

페퍼민트 세포의 현탁 배양시 생육 및 정유생성 특성

김진환 · 이형주

서울대학교 식품공학과, 농업생물신소재연구센터

초록 : 현탁배양에 의한 박하 세포의 성장 특성을 살펴보기 위하여 박하 잎으로부터 캘러스를 유기하고 이 캘러스 중 쉽게 퇴화되지 않고 생육 속도가 빠른 우수 세포주를 선발하였으며 선발된 세포주를 현탁 배양하였다. 현탁 배양중 배지의 조성, 식물 성장 호르몬, 배지의 pH가 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 배지로서 사용한 Lin-Staba 배지, B5 배지, MS 배지 중에서는 Lin-Staba 배지에서 세포의 생육이 가장 좋았으며 특히 이 배지에 100 mg/l yeast extract를 첨가했을 때 생육은 크게 저해되었다. 식물 성장 호르몬의 경우는 cytokinin류가 auxin류를 첨가했을 때보다 성장 속도가 더 빨라졌다. 배지의 초기 pH는 성장에 큰 영향을 주지 못하였다(1992년 9월 20일 접수, 1992년 10월 15일 수리).

각종 식물은 오래전부터 풍미료, 색소, 의약품, 농약 등 2차 대사 산물의 중요한 급원으로 이용되어 왔는데, 최근들어 생물공학 기술이 발전함에 따라 식물조직 배양을 이용하여 2차 대사 산물을 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{1,2)}

박하 정유의 구성성분은 monoterpenoids로서 껌, 사탕, 술 등의 식품과 의약품에 가장 널리 쓰이는 풍미질의 하나로, Lin-Staba³⁾에 의해 처음으로 조직 배양이 시도되어 캘러스 유기와 배양조건에 대한 보고가 있었다. Becker,⁴⁾ Bricout와 Paupardin 등⁵⁾에 의해서도 캘러스 배양에 대한 보고가 있었으며, Kreeva 등⁶⁾은 페퍼민트 캘러스 세포 성장에 Lin-Staba 배지가 좋음을 보고하였다. 이상과 같이 박하 세포 배양에 관한 연구는 대부분 캘러스 성장에 관한 연구였다. 그러나 박하 세포 배양에 의해 박하 정유를 대량으로 생산하기 위해서는 박하 세포가 현탁 배양에 의해서도 잘 자라고 그 유전적 형질이 잘 유지되어야 한다.

Lin과 Staba⁸⁾는 처음으로 캘러스 배양과 현탁 배양을 시도하였으나 monoterpenoids의 생산에 대해서는 보고가 없었고, Wang과 Staba⁹⁾는 carboy system으로 스피아민트 세포를 배양하였으나 박하유는 생성되지 않았다. 또한 Becker¹⁰⁾에 의해서도 캘러스 배양이 시도되었으나 역시 monoterpenoids는 생산되지 않았다. 그러나 Bricout와 Paupardin¹¹⁾은 0.1 ppm의 benzylaminopurine과 3%의 glucose가 함유된 Murashige Skoog 고체 배지에서

박하 캘러스를 배양하여 박하 정유가 생산되었음을 보고하였다.¹²⁾ 그렇지만 식물체로부터 생산되는 박하정유의 주요성분은 menthol(34.6%)과 menthone(23.8%)인데 비하여, 배양 캘러스에서는 menthol과 menthone은 거의 생성되지 않았고 대신 미량 성분인 pulegone과 menthofuran이 각각 30.4%와 12.3%로 많이 생성되었다.¹²⁾ Kireeva 등¹³⁾에 의해서도 박하정유 생산에 관한 보고가 있었는데 3% sucrose와 2 ppm의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid가 첨가된 Lin-Staba 배지에서 캘러스를 배양한 결과 박하정유의 함량이 식물체의 정유함량과 유사하였다. 그러나 정유의 조성은 재배된 식물체와 달라서 menthol과 menthone 대신 pulegone과 piperitone이 높게 나타나 Bricout와 Paupardin과 비슷한 결과를 보였다. 최근에는 식물 조직 배양을 monoterpenoids의 생물학적 변환(biotransformation)에 이용하려는 연구가 많이 보고 되어¹⁴⁾ 박하의 경우 Aviv 등¹⁵⁻¹⁷⁾에 의해 박하 현탁 배양 세포가 pulegone을 isomenthone으로, menthone을 neomenthol로 변환시키는 능력이 있음을 알게 되었고 이를 이용하여 고정화 박하세포를 통한 생물학적 변환을 연구하였다.

이상과 같이 식물체의 배양에 의하여 박하정유를 생산하려는 연구는 주로 캘러스 배양에 의한 것이었고 현탁 배양에 의한 정유의 생성에 대하여는 연구된 바가 거의 없었다. 본 실험에서는 박하세포의 현탁 배양에 의한 정유의 생산 가능성과 생성 최적조건을 살펴보기 위하여

여러 배양조건에서의 박하세포의 정유 생성량 및 그 조성을 분석하였다.

재료 및 방법

박하 세포 및 계대 배양

박하 세포로는 서울대학교 농과대학 식품공학과에서 계대 보존중인 서양종 페퍼민트(*Mentha piperita*)의 현탁 배양세포를 사용하였다. 배양세포는 50 ml의 액체배지 가운데 200 ml의 flask내에서 진탕 배양하였으며 10일마다 계대하여 유지하였다. 배양배지는 Lin-Staba 배지에 2,4-D를 2 mg/l 첨가하였으며 배지의 초기 pH는 5.7로 맞추었다. 배양온도는 27°C 였으며 1600 lux의 광조건하에서 16~18시간으로 명암을 반복 조절하며 130 rpm으로 진탕 배양하였다. 단, 저온처리에 의한 박하유생성 시험의 경우는 18~6시간의 명암으로 배양하였다.

박하 oleoresin의 추출

제배된 페퍼민트는 50°C 에서 14시간 송풍 건조하였다. 건조된 잎은 유발에서 분쇄한 후 rapid solvent extraction 방법¹⁸⁾으로 추출하였다. 충전제로는 activated alumina(80~200 mesh, Merck)를, 용매는 pentane과 dichloromethane을 2:1의 비율로 섞어 사용하였다. 추출후 charcoal(activated, Wako Chemicals)로 탈색한 다음, 진공 회전 증발기로 농축하였다.

현탁 세포 배양액의 경우에는 20일간 배양한 배양액을 원심분리(2000×g, 200 min)하여 세포를 제거하고 상정액을 취하여 liquid-liquid extract 장치¹⁹⁾에서 pentane : dichloromethane이 2:1로 혼합된 유기 용매로 8시간 추출하였다. 추출 후 무수 황산나트륨으로 수분을 제거하고 charcoal로 탈색하였으며 진공 회전 증발기로 농축하였다.

박하 oleoresin의 성분 분석

성분의 분석을 위하여 gas chromatograph(Varian mo-

del 3700)를 사용하였고 detector는 flame ionization detector, column은 0.25 mm(ID)×30 m의 SE 52 fused silica capillary column을 사용하였다. 분석시 온도조건은 injector가 240°C, detector는 250°C 이었고, column은 초기에 70°C 에서 2분간 지체한 후 분당 3°C 씩 230°C 까지 높여서 분석하였다.

결과 및 고찰

박하유 생성에 대한 배지의 영향

현탁 배양시 박하유 생성에 대한 배지의 영향을 알아보기 위하여 Lin-Staba 배지, B5 배지, MS 배지 그리고 Lin-Staba 배지에 yeast extract 100 mg/l를 첨가한 배지에서 배양하였다. 이 네 종류의 배지에 의해 생성된 박하 정유의 생성량과 그 주요 성분의 함량은 Table 1에 나타내었다. 전체 배양액중 박하정유의 생성량은 Lin-Staba 배지에서 가장 많아 B5 및 MS 배지의 경우에 비해서 각각 2배, 4배 가량 생성되었고, menthol 함량도 약 18%로서 Lin-Staba 배지가 박하 정유의 생산에 좋은 배지임을 알 수 있었다.

특이한 것은 Lin-Staba 배지에 yeast extract를 첨가한 modified Lin-Staba 배지의 경우 생장은 거의 일어나지 않았으나 박하 정유의 생성량은 Lin-Staba 배지에 비해 거의 2배에 가깝고 menthol의 함량도 20%에 달해 박하 정유의 생성에 큰 효과가 있었다. 이것은 yeast extract 중의 미지의 물질이 박하 정유의 생산을 촉진하는 것으로 생각되며 앞으로 yeast extract의 첨가량을 조절하여 박하 정유를 생산하기 위한 생산용 배지로 사용가능함을 시사하고 있다.

박하유 생성에 대한 식물 성장 호르몬의 영향

식물 성장 호르몬의 영향을 알아보기 위하여 auxin류로는 2,4-D와 NAA, cytokinin류로는 BA와 kinetin을 2 mg/l의 농도로 Lin-Staba 배지에 첨가하여 배양하였다. Table 2에서와 같이 auxin류에서는 2,4-D보다 NAA, cy-

Table 1. Contents of oil and major flavor components in different culture media of peppermint, suspension cultured for 20 days

Medium	Content of essential oil	Menthol	Content of pulegone	
			% (w/w)	Piperitone
Lin-Staba	0.228	17.93	23.11	11.19
B5	0.120	19.48	26.37	13.44
MS	0.062	13.53	20.20	10.93
Mod. L-S	0.390	19.59	26.06	12.70

tokinin류에서는 BA보다 kinetin을 첨가했을 때 정유 생산량이 많았으며 cytokinin류의 경우에는 auxin류에 비해 menthol의 함량이 매우 낮아 BA는 0.99%, kinetin에서는 8.11%에 불과하였다. 따라서, 전체적으로 NAA의 처리가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

식물 성장 호르몬은 식물세포의 세포 분열 및 생장, 분화 등에 관계하는 이외에, 2차 대사 산물의 생합성 경로에 관여하는 효소를 촉진시키거나 또는 억제함으로써 대사 산물의 생성에도 큰 영향을 미치는데 2차 대사 산물의 종류나 배양세포에 따라 auxin 및 cytokinin 등이 매우 다른 영향을 준다고 알려져 있다.^{6,7)} 본 실험에서도 4종류의 호르몬에 대해 정유의 생성량 및 조성비가 달라 호르몬에 의해 생합성 과정에 변화가 있었음을 알 수 있었다.

2,4-D의 경우는 일반적으로 2차 대사 산물의 생성을 억제한다고 알려져 있으며,²⁰⁾ 또한 terpenoid 생성에도 나쁜 영향을 미친다고 하였다.³⁾ 본 실험의 결과에서도 2,4-D에 의한 박하 정유의 생성량은 제일 적었으나 오히려 menthol 함량은 제일 많아 재배된 박하에서 생성되는 정유와 유사한 조성을 얻기 위해서는 2,4-D를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 그러므로 2,4-D의 농도를 달리하든가 NAA 등 다른 호르몬과 조합하여 처리하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.

박하유 생성에 대한 초기 pH의 영향

2,4-D 2 mg/l를 첨가한 Lin-Staba 배지의 초기 pH를

4.7, 5.2, 5.7로 했을 때의 박하 정유의 생산량과 주요성분의 조성은 Table 3에 나타난 바와 같다. pH 4.7에서 정유 생성량이 가장 많았으나 menthol의 함량은 6%로 낮았으며, 5.7에서의 정유 생성량은 4.7에서의 1/3정도 되었으나 menthol의 함량은 18%로 약 3배 가량 높았다.

박하유 생성에 대한 저온처리의 영향

배양 세포가 아닌 재배된 박하에서는 생장 및 정유의 생산이 온도에 의해 많은 영향을 받는다고 알려져 있는데²¹⁾ 본 실험에서는 이러한 저온처리(cold stress)가 박하 세포의 현탁 배양에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 18시간~6시간의 명암중 명상태에서는 27°C, 암상태에서는 10°C로 낮추어 배양하였다.

Fig. 1은 이때의 생육곡선과 함께 박하 정유의 생성량의 변화를 나타내고 있으며, Fig. 2는 20일째 배양액으로부터 추출한 박하유의 chromatogram을 대표적으로 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 정유의 생성량은 세포의 생장이 정체기에 들어가는 16일째에 가장 높았다가 그 이후에 떨어졌는데 이로부터 박하정유의 생성량은 세포의 생육과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. Menthol의 함량은 8일간 배양 이후 19~20%이었으나 전구체인 pulegone과 piperitone의 함량도 증가하여 재배된 박하에서 저온의 암상태에 의하여 pulegone의 생성이 적어지고 menthol의 생성이 많아지는 효과²²⁾가 현탁배양 세포에는 나타나지 않음을 알 수 있었다. 그러나 정유 생산면에서는 배양액 1l당 최고 528 mg으로 그

Table 2. Contents of essential oil and major components in culture media of peppermint, suspension cultured for 20 days with different plant growth hormones

Plant growth hormone	Content of essential oil	Menthol	Content of pulegone	Piperitone
	g/l		% (w/w)	
2,4-D	0.08	17.93	23.11	11.19
NAA	0.172	14.56	17.74	8.49
BA	0.092	0.99	2.19	1.21
Kinetin	0.145	8.11	18.1	9.68

Table 3. Contents of essential oil and major components in culture media of peppermint, suspension cultured for 20 days at different initial pH of Lin-Staba medium

Initial pH	Content of essential oil	Menthol	Content of pulegone	Piperitone
	g/l		% (w/w)	
4.7	0.115	6.03	9.47	4.61
5.2	0.047	10.89	15.23	6.68
5.7	0.036	17.93	23.11	11.19

생성량이 높았고, 건체량에 대한 박하정유의 함량도 88.4%로서 식물체의 경우(1.5%)보다 훨씬 높았다.

그리고 Table 1~3에 나타나 있는 Lin-Staba 배지, 2,4-D, pH 5.7의 실험구는 모두 같은 조건의 실험구임에도 불구하고 박하 정유의 단위 생산량이 점차로 줄어들었다. 일반적으로 켈러스나 현탁 배양 세포는 계대 횟수가 진행될수록 2차 대사 산물의 생성능력이 줄어든다고 알려져 있는데,^{23,24)} 본 연구에서는 배양조건의 실험시 마다 2~3차례의 차이로 계대가 진행됨에 따라 생성능력이 점점 줄어든 때문으로 생각된다. 그러나 Table 4의 실험에서는 앞의 실험때 보다 7~8계대 후의 세포인데도 Table 1의 실험시와 비슷하거나 더 높은 양의 박하 정유가 생산되었음을 알 수 있는데, 이는 저온 암상태의 영향으로 박하정유의 생성능력이 회복되었기 때문으로 추측된다.

이상과 같이 박하 세포의 미세 현탁배양에서도 1당 최고 528 mg까지의 박하 정유가 생성된 결과로부터 탈분화된 현탁배양 세포도 monoterpenoids를 생성할 수 있는 능력을 지니고 있음을 알 수 있었다. 그러나 박하

정유의 주요 구성성분인 menthol과 menthone보다 그의 전구체인 pulegone과 piperitone이 많이 형성된다는 점은 Bricout와 Paupardin 그리고 Kireeva 등의 결과와 매우 유사한 것이었다. 재배된 박하 세포체에서 추출한 정유중 menthol이 49.7%, menthone이 21.8%인데 비하여, modified Lin-Staba 배지에서의 세포 배양액으로 부터 추출한 정유의 경우는 menthol이 19.6%이고 menthone은 0.9%로 함량이 낮고 대신 pulegone과 piperitone은 26.1%와 12.7%로 밭에서 자란 페퍼민트의 5.0%, 0.2%에 비해

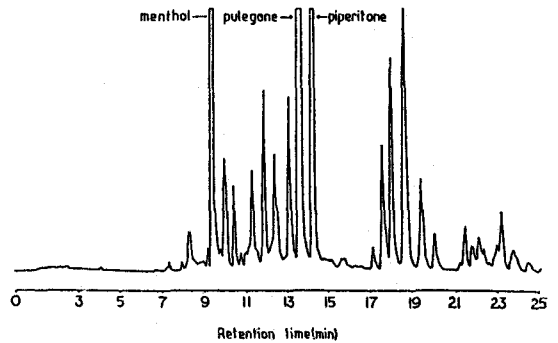


Fig. 2. Gas chromatogram of essential oil produced by the peppermint cells in suspension culture. The cells were cultured for 20 days with cold treatment at 10°C during daily 6 hr-dark period.

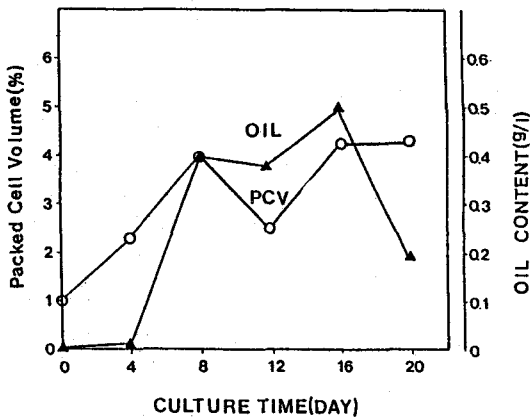


Fig. 1. Growth and essential oil production of peppermint cells cultured in suspension with cold treatment at 10°C during daily 6 hr-dark period.

Table 5. Composition of essential oil from intact plant and suspension cultured peppermint

Components	Intact plant	Suspension culture
	% (w/w)	% (w/w)
Menthol	49.7	19.6
Menthone	21.8	0.9
Menthyl acetate	6.9	Trace
Limonene	5.0	Trace
Pulegone	5.0	26.1
Piperitone	0.2	12.7

Table 4. Contents of essential oil and major components in culture media of peppermint, suspension cultured for 20 days with daily 6 hr, dark and 10°C cold treatment

Culture time in days	Content of essential oil g/l	Menthol	Content of pulegone	Piperitone
			% (w/w)	
4	0.287	15.63	22.07	12.11
8	0.409	19.81	26.75	13.86
12	0.383	20.89	27.80	14.82
16	0.528	19.07	25.73	13.75
20	0.215	19.38	26.39	12.96

매우 높았다(Table 5). 그러나 menthol의 함량이 20%로 나타나, 켈러스를 배양한 Kireeva 등의 실험에서 그 함량이 10% 이었던 점에 비교하면 월등히 증가한 결과이다. Menthol은 pulegone에서 menthone을 거쳐 생합성되는데 현탁 배양 세포에서는 pulegone에서 menthone으로 가는 환원단계가 억제되었기 때문에 pulegone이 축적된다고 할 수 있다. Menthone은 거의 축적되지 않은 것으로 보아 일단 pulegone에서부터 만들어진 menthone은 곧바로 menthol로 변환된다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Charlwood, B. W., Hegarty, P. K. and Charwood, K. A.: Secondary metabolism in plant cell cultures, Morris, P., Scragg, A. H., Stafford, A. and Fowler, M. W. (eds), Cambridge University Press, London, p. 15, (1986)
- Berlin, J.: Biotechnology, Pape, H. and Rehm, H. J.(eds), VCH, p. 629, (1986)
- Banthorpe, D. V.: Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 5, Vasil, I. D. (ed), Academic Press, p. 143, (1988)
- Bhom, H.: Proc. 5th Int. Cong., Plant tissue culture, p. 325, (1982)
- Brown, J. J. and Charlwood, B. V.: Secondary metabolism in plant cell cultures, Morris, P., Scragg, A. H., Stafford, A. and Fowler, M. W.(eds), Cambridge University Press, London, p. 68, (1988)
- Barz, W. and Ellis, B. E.: Natural products as medicinal agents, Beal, J. L. and Reinhard, E.(eds), p. 447, (1980)
- Carew, D. P. and Staba, E. J.: Lloydia, 28 : 1(1985)
- Lin, M. L. and Staba, E. J.: Lloydia, 24 : 139(1961)
- Wang, C. J. and Staba, E. J.: J. Pharm. Sci., 52 : 1058(1963)
- Becker, H.: Biochem. Physiol. Pflanzen., 161 : 425 (1970)
- Bricout, J. and Paupardin, C.: Sci. Paris. Ser. D., 281 : 383(1975)
- Murashige, T. and Skoog, F.: Physiol. Plant., 15 : 473(1962)
- Kireeva, S. A., Mel'nikov, V. N., Reznikova, S. A. and Meshcheryakova, N. I.: Soviet Plant Physiol., 25 : 438(1978)
- Lappin, G., Tampin, J. and Stride, J. D.: Secondary metabolism in plant cell cultures, Morris, P., Scragg, H., Stafford, A. and Fowler, M. W. (eds), Cambridge University Press, London, p. 114
- Aviv, D. and Galun, E.: Planta Medica, 33 : 70(1986)
- Aviv, D., Krochmal, E., Dantes, A. and Galun, E.: Planta Medica, 42 : 236(1981)
- Galun, E., Aviv, E., Dantes, A. and Freeman, A.: Planta Medica, 49 : 511(1985)
- Lan, K. C., Nickerson, G. B. and Deinzer, M. L.: J. Agric. Food Chem., 34 : 63(1986)
- Drawert, F., Heimann, W., Emberger, R. and Tressl, R.: Chromatographia, 2 : 57(1969)
- Sacuta, M. and Komamine, A.: Cell culture and somatic cell genetics, Constabel, F. and Vasil, I. K. (eds), Vol. 4, Academic Press, New York, p. 97. (1987)
- Biggs, R. H. and Leopold, A. C.: Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 66 : 315(1955)
- Burbott, A. J. and Loomis, W. D.: Plant Physiol., 66 : 315(1967)
- Dougall, D. K.: Plant Cell and Tissue Cultures-Principles and applications, Sharp, W. R., Larson, P. D., Paddock, E. F. and Raghaven, V.(eds), Ohio State University Press, p. 27, (1979)
- Berlin, J.: Endeavour, 8 : 5(1984)

Production of monoterpenoid flavor compounds by suspension culture of peppermint cells

Jin-Hwan Kim and Hyong-Joo Lee (Department of Food Science and Technology, Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : To investigate the production of monoterpenoids by *Mentha piperita* cells in suspension culture, effects of media formulation, plant growth hormones, initial pH of the media, and cold stress on the production of essential oil and menthol were analyzed. Among the media employed, Lin-Staba medium resulted in the best essential oil production. Addition of 100 mg/l of yeast extract to the Lin-Staba medium induced the cells to produce large amount of essential oil and high content of menthol (0.39 g/l and 19.6%, respectively). In the effect of plant growth hormone, auxine were more effective than cytokinins. At initial pH of 4.7, oil production was good but menthol content was low. However at pH 5.7 the trend was reversed. When the culture temperature was lowered from 27°C to 10°C during 6 hour-dark period, growth was not changed much but essential oil production and menthol content was increased and reached to 528 mg/l and 21%, respectively.