생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
27(4) : 289~294(1996)

세포 현탁배양에 의한 현호색 알칼로이드의 생산

신승원,* 장정인, 지형준[1]

덕성여자대학교 약학대학, [1]서울대학교 천연물과학연구소

Studies on Production of Alkaloid by Plant Cell Culture of *Corydalis remota*

Seung-Won Shin,* Jung-In Chang and Hyung-Joon Chi[1]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea; and [1]Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract – In previous paper, we described the induced callus of *Corydalis remota* contains a significant amount of alkaloids. This study describes an optimal condition to maximize alkaloid production. The suspension cultures maintained alkaloid production ability after fifth subculture and a small amount of alkaloid seemed to be released out of cells. The yields of alkaloid by cultured cells was varied depending on the concentrations of NAA, carbon sources and phosphate ion and depending on the vitamin combinations and concentrations. Biosynthetic precursor and an elicitor treatment also affected the total alkaloid yield of the cultures. The optimal conditions for alkaloid production were as follows: 1) MS basal salt containing 30 g/l of glucose, 1.0 mg/l of NAA, and vitamins of LS medium should be used. 2) The culture should be treated with tyrosine 20 mg/l, and yeast extract 1.5 ml/l after the culture reached a stationary phase of growth. Five alkaloids were isolated from the cultures and they were characterized. The spectral data unambiguously revealed that the isolated compounds were dihydrosanguinarine, protopine, tetrahydropalmatine, allocyptopine and ambinine, respectively.

Key words – *Corydalis remota*; Papaveraceae; cell suspention culture; NAA; tyrosine; yeast extract; *Corydalis* alkaloids.

전보[1]에서 한국에 자생하고 있는 현호색(*Corydalis remota* Fish. ex Maxim.)의 미숙 종자로부터 캘러스를 유도하고 유도된 캘러스를 적정배지에서 배양하여 캘러스에 생성·축적된 알칼로이드 성분을 확인하고 세포현탁배양에 적합한 캘러스를 선발하여 알칼로이드 고생산세포주에 관하여 그 결과를 보고한 바 있다.

이 논문에서는 현호색의 세포 현탁배양에 있어서 alkaloid의 생산성을 높일 수 있는 조건을 규명할 목적으로, 계대배양에 따른 세포내 alkaloid의 함량변화 및 배양세포와 배양세포로부터 배지로 유출되는 alkaloid를 분석하고, 또한 sucrose, 인산염, α-naphthalene acetic acid (NAA), 비타민, tyrosine 등의 첨가가 alkaloid 생산에 미치는 영향 및 yeast extract가 alkaloid 생산에 있어서 elicitor로 작용하는가를 실험하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료, 배지 및 알칼로이드의 정량 – 전보[1]와 같은

*교신저자 : Fax 02-901-8386

방법으로 수행하였으며, 배양조건에 따른 세포의 성장과 알칼로이드 생성량에 대한 실험은 250 ml 플라스크를 사용하여 각각 5반복씩 MS배지 80 ml에 세포 생중량으로 1.8 g씩을 접종시켜 26±1℃에서 암상태로 100±10 rpm로 회전진탕하여 20일동안 배양한 후 세포를 수확하여 세포의 생중량을 측정하였으며 수확한 세포는 동결건조한 후 전보[11]에 서술한 알칼로이드 정량방법에 따라 정량하였다.

배양조건이 알칼로이드 생성에 미치는 영향 - Sucrose농도를 20 g/l에서 60 g/l까지 변화시킨 배지에서 배양한 후 세포의 성장과 알칼로이드 생성량을 TLC scanner를 사용하여 분석하였다. 탄소원의 종류가 알칼로이드 생산에 미치는 영향을 실험하기 위하여 fructose, lactose, glucose 및 sucrose를 각각 30 g/l의 농도로 MS배지 80 ml를 함유한 배지에서 배양하였고, MS기본배지에 배양액 중의 인산염(KH_2PO_4)의 농도를 0 mM, 0.25 mM, 0.75 mM, 1.25 mM, 1.75 mM 및 2.25 mM까지 변화시켜 실험하였다.

배양액 중의 NAA농도는 0.5 mg/l에서 8.0 mg/l까지, tyrosine은 배양초기에 각각 2.0 mg/l와 20 mg/l의 농도로 첨가한 배양액 80 ml를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 세포를 생중량으로 1.8 g씩을 접종하여 20일간 배양하였고, 배양액 80 ml를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 세포를 생중량으로 1.8 g씩을 접종하여 배양하다가 세포의 생장과 알칼로이드 함량이 최고치에 달한 배양중기인 20일 후에 각각 2.0 ml/l와 20 mg/l의 농도로 배양액에 첨가한 후 8일 동안 배양하였을 때의 알칼로이드 함량을 비교하였다. 또한, *Corydalis* alkaloid의 배양액 내로의 용출 여부를 시험하기 위하여 세포를 수확하고 남은 배양액을 NH_4OH로 pH 10으로 조정한 후 $CHCl_3$로 추출한 알칼로이드분획을 분석하였다.

또한 세포를 생중량으로 1.8 g씩 접종하여 20일간 배양한 후 yeast extract 100 mg을 증류수 10 ml에 용해시켜 만든 yeast stock solution을 각각 0.5 ml, 1.5 ml씩을 배양액에 첨가하여 72시간 동안 배양한 후 세포를 수확하고, 계속해서 배양액을 NH_4OH로 알칼리성으로 한 후 $CHCl_3$으로 추출하였다.

알칼로이드의 분리 - Scheme 1과 같이 배양세포를 추출한 후, columm chromatography를 행하여 alkaloid를 분리하였다.

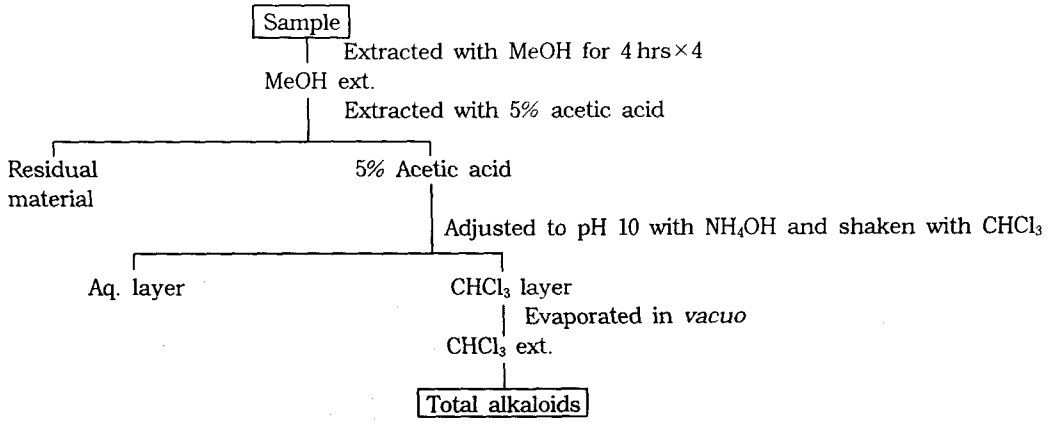
결과 및 고찰

배양기간에 따른 세포생장 및 알칼로이드 함량변화

Table 1. Vitamins of culture media

Vitamins \ Media	MS	B5	LS	NN	SH
Biotin					0.05
Glycine	2.0				2.0
Folic acid	100				0.5
Myo-inositol	100	100	100	100	1000
Nicotinic acid	0.5	1.0		5.0	5.0
Pyridoxine	0.5	1.0		0.5	0.5
Thiamine	1.0	10.0	1.0	0.5	5.0

MS: Murashge & Skoog(1962), B5: Gamborg's (1968), LS: Linsmaier & Skoog(1965), NN: Nitsch & Nitsch(1969), SH: Schenk & Hildebrandt(1972).



Scheme 1. Extraction of total alkaloid for column chromatography.

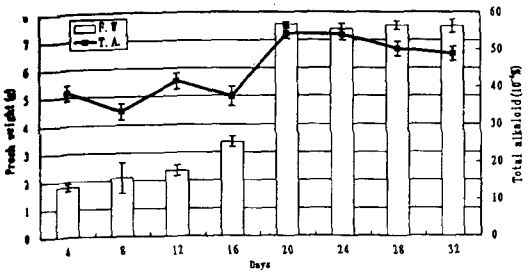


Fig. 1. Effects of culture period on the growth rate and alkaloids production in suspension cultured cells.

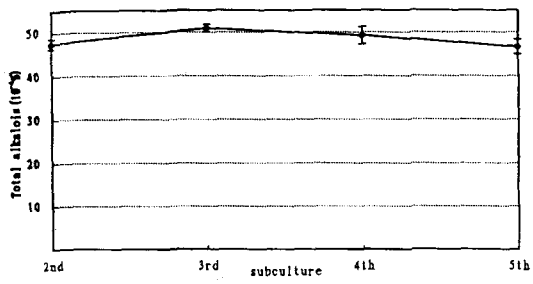


Fig. 2. The contents of *Corydalis* alkaloids from 2nd to 5th subculture.

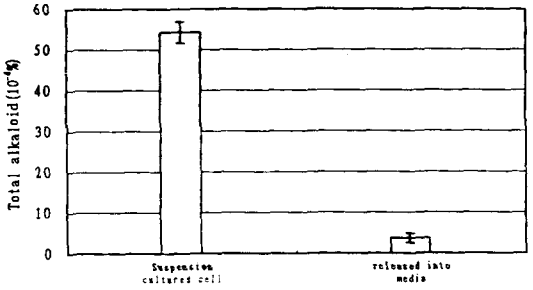


Fig. 3. Contents of total alkaloids in cells and broth.

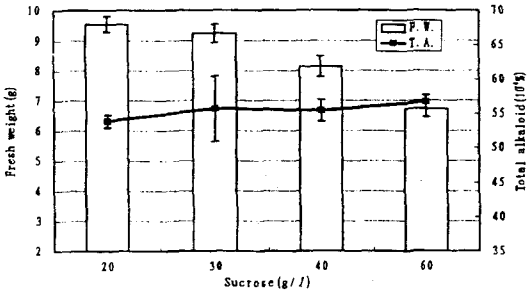


Fig. 4. Effects of sucrose concentration on cell growth rate and alkaloids production in suspention cultured cells of *Corydalis remota*.

-세포 현탁배양용으로 선발한 세포주 A의 생장곡선은 전형적인 세포생장곡선을 나타내었다. 즉, 세포의 생장은 배양 20일경에서 최고의 생장율을 나타내었고, 그 이후에는 거의 정지하였다. 알칼로이드 함량 역시 배양 20일 경에 54.3×10^{-4}%으로 가장 높았으며 28일경 부터는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1).

계대배양에 따른 알칼로이드 함량변화 - 세포 현탁배양에 있어서 알칼로이드 생산성을 검정하기 위하여 현탁배양 세포를 20일 간격으로 계대배양하여 알칼로이드 함량을 분석한 바, 5대까지의 계대배양을 하여도 안정하게 알칼로이드를 생성하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

세포 현탁배양에서 배양액내로 알칼로이드 유출 - *Corydalis* alkaloid[2]가 배양액내로 유출되어 나오는지를 관찰하기 위하여 배양세포를 수확한 후의 배양액에 NH_4OH로 액성을 알칼리성으로 한 후 $CHCl_3$로 추출하여 총 알칼로이드 분획을 얻어 TLC scanner를 사용하여 알칼로이드 함량을 구한 바, 총 알칼로이드 함량이 3.7×10^{-4}%로서 세포내의 알칼로이드 함량 54.3×10^{-4}%에 비하여 소량만이 배양액내로 유출되어 나오는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

배양조건이 알칼로이드 생성에 미치는 영향 - 실험결과 MS기본배지에 배양액 중의 sucrose의 농도를 20 g/l로 했을 때 세포의 생장이 가장 좋았으며, sucrose의 농도가 증가할수록 세포의 생장은 떨어지는 경향을 보였고, 알칼로이드 생성에 있어서는 농도에 따른 차이가 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4). 현호색의 세포는 탄소원의 종류에 따라서 세포생장에 차이를 보여 fructose가 세포생장이 가장 좋았으며, glucose 첨가시에는 알칼로이드 생산량이 가장 높았고, lactose의 첨가는 세포생장이나 알칼로이드 함량 모두에서 저조한 결과를 나타내었다.

이는 *Digitalis purpurea* 세포배양시에 sucrose, glucose 및 raffinose는 세포생장과 digitoxin 생성이 양호하였으나 maltose, fructose 및 galactose의 경우에는 세포생장은 양호하였으나, digitoxin 생성에 부적합하였다는 결과와 비슷하였다[3,4](Fig. 5).

인산염이 첨가되지 않았을 때는 세포생장은 좋았

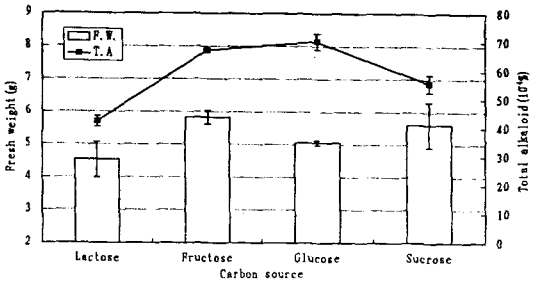


Fig. 5. Effects of carbon sources on cell growth rate and alkaloids production in suspension cultured cells of *Corydalis remota*.

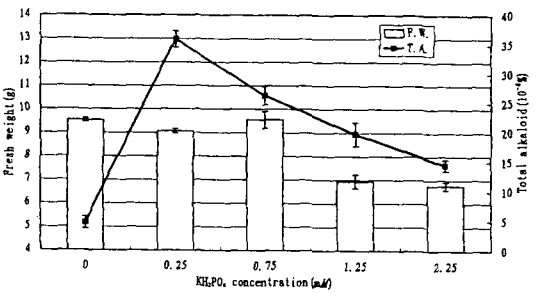


Fig. 6. Effects of KH_2PO_4 concentration on cell growth rate and alkaloids production in suspension cultured cells of *Corydalis remota*.

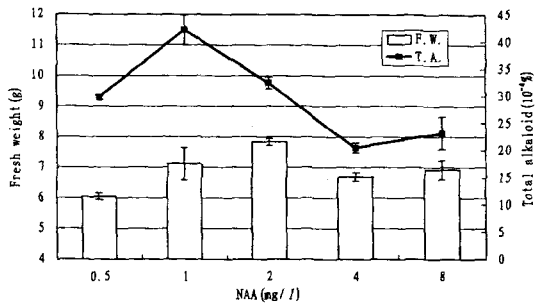


Fig. 7. Effects of NAA concentration on cell growth rate and alkaloids production in suspention cultured cells of *Corydalis remota*.

으나 알칼로이드 함량은 극히 낮았다. 인산염의 농도가 0.25 mM일때 알칼로이드 생성이 가장 많았으며, 이보다 높은 농도에서는 알칼로이드 생성이 감소되었다(Fig. 6).

NAA 1.0 mg/l에서 8.0 mg/l까지는 세포의 생장에는 별 차이가 없었으나, 알칼로이드 생산에서는 NAA 1.0 mg/l를 첨가한 배지에서 가장 많이 생산됨을 알 수 있었다(Fig. 7).

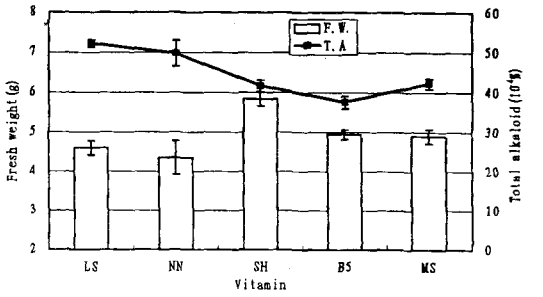


Fig. 8. Effects of various types of vitamin on cell growth rate and alkaloids production in suspention cultured cells of *Corydalis remota*.

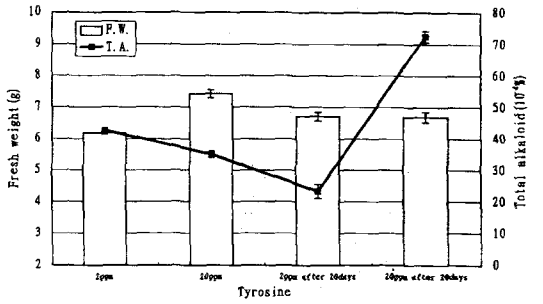


Fig. 9. Effects of tyrosine on cell growth rate and alkaloids production in suspention cultured cells of *Corydalis remota*.

세포생장에는 SH배지의 비타민 조성이 적합하였으나, 알칼로이드 생성에는 nicotinic acid와 pyridoxine이 배제된 LS배지의 비타민 조성이 적합한 것으로 나타났다(Fig. 8).

Sato등[5]이 일황련(*Coptis japonica*)을 세포배양하여 berberine을 생성하는 실험에서 berberine의 전구물질인 tyrosine을 첨가하였을때 알칼로이드 생성률이 높아진다고 보고한 바 있으므로 현호색의 현탁배양에서도 이와같은 효과가 있는지 시험하기 위하여 tyrosine을 배양 초기와 배양 중기로 나누어 배양액에 첨가하여 배양한 결과, 배양초기에 tyrosine 20 mg/l을 첨가한 경우가 세포의 생장에 좋은 결과를 나타내었으나, 알칼로이드 함량은 tyrosine 2 mg/l를 첨가한 경우가 더 높았다. 또 20일 후에 첨가하였을 때에는 세포의 생장은 거의 비슷하였으나 알칼로이드 함량은 tyrosine 20 mg/l 첨가시에 훨씬 높은 생산량을 나타냈으며(Fig. 9), 배양액으로의 알칼로이드 유출량은 배양세포의 알칼로이드 함량보다 오히려 배양액으로 유출된 알칼로이드량이 더 많았고 특히 배양중기에 tyrosine

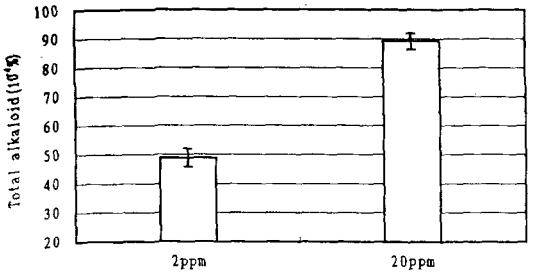


Fig. 10. Effects of tyrosine on alkaloids contents of broth.

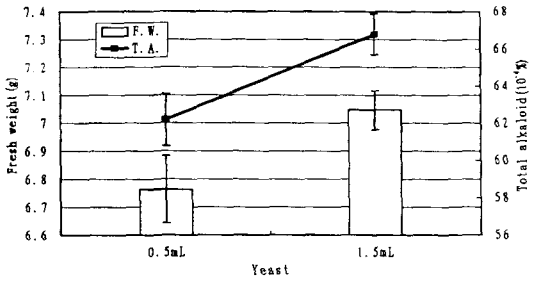


Fig. 11. Effects of yeast extract treatment on cell growth rate and alkaloids contents in suspention cultured cells of *Corydalis remota*.

20 mg/l를 첨가했을 경우 배양액으로 용출된 알칼로이드 함량은 89.1×10^{-4}%로서 생약 현호색의 알칼로이드 함량인 99.4×10^{-4}%와 비교하였을 때 크게 떨어지지 않음을 알 수 있었다(Fig. 10).

여러가지 종류의 자극에 의한 생산능 향상 즉, elicitation은 배양세포의 일반적인 특성이라 할 수 있다. 현호색 세포배양에 있어서도 elicitor를 이용하여 Corydalis alkaloid 생산을 증가시키기 위하여 biotic elicitor로서 yeast extract(Difco)를 써서 시험한 결과, yeast solution 1.5 ml 첨가시에 세포생장과 세포내에 생성 축적된 알칼로이드 함량이 많았으며, 배양액내의 알칼로이드 함량을 비교한 결과 yeast extract 0.5 ml/l 첨가시에 1.5 ml/l 첨가보다 더 많은 양의 알칼로이드가 배양액내로 유출되어 나옴을 알 수 있었다(Fig. 11, 12).

알카로이드의 분리 및 동정 - 현탁배양한 현호색의 세포를 추출하여 chromatography의 방법으로 순수분리하여 spectral data를 분석하고, 표준품과 비교한 결과, 이 성분들은 dihydrosanguinarine, protopine, tetrahydropalmatine, allocryptopine 및 ambinine인 것으로 확인되었다.

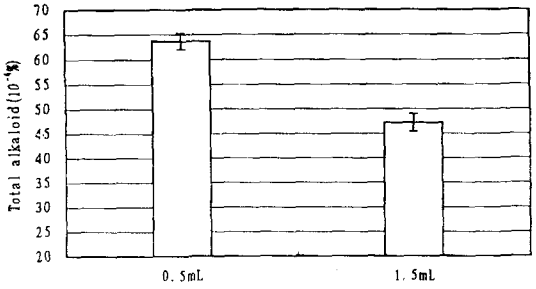


Fig. 12. Effects of yeast extract treatment on alkaloids contents of broth.

결 론

세포현탁배양에 있어서 5대의 계대배양을 거쳐도 현호색 세포주 A, B는 일정한 알칼로이드 생산능력을 나타내었고, 소량의 알칼로이드가 세포밖으로 유리되어 나옴을 알 수 있었다. 총 알칼로이드 함량은 NAA, 탄소원, 인산염, vitamin류에 따라 차이가 있으며, 생합성 전구물질과 elicitor에 의해서도 총 알칼로이드 생산에 영향을 주는 것으로 나타났다.

현호색 세포배양에 있어서 알칼로이드 생성의 최적조건은 다음과 같다.

1) MS기본배지에 glucose 30 g/l, NAA 1.0 mg/l, LS 배지와 같은 비타민류의 첨가
2) 알칼로이드 생합성 전구물질인 tyrosine 20 mg/l을 정지상(Stationary phase)에서 첨가
3) Elicitor로서 yeast extract 1.5 ml의 첨가

위 조건하에서 현탁배양한 배양세포로 부터 dihydrosanguinarine, protopine, tetrahydropalmatine, allocryptopine 및 ambinine을 분리, 동정하였다.

사 사

이 논문의 일부는 한국학술진흥재단의 학술연구조성비 자유공모과제(1991-1994) 및 덕성여자대학교 교내연구비(1995) 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 장정인, 신승원, 지형준 (1995) 식물세포배양에 의한 *Corydalis* alkaloid의 생산(I). 생약학회지 26: 419-425.

2. Imaseki, I. and Taguchi, S. (1962) Studies on the components of *Corydalis* spp. I. Alkaloids of the Chinese *Corydalis*. On the new bases corydalmine and dehydrocorydalmine. *Yakugaku Zasshi* 82: 1214-1219.
3. Wang, F. X. and Yan, X. (1981) Studies on suspension culture of *Corydalis ambigua* callus I. Effects of supplementary sugar on suspension culture of *Corydalis ambigua* callus. *Chung Ts'ao Yao* 12: 34-37.
4. Hagimori, M., Matsumoto, T. and Obi, Y. (1982) Studies on the production of *Digitalis* by plant tissues culture III., Effect of nutrients on *Digitalis*-glycosides formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* grown in liquid media. *Plant Cell Physiol.* 23: 1205-1208.
5. Sato, F. and Yamada, Y. (1984) High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* 23: 281-285.

(1996년 9월 20일 접수)