

組織培養한 柴胡根의 Saikosaponin 含量

趙弼衡 · 成樂宣 · 裴馨華* · 蘇雄永** · 趙德以***

*韓豐製藥中央研究所 生物工學研究室 · **全北大學校 自然科學大學 生物學科

***全州又石大學 生物學科

Saikosaponin Contents in *Bupleurum falcatum* Root Produced by Tissue Culture

Pil Hyung Jo, Rack Seon Seong, Hyung Hwa Bae,* Woong Young Soh** and Duck Yee Cho***

*Laboratory of Biotechnology, Hanpoong Central Research Center, **Department of Biology, College of Natural Science, Chonbuk National University Chon Buk 560-765 and*** Department of Biology, Chonju Wooseok College, Chon Buk 565-800, Korea

Abstract—The study for the quantitative analysis of saikosaponin of *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture was attempted. The optimal concentration of 2,4-D was 0.1 mg/l for inducing the callus. The induction and growth of the adventitious root from the callus was obtained in the suspension culture containing MS basal medium supplemented with no plant growth regulators. The results of the quantitative analysis of saikosaponins by high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the content of saikosaponin a and c was high in the one-year-old root from somatic embryos and that of saikosaponin d was remarkably high in three-months-old adventitious root from callus.

Keywords—*Bupleurum falcatum* · callus · saikosaponins · analysis by HPLC

柴胡는 미나리科에 속하는 重要한 藥用植物로 우리나라의 거의 全域에 걸쳐 自生하는 多年生 草本植物이다.³⁾ 뿌리는 漢方에 있어서 解熱·鎮痛·解毒 및 消炎 等の 處方에 많이 使用되며 그 需要는 점차 增大해 가고 있다. 그 成分으로는 saikosaponin a, c, d等的 oleanane系의 saponin이며 藥理作用은 주로 saikosaponin a 및 d에 의한 것으로 報告되어 있다.^{1,3)} 他家受粉性植物인 柴胡는 栽培地域에 따라 變異가 많이 일어날 수 있고 따라서 形態의으로도 약간적의 差異를 보이고 있으며 2次代謝產物인 saikosaponin의 含量에 있어서도 栽培地域에 따라서는 2倍 以上の 差異를 보인다.^{6,13)} Hiraoca等은 組織培養을 통해 얻은 植物體의 saikosaponin 含量이 種子를 播種하여 얻은 것에 비해 훨씬 많이 含有되어

있음을 報告하고 있다.⁴⁾

한편, 最近에는 再分化狀態의 培養細胞에서 直接 2次代謝產物의 生産을 試圖하고 있는데 이미 Papaveraceae⁷⁾나 *Datura innoxia*⁵⁾의 再分化된 뿌리로부터 alkaloid를 生産하는 것과 *Bupleurum scozoneraefolium* 培養根에서 saponin을 分離하여 成分 含量이 栽培品에 匹敵하는 結果를 얻었으며,¹¹⁾ 人蔘의 不定根培養으로부터 2次代謝產物의 大量培養을 誘導하므로써 器內培養을 통한 2次代謝產物의 生産을 위한 研究가 繼續되고 있다.^{2,12)}

本 實驗은 柴胡의 品質의 均一化와 優秀한 品種의 柴胡로부터 組織培養을 통한 良質의 柴胡를 短時日內에 大量 增殖시킬 수 있는 方法과 再分化狀態의 培養細胞로부터 saikosaponin이 多

量으로 함유되어 있는 不定根을 培養하여 器內에서 直接 大量生産을 誘導할 目的으로 試圖되었다.

實驗材料 및 方法

材料

日本 近畿大學 藥學部 種子센터에서 分讓받은 柴胡種子를 24時間동안 蒸溜水에 沈積시킨 뒤 蛭石土로 채워진 花盆에 播種하여 溫度 $25 \pm 1^\circ$, 1,900 lux 連續螢光下에서 50일간 자라게 했다. 이렇게 生育된 길이 40~50 mm 가량의 幼葉을 70% 에칠알콜에 1分間 沈積시킨 후 滅菌수로 씻고 2% NaOCl에 10分間表面殺菌시킨 다음 滅菌수로 행구어 5 mm 크기로 切片하여 培地에 移植하였다.

實驗方法

이 實驗을 위하여는 첫째, 칼루스로부터 體細胞胚를 誘導, 器官分化를 거쳐 幼植物體를 만들고, 約 2個月間 溫室內에서 馳化를 거친 후, 露地에 移植栽培하여 收穫하는 方法과, 둘째로 生藥에 있어서 柴胡는 주로 뿌리만을 使用하므로 脫分化된 칼루스로부터 直接 再分化된 不定根만을 誘導시켜 3個月間 同一器內에서 培養하는 方法을 取했다. 위의 두가지 方法으로부터 얻어진 뿌리의 saikosaponin 含量을 測定하기 위해 HPLC를 利用하여 分析하였다.

칼루스 誘導를 위한 培地の 調整

使用培地는 MS基本培地에 寒天 8 g/l, 2,4-D 0.1 mg/l를 添加하여 pH5.6으로 調整한 후 120°에서 15分間 滅菌하였다. 培養條件은 播種時와 同一하며 移植한 2달만 후부터 칼루스가 誘導되기 始作하였고 이로부터 한달 후 同一條件으로 繼代培養하였다.

不定根 誘導 및 生長

不定根 誘導에 가장 效果의인 條件을 糾明하기 위하여 2,4-D 0.1 mg/l가 添加된 培地에서 2次繼代 培養되어 增殖된 칼루스를 3次繼代 培養時에는 2,4-D를 0에서 8 mg/l까지의 範圍를 2 mg單位로 나누어 處理한 MS固體培地에 培養하였다. 各各의 條件에서 增殖된 칼루스는 호르몬이 添加되지 않은 50 ml의 MS基本培地가 들

어 있는 250 ml 삼각플라스크에 接種시킨 후 實驗과 같은 培養條件下에서 100 rpm으로 振盪 培養하였다. 培養 1週日 후부터 誘導된 不定根을 30일 후 繼代培養한 후 두달이 經過하여 얻은 不定根을 乾燥시켜 分析의 材料로 使用하였다.

不定胚의 誘導 및 植物體 再生

일단 誘導된 칼루스는 不定胚 誘導 및 形成을 위하여 호르몬 無處理의 MS基本培地에 置床하여 不定根 誘導와 같은 培養條件下에서 懸濁培養하였다. 培養 20일 후 形成된 不定胚를 滅菌된 스포이드로 上騰液을 除去하고 남은 不定胚만을 寒天 0.8%의 MS基本培地에 옮겨 器官分化를 誘導하였다. 20 mm가량 자란 幼植物體를 蛭石土로 채워진 花盆에 移植하여 溫度 $20 \pm 3^\circ$, 自然光條件의 溫室에서 約 3個月間 5~6 cm程度로 生長시켜 順化시킨 뒤 이듬해 5月初旬頃 全北 礪山에 移植하여 栽培하였다. 同年 12月 5日 이 를 收穫하여 分析의 材料로 使用하였다.

Saikosaponin의 定量分析

不定根 및 體細胞胚를 통해 再分化된 植物體를 栽培하여 얻은 柴胡根과 種子를 播種하여 얻은 柴胡의 1年根을 saikosaponin의 定量分析 材料로 하였다.

Saikosaponin標準品(Wako Co., Japan) a, b 및 d 2 mg씩을 각각 1 ml의 5% HCl-MeOH에 溶解시킨 후 室溫에서 16時間 放置시킨 다음 10% NaOH로 中和시키고 MeOH로 2 ml가 되도록 하여 標準液으로 하였으며 種子由來 柴胡 1年根, 體細胞胚 由來 1年根 및 誘導된 不定根 각각 5 g씩을 취하여 200 ml의 MeOH로 70° 水槽에서 2時間동안 還流抽出한 다음 抽出物을 濾過하고 70° 이하에서 減壓濃縮하여 乾枯시킨 후 5% HCl-MeOH를 넣어 室溫에서 16時間 放置시켰다. 이 액을 10% NaOH로 中和시키고 MeOH로 5 ml가 되게 하여 C-18 sep-pak cartridge를 통해 濾過시킨 것을 試料液으로 하였다.

標準液 및 試料液은 各各 10 μ l씩을 注入하였으며 5回 反復 注入하여 分析을 실시하였다.

HPLC條件

試料液 10 μ l를 Hitachi-HPLC L-6,000 photodiode array detector에 注入하였고 column은 室溫에서 Merck社(U.S.A.)의 Lichrosorb RP-8

($\phi 4 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$)을 사용하였다. 移動相으로는 MeOH와 HPLC用蒸溜水, triethylamine, acetic acid를 75 : 25 : 0.2 : 0.2로 하여 流速 1.0 ml/min으로 흘려보내어 柴外部 吸光光度計 254 nm에서 分析을 施行하였다.

實驗結果 및 考察

Callus 增殖

잎 切片으로부터 칼루스 誘導까지는 8~12週 程度의 期間이 經過되어야 했고, 일단 誘導된 칼루스를 增殖시키는데는 2,4-D 0.1 mg/l 單獨 處理로 約 2週 程度 培養할 境遇 效果의이었다 (Table I). 2,4-D의 境遇 0.1 mg/l의 低濃度로 單獨處理했을 때 增殖效果가 뛰어난 反面에, k-NAA의 境遇 1.0 mg/l의 高濃度에서 2,4-D 0.1 mg/l 單用時와 비슷한 效果를 나타냈다. 本實驗에 있어서도 2,4-D 低濃度 處理에서 칼루스 增殖이 效果의이므로 칼루스 增殖에 必要的한 植物生長調節物質로서 2,4-D의 處理가 바람직하다 하겠다. IAA 處理의 境遇에는 칼루스 增殖은 되는 편이나 效果的이지 못하였으며 增殖에 걸리

Table I. Effects of some auxins and kinetin for the propagation of callus induced from *Bupleurum falcatum*

Auxins (mg/l)	Kinetin(mg/l)				
	0	0.1	1	10	
2,4-D	0	+	+	++	-
	0.1	###	###	###	###
	1	++	++	+	-
	10	+	+	++	+
k-NAA	0	+	+	++	+
	0.1	-	-	-	-
	1	+	+	+	-
IAA	10	++	###	###	###
	0	++	++	+	-
	0.1	-	-	+	-
	1	-	++	+	-
	10	+	+	+	-

###; excellent. ##; very good. ++; good.
+; usual. -; rare.

는 期間도 길었다.

不定根의 誘導

繼代培養된 칼루스를 植物生長調節物質無處理의 液體培地에 振盪培養하였다. 培養 19日後 生長調節物質 無處理에서 增殖된 칼루스를 液體培養한 것에서 不定根이 가장 活潑하게 形成되었는데 (Fig. 1) 器官形成에 있어서 植物生長調節物質로서 2,4-D의 添加가 오히려 不定根 形成에는 좋은 影響을 미치지 못하는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 現象은 Furuya 等²⁾이 一般的으로 生育에 좋은 影響을 미친다고 알려져 있는 2,4-D가 人蔘不定根의 培養에 있어서는 큰 效果를 보이지 못한다고 하는 報告와도 一致하는 것으로서 앞으로 不定根 誘導를 위해서는 生長調節物質의 添加의 有無가 큰 關鍵이 될 것으로 생각된다.

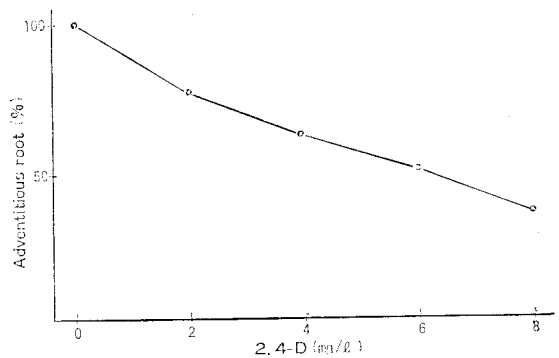


Fig. 1. Effect of 2,4-D for the induction of adventitious root from *B. falcatum* callus

體細胞胚의 誘導

體細胞胚 由來 柴胡根은 體細胞胚로부터 再分化되어 個體發生된 柴胡의 샘플 100個體를 露地에 移植하여 收穫한 것을 사용하였다.

生重量 및 乾量의 比較

體細胞胚 由來 1年根, 種子 由來 1年根 및 器內培養 不定根의 標本 各各 20個體를 任意 採取하여 生重量 및 乾量을 測定한 結果, 體細胞胚 由來 1年根이 種子 由來 1年根의 것보다 豫想밖으로 越等히 좋은 生育狀態를 보여주고 있었으며 한편 3個月間 培養되어 얻은 乾量의 平均値가 種子 由來 1年根의 것보다 높은 數値를 보이고 있음은 注目할 만한 것이라 하겠다 (Table II).

Saikosaponin의 함유

柴胡의 saikosaponin의 분석을 위해 이미 前處理된 標準品을 10 μl씩 注入하였다. 그 結果 saikosaponin c는 retention time 5分, d는 9分

Table I. Comparison of the fresh and dry weight and the dry/fresh weight ratio of the roots of *B. falcatum* derived from three sources

	Roots		
	A	B	C
Fresh weight (g)	7.54	1.68	—
Dry weight (g)	2.39	0.59	1.00
Dry/fresh weight ratio (%)	32	35	—

* (A) One-year-old root from somatic embryos.
 (B) One-year-old root from seed.
 (C) Three-months-old adventitious root from callus.

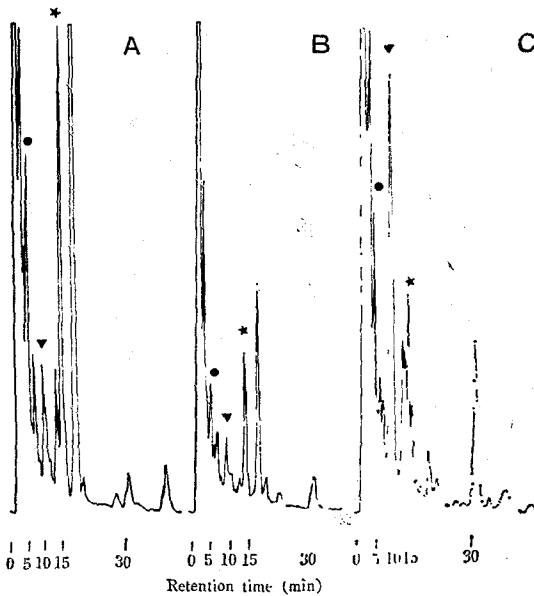


Fig. 2. HPL chromatograms of saikosaponin contents in extracts from the roots of *B. falcatum* derived from three sources: (A) One-year old root from somatic embryos. (B) One-year old root from seed, and (C) Three-months old adventitious root from callus.
 ★: saikosaponin a ●: saikosaponin c
 ▼: saikosaponin d

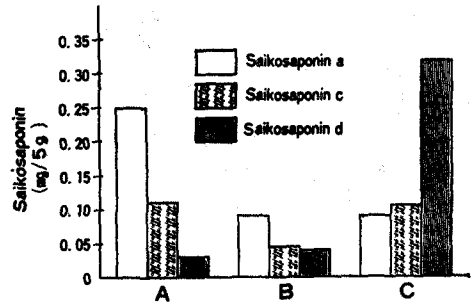


Fig. 3. Histograms of saikosaponin contents in extracts from the roots of *B. falcatum* derived from three sources: (A) One-year-old root from somatic embryos, (B) One-year-old root from seed and (C) Three-months-old adventitious root from callus.

그리고 a는 15分 程度에서 分離되었다. 體細胞胚 由來 1年根, 種子 由來 1年根 그리고 器內培養不定根의 分析은 標準品 saikosaponin과 同一하게 施行하였다. 그 結果는 Fig. 2-3과 같다. Saikosaponin a와 c의 境遇 體細胞胚 由來 1年根에서 그 含有量이 가장 높게 나타나고, saikosaponin d는 器內培養不定根에서 가장 높게 나타났다. 體細胞胚 由來 1年根의 saikosaponin 含量은 種子 由來 1年根의 것보다 顯著히 높게 나타났는데 이는 Hiraoka 等⁴⁾이 柴胡의 體細胞胚 由來 1年根의 saikosaponin 含量이 種子 由來 1年根의 것보다 매우 높게 나타난다고 報告한 것과도 一致하는 것이다. 따라서 이와 같은 現象이 母植物의 影響을 받은 것인지 아니면 칼루스 培養 期間 동안에 바이러스에 感染되지 않아서인지 또는 칼루스 培養 期間 동안에 일어난 細胞의 形質轉換에 의한 것인지에 대해서는 앞으로 繼續的인 研究가 뒤따라야 될 것으로 思料된다. 한편 이러한 現象에 대해서 Zenk 等¹⁴⁾은 *Catharanthus roseus*의 細胞培養을 통해 볼 때 母植物이 遺傳的으로 同型接合子가 아닐 境遇 한 母植物로부터 細胞를 培養하여 發生하는 成分含量의 差異는 遺傳的으로 分離되는 것 以上으로 많이 일어난다고 볼 때 특히 他家受粉性 植物인 柴胡의 境遇에 있어서는 細胞培養時 母植物의 選抜도 重要한 問題가 될 것이라고 생각된다.

不定根 誘導後 3個月間의 短期間內에 培養했던 器內培養 不定根에 있어서도 특히 優秀한

saikosaponin의 함유량을 나타냈는데 不定根 誘導後 30~40일까지는 急激한 生長을 보이다가 점차 鈍化되는 데 이는 脫分化 狀態에 있는 細胞가 母植物이 2次代謝系처럼 發現되는 것으로서 活潑한 根樣培養 組織狀態를 거치는 課程⁸⁾이라고 생각된다. 이와 같이 器官分化를 통한 saikosaponin의 生産은 Stumpt 등⁹⁾이 shikonin은 母植物의 뿌리 細胞에서 合成된 후 細胞바깥쪽으로 排出되어 뿌리의 皮層에 蓄積된다고 하는 報告와도 一致됨은 勿論 Tani等¹⁰⁾이 主根보다는 纖維狀根에서의 saikosaponin 蓄積이 越等하다고 하는 것처럼 아직 不定根에서 2期生長이 일어나지 않으므로서 saikosaponin이 節部層에서 蓄積되는 것이라고 여겨진다. 따라서, 이와 같은 事實로 미루어 볼 때 不定根만의 培養에 의한 saikosaponin의 大量生産이 可能해지리라고 豫想된다.

以上과 같은 結果를 綜合해 볼 때 柴胡는 多年草로서 1年根 또는 2年根을 收穫하여 使用하여 왔으며, 특히, 심한 根腐病으로 因하여 栽培에 많은 어려움이 있다. 그러나 體細胞胚 培養을 통해서 生産된 柴胡는 從來의 繁殖方法을 통해 生産된 柴胡와 比較하여 生重量 및 乾重量과 그 藥效成分인 saikosaponin의 含量에 있어서 越等히 優秀함을 보이고 있으므로 體細胞胚 培養을 통한 柴胡의 育種學的인 研究가 繼續되어져야 할 것이다.

한편 短期間內에 器內에서 培養된 不定根에서 saikosaponin含量的 分析을 통해 볼때 卓越한 結果를 보이고 있음은 勿論 특히 saikosaponin d의 境遇는 매우 높은 含有량을 나타내고 있다. 이미 人蔘의 培養根에서도 栽培人蔘보다 saponin 含量面에서 높게 나타나고 있는 例도 있으므로 앞으로 柴胡의 器內根培養을 통해 saikosaponin의 大量生産에 의한 商業的 利用 可能性에 對한 研究가 檢討되어져야 할 것으로 要望된다.

結 論

組織培養을 통하여 生産된 柴胡根으로부터 saikosaponin의 含量分析을 실시하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Callus誘導를 위한 2,4-D의 適正濃度는 0.1

mg/l였다.

2. 不定根의 誘導 및 生長에는 生長調節物質 無處理한 MS基本培地에서 增殖시킨 후 縣濁培養했을 때 잘 되었다.

3. HPLC에 의한 含量分析 結果, saikosaponin a와 c는 體細胞胚 由來 1年根에서 그리고 saikosaponin d는 器內培養不定根에서 顯著히 높게 나타났다.

〈1990년 7월 13일 접수 : 8월 1일 수리〉

文 獻

1. Abe, H., Sakaguchi, M., Konish, H., Tah, T. and Arich, S.: *Planta Medica* 34, 160(1978).
2. Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *Planta Medica* 48, 83 (1983).
3. Han, D.S. and Lee, D.K.: *Kor. J. Pharmacogn.* 16, 3(1985).
4. Hiraoka, N., Kodama, T., Oyanagi, M., Nakano, S., Tomita, Y., Yamada, N., Lida, O. and Satake, M.: Springer-Verlag. (1986).
5. Hiraoka, N. and Tabata, M.: *Phytochem.* 13, 1671. (1974).
6. Hiraoka, N., Kodama, T. and Tomida, Y.: *Shoyakugaku Zasshi* 37, 62(1983).
7. Ikuta, A., Syono, K. and Furuya, T.: *Phytochem.* 13, 2175, (1974).
8. Soh, W. Y. and Yeo, U. D.: '86 國內의 한국과학기술회 학술회의 하계 symposium 논문집. 337-340 (1986).
9. Stumpt, P.K., Conn, E.E. (ed).: In the *Biochemistry of plants*, Vol. 1,7. Academic Press. (1981).
10. Tani, T., Katsuki, T., Kubo, M. and Arichi, S.: *J. Chromatogr.* 360, 407 (1986).
11. Uomori, A. and Tomita, Y.: *Japan J. Pharmacog.* 28, 152. (1974).
12. Ushiyama, K., Miyamoto, Y., Oda, H., and Ishida, Y.: Production of *Panax ginseng* by tissue cultures 日東技報 22, 3 (1984).
13. Won, D.H., Yoon, T.B., Jo, J.H., Kang, S.J., No, H.W. and Chi H.J.: Report of NIH Korea 20, 233 (1983).
14. Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, H., Stöckigt, J., Weiler, E.W. and Deus, B.: Plant tissue culture and its biotechnology 27 (1977).