

## 지치세포 배양에 의한 $\gamma$ -Linolenic Acid 생산

김용환\* · 김정봉 · 류태훈 · 이철희<sup>1</sup> · 황영수

농촌진흥청 농업과학기술원 생화학과, <sup>1</sup>충북농촌진흥원 단양마늘시험장

## Production of $\gamma$ -Linolenic Acid by Cell Suspension Cultures of *Lithospermum erythrorhizon*

Yong-Hwan KIM\*, Jung-Bong KIM, Tae-Hun RYU, Cheol-Hee LEE<sup>1</sup>, and Young-Soo HWANG

Biochemistry Division, Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707.

\*Corresponding author. (<sup>1</sup>Present address: Danyang Garlic Exp. Station, Chungbug Provincial RDA.)

To produce  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) by cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, we optimized medium compositions including carbon sources, nitrogen sources and growth regulators. MS basal medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D was effective for callus induction from mesophyll tissue. Addition of sucrose at 88 mM concentration induced active proliferation of suspension cells and increased GLA content. Increased supplement of potassium nitrate as nitrogen source resulted in proliferous cell growth and increased total fatty acid content. Abscisic acid increased cell growth and fatty acid content in callus culture, whereas as it had an inhibitory effect in suspension cell culture.

**Key words:** abscisic acid, fatty acid, growth regulators

Gamma-linolenic acid ( $\gamma$ -18:3, GLA)는 탄소수가 18개이며 6, 9, 12번 탄소에 각각 이중결합을 가지고 있는 직쇄지방산으로서 체내에서는 합성되지 않는 필수지방산이며 vitamin F의 일종으로 알려져 있다. GLA는 혈액점도강하 및 혈전 제거능력이 있어 뇌졸중, 동맥경화, 심근경색 방지 및 근육 수축, 노화방지, 그리고 비만억제 등에 작용하는 국소호르몬인 prostaglandins의 전구체로 밝혀졌으며, 약리성 지방산으로서의 수요가 확대되고 있다(Hinman, 1972; 일본식물자원연감, 1990).

GLA는 지금까지 몇 가지 식물종에 분포하고 있는 것으로 알려져 있지만 특히 *Onagraceae*에 가장 많은 것으로 밝혀졌고, *Boraginaceae*, *Scrophulariaceae* 및 *Saxifrageae* 등이 주요 자원식물이다(Wolf et al., 1983). 100여 종의 국내 자원식물로부터 GLA 함유 식물을 탐색한 결과, 지치(*Lithospermum erythrorhizon* SIEB, et ZUCC)의 영양기관에서 0.3 mg/g dry weight (DW)의 GLA가 검출되었다(Kim et al., 1995). GLA의 기내생산 연구는 borage의 체세포배 배양(Whipkey et al., 1988)이 있으나 탈분화세포의 배양에 의한 보고는 없는 상태이다. 본 연구는 GLA의 기내생산조건을 확립하기 위하여

지치의 캘러스를 현탁배양하여 세포의 성장과 지방산 생산에 미치는 최적조건을 구명하였다.

### 재료 및 방법

#### 캘러스유도 및 현탁배양

캘러스 유도에는 지치종자의 종피를 제거한 후 2% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 살균하여 MS 기본배지에서 발아시키고 한달동안 발육시킨 후 본엽을 explant(5 × 5mm)로 사용하였다. 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 유도된 캘러스 약 1 g을 잘게 부순 다음 0.7 mg/L 2,4-D 및 0.03 mg/L kinetin이 첨가된 MS 액체배지(50 mL/250 mL Erlenmeyer flask)에 접종하여 약 3000 lx 조명과 120 rpm의 gyratory shaker에서 배양하였으며 10일 간격으로 계대배양하였다.

탄소원, 질소원, 생장조절제의 영향

지방산과 GLA함량증진을 위한 탄소원과 질소원, 생장조절제의 배지내 적정조성탐색은 우선 탄소원의 경우 osmolarity를 고려하여 sucrose를 기준으로 1, 3, 5, 7 및 10% 수준인 29.2, 88.0, 146.0, 205.0, 및 292.0 mM 농도의 sucrose, glucose, fructose를 첨가하였다. 질소원으로서의 ammonium nitrate와 potassium nitrate는 MS기본배지의 농도인 20.6 mM 및 18.3 mM을 두배 또는 세배 추가하여 처리하였다. 생장조절제로서는 auxin (2,4-D, IAA)과 cytokinin (kinetin, BA)을 각각 10 µM 농도로 첨가 하였다.

모든 실험은 3 반복으로 수행하였으며 원심분리하지 않은 현탁배양세포 10 mL를 MS액체배지에 접종하였고 배양 10 일후에 세포를 수확하여 생장량 측정, 지방산 및 GLA분석을 수행하였다. 현탁세포 생장량은 현탁배양세포를 graduated 50 mL 원심분리관에 옮겨 담고 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 packed cell volume (PCV, mL)으로 측정 하였다.

지방산 및 GLA의 분석

동결건조기에서 건조한 재료를 마쇄하여 chloroform:methanol (2:1, v/v) 용액으로 추출한 후 BF<sub>3</sub>/MeOH로 esterification 한 다음 carbowax column (HP 20 M, 0.2 mm, 25 m)을 연결한 Hewlet Packard 5890 series II gas chromatography로 지방산 및 GLA를 분리, 정량 하였다. 내부표준물질로는 재료에 함유되어 있지 않은 pentadecanoic acid (15:0, PDA)를 분석시료당 0.5 mg을 첨가하였다. 지방산의 함량은 PDA에 대한 각 peak의 면적비율로 환산하였으며 GC-MS를 사용하여 분자량을 확인하였다(Kim and Janick, 1991).

결과 및 고찰

캘러스 유도

무균적으로 기내 육성한 지치 엽육조직으로부터 캘러스 유도는 1.0 mg/L 2,4-D의 단용처리구에서 가장 왕성하였다 (Table 1). 2.0 mg/L 2,4-D까지는 0.5 mg/L kinetin의 공동처

Table 1. Effect of growth regulators on the callus induction of *Lithospermum erythrorhizon*.

Kinetin (mg/L)	2, 4-D (mg/L) <sup>a</sup>			
	1	2	3	4
0	+++	++	+	+
0.5	++	++	+	+

<sup>a</sup> +++: very good, ++: good, +: poor.

리 효과가 인정되었으나 2,4-D 단용처리보다는 저조하였다.

GLA 생산에 미치는 탄소원의 영향

탄소원의 종류에 따른 세포생장(PCV)을 살펴보면 sucrose 88 mM(3% 수준)에서 가장 왕성하였으며 모든 종류의 탄소원에서 205 mM을 초과하는 경우에는 급격하게 감소하였다. 단위건물중 당 총지방산(TFA) 함량은 세포생장량과는 반대로 sucrose에서 가장 낮았으며 fructose 88 mM에서 가장 높은 함량을 나타내어 탄소원의 종류에 따른 차이가 뚜렷 하였다.

GLA의 생산은 탄소원의 종류 및 처리농도에 따라 차이가 있었으며 건물중 g당 총지방산 함량은 glucose 146 mM, fructose 88 mM, 그리고 sucrose 29 mM에서 최고치를 나타냈다. Sucrose처리에서 TFA, GLA비율이 전반적으로 높으며 (11.9%) 단위건물중당 TFA함량은 가장 낮게 나타났다. 이 결과는 탄소원의 종류에 따라 지방산 대사과정이 영향을 받을 수 있다는 사실을 의미하며, glucose를 탄소원으로 배양한 *Chlorella saccharophila*의 경우에는 지방산의 불포화도가 현저히 높아지며 지방산함량이 증가하였다는 보고가 있으나(Tan and Johns, 1991) 본 연구에서는 그러한 현상을 발견할 수 없었다. 그리고 이들 탄소원의 농도가 높아질수록 배양기간이 경과함에 따라 세포가 갈색으로 변색되는 정도가 빨랐고 최고처리농도에서는 세포덩어리가 생기면서 흑변하는 현상이 발생하였다. 그러나 일반적으로 각 탄소원의 88 mM과 146 mM농도의 처리에서는 현탁배양세포가 노

Table 2. Effect of carbon sources on cell growth and production of fatty acid and γ-linolenic acid in suspension-cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*.

Source	Conc (mM)	Cell growth (PCV, mL±SE)	TFA <sup>a</sup> (mg/g DW±SE)	GLA <sup>b</sup> (% of TFA)
Glucose	29.2	10.5±1.0	15.7±0.5	2.9
	88.0	13.5±0.9	32.7±0.8	6.7
	146.0	14.7±0.9	32.9±5.3	7.3
	205.0	12.5±0.3	31.9±1.7	5.3
	292.0	8.7±1.3	27.5±1.2	5.2
Fructose	29.2	9.3±0.4	22.5±1.7	4.0
	88.0	11.8±0.8	39.9±1.2	6.1
	146.0	14.2±0.6	33.9±2.0	5.5
	205.0	8.2±1.4	30.4±0.3	3.9
	292.0	7.5±0.5	28.2±0.6	3.2
Sucrose	29.2	21.0±0.6	19.3±3.0	6.6
	88.0	32.2±1.7	16.4±2.0	11.9
	146.0	16.8±0.6	16.5±0.8	9.2
	205.0	10.5±0.5	17.6±1.2	7.2
	292.0	6.5±0.3	12.6±0.7	9.5

<sup>a</sup>Total fatty acid.

<sup>b</sup>γ-Linolenic acid.

랑색을 나타내며 건전한 성장을 하였다.

GLA 생산에 미치는 질소원의 영향

Ammonium nitrate 처리에서는 농도의 증가에 따른 세포 성장, TFA함량, GLA의 함량비율에 차이가 없었다. 그러나 potassium nitrate의 경우에는 농도가 증가함에 따라 세포 성장, TFA, TFA중 GLA함량비율이 증가하여 56.3 mM에서 최고치를 나타내었으며, 단위세포(PCV, mL)당 GLA함량도 56.3 mM농도에서 가장 많았다. 반면에 ammonium nitrate의 경우에는 고농도에서 갈변세포가 증가하였다.

Potassium nitrate에서는 기본농도인 18.8 mM처리에서 세포의 갈변현상이 심하였으며 최고처리농도인 56.3 mM처리에서 가장 왕성한 성장을 보였다.

$\text{NO}_3^-$ 는 세포배양시 가장 효과적인 질소원으로 보고되고 있으며 (Jessup and Fowler, 1976),  $\text{NO}_3^-$ 를 함유하는 배지에  $\text{NH}_4^+$ 를 첨가함으로써 soybean 세포생장이 현저하게 증가를 보인 것으로 보고되어 있다(Bayley et al. 1972). 본 실험에서는 기존의 보고들 보다 훨씬 높은  $\text{NO}_3^-$ 농도에서 최고의 세포성장 및 GLA축적이 현저한 점이 특이한 것으로 생각된다.

Table 3. Effect of ammonium or potassium nitrate concentrations on cell growth and production of fatty acid and  $\gamma$ -linolenic acid in the suspension-cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*.

Nitrogen sources	Conc (mM)	Cell growth (PCV, mL $\pm$ SE)	TFA <sup>a</sup> (mg/g DW $\pm$ SE)	GLA <sup>b</sup> (% of TFA)
Ammonium nitrate	20.6	10.0 $\pm$ 4.0	25.0 $\pm$ 4.0	6.3
	41.2	9.0 $\pm$ 3.1	23.0 $\pm$ 3.3	5.7
	61.8	10.5 $\pm$ 2.3	24.2 $\pm$ 2.1	6.3
Potassium nitrate	18.3	9.7 $\pm$ 3.0	19.7 $\pm$ 2.7	5.8
	37.6	12.6 $\pm$ 2.6	27.4 $\pm$ 1.4	6.9
	56.3	16.7 $\pm$ 2.1	25.2 $\pm$ 2.1	7.9

<sup>a</sup>Total fatty acid.  
<sup>b</sup> $\gamma$ -Linolenic acid.

GLA 축적에 미치는 성장조절제의 영향

IAA를 제외한 모든 처리에서 세포성장량이 감소하였으며 TFA함량은 2,4-D의 경우가 약 29 mg/g DW로서 무처리에 비하여 현저히 많은 축적을 보였다. 따라서 2,4-D처리에서 세포성장량이 적고 GLA함량비율이 낮음에도 불구하고 총 지방산함량이 많아 단위세포량(mL)당 GLA함량은 가장 높았다. 그리고 cytokinin 단독처리 배양의 경우에는 auxin 단독처리의 경우보다 갈변 및 세포덩어리 형성이 빨랐다. 본 연구에서는 각 성장조절제의 처리농도를 10  $\mu$ M로 고정하여 실시하였다. 각각의 최적 처리농도는 추후 구명되어야 할

Table 4. Effect of auxin and cytokinin on cell growth and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in suspension cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*.

Hormone (10 $\mu$ M)	Cell growth (PCV, mL $\pm$ SE)	TFA <sup>a</sup> (mg/g DW $\pm$ SE)	GLA <sup>b</sup> (% of TFA)	
Hormone free	17.5 $\pm$ 4.5	19.6 $\pm$ 3.0	9.7	
Auxin	2, 4-D	13.5 $\pm$ 1.0	28.9 $\pm$ 0.7	6.7
	IAA	23.3 $\pm$ 1.0	19.4 $\pm$ 3.7	9.6
cytokinin	kinetin	11.3 $\pm$ 0.3	21.8 $\pm$ 1.5	9.1
	BA	11.3 $\pm$ 1.0	19.7 $\pm$ 1.0	8.2

<sup>a</sup>Total fatty acid.  
<sup>b</sup> $\gamma$ -Linolenic acid.

Table 5. Effect of ABA on fatty acid and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in the callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*.

ABA conc.	Callus growth (mg FW/explant $\pm$ SE)	TFA <sup>a</sup> (mg/g DW $\pm$ SE)	GLA <sup>b</sup> (% of TFA)
Free	520 $\pm$ 60	16.2	10.3
10 <sup>-7</sup> M	670 $\pm$ 80	20.2	14.5
10 <sup>-6</sup> M	450 $\pm$ 70	22.6	15.3
10 <sup>-5</sup> M	200 $\pm$ 15	11.4	14.2

<sup>a</sup>Total fatty acid.  
<sup>b</sup> $\gamma$ -Linolenic acid.

Table 6. Effect of ABA on cell growth and production of fatty acid and  $\gamma$ -linolenic acid in suspension-cultured cells of *Lithospermum erythrorhizon*.

ABA conc.	Callus growth (mg FW/explant $\pm$ SE)	TFA <sup>a</sup> (mg/g DW $\pm$ SE)	GLA <sup>b</sup> (% of TFA)
Free	16.3 $\pm$ 0.7	17.8 $\pm$ 0.5	7.9
10 <sup>-7</sup> M	16.0 $\pm$ 0.9	20.0 $\pm$ 4.0	7.8
10 <sup>-6</sup> M	11.2 $\pm$ 0.3	17.2 $\pm$ 2.8	6.3
10 <sup>-5</sup> M	11.2 $\pm$ 0.8	15.4 $\pm$ 1.7	7.0

<sup>a</sup>Total fatty acid.  
<sup>b</sup> $\gamma$ -Linolenic acid.

것으로 생각된다.

ABA는 배양세포 및 현탁배양세포 유래 체세포배의 지방산 함량을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Kim and Janick, 1991). 본 실험에서는 ABA를 10<sup>-7</sup>M ~ 10<sup>-5</sup>M농도로 캘러스유도용 고체배지와 세포현탁배양배지에 첨가하여 세포생장과 지방산함량 및 GLA함량의 변화를 조사하였다 (Table 5 and 6). 캘러스증식은 ABA 10<sup>-7</sup>M에서 유의적으로 증가하였고 TFA함량은 10<sup>-7</sup>M 및 10<sup>-6</sup>M농도에서 현저히 증가하였다. 그러나 현탁배양의 경우에는 ABA가 세포증식에 저해적 요인으로 작용하였으며 총지방산 함량은 10<sup>-7</sup>M

ABA농도에서만 유의적으로 증가하였다. GLA함량비율은 ABA에 의하여 영향을 받지 않았으며 캘러스에서 현탁배양 세포보다 높은 함량비율이 검출되었다.

본 실험에 의하여 지치현탁배양세포는 식물체 함량(0.3 mg/g DW)(Kim et al, 1995)보다 최고의 경우 단위건물중 당 약 8배 정도의 GLA함량을 높일 수 있었으며 배양세포의 증식속도를 감안한다면 대량생산이 가능할 것으로 보인다. 이상의 결과들은 진탕기상의 flask수준에서의 실험결과이므로 대량배양과 대량생산을 위한 생물배양기에 적용하기 위해서는 보다 세밀하고 복합적인 실험이 요구되리라고 생각된다

## 적 요

지치(*Lithospermum erythrorhizon* SIEB, et ZUCC)의 잎조직으로부터 유도한 캘러스를 현탁배양하여 약리성 지방산인  $\gamma$ -linolenic acid (GLA)를 생산하는 기술을 확립하고자 탄소원, 질소원, 생장조절제의 영향을 조사하였다.

캘러스 유도는 1.0 mg/L 2,4-D 단용첨가시 가장 왕성하였다. Sucrose 88 mM농도에서 세포생육이 가장 왕성하고 총 지방산(TFA)중 GLA비율이 높아 단위건물중당 TFA함량이 가장 낮았음에도 flask당 GLA생산량은 가장 많았다. 질소원으로서 potassium nitrate농도증가는 세포생장 및 지방산함량 및 GLA함량을 증가시켰으며 최고 처리농도인 56.3 mM에서 최고수준을 나타냈다. IAA 첨가는 배양세포 성장량을 증가시켰고 2,4-D는 배양세포내의 총지방산 함량을 높이는 결과를 나타내었으나, kinetin과 BA는 세포생육에 저해적 영향을 나타냈다.  $10^{-7}$  M ABA는 캘러스생장을 유의적으로

증가시켰으며 TFA 및 GLA함량도 증가시켰으나 현탁배양 세포의 생육과 지방산 축적에는 저해적으로 작용하였다.

## 인 용 문 헌

- Bayley JM, King J, Gamborg OL (1972) The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta* 105: 15-20
- Hinman JW (1972) Prostaglandins. *Annu Rev Biochem* 41: 161-178
- Jessup W, Fowler MW (1976) Interrelationship between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. I. Effect of glutamate and nitrate as alternative nitrogen sources on cell growth. *Planta* 132: 119-125
- Kim JB, Kim YH, Lee CH, Hwang YS, Park RD (1995) Screening of  $\gamma$ -linolenic acid resources and fatty acid composition in Korean native medicinal plants. *Korean J Med Crop Science*. (In press)
- Kim YH, Janick J (1991) Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of *celery somatic embryos*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 24: 83-89
- Tan CK, Johns MR (1991) Fatty acid production by heterotrophic *Chlorolla saccharophilus*. *Hydrobiologia* 215: 13-19
- Whipkey A, Simon JE, Janick J (1988) In vivo and in vitro lipid accumulation in *borage officinalis* L. *JAOCS* 65: 979-984
- Wolf RB, Kleiman R, England RE (1983) New sources of  $\gamma$ -linolenic acid. *JAOCS* 60: 1858-1860
- 日本植物資源年監, 1990.  $\gamma$ -リノレン酸. pp255-258.

(1995년 3월 17일 접수)