

## 섬오갈피 부정근 배양 시 옥신과 사이토키닌이 생장과 생리활성물질 생산에 미치는 영향

이은정<sup>1</sup> · 김명기<sup>2</sup> · 백기엽<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 첨단원예기술개발연구센터, <sup>2</sup>충북대학교 원예학과

### Auxin and Cytokinin Affect Biomass and Bioactive Compound Production from Adventitious Roots of *Eleutherococcus koreanum*

Eun-Jung Lee<sup>1</sup>, Myong-Ki Kim<sup>2</sup>, and Kee-Yoep Paek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>2</sup>Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract.** In an attempt to improve biomass and bioactive compound production, we cultured adventitious roots of *Eleutherococcus koreanum* in 250 mL Erlenmeyer flasks using Murashige and Skoog (MS) medium with different concentrations of auxins (IBA, NAA, IAA) and cytokinins (BA, kinetin, TDZ). Root biomass (fresh and dry weight) was enhanced at 5 mg·L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA) after 5 weeks of culture. The content of total phenolics and flavonoids was also increased with 5 mg·L<sup>-1</sup> IBA compared to  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) or indole-3-acetic acid (IAA) treatments. The combination of 5 mg·L<sup>-1</sup> IBA with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> thidiazuron (TDZ; N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea) enhanced root fresh and dry weight (1.4- and 1.6-fold, respectively) as well as the content of total phenolics and flavonoids compared to the relative control (without cytokinin). On the contrary, N<sub>6</sub>-benzyladenine (BA) and 6-furfurylaminopurine (kinetin) did not significantly affect root biomass and bioactive compound production in adventitious roots of *E. koreanum*. These results suggested that 5 mg·L<sup>-1</sup> IBA combination with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ supplementation was most suitable for both biomass and bioactive compound production from adventitious roots of *E. koreanum*.

**Additional key words:** liquid culture, medicinal plants, root morphology

## 서 언

고착생활을 하는 식물체는 다양한 환경조건에 노출되기 때문에 생장과 발육 및 생식과정과 같이 생존에 필요한 직접적인 기능을 가진 물질 이외에 방어기작의 일종으로 특정 식물에 한정되어 생산되는 부가적인 천연산물을 생산한다. 하지만 식물체내 유효성분의 함량은 재배환경이나 수확시기 등에 따라 차이가 심하여(Southwell과 Bourke, 2001) 산업시장의 원료로 균일한 생리활성물질을 공급하기 위한 효과적인 생산방법의 확립이 중요하다. 이러한 요구에 효율적으로 대처할 수 있는 방법으로 세포(Lee 등, 2006), 체세포배(Shohael 등, 2008), 부정근(Jeong 등, 2009), 기내 소식물

체(Lee 등, 2008) 등을 이용하여 생리활성물질을 생산하는 식물조직배양을 들 수 있다. 이중 부정근 배양은 식물체 배양에 비해 배양체의 생장이 빠르고, 연속적인 증식과 안정적인 공급이 가능하며, 상업적 대량화가 용이한 장점 등을 가지고 있어 널리 이용되고 있다(Wu 등, 2006).

오갈피속 식물들은 분류학적으로 산형화목(Umbellales) 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 관목으로 한국, 중국, 일본 등지의 동남아시아와 서남아시아 및 러시아 지역에 분포한다(Ahn 등, 2005). 넓은 지역에 분포하는 만큼 국가별 다양한 자생 오갈피들이 알려져 있는데, 이중 섬오갈피(*Eleutherococcus koreanum* Nakai)는 제주도 바닷가에서부터 해발 1,400m에 이르는 계곡이나 숲 속에 드물게 자라고 있는 한국 자생 오

\*Corresponding author: paekky@chungbuk.ac.kr

※ Received 16 February 2010; Accepted 12 April 2010. 이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

갈피의 일종이다(Ko 등, 2003). 최근 섬오갈피가 진통소염 작용, 자양강장, 항피로작용, 항스트레스 작용, 해독작용, 항류마티스 및 당뇨병 치료 등에 생리활성을 나타내는 것으로 보고됨에 따라(Ko 등, 2003) 사용량이 증가하고 있다. 그에 따라 한정된 지역에서 서식하는 섬오갈피가 무분별하게 채취되어 효과적인 보존과 생산방법이 필요하게 되었다(Park 등, 2005). 섬오갈피의 경우 타 오갈피에 비해 수확기간이 짧고 재배 관리가 쉬운 속성수이지만(Lim 등, 2005) 미숙 종자로 생산되기 때문에 발아에 2년 이상이 소요되고 발아율이 낮아 균일한 식물체를 일시에 대량 확보하는 데는 어려움이 있다(Ko 등, 2003). 또한 Jwa 등(2000)은 섬오갈피의 수확시기와 부위에 따라 생리활성물질 함량이 다르기 때문에 생리활성물질 생산을 목적으로 재배할 경우 9월 말에 수확하는 것이 생리활성물질 함량이 가장 높다고 보고하여, 노지에서 생산된 섬오갈피를 산업시장의 원료로 사용하기 위해서는 엄격한 재배관리가 요구된다. 이에 비해 식물조직 배양을 이용하여 생리활성물질을 생산할 경우 배양환경을 인위적으로 조절할 수 있고, 배양체가 균일하여 연중 일정한 품질의 생리활성물질을 생산할 수 있다(Paek 등, 2001). 부정근을 이용한 섬오갈피의 성장과 생리활성물질 생산에 관한 연구는 일부 진행되었으나(Ahn 등, 2005; Ahn 등, 2006), 이미 500L 이상 규모의 생물반응기 배양에 성공하여 상업화가 이루어진 *Panax ginseng*(Choi 등, 2000; Murthy 등, 2008)과 *Echinacea purpurea* 부정근(Wu 등, 2007) 등에 비하면 대량생산 방법의 확립은 미미한 수준이다.

본 연구는 섬오갈피의 생리활성물질을 기내에서 연중 균일하게 대량생산하기 위한 생물반응기 배양조건 확립의 기초 실험으로 부정근의 성장(생체중, 건물중)과 총 페놀, 플라보노이드 생산에 적합한 배지 내 오옥신과 사이토키닌의 종류와 농도를 구명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

섬오갈피(*Eleutherococcus koreanum* Nakai) 종자는 경기도 수원시에 위치한 국립산림과학원 유전자원림에서 채취한 뒤 2년간 습윤, 저온 저장하여 휴면을 타파시켰다. 휴면이 타파된 종자를 2% sodium hypochlorite solution으로 15분간 표면 살균한 뒤 멸균수로 3회 세척하였다. 그 후 미숙배를 적출하여 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 가 첨가된 MS 배지(Murashige와 Skoog, 1962)와 식물생장조절물질이 제거된 1/2 MS 배지에 순차적으로 치상하여  $22\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16/8(명/암) 광주기

에서 식물체를 유도하였다. 2개월 후 식물체로부터 뿌리를 절단하여  $22\pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 암조건에서 indole-3-butyric acid(IBA)  $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , thidiazuron(TDZ: N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea)  $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 가 첨가된 1/2 MS 배지를 이용하여 최종 부정근을 유도하였다(Ahn 등, 2005).

### 오옥신의 종류와 농도가 섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 적합한 오옥신의 종류와 농도를 조사하기 위하여 sucrose  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 가 첨가된 1/2 MS 배지에 IBA,  $\alpha$ -naphthalene acetic acid(NAA), indole-3-acetic acid(IAA)를 각각 0, 1, 2, 3,  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 처리하여 5주간 액체 진탕 배양하였다. 배지는 1N NaOH를 이용하여 pH 5.8로 조정 후, 공기용적이 250mL인 삼각플라스크에 70mL씩 분주하여  $121^\circ\text{C}$ , 1.2기압에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 배양은 생체중을 기준으로  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  접종밀도로 부정근을 접종한 후,  $22\pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 암조건에서 90rpm 속도로 각 처리구당 5반복하였다.

### 사이토키닌의 종류와 농도가 섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

사이토키닌의 종류와 농도가 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 IBA  $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sucrose  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 가 첨가된 1/2 MS 배지에  $\text{N}_6$ -benzyladenine(BA), 6-furfurylamino-purine(kinetin), TDZ의 농도를 달리하여 5주간 액체 진탕 배양하였다. BA와 kinetin은 0, 0.5, 1.0, 2.0,  $4.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 로, TDZ는 0, 0.05, 0.1, 0.2,  $0.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 달리 처리하였다. 기타 배양조건은 오옥신 실험과 동일하게 실시하였다.

### 성장량 측정

배양 5주 후에 배지를 제거한 부정근을 흡습지를 이용하여 충분히 수분을 제거한 다음 생체중을 측정하였으며, 생체중을 측정한 부정근을  $60^\circ\text{C}$ 로 고정시킨 건조기(FO-600M, Jeio Tech, Korea)에서 48시간 건조 후 건물중을 측정하였다. 생체중에 대한 건물중 비율은 Shohael 등(2006)의 방법에 따라 최종 수확한 건물중을 최종 수확한 생체중으로 나누어 백분율로 표시하였다.

### 생리활성물질 함량 측정

#### 추출물 조제

건조한 2g의 부정근을 40%(w/v) 메탄올에 침지하여 냉각

**Table 1.** Effect of auxin type and concentration on biomass accumulation of *Eleutherococcus koreanum* adventitious roots after 5 weeks of culture.

Auxin type	Concentration (mg·L <sup>-1</sup> )	Fresh weight (g·L <sup>-1</sup> )	Dry weight (g·L <sup>-1</sup> )	% dry weight
Control		9.43 ij <sup>z</sup>	1.14 hg	12.04
IBA	1.0	12.57 f	1.56 d	12.41
	2.0	13.71 e	1.61 d	11.74
	3.0	15.38 d	1.89 c	12.30
	5.0	23.24 a	2.77 a	11.89
NAA	1.0	14.71 d	1.86 c	12.64
	2.0	19.29 c	2.29 b	11.86
	3.0	21.76 b	2.34 b	10.76
	5.0	22.10 b	2.39 b	10.82
IAA	1.0	5.57 j	1.08 h	12.60
	2.0	9.90 hi	1.26 fg	12.70
	3.0	10.71 gh	1.38 ef	12.87
	5.0	11.05 g	1.49 de	13.47

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

관이 부착된 환류 냉각 추출장치(LS-2050-S10, LS-TECH, Korea)를 이용하여 80℃에서 1시간 추출하였다. 추출액은 여과지(Advantec 110mm, Toyo Rosihi Kaisha Ltd., Japan)를 통과시킨 후, 30mL로 정용하여 최종 추출물로 사용하였다.

#### 총 페놀과 플라보노이드 함량 측정

부정근 내 총 페놀과 플라보노이드 함량은 각각 Ali 등 (2006)과 Sakanaka 등(2005)의 방법에 따라 측정하였다. 표준물질로는 garlic acid(Sigma, MO, USA)와 (+/-) catechin standard solution(Sigma, MO, USA)을 사용하였으며, 부정근 내 생리활성물질 함량은 mg·g<sup>-1</sup> DW로 표시하였다.

#### 통계처리

통계처리는 SAS 프로그램(Version 6.21, SAS Institute Inc., Cary, NC)을 이용하여 5% 유의수준에서 Duncan 다중 비교하였다(SAS Institute, 1989).

## 결과 및 고찰

### 오옥신의 종류와 농도가 섬오갈피 부정근의 생장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

오옥신의 종류와 농도를 달리하여 섬오갈피 부정근을 5주간 배양한 결과 IBA 5mg·L<sup>-1</sup> 처리구에서 생체중과 건물중이 각각 23.24g·L<sup>-1</sup>와 2.77g·L<sup>-1</sup>로 가장 높았다(Table 1). IBA와 NAA 처리구들은 호르몬 무첨가 처리구에 비해 부정

**Table 2.** Effect of auxin type on root morphology of *Eleutherococcus koreanum* adventitious roots after 5 weeks of culture.

Treatment <sup>z</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	Root morphology		
	No. of lateral roots (per explant)	Average length of lateral roots (mm)	Color
Control	-	-	-
IBA 5.0	> 5	> 10	White
NAA 5.0	> 5	< 5	Dark yellow
IAA 5.0	-	-	-

<sup>z</sup>MS medium supplemented with 5.0 mg·L<sup>-1</sup> of each auxin.

근의 생장량이 최소 1.4배에서 최고 2.4배 이상 높았으나, IAA 처리구들은 호르몬 무첨가 처리구와 비교해 부정근의 생장량 차이가 거의 없었다. 특히 모든 처리구에서 배지 내 오옥신 농도가 증가할수록 생체중과 건물중이 증가하여 배지 내 오옥신 농도를 높여주는 것이 섬오갈피 부정근의 생장량 증가에 효과적임을 알 수 있었다.

각각의 오옥신들은 부정근의 형태형성에도 영향을 주어 배양 5주 후 부정근의 색상과 형태가 다르게 발달되었다(Table 2). 특히 부정근의 생장량이 높았던 IBA와 NAA 처리구들의 경우 형성된 측근의 수는 두 처리구 모두 절편체당 5개 이상으로 비슷하였지만 길이 신장률에서는 차이가 관찰되었다. IBA 처리구들은 새롭게 형성된 측근이 흰색을 띄며 10mm 이상으로 길이 신장이 활발히 이루어진대 비해, 상대적으로 초기에 접종한 주근이 비대 됨에 따라 배양 5주

후 부정근의 생장량이 증가된 NAA 처리구들은 새롭게 형성된 측근이 짙은 노란색을 띄며 5mm 미만으로 길이 신장이 크게 억제되었다.

오옥신은 부정근의 측근 형성과 길이 신장에 가장 큰 역할을 하는 식물생장조절물질로 부정근에 미치는 영향은 오옥신의 종류와 농도, 배양체의 종류, 배양환경 등에 따라 다르게 나타난다. 따라서 인돌산 그룹의 IBA와 나프탈렌산 그룹의 NAA, 천연 오옥신인 IAA에 의한 섬오갈피 부정근의 생장과 형태형성에 미치는 영향에는 차이가 있을 수 있다. 또한 본 실험에서는 섬오갈피 부정근을 새로운 배지로 옮겨 주는 과정에서 새롭게 형성된 측근만을 선발하여 절단하였는데, 이 과정 동안 IAA의 산화반응이 타 오옥신에 비해 강하게 발생하여 부정근의 생장량 증가가 거의 이루어지지 않은 것이라 생각되었다. 일반적으로 IBA는 타 오옥신에 비해 부정근의 형성과 길이신장에 강하게 작용하기 때문에 *Panax ginseng* 부정근(Kim 등, 2003a)과 모상근(Washida 등, 2004)의 뿌리 배양 시 측근의 형성과 길이 신장을 촉진시킨다고 알려져 있다. Kim 등(2003b)은 배지 내 IBA와 NAA를 각각 첨가하여 *Panax ginseng* 부정근을 배양할 때 발생하는 측근 형성과 길이 신장 과정을 현미경을 통하여 관찰한 결과 배양초기 부정근의 내피 부분의 분열 양상이 NAA 처리구보다 IBA 처리구에서 두드러지게 관찰되었으며, 측근의 형성과 길이 신장도 IBA 처리구에서 왕성하게 이루어졌다고 보고하였다. 특히 NAA 처리구의 경우 측근의 세포분열이 억제된 것처럼 보이며 근정단 부분이 비대 된 형태를 보여 본 실험결과와 동일하게 형성된 측근의 길이 신장이 원활하게 이루어지지 않았다고 하였다. NAA 처리 시 부정근의 길이 신장이 이루어지지 않고 비대 되는 현상은 *Panax ginseng* 부정근을 이용한 Jeong 등(2009)의 실험에서도 관찰되었다. 이와 같이 섬오갈피가 속한 두릅나무과 식물의 부정근 배양 시 일반적으로 NAA를 첨가하여 배양하면 새로운 측근의 형성은 이루어지지만 형성된 측근의 길이 신장은 원활이 이루어지지 않는 경향을 나타내었다. 길이 신장이 충분히 이루어지지 않은 부정근의 경우 활력이 높은 측근만을 선발하여 배양하는 부정근의 연속배양에는 적합하지 않은 형태로 판단되어 섬오갈피 부정근 배양에는 생장량 증가와 측근의 길이 신장이 활발히 이루어진 IBA가 적정 오옥신이라 생각되었다.

오옥신의 종류와 농도가 섬오갈피 부정근의 생리활성물질 축적에 미치는 영향을 조사한 결과 생장량 결과와 동일하게 고농도 IBA와 NAA 처리구에서 건물 1g속에 함유된 총 페놀과 플라보노이드 함량이 높았다(Table 3). NAA 5mg·L<sup>-1</sup> 처리구에서 총 페놀과 플라보노이드 함량이 각각 4.83mg·g<sup>-1</sup>

DW와 2.15mg·g<sup>-1</sup> DW로 총합이 가장 높았으며, IBA 5mg·L<sup>-1</sup> 처리구에서도 총 페놀과 플라보노이드 함량이 각각 4.88mg·g<sup>-1</sup> DW와 1.94mg·g<sup>-1</sup> DW로 비교적 높았다. 그러나 IAA 처리구는 배지 내 농도와 관계없이 생리활성물질 함량이 IBA와 NAA 처리구에 비해 현저히 낮았다. 일반적으로 생리활성 물질을 생산하기 위해 세포나 부정근 배양에 첨가하는 IBA와 NAA는 생리활성물질의 생합성 과정을 촉진시키고 2,4-D는 억제한다고 알려져 있다(Sahai와 Shuler, 1984). 특히 IBA는 *Panax ginseng* 부정근(Kim 등, 2003a)과 모상근(Washida 등, 2004)의 측근 형성뿐만 아니라 배양체 내 ginsenosides 함량도 증가시켰다고 보고되어, 본 실험에서도 배지 내 IBA 농도가 증가할수록 부정근 내 생리활성물질 축적이 촉진되었다고 생각되었다.

*Panax ginseng* 부정근(Jeong 등, 2009)과 *Echinacea augustifolia* 부정근(Wu 등, 2007)의 생장에 적합한 최적 IBA농도는 각각 5mg·L<sup>-1</sup>와 2mg·L<sup>-1</sup>로 일반적으로 5mg·L<sup>-1</sup> 이하 농도가 최적 농도로 보고되었다. 부정근의 생장에 적합한 식물생장조절물질의 종류와 농도는 배양체의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있으나, 고농도 오옥신이 첨가된 배지에서 식물조직을 장기간 배양할 경우 배양세포의 염색체 이상을 초래할 수 있으므로 주의하여야 한다. 또한 섬오갈피 부정근을 IBA 5mg·L<sup>-1</sup> 이상 농도에서 연속배양 시 배양체의 callus화가 진행되었다(결과 미제시). 따라서 본 실험의

**Table 3.** Contents of total phenolics and flavonoids in the adventitious root of *Eleutherococcus koreanum* as affected by auxin type and concentration after 5 weeks of culture.

Auxin Type	Concentration (mg·L <sup>-1</sup> )	Total phenolics (mg·g <sup>-1</sup> DW)	Total flavonoids (mg·g <sup>-1</sup> DW)
Control		1.44 e <sup>z</sup>	0.58 i
IBA	1.0	4.34 b	1.64 f
	2.0	4.63 a	1.81 e
	3.0	4.74 a	1.88 d
	5.0	4.88 a	1.94 c
	NAA	1.0	4.11 b
IAA	2.0	3.86 c	1.81 e
	3.0	4.25 b	2.00 e
	5.0	4.83 a	2.15 a
	1.0	1.42 e	1.42 fg
	2.0	1.58 e	0.60 i
IAA	3.0	2.38 d	0.84 h
	5.0	2.61 d	0.95 g

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

목적이 섬오갈피 부정근 배양을 통한 생리활성물질의 대량 생산이라는 점을 고려하여 부정근 내 생리활성물질 함량도 비교적 높고 성장량도 가장 높았던 IBA 5mg·L<sup>-1</sup>를 최적 옥신의 종류와 농도로 선발하였다.

#### 사이토키닌의 종류와 농도가 섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 축적에 미치는 영향

섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 생산에 최적 옥신의 종류와 농도로 선발된 IBA 5mg·L<sup>-1</sup>와 사이토키닌을 혼용 처리하여 5주간 배양한 결과는 Table 4와 같다. TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup>와의 혼용 처리구가 IBA 단용 처리구에 비해 생체중과 건물중이 각각 1.4배(30.59g·L<sup>-1</sup>)와 1.6배(4.14g·L<sup>-1</sup>) 증가하여 성장량이 가장 높았다. 이에 비해 BA와 kinetin과의 혼용 처리구들은 배지 내 농도와 관계없이 IBA 단용 처리구에 비해 부정근의 성장량이 비슷하거나 소폭 증가하여 부정근의 성장량 증가에는 효과적이지 않았다. 특히 저농도 TDZ 첨가 시 IBA 단용 처리구에 비해 형성된 측근의 수는 비슷하지만 형성된 측근의 길이가 2배 이상 신장되어 최종 부정근의 성장량이 증가하였다(Fig. 1). 일반적으로 부정근의 성장량은 일차근의 비대생장과 함께 발생하는 이차근의 수와 길이신장에 의해 증가한다. 따라서 세포분열을 촉진하는 것으로 알려진 사이토키닌은 부정근 배양 시 옥신과 혼용하여 사용할 경우 측근의 길이 신장을 촉진시켜 최종 성장량 증가를 기대 할 수 있다. Narayan 등(2005)과 Lee 등(2006)도 *Daucus carota* 세포와 *Gymnema sylvestre* 세포

배양 시 고농도 옥신과 함께 저농도의 사이토키닌을 혼용 처리할 경우 배양체의 세포분열이 활발하게 이루어져 최종 성장량이 증가하였다고 보고하였다.

배양 5주 후 부정근 내 생리활성물질 함량을 측정한 결과 성장량 결과와 동일하게 TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup>와의 혼용 처리구에서 총 페놀과 플라보노이드 함량이 IBA 단용 처리구에 비해 각각 1.5배 증가하여 7.7mg·g<sup>-1</sup> DW와 2.9mg·g<sup>-1</sup> DW로 가장 높았다(Table 5). 또한 TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup> 이상 농도에서는 총 페놀과 플라보노이드 함량이 오히려 감소하여 고농도 TDZ 첨가 시 부정근 내 생리활성물질 축적이 억제됨을 알 수 있었다. BA와 kinetin과의 혼용 처리구들은 모든 농도에서 생리활성물질 함량이 IBA 단용 처리구와 5% 유의범위 수준에서 비슷하거나 감소하여 생리활성물질 축적에 효

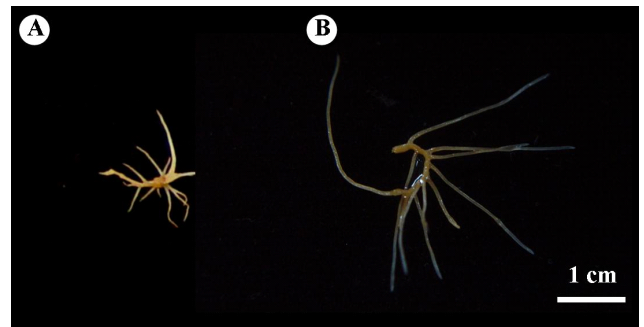


Fig. 1. Development of *Eleutherococcus koreanum* adventitious roots as affected by TDZ concentration after 5 weeks of culture (A, 5.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA; B, 5.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ).

Table 4. Effect of combination of auxin and cytokinin on biomass accumulation of *Eleutherococcus koreanum* adventitious roots after 5 weeks of culture.

Cytokinin type <sup>z</sup>	Concentration (mg·L <sup>-1</sup> )	Fresh weight (g·L <sup>-1</sup> )	Dry weight (g·L <sup>-1</sup> )	% dry weight
Control		21.53 e <sup>y</sup>	2.57 f	12.00
TD <sup>z</sup>	0.05	27.43 b	3.56 b	12.98
	0.1	30.59 a	4.14 a	13.54
	0.2	19.33 g	2.78 de	14.36
	0.4	19.12 g	2.73 def	14.27
BA	0.5	22.46 d	2.88 d	12.83
	1.0	24.37 c	3.09 c	12.68
	2.0	21.33 e	2.68 ef	12.55
	4.0	21.32 e	2.68 ef	12.57
Kinetin	0.5	22.56 d	2.90 d	12.83
	1.0	20.74 ef	2.71 def	12.87
	2.0	20.74 ef	2.62 ef	12.62
	4.0	20.35 f	2.60 ef	12.75

<sup>z</sup>Each treatment supplemented with 5.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 5.** Contents of total phenolics and flavonoids in the adventitious root of *Eleutherococcus koreanum* as affected by combination of auxin and cytokinin after 5 weeks of culture.

Cytokinin type <sup>z</sup>	Concentration (mg·L <sup>-1</sup> )	Total phenolics (mg·g <sup>-1</sup> DW)	Total Flavonoids (mg·g <sup>-1</sup> DW)
Control		4.93 cde <sup>y</sup>	1.98 d
TDZ	0.05	5.16 cd	1.91 d
	0.1	7.70 a	2.90 a
	0.2	6.63 b	2.20 c
	0.4	7.17 ab	2.59 b
BA	0.5	5.57 c	1.74 e
	1.0	5.66 c	1.80 e
	2.0	5.35 c	1.57 f
	4.0	5.11 cde	1.44 g
Kinetin	0.5	3.84 f	0.80 i
	1.0	4.16 ef	0.88 h
	2.0	4.23 def	0.94 h
	4.0	4.33 def	0.88 h

<sup>z</sup>Each treatment supplemented with 5.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA.

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

과적이지 않았다.

세포분열을 촉진하는 것으로 알려진 사이토키닌 첨가에 의한 배양체 내 생리활성물질 함량 증가는 다양한 약용식물의 기내 배양에서 보고되었다. Zhong 등(1996)은 *Panax quinquefolium* 세포배양 시 저농도 kinetin을 첨가하면 세포 내 saponin 축적이 촉진된다고 보고하였으며, Ahn 등(2005)도 섬오갈피 부정근 배양 시 오옥신과 함께 저농도 사이토키닌을 혼용하여 사용할 경우 성장량과 함께 생리활성물질 함량도 증가하였다고 보고하였다. 그러나 모든 생리활성물질이 사이토키닌 첨가에 의해 증가하는 것은 아니다. Seitz와 Hinderer(1988)는 *Haplopappus* 세포배양 시 배지 내 kinetin을 첨가하여 배양하면 세포 내 anthocyanins의 함량이 증가하지만 *Populus* 세포배양의 경우에는 오히려 세포 내 anthocyanins 함량이 감소되어 식물 종에 따라 식물생장조절물질에 의한 배양체 내 생리활성물질의 축적양상이 다르게 나타남을 보고하였다. 식물생장조절물질과 배양체 내 생리활성물질 축적간의 상관관계를 규명하려는 연구가 진행 중이나 아직 정확한 기작은 밝혀지지 않았다(Zhong 등, 1996). 일반적으로 synthetic phenylurea derivate의 일종인 TDZ와 N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea(CPPU)는 식물조직배양 시 부정근과 부정아 유도에 adenin-type cytokinin의 일종인 BA와 kinetin에 비해 작용력이 강한 것으로 알려져 있다(Huettaman과 Preece, 1993). 특히 Huettaman과 Preece(1993)은 목본류의 조직배

양 시 TDZ를 사용하면 adenin-type cytokinin에 비해 활성이 높아 효과적으로 세포분열이 유도된다고 하여 목본류의 일종인 섬오갈피도 저농도 TDZ 첨가에 따른 부정근의 세포분열을 증가로 인해 성장과 생리활성물질 함량이 증가한 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 바탕으로 섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 생산에 적합한 식물생장조절물질의 종류와 농도는 IBA 5mg·L<sup>-1</sup>와 TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup>를 혼용 처리하는 것으로 선발하였다. 생물반응기를 이용하여 생리활성물질을 대량생산하기 위해서는 다양한 배양환경의 최적화가 필요하다(Murthy 등, 2008). 생리활성물질 생산에 영향을 주는 배양환경에는 크게 배지 내 화학적 환경요인(식물생장조절물질의 종류와 농도, 무기염 농도, 질소원의 비율 및 당 농도), 배양기 내 물리적 환경요인(접종 밀도와 공기 공급량) 및 배양체 내 생리활성물질 함량을 증가시키기 위한 elicitor 처리 등이 있다. 이에 본 실험결과를 바탕으로 생물반응기를 이용한 섬오갈피의 생리활성물질을 연중 균일하게 대량생산하기 위하여 다양한 환경요인들에 대한 추가 실험들을 진행 중이다.

## 초 록

섬오갈피 부정근의 성장과 생리활성물질 생산에 적합한 MS 배지 내 오옥신(IBA, NAA, IAA)과 사이토키닌(BA, kinetin, TDZ)의 종류와 농도를 구명하고자 250mL 삼각플라스크를 이용하여 5주간 액체 진탕 배양하였다. IBA 5mg·L<sup>-1</sup> 처리구에서 생체중과 건물중이 가장 높았으며, 부정근 내 총 페놀과 플라보노이드 함량 역시 NAA나 IAA처리구에 비해 높았다. 오옥신과 사이토키닌의 혼용처리에 따른 부정근의 생장은 IBA 5mg·L<sup>-1</sup>와 TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup>와의 혼용 처리구가 IBA 단용 처리구에 비해 생체중과 건물중이 각각 1.4배와 1.6배 증가하여 가장 높은 성장량과 생리활성물질 함량을 나타내었다. 이에 비해 BA와 kinetin과의 혼용 처리는 IBA 단용 처리와 비교해 부정근의 성장과 생리활성물질 생산에 크게 영향을 주지 않았다. 본 실험을 통하여 MS 배지 내 오옥신과 사이토키닌을 IBA 5mg·L<sup>-1</sup>와 TDZ 0.1mg·L<sup>-1</sup>로 혼용 처리 할 경우 섬오갈피 부정근의 성장량과 생리활성물질 함량을 크게 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

추가 주요어 : 액체배양, 약용식물, 뿌리 형태형성

## 인용문헌

Ahn, J.K., S.Y. Park, W.Y. Lee, and J.J. Lee. 2005. Effects of

- growth regulators on adventitious root growth and eleutherosides and chlorogenic acid accumulation in air lift bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum*. Kor. J. Plant Biotechnol. 32:57-61.
- Ahn, J.K., S.Y. Park, W.Y. Lee, and Y.K. Park. 2006. Effects of jasmonic acid on root growth and eleutheroside accumulation in adventitious root culture of *Eleutherococcus koreanum*. J. Kor. For. Soc. 95:32-27.
- Ali, M.B., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Antioxidantive responses of *Echinacea angustifolia* cultured roots to different levels of CO<sub>2</sub> in bioreactor liquid cultures. Enz. Microbial Technol. 39:982-990.
- Choi, S.M., S.H. Son, S.R. Yun, O.W. Kwon, J.H. Seon, and K.Y. Paek. 2000. Pilot scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 62:187-193.
- Huettaman, C.A. and J.E. Preece. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33:105-119.
- Jeong, C.S., H.N. Murthy, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2009. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Acta Physiol. Plant 31:219-222.
- Jwa, C.S., Y.T. Yang, and J.S. Koh. 2000. Changes in free sugars, organic acids, free amino acids and minerals by harvest time and parts of *Acanthopanax koreanum*. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43:106-109.
- Kim, Y.S., E.J. Hahn, E.C. Yeung, and K.Y. Paek. 2003a. Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA and NAA in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. In vitro Cell Dev. Biol. Plant 39:245-249.
- Kim, Y.S., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2003b. Effects of auxin-induced ethylene on growth and development of adventitious roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Kor. J. Plant Biotechnol. 30:173-177.
- Ko, H.J., C.K. Song, and N.K. Cho. 2003. Growth of seedling and germination characteristics of *Acanthopanax koreanum* Nakai. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 11:46-52.
- Lee, E.J., M. Mobin, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestri*. J. Plant Biol. 49:427-431.
- Lee, S.H., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2008. Nitrogen source and sucrose concentration in the medium affect Indian ginseng (*Withania somnifera*) cultures in vitro. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26:306-312.
- Lim, J.H., S.H. Lee, B.S. Jun, Y.T. Yang, and J.S. Koh. 2005. Changes in major constituents by soaking of *Acanthopanax koreanum* with spirit solution. J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 48:166-172.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-497.
- Murthy, H.M., E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2008. Adventitious roots and secondary metabolism. Chin. J. Biotechnol. 24:711-716.
- Narayan, M.S., R. Thimmaraju, and N. Bhagyalakshmi. 2005. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin cell line of *Daucus carota*. Process Biochem. 40:351-358.
- Paek, K.Y., E.J. Hahn, and S.H. Son. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. In vitro Cell. Dev. Biol. 37:284-292.
- Park, S.Y., J.K. Ahn, W.Y. Lee, H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2005. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerates. Plant Sci. 168:1221-1225.
- Sahai, O.P. and M.L. Shuler. 1984. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnol. Bioeng. 26:111-120.
- Sakanaka, S., Y. Tachibana, and Y. Okada. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of *Japanese persimmon* leaf tea (kakinoha-cha). Food Chem. 89:569-575.
- SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's guide. 4th ed. Ver. 6. SAS Inst., Cary, NC.
- Seitz, H.U. and W. Hinderer. 1988. Anthocyanins: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 5. Academic Press., San Diego, USA.
- Shohael, A.M., M.B. Ali, K.W. Yu, E.J. Hahn, R. Islam, and K.Y. Paek. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. Process Biochem. 41:1179-1185.
- Shohael, A.M., H.N. Murthy, H.L. Lee, E.J. Hahn, R. Islam, and K.Y. Paek. 2008. Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus senticosus* embryogenic suspension cultures with methyl jasmonate treatment. Biochem. Eng. J. 38:270-273.
- Southwell, L.A. and C.A. Bourke. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochem. 56:437-441.
- Washida, D., K. Shimomura, M. Takido, and S. Kitanaka. 2004. Auxins affected ginsenoside production and growth of hairy roots in *Panax* hybrid. Biol. Pharm. Bull. 27:657-660.
- Wu, C.H., Y.H. Dewir, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J. Plant Biol. 49:193-199.
- Wu, C.H., H.N. Murthy, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2007. Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. Biotechnol. Lett. 29:1179-1182.
- Zhong, J.J., Y. Bai, and S.J. Wang. 1996. Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. J. Biotechnol. 45:227-234.