

## 대황의 형질전환된 뿌리로 부터 anthraquinone의 생산

황성진<sup>†</sup> · 표병식 · 채호준\* · 황백\*

동신대학교 식품생물공학과, \* 전남대학교 생물학과

### Anthraquinone Production in Transformed Roots of *Rheum undulatum* L.

Sung Jin Hwang<sup>†</sup>, Byoung Sik Pyo, Ho Zoon Chae\*, and Baik Hwang\*

Dept. of Food and Biotechnology, Dongshin University, Na-ju

\* Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

**ABSTRACT** : The production of anthraquinone has been detected in transformed roots of *Rheum undulatum* L. The effects of medium, initial pH, concentration of sucrose, light irradiation and elicitors on anthraquinone production in transformed roots of *Rheum undulatum* L. were investigated. The maximum production of anthraquinone was achieved in WPM medium (pH 5.7) supplemented with 6% sucrose, 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>, and 50 mg/l chitosan at 16h light (16  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) condition. Under the optimum conditions, the production of anthraquinone reached to 0.18 mg/g(F.W.) after 8 weeks. The content was estimated about 1.3 times of the level of native roots.

**Key words** : *Rheum undulatum* L. transformed roots, anthraquinone, plant growth regulators, light, chitosan

## 서 언

대황(*Rheum undulatum* L.)의 추출물은 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등에 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료에 사용된다(Kimura et al., 1996). 대황의 전초로부터 생합성되는 주요 약리물질로는 glycosides rhein-8-monoglucoside, physcion monoglucoside, aloemodin monoglucoside, emodine monoglucoside, chrysophenol monoglucoside, sennoside, tannin, gallic acid, catechin, chromone, fatty acid 등이 있다(Zhu, 1998). 대황은 물론 카스카사그라다(*Rhamnus purshiana*), 호장(*Reynoutoria japonica*), 하수오(*Polygonum multiflorum*), 결명자(*Cassia tora*) 등과 같은 고등식물에 함유되어 있는 anthraquinone은

quinone계 알칼로이드 성분으로 항바이러스는 물론 항종양 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 대부분의 고등 식물 유래 약리물질은 서식지의 환경 조건과 발달 단계, 그리고 품종에 따라 생합성량이 많은 차이를 나타내고 미량 물질의 경우 전혀 만들어지지 않을 수도 있기 때문에 균질화된 약리물질의 확보에 어려움이 있다. 따라서, 이를 해결할 수 있는 방법으로 조직배양 및 유전자 조작 기술을 이용한 유용 이차 대사물질의 생산성을 높여려는 시도가 행하여지고 있다. 그 결과 일부 제한적이기는 하지만 탈분화된 체세포로부터 형질전환된 뿌리에 이르기까지 매우 다양한 소재들로부터 물질을 대량으로 생산할 수 있는 산업화의 단계에 까지 이루어진 경우도 있다(Flores, 1987; Hasimoto et al., 1986).

본 연구에서는 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes*의 감염을 통하여 대황의 게놈내로 전이된 T-

<sup>†</sup> Corresponding author (Phone) : Sung Jin Hwang, 061-330-3225, E-Mail : jinscT@lycos.co.kr  
Received March 18 2002 / Accepted May 31 2002

DNA에 의해 호르몬 생합성능이 변환된 형질전환된 근 으로부터 anthraquinone의 생산 효율을 높일 수 있는 최적 배양조건을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 형질전환 근의 배양

대황(*Rheum undulatum* L.)은 전남 해남의 농가에서 분양받아 전남대 식물분류학교실에서 동정 후 본 연구실에서 형질전환을 유도 하였다 (Hwang et. al, 2000). 형질전환된 뿌리는 0.2%(w/v) phytigel이 첨가된 1/2MS 고형배지에서 초기 증식 후 시료로 사용 하였다. 고형배지에서 약 4주 배양된 형질전환된 뿌리를 근단 부위로부터 1.5 cm 가량 절취한 후 약 0.05 g(F.W.)을 40 ml 액체배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종 후 암조건하에서 100 rpm으로 배양 (25±1℃) 하였다. 배양체는 3주 간격으로 새로운 배지를 1/3 가량 교환하는 방법으로 계대배양 하였다.

### 2. Anthraquinone의 생산성에 미치는 배지, 탄소원, 초기 pH의 영향

Anthraquinone의 생산성을 최적화 할 수 있는 배양조건을 확보하기 위하여 MS배지를 포함한 7종의 기본배지를 형질전환 근의 배양에 사용 하였으며, 배지내 탄소원으로는 sucrose를 2-10%(w/v) 까지 농도별로 각각 기본배지에 첨가 하였다. 또한 배지의 초기 pH는 감압멸균 전에 4.7에서 6.7까지 1N NaOH로 조정하여 anthraquinone의 생산성에 미치는 pH 영향을 조사 하였다.

### 3. 식물성장조절물질(PGRs) 및 elicitors의 처리

Anthraquinone의 생산성의 증진을 유도하기 위하여 효모의 추출액과 chitosan을 시료 접종 1주일 후 농도별로 배지에 처리하였으며, 식물성 장조절물질로는 GA<sub>3</sub>와 ABA 그리고 IBA를 0.2 μm membrane filter를 사용하여 여과멸균 후 각각 0.5 mg/l에서 5 mg/l까지 농도별로 배지에 첨가 하였다.

### 4. 물질 생산성에 있어서 광의 영향

광 조건에 따른 대황의 형질전환된 뿌리로부터 anthraquinone 생산성을 확인하기 위하여 시료를 25±1℃에서 암상태와 8, 12, 16, 20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 광도 하에서 배양 하였으며, 광주기는 0/24, 8/16, 12/12, 16/8, 그리고 24/0(light/dark)의 주기로 8주간 배양 하였다.

### 5. Anthraquinone의 분석

재배 식물의 뿌리와 기내(*in vitro*) 배양된 형질전환된

뿌리의 조직으로 부터 지표 물질인 anthraquinone의 추출 및 분석은 List와 Horhammer(1971)의 방법에 따라 냉동 건조 후 분말시료 30 mg을 초산과 에테르로 추출하고, 1N NaOH로 발색시킨 다음 530 nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Anthraquinone의 생산성에 있어서 최적 배지조건

*Agrobacterium rhizogenes*의 감염에 의해 형성되는 탈분화된 배양세포와 달리 화학합성능이 대부분 유지되며, 배양시 일종의 고정화세포(immobilized cells)와 같은 특성을 갖게 된다(Flores, 1987; Shanks and Morgan, 1987; Toivonen, 1993). Hamill 등(1986)과 Ogasawara 등(1993)에 따르면 노지 재배근과 비교할 때 형질전환 근이 지표물질의 함량에 있어서 동일한 수준이거나 오히려 높게 나타났으며, 배양조직 간의 물질 생산성 비교에 있어서도 형질전환 근이 탈분화된 배양세포에 비해 4배 이상 높게 나타나는 것으로 보고된 바 있다 (Kittipongpatana et. al, 1998). 기내(*in vitro*)배양에 있어서 배지의 성분은 배양체의 성장은 물론 대사물질의 생합성에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치게 된다 (Toivonen et al., 1991; Weathers et al., 1997). 대황의 경우 WPM(Lloyd and McCown, 1987) 배지에서 최적 성장율과 tannin의 생산성을 나타낸 바 있으며 (Hwang et al, 2001), anthraquinone의 경우에도 비슷한 양상을 보여 주었다(Fig. 1). 뿌리의 배양에 의한 이차대사물질의 생산성은 RCM배지를 포함한 무기성분을

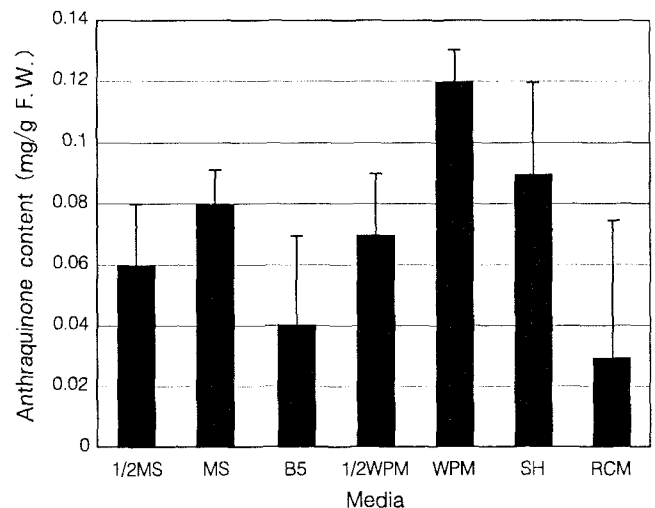


Fig. 1. Effects of media on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

강조한 배지에서 전반적으로 높게 나타나는 것으로 보고 되어지고 있으나(Bakkali et al., 1997; Toivonen, 1993; Toivonen et al., 1991). 대황의 경우에는 Merkli 등(1997)의 경우처럼 WPM 배지에서 지표물질의 생산성이 높게 나타났다. 대부분의 경우 성장과 물질의 생산능에 있어서 각각 서로 다른 배지의 사용이 요구되는 경우 배양과정에서 초기에는 조직의 성장에 필요한 배지에서 배양한 후 물질합성을 극대화 할 수 있는 배지로 옮겨 배양을 하는 2단계 배양 방법을 고려해 볼 수 있으나 대황의 경우 동일 배지조건에서 성장(Hwang et al, 2001)과 물질의 생산성을 최적화가 가능함을 확인하였다.

## 2. Anthraquinone의 생산성에 있어서 탄소원 및 초기 pH의 영향

배지내 탄소원은 타가영양체인 배양세포에 있어서 성장 뿐만아니라 이차 대사물질의 생합성에도 영향을 미치게 된다(Weathers et al., 1997). 대황의 경우 성장에 필요한 배지내 탄소원의 초기 농도는 3-4%가 적정한 것으로 나타났다(Hwang et. al, 2000). Anthraquinone의 생산성의 경우 배지내 sucrose의 농도가 6%에서 가장 높게 나타났다(Fig. 2). *Rumex crispus*의 형질전환 근의 배양에 의한 anthraquinone 생산성 연구에서는 5%에서 최대 성장을 보여 주었으며, 생산성의 효율은 7% 수준이 적정한 것으로 보고된 바 있다(Chang et. al, 1999). 한편, *Trigonella foenumgraecum*의 경우 오히려 배지내 sucrose의 농도를 1%로 낮추어 줌으로서 diosgenin의 최

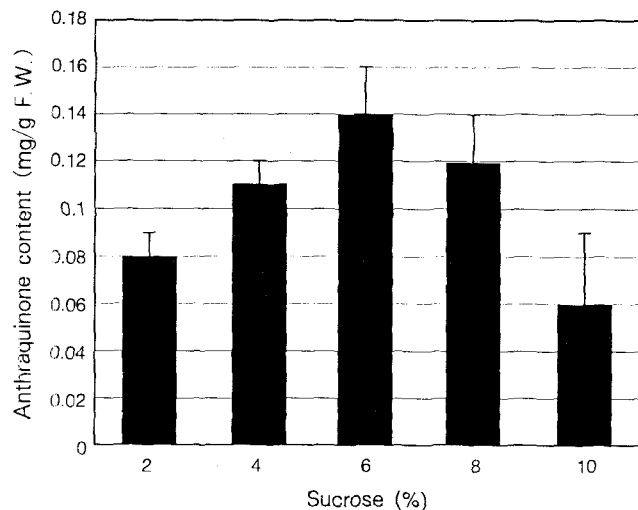


Fig. 2. Effects of sucrose concentration on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

대 생산을 이끌어낸 바 있다 (Merkli et. al, 1997). 대황의 경우 8% 이상의 농도에서는 근의 성장이 많은 영향을 받아 생중량의 감소를 가져왔으며, 이로 인해 anthraquinone의 생산성에 있어서의 감소를 가져왔다. 배지의 초기 pH에 의한 anthraquinone의 생산은 pH 5.5-5.8 범위 내에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다 (Fig. 3). 이와같은 연구 결과는 Merkli등(1997)에 의한 diosgenin의 생합성에 있어서의 제한된 범위의 초기 pH 조건이 필요하다는 연구 결과와는 약간의 차이를 보여 주었다.

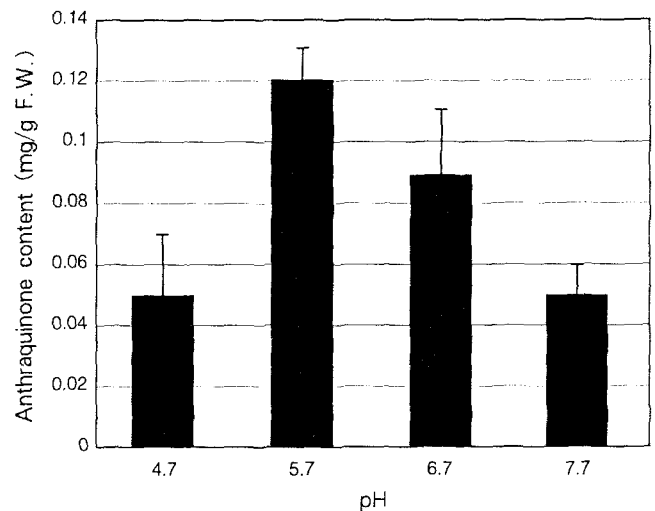


Fig. 3. Effects of initial pH on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

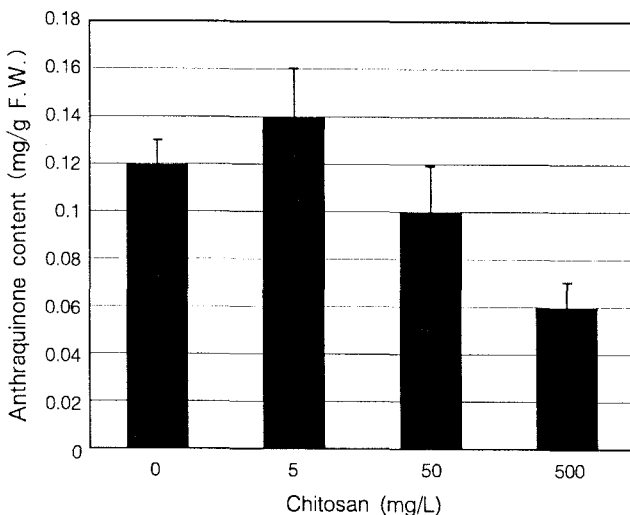
## 3. Anthraquinone의 생산에 있어서 PGRs 및 elicitors의 효과

식물호르몬 생합성을 조절하는 효소 유전자가 전이된 형질전환 근의 경우 외부에서 식물성장조절물질의 첨가에 의해 이차대사물질의 생합성에 영향을 받는 경우가 있다(Ozeki and Komamine, 1986). IAA나 NAA 등과 같은 옥신류가 특정 대사물질의 생합성에도 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Arro et al., 1995; Rhodes et al., 1994). 동일 세포주를 가지고 수행한 tannin의 생산성에 관한 연구에서 배지내 처리 한 식물성장조절물질이 생합성에도 영향을 주는것으로 나타난 바 있다(Hwang et. al, 2000). Anthraquinone의 경우 각 처리구에서 대조구에 비해 뚜렷한 영향을 확인할 수는 없었으나 0.5 mg/L GA<sub>3</sub> 처리구에서 약 1.3배의 증가를 보여주었다(Table 1). 이와같은 결과는 *Datura stramonium*의 배양조직에서 GA<sub>3</sub>의 처리에 의한 알칼로이드의 생산성 증대 효과와 유사하다(Robins e al.,

1991).  $\beta$ -1,4-D-glucosamine 중합체로 키틴의 가수분해로부터 얻어지는 chitosan은 이차대사물질의 유도체로 작용하는 것으로 알려지고 있다(Hashimoto et al., 1986). 배지에 chitosan을 농도별로 500 mg/L 까지 첨가하였을 때 50 mg/L의 처리구에서 대조구의 약 1.2배의 증대 효과를 보였다(Fig. 4). 그러나, 효모 추출액의 경우에는 anthraquinone의 생산성에 있어서 유의할 만한 효과를 보여주지 못하였다(data not shown).

**Table 1.** Effect of PGRs on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

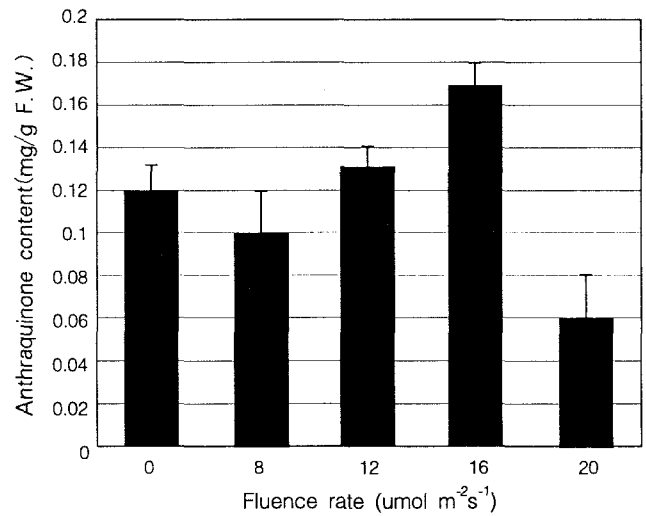
PGRs (mg/L)	Anthraquinone content (mg/g F.W.)
GA <sub>3</sub> 0.5	0.16±0.01
1	0.12±0.01
3	0.06±0.02
5	0.05±0.01
IBA 0.5	0.10±0.01
1	0.12±0.01
3	0.08±0.02
5	0.09±0.02
ABA 0.5	0.09±0.01
1	0.08±0.01
3	0.08±0.02
5	0.07±0.02



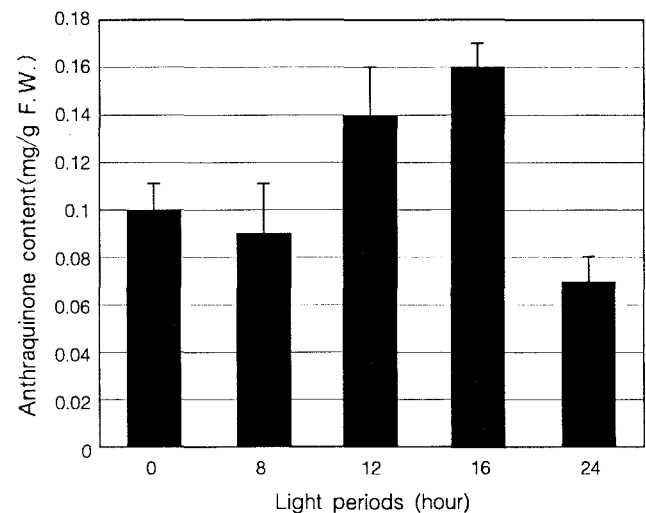
**Fig. 4.** Effects of chitosan on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

#### 4. Anthraquinone의 생산에 있어서 광의 영향

대황의 형질전환 근에 있어서 anthraquinone의 생산성은 광량에 따라 변화를 나타내었으나, 광주기에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 5, 6). Anthraquinone의 생산성에 있어서 최적 광조건은 16  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 8주간 16/8의 광주기로 배양시 암조건에 비해서는 1.4배의 증가를 유도할 수 있었다. 이와같은 결과는 *Panax ginseng*(Yang et al., 1995b), *Datura stramonium*(Yang et al., 1996), 그리고 *Phytolacca esculenta*(Yang et al., 1997)의 형질전환 근에 대한 배



**Fig. 5.** Effects of light on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.



**Fig. 6.** Effects of light periods on anthraquinone content in transformed roots of *Rheum undulatum* L.

양에서 광조건에 의해 이차대사물질의 함량이 영향을 받았다는 연구 결과와 유사하다.

## 적 요

대황(*Rheum undulatum* L.)의 형질전환된 뿌리의 기내(*in vitro*)배양으로부터 quinone계 알칼로이드 물질인 anthraquinone의 생산성을 확인하고자 하였다. 형질전환된 뿌리로부터 anthraquinone의 생산에 있어서 배지, 초기 pH, 탄소원의 농도, 광 그리고 elicitors의 영향을 조사 하였다. 형질전환된 뿌리는 6% sucrose와 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>, 그리고 50 mg/l chitosan이 첨가된 WPM 배지에 치상한 후 16/8의 광조건(16 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)하에서 배양시 0.18 mg/g(생중량)의 anthraquinone의 생산성을 보여주었다. 이와같은 함량은 재배근의 약 1.3배에 해당된다.

## 사 사

본 연구과제는 2000년도 한국 학술진흥재단 기초과학 연구지원사업비 (2000-015-DP0360)의 일부 지원에 의해 수행 되었음.

## LITERATURE CITED

- Arro RRJ, Develi A, Meijers H, van der Westerlo E, Cores AK, Wullems GJ (1995) Effects of endogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures. *Physiol. Plant.* 93 : 233-240.
- Bakkali AT, Jaziri M, Ishimaru K, Tanaka N, Shimomura K (1997) Tannin production in hairy root cultures of *Lawsonia inermis*. *J. Plant Physiology* 151 : 505-508.
- Chang SW, Kim IH, Han TJ (1999) Anthraquinone productivity by the cultures of adventitious roots and hairy roots from Curled Dock(*Rumex crispus*). *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 26 : 7-14
- Flores HE (1987) Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. *In Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry*. American Chemical Society Symposium Series, Vol. 334. H. Lebaron, R.O. Mumma, R.C. Honeycutt and J.H. Duesing ed. American Chemical Society, Washington DC, pp. 66-68.
- Hamil JD, Parr R, Robins J, Rhodes MJ (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana glauca* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 5 : 111-114
- Hashimoto T, Yukimune Y, Yamada Y (1986) Tropane alkaloid production in *Hyosyamus* root cultures. *J. Plant Physiol.* 124 : 61-75.
- Hwang SJ, Na MS, Pyo BS, Lee JB, Hwang B (2000) Production of tannin from hairy root cultures of *Rheum undulatum* L. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* 8 : 250-258
- Kimura T, Paul PHB, Chung KS, Han BH (1996) *In International collection of traditional and folk medicine*. World Sci. pp. 18-20.
- Kittipongpatana N, Hock RS, Porter JR (1998) Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* 52 : 133-143.
- List PH, Horhammer L (1979) *Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis*. vol. 6, Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, NY pp.95-113
- Merkli A, Christen P, Kapetanidis JI (1997) Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Rep.* 16 : 632-636.
- Ogasawara T, Chiba K, Tada M (1993) Production in high-yield napthaquinone by a hairy root cultures of *Sesamum indicum*. *Phytochemistry* 33 : 1095-1098
- Ozeki Y, Komamine A (1986) Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot cell suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 27 : 1361-1368.
- Rhodes MJ, Parr AJ, Giulietti A, Arid EL (1994) Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* 38 : 143-151.
- Robins RJ, Bent ES, Rhodes MJC (1991) Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis. *Planta* 185 : 385-390.
- Shanks JV, Morgan J (1987) Plant hairy root culture. *Current Opinion in Biotechnology* 10 : 151-155.
- Toivonen L (1993) Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* 9 : 12-20.
- Toivonen L, Ojala M, Kaupinnen V (1991) Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. & Bioeng.* 37 : 673-680.
- Weathers PJ, Hemmavanh DD, Walcerz DB, Cheetham RD, Smith TC (1997) Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 33 : 306-312.
- Yang DC, Kim YH, Kwon JN, Choi CH, Yang DC (1995b) Effects of light on activities of antioxidative enzymes in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 22 : 71-76
- Yang DC, Choi YH, Kim YH, Yun KY, Yang DC (1996) Growth and ginsenosides production of hairy root via light energy. *Kor. J. Ginseng Sci.* 20 : 318-324
- Yang DC, Kang HM, Lee KS, Kim YH, Kim DC (1997) Effects of pH, sucrose and vitamins on the growth and tropane alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. Tatula. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 24 : 143-148
- Zhu YP (1998) *In Chinese materia medica*. Harwood Acad. Press. pp. 231-238.