J Plant Biotechnol (2018) 45:250-256
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.3.250

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

IBA 및 elicitor 처리에 따른 백수오 기내 생산 부정근 및 표준품의 FT-IR 스펙트럼 기반 대사체 비교 분석

안명숙 · 소은진 · 지은이 · 최소연 · 박상언 · 문병철 · 강영민 · 민성란 · 김석원

Metabolic comparison between standard medicinal parts and their adventitious roots of *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl. using FT-IR spectroscopy after IBA and elicitor treatment

Myung Suk Ahn · Eun Jin So · Eun Yee Jie · So Yeon Choi · Sang Un Park · Byeong Cheol Moon · Young Min Kang · Sung Ran Min · Suk Weon Kim

Received: 19 July 2018 / Revised: 23 July 2018 / Accepted: 23 July 2018
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To determine whether metabolite fingerprinting for whole cell extracts based on Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) can be used to discriminate and compare metabolic equivalence, standard medicinal parts of *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl. and their adventitious roots were subjected to FT-IR. The principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) from FT-IR spectral data showed that whole metabolic pattern from the adventitious root of *Cynanchum wilfordii* was highly similar to its standard medicinal parts. These results clearly showed that mass proliferation of adventitious roots could be applied for the novel supply of standard medicinal parts of medicinal plants. Furthermore, FT-IR spectroscopy combined with multivariate analysis established in this study could be applied as an alternative tool for discriminating of whole metabolic equivalence from standard medicinal parts. Thus, it is proposed that these metabolic discrimination systems from the adventitious root of *Cynanchum wilfordii* could be applied for metabolic standardization of in vitro grown *Cynanchum wilfordii*.

Keywords Adventitious root, *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl., Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Partial least square discriminant analysis (PLS-DA), Principal component analysis (PCA)

†These authors contributed equally to this work.
M. S. Ahn† · E. J. So† · E. Y. Jie · S. Y. Choi · S. R. Min (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Republic of Korea)
e-mail: srmin@kribb.re.kr

M. S. Ahn†
국립원예특작과학원 화훼과
(Floriculture Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea)

S. W. Kim (✉)
한국생명공학연구원 생물자원센터
(Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do, 56212, Republic of Korea)
e-mail: kimsw@kribb.re.kr

S. U. Park
충남대학교 자원식물학과
(Department of Crop Science, College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea)

B. C. Moon · Y. M. Kang
한국한의학연구원 한약연구부
(Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Republic of Korea)

서 언

백수오는 박주가리과 다년생 덩굴성 초본식물인 은조롱(*Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.의 괴근으로서 강장, 보혈 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 백수오 괴근의 유효성분은 steroidal alkaloid로서 gagamine과 steroid 계통의

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

sarcostine, penupogenin, kidjoranin, ikemaoylsarcostin 등과 배당체가 보고되어 있다(Nam 2014). 특히 gagamine은 in vitro에서 hepatic aldehyde oxidase의 활성을 억제하고, 또한 cynandione A는 신경세포의 손상을 억제한다고 보고되는 등 항산화 활성에 효과적인 것으로 알려져 있다(Lee et al. 2008).

최근 국내 생산 기반이 미약한 한약자원의 경우 외국 수입이 크게 증가하면서 사회적 우려가 증가하고 있다. 무엇보다도 사회적 관심이 큰 문제는 수입 한약재의 안전성에 관한 것으로 한약자원의 재배 및 유통과정에서 발생될 수 있는 농약이나 중금속 오염 등 에 관한 우려가 크게 증가하고 있다. 또 다른 문제는 수입 한약재들이 가루나 절편 형태로 주로 유통이 이루어지기 때문에 육안으로 원산지를 판별하는 것은 거의 불가능하여 수입산 한약재를 국내산으로 불법 표기함으로써 발생되는 유통질서 문란이다. 또한 백수오의 경우 유사종인 이엽우피소의 재배나 혼용에 따른 사회적 문제가 제기된 바 있다. 따라서 국내 한약산업의 발전과 보다 안전한 한약재의 공급을 위해서는 한약자원의 대사체 수준에서 표준화 체계를 구축하고 이를 통해 신속하고, 정확한 한약자원 진위 판별 및 원산지 식별기술 개발이 매우 시급한 실정이다(Korea Health Industry Development Institute 2013).

식물조직배양 기술은 식물의 세포 및 조직을 인공배양조건에서 무균배양하는 기술로 한약자원의 기내 대량 증식을 통한 상용화는 물론 주요 약용부위(부정근 및 소괴경 등)를 직접적으로 대량 생산할 수 있는 수단이다(Sridha and Aswath 2014). 기내에서 대량생산된 한약자원의 약용부위는 배양과정동안 인공배양조건에서 무균으로 증식이 이루어지기 때문에 농약이나 기타 중금속 등 인체 유해 요인을 완벽하게 배제한 상태에서 생산이 가능하다. 또한 기원식물의 검증이 이루어진 표준시료로부터 증식이 이루어지므로 이종 혼입의 문제점 또한 완벽하게 제어할 수 있다. 특히 부정근 배양은 세포배양에 비하여 유전적, 생화학적으로 안정성이 높아서(Jung 2013) 인삼(*Panax ginseng*) (Murthy et al. 2016), 섬오갈피(*Eleutherococcus koreanum*) (Lee and Paek 2012), 카모마일(*Anthemis nobilis*) (Abdullahil et al. 2012) 등의 약용작물에 대한 부정근 증식을 통한 상용화 가능성 연구보고가 이루어진 바 있다. 따라서 식물조직배양을 통한 한약자원 약용부위 대량증식 기술은 보다 안전하고, 정확하며, 균일한 한약자원의 대체공급수단으로 활용 가능성이 매우 크다.

대사체 분석기술은 세포 및 조직에 존재하는 대사산물의 양적, 질적 패턴 차이를 조사하는 연구 분야이다. 각 시료의 대사체 추출물을 FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy), HNMR (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy) 및 MS (mass spectrometry) 등의 분석장비를 이용하여 스펙트럼을 조사하고, 얻어진 데이터로부터 다변량통계분석 기법을 활용하여 유용한 생물학적 정보를 추출하는 기술 분야이다 (Krishnan et al. 2005). 이들 대사체 분석 기술들은 식물 종과 품종의 신속한 식별 (Kim et al. 2004; Kim et al. 2009), GMO와 non-GMO의 식별(Emura et al. 2006; Caires et al. 2008), 돌연변이주의 신속한 선발수단(Ward et al. 2003) 등 식물 연구에 다양하게 적용되고 있다. 특히 FT-IR을 이용한 분석법은 높은 감도를 가지며 다수의 시료로부터 얻어진 스펙트럼을 쉽고 간편하게 조사할 수 있는 장점을 가지고 있다. 최근 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기술은 유연관계가 높은 고등식물의 종 구분(Kwon et al. 2011; Kim et al. 2007) 및 품종 식별(Kwon et al. 2014), 한약자원 부정근과 표준품 비교분석(Ahn et al. 2015)이 가능함이 보고된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법을 이용하여 백수오의 표준 약용부위와 식물조직배양 기술을 통해 생산된 기내배양 부정근으로부터 대사체 수준 동등성 평가체계를 확립함으로써 기내 생산 백수오 부정근의 상용화 발판을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

백수오 부정근 증식에 미치는 생장조절제 IBA 농도별 영향 조사

본 연구에 사용된 백수오(*Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.)의 약용부위 표준시료는 한국한의학연구원 한약연구본부로부터 제공받은 것을 사용하였다. 기내에서 발아된 백수오 식물체의 뿌리 절편을 1 mg/L IBA가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체배지에 치상하여 25°C, 암조건에서 부정근을 유도하였다. 0.5 mg/L IBA와 30 g/L sucrose가 첨가된 1/2MS 액체배지에서 부정근을 증식시킨 후 IBA 농도별 실험재료로 이용하였다.

백수오 부정근의 생장에 적합한 IBA의 농도를 구명하기 위하여 30 g/L sucrose가 첨가된 1/2 MS 배지에 IBA의 농도를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L로 달리하여 30일간 배양하였다. 생체중을 기준으로 100 mg을 25 mL 배지가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 접종하여 5일 간격으로 생장을 조사하였고, 10일 간격으로 동일 배지로 배지 교체를 해주었다. 또한 5일 간격으로 부정근을 수확하여 증류수로 세척한 다음 여과지를 이용하여 남아있는 수분을 충분히 제거한 다음 생체중(fresh weight, F.W)을 측정하였다. 건중량(dry weight, D.W)의 측정은 부정근을 60°C 건조기(JSOF-150, JSR, Korea)에서 48시간 건조한 후 측정하였다. 모든 배지의 pH는 고압멸균 전 pH 5.7 ± 1로 조정 후 121°C, 1.2기압에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 부정근의 배양은 25 ± 1°C, 100 rpm의 암조건인 현탁배양기(JSSI-300CL, JSR, Korea)에서 30일간 실시하였으며, 모든 처리구는 3반복으로 실시하였다.

백수오 부정근 생리활성물질 변화에 미치는 elicitor 종류별, 농도별 영향 조사

Elicitor 종류와 농도에 따른 백수오 부정근의 유용생리활성물질 함량 변화를 유도하기 위하여 elicitor 종류별, 농도별 영향을 조사하였다. Elicitor 처리에 사용된 배지는 배지 종류, 배지의 무기염 함량 및 sucrose 농도별 생장실험에서 백수오 부정근 증식에 가장 효과적이었던 2WPM (McCown Woody Plant 1980) 배지에 5 mg/L IBA, 6% sucrose 첨가한 액체배지(So 2017)를 사용하였다. 부정근 생체중 기준으로 200 mg을 50 mL 배지가 들어있는 250 mL 삼각플라스크에 접종한 다음 25°C, 암조건에서, 100 rpm으로 3주간 현탁배양을 실시하였다. 배양 4주차에 methyl jasmonate (MeJA) 및 salicylic acid (SA)를 다양한 농도(0, 50, 100, 200, 400 μM)로 처리하여 1주간 추가 배양을 실시하였다. 배양 4주 경과 후 elicitor가 처리된 부정근을 수거하여 증류수로 세척한 다음 각각 생중량 및 건중량을 조사하였다. 모든 처리구는 3반복으로 실시하였다.

백수오 표준 약용부위 및 기내 증식 부정근 시료로부터 metabolite의 추출 및 FT-IR 스펙트럼 분석

백수오 약용부위 표준 시료는 한국한의학연구원으로부터 제공받은 것을 사용하였다. 백수오 표준시료와 기내 부정근 시료로부터 metabolite의 추출을 위해 막자와 막자사발을 이용하여 미세한 분말로 분쇄하여 사용하였다. 각 처리구별 백수오 건조 분말 시료 20 mg을 tube에 넣고 20% methanol 용액을 200 μL씩 첨가하여 잘 섞어주었다. 각 tube를 50°C 수조에서 20분간 반응시킨 다음 13,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상징액을 새로운 tube에 옮겼다. 회수한 상징액은 원심분리과정을 반복하여 찌꺼기가 들어가지 않도록 조심스럽게 새로운 tube로 상징액을 옮겼다. 회수된 상징액은 -20°C에서 보관한 다음 FT-IR 스펙트럼 조사에 사용하였다.

FT-IR 스펙트럼 조사는 Tensor 27 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany)를 사용하였고, DTGS (deuterated triglycine sulfate) 검출기로 분석하였다. 추출된 각각의 시료 5 μL를 384-well silicon plate에 분주하여, 37°C hot plate에서 약 20분간 건조하였다. 건조된 silicon plate는 Tensor 27에 장착된 HTS-XT (Bruker Optics GmbH) 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 시료의 스펙트럼은 총 4,000 ~ 400 cm^{-1} 범위에서 그리고 4 cm^{-1} 간격으로 총 128회 반복 측정된 평균 스펙트럼을 분석에 사용되었다. 각 시료의 FT-IR 스펙트럼은 통계적 분석을 위해 각각 3회 반복 측정하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 데이터 변환에 사용된 프로그램은 Bruker에서 제공하는 OPUS Lab (ver. 7.0, Bruker Optics Inc.)를 사용하였다.

백수오 부정근 FT-IR스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석

FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 위해 먼저 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 전처리 과정을 R 프로그램(version 2.15.0, Auckland, New Zealand)을 이용하여 수행하였다. Baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점(1,800 ~ 800 cm^{-1})의 흡광도를 0으로 조정하였으며 실험상의 오차를 최소화하기 위하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering 과정을 거쳐 1차 미분을 수행한 다음 전처리가 완료된 스펙트럼 데이터를 다변량 통계분석 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다. 가공된 FT-IR 스펙트럼 데이터는 NIPALS 알고리즘(Wold et al. 2001)을 이용하여 R 프로그램(version 2.15.0)에서 PCA (Principal component analysis)와 PLS-DA (Partial least square discriminant analysis) 분석(Fiehn et al. 2000; Trygg et al. 2007)을 수행하였다.

결과 및 고찰

IBA의 농도 변화에 따른 백수오 부정근 생장률 변화

백수오 부정근의 생장에 적합한 IBA 농도를 조사하기 위하여 1/2 MS 배지에 IBA 농도를 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L로 처리하여 30일 동안 배양하였다. 생중량 및 건중량의 조사 결과 5 mg/L IBA 처리구에서 각각 8,810 mg, 924 mg 정도로 다른 처리구에 비해 가장 많이 증가하였다(Fig. 1). 배양 10일까지는 모든 처리구에서 생중량이 느린 속도로 증가하였으며, 배양 15일 경과 후에는 1 mg/L IBA 처리구에서 생중량이 급격하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1A). 그러나 배양 20일째부터 5 mg/L IBA 처리구에서 생중량이 뚜렷이 증가하여 배양 30일 후에 가장 높은 생중량을 보였으며, 0.1 mg/L IBA와 무처리구에서의 생중량은 5 mg/L IBA 처리구의 1/4 수준으로 적은 생중량을 보여주었다(Fig. 1A). IBA 농도별 처리구의 건중량은 생중량의 변화 양상과 거의 유사하였고, 배양 30일 경과 후 5 mg/L IBA 처리구에서 건중량은 924 mg으로 가장 높았다(Fig. 1B). IBA 처리농도에 따른 백수오 부정근의 증식 양상을 5일 간격으로 관찰한 결과, 배양 5일차부터 모든 처리구에서 부정근의 길이 생장과 측근 발생이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 배양 10일 경과후에는 모든 처리구에서 배지색이 연한 황색으로 변하기 시작하였으며, 배양 20일 경과 후에는 IBA 무처리구와 0.1 mg/L IBA 처리구에서 부정근의 중심부분이 갈변되고 있음을 보여주었다(Fig. 2A-B). IBA 처리 농도가 높아질수록 전반적으로 길이 생장보다는 측근 발생이 증가하는 경향을 보였고, 5 mg/L IBA 처리 농도에서 길이 생장 및 측근 발생이 왕성하여 생·건중량이 가장 많이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 2E). 그러나 10 mg/L IBA 처리구에서는 오

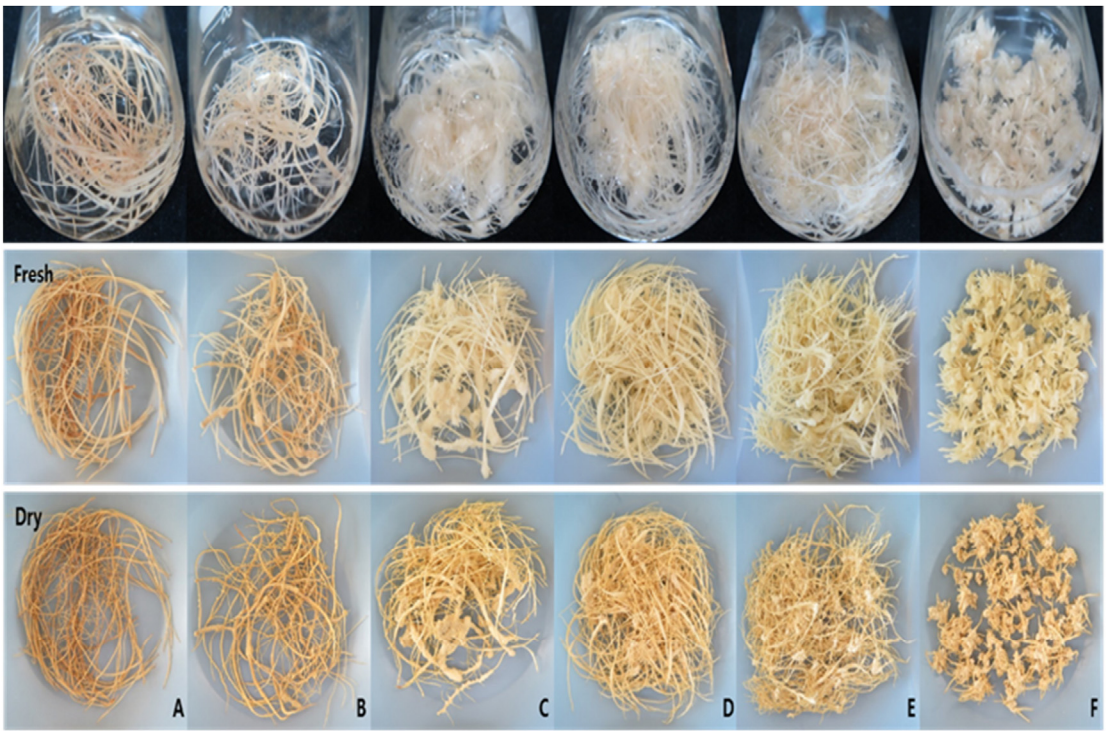

Fig. 1 Adventitious roots of *C. wilfordii* cultured in 1/2 MS medium supplemented with various concentration of IBA. A, 0 mg/L; B, 0.1 mg/L; C, 0.5 mg/L; D, 1 mg/L; E, 5 mg/L; and F, 10 mg/L of IBA

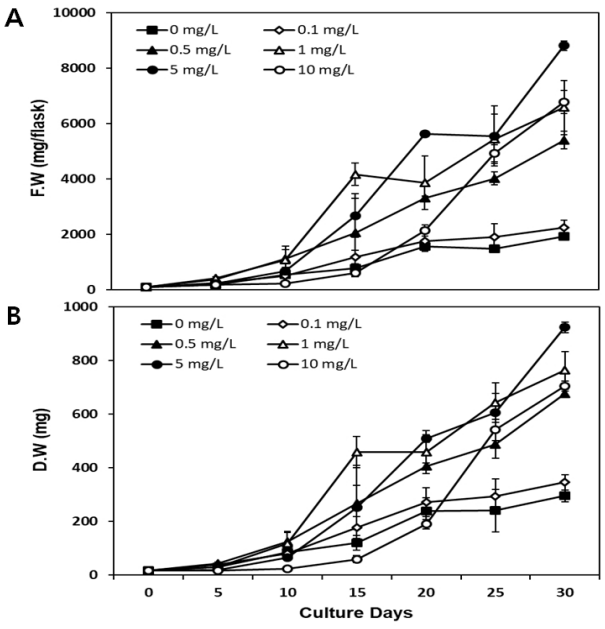

Fig. 2 Effect of IBA concentration on growth of adventitious roots of *C. wilfordii.* Fresh weight (A) and dry weight (B) was determined after 30 days of culture in 1/2MS medium supplemented with 30 g/L sucrose. The symbol represents individual IBA treatment. Results represent means ± SD (n=3)

히려 백수오 부정근의 생장이 감소하였다(Fig. 2F). 본 연구 결과로 미루어볼 때 5 mg/L IBA 처리가 백수오 부정근의 기내 증식에 최적 농도임을 알 수 있었다.

생장조절제는 부정근의 유도 및 발달에 중요한 역할을 하지만 식물 종에 따라 요구되는 최적 생장조절제의 종류와 농도는 상이하다. 본 연구 결과와 마찬가지로 *Polygonum*의 부정근 유도에서 NAA 보다 IBA가 더욱 효과적이며(Lee et al. 2015), *Morinda citrifolia*의 부정근 생장 및 유용생리활성물질 생산에 요구되는 최적 생장조절제로 5 mg/L IBA임이 보고된 바 있다(Abdullahil et al. 2010). 따라서 백수오 부정근의 생장률 및 형태적 관찰 결과로 미루어 볼 때 백수오 부정근의 대량증식을 위해 요구되는 IBA 최적 농도는 5 mg/L인 것으로 사료된다.

Elicitor 처리에 따른 백수오 부정근 및 표준품 시료의 대사체 비교 분석

백수오 유래 기내 생산 부정근 시료로부터 SA 및 MeJA를 각각 농도별(0, 50, 100, 200, 400 μM)로 1주일간 처리 후 백수오 약용부위 건조시료를 대상으로 전세포추출물의 FT-IR 스펙트럼 데이터로부터 다변량 통계분석 기법을 이용하여 대사산물의 양상변화를 비교분석하였다(Fig. 3). SA 처리구의 경우 농도별 처리구 간에 백수오 부정근의 생장에 큰 차이가 없었지만, MeJA 처리구의 경우 MeJA 처리 농도가 높아질수록 부정근이 갈변되면서 강한 향을 발산하였다. 특히 고농도의 MeJA 처리시 백수오 부정근의 생장이 감소하였다(데이터미제시). 이러한 결과는 *Salvia miltiorrhiza*의 세포배양 그리고 *Scopolia parviflora* 부정근 배양에서도 유사한 경향을

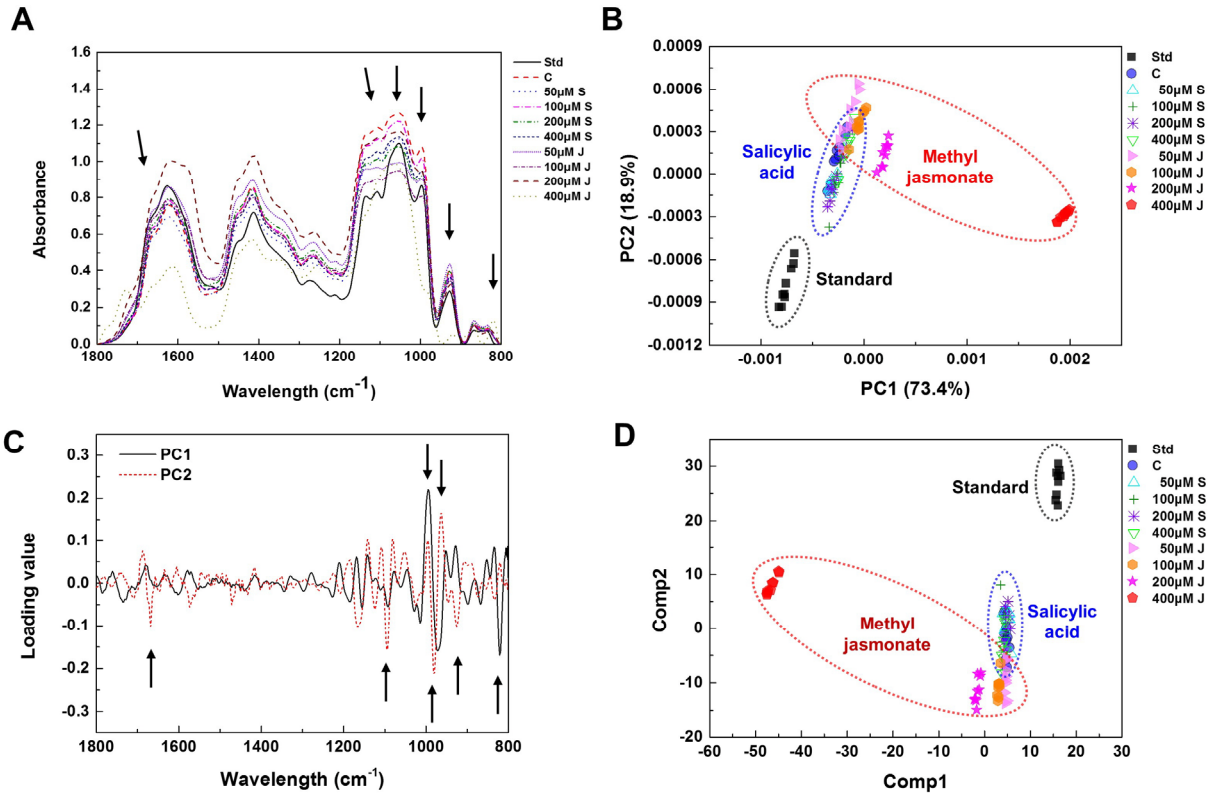

Fig. 3 Multivariate analysis of FT-IR spectral data from whole cell extracts of standard medicinal parts and elicitors treated adventitious roots of *C. wilfordii*. A: Representative FT-IR spectra of standard medicinal parts and adventitious roots. Arrows indicate the FT-IR regions showing significant spectral variations between standard medicinal parts and adventitious roots. B: Two-dimensional PCA score plot of FT-IR spectral data. C: PC loading plot based on PCA data from standard medicinal parts and adventitious roots. The solid line and dotted line represent PC 1 and PC 2 score, respectively. Arrows indicate the FT-IR regions playing important roles in discrimination between standard medicinal parts and adventitious roots. D: PLS-DA score plot of FT-IR spectral data. Dotted circles represent the individual boundaries of standard medicinal parts and elicitor treatments (B, D)

보였다(Murthy et al. 2016).

SA 및 MeJA를 1주일간 처리한 백수오 부정근 시료 및 표준 약용부위 시료 추출물들의 FT-IR spectrum을 비교 분석한 결과, 400 μM MeJA 처리구를 제외한 모든 elicitor 처리구에서 FT-IR 스펙트럼의 1,700 ~ 1,500 cm^{-1} 범위와 1,200 ~ 900 cm^{-1} 범위에서 유사한 스펙트럼 패턴을 보였다(Fig. 3A). FT-IR 스펙트럼상의 이 부위들은 amide I, II 그리고 carbohydrates 계열의 화합물들의 양적, 질적인 정보를 반영하는 부위이다(Dumas and Miller 2003; Wolkers et al. 2004; Lopez-Sanchez et al. 2010). 따라서 본 결과는 고농도의 MeJA 처리를 제외한 elicitor 처리된 백수오 부정근 시료와 표준 약용부위 시료간에 amide I과 II을 포함하는 아미노산이나 단백질 계열 물질과 단당류나 복합 다당류를 포함하는 carbohydrates 계열의 화합물들의 질적 차이가 크지 않음을 나타내었다. 그러나 400 μM MeJA 처리 조건에서 얻어진 부정근 시료와 나머지 조건 사이에서는 같은 범위에서 질적인 차이가 크게 나타나고 있다. 따라서 이 결과는 백수오 표준 약용부위와 기내에서 적정 농도의 elicitor와 함께 생산된 백수오 부정근 사이에 전체적인 대사체 패턴이 매우 유사함을 보여준다. 따라서 이 결과는 백수오 표준 약용부위와 기내에서 생산된 백수오 부정근사이에 전체적인 대사체 패턴이 매우 유사함을 보여주는 결과이다.

Elicitor 처리된 백수오 부정근 및 표준 약용부위 시료들에 대한 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 PC 1과 2 score의 설명력은 각각 73.4%와 18.9%로 전체 변이량의 92.3%를 반영하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3B). 또한 PC 1과 PC 2를 축으로 한 PCA score plot상에서 각 시료들의 분포를 조사한 결과 PC 1을 축으로 400 μM MeJA 처리구가 우측에 별도의 집단을 형성하며 분포하고 표준 약용부위 시료를 포함한 모든 elicitor 처리구들이 좌측에 분포함을 알 수 있었다(Fig. 3B). 이 결과는 400 μM MeJA 처리가 이루어지면 백수오 부정근에 존재하는 화합물들의 양적, 질적 차이가 크게 이루어지고 있음을 보여주는 결과라 사료된다. 또한 SA 처리구가 MeJA 처리구에 비해 표준 약용부위 시료에 보다 인접하여 분포하고 있어 표준시료와 대사체 수준에서 보다 유사한 것으로 사료된다. Methyl jasmonate 처리가 이루어지면 인삼 부정근 배양의 경우도 ginsenoside 함량 변화가 이루어지며(Yu et al. 2002), *Lithospermum* 현탁배양세포에서도 rosmarinic

acid, shikonin 및 dihydroechinofuran 등 주요 2차대사산물의 함량 변화가 이루어짐이 보고된 바 있다(Mizukami et al. 1993, Yazaki et al. 1997). 따라서 기내 배양과정에서 여러 elicitor 처리나 배양 환경 변화를 통하여 기내 생산 부정근의 대사체 변화를 유도하여 표준 약용부위 시료와 대사체 수준에서 동등하거나 특정 기능성 2차대사산물의 함량이 높은 시료의 확보가 가능할 것으로 기대된다.

PCA score plot으로부터 시료간의 구분이 이루어지는데 관여하는 중요한 변수를 보여주는 PCA loading value 분석 결과 시료의 구분에 중요한 역할을 하는 FT-IR 스펙트럼부위는 주로 1,200 ~ 900 cm^{-1} 범위와 1,700 cm^{-1} 부위인 것으로 나타났다(Fig. 3C). 이 결과는 고농도의 MeJA 와 다른 elicitor 처리구 시료간의 FT-IR 스펙트럼의 비교에서 스펙트럼의 양적, 질적 차이가 주로 이루어진 부위(Fig. 3A)와 일치하는 결과이다. 그러나 1,700 cm^{-1} 부위에서는 스펙트럼의 차이가 크게 이루어지지 않았다. 따라서 아미노산 계열의 화합물 변화보다는 단당류나 복합 다당류를 포함하는 carbohydrates 계열의 화합물들의 변화가 elicitor 처리를 통한 시료 식별에 중요한 역할을 하고 있는 물질인 것으로 사료된다.

PLS-DA 분석결과는 PCA에 비해 elicitor 농도별 처리구의 식별이 보다 확실하게 가능하였다(Fig. 3D). Comp1상으로 우측상단에 백수오 표준품 시료들이 위치하며, Comp2상으로 우측 하단부위에 400 μM MeJA 처리구를 제외한 모든 elicitor 처리구들이 위치하였다. 이 결과는 백수오 부정근의 경우 SA나 MeJA의 처리가 대사체 수준에서 큰 차이를 유발하지 않음을 의미하는 결과라 사료된다. 그러나 400 μM MeJA 처리구의 경우 Comp1상으로 좌측에 별도의 그룹으로 분포하여 표준품과의 대사체 수준에서 차이가 매우 큰 시료임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 고농도의 elicitor 처리에 따른 부정근의 손상 및 스트레스 심화로 인해 대사산물의 양적 혹은 질적 수준의 변화가 이루어졌을 것으로 추측된다. 따라서 백수오 부정근의 대량증식과정에서 100 μM 정도의 SA나 MeJA 처리가 대사체 수준에서 표준품과 유사한 백수오 부정근 시료로 생산이 가능할 것으로 예상된다.

본 연구 결과를 통해 한약자원 표준 약용부위 시료와 이들의 부정근 시료의 전세포추출물 FT-IR 스펙트럼분석을 통해 전체 대사산물의 질적, 양적 패턴차이를 쉽게 파악할 수 있음을 알 수 있었다. 본 연구그룹에서는 이미 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법을 활용하여 고등식물의 종 구분(Kim et al. 2004)은 물론 일일초(Kim et al. 2007), 딸기(Kim et al. 2009) 그리고 인삼(Kwon et al. 2014)의 품종 식별이 대사산물의 비교를 통해 가능함을 보고한 바 있다. 또한, GMO와 non-GMO 대두(Caires et al. 2008), 옥수수의 식별과 indica/japonica 벼 품종 식별(Emura et al. 2006)이 보고되었다. 이와 같이 PCA나 PLS-DA score plot상의 분포 위치에 얼마나 반복시료들의 집단 형성이 이루어지느냐에 따라 그룹을 형성하고 식별할 수 있다면 그것이 품종간이든 GM작물이든 아니면 배양시료/야생시료이든 식별이 가능하다고 보는 것이 타당할 것이다. 따라서 보다 다양한 한약자원 약용부위 시료들의 분석이 이루어진다면 본 연구결과는 다양한 한약자원 시료의 대사체 수준 비교분석 및 평가 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 아울러 본 연구를 통하여 백수오 기내생산 부정근과 표준 약용부위의 대사체 수준 양적, 질적 패턴이 유사함을 알 수 있었다. 이는 생물반응기나 여러 식물조직배양 기법을 통해 대량생산된 백수오 부정근 시료가 백수오 약용부위의 새로운 대체 공급수단으로 활용 가능성이 매우 높음을 의미하는 결과라 사료된다. 따라서 보다 다양한 한약자원들에 대한 기내 생산 약용부위 분석이 이루어진다면 부정근의 대량증식을 통하여 보다 안전하고, 기원검증이 이루어진 한약자원의 대체 공급이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

한약자원 약용부위와 대사체 수준에서 동등성이 규명된다면 식물조직배양을 통한 약용자원의 대량증식은 한약자원 약용부위의 보다 안전하고, 지속적인 대체 공급수단으로 활용이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 기원 검증이 이루어진 백수오 약용부위와 동일조직에서 유래된 부정근으로부터 전세포추출물의 FT-IR스펙트럼 분석을 통해 대사체 수준에서의 동등성을 비교분석함으로써 한약자원 약용부위의 대체 공급수단으로 활용 가능성을 검증하고자 하였다. 식물생장조절제인 IBA 농도별 백수오 부정근의 생장률 분석 결과 5 mg/L IBA 첨가 배지에서 백수오 부정근 증식이 가장 우수하였다. SA 처리의 경우 처리 농도가 증가함에도 불구하고 백수오 부정근의 생장에는 차이가 없었지만, MeJA 처리시 농도가 높아질수록 부정근이 갈변되고 생장이 감소하였다. Elicitor 처리된 백수오 부정근 및 표준 약용부위 시료로부터 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 와 PLS-DA 분석결과 400 μM MeJA를 제외한 모든 처리구에서 백수오 기내 생산 부정근과 표준 약용부위 시료들 사이에서 전체 대사체 패턴이 매우 유사함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확립된 FT-IR 스펙트럼기반 다변량통계분석 기술은 다양한 한약자원 약용부위 시료들의 대사체 수준 동등성을 신속하게 식별하는 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 한국생명공학연구원 기관고유사업(KGM4731814, KGM5281812)과 한국한의학연구원의 '생명공학기술 기반 한약자원 생산 다양화 기술 개발'(K14418)과제의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Abdullahil Baque M, Hahn E-J, Paek KY (2010) Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. Plant Biotechnol Rep 4:109-116

Abdullahil Baque M, Moh SH, Lee EJ, Zhong JJ, Paek KY (2012), Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. Biotechnology Advances 30:1255-1267

Ahn MS, Min SR, Jie EY, So EJ, Choi SY, Moon BC, Kang YM, Park SY, Kim SW (2015) Rapid comparison of metabolic equivalence of standard medicinal parts from medicinal plants and their in vitro-generated adventitious roots using FT-IR spectroscopy. J Plant Biotechnol 42:257-264

Caires ARL, Teixeira MRO, Súarez YR, Andrade LHC, Lima SM (2008) Discrimination of transgenic and conventional soybean seeds by fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. Applied Spectroscopy 62:1044-1047

Dumas P, Miller LM (2003) The use of synchrotron infrared microspectroscopy in biological and biomedical investigations. Vib Spectrosc 32:3-21

Emura K, Yamanaka S, Isoda H, Watanabe KN (2006) Estimation for different genotype of plants based on DNA analysis using near infrared (NIR) and fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Breeding Sci 56:399-403

Fiehn O, Kopka J, Drmann P, Altmann T, Trethewey R, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol 18:1157-1161

Jung CM (2013) In vitro culture of adventitious root and biological activity of extracts from *Broussonetia kazinoki*. Chonnam National University M.S Thesis

Kim SW, Ban SH, Chung H, Cho SH, Chung HJ, Choi PS, Yoo OJ, Liu JR (2004) Taxonomic discrimination of higher plants by multivariate analysis of fourier transform infrared spectroscopy data. Plant Cell Rep 23:246-50

Kim SW, Cho SH, Chung H, Liu JR (2007) Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by multivariate analysis of fourier transform infrared spectroscopy data. J Plant Biotechnol 34:201-205

Kim SW, Min SR, Kim JH, Park SK, Kim TI, Liu JR (2009) Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. Plant Biotechnol Rep 3:87-93

Korea Health Industry Development Institute (2013) An Empirical Study for the Growth of Korean Traditional Medicine Industry

Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. J Exp Bot 56:255-265

Kwon YK, Kim SW, Seo JM, Woo TH, Liu JR (2011) Prediction and discrimination of taxonomic relationship within *Orostachys* species using FT-IR spectroscopy combined by multivariate analysis. J Plant Biotechnol 38:9-14

Kwon YK, Ahn MS, Park JS, Liu JR, In DS, Min BW, Kim SW (2014) Discrimination of cultivation ages and cultivars of ginseng leaves using fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. J Ginseng Res 38:52-58

Lee EJ, Paek KY (2012), Enhanced productivity of biomass and bioactive compounds through bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai adventitious roots affected by medium salt strength. Ind Crops Prod 36:460-465

Lee HW, Park SY, Lee AY, Chae SW, Choi GY, Choo BK, Kim HY (2008) Quantitative analysis of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. J Kor Oriental Med 14:107-111

Lee KJ, Park YK, Kim JY, Jeong TK, Yun KS, Paek KY, Park SY (2015) Production of biomass and bioactive compounds from adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum* using air-lift bioreactors. J Plant Biotechnol 42:34-42

Lopez-Sanchez M, Ayora-Canada MJ, Molina-Diaz A (2010) Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. J Agric Food Chem 58:82-87

Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Rep 12:706-709

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-493

Murthy Hosakatte N, Dandin Vijayalaxmi S, Paek KY (2016) Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. Phytochemistry Reviews 15:129-145

Nam YJ (2014) Study on the constituents from roots of Cynanchum *wilfordii* and their anti-inflammatory effects. Dongguk University M.S Thesis

So EJ (2017) Establishment of optimal culture system for in-vitro large scale production of *Cynanchum wilfordii* adventitious roots. Chungnam National University M.S Thesis

Trygg J, Holmes E, Londstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. J Proteome Res 6:467-79

Ward JL, Harris C, Lewis J, Beale MH (2003) Assessment of 1H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 62:949-57

Wold S, Sjostrom M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chem Int Lab Syst 58:109-130

Wolkers WF, Oliver AE, Tablin F, Crowe JH (2004) A fourier transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. Carb Res 339:1077-1085

Yazaki K, Takeda K, Tabata M (1997) Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum* cell cultures. Plant Cell Physiol 38:776-782

Yu KW, Gao WY, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochem Eng J 11:211-215