자연과학대학 생물과학부, ¹연변대학 농학원 농학계

Growth and Utility of *Rhodiola sachalinensis* in Baekdu Mountain I. Induction of Callus and Composition of Free Amino Acids

In-Suk Oh, Sang-Sup So* and Ming-zi Xu¹

Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences,
Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

¹Agricultural College of Yanbian University, Longjiung Jilin 133400, China

Abstract - This study was carried out to investigate the callus formation and to determine the composition and contents of the free amino acids in seedlings and callus of *Rhodiola sachalinensis*. The callus formation from the part of seedling-roots was the most effective on MS (Murashige and Skoog) media supplemented with 2.0 mg L⁻¹ 2, 4-D included in 1.0 mg L⁻¹ kinetin than the other experimental plots which prepared with the different concentration of the various growth regulators. Free amino acids extracted from the explants and the callus were a total of 25~26 kinds. Especially, the basic amino acids such as arginine, lysine and histidine released in callus were found relatively in a large quantity. These results suggest that the cultured callus of *Rhodiola sachalinensis* could induce for the mass production of the other useful ingredients.

Key words : *Rhodiola sachalinensis*, free amino acids, callus

서 론

참들꽃(*Rhodiola sachalinensis*) (蕭 1994; 임 등 1996)은 해발 1,800~2,300 m 되는 고산의 수림속과 협곡의 바위 부근에서 자라는 다년생 초본이다. 뿌리는 실하고 직립 하였거나 가로로 성장하며, 줄기는 6~30 cm이고 꽃은 줄기 끝에 노란색으로 모여서 피는데 암꽃과 수꽃이 서로 다른 포기에 핀다. 참들꽃은 전초를 약으로 쓸

수도 있지만 중요한 약용부위는 뿌리이고 분류상으로 피자식물문, 경천과, 홍경천속에 속한다. 참들꽃에 속하는 식물은 전 세계에 90여 종이 있는데 중국에 73종이 있다. 특히 참들꽃은 온도가 낮고 건조하며 산소가 결핍되고 자외선이 강하며 낮과 밤의 온도차이가 심해 기타 다른 식물이 서식할 수 없는 곳에 특수한 적응성을 가지고 있으며 우리나라에서는 백두산, 포태산, 낭림산의 정상에서 자라고 있다.

참들꽃은 인삼, 가시오갈피 이후에 발견한 보건의약식물의 일종으로 산소 결핍, 한랭, 피로, 마이크로파의 복사 등에 의한 신체장애를 극복하는데 뚜렷한 효과를 나타낼

* Corresponding author: Sang-Sup So, Tel. 063-270-2786, Fax. 063-270-3362, E-mail. sso@moak.chonbuk.ac.kr

뿐만아니라 주의력을 증가시키고 신체의 쇠퇴를 늦추고 노인병을 예방하는 등의 효과가 있다고 알려져 있다(金 등 1994; 문 1984; Kelly 2001; Yoshikawa *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1989; Petkov *et al.* 1986). 특히 참돌꽃에는 superoxide dismutase의 활성이 높은 것으로 보고 된 바 있다(Lee *et al.* 2000). 즉, 호기성 생물체의 생체내 산소는 전자와 반응하면서 반응성이 높은 독성의 활성산소종으로 변하는데(Imlay and Linn 1988), 이를 제거하는 천연항산화 물질로서의 효능(Zong *et al.* 1991; Lee *et al.* 2000; Mook-Jung *et al.* 2002)이 커서 기능성 건강식품과 의약품의 소재로 이용 개발되고 있다.

본 연구에서는 우수한 생물, 약리적 기능을 갖고 있는 백두산 자생 참돌꽃의 발아조건 및 조직배양을 통한 우수한 약리 성분의 대량생산에 그 목적을 두고 참돌꽃 종자의 발아율 측정과 배양세포를 유도하였으며, 유효성분 조사의 일환으로서 종자, 초기 유식물의 부위별 및 배양세포의 유리 아미노산 조성을 분석 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 참돌꽃(*Rhodiola sachalinensis*) 종자는 中國 연변대학 농학원의 許明子 교수로부터, 2000년과 2001년 두 차례에 걸쳐 분양 받은 것으로서 채집은 백두산 일대에서 이루어진 것이다.

2. 종자의 발아

종자 100粒을 기준으로 하여 영양소가 첨가되지 않은 수정액 상태 15~24°C에서 약 10일간 발아 성장시킨 유식물을 사용하여 발아율을 측정하였다.

3. 배양세포(캘러스)의 유도

발아 후 10일 동안 성장한 유식물의 뿌리를 약 0.5 cm 길이로 잘라 식물생장조절물질을 첨가한 MS기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 파종한 후 온도 25±1°C 암조건에서 배양하여 캘러스를 유도시켰다. 생장조절물질은 2, 4-D와 NAA의 농도를 각각 1.0과 2.0 mg L⁻¹로 하고 kinetin의 농도를 0.5와 1.0 mg L⁻¹로 각각 조합하여 8가지의 실험구를 두었으며 생장조절물질의 효과는 배양 10주 후에 캘러스 형성율로 측정하였다.

4. 유리 아미노산 분석

참돌꽃 종자와 발아된 유식물의 줄기와 뿌리 부위의

시료 및 배양된 캘러스를 1 g씩 각각 취하여 여기에 aluminum oxide를 0.5 g씩 넣고 액체질소 20 mL를 부어 얼린 다음 막자로 시료를 곱게 갈았다. 곱게 마쇄된 각 시료에 증류수 5 mL를 넣어 잘 녹인 후 원심분리(12,000×g, 15 min, 4°C)하고, 그 상등액을 취하여 동결건조시켜 물을 제거한 다음 여기에 500 μl의 100 mM Borate buffer (AccQ-Fluor Reagent Kit, Waters)를 넣고 녹였다. 물에 용출된 성분 중 단백질을 제거하기 위하여 500 μl의 chloroform을 첨가하여 혼합한 다음 5분간 원심분리 후 상등액만을 취하였다. 이 상등액을 0.22 μm syringe filter를 이용하여 잔사를 완전히 제거시킨 후 얻어진 시료 중 10 μl를 취하여 Borate buffer 70 μl와 혼합하고, AccQ-Tag 시약(Waters) 20 μl를 넣어 전체를 100 μl로 조정된 뒤 30초 이상 반응시켰다. 시료를 55°C에서 10분간 반응시키고 이후 실온에서 5분간 방치하였다. 이렇게 만들어진 시료를 아미노산 자동분석기(AccQ·Amino Acid Analysis System, Waters)로 분석하였다. 사용된 column은 AccQ-Tag 3.9×150 mm이며, 온도는 37°C로 하였고 injection volume은 시료당 10 μl로 하였다. Eluents는 A: 100 mM NaAC, 5.6 mM triethylamine (pH 5.7), B: 100 mM NaAC, 5.6 mM triethylamine (pH 6.8), C: 100% acetonitrile, D: 3차 증류수를 이용하였다. 또한 각 아미노산의 standard는 PIERCE사의 Amino Acid Standard H (No. NCI 0180)를 사용하였으며, 이에 포함되지 않은 γ-aminobutyric acid 등은 mL당 2.5 μmole을 포함시켜 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 종자의 발아율

온도에 따른 참돌꽃 종자의 발아는 전 시험구(15°C, 18°C, 21°C 및 24°C)에서 파종 후 1일째(24시간)는 변화가 없었으며, 2일째에는 15°C와 18°C 시험구에서만 20% 정도 발아율을 보였다(Fig. 1). 21°C와 24°C 시험구에서는 3일째 10%의 발아율을 보여 저온에서의 발아율이 더 높았다. 4일째에는 15°C와 18°C 시험구 각각에서 40%와 46% 정도였고, 6일째는 52%와 60%의 발아율을 보여 전체적으로 저조한 상태였으며, 발아세 또한 40%로 낮았다. 이처럼 낮은 발아율은 참돌꽃 자생지역인 백두산 일대 고산지대가 갖는 발아조건인 환경적 요인 때문으로 사료되었다. 즉, 식물 종자가 휴면에서 깨어나 유식물로 되는 과정에서 배의 영양상태 또는 온도, 수분, 산소 및 빛 등의 외적조건(Mayer and Poljakoff-Mayber 1975)과 내적 조건 즉, 휴면타파 또는 발아억제인자의 제거(Karssen *et*

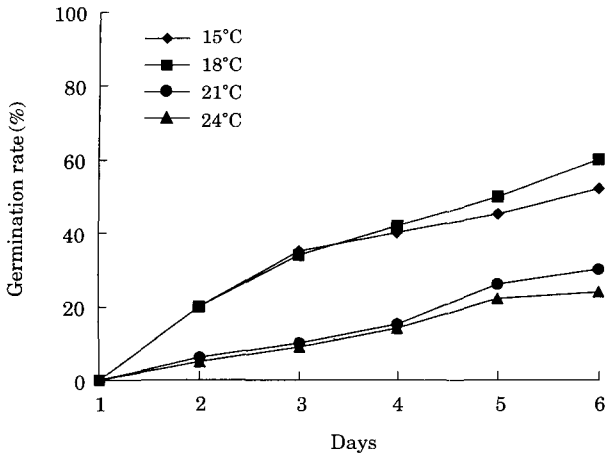


Fig. 1. Effect of temperature on the germination of *Rhodiola sachalinensis*.

Table 1. Effects of growth regulators on callus formation from the seedling-roots of *Rhodiola sachalinensis*.

Growth regulators (mg L ⁻¹)			Seedling-roots
2,4-D	NAA	Kinetin	Callus formation (%)
1.0	-	-	25.5
2.0	-	-	30.2
1.0	-	0.5	80.4
2.0	-	1.0	84.2
-	1.0	-	21.7
-	2.0	-	26.2
-	1.0	0.5	37.2
-	2.0	1.0	42.5

al. 1983; Thomas 1989) 등의 부족으로 인해 발아유도가 억제됨을 시사하였다.

2. 캘러스 형성

참돌꽃 유식물의 뿌리로부터 캘러스는 3주 배양 후에 표면이 약간 부풀어오르면서 유도되었다. 캘러스 형성은 2,4-D 1.0, 2.0 mg L⁻¹ 처리구가 NAA 1.0, 2.0 mg L⁻¹ 처리구 보다 4% 높게 나타났으며, kinetin 혼용처리가 2,4-D와 NAA의 단독처리보다 양호한 결과를 보였다 (Table 1). 특히 kinetin을 2,4-D와 혼용처리 하였을 때 80% 이상의 캘러스 형성율을 보였으며, NAA와 혼용 처리한 경우에는 캘러스 형성율이 2,4-D 처리에 비하여 약 40% 정도 낮았다. 본 실험의 결과 2,4-D나 NAA의 단독처리 보다는 kinetin을 혼용 처리하는 것이 캘러스 유도에 효과적이었다, 특히 NAA보다는 2,4-D가 더 효과적이었다.

Table 2. Compositions of free amino acids in seed of *Rhodiola sachalinensis* (unit: $\mu\text{mole g}^{-1}$ F.W.)

Amino acids	Seed
Aspartic acid	121.36
Glutamic acid	222.60
Serine	274.54
Glycine	284.76
Histidine	346.58
Arginine	322.65
Lysine	404.41
Alanine	270.35
γ -aminobutyric acid	346.97
Proline	272.54
Tyrosine	224.54
Methionine	180.36
Isoleucine	295.66
Leucine	264.74
Threonine	227.66
Phenylalanine	320.54
Trace	(9)
Total	4,380.26

3. 유리 아미노산 분포

참돌꽃 종자와 발아된 유식물의 줄기와 뿌리부위 및 배양세포인 캘러스의 유리 아미노산 함량 변화를 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 종자의 유리 아미노산

Table 2는 참돌꽃 종자의 유리 아미노산의 조성구 함량변화를 나타낸 것이다. 종자에는 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, γ -aminobutyric acid, proline, tyrosine, methionine, lysine, isoleucine, leucine 및 phenylalanine 등 16종과 수종의 trace를 포함하여 모두 25종이 검출되었다. 검출된 유리 아미노산 중 lysine이 신선중 (fresh weight) g 당 404.41 μmole 로서 가장 많은 양을 나타냈으며 이어 γ -aminobutyric acid, histidine, arginine 그리고 isoleucine 등의 순이었고 aspartic acid와 methionine은 비교적 낮은 함량을 나타냈다.

2) 줄기부위의 유리 아미노산

발아 후 10일째 되는 참돌꽃 유식물의 줄기부위 유리 아미노산의 조성구 함량은 Table 3과 같다. 검출된 아미노산은 유리 아미노산 분석시 사용된 PIERCE사의 아미노산 standard에 함유된 16종과 수종의 trace를 포함하여 26종이 검출되었으며 총유리아미노산의 함량은 신선중 g당 4576.05 μmole 로서 전술한 종자와 유사하였다.

검출된 유리 아미노산 함량별 분포는 lysine이 신선중

Table 3. Compositions of free amino acids in shoot and root of the seedling of *Rhodiola sachalinensis* (unit: $\mu\text{mole g}^{-1}$ F.W.)

Amino acids	Shoot	Root
Aspartic acid	207.94	206.54
Glutamic acid	284.52	277.84
Serine	233.54	287.62
Glycine	317.63	314.85
Histidine	356.27	432.45
Arginine	382.61	411.94
Lysine	414.36	446.54
Alanine	274.75	255.45
γ -aminobutyric acid	—	354.88
Proline	245.67	270.54
Tyrosine	237.40	—
Valine	225.48	272.47
Methionine	197.65	284.22
Isoleucine	300.55	388.16
Leucine	310.37	305.40
Threonine	257.84	269.52
Phenylalanine	329.47	274.85
Trace	(10)	(10)
Total	4,576.05	5,053.27

g당 414.36 μmole 로 가장 높은 비율을 나타냈다. 이어 arginine, histidine, phenylalanine 및 glycine 등의 순이었으며 기타 아미노산류도 200 μmole 이상의 비교적 고른 분포율을 보였다. 또한 종자에서 확인되지 않았던 valine 이 신선중 g당 225.48 μmole 이 검출되었으며 줄기부위에서는 γ -aminobutyric acid가 확인되지 않았다. 특히 arginine, lysine 및 histidine 등의 염기성 아미노산의 높은 함량분포는 초기유식물 생육과정의 정상적인 아미노산 분포양상(Noggle and Fritz 1983)과 일치하였다.

3) 뿌리부위의 유리 아미노산

참들꽃 뿌리부위의 유리 아미노산 분포 (Table 3)는 trace을 포함하여 줄기부위와 같은 26종이 검출되었는데, 전체적인 총 함량은 신선중 g당 5053.27 μmole 로서 종자 및 줄기보다 높은 함량을 나타내었다. 또한 줄기부위에서 확인되지 않았던 γ -aminobutyric acid가 신선중 g당 354.88 μmole 이 검출되었으나 tyrosine은 확인되지 않았다. 유리 아미노산의 함량별 분포는 lysine이 446.54 μmole 의 최고치를 나타냈으며 이어 histidine, arginine 및 isoleucine 등의 순이었으며 기타의 아미노산류도 200~300 μmole 정도의 비교적 고른 분포율을 보여주었다. 특히 종자, 줄기 및 뿌리부위에서 lysine, histidine 및 arginine이 다량으로 검출되어 참들꽃 유식물의 경우 염기성 아미노산의 분포가 높은 식물임을 알 수 있었다. 이와같은 분포는 뿌리부위가 주로 약용부위로 쓰이고 있는

Table 4. Compositions of free amino acids in callus induced from the seedling-roots of *Rhodiola sachalinensis* (unit: $\mu\text{mole g}^{-1}$ F.W.)

Amino acids	Callus
Aspartic acid	188.46
Glutamic acid	266.46
Serine	302.46
Glycine	314.54
Histidine	496.48
Arginine	411.54
Lysine	418.28
Alanine	228.46
γ -aminobutyric acid	313.40
Proline	311.58
Tyrosine	322.46
Valine	316.45
Methionine	355.73
Isoleucine	383.37
Leucine	346.64
Threonine	340.05
Phenylalanine	333.46
Trace	(9)
Total	5,649.82

이유 중의 하나라고 사료되었다.

4) 배양세포의 유리 아미노산

유식물 뿌리로부터 유도된 캘러스를 수 차례 계대배양하여 유리아미노산 함량분포를 조사하였다 (Table 4). 캘러스에서 검출된 유리아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, serine 및 glycine 등의 26종이었으며 histidine이 신선중 g당 496.48 μmole 로서 최고치를 나타냈으며 종자, 줄기 및 뿌리부위에서 다량 검출되었던 lysine과 arginine 역시 높은 함량을 나타내었다. 배양세포 역시 염기성 아미노산의 분포가 높았으며, 필수아미노산의 함량도 높게 나타났다. 총 유리아미노산 함량은 줄기와 뿌리 등의 조직에 비해 500~1,000 μmole 정도로 높아 실험 식물인 참들꽃은 배양세포를 이용한 아미노산 유도과 생성이 효율적인 식물로서 장차 여러 가지 우수한 약리작용을 지니고 있는 참들꽃 성분을 배양세포를 통하여 대량생산이 가능함을 시사하고 있다. 참들꽃은 인삼을 능가하는 약리작용을 지니고 있는 자연약물로서(임 등 1996)의 가치가 높아지고 있어 그 수요가 점차 증가하고 있으나 서식지의 특수성 때문에 낮은지대의 평야에서의 재배가 어려워 공급이 안정적이지 못하다. 그러므로 필요 성분의 수요에 대한 공급조절역할을 할 수 있는 수단으로 배양세포에 의한 유용물질 생산은 매우 가치 있는 일이라고 사료된다.

적 요

본 실험은 백두산 자생 참돌꽃의 발아조건과 종자, 유식물 및 뿌리유래 캘러스의 유리 아미노산 조성과 함량을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 뿌리로부터 캘러스 유도에는 2,4-D 및 NAA가 첨가된 MS배지에서 유도되었다. 캘러스 형성율은 2,4-D 2.0 mg L⁻¹에 kinetin 1.0 mg L⁻¹ 혼용 처리구가 NAA 2.0 mg L⁻¹에 kinetin 1.0 mg L⁻¹ 혼용 처리구보다 캘러스 형성율이 높았다.

유리 아미노산은 종자, 줄기, 뿌리 그리고 캘러스에서 aspartic acid, glutamic acid, serine 및 glycine 등의 25~26종이 검출되었으며 종자, 줄기 그리고 뿌리부위에서는 lysine이 가장 많은 양을 나타냈으며 캘러스에서는 histidine이 높은 양을 나타냈다. 전체적인 유리아미노산 분포는 lysine, histidine 및 arginine의 함량이 높아 참돌꽃 유식물 및 캘러스의 경우 엽기성 아미노산의 분포가 높은 식물임을 알 수 있었다. 또한 총 유리 아미노산 함량은 종자와 뿌리, 줄기에 비해 캘러스에서 신선중 g당 500~1,000 μmole 정도 높아 우수한 약리작용을 지니고 있는 참돌꽃의 성분을 배양세포를 통하여 대량생산이 가능함을 시사하고 있다.

사 사

본 연구는 2001년도 전북대학교 국제공동연구과제 지원 연구비에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- 金洙哲, 安相得, 李相來. 1994. 原色白頭山資源植物, 아카데미서적, 서울.
- 蕭培根. 1994. 中國本草圖鑑(第一卷), 驪江出版社, 서울.
- 임용규, 박석근, 류종원, 사동민, 이미순, 임규옥. 1996. 자원식물학. 서일출판사, 서울.
- 문관심. 1984. 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울.
- Imlay JA and S Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302-1308.
- Karssen CM, A Haigh, P van der Toorn and R Weges. 1989. Physiological mechanisms involved in seed priming. pp.269-280. In *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds* (Taylorson RB ed.). Plenum Press. New York.
- Kelly GS. 2001. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. *Altern. Med. Rev.* 6:293-302.
- Lee MW, YA Lee, HM Park, SH Toh, EJ Lee, HD Jang and YH Kim. 2000. Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Arch. Pharm. Res.* 23:455-458.
- Mayer AM and A Poljakoff-Mayber. 1975. Factors affecting germination. pp.21-45. In *the Germination of Seeds*. Pergamon Press. Oxford.
- Mook-Jung I, H Kim, W Fan, Y Tezuka, S Kadota, H Nishijo and MW Jung. 2002. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *Rhodiola sachalinensis* and Tokaku-joki-to, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 25:1101-1104.
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Noggle, GR and GJ Fritz. 1983. Metabolism in germinating fat-rich seeds. pp.502-505. In *Intriductory Plant Physiology*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Petkov VD, D Yonkov, A Mosharoff, T Kambourova, L Alova, VV Petkov and I Todorov. 1986. Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rosea* L. roots on learning and memory. *Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.* 12:3-16.
- Thomas TH. 1989. Gibberellin involvement in dormancy-break and germination of seeds of celery. *J. Plant Growth Regul.* 8:225-261.
- Yoshikawa M, H Shimada, H Shimoda, N Murakami, J Yamahara and H Matsuda. 1996. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. II. *Rhodiola* radix. (1). Chemical structures and antiallergic activity of rhodiocyanosides A and B from the underground part of *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey. (Crassulaceae). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 44:2086-2091.
- Zong Y, K Lowell, JA Ping, CT Che, JM Pezzuto and HH Fong. 1991. Phenolic constituents of *Rhodiola coccinea*, a Tibetan folk medicine. *Planta. Med.* 5:589.
- Zhang ZH, SH Feng, GD Hu, ZK Cao and LY Wang. 1989. Effect of *Rhodiola kirilowii* (Regel.) Maxim on preventing high altitude reactions. A comparison of cardiopulmonary function in villagers at various altitudes. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 14:687-690.

Manuscript Received: November 21, 2003

Revision Accepted: February 19, 2004

Responsible Editorial Member: Joo-Hwan Kim
(Daejeon Univ.)