

금창초(*Ajuga decumbens* THUNB.) 모상근의 기내배양을 통한 20-hydroxyecdysone의 생산  
 작물과학원 목포시험장<sup>1</sup>, 전남대학교<sup>2</sup>  
 김광수<sup>1\*</sup>, 김화영<sup>1</sup>, 장영석<sup>1</sup>, 김용범<sup>1</sup>, 황백<sup>2</sup>, 방진기<sup>1</sup>

Production of 20-Hydroxyecdysone through *In vitro* Hairy Root Cultures of  
*Ajuga decumbens* THUNB.

Mokpo Experimental Station, NICS, RDA, Muan, Korea<sup>1</sup>

Dept. of Biology, Chonnam National University, Gwangju, Korea<sup>2</sup>

Kwang-Soo Kim<sup>1\*</sup>, Hwa-Young Kim<sup>1</sup>, Young-Seok Jang<sup>1</sup>, Yong-Bum Kim<sup>1</sup>, Baik  
 Hwang<sup>2</sup>, and Jin-Ki Bang<sup>1</sup>

실험목적

금창초(*A. decumbens*) 모상근의 배양을 통하여 20-hydroxyecdysone(20-HE)의 기내 생산 가능성을 확인하기 위해 모상근을 유도하고, 배지, 탄소원의 종류와 농도, 인원, 질소원, 성장조절제 및 암, 명배양 그리고 온도 등의 물리적인 변화가 모상근의 성장과 20-HE의 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

표면살균한 금창초의 줄기 절편체를 모상근의 유도에 사용하였다. 사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834이며 감자 추출배지(Potato 2%, sucrose 1.5%)로 27°C 암소에서 2일간 배양한 다음, 약 10<sup>8</sup> bacteria/ml로 희석하여 사용하였다.

○ 실험방법

금창초의 모상근 유도를 위하여 줄기 절단면에 직접 *A. rhizogenes* ATCC 15834를 접종한 후, cefotaxime (500 mg/L)이 첨가된 1/2MS 고형배지(sucrose 2%)에 치상하여 모상근을 유도하였다. 모상근의 성장에 적합한 배양조건을 규명하기 위해 1/2MS, MS, 1/2 B5, B5, RCM 등의 배지를 이용하여 적정배지를 규명하였고, 탄소원 종류 및 농도, 인산의 농도, 질소원인 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 조합 그리고 성장조절제 등의 화학적인 요소 및 암조건, 광조건 그리고 배양온도와 같은 물리적 변화가 모상근의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 배양은 100 ml 삼각플라스크에 30 ml의 배지를 넣고 root tip이 포함된 길이 2 cm의 모상근을 5개씩 접종하여 3회 반복으로 회전교반기에서 100 rpm으로 3주간 배양한 후, 수확하여 흡습지에 흡습한 후 생체량을 측정하였으며, 이를 동결건조기에서 동결건조하여 건중량을 측정하였다. Matsumoto와 Tanaka (1991)의 방법에 따라 모식물체와 기내 배양된 부정근 및 모상근으로부터 20-HE를 추출하고 HPLC로 함량을 조사하였다. HPLC 분석은 Waters의 injector (V6K), detector (Tunable Absorbance Deteror), integrator (746 Data module)를 사용하였고, 고정상으로 Waters의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column(10  $\mu$ m, 3.9 mm  $\times$  300 mm)을, 이동상으로는 CH<sub>3</sub>CN : MeOH : H<sub>2</sub>O = 18 : 2 : 80(V/V/V)를 사용하였으며, 각 시료를 5  $\mu$ l씩 주입하고, 유속 1.0 ml/min으로 하여 242 nm에서의 자외선 흡광도로 검출하였다.

\*주저자 연락처(Corresponding author) : 김광수 E-mail: ajuga@rda.go.kr Tel : 061-450-0133

## 실험결과

금창초(*A. decumbens*)의 모상근 배양을 통한 유용물질의 기내생산을 위해 모상근을 유도하고 배양환경 및 20-HE의 합성능을 조사하였다.

*A. rhizogenes* ATCC 15834 균주를 감염시켜 금창초의 줄기로부터 모상근을 유도하여, 최적 배양조건을 확인한 결과, 배지는 MS 배지의 다량원소를 1/2로 낮춘 1/2 MS 배지에서 생장률이 가장 좋았으며, 탄소원으로는 sucrose가, 농도는 5 %로 첨가되었을 때 생장이 가장 좋았다. 인산은 1/2 MS 기본염에서와 동일한 농도인 0.62 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  첨가 시 생장이 가장 양호했고, 질소원으로써  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_3^-$ 를 조합처리하여 배양한 결과  $\text{NH}_4^+$ 가 첨가되지 않은 37.6 mM  $\text{NO}_3^-$ 가 단독으로 첨가되었을 때 가장 양호한 생장을 보였으며, 첨가된  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가 높아질수록 생장률이 낮았다. 성장조절제인 IAA의 첨가 시 근단 수의 증가로 인해 모상근의 생장률이 증가했으며 0.5 mg/L IAA가 첨가되었을 때 가장 높은 2.9배의 생장률을 보였다. 명배양 시 생장률은 암배양보다 약간 더 양호했으며 30°C에서 가장 빠른 성장을 나타냈다. 모상근의 성장패턴을 조사한 결과, 접종 후 약 6일 정도까지 새로운 배지로의 적응기를 거친 다음 9일 이후 서서히 증가하다가 18일 이후에는 급속히 증가하여 27일 이후 생장이 점차 감소되는 경향을 나타냈다. 모 식물체의 뿌리, 부정근 그리고 기내 배양된 모상근의 20-HE의 함량을 HPLC를 이용하여 비교, 분석한 결과, 암배양된 모상근이 모 식물체의 뿌리보다 약 2.7배 정도 높은 20-HE의 합성능을 보였으며 부정근은 모 식물체보다 낮은 합성능(0.7배)을 보였다. 또한 배양 조건에 따른 모상근의 20-HE의 합성능을 확인한 결과, 암배양에 비해 명배양 시 1.2배, IAA의 첨가 시 1.1배 정도 20-HE의 합성이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 1. 20-HE content of natural, adventitious and hairy root of *A. decumbens*.

	Growth rate (g • dry wt./flask)	20-HE content (g • dry wt./flask)	20-HE product (mg/flask)
Natural root	-	0.346	-
Adventitious root	0.065	0.232	0.015
Dark	0.148	0.927	0.137
Hairy root Light	0.159	1.136	0.181
IAA	0.429	1.043	0.447