

## 쥐오줌풀 부정근으로부터 valepotriates와 valerenic acid 생산에 미치는 elicitor의 효과

김홍실\* · 김미란\* · 이미양\*\* · 박형재\*\*\* · 남승현\*\*\*\* · 황 백\* · 황성진\*†

\*전남대학교 생물학과, \*\*농촌진흥청 작물과학원 목포시험장,  
\*\*\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*\*\*주)그래미

### Effect of Elicitors on the Production of Valepotriates and Valerenic Acid in the Adventitious Roots of *Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* Hara

Hong Shi Jin\*, Mei Lan Jin\*, Mei Yang Lee\*\*, Hyoung Jae Park\*\*\*, Jong Hyun Nam\*\*\*\*  
Baik Hwang\*, and Sung Jin Hwang\*†

\*Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

\*\*Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, RDA, Muan 530-834, Korea.

\*\*\*Plant Biotechnology, School of Bioscience & Biotechnology, Kangwon Natl. Univ. Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*\*\*Glami Co., LTD, Cheorwon 269-800, Korea.

**ABSTRACT :** Effects of various concentrations of elicitors for enhancement in valepotriates and valerenic acids production in adventitious root culture of *Valeriana fauriei* were investigated. Although the growth of adventitious roots was suppressed by addition of biotic or abiotic elicitors, the production of valepotriates and valerenic acids was enhanced. Addition of 100  $\mu$ M methyl jasmonate or 1 g/l yeast extract to the root culture of *V. fauriei* resulted in the optimal production of valepotriates ( $12.56 \pm 0.78$  mg/l) and valerenic acids ( $10.63 \pm 1.1$  mg/l), respectively.

**Key Words :** *Valeriana fauriei*, valepotriates, valerenic acids, adventitious roots, elicitors

## 서 론

쥐오줌풀 (*Valeriana fauriei*)은 마타리과 (Valerianaceae)에 속하는 다년성 초본으로서 전 세계에 약 200 여종이 주로 북부 유럽 및 아시아의 온대지방에 분포되어 있고 한국에는 약 8종이 자생하는데 주로 그늘지며, 습한 환경 즉 산속, 강변 또는 냇가의 뚝 등 지에 분포하고 있다 (Choi, 1995). 쥐오줌풀은 약용식물로서 주로 건조뿌리를 사용하며 진정, 불면, 신경성 불안성, 두통 등에 전통적으로 사용되었다. 동양 의학에서는 산통, 월경불순, 피어, 금창치료, 고혈압, 위통 등에 응용하고 있으며 서양에서도 항히스테리 치료에 사용되어져왔다 (Backer *et al.*, 1983). 이러한 약리작용은 쥐오줌풀의 주요성분인 valepotriates와 valerenic acids에 의한 것으로 알려져 있다 (Thies & Funke, 1966; Hendriks, 1985). 1966년 Thies와 Funke가 *V. wallichii* DC로부터 세계의 iridoid 화합물 즉, valtrate, acevaltrate와 didrovaltrate를 valepotriate라고 명명하였다. 그 뒤로 쥐오줌풀로부터 valepotriate 화합물의 분리와

진정작용에 관한 연구결과가 보고되었고 쥐오줌풀의 약리효능에 대한 연구는 추출물이나 휘발성 정유성분 보다는 valepotriate 화합물에 더욱 관심이 집중되었으며 화합물의 구조와 약리활성에 대한 많은 연구가 수행되었다 (Hendriks, 1985; Choi, 1995). 쥐오줌풀의 유효 성분으로는 isovaleric acid의 ester류 일 것이라는 보고가 있으나, Stoll (1957) 등은 유럽산 *V. officinalis*에서 valerenic acid를 Eickstedt (1969) 등은 히말라야 산 *V. Wallichii* DC에서 valepotriate (valtrate, acetovaltrate, didrovaltrate 등)를 그리고 Takamura (1973) 등은 *V. fauriei*에서 kessoglycoloil을 동정한 바 있으나 연구자마다 기원식물과 유효성분의 차이를 보이는 경향이 있었다. 이 외 쥐오줌풀에 대한 연구는 계속 진행 되었으나 현재는 주로 재배, 정유성분과 약용성분의 분석에 관한 연구만 보고 되어 있을 뿐 식물기내배양을 통한 이차대사산물의 생산에 대한 연구는 매우 미흡하다.

식물체에서 생산되는 많은 이차대사산물은 대체적으로 항균 활성을 가지고 있기 때문에 의약적인 효과를 보이는 경우가

†Corresponding author: (Phone) +82-62-530-3416 (E-mail) jimhwang@jnu.ac.kr  
Received June 30, 2007 / Accepted August 2, 2007

많은 것으로 알려져 있다. 대부분 이차대사산물은 세포가 영양의 고갈이나 환경의 변화 또는 미생물에 의한 오염과 같은 스트레스를 받을 때 축적되기 시작하는 것이 보통인데 식물 세포 및 조직배양에서 배양체에 다양한 스트레스를 가하여 이차대사산물의 생성을 촉진시키는 것을 광범위한 의미에서 elicitation라 하며 이때 가해지는 스트레스를 elicitor라 한다 (Yun, 1995). 이러한 elicitation은 식물의 목적하는 성분의 생산을 향상시키기 위한 한가지 방법이 될수 있다 (Kim and Roh, 1998). Mansfield (1974) 등은 잎에 *Botrytis cinerea*을 감염시켜 phytoalexin을 생산한 바 있다. 그 밖에 곰팡이, 박테리아, 중금속, 염 등 과 같은 elicitor에 의한 이차대사산물의 생산에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 가령 elicitor 처리를 통하여 지치로부터 shikonin (Tabata and Fujita, 1985)을 인삼배양세포로부터 ginsenosides (Yoo and Byun, 2001)의 생산 효율을 높인 바 있다. 그 외에도 인삼 부정근배양으로부터 ginsenoside 생산 (Lim *et al.*, 2005), 섬오갈피나무의 부정근 배양으로부터 eleutheroside 생산연구 (Ahn *et al.*, 2006)에서도 모두 유의적인 증가를 나타냈다고 보고한 바 있다. 하지만 쥐오줌풀 부정근 배양에서는 elicitor처리가 valepotriates와 valerenic acids와 같은 성분에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 다양한 elicitor를 처리하므로써 쥐오줌풀 부정근내 valepotriates와 valerenic acids 생산성을 더욱 증가시킬 수 있는 가능성을 확인하고 최적의 조건을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용된 쥐오줌풀 부정근은 본 연구실에서 기 유도시킨 세포주를 사용하였으며 무기염의 농도를 1/4로 줄인 B5배지 (1/4B5) (7% sucrose, pH 5.7)에 접종하여 25 ± 1°C의 암소에서 진탕배양기내에서 100 rpm으로 4주 간격으로 계대배양 하였다. 각 실험구는 부정근 (root tip을 포함)을 2 cm 정도의 길이로 절취하여 약 0.04 g (F.W)씩 30 ml의 1/4B5 액체배지에 접종하여 5주간 배양한 후 수확하여 여과지 (Whatman No. 2)로 충분히 수분을 제거한 다음 생중량을 측정하였고, 액체질소로 급속 동결 후 24시간 동결건조기 (Ilsin Co, Korea)에 동결건조하여 건중량을 측정한 후 함량 분석하였다. 모든 실험은 5회 반복하여 수행하였다.

### 2. Elicitor 처리

쥐오줌풀 부정근의 생장과 valepotriates와 valerenic acid 생산에 미치는 elicitor의 영향을 조사하고자 30 ml의 1/4B5 기본배지에서 4주간 전배양한 후 methyl jasmonate (MeJA)와

jasmonic acid (JA)를 10-150 µM 농도로 yeast extract (YE)는 0.05-2 g/l 농도로 각기 첨가한 후 5일간 배양한 다음 부정근의 생중량과 valepotriates와 valerenic acids의 함량을 측정하였다.

4주간 전배양한 부정근에 CuCl<sub>2</sub>와 CdCl<sub>2</sub>를 1-50 mM 농도로 KCl, MnCl<sub>2</sub> 그리고 NaCl은 5-100 mM 농도로 조정하여 처리하고 5일간 배양한 다음 부정근의 생중량과 valepotriates와 valerenic acids의 함량을 측정하였다.

### 3. HPLC 분석

추출은 수확한 쥐오줌풀 부정근을 동결건조 시킨 후 마쇄된 건조분말 0.25 g을 실온에서 5 ml methanol에 넣고 30분 동안 sonication 하였다. 이렇게 2회 반복 추출한 다음 여과지 (Whatman No. 2)로 여과하여 Rotary evaporator (Rikakikai, Japan)로 농축시켰다. 농축된 시료는 1 ml MeOH로 재용해시켜 HPLC 분석에 사용하였다.

Valepotriates와 valerenic acid 분석은 HPLC (Waters, USA)를 이용하여 확인하였다. Column은 u-Bondapak C<sub>18</sub>을 용매는 A (water : acetonitrile : phosphoric acid, 80 : 20 : 0.05)와 B (water : acetonitrile : phosphoric acid, 20 : 80 : 0.05)를 사용하였다. 시료는 20 µl를 주입하여 유속 1 ml/min으로 전개시킨 후 valepotriates는 254 nm에서, valerenic acid는 220 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

일반적으로 elicitor는 세포, 모상근 및 부정근 대수 증식 기 말기에 처리할 때 가장 두드러진 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 이에 근거하여 1/4B5 액체배지에서 쥐오줌풀 부정근을 4주간 전배양한 후 elicitor를 5일간 처리하여 쥐오줌풀 부정근의 생장과 valepotriates와 valerenic acid의 함량 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 식물이 외부로부터 상처를 받으면 상처를 받은 부위는 물론 그 주변 부위에서도 단백질 분해효소 저해제 등과 같은 여러 방어물질의 생합성이 이루어진다. 이러한 일련의 반응들이 통도조직을 통해 상해신호체가 다른 부위로 전달되어야 하는데 이와 같은 신호전달물질로는 MeJA와 JA가 있다 (Park *et al.*, 2000).

쥐오줌풀 부정근을 4주간 1/4B5 액체배지에서 배양한 후 다양한 농도의 MeJA를 처리하여 5일간 경과후 결과를 조사하였다. 생중량은 MeJA가 첨가되지 않은 무처리에서 0.26 ± 0.01 g (D.W)/flask로 접종량의 6.5배로 가장 좋은 생장을 보인 반면 MeJA 농도가 가장 높은 150 µM 처리농도에서는 0.19 ± 0.01 g (D.W)/flask로 접종량의 4.7배로 가장 저조한 생장을 보여주었다. 반면에 valepotriates와 valerenic acids의 생산성은 점차 증가시키는 것으로 나타났으며 100 µM MeJA

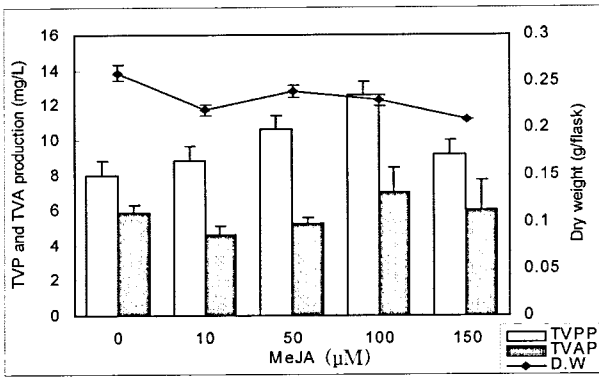


Fig. 1. Effect of MeJA on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

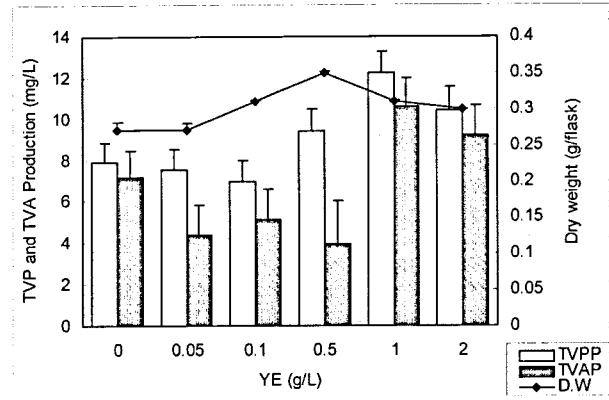


Fig. 3. Effects of YE on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

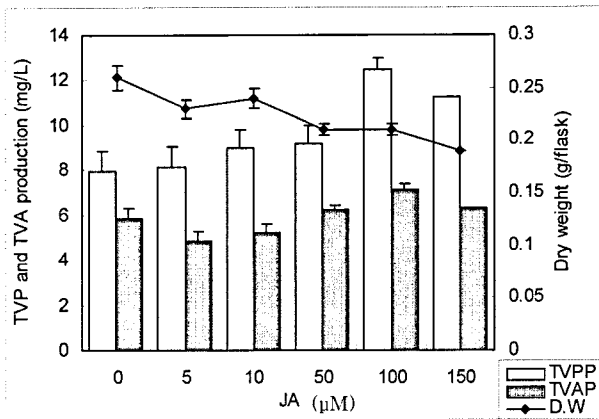


Fig. 2. Effect of JA on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

처리구에서 valepotriates는  $12.56 \pm 0.78 \text{ mg/l}$ , valerenic acids는  $6.98 \pm 1.42 \text{ mg/l}$  로 대조구에 비해 valepotriates는 약 1.6 배로 증가하여 모든 처리구에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 1). 이와 같은 결과는 Lim (2005)과 Kim (2004)의 연구 결과와 유사하다. 즉 인삼 부정근 배양에서 MeJA 처리농도가 증가할수록 생장은 억제되었고 ginsenosides 생산량은 증가되었다. 또한, 조개나물 모상근과 백화사설초의 현탁세포배양 (Lee and Kim, 2004)에 있어서도 이와 유사한 결과를 확인한 바 있다. 이것은 정상적인 식물체에 미생물이 침입하거나 스트레스를 가하면 이에 방어하기 위해 2차대사산물을 급격히 증가시키거나, 목질화과 같은 여러 가지 방어기작을 일으키기 때문이다 (Kim, 2001).

JA는 식물의 성장과 뿌리 발달에 있어 일종의 성장조절제로서의 기능을 가지며 방어유전자를 자극하는 것으로 알려져 있다. JA를 처리하여 인삼 부정근에서 ginsenosides의 함량을 높

이는 연구가 이루어진 바 있으며 (Park *et al.*, 2000) 섬오갈피나무의 부정근 배양 (Ahn *et al.*, 2006)과 회수 현탁세포배양 (Choi and Byun, 2000)등에서도 이차대사물질의 생산성 증가를 가져왔다.

본 연구에서 부정근의 생산과 valepotriates와 valerenic acids의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 JA를 처리한 결과 성장량은 JA 농도가 증가할수록 감소되었으나 valepotriates와 valerenic acid 생산성은 증가하였으며 100 μM 농도에서 valepotriates는  $12.49 \pm 0.47 \text{ mg/l}$ , valerenic acids는  $7.13 \pm 0.23 \text{ mg/l}$  로 대조구에 비해 현저한 증가를 보였다 (Fig. 2).

Bourgaud *et al.* (2001)는 식물의 일차대사산물이 세포증식과 이차대사물질의 생합성에 경쟁적으로 이용되어 생증량이 증가하면 물질의 생산량은 감소하는 결과를 초래한다고 보고하였다. 쥐오줌풀 부정근 배양에서 배지 내 YE 농도가 0.5 g/l 일때 건중량은  $0.35 \pm 0.01 \text{ g/flask}$ 로 대조구 ( $0.26 \pm 0.01 \text{ g D.W}$ )에 비해 약 1.5배 증가하였다. 이에 비해 valepotriates와 valerenic acids 생산성은 생증량이 상대적으로 낮은 1 g/l YE 처리농도에서 valepotriates는  $12.21 \pm 1.0 \text{ mg/l}$ , valerenic acids는  $10.63 \pm 1.1 \text{ mg/l}$  로 대조구에 비해 1.8배로 증가를 보여주었다 (Fig. 3).

한편, 배지 내  $\text{CuCl}_2$ 의 처리 농도가 증가할수록 이차대사산물의 생산은 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 4).  $\text{CdCl}_2$  처리구에서는 24시간 이후부터 부정근이 갈변화 하였으며, 부정근 성장과 valepotriates와 valerenic acids의 생산성은 대조구에 비해 모든 처리구에서 감소하였다 (Fig. 5). 이는 Kim (2001)이 병풀의 기내배양으로부터 triterpene glycosides를 생산하려고 했던 실험 결과와 유사하다.

KCl와  $\text{MnCl}_2$ 의 경우에는 모든 실험구에서 농도가 증가할수록 부정근의 성장량은 감소하였으나 valepotriates와

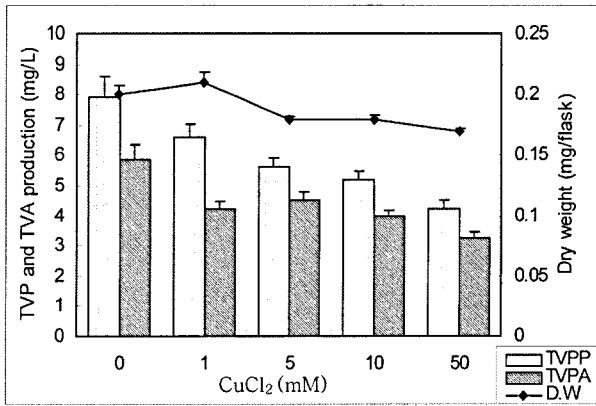


Fig. 4. Effect of CuCl<sub>2</sub> on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

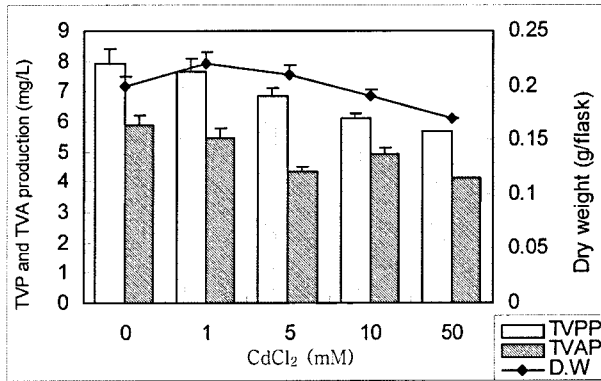


Fig. 5. Effect of CdCl<sub>2</sub> on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

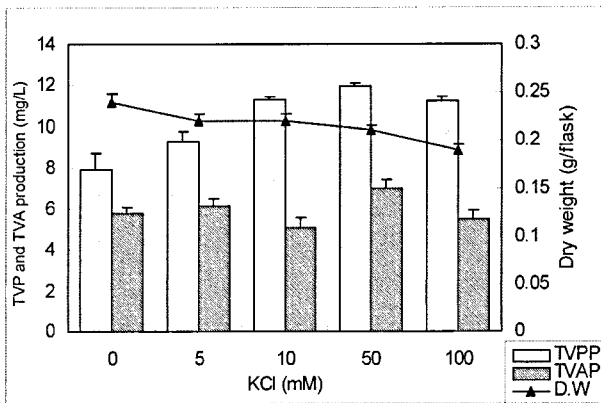


Fig. 6. Effect of KCl on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

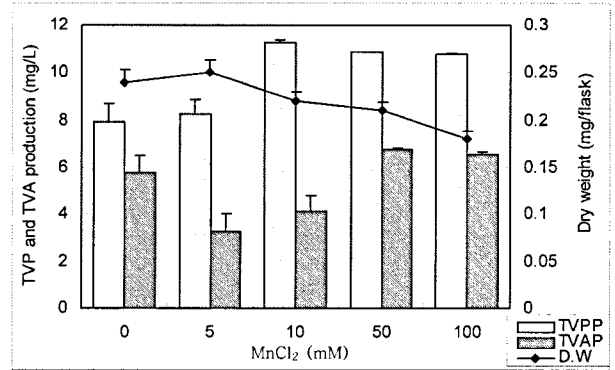


Fig. 7. Effect of MnCl<sub>2</sub> on the growth and valepotriates and valerenic acids production from adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

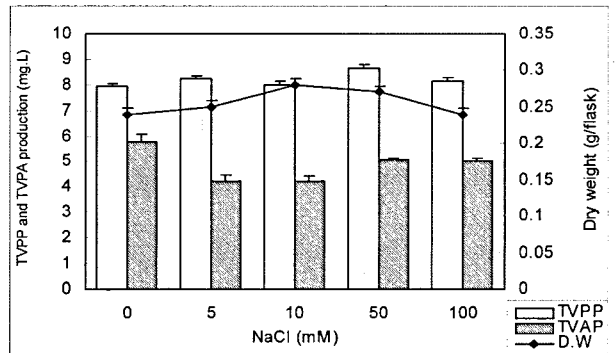


Fig. 8. Effect of NaCl on the growth and valepotriates and valerenic acids production of adventitious roots in 1/4 B5 liquid medium after 5 weeks of culture. Initial inoculum concentration : 0.04 g (F.W)/flask.

valerenic acids 생산은 증가하였다. KCl은 처리농도가 증가할 수록 물질의 생산이 완만하게 증가하였는데 특히 50 mM KCl 처리구에서 valepotriates는  $11.93 \pm 0.2 \text{ mg/l}$ , valerenic acids는  $6.98 \pm 0.43 \text{ mg/l}$ 로 나타났다 (Fig. 6). MnCl<sub>2</sub> 또한 valepotriates와 valerenic acids 생산 증가를 가져왔는데 valepotriates는 10 mM 처리구에서  $11.28 \pm 0.12 \text{ mg/l}$ 로, valerenic acids는  $6.78 \pm 0.06 \text{ mg/l}$ 로 나타났다 (Fig. 7).

NaCl의 경우에는 처리농도가 증가할 수록 생중량의 증가를 보여주었는데 10 mM 처리구에서  $0.28 \pm 0.01 \text{ g}$ 의 건중량을 나타내었다. 반면 물질생산성은 대조구와 비슷한 수준을 보였다 (Fig. 8). Kim (1998)은 구기자(Adonis autumnalis)의 현탁배양세포에 Smith (1987)는 일일초 세포배양에서 각기 NaCl 처리를 통해 betaine과 indole alkaloid 함량을 최대 높인바 있다.

## 적 요

쥐오줌풀 부정근으로부터 valepotriates와 valerenic acids 함

량을 증진시키고자 다양한 elicitor를 처리하였다. 쥐오줌풀 부정근의 생장은 YE 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구에 비해 감소하였다. 그러나 valepotriates와 valerenic acids 생산은 모든 처리구에서 대조구에 비해 증가하였으며 특히, valepotriates는 100 µM MeJA 처리구에서  $12.56 \pm 0.78$  mg/l, valerenic acids는 1 g/l YE 처리구에서  $10.63 \pm 1.1$  mg/l 로 가장 높았으며, 이는 대조구에 비해 1.6배와 1.8배의 생산성증가를 가져왔다.

## LITERATURE CITED

- Ahn JK, Park SY, Lee PW, Park YK (2006) Effects of jasmonic acid on root growth and eleutheroside accumulation in adventitious root culture of *Eleutherococcus koreanum*. J. Kor. Forest. Soc. 95(1):32-37.
- Backer H, Chavadej S, Weberling F (1983) Valepotriates in valeriana *Thalit oides*. Plant Med. 49:64.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci 161:839-851.
- Choi YH (1995) Chemical components and agronomic characteristics of Korean valerian (*Valeriana fauriei* var. *dasycarpa* HARA and valeriana *officinalis* L.) PhD thesis, Dankook University. Korea.
- Choi H, Byun SY (2000) Enhanced production of anticancer agent camptothecin by double elicitors in suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. Kor. J. Bioeng. 15(5):428-433.
- Eickstedt et al (1969) *Arzneim. Forsch.* 19, 316.
- Hendriks H, Bos R, Woerdenbag HJ, Koster AS (1985) Central nervous depressant activity of valerenic acid in the mouse. *Planta Med.* 51:28-31.
- Kim BW, Roh K (1998) Betaine production by two culture and elicitor in the cell culture of *Lycium chinense* mill. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 13:569-579.
- Kim OT (2001) Production of triterpene glycosides in *in vitro* from *Centella asiatica* (L.) Urban. Master thesis. Chonnam University. Korea.
- Kim YS, Hahn EJ, Muthy HN, Paek KY (2004) Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol Lett* 26: 1619-1622.
- Lee YI, Kim DI (2004) Enhanced production of oleanolic acid by the elicitor in *oldenlandia diffusa* suspension cell culture. *Kor J. Biotechnol. Bioeng* 19:471-477.
- Lim S, Bae KB, Shin CG, Kim YY, Kim YS (2005) Increase of secondary metabolites and antioxidative activity in *Panax ginseng* adventitious root by methyl jasmonate. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 32:225-231.
- Mansfield JW, Hargreaves JA, Boyle FC (1974) Phytoalexin production by live cells in broad bean leaves infected with *Botrytis cinerea* Nature. p. 252, 316.
- Park HJ, Oh SY, Choi KH, Meang SJ, Yoon ES, Yang DC (2000) Effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on the production of ginsenoside in the hairy roots Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A meyer). *J. Ginseng Res.* 24:74-78.
- Stoll A, Seebeck E, Stauffacher D (1957) Isolation and characterization of unknown compounds from the neutral fractions of valerian II, *Helv. Chim. Acta.* 40:1205-1230.
- Smith JL, Smart NJ, Misawa M (1987) The use of organic compounds to increase the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* L.G. cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 38:1505-1506.
- Tabata M, Fujita Y (1985) *Biotechnology in Plant Science*, Zaitilin, M, Day, P. and Hollaender, A. Eds. Academic Press, New York, 217.
- Takamur K, Kakimoto M, Kawaguchi M (1973) Pharmacological actions of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*. *Yakugaku Zasshi* 93:599-606.
- Thies PW, Funke S (1966) Über die wirkstoffe des baldrians I. Mitteilung Nachweis und isolierung von sedativ wirksamen isovaleriana saureestern aus wuraeln and rhizomen von verschiedenen valeriana and kevtranthusarten. *Tetrahedron.* 11: 1155-1162.
- Yoo BS, Byun SY (2001) Characteristics of batch culture and effect of various elicitors on ginsenoside production in suspension culture of *Panax ginseng* CA. Meyer. *Kor. J. Biotechnol.* 16:620-625.
- Yun JH, Kim JH, Hwang YS, Byun SY, Kim DI (1995) Taxol production in *Taxus* cell cultures; Effects of various elicitors. *Kor. J. Biotechnol.* 10:143-148.