

Angelica gigas Nakai 현탁세포 배양의 동결보존 연구

조지숙, 이송재, 전수환, 김익환¹⁾, 김동일*

인하대학교 공과대학 생물공학과 세포배양공학실험실

¹⁾고려대학교 생명공학원

전화 (032) 860-7515, FAX (032) 875-0827

Abstract

Cell culture of *Angelica gigas* Nakai producing decursin and decursinol angelate as secondary metabolites were preserved in liquid nitrogen after pre-freezing in deep freezer(-70°C). The development of optimal procedure for cryopreservation was investigated by using cryoprotectant and pre-treatment before cooling. 0.7 M sucrose was found be the optimum osmotic pre-conditioning culture medium compared to mannitol, sorbitol and NaCl with the same osmotic pressure. In pre-culture medium, cells in exponential phase, supported the best growth after cryopreservation. Effective cryoprotectant was proved to be a mixture of sucrose, glycerol, DMSO. Higher concentration of cryoprotectant was better for cell viability. The highest relative cell viability established after the development of optimal procedure was 65%.

서론

식물세포 배양은 여러 유용한 이차대사산물을 생산하기 위한 잠재적인 공급원이다. 지금까지 경제적으로 이용 가능한 이차대사산물로는 pigment, vitamin, alkaloid, steroid 등이 있다. 이러한 산물의 대량 생산을 위한 처음 단계는 고생산 세포주를 선택하는 것이다. 그러나 불행하게도 선택된 세포주의 유지가 매우 어렵다는 문제점을 지니고 있다. 일반적으로 사용되는 세포 또는 식물세포 배양의 유지 방법은 적당한 배지를 이용한 반복적인 계대배양을 통해 세포 분열상태를 계속 유지하는 것이다. 이 방법은 고비용, 오염, 조작의 실수 등의 단점을 가지고 있을 뿐 아니라, 배수체의 증가, 자발적인 변이, 형태 형성능 및 산물 생성 능력의 손실 또는 감소, 선택 세포주 및 형질전환 세포주의 wild type으로의 전환, 원하지 않는 표현형의 배양 내 독점 등의 문제점을 지니고 있다¹⁾. 따라서 식물 세포주의 장기 보존은 이상의 문제점들을 해결하기 위하여 꼭 필요하다고 할 수 있다. 특히 산업화를 위해 선택된 고생산 세포주나 인위적으로 형질 전환된 세포주를 장시간 안전하게 보존할 방법의 개발은 필수적이다. 실제로 종에 따라서는 장기간의 계대배양에 의하여 alkaloid 생산능이 손실된 경우가 보고되었다²⁾. 따라서 동물세포나 미생물과 마찬가지로 식물세포주의 경우도 장기간 보존할 수 있는 보존법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 면역증강활성물질인 polysaccharide와 항암물질인 decursin과 decursinol angelate를 생산하는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포를 이용하여 동결보존 후

의 cell viability를 높이기 위한 최적 예비성장배지 선정 및 성장기간이 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 성공적인 동결보존을 위해서는 완만한 동결이 중요하므로 pre-freezing 기간 및 동결보호제의 종류와 농도를 최적화하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 현탁세포는 *Angelica gigas* Nakai였으며, 성장배지로는 SH 기본배지에 30 g/L sucrose, 1 g/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 첨가하여 25°C, 120 rpm 암 조건에서 배양하였다. 예비 성장배지로는 위의 성장배지에 0.3, 0.5, 0.7 M sucrose를 첨가하였으며, 삼투압 증진제 종류별 실험에서는 mannitol, sorbitol, sodium chloride 등을 첨가하여 수행하였다. 배양기간은 각각 2, 4, 6, 8일간 으로 정하여 실험에 사용하였다. 동결보호제가 동결보존에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 DMSO, glycerol, sucrose 등을 여러 가지 농도로 혼합하여 cryotube에 예비 성장배지에서 배양한 세포 0.5 g과 동결보호제 1.2 mL을 첨가하여 동결보존을 수행하였다. 세포를 냉동시키기 위하여 각각 90, 120, 240, 480, 1440분 동안 deep freezer(-70°C)에서 pre-freezing을 수행한 후 액체 질소(-196°C)에 1일간 보존하였다. 해동을 위해서는 40°C water bath에서 3분간 정치하였다. Cell viability의 측정은 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 환원법을 이용하였다.

결과 및 고찰

식물세포의 동결보존 후 높은 cell viability를 얻기 위해서는 천천히 냉동하는 것이 중요하다³⁾. 따라서 기초 실험으로 deep freezer에서 pre-freezing 시간에 따른 영향을 측정해 보았다. 그 결과 240 분간 수행한 경우 가장 높은 13.5%의 relative viability를 얻었다. 이는 90 분의 경우에 가장 낮은 값을 나타내었는데 이것은 이에 비하여 약 7.4배가 높은 값이며, 1440 분에 비해서는 1.5배 증가한 값이다. 이는 식물세포의 경우 동물세포와는 달리 세포벽이 존재하고 세포 내 수분함유량이 높기 때문에 빠른 freezing을 수행할 경우, 세포 내에 ice crystal이 형성되어 세포에 손상을 미치기 때문인 것으로 생각된다.

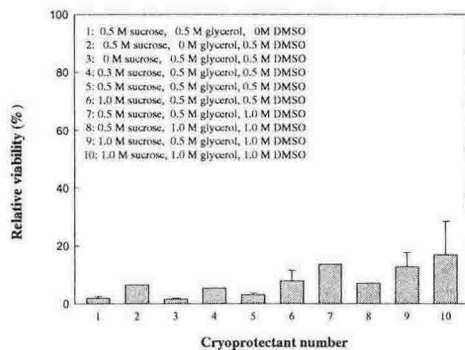


Figure 1. Comparison of component of cryoprotectant on cell viability. Relative viability was obtained by dividing with each control. All samples were prepared with 0.5 g of fresh cells added 1.2 ml. cryoprotectant

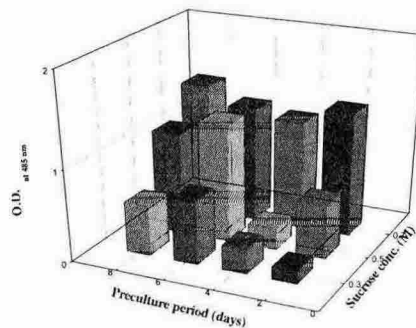


Figure 2. Effect of preculture period and sugar concentration in preculture medium

동결보호제의 종류와 농도가 cell viability에 미치는 영향을 조사한 결과 1 M sucrose, 1 M glycerol, 1 M DMSO의 경우에서 가장 좋은 결과를 나타내었다(Figure 1). 높은 농도의 sucrose와 DMSO를 처리하는 경우 동결보호제로서의 효과가 높은 것을 알 수 있으며, glycerol의 경우는 그 자체로서 어떤 효과를 나타내는 것보다는 다른 첨가제들과 같이 작용하여 더욱 동결보호제의 효과를 증대시키는 것으로 판단된다. 이상의 결과로 동결보호제를 처리 할 경우 한가지 물질보다는 여러 가지 물질을 혼합하여 사용하는 것이 보다 효과적인 것으로 생각된다⁴⁾. 대부분의 배양은 본래의 동결보존을 시작하기 전에 최대의 동결저항성을 갖도록 하기 위하여 며칠간 또는 적어도 몇 시간 동안은 특별한 조작을 하거나 특수 조건에서 배양할 필요가 있기 때문에 효과적인 예비생장배지의 결정 및 생장기간에 따른 영향을 조사해 보았다. Figure 2에서 볼 수 있듯이 예비생장배지 내의 sucrose농도가 높을수록 동결보존 후의 cell viability가 높았는데 이는 예비생장기간동안 높은 삼투압으로 세포 크기를 줄여줌으로써 동결에 의한 cell damage를 최소화시켰기 때문이라 추측된다. 또한 생장기간의 영향을 보면 6~8일 정도의 시간이 지난 세포의 경우 결과가 좋았는데 그 이유는 이 기간이 *Angelica gigas* 세포의 세포분열이 일어나는 지수생장으로 metabolism이 활발히 일어나는 시기이며 동시에 세포 크기 지수인 F/D ratio도 6일째 가장 작은 값을 나타내므로 세포 크기가 작아 동결시 저항성이 증대되는 것으로 보인다(Figure 3).

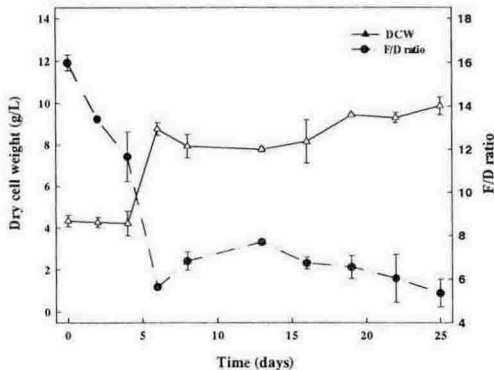


Figure 3. Time course changes of cell growth and F/D ratio in preculture medium. 8 ml suspension cells were inoculated with liquid-to-liquid inoculation method in 22 ml medium. Preculture medium was composed with 0.7 M sucrose, SH basal medium/L 2,4-D.

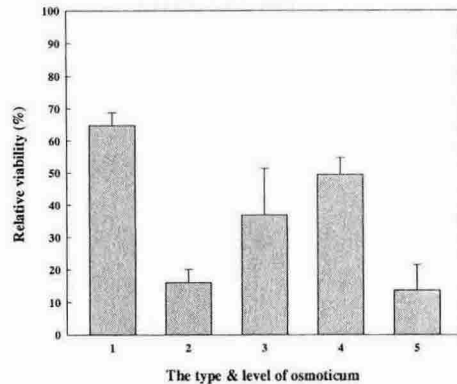


Figure 4. Effect of type and combination of osmotic factors (preculture medium). Osmolality of each sample was 1: 749 mOsm/kg H_2O , 2: 752 mOsm/kg H_2O , 3: 719 mOsm/kg H_2O , 4: 723 mOsm/kg H_2O , 5: 394 mOsm/kg H_2O .

따라서 최적의 예비생장기간은 relative viability와 비교하여 6일로 결정하였다. 최적의 예비생장배지로는 0.7 M sucrose를 사용하였는데, sucrose 이외의 다른 삼투압 증진제를 사용하여 각각이 cell viability에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 4). 그 결과 같은 삼투압의 농도로 처리하였을 때 sucrose가 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이는 sucrose가 삼투압을 높여 세포 크기를 줄여주는 것 이외에도 membrane fusion,

phase transition, phase separation을 방지함으로써 membrane의 구조를 보존하여 냉동 시 세포 내에 형성되는 ice crystal에 의한 membrane의 손상을 막아주는 것으로 보인다⁵⁾. 따라서 sucrose의 경우 다른 삼투압 증진제 보다 동결보존 후 높은 cell viability를 나타내는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 토대로 앞으로 동결보존 후 세포의 regrowth와 이차대사산물의 생합성능을 측정하여 동결보존 전의 세포와 비교하는 연구가 함께 진행되어야 할 것으로 판단된다.

요약

식물세포의 장기보존방법 연구를 위하여 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포를 이용하여 동결보존을 수행하였다. 최적의 예비성장배지로는 0.7 M sucrose를 첨가하여 6일간 배양한 것이 가장 좋았으며, 동결보호제로는 1 M sucrose, 1 M glycerol, 1 M DMSO를 혼합하여 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 나타내었다. 동결 시에는 처음 8시간 동안 deep freezer에서 천천히 냉동을 한 후 액체질소에 넣는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다. 또한 여러 가지 삼투압 증진제를 사용한 실험을 수행한 결과 sucrose가 가장 좋은 결과를 나타내었는데 이것은 sucrose가 삼투압 증진제 역할뿐만 아니라 cell membrane을 보호하기 때문으로 사료된다.

참고문헌

1. Kartha, K. K., "Cryopreservation of secondary metabolite-producing plant cell cultures"(1987), In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants(Eds. I. K. vasil), Vol.4, 217-227, Academic Press, Orlando, Florida.
2. Chen, T. H. H., K. K. Kartha, N. L. Leung, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, and F. Constabel, "Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of Periwinkle (*Catharanthus roseus*)"(1984), *Plant Physiol.*, **75**, 726-731.
3. Jain, S., R. K. Jain, and R. Wu, "A simple and efficient procedure for cryopreservation of embryogenic cells of aromatic Indica rice varieties"(1996), *Plant Cell Rep.*, **15**, 712-717.
4. Hitmi, A., H. Sallanon, and C. Barthomeuf, "Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability"(1997), *Plant Cell Rep.*, **17**, 60-64.
5. Panis, B., N. Totté, K. van Nimmen, L. A. Withers, and R. Swennen, "Cryopreservation of banana(*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose"(1996), *Plant Sci.*, **121**, 95-106.