

## 참돌꽃의 캘러스로부터 salidroside 생산에 미치는 배지성분의 영향

이재승\* · 최혜진\*\* · 황 백\*\* · 박형재\*\*\* · 안준철\*\*\* · 황성진\*\*†

\*순천대학교 교육대학원 생물교육전공, \*\*전남대학교 생물학과,  
\*\*\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*\*\*서남대학교 생명과학과

### Effect of Macro-nutrients for the Salidroside Production from Callus Cultures of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor

Jae Seung Lee\*, Hye Jin Choi\*\*, Baik Hwang\*\*, Hyoung Jae Park\*\*\*, Jun Cheul Ahn\*\*\*\*, and Sung Jin Hwang\*\*†

\*Major of Biological Education, Graduate School of Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742. Korea.

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

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

\*\*\*\*Department of Life Science, Seonam University, Namwon 590-711, Korea.

**ABSTRACT :** *Rhodiola sachalinensis* A. Bor is a Chinese herb containing the natural compound salidroside, which has been known to possess medical properties such as enhancing bodies' ability to survive in adverse environments and extending human life. To improve a metabolite production from *Rhodiola sachalinensis* callus cultures, the concentrations of macro nutrients were investigated. To investigate the salidroside production in *Rhodiola sachalinensis* callus cultures, we analyzed salidroside content in each callus which was cultured in 30 ml of 2 × B<sub>5</sub> liquid medium for 4 weeks. The optimal concentrations of macro nutrients for salidroside production (67.96 ± 3.41 mg/ℓ) were found to be 99 mM KNO<sub>3</sub>, 1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O and 1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. From these results, we determined the more upgraded culture condition for industrial production of salidroside.

**Key Words :** salidroside, callus culture, macro nutrient, *Rhodiola sachalinensis* A. Bor

## 서 언

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 고산지대에서 자라는 다년생 초본 식물로서 들나무과의 들꽃속에 속한다. 홍경천이라는 별칭을 가지며 뿌리와 줄기를 약용한다 (Chung, 1974). 대부분은 해발 1,700-2,300 m 사이의 주야간 온도차가 크고, 저온, 건조, 광풍, 강자외선과 같은 고산지대의 혹독한 환경에서 석회암이나 화강암 등의 암석 사이에서 서식한다 (Jiang *et al.*, 1994). 홍경천은 중국, 러시아 등에서는 오래전부터 진정제, 해열제, 수렴제 등의 민간약용으로 사용되고 있으며, 전초를 약으로 쓸 수 있지만 대개 굵은 뿌리를 약으로 쓴다. 현대에 와서도 뿌리는 간장해독, 항피로, 신경증 및 고혈압 등에 약성이 있는 것으로 조사 되었다 (Lee *et al.*, 2002). 특히, 주요 약리 성분으로 밝혀진 salidroside는 무산소증, 극초단파방사성 및 피로환자의 치료효과와 (Ming, 1986; Furmanova *et al.*, 1998) 중추 신경의 억제작용, 강심작용, 아

드레날린 분비 촉진으로 인한 혈당조절 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2000; Zong *et al.*, 1991). 주요 약리 성분으로는 salidroside와 p-tyrosol, 배당체로 조사되었으며 (Linch *et al.*, 2000), 이외에 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라본류 화합물과 미량의 휘발성 물질, 아스파라긴산, 트레오닌, 글루타민산, 글리신 등 20여종의 아미노산이 함유되었다 (Park *et al.*, 1999). 또한 monoterpene glycoside, cyanoglycoside, phenethyl glycoside, aliphatic glycoside, phenylpropanoid, proanthocyanidin 등을 함유한다. 한편 *R. sachalinensis*로부터 kaempferol, kaempferol-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, herbacetin-7-O-L-rhamnopyranoside 및 flavolignan rhodiolinin 등의 flavonoid를 포함한 페놀성 화합물의 항산화 활성에 대하여 보고한 바 있다 (Lee *et al.*, 2000; Zong *et al.*, 1991). 특히 재배한 뿌리에서의 함량은 자연산에 비교하여 훨씬 낮은 함량을 보이며 근부병 등의 문제를 나타내었다 (Meng *et al.*, 1994). 이의 대안으로 세포배양을 통한 salidroside의 생산과 유기합성

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

을 통한 시도가 있었으며, 유기합성과 세포배양을 통한 생산 가능성이 확인된 바 있다 (Xu *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004a). 최근에는 salidroside 외 몇 가지 유도체 역시 생리활성이 있는 것으로 확인되고 있어 (Linh *et al.*, 2000), 이들 화합물의 동시 생산 및 조추출물의 통합 또는 상승효과 등을 감안한 생산방식은 여전히 식물의 생합성 계를 이용하는 것이 유리한 측면이 있다. 또한 장기적으로 홍경천의 육종은 물론 이들 화합물의 고효율 생산과 생합성 과정을 이해하기 위해서는 생합성 과정에 영향을 주는 많은 환경요인을 탐색하고 그 과정에서 도출된 함량의 양적/질적 변화에 대한 기초자료를 얻기 위해서도 식물세포배양기술이 유용할 것이다. 이러한 목적에서 본 연구실에서는 참돌꽃 세포배양을 확립하고 생리활성물질인 salidroside를 분리·동정한 바 있다 (Kim *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2004b). 홍경천은 제한된 지역에서만 자생하는 특성과 더불어 유효 생리활성물질을 함유하고 있어, 생리활성의 지속적 탐색의 주요 생리활성물질의 안정적이고 효율 높은 생산을 이루어야 할 필요가 있다. 본 연구를 통해서 참돌꽃의 주요 생리활성 물질인 salidroside를 생물 공학적인 방법으로 생산하고자 참돌꽃의 캘러스로부터 salidroside의 생합성을 최대로 유도할 수 있는 적정 배지성분을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

본 연구에 사용된 참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)의 캘러스는 Kim 등 (2004 a)이 유도하여 0.5 mg/l NAA와 1 mg/l BA가 첨가된 2×B<sub>5</sub> 액체배지 (3% sucrose, pH 5.7)에 접종하여 25°C의 암상태에서 100 rpm으로 회전식 배양기 위에서 유지되어 지고 있는 캘러스를 사용하였다.

### 2. Salidroside 생산에 있어서 macro nutrient의 영향

캘러스는 새로운 배지에 접종하여 2주간 전 배양 (pre-culture)한 다음 20 μm pore size의 sieve를 사용하여 캘러스만 수확하고 무균증류수에 3회 세척 후 캘러스만을 0.5 g (F.W)씩 정량하여 접종하였다. 처리 조건은 30 ml liquid medium/100 ml erlenmeyer flask의 기본조건으로 sucrose 3%, pH 5.7로 조정된 2XB<sub>5</sub> 기본배지에서 1 mg/l NAA와 5 mg/l BA 호르몬을 첨가하여 사용하였다. 이 2XB<sub>5</sub> 배지에서 대량원소를 KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 그리고 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 각각의 농도 별로 조정하여 사용하였다. 4주 배양한 후 배양된 캘러스는 여과지 (Whatman No. 2)로 수확하여 흡습지로 충분히 습기를 제거한 다음 생중량을 측정하고, 액체질소로 급속동결 후 48시간 동결건조기 (Ilsin Co., Korea)에서 동결 건조하여 건중량을 측정하였다. 모든 처리는 5회 반복하여 수행 하였다.

### 3. Salidroside의 분석

Salidroside의 함량은 배양된 참돌꽃 캘러스를 동결건조시킨 후 시료 0.2 g을 10 ml MeOH 로 3회 반복 추출한 다음 여과지 (Whatman No. 2)로 여과하여 여과액을 합하고 Rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축시켰다. 농축된 시료는 3 ml MeOH로 재용해시켜 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC (Waters Co., U.S.A) 분석에 있어서 column은 μ-Bondapak C<sub>18</sub> (Water, U.S.A), 이동상으로는 20% MeOH (v/v)을 사용하였다. 시료는 10 μl를 주입하였으며, 용매의 전개 속도는 1 ml/min로 하고 흡광도는 214 nm UV 하에서 측정하였다.

## 결 과

식물이 이용하는 질소원인 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 조합과 농도는 배양 세포의 성장과 물질의 생합성에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 적정 질소원의 종류 및 농도의 구명은 식물의 성장뿐 아니라 유용한 2차 대사산물의 생합성량 증가를 위해 필수적이다. 참돌꽃 캘러스를 질소원의 농도를 달리한 2XB<sub>5</sub> 배지에서 배양한 결과 98.92 mM의 KNO<sub>3</sub> 농도 배지에서는 참돌꽃 캘러스 생장이 0.35±0.015 g (D.W)로 가장 좋았으며, salidroside의 생산성 또한 동일하게 98.92 mM 농도에서 64.53±11.242 mg/l로 가장 좋았다 (Fig. 1). (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도는 0.68 mM에서 생장이 0.37±0.012 g (D.W)으로 가장 좋았으며, salidroside의 생산성은 1.01 mM에서 29.48±2.284 mg/l로 가장 좋았다 (Fig. 2).

인산은 생체 내의 거대 분자나 인지질 등의 생합성에 대한 전구 물질일 뿐만 아니라 수많은 대사 경로에서 물질 대사의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있으며 (Brodelius and Vogel, 1985), 조직 배양에서 적정 농도의 인산은 필수적이다. 2B<sub>5</sub> 배지에 인산의 농도를 달리한 결과 3.27 mM의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

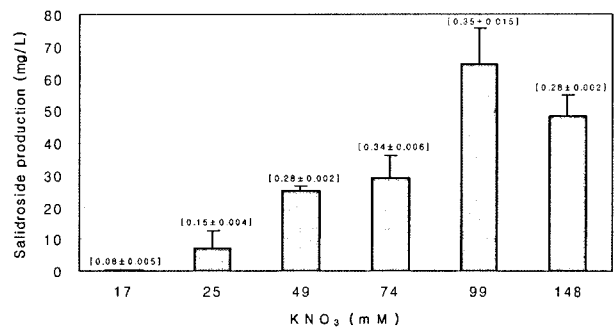
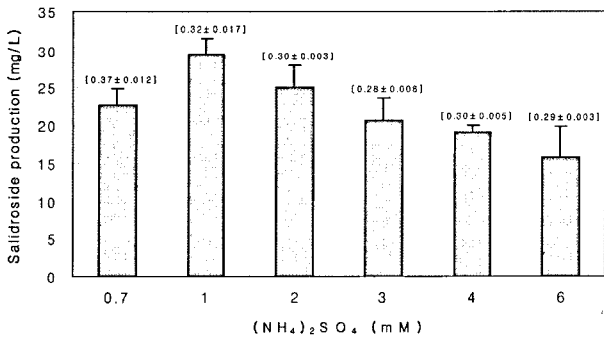
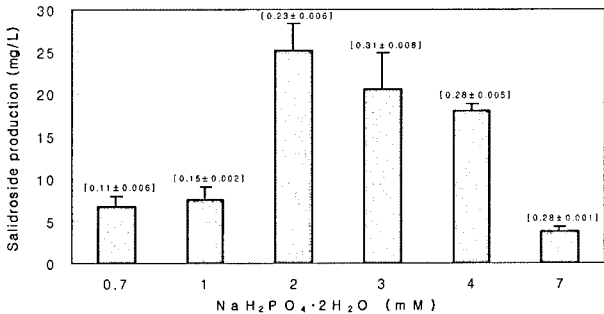


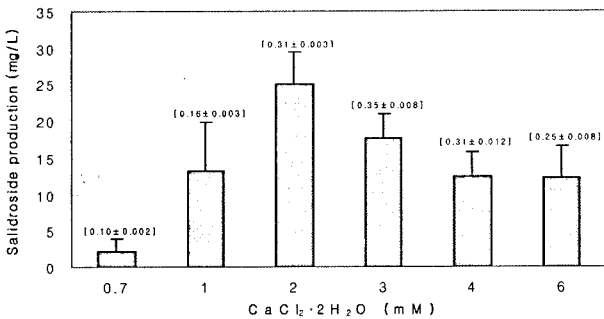
Fig. 1. Effect of KNO<sub>3</sub> concentrations on the salidroside production from *Rhodiola sachalinensis* callus culture in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.



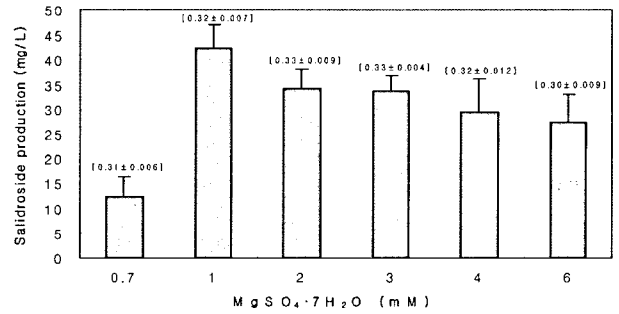
**Fig. 2.** Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrations on the salidroside production from *Rhodiola sachalinensis* callus culture in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.



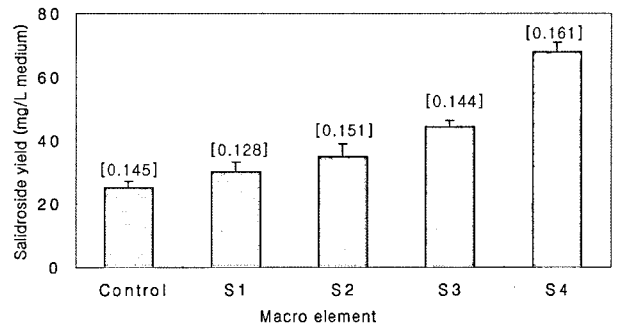
**Fig. 3.** Effect of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O concentrations on the salidroside production from *Rhodiola sachalinensis* callus culture in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.



**Fig. 4.** Effect of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O concentrations on the salidroside production from *Rhodiola sachalinensis* callus culture in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.



**Fig. 5.** Effect of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O concentrations on the salidroside production from *Rhodiola sachalinensis* callus culture in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.



**Fig. 6.** Effect of macro-element combinations on the yield of *Rhodiola sachalinensis* callus in 2XB<sub>5</sub> liquid medium containing 1 mg/l NAA and 5 mg/l BA after 3 weeks of culture. A, 25 mM KNO<sub>3</sub>; B, 1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; C, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; D, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; E, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Control, 2A + 2B + 2C + 2D + 2E; S1, 2A + B + 2C + 2D + E; S2, 4A + B + 2C + 2D + E; S3, 4A + 2B + 2C + 2D + E; S4, 4A + B + 2C + 2D + 2E. Initial inoculum size: 0.5 g (F.W). [ ]: Biomass represented with dry weight bass.

게 나타났다 (Fig. 3). CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 농도는 3.06 mM 처리구에서 생장이 0.35 ± 0.008 g (D.W)으로 높았고, salidroside의 생산성은 2.04 mM에서 25.07 ± 3.37 mg/l로 높았다 (Fig. 4). MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도는 3.03 mM 농도에서 생장이 0.33 ± 0.004 g으로 높았고, salidroside의 생산성은 1.01 mM에서 42.46 ± 4.526 mg/l에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 5).

이와 같은 최적 조건의 무기이온 농도를 선별하여 A, 99 mM KNO<sub>3</sub>; B, 1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; C, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; D, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; E, 2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 포함된 S4B<sub>5</sub>에서 캘러스를 배양한 결과 salidroside의 생산량이 67.958 ± 3.407 mg/l 까지 높일 수 있었다 (Fig. 6).

## 고 찰

처리구에서 생체량은 0.31 ± 0.006 g (D.W)으로 가장 높았고, salidroside의 생산성은 2.18 mM에서 25.07 ± 3.37 mg/l로 높

Kim등 (2004 a,b)은 참돌꽃의 현탁 세포 배양을 통하여

salidroside 함량을 0.17~0.41%까지 얻은 바 있다. 또한, Chio 등 (2005)은 생산성 최적화를 위한 식물생장조절 호르몬의 선택과 조합에 대한 연구를 수행한 바 있다. Wu 등 (2003)은 참돌꽃 세포주의 배양시 배지의 pH와 전구물질 처리, 그리고 교반 속도 등에 의한 salidroside 함량변화를 조사한 바 있다. 특히, 전구물질인 L-tyrosol의 첨가로 salidroside 수율을  $553.13 \pm 21.87 \text{ mg/l}$  까지 올렸다. 하지만 세포배양을 통한 2차 대사물질의 생산에 경우 전구물질이나 elicitor 등의 처리에 앞서 배지성분의 최적화가 필요하다 (Zhang *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1998). 배지성분중 질소원의 비율에 따라 2차 대사산물 생합성 등이 영향을 받는 경우가 많다 (Zhang *et al.*, 1996). 참돌꽃의 경우 *in vivo*에서 Yan 등 (2004)은 토양 질소원의 농도와 salidroside 함량은 비례관계에 있으며, 토양의 총 질소 함량이 0.6% 이상일 때 뿌리 건중량 당 0.8% 함량을 보인다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 질소원의 농도변화에 따른 참돌꽃 세포배양의 성장과 함량에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, 2XB<sub>5</sub> 배지에서 기본 농도인 99 mM에서 최대 성장과 생산을 나타내었다. 이와 같은 결과는 대량원소 양을 2배로 한 2XB<sub>5</sub> 배지가 B<sub>5</sub> 배지보다 효과적이었다는 Kim 등 (2004 a,b)의 결과와 일치한다. 반면에 암모니아태 질소인 변화는 세포생장 및 물질 함량에 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 인산염인 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 2XB<sub>5</sub> 배지의 2 mM 보다 높은 농도에서 최적의 성장을 보이긴 하였지만 salidroside 함량의 감소로 총 생산성 저하로 나타나 고농도에서의 성장 촉진효과와 달리 salidroside 생합성에는 부정적인 영향을 나타내었다. 한편, CaCl<sub>2</sub>와 MgSO<sub>4</sub>는 2B<sub>5</sub> 배지의 기본 농도 범위내에서 효과를 나타내었다. 이와 같은 대량원소의 최적 농도 조합이 이루어진 S4B<sub>5</sub> 배지에서의 생산성은 대조구에 비해 약 2.5배 증가를 가져왔다.

## 적 요

대량 원소의 종류 및 적정 농도의 규명은 식물의 성장뿐 아니라 유용한 2차 대사산물의 생합성량 증가를 위해 필수적이다. 참돌꽃 배양조직에서 salidroside의 생산성을 높이기 위해 기본 배지의 대량 원소의 농도를 달리하였을 때 KNO<sub>3</sub>는 98.92 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 1.01 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O는 2.18 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O는 2.04 mM, 그리고 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O는 1.01 mM 일 때, salidroside의 생산량이 가장 높았다. 또한 이와 같은 무기이온의 농도를 조합한 S4B<sub>5</sub>배지에서 기본배지인 2XB<sub>5</sub> 배지에 비해 2.5배 salidroside 함량 증가를 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구과제 연구비 지원에 의

하여 이루어졌으며 이에 감사를 표한다.

## LITERATURE CITED

- Anh JC, Yang SJ, Sung CK, Pyo BS, Choi JW, Hwang B (1998) Improvement of tropane alkaloid production by optimization of sucrose concentration and addition of hydroxyapatite in hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 25:21-25.
- Chung TH (1974) Korean Flora (Herb part), p. 283.
- Furmanova M, Skopinska-Rozewska E, Rogala E, Hartwich M (1998) *Rhodiola rosea* in vitro culture-phytochemical analysis and antioxidant action. Acta. Soc. Bot. Poloniae 67:69-73.
- Han T, Hong JP, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (2000) Effect of Polyamines on Formation of Adventitious Roots, Trichomes and Calli by NAA in Leaf Segment Cultures of *Arabidopsis thaliana*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27:117-123.
- Jiang M, Zhong W, Han H (1994) Studies on producing effective medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin. J. Shen. Univ. 25:355-359.
- XU JF, Kim OT (2004) Production of triterpene saponins and cloning of oxidosqualene cyclases from *Centella asiatica* (L.) Urban. PhD Thesis, Chonnam National University, Korea.
- Kim SJ, Hwang B, Hwang SJ, Ahn JC (2004 a) Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Kor. J. Plant Biotechnol. 31:89-94.
- Kim SJ, Kim KS, Hwang SJ, Chon Su, Kim YH, Ahn JC, Hwang B (2004 b) Identification of salidroside from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. and its production through cell suspension culture. Kor. J. Med. Crop Sci. 12:203-208.
- Lee MW, Lee YH, Park HM, Tosh SH, Lee EJ, Jang HD, Kim YH (2000) Antioxidant phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch. Pharm. Res. 23:455-458.
- Lee YA, Cho SM, Lee MW (2002) Flavonoids from the roots of *Rhodiola sachalinensis*. Kor. J. Pharm. 33:116-169.
- Linch PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS (2000) Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. Arch. Pharm. Res. 23:349-352.
- Meng QY, Jian M, Zhong W (1994) Controlling the root-rot disease of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. with peptide. Chin. J. Shen. Univ. 25:264-267.
- Ming HQ (1986) The synthesis of salidroside and its pharmacological properties. Chin. J. Pharm. Bull. 21:373-375.
- Wu S, Zu Y, Wu M (2003) High-yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. J. Biotechnol. 106:33-43.
- Xu JF, Liu CB, Han AM, Feng PS, Feng, Su ZG (1998) Strategies for the improvement of salideroside production in cell suspension cultures of *Rhodiola sachalinensis*. Plant Cell Rep.. 17:288-293.
- Yan XF, Wu SX, Wang Y, Shang XH, Dai SJ (2004) Soil nutrient factors related to salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* distributed in Chang Bai Mountain. Env Exp. Bot. 53:267-276.
- Yang PQ, Han AM, Su ZG (1999) Enhanced salidroside

- production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis* : manipulation of plant growth regulators and sucrose. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* 55:53-58.
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT** (1996) Enhancement of ginseng saponin production in suspension culture of *Panax notojinseng*. manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol* 51:49-56.
- Zhong JJ, Bai Y, Wang SJ** (1996) Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *J Biotechnol* 45:227-234.
- Zong Y, Lowell K, Ping JA, Che CT, Pezzuto JM, Fong HH** (1991) Phenolic constituents of *Rhodila coccinea* a tibetan folk medicine. *Plana Med* 57:589.
- 박석근, 한유경, 김기선, 김정일** (1999) 신비의 약초 홍경천. 도서출판진술. p. 13-17.