

## 한국산 야생취 캘러스에서의 이소플라본 및 생물전환에 의한 디하이드로다이드제인 분석

이은지 · 권정은 · 김수정 · 차민석 · 김인혜 · 강세찬 · 박태호

### Isoflavones and biotransformed dihydrodaidzein production with *in vitro* cultured callus of Korean wild arrowroot *Pueraria lobata*

Eunji Lee · Jung Eun Kwon · Soojung Kim · Min-Seok Cha · Inhye Kim · Se Chan Kang · Tae-Ho Park

Received: 16 December 2013 / Accepted: 23 December 2013  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** *Pueraria lobata*, a medicinally important leguminous plant produces various isoflavones including puerarin, daidzin and daidzein which are metabolized to equol via dihydrodaidzein and tetrahydrodaidzein by the bacterial fermentation of natural isoflavone sources in human intestines. In this study, we described callus proliferation and isoflavone production in callus of Korean wild arrowroot and dihydrodaidzein biosynthesis in callus extract fermented with *Pediococcus pentosaceus*. Proliferation was the best at callus cultured in the medium containing 1.0 mg/L TDZ and 1.0 mg/L NAA at light condition for 12 days. Puerarin was significantly more produced at callus cultured in the medium containing 2.0 mg/L kinetin and 1.0 mg/L NAA at dark condition for 16 days, but daidzin and daidzein were not significant. Callus extract was successfully fermented with *P. pentosaceus* and dihydrodaidzein, which is one of equol precursors formed by biotransformation, was confirmed to

be produced. These results will facilitate mass production of callus and isoflavones as equol precursors from Korean wild arrowroot and can be applied for the production of equol by biotransformation *in vitro*.

#### 서론

취(*Pueraria lobata*)은 콩과에 속하는 덩굴성 다년식물로 한국, 일본, 중국을 포함하는 극동아시아 지역에 넓게 분포하여 야생하고 있다. 취는 예로부터 중요한 약용식물로 사용되어 왔으며, 두통, 진정작용, 편도선염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 왔다(Yuk 1989). 특히 골다공증, 심혈관계 질병, 폐경기 질환 등의 발생을 감소시키는 효과가 있는 식물성 에스트로겐으로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Cherdshewasart et al. 2007). 취의 뿌리에는 이러한 역할을 하는 다이드진(daidzin), 다이드제인(daidzein), 제니스틴(genistin), 제니스테인(genistein), 푸에라린(puerarin) 등과 같은 다양한 이소플라본 성분을 함유하고 있다(Chansakaow et al. 2000). 이러한 이소플라본들은 주로 콩과작물에 많은 것으로 알려져 있으며, 특히 대두를 이용한 많은 연구 결과가 발표되었다(Cassidy 1996; Barnes 1998; Setchell 1998; Setchell et al. 2013). 취에는 대두보다 많은 양의 이소플라본이 함유되어 있다고 알려져 있으나(Kaufman et al. 1997) 취에 대한 연구는 상대적으로 매우 미흡한 편이다. 뿐만 아니라 식품으로 섭취된 이소플라본이 장내세균에 의해 생물 전환되어 생성되는 이퀄(equol)은 앞서 언급된 모든 다른 이소플라본 보다 높은 효과가 있는 것으로 보고되었으나(Setchell et al. 2002), 건강한 성인의 50% 미만이 이퀄을 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다(Arai et al. 2000).

\*Eunji Lee and Jung Eun Kwon equally contributed to this work  
E. J. Lee · S. J. Kim · M. S. Cha · T. H. Park (✉)  
대구대학교 원예학과, 대구대학교 생명환경연구소  
(Department of Horticulture and Institute of Life and Environment,  
Daegu University, Gyeongsan 712-714, Republic of Korea)  
e-mail: thzoo@daegu.ac.kr

J. E. Kwon · S. C. Kang (✉)  
가천대학교 생명과학과  
(Department of Life Science, Gachon University, Seongnam  
461-701, Republic of Korea)  
e-mail: sckang73@gachon.ac.kr

I. H. Kim  
농촌진흥청 국립농업과학원  
(Functional Food & Nutrition Division, National Academy of  
Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Republic of Korea)

이켈 생산은 식물 유래의 대사산물이 아닌 전적으로 장내세균의 물질대사에 의해 이소플라본이 전환된 것으로 장내세균의 종류와 이소플라본 중 이켈생산의 전구물질로 알려진 다이드제인을 이켈로 전환할 수 있는 능력에 달려있다(Setchell et al. 2002; Jin et al. 2008). 이켈을 생산할 수 있는 균주는 인간, 쥐, 돼지 등의 분변 유래 세균의 분리와 동정에 의해 다양한 종류가 있는 것으로 알려져 있으나(Minamida et al. 2006; Jin et al. 2008; Yu et al. 2008), 이켈이 생산되는 물질대사 경로는 명확히 밝혀지지 않았다. 다만 최근 밝혀진 *Lactococcus*와 *Slakia* 균주에서 구명된 몇몇 효소들에 의해 단계적으로 다이드제인이 디하이드로다이드제인(dihydrodaidzein, DHD)으로, 디하이드로다이드제인이 테트라하이드로다이드제인(tetrahydrodaidzein, THD)으로, 테트라하이드로다이제이인이 이켈로 전환되는 것으로 추정하고 있으며(Shimada et al. 2010; Tsuji et al. 2012). 다이드제인 이전의 경로는 푸에라린과 다이드진이 다이드제인으로 전환되는 것으로 추정하고 있다(Park et al. 2006; Jin et al. 2008).

앞서 언급한 바와 같이 칩은 기능적으로 많은 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 뿌리 부위에 가장 많은 성분이 포함되어 있어(Kim et al. 2004) 이를 이용하기 위하여 야생의 칩을 수거하는데 큰 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 타 *Pueraria* 속 식물을 대상으로 제한적으로 진행되었던 캘러스와 모상근의 유도 및 배양을 통해 생산된 재료에서의 이소플라본 생성 검증 연구(Vaishnav et al. 2006; Reppert et al. 2008; Boonsongcheep et al. 2010; Korsangruang et al. 2010; Udomsuk et al. 2011)와 같이 국내 야생칩으로부터 유도된 캘러스의 증식에 효과적인 배지와 배양조건 등을 구명하고 이를 통해 생산된 캘러스에서 이켈전구체 이소플라본의 생성 정도를 확인하고자 하였으며, 캘러스 추출물과 본 연구와의 공동연구로 구명된 생물전환 능력이 있는 신규 균주와의 반응에서 디하이드로다이드제인의 생성여부를 검증하여 기내에서 이켈의 생산 가능성 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 캘러스 배양조건

실험에 사용된 칩(*Pueraria lobata*)은 한국에 자생하는 야생칩으로 전국 4개 지역에서 수집되어 대구대학교 포장에서 생육중인 계통 중, 기 확립된 캘러스 유도 및 증식(Kim et al. 2012)이 용이한 GS1으로 고체배지에서 1차 배양된 캘러스를 사용하였다. 사용된 캘러스는 칩 덩굴의 줄기에서부터 유도된 것으로 증식된 캘러스는 0.5 g 정량하여 125 ml 삼각플라스크의 50 ml MS 배지(Murashige and Skoog 1962)에 접종하여 암조건과 16시간 광주기조건(광

조건: 약 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )으로 나누어  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 110 rpm의 조건으로 현탁배양하였다. 배지에 첨가된 식물생장조절제는 세 가지의 서로 다른 사이토키닌계 식물생장조절제 2.0 ml/L BA (6-benzyladenine), 2.0 ml/L Kinetin, 1.0 ml/L thidiazuron (TDZ)과 옥신계 식물생장조절제 1.0 ml/L NAA (Naphthalene acetic acid)의 조합으로 구성하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로 20분간 고온, 고압 멸균하여 사용하였으며, 각각의 처리에 대해 4반복으로 실험이 진행되었다. 배양된 캘러스는 배양기간에 따른 증식 정도를 확인하기 위하여 4일 간격으로 네 차례에 걸쳐 생체중을 측정 후, 동결건조시켜 건물중을 측정하였다. 이후 배양된 캘러스로부터의 추출물을 균주와 반응 시 물질의 변화를 조사하기 위하여 250 ml 삼각플라스크에서 앞서 언급한 동일한 배지와 동일한 광주기 조건의 처리로 12~14일 배양하여 증식된 캘러스를 동결건조하여 약 2 g의 샘플을 각각 확보하였다.

### 배양된 캘러스에서의 이소플라본 분석

이소플라본(푸에라린, 디이드진, 다이드제인) 및 미생물 발효후의 이소플라본 대사체(디하이드로다이드제인) 분석을 위해 DGU-20A3R (Shimazu, Japan) HPLC를 사용하였으며, 검출기는 PDA detector (Shimazu, SPD-M20A)를 사용하였다. 컬럼은 Sky pack C18 (SKchemical, Korea)이었으며 길이는 25 mm, 내경은 4.6 mm이고 입자크기는 5  $\mu\text{m}$  이었다. 이동상은 A [물:아세트산 = 100:1], B [물:아세트산:나이트릴:아세트산 = 50:50:1] (v/v, %)을 사용하였으며, 분석 시간은 60분이었다. 검출 파장은 280 nm 이었으며 이동상의 유속은 1.0 mL/min, 시료주입량은 50  $\mu\text{L}$ 이었다.

### 캘러스 추출물과 균주 반응에 의한 디하이드로다이드제인의 생산

각각의 처리 별로 배양되어 동결 건조된 캘러스를 20% 에탄올을 사용하여 상온에서 교반 추출하였으며, 얻어진 추출액은 여과지(Hyundai micro, 20  $\mu\text{m}$ )를 이용하여 여과하였다. 여과된 추출액을 회전진공농축기(EYELA, Japan)를 사용하여 농축하여 동결건조(IlshinBioBase, Korea)를 통한 분말화 하였으며, 사용 시까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. GAM broth에 *Pediococcus pentosaceus* EP106을 접종시킨 후, 상기의 분말을 최종농도 2%가 되도록 첨가하여  $28^\circ\text{C}$  250 rpm 조건에서 0, 24, 48 및 72시간 동안 배양시간에 따른 푸에라린, 디이드진+다이드제인 및 디하이드로다이드제인의 생산량을 확인하였다.

### 통계적 분석

캘러스의 배양조건에 따른 증식의 차이, 이소플라본의 생

성 정도의 차이 등을 확인하기 위하여 모든 데이터에 대하여 ANOVA (Analysis of Variance)를 실시하였고, 처리 집단간의 유의성이 있는 경우 DMRT (Duncan's multiple range test)로 사후 검증을 하였다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

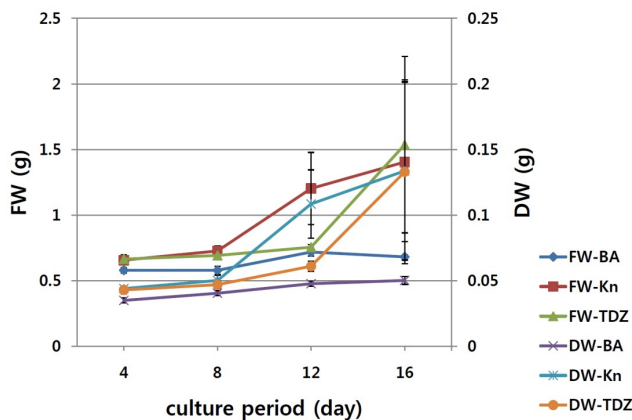
### 결과 및 고찰

국내 자생하는 칩을 대상으로 유도된 캘러스를 이용하여 가장 효율적인 이소플라본의 생성 조건을 구명하기 위하여 배지에 첨가되는 식물생장조절제의 종류, 광조건 및 배양기간에 따른 캘러스의 증식 정도와 이퀄의 전구체로 알려진 푸에라린과 다이드진+다이드제인을 조사하였다.

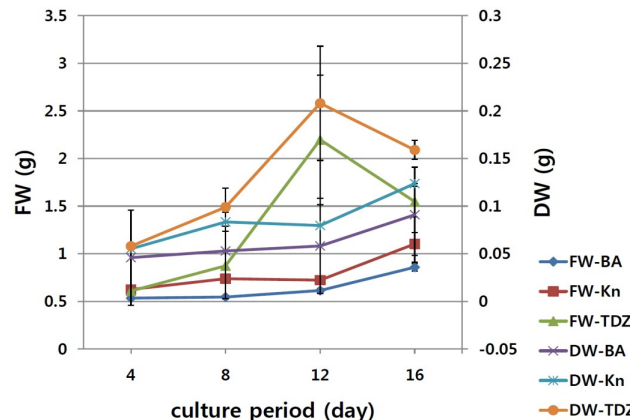
기존 보고된 *Pueraria* 속 식물을 대상으로 한 캘러스 배양에서는 NAA, 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid), 2, 4, 5-T (2, 4, 5-Trichlorophenoxy acetic acid) 등 옥신계 및 BA, kinetin 등 사이토키닌계 식물생장조절제의 다양한 농도와 조합을 사용하였다(Vaishnav et al. 2006; Prasain et al. 2007; Goyal & Ramwat 2008; Boonsongcheep et al. 2010; Korsangruang et al. 2010). 본 연구에서는 추가적으로 사이토키닌계 식물생장조절제인 TDZ을 포함하여 이들 전체를 대상으로 다양한 조합과 농도를 기본 MS배지에 첨가하여 캘러스를 증식하며 선발된 세 가지의 다른 배지 조성 (2.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L kinetin+1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L TDZ+1.0 mg/L NAA)과 두 가지 배양조건

(암조건, 광조건)을 대상으로 하였다. 각각의 처리별로 4 반복으로 진행된 실험에서 초기 접종된 0.5 g의 캘러스를 배양하여 16일간 4일 간격으로 생체중과 동결건조 이후의 건물중을 측정하였다(Fig. 1, 2). 생체중과 건물중 모두 암조건과 광조건에 따른 유의한 차이는 없었으며, 배지 조성 및 배양기간에 따라서는 유의한 차이를 보였다. 암조건에서는 생체중과 건물중 모두 TDZ이 첨가된 배지에서 16일 동안 배양한 경우, 광조건에서는 생체중과 건물중 모두 TDZ이 첨가된 배지에서 12일 동안 배양한 경우 가장 높은 증가를 보였다. 이러한 결과는 Boonsongcheep 등 (2010)과 Goyal과 Ramawat (2007)가 보고한 *Pueraria* 식물의 캘러스 배양에서 캘러스의 생체중과 건물중이 일정기간 지속적으로 증가세를 보이거나 증가 후 감소하는 경향과 유사한 것으로 나타났다. 하루 평균 캘러스의 증식량을 분석한 결과 암조건에서는 배양기간에 따른 차이가 나타나지 않았으며, 광조건에서는 TDZ이 처리된 배지에서 유의한 차이의 증식량을 보였다(Table 1, 2).

동결건조 된 캘러스는 각각의 처리별로 생합성되는 이소플라본의 함량의 차이를 비교하기 위하여 푸에라린과 다이드진+다이드제인의 함량이 분석되었다. 푸에라린의 경우 암조건과 광조건에 따른 유의한 차이는 없었으나, 배지조성과 배양기간에 따라서는 유의한 차이를 보였다 (Table 4). 암조건에서 kinetin을 첨가한 배지에서 16일 간 배양하였을 때 가장 높은 생성량을 나타내었으며, 이를 포함하여 암조건에서 TDZ을 포함한 배지에서 16일 간 배양 및 광조건에서 kinetin 또는 TDZ을 포함한 배지에서



**Fig. 1** Growth curves of callus suspension culture of Korean wild arrowroot, *P. lobata* incubated in three different medium at 24 hour dark condition. Fresh (FW) and dry (DW) weight were measured for 16 days of culture period. BA, Kn and TDZ indicate different medium containing different plant growth regulators, 2.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L TDZ + 1.0 mg/L NAA, respectively. The error bars represent the standard error of the means of four replicates



**Fig. 2** Growth curves of callus suspension culture of Korean wild arrowroot, *P. lobata* incubated in three different medium at 16 hour light and 8 hour dark condition. Fresh (FW) and dry (DW) weight were measured for 16 days of culture period. BA, Kn and TDZ indicate different medium containing different plant growth regulators, 2.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA, 2.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L TDZ + 1.0 mg/L NAA, respectively. The error bars represent the standard error of the means of four replicates

**Table 1** Callus growth per day in three different medium at dark condition. Experiment was conducted in four replications over 16-day period

	4 days	8 days	12 days	16 days
BA	0.020 ± 0.005	0.010 ± 0.004	0.018 ± 0.003	0.011 ± 0.001
Kinetin	0.039 ± 0.005	0.028 ± 0.005	0.059 ± 0.023	0.057 ± 0.023
TDZ	0.041 ± 0.008	0.024 ± 0.002	0.021 ± 0.002	0.065 ± 0.042

\* Average fresh weight of callus is given in gram per day.

\* BA (2.0 mg/L), Kinetin (2.0 mg/L) and TDZ (1.0 mg/L) indicate plant growth regulators added in MS medium with 1.0 mg/L NAA.

\* The values represent mean ± standard error and mean values are not significantly different at P=0.05 by ANOVA.

**Table 2** Callus growth per day in three different medium at 16 hours light and 8 hours dark condition. Experiment was conducted in four replications over 16-day period

	4 days	8 days	12 days	16 days
BA	0.009 ± 0.002 b	0.006 ± 0.003 b	0.010 ± 0.002 b	0.022 ± 0.002 b
Kinetin	0.031 ± 0.007 b	0.030 ± 0.005 b	0.019 ± 0.002 b	0.038 ± 0.007 b
TDZ	0.028 ± 0.006 b	0.047 ± 0.019 b	0.141 ± 0.057 a	0.065 ± 0.010 b

\* Average fresh weight of callus is given in gram per day.

\* BA (2.0 mg/L), Kinetin (2.0 mg/L) and TDZ (1.0 mg/L) indicate plant growth regulators added in MS medium with 1.0 mg/L NAA.

\* The values represent mean ± standard error and mean values with a different letter are significantly different at P=0.05 by DMRT.

**Table 3** Puerarin contents in callus cultured in three different medium at dark and light conditions. Experiment was conducted in four replications over 16-day period

		4 days	8 days	12 days	16 days
Dark condition	BA	5.68 ± 4.37 b	0.42 ± 0.25 b	0.64 ± 0.58 b	0.25 ± 0.09 b
	Kinetin	4.55 ± 0.30 b	6.46 ± 1.98 b	11.54 ± 2.98 b	27.43 ± 18.13 a
	TDZ	8.08 ± 2.13 b	5.02 ± 0.79 b	7.75 ± 1.89 b	14.67 ± 8.11 ab
Light condition	BA	1.04 ± 0.23 b	1.73 ± 0.12 b	2.12 ± 0.65 b	3.23 ± 0.99 b
	Kinetin	3.60 ± 1.02 b	9.63 ± 1.84 b	7.77 ± 1.53 b	12.94 ± 1.01 ab
	TDZ	3.53 ± 0.40 b	3.15 ± 2.24 b	10.43 ± 2.40 b	13.09 ± 0.63 ab

\* Puerarin content is given in milligram per gram of 20% ethanol extract.

\* Dark and Light conditions indicate 0 and 16 hours photoperiod, respectively.

\* BA (2.0 mg/L), Kinetin (2.0 mg/L) and TDZ (1.0 mg/L) indicate plant growth regulators added in MS medium with 1.0 mg/L NAA.

\* The values represent mean ± standard error and mean values with a different letter are significantly different at P=0.05 by DMRT.

**Table 4** Total contents of daidzin and daidzein in callus cultured in three different medium at dark and light conditions. Experiment was conducted in four replications over 16-day period

		4 days	8 days	12 days	16 days
Dark condition	BA	8.75 ± 0.69	4.82 ± 1.14	2.37 ± 0.89	1.14 ± 0.22
	Kinetin	0.22 ± 0.09	0.30 ± 0.12	0 ± 0	4.64 ± 4.62
	TDZ	0.37 ± 0.14	0.07 ± 0.07	0.09 ± 0.09	5.05 ± 5.05
Light condition	BA	0 ± 0	0 ± 0	0.01 ± 0.01	0.23 ± 0.10
	Kinetin	0 ± 0	0.53 ± 0.25	0.11 ± 0.08	0.29 ± 0.20
	TDZ	0.25 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.56 ± 0.32	0.42 ± 0.34

\* Total content of daidzin and daidzein is given in milligram per gram of 20% ethanol extract.

\* Dark and Light conditions indicate 0 and 16 hours photoperiod, respectively.

\* BA (2.0 mg/L), Kinetin (2.0 mg/L) and TDZ (1.0 mg/L) indicate plant growth regulators added in MS medium with 1.0 mg/L NAA.

\* The values represent mean ± standard error and mean values are not significantly different at P=0.05 by ANOVA.

16일 간 배양한 캘러스에서 유의성 있는 푸에라린 생성됨을 확인하였다. 다이드진과 다이드제인의 총 함량 분석에서는 배지조성과 배양기간에 따른 유의한 차이는 없었으며, 암조건에서의 생성량이 광조건보다 많은 것으로 나타났다(Table 5). Boonsongcheep 등(2010)은 *P. candollei* var. *candollei*의 잎, 줄기, 뿌리에서 유도된 셀배양 후 다이드제인, 다이드진, 제니스테인, 제니스틴 조사하였는데 줄기에서 유도된 셀에서 가장 높은 이소플라본 함량이 측정되었으며, 배양기간에 따라서는 기관별로 유도된 셀의 종류에 따라 약간의 차이를 보이나 18~21일 배양에서 가장 높게 나타났다. 또한 Vaishnav 등(2006)은 캘러스 배양 시 배지에 첨가되는 식물생장조절제의 종류에 따른 다양한 이소플라본의 함량을 조사한 결과 이소플라본의 종류와 식물생장조절제의 종류에 따라 함량의 차이가 있음을 보고하였다. 이러한 보고는 본 연구의 결과와 비교해 볼 때, *Pueraria* 속에 속한 종의 차이, 배양배지에 첨가된 식물생장조절제의 종류, 배양기간, 조사 이소플라본의 종류에 따라 상이한 결과를 보여주는 것으로 생각된다.

캘러스 증식 연구에서 처리된 배양배지 및 배양조건 별로 12-14일간 배양하여 동결 건조된 각각의 캘러스 추출물은 이소플라본의 생물전환이 가능한 것으로 구명된 *P. pentosaceus* EP106 (미발표데이터)를 반응시켜 반응시간 별로 이퀄의 전구체인 푸에라린, 다이드진, 다이드제인, 디하이드로다이드제인을 분석에 이용하였다. 암조건

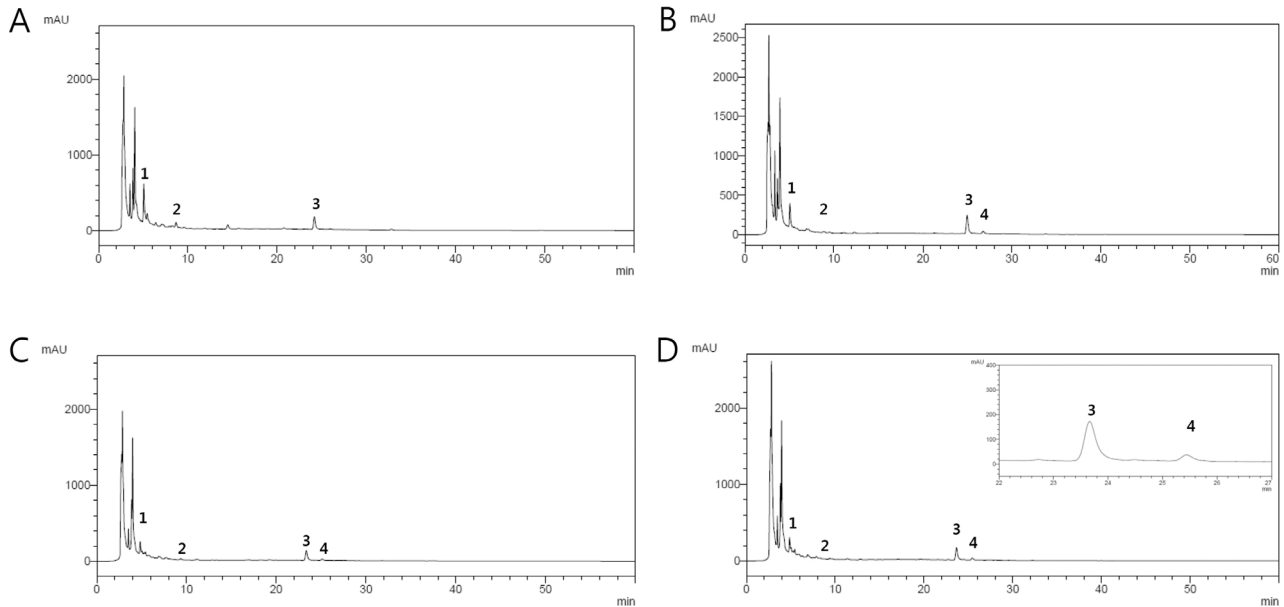
의 경우 BA 배지에서 배양된 캘러스에서는 디하이드로다이드제인의 72시간 배양까지 생성되지 않았으나, kinetin 과 TDZ 배지에서 배양된 캘러스에서는 72시간 배양에서 디하이드로다이드제인이 검출되었다(Table 5). 광조건인 경우 BA 및 TDZ 배지에서 배양된 캘러스에서는 48시간 배양 추출물부터, kinetin 배지에서 배양된 캘러스에서는 24시간 배양 추출물부터 디하이드로다이드제인이 검출되었다(Table 5, Fig. 3). 뿐만 아니라 캘러스 추출물에 존재하고 있던 푸에라린, 다이드진, 다이드제인이 전반적으로 균주와의 반응시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보여주고 있는데, 이는 균주의 생물전환능에 의해 물질대사가 일어나 디하이드로제인 그리고/또는 이퀄을 포함하는 다른 이소플라본 대사체로 전환되기 때문인 것으로 사료된다(Park et al. 2006; Jin et al. 2008; Shimada et al. 2010; Tsuji et al. 2012).

본 연구에서는 국내 자생침을 대상으로 유도된 캘러스를 현탁배양할 때 배지에 첨가되는 식물생장조절제의 종류, 배양조건 및 배양기간에 따른 캘러스의 증식 정도와 생체내에서 합성되는 이퀄의 전구물질인 이소플라본의 생성 정도를 확인하고, 이소플라본을 생물전환에 의한 물질대사를 통하여 이소플라본 대사체를 생산할 수 있는 균주와의 반응을 통한 디사이드로다이드제인의 생합성을 확인하였다. 최종적으로는 조직배양을 통한 바이오매스의 증대, 다양한 조건에서의 이퀄 전구체인 이소플라본 함량의 증대와 균주 반응을 통한 최종산물인 이퀄 생산을

**Table 5** Puerarin, daidzin+daidzein and dihydrodaidzein contents after fermentation of callus extracts of Korean wild arrowroot with *P. pentosaceus* EP106

Medium	Time (hours)	Dark condition			Light condition		
		Puerarin	Daidzin+Daidzein	DHD	Puerarin	Daidzin+Daidzein	DHD
BA	0	71.31	13.03	ND	79.17	20.28	ND
	24	19.29	6.43	ND	52.44	19.61	ND
	48	19.29	5.73	ND	20.78	19.80	4.09
	72	18.23	13.19	ND	20.10	7.63	4.10
KN	0	110.28	50.99	ND	172.65	41.13	ND
	24	87.62	29.45	ND	93.32	39.33	4.19
	48	44.31	28.81	ND	77.73	30.05	4.98
	72	19.30	27.58	5.43	36.11	25.19	5.34
TDZ	0	54.34	10.44	ND	91.83	41.89	ND
	24	3.50	5.44	ND	52.56	32.60	ND
	48	3.06	3.42	ND	43.22	28.96	4.08
	72	3.39	4.63	5.30	31.12	27.20	4.78

\* Contents of puerarin, daidzin+daidzein and DHD are given in milligram per gram of 20% ethanol extract.  
 \* Dark and Light conditions indicate 0 and 16 hours photoperiod, respectively.  
 \* BA (2.0 mg/L), Kinetin (2.0 mg/L) and TDZ (1.0 mg/L) indicate plant growth regulators added in MS medium with 1.0 mg/L NAA.  
 \* 0, 24, 48 and 72 indicate fermentation time with *P. pentosaceus* EP106.  
 \* ND indicates 'not detected'.



**Fig. 3** An example of HPLC-PDA analysis of puerarin (1), daidzin (2), daidzein (3) and dihydrodaidzein (4) from callus extracts of Korean wild arrowroot cultured in MS medium containing 2.0 mg/L kinetin and 1.0 mg/L NAA at 16 hours photo period. A: without fermentation with *P. pentosaceus* EP106, B: 24 hours, C: 48 hours, D: 72 hours fermentation with *P. pentosaceus* EP106

목적으로 하는 바, Sharma 등(2009)이 보고한 *P. tuberosa*를 대상으로 한 생물반응기 배양을 통한 바이오매스의 증대 및 이소플라본의 효율적 대량생산, Korsangruang 등(2010)이 보고한 *P. candollei*를 대상으로 한 Methyl Jasmonate, Chitosan, Yeast extract 등과 같은 생물적, 비생물적 Elicitor 처리에 의한 이소플라본 함량의 증대, 그리고 본 연구에서 이용된 균주와 칩 캘러스 추출물과의 반응을 통한 최종산물 이퀄생산의 확인 등과 같은 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 적 요

국내 자생하는 야생취(*Pueraria lobata*)은 푸에라린, 다이드진, 다이드제인 등 다양한 이소플라본을 함유하고 있는 주요한 콩과 약용작물이다. 이들 이소플라본은 장내에서 특정 세균과 반응으로 생물전환이 일어나 디하이드로다이드제인, 테트라하이드로다이드제인을 거쳐 약리작용이 타 이소플라본 보다 월등한 이퀄로 물질대사가 이루어지는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 국내 야생취로부터 유도된 캘러스를 이용하여 배양배지, 배양조건 및 배양기간에 따른 캘러스의 증식과 이소플라본의 합성 정도를 구명하고 배양된 캘러스 추출물을 생물전환 능력이 있는 것으로 밝혀진 *Pediococcus pentosaceus* 균주와의 반응을 통하여 이퀄 전구체인 디하이드로다이드제인의 생합성을 구명하고자 수행되었다. 캘러스의 증식은 광조건에서 1.0 mg/L TDZ과 1.0 mg/L NAA가 첨가된 배

지에서 12일 배양했을 때 가장 좋다. 푸에라린 함량은 암조건에서 2.0 mg/L kinetin과 1.0 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 16일 배양했을 때 가장 높게 나타났으나, 다이드진과 다이드제인 함량은 처리에 따른 유의한 차이가 나타나지 않았다. 캘러스 추출물을 *P. pentosaceus* 균주와 반응하여 발효시켰을 때 생물전환에 의해 이퀄의 전구체인 디하이드로다이드제인이 성공적으로 생합성되는 것이 확인되었다. 본 연구의 결과는 국내 야생취를 대상으로 캘러스의 대량증식을 통한 이퀄의 전구물질인 이소플라본의 대량생산에 기여할 수 있으며, 기내에서 생물전환을 통하여 이퀄을 생산하기 위한 기반이 될 것이다.

## 사 사

본 연구는 2013년 농촌진흥청 국립농업과학원 연구개발사업(과제번호: PJ008398) 및 대구대학교 연구장학기금 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, Watanabe S (2000) Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol* 10:127-135
- Barnes S (1998) Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:386-392

- Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathantharug S (2010) Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Cult* 101:119–126
- Cassidy A (1996) Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 55:399–417
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higushi Y, Kudo M, Chaichantipyuth C (2000) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 66:572–574
- Cherdshevasart W, Subtang S, Dahlan W (2007) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J Pharm Biomed Anal* 43:428–434
- Goyal S, Ramawat KG (2007) Effect of chemical factors on production of isoflavonoids in *Pueraria tuberosa* (Roxb.ex. Willd.) DC suspension culture. *Indian J Exp Biol* 45:1063–1067
- Goyal S, Ramawat KG (2008) Synergistic effect of morphactin on cytokinin-induced production of isoflavonoids in cell culture of *Pueraria tuberosa* (Roxb.ex. Willd) DC. *Plant Growth Regul* 55:175–181
- Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, Hattori M (2008) Biotransformation of C-Glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 31:1621–1625
- Kaufman PB, Duke JA, Briemann H, Boik J, Hoyt JE (1997) A comparison survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J Altern Complement Med* 3:7–12
- Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY (2004) A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 16–21
- Kim S, Cha MS, Lee E, Kim I, Kwon JE, Kang SC, Park TH (2012) *In vitro* induction of hairy root from isoflavonoid-producing Korean wild arrowroot *Pueraria lobata*. *J Plant Biotechnol* 39:205–211
- Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathantharug S (2010) Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:333–342
- Minamida K, Tanaka M, Abe A, Sone T, Tomita F, Hara H, Asano K (2006) Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine. *J Biosci Bioeng* 102:247–250
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–479
- Park EK, Shin JS, Bae EA, Lee YC, Kim DH (2006) Intestinal bacteria activate estrogenic effect of main constituents puerarin and daidzin of *Pueraria thunbergiana*. *Biol Pharm Bull* 29:2432–2435
- Prasain JK, Reppert A, Jones K, Moore DR, Barnes S, Lila MA (2007) Identification of isoflavone glycosides in *Pueraria lobata* cultures by tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 18:50–59
- Reppert A, Yousef GG, Rogers RB, Lila MA (2008) Isolation of radiolabeled isoflavones from Kudzu (*Pueraria lobata*) root cultures. *J Agric Food Chem* 56:7860–7865
- Setchell KDR (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68:1333S–1346S
- Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E (2002) The clinical importance of the metabolite equol – A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132:3577–3584
- Setchell KDR, Brown NM, Summer S, King EC, Heubi JE, Cole S, Guy T, Hokin B (2013) Dietary factors influence production of the soy isoflavone metabolite S(-)-equol in healthy adults. *J Nutr* 143:1950–1958
- Sharma V, Goyal S, Ramawat KG (2009) Scale up production of isoflavonoids in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* grown in shake flasks and bioreactor. *Eng Life Sci* 9:267–271
- Shimada Y, Yasuda S, Takahashi M, Hayashi T, Miyazawa N, Sata I, Abiru Y, Uchiyama S, Hishigaki H (2010) Cloning and expression of a novel NADP(H)-dependent daidzein reductase, an enzyme involved in the metabolism of daidzein, from equol-producing *Lactococcus* strain 20-92. *Appl Environ Microb* 76:5892–5901
- Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Akaza H (2012) Identification of an enzyme system for daidzein-to-equol conversion in *Slakia* sp. Strain NATTS. *Appl Environ Microb* 78:1228–1236
- Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W (2011) Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol Lett* 33:369–374
- Vaishnav K, Goyal S, Ramawat KG (2006) Isoflavonoids production in callus culture of *Pueraria tuberosa*, the Indian Kudzu. *Indian J Exp Biol* 44:1012–1017
- Yu ZT, Yao W, Zhu WY (2008) Isolation and identification of equol-producing bacterial strains from cultures of pig faeces. *FEMS Microbiol Lett* 282:73–80
- Yuk CS (1989) Colored medicinal plants of Korea. Academy book. Seoul. p301